

**ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA LA
EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN
MITOCONDRIAL, A PARTIR DE HECES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*)**

LEDA CAROLINA RESTREPO CARDONA

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

BIÓLOGA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D. C.
26 de Noviembre de 2010**

Nota de advertencia:

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de grado. Solo velará por lo que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que los trabajos no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA LA
EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN
MITOCONDRIAL, A PARTIR DE HECES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*)**

LEDA CAROLINA RESTREPO CARDONA

APROBADO

**Paul Blour, PhD
Director**

**Ursula Ramirez, PhD (c)
Codirectora**

**Wilson Terán, PhD
Jurado**

**ESTANDARIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS PARA LA
EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN
MITOCONDRIAL, A PARTIR DE HECES DE OCELOTE (*Leopardus pardalis*)**

LEDA CAROLINA RESTREPO CARDONA

APROBADO

Ingrid Schuller
Decana Académica

Andrea Forero
Directora de carrera

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado gracias al convenio de cooperación científica entre el Ministerio de Ambiente de Vivienda y Desarrollo Territorial y la Universidad Nacional de Colombia.

Agradezco a Dios.

A ACOPAZOA, a Merecure Parque agroecológico S.A., a la CAV Bioandina por permitirme coleccionar las muestras.

A Paul y Úrsula por enseñarme otro aspecto de la genética, y mostrarme que todo con dedicación se puede lograr.

A mis compañeros de laboratorio por el apoyo y la colaboración que me brindaron durante todo el proceso de ésta investigación.

A mis papás, hermanos y amigos por estar ahí siempre para mí, acompañarme, apoyarme y entenderme.

A Sebastián ya que sin él nada de esto habría sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. REFERENTES CONCEPTUALES	13
3.1. Diagnósis de la especie	13
3.2. Ecología	14
3.3. Distribución	14
3.4. Técnicas no invasivas	15
3.4.1. <i>Conservación de muestras</i>	17
3.4.2. <i>Extracción de ADN</i>	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. General	18
4.2. Específicos	18
5. METODOLOGÍA	18
5.1. Muestras fecales	18
5.2. Métodos de preservación	18
5.3. Métodos de extracción de ADN	19
5.4. Determinación de la calidad, pureza y concentración de ADN extraído	20
5.4.1. <i>Amplificación de ADN</i>	21
5.5. Análisis de datos	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Cantidad de ADN	22
6.2. Pureza de ADN	23
6.3. Amplificación de ADN mediante PCR	24
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	27
7.1. Cantidad de ADN	27
7.2. Pureza del ADN	28
7.3. Amplificación de ADN	29
8. RECOMENDACIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33
10. ANEXOS	37
Anexo 1. Protocolo para la preparación de buffer DETs	37
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN para heces con QIAamp DNA Stool Mini Kit	38
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN para heces con Fenol Cloroformo (Ernest <i>et al</i> 2000)	40
Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN para heces con Fenol Cloroformo variación con Triton (Reed 1997)	42

I. LISTA DE FIGURAS

1. Procesamiento de muestras para los diferentes tipos de métodos de conservación	19
2. Relación de la cantidad de ADN entre los métodos de conservación y extracción	23
3. Relación de la pureza de ADN entre los métodos de conservación y extracción	24
4. Evaluación de amplificación por PCR del gen mitocondrial 16S con fragmentos de diferentes tamaños	25
5. Amplificación por PCR del gen mitocondrial 16S con fragmentos de 135 pb	26
6. Porcentaje de amplificación para cada método de conservación y extracción usando muestras fecales	27

II. LISTA DE TABLAS.

1. Oligonucleótidos degenerados para amplificar 16S	21
---	----

RESUMEN

Las metodologías invasivas se convierten en metodologías poco eficaces para la obtención de información cuando se trabaja con poblaciones de mamíferos carnívoros como los felinos que con frecuencia ocupan zonas inaccesibles y presentan comportamientos evasivos. Recientemente, el desarrollo de herramientas moleculares junto con el uso de metodologías no invasivas han ofrecido una respuesta a este problema, como lo es el uso de muestras fecales para la obtención de ADN. A pesar que el trabajo con metodologías no invasivas utilizando muestras de heces como fuentes de ADN, facilitan la obtención de información de poblaciones de felinos en Colombia y especialmente para *L. pardalis*, el uso de muestras fecales para realizar análisis genético es un campo inexplorado, debido a las limitaciones metodológicas para coleccionar muestras, extraer y amplificar el ADN. En este estudio probamos metodologías para la conservación de muestras fecales y extracción de ADN obtenido a partir de heces. Se evaluaron tres métodos de conservación de muestras fecales (secadas en horno a 40°C, buffer DETs, y combinación de etanol absoluto y silica gel) y tres métodos de extracción de ADN fecal (QIAamp DNA Stool Mini Kits de QIAGEN, extracción con fenol-cloroformo y variación con tritón de la extracción con fenol-cloroformo). Fueron evaluadas tres variables: la cantidad, la pureza y la calidad, encontrando que existen diferencias significativas para interacción de los métodos de preservación y extracción con respecto a cantidad ($P= 0.019$). Además, los valores de calidad tuvieron diferencias significativas para los métodos evaluados. Se recomienda el método de colecta de secado al horno y el método de extracción de QIAamp DNA Stool Mini Kit para realizar estudios genéticos con *Leopardus pardalis*.

ABSTRACT

The invasive methodologies become ineffective methods for obtaining information when working with populations of mammalian carnivores like the felines that frequently occupy inaccessible areas and present evasive behaviors. Recently, the development of molecular tools along with the use of noninvasive methodologies has offered an answer to this problem, as is the use of fecal samples for DNA obtaining. While working with non-invasive methodologies using fecal samples as sources of DNA, facilitate obtaining information feline population in Colombia and especially *L. pardalis*, the use of fecal samples for genetic analysis is an unexplored field, due to methodological limitations to collect samples, to extract and amplify DNA. In this study we proved methodologies for the conservation of fecal samples and DNA extraction obtained from stool. Three methods of conservation were evaluated for faecal samples (dried in an oven at 40 ° C, buffer DETs, and combination of absolute ethanol and silica gel) and three methods for extraction of fecal DNA (QIAamp DNA Stool Mini Kits of QIAGEN, extraction with phenol-chloroform and variation with Triton extraction with phenol-chloroform). Were tested three variables: the amount, the purity and the quality, finding significant differences for interaction of preservation and extraction methods with regard quantity ($P= 0.019$). In addition, the quality values had significant differences for the evaluated methods. We recommend the collection method with oven drying and the extraction method with QIAamp DNA Stool Mini Kit for genetic studies with *Leopardus pardalis*.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las herramientas moleculares han sido de gran utilidad en la resolución de preguntas relacionadas con ecología, demografía, dispersión y comportamiento de fauna silvestre (DeYong & Honeycutt 2005). El uso de metodologías no invasivas ha permitido el estudio de individuos y poblaciones de diferentes especies sin necesidad de entrar en contacto con los individuos, perturbarlos e incluso tener que visualizarlos (Beja-Pereira *et al.* 2009). Dentro de las muestras de colecta no invasiva tenemos heces, pelo, plumas, orina o mudas, entre otras.

En los últimos años las muestras de heces han sido las más exitosas y comúnmente utilizadas para la obtención de ADN, debido a que son fáciles de coleccionar en campo y proporcionan mayor información que otras muestras (dieta, hormonas de estrés,

hormonas reproductivas, parásitos, ADN de parásitos) (Waits & Paetkau 2005). La colecta de heces se ha utilizado particularmente para aquellas especies de comportamiento evasivo como los ungulados de bosque, osos, canidos, felinos, entre otras. Es por esta razón, que actualmente existe una gran variedad de protocolos para la conservación de muestras fecales para análisis genéticos. Sin embargo esto implica una desventaja en el momento de la toma de decisiones con respecto al método más fiable para trabajar con este tipo de muestras. Por esta razón, para asegurar la calidad, pureza y cantidad del ADN extraído es necesario realizar una estandarización de los diferentes métodos de conservación de muestras y de las técnicas de extracción, que permitan la obtención de amplificaciones óptimas (Bhagavatula & Singh 2006; Palomares *et al.* 2002). Para la optimización de las condiciones de preservación de las muestras y de los protocolos de extracción de ADN es necesario tener en cuenta diferentes factores, minimizando así el efecto de los inhibidores en las reacciones de amplificación de ADN y llevando el rendimiento al máximo cuando se realizan análisis genéticos con muestras fecales (Waits & Paetkau 2005).

A partir del uso de muestras de heces de individuos en cautiverio de *Leopardus pardalis* de diferentes regiones de Colombia, en el presente estudio se evaluó y determinó el mejor método de conservación de muestras, y extracción de ADN que permitiera obtener cantidad, pureza y calidad óptimas para la amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, con el fin de ser utilizado en futuras investigaciones en genética de poblaciones de *L. pardalis* provenientes de poblaciones naturales de ecosistemas de Colombia.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trabajo con felinos tropicales a menudo se realiza a través de metodologías invasivas que requieren de la captura, la manipulación y el seguimiento de diferentes especies (Palomares *et al.* 2002). Los mamíferos carnívoros con frecuencia ocupan zonas inaccesibles, las cuales son difíciles de muestrear, lo que hace que las metodologías invasivas no sean suficientemente eficaces para la obtención de información sobre las poblaciones de felinos (Gompper *et al.* 2006). Debido a que el conocimiento de las poblaciones e individuos es de vital importancia para el desarrollo de programas eficaces para la conservación (Johnson *et al.* 2001), es necesario desarrollar nuevas

herramientas que faciliten la obtención de datos de diferentes especies (Foran *et al.* 1997).

Las metodologías no invasivas son una forma relativamente nueva de estudiar diferentes especies, con un gran potencial en el acercamiento y comprensión de la fauna silvestre (Gompper *et al.* 2006). Estas metodologías utilizan diferentes tipos de material biológico como fuente de ADN, que permite acceder a información importante acerca de las especies sin entrar en contacto con ellas (Waits & Paetkau 2005). Sin embargo, el énfasis de la mayoría de estudios relacionados con técnicas no invasivas va dirigido al desarrollo y presentación de las técnicas moleculares, prestando poca atención a los aspectos metodológicos y a las técnicas de laboratorio que los condicionan, como lo son los métodos de preservación de muestras y de extracción de ADN (Palomares *et al.* 2002).

Aunque las heces son la fuente de ADN que se usa con mayor frecuencia, el trabajo con este tipo de muestras tiene inconvenientes debido a que se encuentra acompañado de microorganismos, restos de comida no digeridos, enzimas digestivas, moco y sales biliares (Albaugh *et al.* 1992), lo cual puede limitar la aplicabilidad de este tipo de material para estudios moleculares (Echegaray *et al.* 2005) ya que puede presentar baja eficiencia en la amplificación, alta contaminación y errores en el genotipado (Spiering 2009). Por esta razón, los métodos de conservación deben garantizar la esterilización y la calidad de las heces, asegurando la obtención de ADN de buena calidad (Beja-Pereira *et al.* 2009). De igual forma, los métodos de extracción utilizados tienen un efecto sobre la concentración de ADN (Bosch *et al.* 2005), presencia de inhibidores enzimáticos en la amplificación (Waits & Paetkau 2005), y coextracción del ADN de las presas del animal de interés (Piggott & Taylor 2003).

A pesar de que en la última década han sido utilizados varios métodos de extracción de ADN fecal en diferentes estudios con mamíferos (Palomares *et al.* 2002), se ha llegado a la conclusión que no existe un consenso claro sobre un método óptimo y que este método puede variar según la especie y la región geográfica (Waits & Paetkau 2005).

En Colombia *L. pardalis* es una especie de felino de comportamiento evasivo que habita áreas de vegetación densa y se distribuye en diferentes ecosistemas (Navarro & Muñoz

2000). Está clasificada en el apéndice I del CITES, sin embargo no se tiene información detallada y precisa sobre su distribución. Además las limitaciones metodológicas en relación a la preservación de las muestras y la optimización de los protocolos de extracción y amplificación de ADN no han permitido el uso de las heces como fuente de ADN para realizar estudios de identificación y distribución de *L. pardalis* en Colombia. De hecho Taberlet & Luikart (1999) recomiendan que cualquier investigación que requiera el uso de metodologías no invasivas debe ser precedida por estudios detallados que evalúen la viabilidad y reproductibilidad de los métodos para extraer ADN. Es por esta razón que para utilizar herramientas moleculares en la identificación y monitoreo de *L. pardalis* con el fin de realizar programas de conservación, son necesarios la estandarización y optimización de los protocolos de preservación de la muestras, extracción y amplificación de ADN que permitan un rendimiento óptimo de la metodologías de colecta no invasiva.

3. REFERENTES CONCEPTUALES

3.1. Diagnósis de la especie

El ocelote (*Leopardus pardalis*) es el felino de mayor tamaño entre los gatos pequeños manchados (Redford & Eisenberg 1992). Comparado con el jaguar (*Panthera onca*), el ocelote es más pequeño (pesa entre 63 a 88 kg menos que el jaguar), en la nuca presenta líneas paralelas negras y en los hombros líneas oblicuas. *L. pardalis* es muy similar al tigrillo (*Leopardus wiedii*), pero el ocelote tiene un peso mayor (de 2 a 7 kg más), su longitud es superior (de 17 a 21 cm más), sus hombros presentan mayor amplitud (entre 5 y 10 cm), y por último *L. pardalis* tiene una cola más corta la cual apenas toca el suelo (6 cm menos aproximadamente) (Murray & Gardner 1997).

Las características generales de esta especie son: el color de su pelaje es muy variable, las zonas que presentan mayor versatilidad son la frente, la corona, la nuca y los hombros. Las marcas distintivas que presentan los individuos de esta especie son manchas color negro que se alargan y se extienden hacia los lados de forma oblicua; en la parte inferior es de color blanco con puntos negros. La cabeza tiene pequeñas manchas negras y dos líneas negras en las mejillas, en el cuello presenta de cuatro a cinco franjas paralelas, y una o dos barras transversales recorren la parte interna de las patas delanteras; en promedio las hembras son más pequeñas que los machos (Murray & Gardner 1997).

En cuanto a la clasificación taxonómica para esta especie se encuentran reportadas once subespecies, las cuales fueron determinadas morfológicamente por Pocock (1941) y Weigel (1961). Esta clasificación se encuentra en constante revisión debido a que la asignación de subespecies fueron determinadas a partir de pocos especímenes, basándose en muestreos geográficos restringidos y usando caracteres morfológicos que muestran gran variabilidad individual como la coloración del pelaje y la distribución de manchas (O'Brien 1994).

3.2. Ecología

Los ocelotes pueden ocupar gran variedad de hábitats, desde bosques secos hasta selvas montanas, también se encuentran en zonas pantanosas, orillas de los ríos, en manglares, y en las sabanas pantanosas; el hábitat preferido parece ser el bosque de galería (Redford & Eisenberg 1992). En contraste, *L. pardalis* no es una especie generalista (Murray & Gardner 1997) por el contrario, los patrones de movimiento indican que se encuentran fuertemente asociados con áreas de vegetación densa. Por esta razón, evitan hábitats abiertos durante el día, aunque algunas veces se alimentan en ellos durante las noches (Sunquist 1992). Los ocelotes son buenos cazadores en el suelo (aunque también cazan sobre los árboles). Principalmente consumen pequeños mamíferos, como roedores, murciélagos, zarigüeyas, pájaros, reptiles y en algunos casos peces (Riveros *et al.* 2005).

Los machos adultos suelen habitar zonas más grandes que las hembras, aunque en diferentes hábitats su distribución puede variar (Sunquist 1994). En bosques de galería los rangos de distribución suelen ser más pequeños que los de zonas llanas probablemente indicando un mejor hábitat (Sunquist 1994).

3.3. Distribución

El rango de distribución de *L. pardalis* va desde el sur de Texas hasta el norte de Argentina sin abarcar Chile (Redford & Eisenberg 1992). Existen registros para esta especie en los valles tropicales de los Andes a una altitud de 2.800 m.s.n.m y en altitudes bajas (desde 100 m.s.n.m), normalmente se encuentra a elevaciones menores de 1.200 m.s.n.m (Redford & Eisenberg 1992). Debido a la capacidad que tienen los ocelotes de habitar gran variedad de ecosistemas, en Colombia se encuentra distribuido

en todas las regiones del país. Su rango altitudinal se encuentra entre 0 y 2400 m.s.n.m (Navarro y Muñoz 2000). Esta información no es del todo confiable, debido a que se conoce muy poco sobre la distribución real de esta especie en Colombia.

En Colombia se encuentran reportadas tres subespecies: *L. pardalis pseudopardalis*, *L. pardalis aequatorialis* y *L. pardalis melanurus* (Clavijo & Ramírez 2007). Para el Caribe y la Orinoquía se encuentra reportada la subespecie *L. p. pseudopardalis*. En el Pacífico y en la zona central (Región andina) habita *L. p. aequatorialis* (aproximadamente hasta el departamento de Cundinamarca). Finalmente, existen registros de *L. p. melanurus*, en la vertiente sur oriental de los Andes y de toda la Amazonía (Clavijo & Ramírez 2007). Sin embargo, esta información puede ser poco acertada debido a que morfológicamente estas subespecies son muy parecidas y se confunden fácilmente, ya que se diferencian por pequeños detalles que presentan gran variación entre individuos (Eizirik *et al.* 1998).

3.4. Técnicas no invasivas

Las técnicas no invasivas comenzaron a usarse en animales silvestres aproximadamente hace dos décadas (Waits & Paetkau 2005), y a partir de análisis no invasivos alrededor del mundo se han realizado estudios con invertebrados (caracoles y mariposas), anfibios y reptiles, aves y en su mayoría con mamíferos (osos, canidos, elefantes, chimpancés, felinos, cetáceos), por medio de los cuales se han realizado diversos tipos de investigaciones como: identificación de individuos para estudios de tamaño poblacional y migración de individuos, casos forenses de animales silvestres, delimitación de poblaciones y de parámetros genéticos para poblaciones, evaluación de sistemas de apareamiento y ecología del comportamiento (Beja-Pereira *et al.* 2009). Por lo tanto se han convertido en una alternativa viable, factible y de bajo costo en el trabajo con poblaciones de carnívoros salvajes, solitarios, terrestres crepusculares y nocturnos, de carácter elusivo y con densidades de población muy bajas, como es el caso de *L. pardalis* (Wong *et al.* 1999).

Dentro de las diferentes tipos de muestras no invasivas que se pueden obtener, las heces son las más usadas en varias especies, debido a que se pueden encontrar en la naturaleza, y proporcionan más información que otro tipo de muestras. Permiten conocer la dieta del animal, el estado hormonal, la presencia de hormonas reproductivas

y las de enfermedades que presenta el animal (Kohn & Wayne 1997; Bosch *et al.* 2005; Beja-Pereira *et al.* 2009). Además, la información que nos puede aportar el estudio de las heces con métodos moleculares va mucho más allá de la identificación taxonómica, de la fisiología y de la biología del animal. Los análisis genéticos a partir de excrementos nos pueden informar sobre aspectos relacionados con el comportamiento de una especie, sobre el estado de sus poblaciones, el área de dispersión o el tamaño del territorio ocupado por los individuos, los niveles de variabilidad genética e incluso de las relaciones filogeográficas entre diferentes poblaciones (Kohn & Wayne 1997).

Debido a que el ADN extraído de las heces proviene de células descamadas del lumen del epitelio intestinal de los individuos, en este tipo de muestras las células están acompañadas de otros compuestos de poco interés para el desarrollo de la investigación y que pueden interferir con la obtención del material genético (Albaugh *et al.* 1992). Por esta razón, la extracción de ADN a partir de heces presenta una serie de inconvenientes como: poca cantidad y calidad del ADN que se puede obtener, errores en la genotipificación y problemas de contaminación (Bosch *et al.* 2005), presencia de inhibidores enzimáticos de la PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés), y la coextracción del ADN de las presas del animal de interés, factores que pueden limitar su aplicación en determinados estudios (Echegaray *et al.* 2005). Otras limitaciones que se deben tener en cuenta al momento de extraer material genético a partir de heces, es que la degradación del ADN extraído presenta un incremento por las condiciones ambientales poco óptimas para la conservación de ADN como altas temperaturas, humedad y precipitación alta, del mismo modo se puede presentar una alta contaminación por uso inadecuado de métodos de conservación de las muestras y preservación del ADN extraído ocasionando la amplificación de fragmentos de ADN no-específicos (no perteneciente a la muestra analizada) (Echegaray *et al.* 2005). Finalmente, deben considerarse las limitaciones asociadas a la extracción de ADN, debido a que se dispone de poca cantidad al trabajar con muestras fecales (Taberlet *et al.* 1996). En consecuencia, es necesario utilizar metodologías que permitan extraer la mayor cantidad de ADN de buena calidad para evitar la pérdida de información importante, aumentando la eficiencia de los marcadores moleculares empleados para la identificación de la especie a la cual corresponde una muestra fecal (Echegaray *et al.* 2005).

3.4.1. Conservación de muestras:

En la actualidad los métodos más utilizados para la preservación de muestras de heces son: desactivación de nucleasas a través de la deshidratación utilizando etanol al 100% y silica gel, técnicas de secado como la liofilización y el calor, desactivación de nucleasas a través de la eliminación de cationes usando agentes quelantes como la solución salina de DMSO/EDTA/Tris (solución DETs), y la inhibición de la actividad de las nucleasas a través del almacenamiento de muestras mediante la congelación a -20°C (Palomares *et al.* 2002). Estos métodos han sido descritos para este tipo de muestras en diferentes especies de felinos, como: *Lynx pardinus* en España, *Panthera tigris tigris* en la India, *Puma concolor*, *Panthera onca*, *Herpailurus yagouaroundi*, *L. pardalis* y *Leopardus wiedii* en Brasil, México y Belize (Bhagavatula & Singh 2006; Haag *et al.* 2009; Palomares *et al.* 2002; Roques *et al.* 2010; Wultsch 2008).

3.4.2. Extracción de ADN:

La extracción de ADN es un paso crucial en los análisis genéticos utilizando muestras no invasivas, debido a que todos los pasos posteriores dependen de la concentración, la calidad, la pureza del ADN y la cantidad de los inhibidores de la amplificación en el ADN extraído (Palomares *et al.* 2002). Debido a esto, en la última década han sido utilizados varios métodos para extraer el ADN fecal incluyendo: protocolo fenol-cloroformo, partículas magnéticas, y Kits de extracción con sílice disponibles comercialmente (Bhagavatula & Singh 2006). Del mismo modo, múltiples estudios han evaluado la eficacia de diferentes métodos de extracción. Sin embargo, aún no hay un consenso claro sobre un método óptimo y la conclusión a la que se ha llegado es que el método óptimo puede variar según la especie y la región geográfica. Actualmente, el método más utilizado para la extracción de ADN de muestras fecales es el kit de extracción con columnas de membranas de sílice (Qiagen) el cual puede variar su rendimiento según las especies y las condiciones climáticas (Waits & Paetkau 2005).

Estos protocolos de extracción se han usado con diferentes especies de carnívoros, como: *Canis lupus* (España), *Lynx pardinus* (España), *Panthera tigris tigris* (India), *Panthera onca*, *Puma concolor*, *Herpailurus yagouaroundi*, *Leopardus pardalis* y *Leopardus wiedii* (Brasil y México) (Bhagavatula & Singh 2006; Haag *et al.* 2009; Palomares *et al.* 2002; Roques *et al.* 2010; Wultsch 2008).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Estandarizar y optimizar los protocolos de preservación de muestras y extracción de ADN fecal para la amplificación de ADN mitocondrial a partir de heces de individuos en cautiverio de *Leopardus pardalis* en Colombia.

4.2. Específicos

1. Evaluar y determinar la influencia del protocolo de preservación de muestras fecales sobre la cantidad, pureza y calidad de ADN extraído.
2. Evaluar y determinar la influencia del protocolo de extracción de ADN fecal sobre la cantidad, pureza y calidad de ADN extraído.
3. Evaluar y determinar la mejor combinación de protocolos de preservación y extracción de ADN de muestras fecales que garantice una amplificación exitosa de fragmentos de ADN mitocondrial de *L. pardalis*.

5. METODOLOGÍA

5.1. Muestras fecales

Para el estudio, se colectaron 33 muestras fecales de individuos de *L. pardalis* en cautiverio. Tres muestras fueron colectadas en el Centro de Atención y Valoración de Fauna Silvestre Fundación Bioandina Colombia (Guasca), y seis muestras fueron colectadas en cada Zoológico que tienen en su colección especímenes del género *Leopardus* localizados en: Mesitas (Zoológico de Santa Cruz), Girardot (Parque Recreativo y Zoológico Piscilago), Pereira (Zoológico Matecaña), Barranquilla (Fundación Botánica y Zoológica de Barranquilla) y Villavicencio (Merecure Parque Agroecológico S. A.).

Con base en la bibliografía se eligieron los métodos más utilizados para la conservación de muestras fecales y para la extracción de ADN a partir de heces. Igualmente, fueron elegidos los principales marcadores moleculares utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN de *L. pardalis*.

5.2. Métodos de preservación

Las 33 muestras fueron colectadas mediante tres diferentes protocolos de preservación (11 muestras con cada protocolo): (1) colecta y almacenamiento de heces en recipientes

plásticos con buffer DETs (Anexo 1) cubriendo la muestra (Wultsch 2008) durante 48 horas, luego las muestras fueron trasladadas a bolsas Ziploc y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; (2) colecta de heces en bolsas de papel para su posterior secado en horno a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Palomares *et al.* 2002) tras lo cual se almacenaron en una caja plástica con silica gel a temperatura ambiente; y (3) se conservaron en recipientes plásticos con etanol absoluto por un día, y fueron trasladadas a bolsas Ziploc que contenían aproximadamente 4 gr. de silica gel por gramo de materia fecal (Bhagavatula & Singh 2006; Haag *et al.* 2009; Roques *et al.* 2010) para su almacenamiento en una caja plástica a temperatura ambiente.

5.3. Métodos de extracción de ADN

Según el protocolo de colecta utilizado para la conservación de las heces, se usaron diferentes técnicas para obtener las células epiteliales del lumen que se encuentran en la superficie de las heces. Las muestras secadas en horno eran procesadas mediante el raspado de la superficie del excremento (Fig. 1A) con un bisturí previamente esterilizado. Mientras que para las muestras preservadas en buffer DETs y etanol-silica se les cortaba con un bisturí la parte superior (Fig. 1B). Sin embargo, la diferencia entre los dos últimos métodos, es que las de buffer DETs al encontrarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no deben ser extraídas hasta el momento exacto del procesamiento para que las muestras no se deshagan.



Fig. 1 Procesamiento de muestras para los diferentes tipos de métodos de conservación

Para cada protocolo de extracción fueron procesadas 11 muestras conservadas por método de preservación. Para un total de 33 muestras por método de extracción, a partir de los siguientes protocolos: el primer protocolo fue realizado con QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN (Bhagavatula & Singh 2006; Echegaray *et al.* 2009; Ernest *et al.* 2000; Haag *et al.* 2009; Palomares *et al.* 2002; Roques *et al.* 2010) modificado (Anexo 2). El segundo protocolo de extracción fue fenol-cloroformo descrito por Reed *et al.* (1997) modificado (Anexo 3). Finalmente, se realizó una variación de la extracción con fenol-cloroformo descrita por Ernest (2000) (Anexo 4). Las extracciones se realizaron por duplicado para asegurar que los resultados obtenidos no fueran producto de errores en el proceso de extracción.

Para las dos variaciones de fenol-cloroformo decidió probarse diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 para cada uno de los métodos de extracción, obteniendo mejores resultados con la dilución de 1:100, por lo que se diluyeron todas las extracciones a esta proporción.

5.4. Determinación de la calidad, pureza y concentración de ADN extraído

El ADN extraído se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm (A260) usando el cuantificador marca NanoVue®, mediante este método también se logró obtener los valores estimados de la pureza del ADN frente a proteínas, entendida como la relación de absorbancia (A260/ A280nm).

Para cada uno de los protocolos se determinó la calidad del ADN obtenido mediante una electroforesis de productos amplificados del gen mitocondrial de ARN ribosómico 16S en geles de agarosa al 2.0% teñido con bromuro de etidio (10 µg/mL). Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV.

5.4.1. Amplificación de ADN:

Para evaluar indirectamente la calidad del ADN extraído, el estado de preservación y la utilidad de las muestras fecales, se amplificaron tres fragmentos con diferentes tamaños: 135 pb, 335 pb y 563 pb del gen mitocondrial de ARN ribosómico 16S (Tabla 1). Los primers utilizados para la amplificación de estos fragmentos fueron diseñados a partir de las regiones conservadas de un alineamiento de las secuencias del subphylum Craniata. Para este alineamiento se obtuvieron 32 secuencias de GenBank, los cuales se alinearon

mediante el programa PipMaker (Schwartz *et al.* 2000). Finalmente, los primers fueron diseñados con base en las regiones conservadas con el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000).

Nombre Primer	Secuencia 5' - 3'	Combinación	Tamaño
16sUniMuseo-L1	GYTTACGACCTCGATGTTGG	16sUniMuseo-L1 x 16sUniMuseo-H1	135 pb
16sUniMuseo-L2	AWYTTHTGGTTGGGGYRAC	16sUniMuseo-L2 x 16sUniMuseo-H1	335 pb
16sUniMuseo-L3	CCGTGNAANGTAGCRYAATC	16sUniMuseo-L3 x 16sUniMuseo-H1	563 pb

Tabla 1. Oligonucleótidos degenerados para amplificar 16S. Las diferentes amplificaciones se hicieron utilizando el mismo oligonucleótido H (16sUniMuseo-H1) y los diferentes oligonucleótidos F (16sUniMuseo-F1, 16sUniMuseo-F2 y 16sUniMuseo F3). Las bases degeneradas son: **R**= A+G, **Y**=C+T, **W**= A+T, **H**= A+C+T, **N**= A+C+G+T

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 30 μ L con 1X de Buffer de reacción (Invitrogen 20 mM Tris HCl (pH 8.4) y 50 mM KCl), 2.0 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 μ M de cada primer (de acuerdo con cada combinación) (Invitrogen), 0.75U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 2 μ L de ADN extraído. Las condiciones de amplificación fueron 94°C por 2 min seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos con una extensión final de 72°C por 1 min. El producto de amplificación fue visualizado en un gel de agarosa al 2.0%.

5.5. Análisis de datos

Las variables analizadas en este estudio fueron: el método de conservación (A) y el método de extracción (B), con el fin de definir la influencia global que éstas tuvieron en la pureza y cantidad de ADN extraído. Para el estudio de la concentración, la pureza y el número de amplificaciones exitosas se usó un diseño aleatorio con arreglo factorial 3 x 2. El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS Statistics v17.0.

Para conocer los efectos exactos se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Tukey. Se consideraron significativos los valores de P menores que 0.05 ($P < 0.05$).

Para evaluar las diferencias entre los métodos de conservación y extracción con respecto a la cantidad, se realizó un análisis de diferencias de proporciones.

6. RESULTADOS

Para cada método de extracción (Kit, Fenol y modificación de Fenol con Tritón) en total se evaluaron 33 muestras fecales, correspondientes a 11 muestras por cada uno de los métodos de colecta evaluados (secado en horno, buffer congelado y en etanol-silica).

6.1. Cantidad de ADN

Los resultados obtenidos mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de preservación, donde la cantidad promedio de ADN obtenida fue significativamente mayor para etanol-silica ($P= 0.03$), comparado con secado en horno y buffer congelado ($P= 0.592$) los cuales no presentan diferencias entre sí. Del mismo modo, se encontraron diferencias significativas entre los métodos de extracción ($P= 0.0$), donde la cantidad de ADN obtenida fue significativamente mayor para los métodos de Fenol y variación de Fenol con Triton ($P= 0.068$), comparado con QIAamp DNA Stool Mini Kit ($P= 0.001$).

Finalmente, la interacción entre los métodos de preservación y extracción mostraron que en cuanto a cantidad existen diferencias significativas ($P= 0.019$). Según los datos obtenidos para alcanzar las mayores cantidades de ADN, se deben usar: Fenol y la variación de Fenol con Tritón como primera opción con etanol-silica ($116.24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), como segunda opción con secado en horno ($45.37 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y por último con buffer congelado ($42.92 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Sin embargo, para obtener los mejores resultados en QIAamp DNA Stool Mini Kit la primera elección debe ser secado en horno ($31.36 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), seguido por etanol-silica ($24.38 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y finalmente por buffer congelado ($19.88 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Fig. 2).

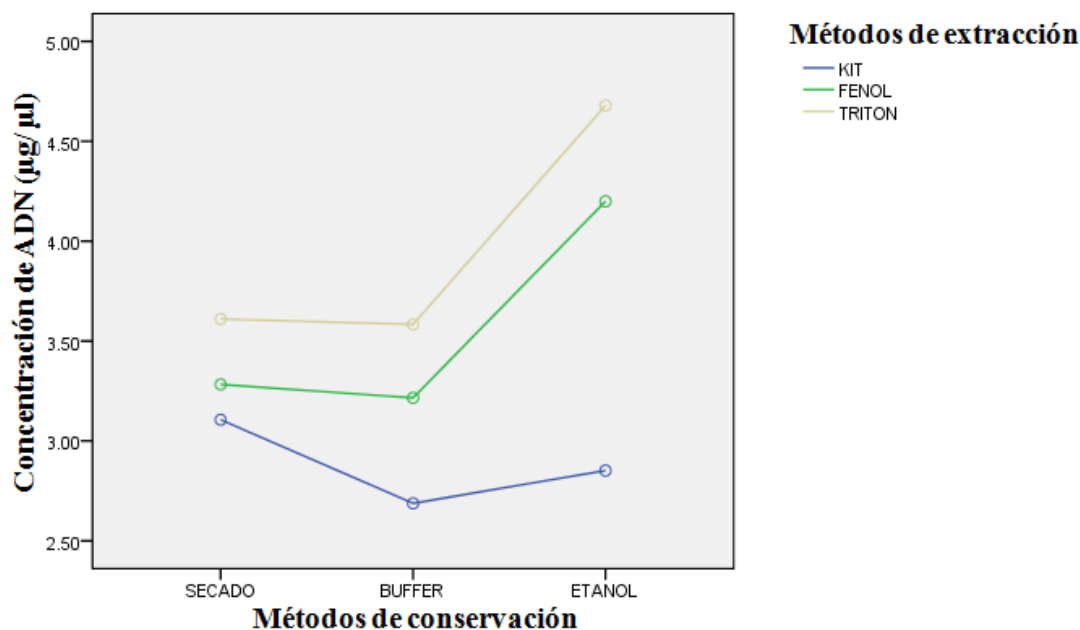


Fig. 2. Relación de la cantidad de ADN entre los métodos de conservación y extracción.

6.2. Pureza de ADN

La pureza del ADN obtenido para muestras conservadas en los métodos de colecta, expuso que buffer congelado presentó el promedio más alto de pureza ($A_{260}/A_{280} = 1,854$), seguido por etanol-silica ($A_{260}/A_{280} = 1,789$) y por último secado horno ($A_{260}/A_{280} = 1,694$), encontrando diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,004$). Por medio de la comparación múltiple se hallaron diferencias entre los datos obtenidos en secado en horno y buffer congelado ($P = 0,003$), pero no se obtuvieron diferencias entre secado con etanol-silica y buffer congelado con etanol-silica ($P = 0,110$ y $P = 0,354$ respectivamente). El método de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit presentó un mayor promedio ($A_{260}/A_{280} = 1,884$), seguido por modificación de Fenol con Tritón ($A_{260}/A_{280} = 1,802$) y Fenol ($A_{260}/A_{280} = 1,693$). Mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey se halló que QIAamp DNA Stool Mini Kit muestra diferencias con respecto al Fenol ($P = 0,013$) pero no con respecto a Fenol con Triton ($P = 0,732$), al igual que no existen diferencias significativas al comparar Fenol y Fenol con Triton ($P = 0,072$).

Los valores de pureza para el ADN obtenido con las combinaciones de los diferentes protocolos, arrojaron los mismos resultados obtenidos anteriormente: siendo QIAamp DNA Stool Mini Kit el que obtuvo un mayor promedio (buffer congelado $A_{260}/A_{280} = 1,901$, etanol-silica $A_{260}/A_{280} = 1,826$ y secado al horno $A_{260}/A_{280} = 1,804$), seguido por

los resultados conseguidos por la variación de Fenol con Tritón (buffer congelado $A_{260}/A_{280}= 1.912$, etanol-silica $A_{260}/A_{280}= 1.789$ y secado horno $A_{260}/A_{280}= 1.706$) y por último con Fenol (buffer congelado $A_{260}/A_{280}= 1.749$, etanol-silica con $A_{260}/A_{280}= 1.749$ y secado horno $A_{260}/A_{280}= 1.572$) (Fig. 3). Al analizar los datos de pureza no se encontró una interacción entre los métodos de preservación y los métodos de extracción ($P= 0.701$).

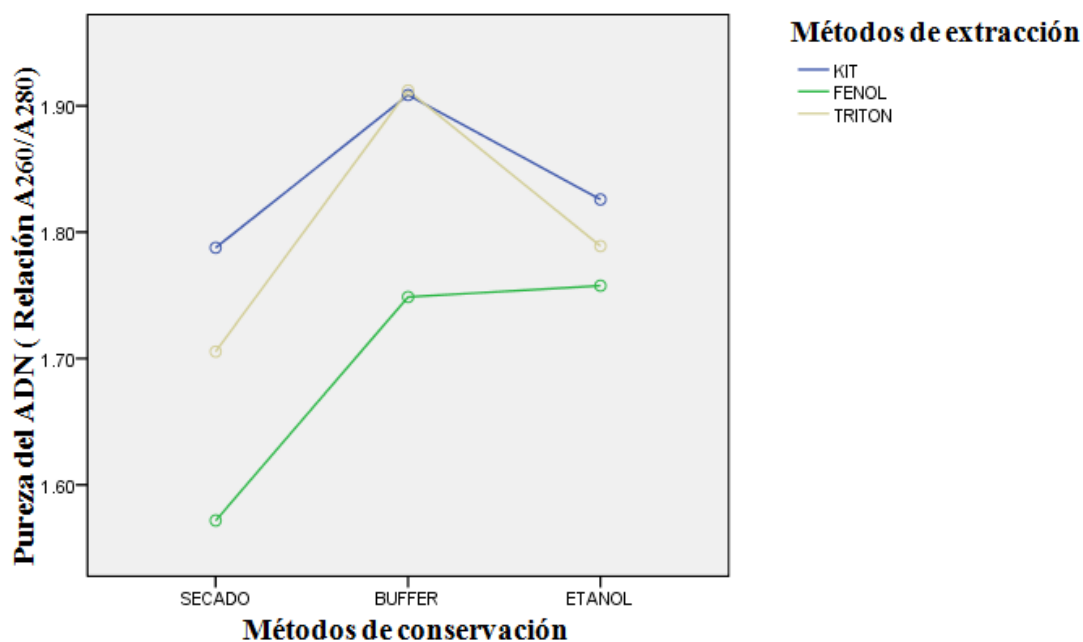


Fig. 3. Relación de la pureza de ADN entre los métodos de conservación y extracción.

6.3. Amplificación de ADN mediante PCR

La amplificación de los tres fragmentos del gen ARN ribosómico 16S con diferentes tamaños: 135 pb, 335 pb y 563 pb, sólo fue exitosa para el fragmento de 135 pb (Fig. 4). Por esta razón, se utilizó este fragmento para evaluar la efectividad en análisis basados en PCR del ADN fecal extraído con cada uno de los protocolos.

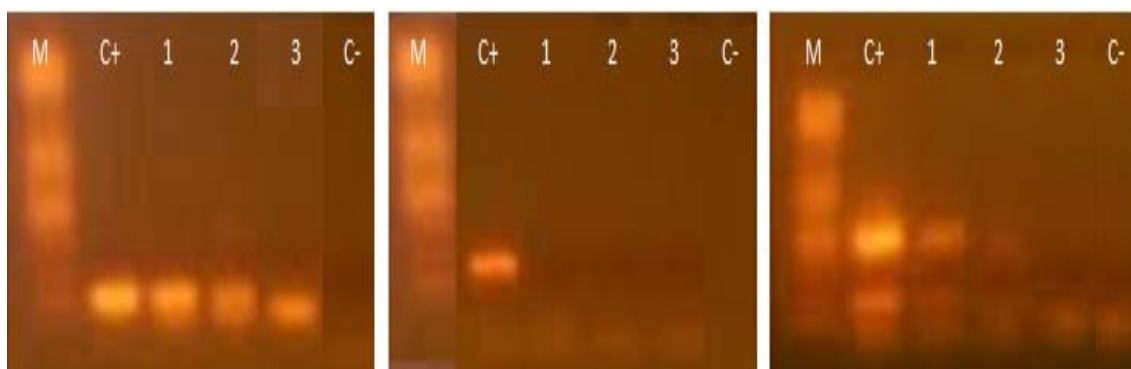


Fig. 4. Evaluación de amplificación por PCR del gen mitocondrial 16S de algunas de las muestras fecales para: A) fragmentos de 135 pb B) fragmentos de 335 pb C) fragmentos de 563pb. Donde: M= Marcador (GeneRuler™ DNA Ladder Mix-Fermentas), C+ = Control positivo de Sangre 1= Lpa 01, 2= Lpa 02, 3= Lpa 03, C- = Control negativo para la reacción de amplificación.

De un total de dos repeticiones y dos replicas por amplificación un 69,70% fueron exitosas. Los métodos de extracción arrojaron diferencias significativas en los porcentajes de amplificaciones, mostrando que con QIAamp DNA Stool Mini Kit se obtuvo el mayor porcentaje de amplificaciones exitosas (93.94%), mientras que Fenol y variación de Fenol con Triton, se obtuvieron porcentajes de 60% y 55.56% respectivamente (Fig. 5). Del mismo modo, se encontró que el método de conservación influye sobre el porcentaje de amplificaciones, obteniendo así un mayor porcentaje para las muestras que se conservaron en secado horno (87.88%), seguido por el buffer congelado (63.64%) y por último con etanol-silica (57.57%). La combinación de todos los métodos para la amplificación, confirmó que QIAamp DNA Stool Mini Kit obtiene los porcentajes de amplificación más altos, independientemente de la forma en que fueron conservadas las muestras (secado horno y buffer congelado= 100%, y etanol-silica= 81.82%), mientras que Fenol y variación de Fenol con Tritón obtuvieron porcentajes menores (secado horno= 80% y 83.33%, buffer congelado= 60% y 33.33%, etanol-silica= 40% y 50%, respectivamente) (Fig. 6).

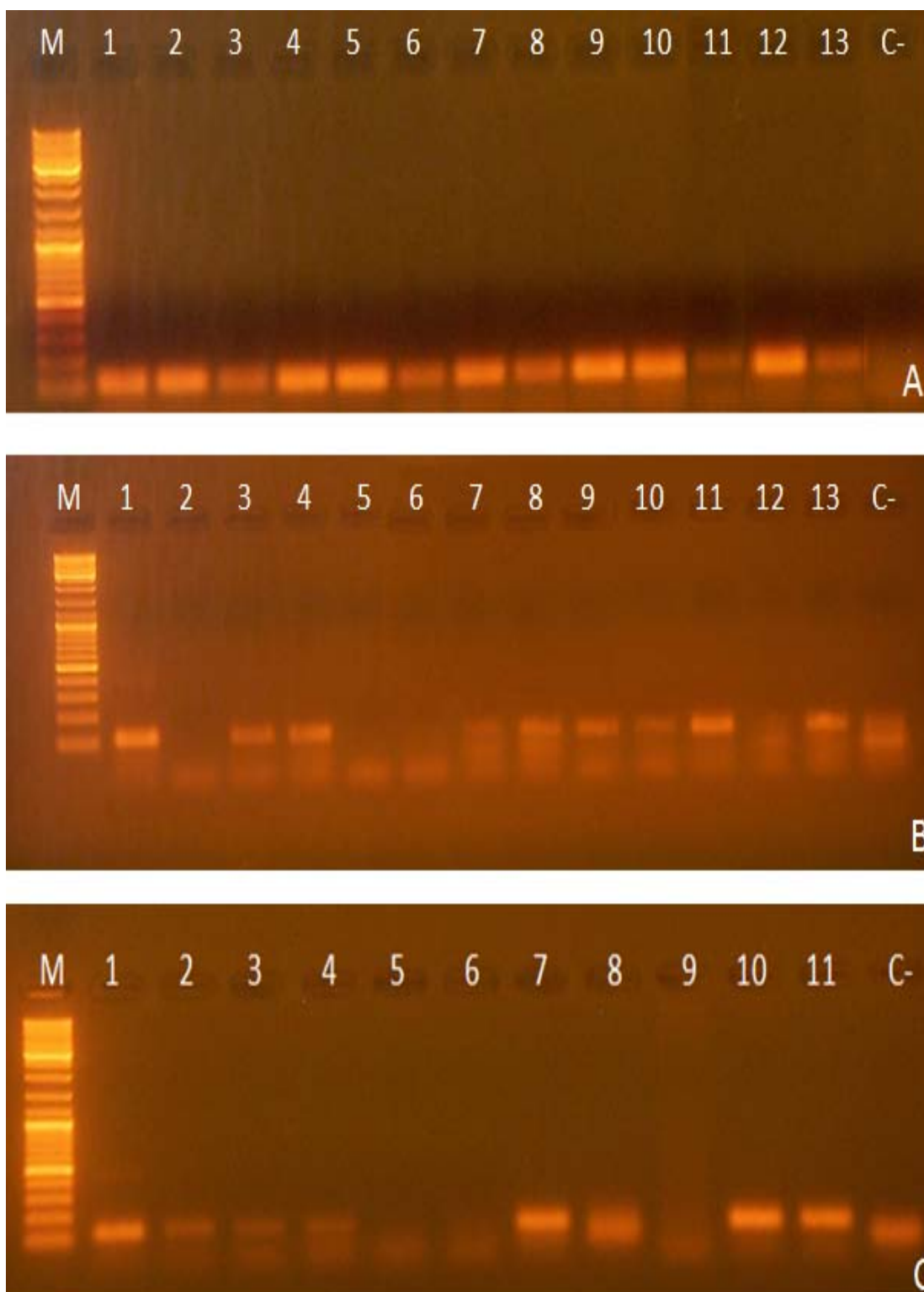


Fig. 5 Amplificación por PCR del gen mitocondrial 16S de algunas de las muestras fecales con fragmentos de 135 pb para: A) Muestras extraídas con QIAamp DNA Stool Mini Kit, B) Diluciones 1:100 con Fenol, C) Diluciones 1:100 con Variación Fenol con Tritón. Donde: M= Marcador (GeneRuler™ DNA Ladder Mix-Fermentas), 1= Control positivo de Sangre 2= Lpa 02, 2= Lpa 02, 3= Lpa 03, 4= Lpa 04, 5= Lpa 05, 6= Lpa 06, 7= Lpa 07, 8= Lpa 08, 9= Lpa 09, 10= Lpa 10, 11= Lpa 11, 12= Lpa 12, 13= Lpa 13, C- = Control negativo para la reacción de amplificación.

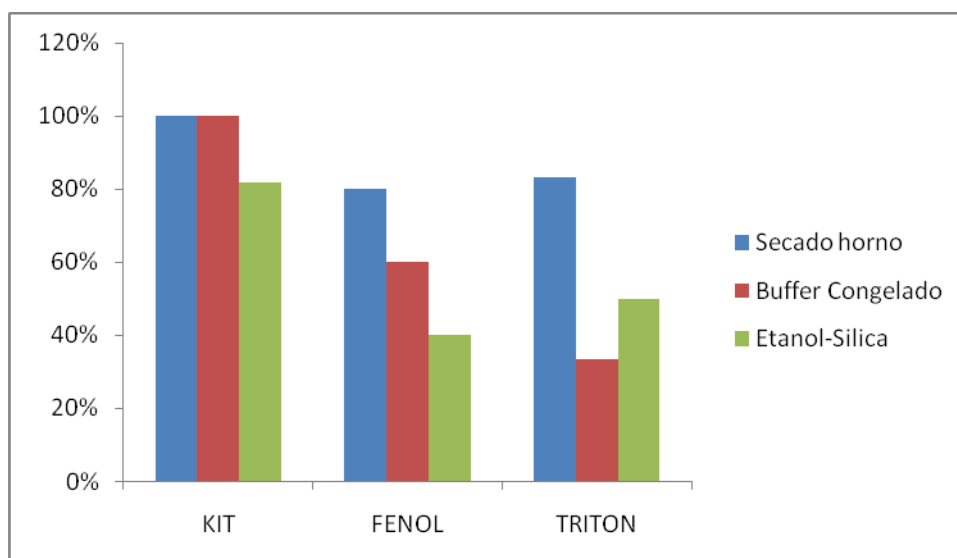


Fig. 6 Porcentaje de amplificación para cada método de conservación y extracción usando muestras fecales.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

7.1. Cantidad de ADN

Por medio de los resultados obtenidos, se puede proponer a etanol-silica como el método de preservación que permite obtener la mayor cantidad de ADN; en cuanto a buffer congelado y secado en horno no se pudo encontrar diferencias significativas, para exponer cual es mejor. Sin embargo, la proporción de buffer congelado fue la que presentó valores más bajos. Lo cual se relaciona con el hecho que el ADN extraído proviene de las células epiteliales del lumen del intestino que se encuentran en la superficie de las muestras fecales, y la cantidad de células fijadas en la muestras va a determinar la cantidad de ADN extraído (Frantzen *et al.* 1998). Por esta razón, con el uso de compuestos líquidos (como el buffer DETs) se pueden perder dichas células, ya que podrían diluirse en el buffer antes de ser fijadas. Sin embargo, únicamente Frantzen *et al.* (1998) utilizan el buffer DETs en el que se almacena la muestra para realizar la extracción de ADN en vez de la materia fecal. Por esta razón, Palomares *et al.* (2002) recomienda el secado como un método de colecta óptimo para la realización de estudios genéticos con muestras fecales. En cuanto a los métodos de extracción probados, encontramos que Fenol y variación de Fenol con Triton presentaron los valores más altos en cuanto a la concentración de ADN extraído en comparación con los datos obtenidos con QIAamp DNA Stool Mini Kit. Sin embargo, los resultados obtenidos con Fenol y la variación de Fenol con Triton pueden presentar errores debido a que existen compuestos que pueden no ser retirados en el proceso de extracción e interferir con los

mismos. Por lo cual, Bhagavatula & Singh (2006) afirman que la concentración de ADN no es un factor determinante al trabajar con heces.

La presente investigación encontró que existe una interacción entre los métodos de conservación probados y los métodos de extracción. El método que presenta una variación es el obtenido por QIAamp DNA Stool Mini Kit, debido a que la mayor cantidad de ADN se da con secado en horno, seguido por etanol-silica y finalmente por buffer congelado, objetando los resultados conseguidos en el análisis general para los métodos de preservación. Lo que indicaría que al usar Kit es mejor preservarlo con secado en horno que con los otros dos métodos, contrario a lo ocurre con Fenol y la variación de fenol.

7.2. Pureza del ADN

Teniendo en cuenta que un rango de A_{260}/A_{280} entre 1.8 y 2 indica un grado óptimo de pureza, y que cocientes inferiores a este rango indican que este puede estar contaminado con proteínas (Broquet *et al.* 2007), se puede notar que independientemente del método de conservación de la muestra las extracciones con QIAamp DNA Stool Mini Kits obtuvieron un rango de pureza (A_{260}/A_{280}) entre 1.8 y 2, mientras que para la variación de Fenol con Triton, sólo las muestras conservadas en buffer están dentro de este rango de pureza y para fenol las extracciones realizadas mostraron valores fuera de este rango. De acuerdo con esto, QIAamp DNA Stool Mini Kit tiene una mayor eficiencia en retirar compuestos proteicos que se pueden encontrar en las muestras fecales que influyen directamente sobre el éxito de la amplificación (Beja-Pereira *et al.* 2009).

Los resultados obtenidos para la pureza arrojaron diferencias significativas en cuanto a los métodos de conservación y extracción pero no a la interacción de estos. Por lo que buffer congelado es el mejor método para la conservación de muestras y QIAamp DNA Stool Mini Kit es el método óptimo para obtener ADN con un buen índice de pureza.

Estos resultados contrastan lo afirmado por Bhagavatula & Singh (2006) puesto que ellos no encontraron diferencias significativas entre los métodos de conservación y extracción de de ADN fecal en *Panthera tigris tigris*. Lo que puede deberse a que no se cometieron errores en las técnicas utilizadas para obtener las células epiteliales que fueron efectivas para los tres protocolos de conservación, ya que como lo indica

Stenglein *et al.* (2010) la porción de la muestra fecal procesada para la obtención del ADN, tiene un efecto sobre la cantidad y la pureza de este. Sin embargo, a este efecto no se le ha prestado mucha atención en los estudios genéticos con heces, debido a que en la mayoría de estudios no especifican la porción procesada para la realización del análisis genético.

7.3. Amplificación de ADN

Las diferencias significativas encontradas para la amplificación del ADN entre los métodos de extracción, sugieren que el método de extracción incide en el porcentaje de amplificación, ya que según Frantz *et al.* (2003) el método de extracción para la obtención de ADN fecal debe ser capaz de retirar la mayor cantidad de inhibidores y restos alimenticios posibles, que presentan naturalmente las muestras fecales, maximizando el porcentaje de amplificación con este tipo de muestras. Por esta razón los mejores porcentajes de amplificación, se obtuvieron con el QIAamp DNA Stool Mini Kits ya que este cuenta con un compuesto específico (InhibitEX) que absorbe los inhibidores y las sustancias que degradan el ADN, y posteriormente el material genético es purificado en los tubos de doble columna, proporcionados por el Kit.

Los métodos de extracción con fenol (clásico y variante con Tritón) son ampliamente usados en los estudios realizados con ADN fecal (Foran *et al.* 1997; Paxinos *et al.* 1997; Redd *et al.* 1997; Ernest *et al.* 2000; Wan *et al.* 2003). Sin embargo, para este estudio estos protocolos no permitieron obtener productos amplificables para las muestras analizadas, a pesar de los dos lavados hechos con fenol y cloroformo. Según Kreader (1995) esto se puede deber a que gran cantidad de los inhibidores encontrados en las muestras fecales presentan la misma solubilidad que el ADN, lo que imposibilita que estos compuestos queden en el precipitado. A causa de esto, se decidió realizar diluciones que permitieran disminuir las concentraciones de estos inhibidores para aumentar el porcentaje de amplificación, incrementando el éxito de las amplificaciones entre un 50-60% aunque no se llegó a igualar los porcentajes obtenido con QIAamp DNA Stool Mini Kits de QIAGEN. Este método fue el más eficiente para el trabajo con heces pues tuvo el mayor porcentaje de amplificación, lo que concuerda con lo encontrado por Bhagavatula & Singh (2006) y Farrell *et al.* (2000). La veracidad de los resultados obtenidos se ven reflejados en la preferencia de los investigadores en el uso

de QIAamp DNA Stool Mini Kits de QIAGEN como método de extracción de ADN fecal sin importar la especie de interés.

Los porcentajes de amplificación muestran que no existe una relación entre la cantidad y la calidad de ADN obtenido de heces, puesto que el tener una gran cantidad de ADN no garantiza que éste sea amplificable (Kreader, 1995). Debido a que los inhibidores pueden interferir en el éxito de la amplificación, debe ser usado un método que elimine la mayor cantidad posible de éstos (Murphy *et al.* 2003; Stenglein *et al.* 2010). De acuerdo a esto, como resultado de las variaciones y modificaciones realizadas para los métodos de fenol y a la eficiencia de las técnicas utilizadas para obtener las células epiteliales del lumen intestinal, se lograron obtener amplificaciones con todos los métodos de conservación y extracción utilizados para la realización de estudios genéticos.

Los resultados obtenidos para la cantidad y pureza con los métodos de preservación y extracción evaluados arrojaron diferencias estadísticamente significativas pero al ser comparadas con los datos de calidad se encuentra que estas dos variables no siempre pueden asegurar el éxito en la amplificación, por lo que se puede sugerir que estas variables no tienen la misma relevancia que la calidad del ADN en términos de eficiencia en la amplificación por PCR obtenido con cada uno de los métodos de preservación y extracción. Debido a esto, la mayoría de estudios que evalúan y determinan la influencia de los métodos utilizados en el análisis genético de muestras fecales, analizan la calidad (porcentaje de amplificaciones) que se obtiene con cada uno de los distintos métodos de conservación y de extracción (Wasser *et al.* 1997; Frantz *et al.* 2003; Murphy *et al.* 2003; Stenglein *et al.* 2010). Este se debe según Oka & Takenaka (2001) a que el mayor problema al trabajar con muestras fecales es que contienen algunas sustancias que no solo inhiben la reacción de amplificación sino que también degradan el ADN. Según Broquet *et al.* (2007) el análisis de la pureza a partir de la relación entre A_{260}/A_{280} se determina por la absorbancia de las proteínas a 280nm, sin tener en cuenta la presencia de otros inhibidores presentes en la materia fecal como las sales biliares, la bilirrubina, sustancias húmicas, sustancias fúlvicas y ácidos tánicos producidas durante la descomposición de la materia fecal (Kreader 1995), lo que hace necesario la evaluación de la relación entre A_{230}/A_{260} en futuras investigaciones.

De acuerdo con los resultados para la cantidad, pureza y amplificación del ADN fecal obtenidos con los diferentes métodos de colecta y extracción, se puede recomendar el uso del QIAamp DNA Stool Mini Kit con todos los métodos de conservación. Sin embargo, el que obtuvo los mejores resultados en cuanto a cantidad de ADN con este método de extracción fue secado al horno. Es por esto que al trabajar con muestras fecales con *Leopardus pardalis* se recomienda conservar las muestras secadas en horno a 40 °C y posteriormente seguir el procedimiento de extracción modificado a partir de las recomendaciones del fabricante (Anexo 2).

A pesar que los otros dos métodos de extracción evaluados no obtuvieron los mismos resultados en cuanto a amplificación, que los obtenidos con QIAamp DNA Stool Mini Kit, las modificaciones realizadas permitieron obtener ADN amplificable; por lo que si se desean usar se recomienda utilizar el método de secado al horno tanto para Fenol como para la variación de Fenol con Tritón (Anexo 3 y Anexo 4) realizando diluciones de 1:100 con el ADN extraído.

La cantidad y pureza de ADN obtenidos con los métodos de preservación y extracción evaluados mostraron diferencias estadísticamente significativas, pero al ser comparadas con los datos de calidad se encuentra que estas dos variables no siempre pueden asegurar el éxito en la amplificación.

Las modificaciones realizadas permitieron obtener ADN amplificable con Fenol y variación de Fenol con Triton, estos deberían utilizados con el método de secado al horno para obtener el mayor porcentaje de ADN amplificable.

Para obtener los mejores resultados al trabajar con muestras fecales de individuos de *Leopardus pardalis* deben ser preservadas secadas en horno a 40°C y posteriormente realizar el proceso de extracción con QIAamp DNA Stool Mini Kit con las modificaciones realizadas.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda la evaluación de la relación entre A_{230}/A_{260} para analizar cómo los compuestos fenólicos pueden interferir en la extracción y amplificación de ADN provenientes de muestras fecales.

Para estudios posteriores se recomienda la implementación de primers más específicos para *L. pardalis*.

Para futuras investigaciones se recomienda el análisis de secuenciación para la genotipificación de los individuos para corroborar la precisión de los resultados.

Se recomienda realizar un estudio piloto donde se prueben la viabilidad de las metodologías estandarizadas para el estudio de poblaciones naturales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albaugh GP, Iyengar V, Lohani A. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer* 1992; **52**: 347-350
- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources* 2009; **9**: 1279–1301
- Bhagavatula J, Singh L. Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: A pilot study. *BMC Genetics* 2006; **48** (7): 1-12
- Bosch M, Marmi J, Ferrando A, López-Giráldez F, García E, Ponsá M, Kellermann T, Guallar B, Bisbal F, Domingo-Roura X. Genotipar sin capturar. *Galemys* 2005; **17**: 81-102
- Broquet T, Menard N, Petit E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics* 2007; **8**: 249-260
- Clavijo A, Ramírez GF. Taxonomía, Distribución y Estado de Conservación de los felinos Suramericanos: Revisión Monográfica. *Boletín Científico Centro de Museos de Historia Natural* 2007; **13** (2): 43-60
- DeYong RW, Honeycutt RL. The Molecular toolbox: Genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 2005; **69**:1362-1384
- Echegaray J, Martínez A, Ayala AH, Martínez de Lecea F, Celis JB, de la Torre JA. El lobo (*Canis lupus*) en la comunidad autónoma del país Vasco. Uso del ADN fecal para el seguimiento de sus poblaciones. (eds.). Dirección de Biodiversidad del Departamento de Ordenación del Territorio y Medio Ambiente del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz. Informe inédito. Madrid, España. 2005; 252 pp
- Eizirik E, Bonatto S, Johnson W, Crawshaw P, Vie JC, Brousset D, O'Brien SJ, Salzano F. Phylogeographic patterns and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in two Neotropical Cats (Mammalia, Felidae). *Molecular Evolution* 1998; **47**: 613-624
- Ernest HB, Penedo MC, May BP, Syvanen M, Boyce WM. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology* 2000; **9**: 433-441
- Farrell LE, Roman J, Sunquist ME. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 2000; **9**: 1583–1590
- Foran DR, Crooks KR, Minta SC. Species Identification from Scat: An Unambiguous Genetic Method. *Wildlife Society Bulletin* 1997; **25** (4): 835-839
- Frantzen MA, Silk JB, Ferguson JW, Wayne RK, Kohn MH. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* 1998; **7**: 1423-1428

Frantz AC, Pope LC, Carpenter PJ, Roper TJ, Wilson GJ, Delaha RJ, Burke T. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology* 2003; **12**: 1649-1661

Gompper ME, Kays RW, Ray JC, Lapoint SD, Bogan DA, Cryan JR. A Comparison of Noninvasive Techniques to Survey Carnivore Communities in Northeastern North America. *Wildlife Society Bulletin* 2006; **34** (4): 1142-1151

Haag T, Santos A, De Angelo C, Srbek-Araujo AC, Sana DA, Morato RG, Salzano FM, Eizirik E. Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. *Genetics* 2009; **136**: 505-512

Johnson WE, Slattery JP, Eizirik E, Kim JH, Menotti M, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Seuánez H, Martins MA, Seymour KL, Façal S, Swanson W, O'Brien SJ. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species *Molecular Ecology* 2001; **8**:79–94

Kohn MH, Wayne RK. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution* 1997; **12** (2): 223-227

Kreader CA. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gen 32 Protein. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; **62** (3): 1102-1106

Murphy MA, Waits LP, Kendall KC, Wasser SK, Higbee JA, Bogden R. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. *Conservation Genetics* 2002; **3**: 435-440

Murray JL, Gardner HL. *Leopardus pardalis*. Mammalian Species. *Journal of Tropical Ecology* 1997; **548**: 1–10.

Navarro JF, Muñoz J. Manual de huellas de algunos mamíferos terrestres de Colombia-Edición de campo. En: Navarro JF, Muñoz J. (eds.) Editorial Multipresos. Medellín, Colombia 2000; 354 pp

O'Brien SJ. Source A Role for Molecular Genetics in Biological Conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994; **91** (13): 5748-5755.

Oka T, Takenaka O. Wild Gibbons' Parentage Tested by Non-invasive DNA Sampling and PCR-amplified Polymorphic Microsatellites. *Primates* 2001; **42** (1): 67-73

Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Johnson WE. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 2002; **11**: 2171-2182

Paxinos E, McIntosh C, Ralls K, Fleischer R. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* 1997; **6**: 483-486

Piggott MP, Taylor AC. Extensive evaluation of faecal preservation and extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology* 2003; **51**: 341-355

Pocock RI. The Races of the Ocelot and the Margay. *Papers of Mammalogy Zoological Series Field Museum of Natural History* 1941; **155**: 945-959

Redford KH, Eisenberg JF. The Mammals of the Neotropics: the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. En: Redford KH, Eisenberg JF. (eds.). University Chicago Press. Chicago. United States of North America 1992; 692 pp

Reed JZ, Tollit DJ, Thompson P, Amos W. Molecular Scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* 1997; **6**: 225-234.

Riveros A, Sofrony C, Taylor D, Jiménez G, Cepeda I, Martinez N, Giontescu N, Riaño N, Isaacs P, Jiménez S. Programa Nacional para la Conservación de Felinos. Fundación Vida Silvestre Neotropical (FVSN). Bogotá, D.C., Colombia 2005; 81 pp

Roques S, Adrados B, Chavez C, Keller C, Magnusson WE, Palomares F, Godoy JA. Identification of Neotropical felid faeces using RCP-PCR. *Molecular Ecology Resources* 2010; **21** (3): 2-9

Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press Incorporation. New Jersey, United States of North America. 2000; 365-386

Schwartz S, Zhang Z, Frazer KA, Smit A, Riemer C, Bouck J, Gibbs R, Hardison R, Miller W. PipMaker a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome Research* 2000; **10**: 577-586.

Spiering PA, Szykman M, Wildt DE, Somers MJ, Maldonado JE. Sampling error in non-invasive genetic analyses of an endangered social carnivore. *Conservation Genetics* 2009; **10**: 2005-2007

Stenglein L, De Barba M, Ausband DE, Waits LP. Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. *Molecular Ecology Resources* 2010; **10**: 109-114

Sunquist ME, Sunquist F. Ecological constraints on predation by large felids. *Carnivore behavior: Ecology and Evolution* 1994; **23**: 283-301

Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 1996; **24** (16): 3189-3194

Taberlet P, Luikart G Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Molecular Ecology* 1999; **7**: 1419-1422

Waits LP, Paetkau D. Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. *The Journal of Wildlife Management* 2005; **69** (4):1419-1433

Wan QH, Fang SG, Chen GF, Wang ZM, Ding P, Zhu MY, Chen KS, Yu JH, Zhao YP. Use of oligonucleotide fingerprinting and faecal DNA in identifying the distribution of the Chinese tiger (*Panthera tigris amoyensis* Hilzheimer). *Biodiversity and Conservation* 2003; **12**: 1641-1648

Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd G, Fain SR. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular ecology* 1997; **6**: 1091-1097

Weigel I. Das Fellmuster der wildlebender Katzenarten und der Hauskatze in vergleichender und stammesgeschichtlicher Hinsicht. *Säugetierkundliche Mitteilungen* 1961; **9**: 1-120

Wong G, Lockwood M, De Lacy TM. Mamíferos del Parque Nacional Corcovado, Costa Rica. En: Wong G, Lockwood M, De Lacy TM. (eds.). INBIO and SINAC. San José, Costa Rica. 1999; 112-157

Wulsch C. Noninvasive tracking of jaguars (*Panthera onca*) and co-occurring feline species in Belize by combining molecular scatology, remote camera trapping and GIS: the impact of fragmentation. (eds.). Submitted to: Programme for Belize. Department of Fisheries and Wildlife Sciences. Virginia, United States of North America. 2008; 1-14

Anexo 1. PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE BUFFER DETs

MATERIALES Y EQUIPOS

Erlenmeyer
Hot Plate
Imanes
Papel de filtro

REACTIVOS

Para la preparación del Buffer: DMSO (concentración final 20%)
EDTA (concentración final 0.25 M)
Tris HCl (concentración final 0.1 M)
NaCl hasta saturación

PROCEDIMIENTO

Para un litro de solución de DETs:

1. Vierta 500 mL de agua desionizada y esterilizada en un Erlenmeyer. Agregue 12.114 g de Tris (MW 121.14).
2. Cuando el Tris HCl se disuelva, agregue 93.05 g de EDTA (MW 372.20).
3. Para conseguir que el EDTA se disuelva, agregue 200 mL más de agua desionizada y ajuste el pH entre 7.5 y 8.
4. Agregue los 200 mL de DMSO.
5. Ajuste el volumen final a 1000 mL con agua desionizada.
6. Agregue cloruro de sodio (NaCl MW 58.44 g) hasta saturación, luego caliente y deje enfriar a temperatura ambiente.
7. Finalmente pase la solución por un filtro de 0.2 μm para esterilizar.

Anexo 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA HECES CON QIAamp DNA Stool Mini Kit.

MATERIALES Y EQUIPOS

Bolsas ziploc
Cajas de petri
Navajas
Tubos de microcentrífuga (1.5 y 2 mL)
Cámara de extracción
Centrifuga
Vortex
Baño María

REACTIVOS

Buffer ASL
Pastilla de InhibitEX
Proteinasa K (2 mg/mL)
Buffer AL
Etanol de grado molecular al 100%
Buffer AW1
Buffer AW2
Buffer AE

PROCEDIMIENTO

1. Dentro de la cámara de extracción (previamente esterilizada bajo luz UV) saque 220 mg de raspadura de materia fecal e introdúzcala en un tubo de 2 mL.
Si la muestra es conservada en Buffer, debe mantenerla congelada hasta el momento de agregar el Buffer ASL.
Antes de agregar el Buffer ASL éste se debe precalentar por 5 minutos a 70 °C.
2. Agregue a cada tubo 1.6 mL de Buffer ASL, y realice un vortex por 1 minuto y 30 segundos para homogeneizar las muestras.
3. Centrifugue a 14000 rpm. Tenga en cuenta que dependiendo del método de conservación utilizado, se debe variar el tiempo. Para muestras conservadas en Buffer se recomienda centrifugar por 10 minutos, mientras que para secado se recomienda hacerlo por 15 minutos y finalmente para etanol-silica es prudente centrifugarlo durante 20 minutos.
4. Luego transfiriera 1.4 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL.
Si no alcanza a obtener este volumen centrifúguelo por 5 minutos más.
Para el siguiente paso se deben cambiar los guantes para asegurar la esterilidad de la pastilla.
5. Agregue la pastilla de InhibitEX a cada muestra. Inmediatamente después realice un vortex por 1 minuto y 30 segundos e incúbelo por 1min a temperatura ambiente.

La incubación es esencial en este proceso, ya que es cuando la pastilla absorbe los inhibidores.

6. Centrifugue las muestras por 10 minutos a 15000 rpm, para que el pellet este bien compacto.
7. Inmediatamente después que la centrifuga se detenga, transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL y descarte el pellet. Y vuelva a centrifugar por 3 minutos a máxima velocidad.
8. Pipetee 25 μ L de proteinasa K en un tubo de 2 mL.
9. Pipetee 600 μ L del sobrenadante obtenido en el paso 7 y transfíeralo al tubo de 2 mL que contiene la proteinasa K.
10. Agregue 600 μ L de Buffer AL y haga un vortex por 15 segundos. Nunca debe agregar el Buffer AL sobre la Proteinasa K.
11. Incube la mezcla durante 10 minutos a 70 °C.
12. Al sacar del baño María, agregue 600 μ L de etanol de grado molecular al 100% y haga un vortex por 15 segundos.
13. Transfiera 600 μ L de la mezcla que obtuvo el paso anterior a un tubo de dos columnas, y centrifúguelo a máxima velocidad por 1 minuto.
14. Transfiera la columna con la membrana a un tubo de 2 mL proveído por el Kit y agregue otra alícuota de 600 μ L. Centrifúguelo a máxima velocidad por 1 minuto.
15. Repita el paso anterior con los últimos 600 μ L.
16. Transfiera la columna con la membrana nuevamente a un tubo 2 mL proveído por el Kit y agregue 500 μ L de Buffer AW1 y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto. Transfiera nuevamente la columna con la membrana a un nuevo tubo.
17. Agregue 500 μ L de Buffer AW2 y centrifugue a máxima velocidad por 3 minutos
18. Transfiera la columna con la membrana a un tubo de 1.5 mL y agregue 200 μ L del Buffer AE directamente sobre la membrana. Deje incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugue a máxima velocidad por 1 minuto y medio.

Anexo 3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA HECES CON FENOL CLOROFORMO (Ernest *et al* 2000)

MATERIALES Y EQUIPOS

Bolsas ziploc
Cajas de petri
Navajas
Tubos de microcentrífuga (1.5 mL)
Cámara de extracción
Centrifuga
Vortex
Baño María
Nevera
Cámara de vacío

REACTIVOS

Buffer de digestión: SDS (concentración final 1%)
EDTA pH 8.0 (concentración final 20 mM)
Tris HCl pH 8.0 (concentración final 60 mM)
NaCl (concentración final 100 mM)
Proteínasa K (concentración final 0,2 mg/mL)
(Para un Volumen final de 500 µL)

Fenol cloroformo alcohol isoamilico (25:24:1)

Cloroformo alcohol isoamilico (24:1)

PROCEDIMIENTO

1. Dentro de la cámara de extracción (previamente esterilizada bajo luz UV) saque 150 mg de raspadura de materia fecal e introdúzcala en un tubo de 2 mL.
Si la muestra es conservada en Buffer, debe mantenerla congelada hasta el momento de agregar el Buffer de digestión.
2. Agregue a cada tubo 500 µL de Buffer de digestión, y realice un vortex por 2 minutos para homogeneizar las muestras.
3. Incube la mezcla durante toda la noche a 56 °C.
Los procesos que se describen a continuación deben hacerse con extremo cuidado en cámara de extracción, debido a que tanto el Fenol como el Cloroformo son altamente peligrosos. Al día siguiente retire del baño maría y lleve a la cámara de extracción. Agregue 500 µL de fenol y centrifugue a 14000 rpm por 10 minutos.
4. Luego transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo y agregue 500 µL de Cloroformo y centrifugue a 14000 rpm por 10 minutos.

5. Luego transfiriera el sobrenadante a un nuevo tubo. Se recomienda repetir los pasos 3 y 4 para retirar la mayor cantidad de inhibidores y sustancias que puedan intervenir en la extracción de ADN.
6. Calcule el volumen que se logró obtener luego de estos proceso. Agregue un volumen de acetato de amonio (1x) y tres volúmenes de etanol frío al 100%.
7. Mezcle por inmersión y reserve a -20 °C por 2 horas.
8. Al sacarlo de la nevera centrifúguelo a 14000 rpm por 15 minutos.
9. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y agregue 1 mL de etanol frío al 70%.
10. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y agregue 1 mL de etanol frío al 70%.
11. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y seque en una cámara de vacío de 3 a 5 minutos.
12. Resuspenda el ADN en 30 μ L de Agua Ultrapura.

Anexo 4. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA HECES CON FENOL CLOROFORMO VARIACIÓN CON TRITON (Reed 1997)

MATERIALES Y EQUIPOS

Bolsas ziploc
Cajas de petri
Navajas
Tubos de microcentrífuga (1.5 mL)
Cámara de extracción
Centrifuga
Vortex
Baño María
Nevera
Cámara de vacío

REACTIVOS

Buffer de digestión: SDS (concentración final 2%)
EDTA pH 8.0 (concentración final 50 mM)
Tris HCl pH 8.0 (concentración final 100 mM)
NaCl (concentración final 200 mM)
Triton X100 (concentración final 0.5%)
Proteinasa K (concentración final 10 mg/mL)
(Para un Volumen final de 500 µL)

Fenol cloroformo alcohol isoamilico (25:24:1)

Cloroformo alcohol isoamilico (24:1)

PROCEDIMIENTO

1. Dentro de la cámara de extracción (previamente esterilizada bajo luz UV) saque 150 mg de raspadura de materia fecal e introdúzcala en un tubo de 2 mL.
Si la muestra es conservada en Buffer, debe mantenerla congelada hasta el momento de agregar el Buffer de digestión.
2. Agregue a cada tubo 500 µL de Buffer de digestión, y realice un vortex por 2 minutos para homogeneizar las muestras.
3. Incube la mezcla durante toda la noche a 56 °C.
Los procesos que se describen a continuación deben hacerse con extremo cuidado en cámara de extracción, debido a que tanto el Fenol como el Cloroformo son altamente peligrosos. Al día siguiente retire del baño maría y lleve a la cámara de extracción. Agregue 500 µL de fenol y centrifugue a 14000 rpm por 10 minutos.
4. Luego transfiriera el sobrenadante a un nuevo tubo y agregue 500 µL de Cloroformo y centrifugue a 14000 rpm por 10 minutos.

5. Luego transfiriera el sobrenadante a un nuevo tubo. Se recomienda repetir los pasos 3 y 4 para retirar la mayor cantidad de inhibidores y sustancias que puedan intervenir en la extracción de ADN.
6. Calcule el volumen que se logro obtener luego de estos proceso. Agregue un volumen de acetato de amonio (1x) y tres volúmenes de etanol frio al 100%.
7. Mezcle por inmersión y reserve a -20 °C por 2 horas.
8. Al sacarlo de la nevera centrifúguelo a 14000 rpm por 15 minutos.
9. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y agregue 1 mL de etanol frío al 70%.
10. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y agregue 1 mL de etanol frío al 70%.
11. Retire el sobrenadante teniendo cuidado de no llevarse el pellet y seque en una cámara de vacío de 3 a 5 minutos.
12. Resuspenda el ADN en 30 μ L de Agua Ultrapura.