

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

M. G. Quinga Socasi¹, M. A. Chavez-Larrea¹, F.W. Proaño Pérez¹

¹Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Departamento de Ciencias de la Vida-Ingeniería en Biotecnología. Casilla 171-5-231-B, Sangolquí-Ecuador.

E-mail: miltongquina@hotmail.com; machavez@espe.edu.ec; fwproano@espe.edu.ec

RESUMEN

Investigaciones centradas en técnicas no invasivas son fundamentales para la conservación y el manejo de vida silvestre en el Ecuador. En este estudio se probaron los métodos SDS/CAI, CTAB/CAI y 2CTAB/CAI para extraer ADN genómico del lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*) a partir de muestras fecales recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca. Los resultados visualizados en geles de agarosa mostraron 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 el tercero (2CTAB/CAI) con valores promedio de 51.16 ng/μl de ADN y pureza de 1.65. Una vez extraído el ADN se amplificó mediante PCR un fragmento de 200 pb del gen mitocondrial citocromo b. La técnica utilizada es relativamente barata comparada con kits de extracción y abre la posibilidad de varios estudios de ecología molecular en el lobo de páramo en el Ecuador.

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

ABSTRACT

Research focused on noninvasive techniques are essential for the conservation and management of wildlife in Ecuador. This study tested the methods SDS / CAI, CTAB / CAI and 2CTAB/CAI to extract genomic DNA Andean fox (*Lycalopex culpaeus*) from fecal samples collected in the Cayambe-Coca National Park. The results visualized on agarose gels showed a positive extraction for the three methods. DNA quantification and purity assessment by measuring its absorbance at 260/280 nm showed that the best method is the third (2CTAB/CAI) with average values of 51.16 ng/ul of DNA purity and 1.65. Once extracted DNA was amplified by PCR a 200 bp fragment of mitochondrial cytochrome b gene. The technique used is relatively inexpensive compared with extraction kits and opens up the possibility of several molecular ecology studies in the Andean fox in Ecuador.

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

INTRODUCCIÓN

Lycalopex culpaeus, conocido en el Ecuador como lobo de páramo o zorro andino es un cánido endémico que habita en los Andes de Sudamérica [1] (Figura 1.). La falta de estudios en el Ecuador sobre su ecología, y el alto riesgo de extinción de la especie en estado silvestre¹ hacen de vital importancia establecer nuevos métodos que permitan recopilar información de la especie, a fin de establecer planes de conservación [2].

Los análisis moleculares a partir de heces proveen información ecológica, y genética valiosa de las especies silvestres, sin la necesidad de la captura de los especímenes, evitando causar estrés al animal, esto adquiere especial importancia cuando se trabaja con animales en peligro de extinción [3,4]. Además al tratarse de un método no invasivo los costos de muestreo se disminuyen notablemente [5].

Los excrementos de los vertebrados están impregnados con células epiteliales del intestino por lo que es posible extraer su ADN [6], y este ADN puede ser posteriormente amplificado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) [7]. Previos estudios han demostrado que el uso de ADN a partir de heces permite la identificación de especies usando ADN mitocondrial. Esta técnica se ha utilizado eficazmente para identificar al zorro rojo (*Vulpes vulpes*) [8], especie invasora en Australia. Para identificar a lobos (*Canis lupus L.*) en el País Vasco [9]. Y para identificar al zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*) [10]. Esa técnica no solamente ha sido utilizada en cánidos sino también en otros carnívoros como es el caso de puma (*Puma concolor*), el jaguar (*Panthera onca*) [10] y carnívoros endémicos del Japón [11]. Otra herramienta para estudios de ecología molecular, es la amplificación de microsatélites existentes en el ADN nuclear (repeticiones de di y trinucleótidos), esto ha permitido determinar genotipos presentes en una población de animales, identificar individuos e incluso determinar cómo se encuentra la variabilidad genética de dicha población. Resultados exitosos con estos marcadores moleculares a partir de ADN fecal han sido reportados para lobos (*Canis lupus L.*) [12], zorros de San Joaquín (*Vulpes macrotis mutica*) [13], coyotes (*Canis latrans*) [5], zorro ártico (*Alopex lagopus*) [14], zorro rojo [15] y para el zorro tibetano (*Vulpes ferrilata*) [16].

Durante los últimos años se han implementado varias técnicas para extraer ADN a partir de heces de animales silvestres, como el método de *guanidinium tiocianato sílica* (GuSCN/sílica) [17, 18, 19, 20]; que utiliza columnas de purificación para eliminar contaminantes. El método CTAB, fenol cloroformo y purificación con columnas *Millipore* [21]. El método fenol-cloroformo y purificación con columnas *MicroSpin* [22]. El método *Chelex 100* [23, 18, 24]. Y el kit comercial más utilizado ha sido el “*QIAamp DNA Stool Mini Kit*” que obtiene 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 [5, 25, 21, 8, 9, 26].

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

¹ Como medida de conservación; el lobo de páramo ha sido incluido 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 salvaje [2].

en muchos de los casos no están disponibles en el laboratorio. Esta investigación se centra en estandarizar una técnica de extracción de DNA de heces de lobo de páramo con miras a su aplicación en estudios de genotipaje e identificación de lobos frente a otras especies de carnívoros andinos.



Fuente: Cortesía de © Galo Zapata Ríos, 2009.

Figura 1. Lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*) tomado con trampa de cámara. Parque Nacional Cayambe-Coca, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.- Las muestras fecales fueron recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca ubicado al nororiente del Ecuador. El parque tiene una extensión total de 403.103 ha, con rangos de altitud desde 600 msnm a 5.790 msnm y se encuentra ubicado en cuatro provincias: Imbabura y Pichincha en la Sierra, Sucumbíos y Napo en la Amazonía [27]. Los avistamientos de lobos son sumamente comunes en esta Área Protegida.

Recolección de muestras fecales en los páramos del Parque Nacional Cayambe-Coca.- La recolección de excretas se realizó durante los meses de octubre y noviembre de 2011. Las heces recolectadas se las categorizó como semifrescas ya que no se podía saber el tiempo que estuvieron en el páramo después de la deposición; sin embargo se encontraban íntegras sin rasgos de descomposición. Todas las muestras fueron georeferenciadas utilizando un GPS GARMIN eTrex® 12 Channel. Las heces se recolectaron usando guantes de nitrilo y fueron colocadas en fundas ziploc etiquetadas. Se las transportó en una nevera portátil, y luego fueron almacenadas a -20 °C en el laboratorio de Biotecnología de la ESPE hasta que se realice la extracción de ADN.

Toma de muestras en el zoológico de Quito en Guayllabamba.- Se tomaron dos muestras de sangre y tres de heces de una pareja de lobos de páramo del Zoológico de Quito. El personal del zoológico fue el encargado de la toma de muestras. La sangre se usó como control positivo para estandarizar la amplificación del ADN por PCR. Mientras que las heces se usaron para probar el protocolo de extracción de ADN fecal estandarizado.

La recolección de las heces se realizó con guantes de nitrilo. Con una paleta 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; se anestesió a los lobos macho y hembra, se desinfectó el área de la vena con algodón empapado con etanol y se tomó 2ml de sangre a cada individuo, pulsando con la jeringuilla la vena cefálica, y se colocó la sangre 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 que se realice la extracción de ADN.

Validación de tres métodos manuales de extracción de ADN fecal.- En un primer ensayo, se probó diferentes métodos de extracción de ADN para una muestra fecal recolectada en el Parque Nacional Cayambe-Coca y que se encontraba conservada en congelación a -20 °C. Se emplearon tres técnicas manuales de extracción de ADN encontradas en bibliografía revisada.

Todos los ensayos de extracción se realizaron por duplicado para garantizar la consistencia y reproducibilidad del método, además se empleó un control negativo (en lugar de heces se colocó agua), para evaluar contaminación entre las muestras.

Pretratamiento de las muestras fecales.- Se modificó el método empleado anteriormente para extraer ADN de excrementos realizando un lavado previo con buffer salinas [28]. Se utilizó para el lavado de las heces suero fisiológico inyectable. Para garantizar una completa homogenización de la heces con el suero fisiológico, se calculó la relación excremento/suero (1g:5ml) utilizado anteriormente con etanol [6]. 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, desechado el sobrenadante y dejado el pellet listo para iniciar la extracción de ADN.

Extracción manual de ADN fecal, método SDS/cloroformo-álcool isoamílico (SDS/CAI).- Se utilizó el método empleado anteriormente para la extracción de ADN fecal humano en células cancerosas del colon [29]. 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 particulado por centrifugación. 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/álcool 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, 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.

Extracción manual de ADN fecal, método CTAB/cloroformo-álcohol isoamílico (CTAB/CAI).- Se utilizó el método empleado anteriormente para la extracción de ADN de heces de monos aulladores del Brasil (*Alouatta caray*) [30]. 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. También se modificó la 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, 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.

Extracción manual de ADN fecal, método 2CTAB/cloroformo-álcohol isoamílico (2CTAB/CAI).- Se utilizó el método empleado anteriormente para la extracción de ADN a partir de heces de primates del mediterráneo (*Macaca sylvanus*) y gorilas (*Gorilla g. gorilla*) [31]. 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. 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, 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.

Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal.- Se extrajo el ADN de 5 muestras fecales semifrescas 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). Los datos obtenidos fueron analizados en el software estadístico InfoStat versión 2010 [32]. 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. Posteriormente se utilizó el mejor método como el protocolo estandarizado para extraer el ADN de una sola muestra fecal recolectada en el zoológico de Quito para estandarizar la PCR. Se realizaron 4 repeticiones para obtener más ADN para los ensayos de PCR.

Determinación de integridad, pureza y concentración del ADN extraído.- Se utilizó la electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % para visualizar la integridad del ADN extraído. Además se empleó un marcador de peso molecular de 1Kb (AXYGEN) que permite

determinar el tamaño del ADN y asegurar que el ADN migró adecuadamente. Se tomaron fotos de los geles en un transiluminador UVP BioDoc-It™ System con luz Ultravioleta (UV). Para medir la concentración de ADN extraído se empleó el kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kits, de la casa comercial Invitrogen™. Las mediciones se realizaron en el fluorómetro Qubit® 2.0 cuyo rango de medición va de 10 pg/ml a 100 ng/ml de ADN [33]. Para medir la pureza del ADN en relación a la contaminación con proteínas, se utilizó la relación de absorbancia a 260/280 nm [34]. Las mediciones se las realizó en el espectrofotómetro NanoVue™ Plus siguiendo los rangos establecidos por el manual [35].

Extracción manual de ADN a partir de sangre total.- Se empleó el método manual utilizado en el Laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE para extraer ADN a partir de sangre total. Se extrajo el ADN de dos muestras sanguíneas de lobos de páramo recolectadas en el zoológico y adicionalmente de una muestra sanguínea de perro conservada en EDTA a -20 °C; que se utilizó como control negativo de la amplificación del ADN por PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).- Para evaluar si el ADN extraído por el protocolo de extracción es apropiado para amplificarlo, se utilizó la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Se probó con *primers* de un gen mitocondrial. La técnica del PCR se basa en la replicación del ADN en los organismos procariontes y eucariontes realizada por la ADN polimerasa [36]. 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. Debido a la falta de estudios moleculares en el lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*). Por tal motivo se recurrió a la utilización de ADN mitocondrial de bases genéticas con secuencias de especies relacionadas evolutivamente a la especie objetivo del GenBank [37].

Gracias a estudios filogenéticos de cánidos [38] se obtuvo la secuencia parcial de ADN del gen del citocromo b del lobo de páramo (GenBank: AF028151.1). Utilizando la herramienta bioinformática ClustalX versión 2.0 [39], se realizó un alineamiento entre las secuencias del citocromo b (*Cyt b*) 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.), 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 [40] (Tabla 1.). Los primers diseñados fueron analizados en OligoAnalyzer 3.1 versión 2012 [41] para comprobar su diseño y además se analizó su homología en BLAST versión 2012 [42]; estos análisis demostraron que los *primers* diseñados son específicos para el género *Lycalopex*.

Una vez diseñados los cebadores específicos para una región del gen mitocondrial citocromo b de 200 pb; se estandarizaron las condiciones para realizar la reacción de PCR con un volumen de reacción de 50µl, se ensayó en el ADN obtenido de una muestra fecal de lobo de páramo perteneciente al zoológico de Quito, se realizó por duplicado para garantizar la consistencia y reproducibilidad del método, se empleó como control positivo de la PCR el ADN obtenido de una muestra sanguínea de lobo de páramo del zoológico y

un control negativo (en lugar de heces se colocó agua), para evaluar contaminación. Se utilizó en la reacción 5µl de ADN blanco, 0.4 µM por cada *primer*, 100 µM de cada dNTPs, 2.5 mM de MgCl₂, albúmina de suero bovino (BSA) a distintas concentraciones (0 µg/ml, 100 µg/ml y 200 ug/ml), 1x Buffer PCR (Invitrogen™), 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen™) y Agua PCR libre de nucleasas. El programa utilizado en el termociclador Swift maxi modelo MX-BLC-4 (ESCO, Singapur) constó de una denaturación inicial de 96 °C por 4 minutos; 35 ciclos de: 96 °C por 30 segundos, 66.2 °C por 30 segundos, y 72 °C por 30 segundos, seguido de una extensión final de 72°C por 4 minutos. Para probar la especificidad de los *primers*; se ensayó una reacción PCR con el ADN obtenido de una muestra sanguínea de lobo de páramo y una muestra sanguínea de perro a las condiciones ya estandarizadas de PCR. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y se empleó un marcador de peso molecular de 100pb (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.

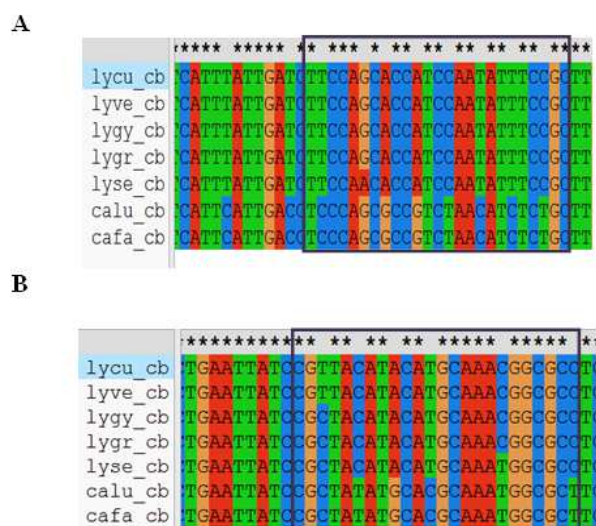


Figura 2. ClustalX 2.0. Alineamiento entre la secuencia del citocromo b de lobo de páramo frente a las especies del género *Lycalopex* (*L. vetulus*, *L. gymnocercus*, *L. griseus* y *L. sechurae*), el lobo (*Canis lupus*) y el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*). (A) Región de unión del primer forward (49-73, posición del *Cyt b* lobo de páramo). (B) Región de unión del primer reverse (225-248, posición del *Cyt b* lobo de páramo).

Tabla 1. Diseño de *primers* para amplificar un segmento de 200 pb del *Cyt b* en el lobo de páramo. Datos editados de Primer BLAST.

<i>Primer</i>	Secuencia de primer 5' - 3'	Tamaño (bases)	Inicio	Parada	¹ T _m	GC%
Delantero	5'-TTCCAGCACCATCCAATATTTCCGC-3'	25	49	73	57.91	48
Reverso	5'-GGCGCCGTTTGCATGTATGTAACG-3'	24	248	225	59.72	54.17

¹Temperatura de fusión del primer

RESULTADOS

Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal.- Se obtuvo una extracción positiva de ADN integro a partir de una muestra fecal recolectada en el Parque Nacional Cayambe-Coca con los tres métodos de extracción validados y modificados en esta investigación. A pesar de que la muestra no se encontraba tan fresca en el páramo y además que estuvo almacenada durante dos meses y medio a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 3A.). Adicionalmente se ensayó la extracción de ADN sin realizar el pretratamiento con suero fisiológico, en cuyo caso no se logró extraer ADN (Figura 3B.).

Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal.- Se extrajo de forma exitosa el ADN de las cinco muestras semifrescas almacenadas durante dos meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por los tres métodos (Figuras 4.). En los geles de agarosa al 0.8 % se observó un ADN integro. Los valores de cuantificación y pureza de ADN obtenido de las muestras fecales de lobo de páramo (Tabla 2.) fueron analizados utilizando InfoStat versión 2010 [32]. El análisis de varianza (ANOVA) mostró que no existe diferencias significativas entre los tres tratamientos en función de la concentración de ADN ($p= 0.6055 >0.05$ de significancia) (Tabla 3.). Mientras que para la pureza se observó que si existe diferencia significativa entre los métodos de extracción ($p= 0.0019 <0.05$ de significancia) (Tabla 4.). Se obtuvo como valores promedio de la cuantificación de ADN para SDS/CAI $37.28\text{ ng}/\mu\text{l}$, CTAB/CAI $57.53\text{ ng}/\mu\text{l}$ y 2CTAB/CAI $51.16\text{ ng}/\mu\text{l}$, y valores promedio de la absorbancia de ADN a $260/280\text{ nm}$ para SDS/CAI 1.62 , CTAB/CAI 1.5 y 2CTAB/CAI 1.65 ; (Tabla 5.) mientras más se aproxime a 2.0 el ADN es más puro [32]. En base a análisis estadísticos el mejor método de extracción fue 2CTAB/CAI, debido a que extrae una buena cantidad de ADN (valor promedio de $51.16\text{ ng}/\mu\text{l}$), aunque no es el método que extrae mayor cantidad de ADN, presenta una mayor pureza (A $260/280\text{ nm}$ de 1.65), y este factor es importante, ya que el ADN más puro puede amplificarse de mejor manera al contener menor cantidad de inhibidores de la PCR [43].

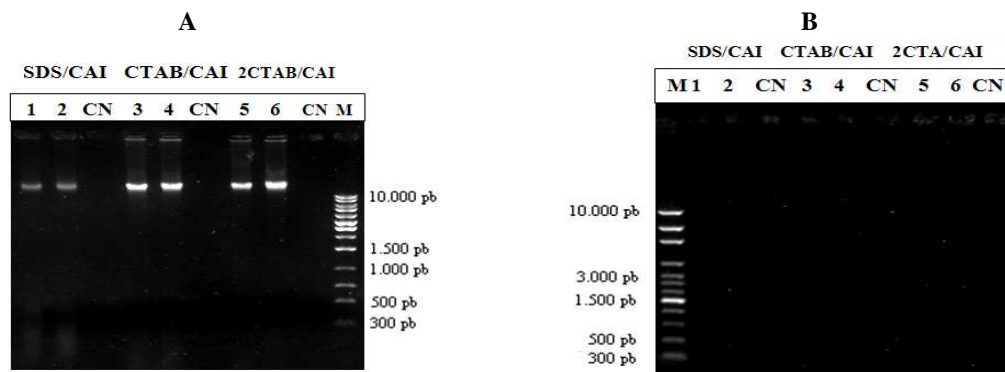


Figura 3. Validación de tres métodos de extracción de ADN fecal. (A) Ensayo de extracción de ADN fecal con pretratamiento de suero fisiológico. (B) Ensayo de extracción de ADN fecal sin pretratamiento. (A) y (B) muestran la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de una muestra fecal de lobo de páramo. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb; 1 y 2 = dos repeticiones de la muestra 1, extraídos mediante el método SDS/CAI; 3 y 4 = dos repeticiones de la muestra 1, extraídos mediante el método CTAB/CAI; 5 y 6 = dos repeticiones de la muestra 1, extraídos mediante el método 2CTAB/CAI; CN: Control negativo de la extracción.

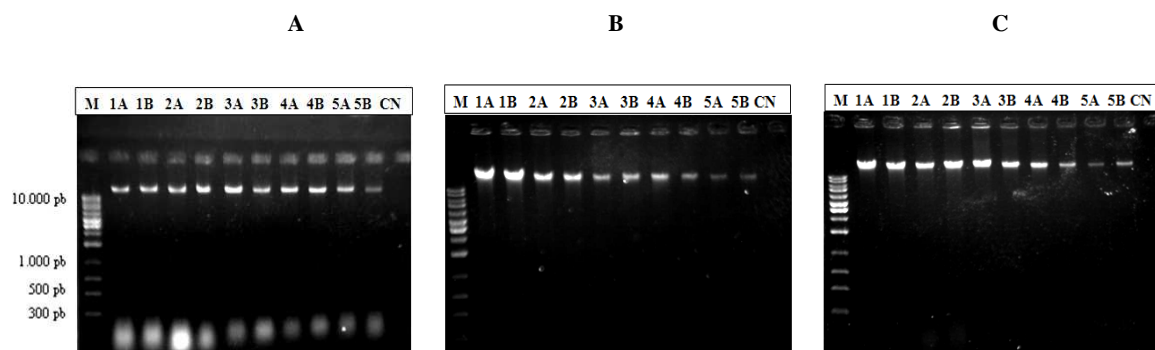


Figura 4. Determinación del mejor método de extracción de ADN fecal. (A) Extracción de ADN fecal, método SDS/CAI. (B) Extracción de ADN fecal, método CTAB/CAI y (C) Extracción de ADN fecal, método 2CTAB/CAI. (A), (B) y (C) muestran la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™)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

Tabla 2. Valores de cuantificación y pureza de ADN obtenido de 5 muestras fecales de lobo de páramo recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca. Aplicando los tres métodos de extracción de ADN.

	METODO SDS/CAI				METODO CTAB/CAI				METODO 2CTAB/CAI			
	ADN [ng/μl]		A 260/280 nm		ADN [ng/μl]		A 260/280 nm		ADN [ng/μl]		A 260/280 nm	
	¹ R	² P	¹ R	² P	¹ R	² P	¹ R	² P	¹ R	² P	² R	² P
M												
1A	47,20	53,00	1,688	1,7125	120,00	120,00	1,653	1,587	103,33	87,27	1,669	1,6545
1B	58,80		1,737		120,00		1,522		71,20		1,64	
2A	45,47	51,40	1,623	1,602	88,93	84,13	1,704	1,392	74,93	78,73	1,667	1,639
2B	57,33		1,581		79,33		1,081		82,53		1,611	
3A	36,80	32,20	1,653	1,595	37,60	42,97	1,635	1,52	47,73	39,73	1,628	1,618
3B	27,60		1,537		48,33		1,415		31,73		1,608	
4A	26,80	28,97	1,642	1,5855	31,00	27,63	1,625	1,539	29,47	35,57	1,629	1,6445
4B	31,13		1,529		24,27		1,454		41,67		1,66	
5A	19,37	20,82	1,621	1,6275	9,88	12,94	1,474	1,442	16,51	14,48	1,707	1,6765
5B	22,27		1,634		16,00		1,41		12,45		1,646	

¹R: Valores obtenidos de cada una de las repeticiones (dos repeticiones por muestra)

²P: Valores promedio para cada muestras (5 muestras)

Tabla 3. Análisis de Varianza (ANOVA). Variable de respuesta: Concentración de ADN [ng/μl], InfoStat 2010.

F.V.	SC	gl	CM	F	¹ p-valor
Tratamiento	1072,64	2	536,32	0,52	0,6055
Error	12299,77	12	1021,9		
Total	13372,41	14			

¹P> 0.05 significancia. No existen diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 4. Análisis de Varianza (ANOVA). Variable de respuesta: Pureza del ADN (Absorbancia 260/280 nm), InfoStat 2010.

F.V.	SC	gl	CM	F	¹ p-valor
Tratamiento	0.06	2	0.03	11,04	0,0019
Error	0.04	12	9E-03		
Total	0.10	14			

¹P<0.05 significancia. Existen diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 5. Valores promedio de cuantificación y pureza de ADN fecal, InfoStat 2010.

	SDS/CAI	CTAB/CAI	2CTAB/CAI
Concentración ADN [ng/μl]	37,28	57,53	51,16
A260/280 nm	1,62	1,5	1,65

Extracción de ADN fecal a partir de muestras fecales del Zoológico de Quito.- Aplicando el método 2CTAB/CAI se pudo extraer ADN integro, de buena cantidad y pureza para amplificar por PCR. Se utilizó una muestra fecal fresca de lobo de páramo recolectada en el zoológico de Quito y que estuvo almacenada durante 4 meses a -20 ° C. Se incrementó los lavados con suero fisiológico y además se dejó inmerso con el suero fisiológico las heces por 6 días en lugar de 12 horas para lavar mejor la muestra fecal y extraer más ADN (Figura 5.).

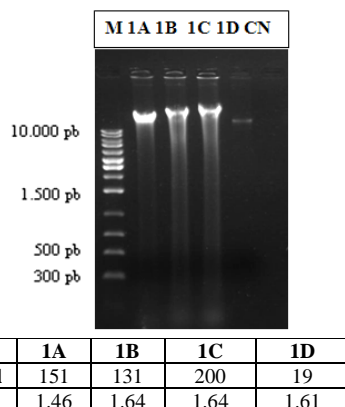


Figura 5. Extracción de ADN fecal del Zoológico. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de una muestra de heces de lobo de páramo (4 repeticiones 1A,1B,1C,1D). M: Marcador de peso molecular de 1 Kb; CN: Control negativo de la extracción.

Extracción manual de ADN a partir de sangre total.- Se extrajo de forma exitosa el ADN de las muestras sanguíneas de lobo de páramo y perro. En los geles de agarosa al 0.8 % se observó un ADN integro, altamente puro y de una concentración superior a 20 ng/μl en la mayoría de las muestras. (Figura 6.).

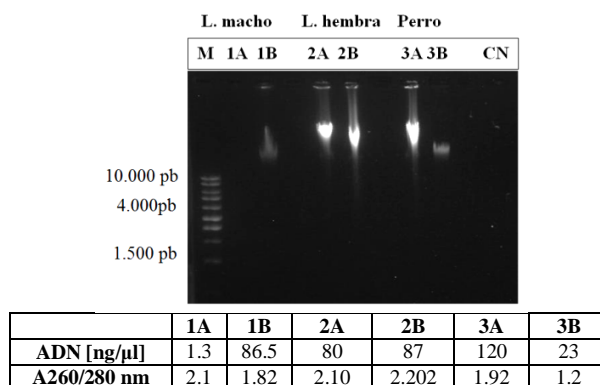


Figura 6. Extracción de ADN de muestras sanguíneas. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la extracción de ADN de muestras sanguíneas de lobo de páramo y perro. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb; 1A,1B= Muestra lobo macho; 2A,2B= Muestra lobo hembra; 3A,3B= Muestra perro; CN: Control negativo de la extracción.

Amplificación PCR de un fragmento del citocromo b de lobo de páramo.- Se diluyó a 20 ng/μl el ADN obtenido de la muestra fecal recolectada en el zoológico (repetición 1A) y se pudo amplificar el fragmento de 200 pb del citocromo b en ADN mitocondrial. La albúmina de suero bovino BSA a una concentración de 100 ug/ml favoreció la reacción de PCR en heces. El control positivo demostró que el fragmento amplificado corresponde a lobo de páramo y el control negativo demostró que no existe contaminación cruzada por ADN en el ensayo (Figura 7.).

La especificidad de los *primers* se ensayó realizando una PCR con el ADN obtenido de una muestra sanguínea de lobo de páramo recolectada en el zoológico y con el ADN obtenido de una muestra sanguínea de perro, el ADN fue diluido a 20 ng/μl y no amplificó para el perro (Figura 8.).

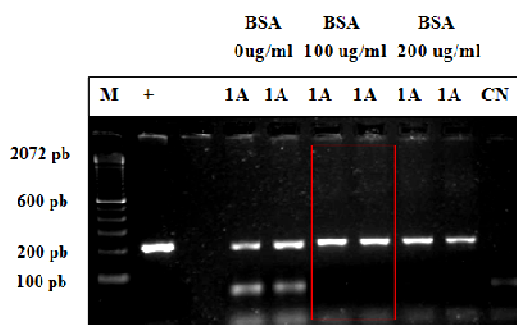


Figura 7. Amplificación del citocromo b, ensayo adyuvante BSA. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b, en el ADN de una muestra fecal de lobo (zoológico). 1A: Muestra fecal, +: Control positivo (ADN lobo de zoológico); M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: Control negativo de la extracción.

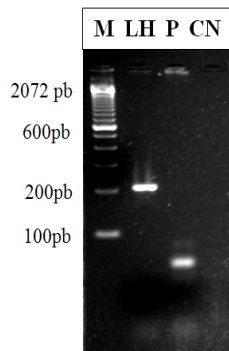


Figura 8. Amplificación del citocromo b, ensayo de especificidad. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe (Invitrogen™) donde se observan los resultados de la amplificación de un fragmento de 200 pb del citocromo b, en el ADN de una muestra sanguínea de lobo de páramo hembra (zoológico) y una muestra sanguínea de perro. LH: Lobo hembra, P; Perro; M: Marcador de peso molecular de 100 pb; CN: Control negativo de la extracción.

DISCUSIÓN

Extraer ADN a partir de muestras fecales resulta complicado debido a que el ADN existente está a menudo muy degradado y contaminado con material genético exógeno e inhibidores de la PCR presente en las heces [17, 44]. Con los tres métodos manuales evaluados en esta investigación; SDS/CAI para extraer ADN de heces humanas [29], CTAB/CAI para extraer ADN de heces de monos aulladores del Brasil (*Alouatta caray*) [30] y 2CTAB/CAI para extraer ADN de heces de primates del mediterráneo (*Macaca sylvanus*) y gorilas (*Gorilla g. gorilla*) [31]; se demostró que se puede extraer un ADN íntegro, puro y de buena cantidad a partir de muestras fecales frescas o semifrescas de lobo de páramo, sin la necesidad de utilizar un kit específico para extracción de ADN a partir de excrementos. Adaptando y modificando métodos manuales que no se han desarrollado específicamente para este carnívoro andino.

El pretratamiento de las muestras con suero fisiológico resultó fundamental para que los métodos de extracción en heces de lobo de páramo funcionen, resultados similares demostraron que al lavar previamente las heces con una buffer salina; se incrementa la extracción de ADN a partir de excrementos [28].

La conservación de muestras fecales de lobo en congelación a -20°C resultó ser eficaz para mantener las muestras con suficiente cantidad de células epiteliales viables a ser extraídas su ADN. Además la congelación de las heces permitió extraer ADN de muestras almacenadas durante largo tiempo (de 2 a 4 meses posterior a su recolección), resultados similares se obtuvieron al extraer ADN fecal de muestras fecales de babuinos (*Papio cynocephalus ursinus*) almacenadas durante 4 meses en congelación a -20°C , pero con Kit de extracción [45]. Esto abre la posibilidad de almacenamiento de muestras por un periodo largo de tiempo.

El tercer método 2CTAB/CAI resultó ser el que más ADN puro extrae ($A_{260}/A_{280} = 1.65$), una de las posibles razones de su pureza puede centrarse en una segunda aplicación de

buffer CTAB para la lisis de las células epiteliales [31]. Aplicando este protocolo se pudo amplificar la secuencia de 200 pb del citocromo b del lobo de páramo, en una muestra fecal recolectada en el zoológico con los primers LC-CYTB-F y LC-CYTB-R diseñados en esta investigación. Resultados similares se han obtenido al diseñar *primers* específicos de PCR para poder identificar a otras especies de cánidos a través de muestras fecales.

El ensayo de PCR en ADN obtenido de una muestra sanguínea de perro y en una muestra sanguínea de lobo de páramo; demostró que los *primers* son específicos para el género *Lycalopex*. En esta investigación, el protocolo permitirá identificar si las heces recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca pertenecen al lobo de páramo (*Lycalopex culpaeus*).

El uso del BSA como adyuvante de la reacción PCR, permitió que no se formen productos inespecíficos, favoreciendo la amplificación del ADN extraído de las heces. El BSA actúa como una matriz que absorbe los inhibidores de la PCR como sales biliares y bilirrubina, presentes en las heces. 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 [43].

El protocolo estandarizado en esta investigación servirá para extraer ADN a partir de muestras fecales frescas o semifrescas de lobos de páramo almacenados por largos periodos, sin la necesidad de emplear un kit costoso de extracción de ADN. El ADN ha obtenerse servirá para ser amplificado por PCR, abriendo la posibilidad de iniciar varios estudios de ecología molecular en el lobo de páramo en el Ecuador.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) que financió este proyecto mediante las BECAS DE INICIACIÓN CIENTÍFICA 2011. A la Dra. María Claudia Segovia, por su valioso apoyo científico en la investigación. Al Dr. Marcelo Grijalva Director del Laboratorio de Biotecnología Humana de la ESPE por su apoyo logístico y académico a la investigación. Al Zoológico de Quito en Guayllabamba que proporcionó los controles positivos para la estandarización del protocolo y 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.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. E. Jiménez & A. Novaro. (2004). Culpeo. *Pseudalopex culpaeus*. En Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. (eds. M. Hoffmann, C. Sillero-Zubiri and D. W. Macdonald). *UICN/SSC Canid Specialist Group*.
- [2] G. Zapata-Ríos, D. G. Tirira, J. Armijos & R. Cisneros. (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. 215-216.

- [3] E. W. Heymann, M. Heistermann, P. Löttker, M. Huck & U Böhle. (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. [Online]. Disponible en: <http://www.revistafauna.com.pe/memo/78-84.pdf>.
- [4] A. Beja, R. Oliveira, P. C. Alves, M. K. Schwartz & G. Luikart. (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in non-invasive genetics. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 1279-1301.
- [5] L. R. Prugh, C. E. Ritland, S. M. Arthur & C. J. Krebs. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Mol. Ecol.* 14, 1585-1596.
- [6] S. K. Wasser, C. S. Houston, G. M. Koehler, G. G. Cadd & S. R. Fain. (1997). Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol. Ecol.* 6, 1091-1097.
- [7] M. H. Kohn & R. K. Wayne. (1997). Facts from feces revisited. *Trends Ecol. Evol.* 12, 223-227.
- [8] O. Berry, S. Sarre, L. Farrington & N. Aitken. (2007). Faecal DNA detection of invasive species: the case of feral foxes in Tasmania. The University of Adelaide. [Online]. Available: http://www.foxdna.animals.uwa.edu.au/_data/page/87330/Berry_Tasmanian_fox_detection_pre-publication_MS.pdf.
- [9] J. Echegaray, F. De Lecea, A. Hernando, J. De la Torre, A. Illana & D. Paniagua. (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. [Online]. Disponible en: http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.net/r49-3074/es/contenidos/informe_estudio/lobo_genetica_no_invasiva/es_doc/adjuntos/genetica_no_invasiva2.pdf.
- [10] L. F. Farrel, J. Roman & M. Sunquist. (2000). Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Mol. Ecol.* 9, 1583-1590.
- [11] N. Kurose, R. Masuda & M. Tataru. (2005). Fecal DNA Analysis for Identifying Species and Sex of Sympatric Carnivores: A Noninvasive Method for Conservation on the Tsushima Islands, Japan. *J. Hered.* 96(6), 688-697.
- [12] J. Echegaray, A. Illana, A. Hernando, F. De Lecea, J. Bayona, I. Covela, J. De la Torre, A. Illana, D. Paniagua & C. Vilà. (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). *Galem.* 19 (2), 3-18.

- [13] D. A. Smith, K. Ralls, A. Hurt, B. Adams, M. Parkerl & J. Maldonado. (2005). Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Mol. Ecol.* 10.1111/j.1365-294X.2005.02841.x. [Online]. Available: <http://si-pddr.si.edu/jspui/bitstream/10088/4415/1/Smith2006.pdf>.
- [14] A. Jakubczak, S. Knaga & G. Jeżewska. (2009). Genetic variation of microsatellite sequences and its relationship with some productive traits of arctic foxes. *Ann. Anim. Sci.* 9(2), 133–142.
- [15] M. Moore, S. Brown & B. Sacks. (2010). Thirty-one short red fox (*Vulpes vulpes*) microsatellite markers. *Mol. Ecol. Resour.* For review only. [Online]. Available: <http://www.vgl.ucdavis.edu/cdcg/documents/Mooreetal2010.pdf>.
- [16] M. Li, X. M. Wang, W. B. Jiang, P. Y. Hua & Z. H. Wang. (2011). Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci in the Tibetan fox (*Vulpes ferrilata*). *J. Genet.* 90, 82–85. [Online]. Available: <http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/90/e82.pdf>.
- [17] P. Taberlet, L. Waits & G. Luikart. (1999). Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14, 323-327.
- [18] J. Reed, D. Tollit, P. Thompson & W. Awos. (1997). Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 6, 225-234.
- [19] L. S. Eggert, J. A. Eggert & D. S. Woodruff. (2003). Estimating population sizes for elusive animals: The forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Mol. Ecol.* 12, 1389–140.
- [20] A. C. Frantz, L. C. Pope, P. J. Carpenter, T. J. Roper, G. J. Wilson, R. J. Delahay, & T. Burke. (2003). Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger *Meles meles* using fecal DNA. *Mol. Ecol.* 12, 1649–1661.
- [21] B. Zhang, M. Li, L. Ma & F. Wei. (2006). A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochem. Geneti.* (44)11/12, 494-503.
- [22] H. B. Ernest, M. C. Penedo, B. P. May, M. Syvanen, & W. M. Boyce. (2000). Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and fecal DNA. *Mol. Ecol.* 9, 433–441.
- [23] P. S. Walsh, D. A. Metzger & R. Higuchi. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotech.* 10, 506–513.

- [24] A. Frantz. (2004). Non-Invasive Genetic Typing in the Study of Badger (*Meles meles*) Ecology. Thesis. University of Sussex United Kingdom. [Online]. Available: http://www.mnf.uni-greifswald.de/fileadmin/naturschutz/thesis_frantz.pdf.
- [25] J. Bhagavatula & I. Singh. (2006). Genotipificación de las muestras fecales tigre de Bengala *Panthera tigris tigris* estimación de la población: un estudio piloto. *BMC. Genet.* 7, 48-48. [Online]. Disponible en: http://viaclinica.com/article.php?pmc_id=1636336.
- [26] A. Jiménez .(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. [Online]. Disponible en: <http://repositorio.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/3374/1/573X52.pdf>.
- [27] MAE. (2011). Parque Nacional Cayambe-Coca. Ministerio del Ambiente. Ecuador. [Online]. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/?q=node/62>.
- [28] J. Tang, Z. Zeng, H. Wang, T. Yang, P. Zhang, Y. Li, A. Zhang, W. Fan, Y. Zhang, X. Yang, S. Zhao, G. Tian & L. Zou. (2008). An effective method for aislation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *J. Microbiol. Methods.* 75,432-436.
- [29] M. Abbaszadegan, A. Velayati, A. Tavasoli & E. Dadkhah. (2007). Rapid DNA Extraction Protocol from Stool, Suitable for Molecular Genetic Diagnosis of Colon Cancer. *Iran. Biomed. J.* 11(3), 203-208.
- [30] L. Oklander, M. Marino, G. Zunino & D. Corach. (2004). Preservation and extraction of DNA from Feces in howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Neotrop. Primate.* 12(2), 59-63.
- [31] D. Vallet, E. J. Petit, S. Gatti, S. Levréro & N. Ménard. (2008). A new 2CTAB/PCI method improves DNA amplification success from faeces of Mediterranean (Barbary macaques) and tropical (lowland gorillas) primates. *Conserv. Genet.* 9(3), 677–680.
- [32] J.A. Di Rienzo, F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada & C.W. Robledo. (2010). InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [Online]. Disponible: <http://www.infostat.com.ar>.
- [33] Invitrogen™ Corp. (2010). Qubit™ dsDNA HS Assay Kits. [Online]. Available: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32851.pdf>.
- [34] S. Surzycki. (2000). *Basic techniques in Molecular Biology* . Heidenberg: Springer-Verlag Berlín.

- [35] NanoVue™. (2010). NanoVue™ Plus Spectrophotometer. Manual. [Online]. Available: [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DCE8B60DE8122421C1257628001D4B49/\\$file/28930169AC.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/DCE8B60DE8122421C1257628001D4B49/$file/28930169AC.pdf).
- [36] K. B. Mullis, F. Faloona, S. J. Scharf, R. K. Saiki, G. T. Horn & H. A. Erlich. (1986). Cold Spring Harbor. Symp. *Quant. Biol.* 51, 263:273.
- [37] NIH. (2012). GenBank. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- [38] R. K. Wayne, E. Geffen, D. J. Girman, K. P. Koepfli, L. M. Lau & C. R. Marshall. (1997). Molecular systematics of the Canidae. *Syst. Biol.* 46:622–653.
- [39] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinform.* 23:2947-2948.
- [40] NCBI. (2012). Primer BLAST. Version 2009. [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- [41] Integrated DNA Technologies. (2012). OligoAnalyzer 3.1. Version 2012. [Online]. Available: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.
- [42] NCBI. (2012). Basic local alignment search tool. (BLAST). Version 2012. [Online]. Available: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- [43] P. B. Chaves, M. F. Paes, S. L. Mendes, K. B. Strier, I. D. Louro & V. Fagundes. (2006). Noninvasive genetic sampling of endangered miquiqui (Primates, Atelidae): Efficiency of fecal DNA extraction. *Genet. Mol. Biol.* (29)4, 750-754.
- [44] T. Broquet, N. Menard & E. Petit. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conser. Genet.* 8, 249-260.
- [45] M. Frantzen, J. Silk, J. Ferguson, R. Wayne & M. Kohn. (1998). Empirical evaluation of preservation methods for fecal DNA. *Mol. Ecol.* 7, 1423-1428.