# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## BIOQUÍMICA Y FARMACIA

# "Optimización de los Métodos de Recolección, Conservación y Extracción de DNA Nuclear a partir de Muestras de Excremento de Oso de Anteojos (*Tremarctos ornatus*)"

Previo a la obtención del
título de Bioquímico
Farmacéutico

**Autora:**
Antonia Germania Jiménez Coronel
**Director:**
Blgo. Rodrigo Cisneros Vidal

**Loja-Ecuador**
**2009**

## CERTIFICACIÓN.

Biólogo.
Rodrigo Cisneros Vidal.
**DIRECTOR DE TESIS.**
Certifica:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Antonia Germania Jiménez Coronel, previo a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja a, 29 de Julio del 2009.

…….
Blgo. Rodrigo Cisneros
**DIRECTOR DE TESIS**

**AUTORÍA.**

Los conceptos, ideas y resultados vertidos en el desarrollo del presente trabajo de investigación son de absoluta responsabilidad de su autora.

Antonia Germania Jiménez Coronel.

**DEDICATORIA:**

Este trabajo que ha sido realizado con mucho sacrificio y esfuerzo, lo quiero dedicar muy especialmente:

A mi hermana Ivy Katherine por todo su ejemplo, amor y apoyo incondicional para que este sueño se haga realidad, a pesar de la distancia.

A mi madre Mercy, por haberme brindado la vida y por su valioso ejemplo de abnegación, trabajo y responsabilidad.

A mi padre porque aunque no está presente físicamente, sé que me ha impulsado desde lo alto a mantenerme firme y a seguir adelante.

A mis hermanas: Gabriela por su dulzura, bondad y amor, y Estefanía por su fortaleza.

A mis sobrinos Anthony, Ithem y Brianna porque forman una parte importante de mi vida.

A Gabriel, por toda la paciencia necesaria para hacer posible que este trabajo se lleve a cabo; por su inmenso amor, cariño y comprensión.

A mis amigos, por todo su apoyo incondicional, especialmente a Jeimmy Ruiz, por haberme permitido compartir buenos y malos momentos.

Antonia.

**AGRADECIMIENTO.**

Quiero agradecer primeramente a Dios por haberme otorgado la vida, salud, sabiduría y habilidades necesarias para culminar esta etapa importante de mi vida, porque por su voluntad y gracia pude subir un escalón más en mi vida, todo es posible gracias a Él.

A la Universidad Técnica Particular de Loja por haberme acogido durante estos cinco años en sus aulas y laboratorios, llenos de sabiduría y amor en especial al Ph.D. Padre Canciller Luis Miguel Romero.

Un sincero agradecimiento a mi director de tesis Blgo. Rodrigo Cisneros Vidal, quien con su paciencia, apoyo y motivación hizo posible que se lleve a cabo este proyecto, que ha significado un valioso reto para crecer personal y profesionalmente.

A la Dra. Lisette Waits por la literatura donada y la Mgs. Paulina Viteri por su ayuda desinteresada en la realización de este trabajo de investigación.

Al Blgo. José Esteban Toracchi y al Matemático Pablo Ramón por su gran ayuda en la parte estadística.

A todos quienes conforman el Centro de Biología Celular y Molecular especialmente a la Dra. Paula Torres Bailón y Dra. Nathalia Bailón Moscoso por la asistencia académica y técnica brindada.

Al personal del Zoológico Municipal de la Ciudad de Loja por su ayuda en la obtención del material de estudio.

A todos mis profesores que con dedicación me ayudaron a aprender todo lo necesario para culminar mi carrera.

Finalmente, agradezco a mis familiares y amigos que estuvieron presentes en los buenos y malos momentos

A todos de corazón, mil gracias…….

## CONTRATO DE SESIÓN DE DERECHO DE TESIS.

Yo, Antonia Germania Jiménez Coronel declaro conocer y aceptar la disposición del artículo 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

……
Antonia Germania Jiménez Coronel

……..
Blgo. Rodrigo Cisneros Vidal
**DIRECTOR**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PAG

Certificado .....i

Autoría .....ii

Dedicatoria .....iii

Agradecimiento.....iv

Cesión de derechos .....v

Índice de contenido .....vi

Índice de tablas .....vii

Índice de figuras…… viii

Índice de fotografías…….ix.

Abstract.....x

Resumen .....xi

Objetivo general .....xii

Objetivos específicos.....xii

**1.** INTRODUCCIÓN.....….1

**1.1.** Muestreo no invasivo de especies animales salvajes… 2

**1.2.** Extracción de ADN……4

**1.2.1.** Extracción de ADN de pelo ..... .4

**1.2.2.** Extracción de ADN de heces……4

**1.3.** Factores limitantes del éxito en estudios con ADN nuclear obtenido de muestras fecales……5

**1.3.1.** Condiciones climáticas en el área de estudio……..6

**1.3.2.** Degradación del ADN…….....7

**1.3.2.1.** Lesiones en el ADN…….10

**1.3.2.2.** Problemática de los estudios de ADN antiguo……..11

**1.3.3.** Errores comunes en el genotipado con ADN obtenido de muestras fecales…….....11

**1.4.** El etanol y el buffer DETs como medios de conservación de muestras……..14

**1.5.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)……15

**1.6.** Marcadores moleculares (microsatélites) y su utilidad en genética poblacional……..17

**2.** MATERIALES Y METODOS……....18

**2.1.** Recolección de las muestras …….22

**2.2.** Descripción de los Métodos de conservación y métodos de pre-extracción de ADN……..25

**2.3.** Amplificación de ADN nuclear……..26

**2.4.** Determinación de la integridad del ADN por electroforesis.29

**2.5.** Análisis Estadístico……31

**3.** RESULTADOS……33

**4.** DISCUSIONES ……..38

**5.** CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES…….42

**6.** BIBLIOGRAFÍA……...46

**7.** ANEXOS……..52

**7.1.** Gel de Agarosa 0,8%.....53

**7.2.** Gel de Agarosa 1,5%.....54

**7.3.** Experimentos de Exposición al Ambiente y Métodos Pre-extracción Geles BOX (Vista preeliminar GelEval)…….55

**7.4.** Experimentos de Exposición al Ambiente y Métodos Pre-extracción Geles MJ (Vista preeliminar GelEval)…….56

**7.5.** Experimentos de Conservación y Métodos Pre-extracción Geles BOX (Vista preeliminar GelEval)…….57

**7.6.** Experimentos de Conservación y Métodos Pre-extracción Geles MJ (Vista preeliminar GelEval)……58

**7.7.** Genotipos ( Agusto y Nacha)……59

**7.8.** Preparación de Soluciones……...60

**7.9.** Porcentaje de Éxito Amplificado para Experimentos de Exposición al Ambiente y Conservación con los Métodos Pre-extracción……61

## ÍNDICE DE TABLAS

PAG

Tabla 1……..20

Tabla 2……..21

Tabla 3……..23

Tabla 4…….26-27

Tabla 5……..29

Tabla 6……..30

Tabla 7……..30

Tabla 8……..31

Tabla 9……..33

Tabla 10……34
Tabla 11……34
Tabla 12……35
Tabla 13……37
Tabla 14……37
Tabla 15……37

## ÍNDICE DE FIGURAS

PAG

Figura 1……12
Figura 2……12
Figura 3……13
Figura 4……16

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

PAG

Fotografía 1……..25
Fotografía 2……..43
Fotografía 3……..43

**ABSTRACT:**

The analysis of DNA starting from fecal samples is one of the most important tools inside the context of the molecular ecology, the genetics of the conservation and the populational monitoreo of wild fauna, however it presents degradation problems and amplification of the DNA.

In this study two conservation (Ethanol to 99.9% and Buffer DETs) means were proven to determine which presents better results in the extraction and amplification for PCR of nuclear (STRs) DNA in fecal samples of Andean bear in captivity.

For the ethanol, two previous treatments were applied to the extraction: you show homogenized (EOH-H) and you show centrifuged (EOH-C). Samples were analyzed collected in the day of their deposition as well as samples conserved by periods of one week, one month and two months to ambient temperature. The extraction of the DNA was carried out with the kit "Qiagen Stool Mini Kit" without any modification.

Of equal formed it analyzed the effects of the degradation from the DNA of exposed samples to different periods of time (one, two and three weeks) under the climatic conditions of the moors of the National Park Podocarpus .

The conservation tests showed significant differences among the pre-extraction ($p$=0 .005322) methods. The time of conservation showed more marked ($p$=1 .939e-09) effects, with a bigger difference in the periods of one and two months.

In the degradation tests to the atmosphere, the time of exhibition showed highly significant ($p$=2 .2e-16) differences, of equal it forms the climate ($p$=0 .000174).
The percentage in the amplification success for nuclear DNA in our study was of 35,48% for BOX and 56,91% for MJ.

**Key words:** conservation of DNA, extraction of DNA, time, climate, sampling genetic non invasivo, microsatélites.

**RESUMEN:**

El análisis de ADN a partir de muestras fecales es una de las herramientas más importantes dentro del contexto de la ecología molecular, la genética de la conservación y el monitoreo poblacional de fauna silvestre, sin embargo presenta problemas de degradación y amplificación del ADN.

En este estudio se probaron dos medios de conservación (Etanol al 99.9% y Buffer DETs) para determinar cual presenta mejores resultados en la extracción y amplificación por PCR de ADN nuclear (STRs) en muestras fecales de oso andino en cautiverio.

Para el etanol, se aplicaron dos tratamientos previos a la extracción: muestras homogenizadas (EOH-H) y muestras centrifugadas (EOH-C). Se analizaron muestras colectadas en el día de su deposición así como muestras conservadas por periodos de una semana, un mes y dos meses a temperatura ambiente. La extracción del ADN se realizó con el kit "Qiagen Stool Mini Kit" sin ninguna modificación.

De igual forma se analizó los efectos de la degradación del ADN de muestras expuestas a diferentes períodos de tiempo (una, dos y tres semanas) en las condiciones climáticas de los páramos del Parque Nacional Podocarpus (PNP).

Las pruebas de conservación mostraron diferencias significativas entre los métodos de pre-extracción ($p$=0.005322). El tiempo de conservación mostró efectos más marcados ($p$=1.939e-09), con una diferencia mayor en los periodos de uno y dos meses.

En las pruebas de degradación al ambiente, el tiempo de exposición mostró diferencias altamente significativas ($p$=2.2e-16), de igual forma el clima ($p$=0.000174).
El porcentaje en el éxito de amplificación para ADN nuclear en nuestro estudio fue de un 35,48% para BOX y 56,91% para MJ.

**Palabras claves:** conservación de ADN, extracción de ADN, tiempo, clima, muestreo genético no invasivo, microsatélites.

**OBJETIVOS:**

**General:**

- Definir los métodos de recolección, conservación y extracción que optimicen la concentración de ADN nuclear extraído de muestras de excremento de oso andino *(Tremarctos ornatus).*

**Específicos:**

- Determinar la influencia del tiempo de recolección de las muestras en la concentración de ADN nuclear.

- Establecer la eficacia de los métodos de conservación de ADN nuclear de excremento de oso andino.

- Validar y mejorar los métodos convencionales de extracción de ADN nuclear de excremento de oso andino.

- Verificar de forma cualitativa la concentración de ADN nuclear de oso de anteojos a partir de muestras con productos amplificados.

## 1. INTRODUCCIÓN.

En las últimas décadas los estudios moleculares basados en la obtención y el análisis de la variación de fragmentos y secuencias de ADN, han adquirido un gran protagonismo en taxonomía, ecología, biología evolutiva y biología de la conservación. La comprensión del vínculo entre variabilidad genética y eficacia biológica o supervivencia es esencial en la biología de la conservación, requiriendo esta comprensión la combinación de datos moleculares con datos no moleculares (fisiológicos, de comportamiento y ecológicos) (Bosch *et al.,* 2005).

Las regiones más variables de los genomas nucleares y mitocondriales son de gran utilidad para estudiar procesos demográficos y de flujo genético entre poblaciones o incluso relaciones familiares entre individuos. Igualmente, la caracterización y el genotipado de las regiones del genoma que son más informativas tienen otras aplicaciones, por ejemplo en genética forense y en el control del tráfico de especies amenazadas o en peligro de extinción, debido a que permite distinguir entre especies filogenéticamente relacionadas o incluso entre poblaciones o individuos de una misma especie (Bosch *et al.,* 2005).

La obtención de muestras constituye una de las principales limitaciones de los estudios moleculares en especies salvajes; sin embargo, se puede obtener el ADN sin capturar ni molestar al animal (muestreo no invasivo), como por ejemplo a partir de pelos con o sin raíz, células epiteliales presentes en las heces o en la orina y el semen. El uso de muestras no invasivas es de gran utilidad sobre todo en el estudio de poblaciones salvajes amenazadas o en peligro de extinción, puesto que permite obtener muestras sin necesidad de perturbar, o incluso observar a los individuos *(*Bosch *et al.,* 2005).

El uso efectivo de muestras no invasivas para el análisis molecular de poblaciones animales salvajes se dificulta por la mala calidad y la poca cantidad de ADN nuclear obtenido, el mismo que es más difícil de amplificar usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Nsubuga *et al.,* 2004).

El ADN que se puede obtener de las heces brinda una alternativa de muestreo potencialmente ideal, ya que la muestra es abundante, la recolección es totalmente no invasiva, solo un gramo de heces puede contener grandes cantidades de ADN del individuo contenido en millones de células descamadas de la mucosa intestinal (Wasser *et al.,* 1997) y muchas veces puede ser el único indicativo de la presencia de una especie (Piggott *et al.,* 2003*).*

Muchos factores pueden influir en las tasas de éxito de genotipado utilizando heces, incluyendo: la especie estudiada y la dieta, las condiciones ambientales, la conservación de la muestra, y los métodos de extracción y amplificación de ADN (Hajkova *et al.,* 2006). No obstante, la optimización de las condiciones de preservación de las muestras, de los protocolos de extracción de ADN, de las técnicas de amplificación y secuenciación, y de los métodos de análisis de los datos obtenidos, ha permitido extender el uso de este tipo de muestras (Bosch *et al., 2005 y* Nsubuga *et al.,* 2004).

El presente estudio es un importante componente de un proyecto de investigación a largo plazo, enfocado en el estudio de la diversidad y estructura genética del oso andino en el sur del Ecuador, sus resultados van a permitir establecer los protocolos óptimos a ser empleados en campo y laboratorio para la colección y extracción de ADN de muestras fecales de oso andino (*Tremarctos ornatus*), no solo en el sur del Ecuador sino en ecosistemas similares, esto permitirá optimizar recursos y tiempo en el campo y laboratorio, minimizando la pérdida en la calidad del ADN de las muestras.

Dentro de este contexto, la optimización de los métodos de recolección, conservación y extracción de ADN nuclear obtenido de muestras fecales de oso andino tiene como fin último el estudio y conservación de esta y otras especies neotropicales en peligro de extinción empleando información genética como una medida de la viabilidad y dinámica de las poblaciones remanentes.

## 1.1. MUESTREO NO INVASIVO DE ESPECIES ANIMALES SALVAJES.

El muestreo genético no invasivo es relativamente nuevo. Permite obtener material genético de: pelos, heces, orina, plumas o de otras fuentes de ADN, los biólogos son capaces de recoger datos esenciales sobre poblaciones de vida silvestre sin la manipulación, la captura, o incluso la observación de los animales (Waits and Paetkau 2005).

Este tipo de muestreo fue presentado como un método para obtener muestras genéticas de rara y difícil procedencia. En los últimos 12 años, los investigadores han demostrado una variedad de importantes aplicaciones para este tipo de muestreo que van desde la detección de especies raras para aplicaciones forenses (Waits and Paetkau 2005).

Si bien el muestreo no invasivo representa una gran promesa para los biólogos de vida silvestre, sin embargo, la amplificación del ADN extraído de muestras no invasivas es a menudo problemático, porque el ADN se encuentra generalmente degradado y en baja cantidad (Taberlet *et al.,* 1996 y Taberlet and Luikart 1999).

Los investigadores han puesto de relieve el potencial deficiente tales como: las bajas tasas de éxito en la amplificación, la contaminación frecuente de este tipo de muestras y las altas tasas de errores de genotipado con microsatélites (Taberlet *et al.,* 1996, 1997 y 1999; Goossens *et al.,* 1998 y Piggott *et al.,* 2004).

Otros autores han usado el muestreo no invasivo para la conservación y manejo de especies en peligro de extinción (Piggott y Taylor, 2003), la detección y el recuento de especies raras y amenazadas para la estimación de poblaciones y el tratamiento de errores de genotipado (Paetkau 2003 y Waits 2004).

Dentro de las aplicaciones más importantes de muestreo no invasivo para la vida silvestre se encuentra (Waits and Paetkau 2005):

- La identificación de especies.
- La identificación de género.
- La identificación individual.

En un principio, la mayoría de estudios moleculares se realizaban mediante técnicas que frecuentemente implicaba la captura o

incluso la muerte de animales ya que era necesario obtener tejido fresco para la electroforesis de proteínas, o grandes cantidades de ADN purificado en el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, lo que entra en contradicción con programas de conservación de especies amenazadas (Bosch *et al.,* 2005).

El descubrimiento y desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR que permite obtener un elevado número de copias de una región concreta de este ácido nucleico, incluso partiendo de una mínima cantidad inicial, ha facilitado extraordinariamente el estudio con muestras no invasivas que contienen poco ADN (Bosch *et al.,* 2005).

## 1.2. EXTRACCIÓN DE ADN.

La aplicación de las técnicas de biología molecular para el análisis de genomas complejos, depende de la habilidad para manipular el ADN, lo que requiere de su aislamiento y purificación. Se han establecido una gran variedad de protocolos para la extracción de ADN, sin embargo, la mayoría de éstos tienen etapas en común, consistiendo generalmente en dos partes: una técnica para romper las paredes celulares y solubilizar el ADN, seguido por un método enzimático o químico para remover la contaminación por proteínas y otras macromoléculas (Ausubel *et al.,* 2002).

**1.2.1. Extracción de ADN de pelo:** la mayor parte del ADN que se puede obtener de pelo procede de la raíz y en concreto de las células localizadas alrededor del folículo, aunque también es posible obtener ADN de pelo sin raíz. Una alternativa a la recogida de pelos caídos (los cuales pueden obtener poca cantidad de ADN y éste suele estar degradado) puede ser la obtención de pelos frescos con raíz mediante trampas de pelo, pues así se asegura la obtención de ADN de mayor calidad sin suponer ningún riesgo para los animales (Bosch *et al.,* 2005).

**1.2.2. Extracción de ADN de heces:** las heces son un recurso cada vez más habitual para la identificación y el estudio de la dieta de diferentes especies de mamíferos silvestres. Sin

embargo, a menudo especies relacionadas presentan similitudes en cuanto: a la morfología y el tamaño de sus excrementos y las heces solamente pueden asignarse correctamente a una especie determinada de forma visual entre un 50 y 60% de los casos (Bosch *et al.,* 2005).

El análisis de ADN de las heces puede ser de gran ayuda para el estudio de mamíferos salvajes, sobre todo en aquellos casos en los que la identificación de la especie de procedencia del excremento es dudosa. Además la información que nos puede aportar el estudio de las heces con métodos moleculares va mucho más allá de la identificación taxonómica.

Los análisis genéticos de excrementos informan también aspectos relacionados con el comportamiento de una especie, censos poblacionales y efectivos, área de dispersión o el tamaño del territorio ocupado por los individuos, niveles de variabilidad genética, relaciones filogeográficas entre diferentes poblaciones e incluso la dieta o los tipos de enfermedades que padecen los animales (Bosch *et al.,* 2005).

En las heces, el ADN del animal procede de las células epiteliales descamadas del lumen del intestino. En este tipo de muestras, estas células están acompañadas de microorganismos, restos de comida no digeridos, enzimas digestivas, moco, sales biliares y bilirrubina. En el caso de animales que ingieren vegetales, las heces contienen además polisacáridos de plantas que pueden actuar como inhibidores de la PCR (Bosch *et al.,* 2005).

También existe la posibilidad de amplificar moléculas de ADN no deseadas procedentes de los restos no digeridos de las presas ingeridas por el animal. A todo esto se suma el hecho de que el ADN del animal presente en sus heces es escaso y acostumbra a estar degradado (Bosch *et al.,* 2005).

## 1.3. FACTORES LIMITANTES DEL ÉXITO EN ESTUDIOS CON ADN NUCLEAR OBTENIDO DE MUESTRAS FECALES.

La utilidad del ADN fecal depende de los siguientes factores clave:

**(a)** La longitud y el número de copias de ADN que se pueden extraer y amplificar;
**(b)** La confirmación de que el ADN amplificado de heces es idéntico al obtenido de muestras tisulares o sanguíneas;
**(c)** Eliminación de los contaminantes de la muestra (por ejemplo: tejido o cabello ingerido);
**(d)** Prevención de la degradación de la muestra en el laboratorio o en el campo; y
**(e)** La remoción de inhibidores provenientes de la dieta (Wasser *et al.,* 1997).

Al utilizar heces la principal desventaja es la poca cantidad y calidad del ADN que contiene, lo que resulta en altas tasas de error de genotipado. Aunque es preferible extraer ADN de heces recién recolectadas, la especie de interés puede encontrarse solo en lugares remotos, o puede requerir el muestreo a través de varias semanas (Piggot y Taylor, 2003), por lo que las variables a tomar en cuenta son:

**1)** El tiempo que las heces permanezcan en el campo;
**2)** Condiciones ambientales mientras las heces estén en el campo;
**3)** Dieta del individuo;
**4)** El método de secado o preservación después de la recolección y
**5)** El método de extracción de ADN (Murphy *et al.,* 2000), (Murphy *et al.,* 2002), (Murphy 2003) y (Piggot *et al.,* 2004).

**1.3.1. Condiciones climáticas en el área de estudio:** El típico clima tropical de variabilidad diurna es también característico en el Sur del Ecuador. En contraste con el clima estacional, aquí no se encuentran estaciones climáticas anuales con distintos comportamientos en radiación y temperatura (estaciones térmicas) y, por lo tanto, los inviernos largos, que interrumpen la actividad biológica por la constante permanencia de frío, no existen (Kiss y Brauning 1997).

Las variaciones climáticas estacionales anuales de las latitudes medias, se pueden observar en los trópicos durante un día: en la mañana primavera y a medio día un caliente verano, en la tarde domina el otoño lluvioso y en la noche un frío invernal (Kiss y Brauning 1997).

Con el incremento de la altura, este comportamiento climático se vuelve más extremo. Sin embargo en los Andes del Sur del Ecuador no existen alturas extremas, debido a que la cordillera llega a alturas máximas de 3.800 msnm. Así, en el lado oriental de la cordillera de los Andes, se registran temperaturas medias anuales de alrededor de 10º C en las partes más altas, y de entre 15 y 21ºC en los valles de Loja, Vilcabamba y Zamora.
La temperatura desciende de manera general con la altura, sin embargo en el área de investigación no se registran noches con heladas, que son típicas de los Andes (Kiss y Brauning 1997).

En algunos lugares de la zona de estudio, se cuenta con precipitaciones extremas a causa de la neblina y nubosidad. Así se habían determinado promedios históricos de precipitación para la zona de la ECSF entre los 2.000 y 3.000 mm anuales, en base a las mediciones del Instituto Metereológico Nacional (Kiss y Brauning 1997).

**1.3.2. Degradación del ADN:** Tras la muerte de un organismo, comienza la degradación de todas sus biomoléculas, incluyendo el ADN.
Los ácidos nucleicos de muestras críticas se encuentran normalmente muy fragmentados y el rendimiento de su análisis queda reducido a unas 1000 veces menos que una muestra en buenas condiciones (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

La **temperatura**, la **humedad**, el **pH**, los **agentes oxidantes,** la **radiación** y la **presión mecánica** son algunos de los factores más importantes que influyen sobre el ADN. Su impacto sobre el ADN todavía no se conoce en detalle, pero se sabe que bajo ciertas condiciones el ADN se fragmenta (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

Tras la muerte se ponen en marcha principalmente dos mecanismos:

- La **autolisis:** que es una autodigestión mediante enzimas liberadas por los lisosomas celulares.
- La **putrefacción**: que es la descomposición anaeróbica de proteínas mediante bacterias, normalmente acompañada de la producción de gas (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

Ambos procesos muestran su máxima actividad a temperaturas de entre 34-40ºC. La pérdida de la regulación enzimática celular y la acidosis láctica de la autolisis aumentan la actividad de algunas enzimas como las hidrolasas. A un nivel celular, la muerte provoca la liberación de enzimas autolíticas contenidas en los lisosomas celulares. En este grupo de enzimas se incluyen las **nucleasas**, que degradan el material genético en un proceso conocido como autolisis, se encuentran presentes en la propia muestra antes de que ésta se seque y a su vez se pueden dividir en dos subgrupos (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

**(a)** **Endonucleasas:** que descomponen el ADN cortándolo en pequeños fragmentos y las
**(b)** **Exonucleasas:** que despegan nucleótidos desde los extremos de las moléculas de ADN haciéndolas cada vez más cortas. Cuando finaliza dicha actividad nucleásica, el proceso degradativo continúa, de mano en este caso de aquellos organismos que colonizan las muestras.

El Calcio y el Magnesio pueden activar las nucleasas que atacan al ADN en la cromatina. El tipo de daño más común causado por las nucleasas es el ataque en las zonas del ADN más expuestas, como las cortas regiones entre nucleosomas adyacentes que no se encuentran protegidas por las histonas.
Este tipo de degradación es característico de las nucleasas de mamíferos dependientes de Ca2+ y Mg2+ y también de algunas nucleasas bacterianas (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

La **humedad** del aire también influye en el grado de autolisis y por tanto en la degradación del ADN.
Por tanto, el **agua** es uno de los compuestos que más afectan a la degradación del ADN por intervenir en los mecanismos de descomposición como reactante o como medio. En ausencia de agua, el crecimiento bacteriano, la degradación enzimática, la

hidrólisis espontánea y otras formas de daño químico, se reducen drásticamente (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

En algunas muestras podemos encontrarnos con **contaminantes microbianos**.
Otras veces aparece este tipo de contaminación cuando la muestra permanece en condiciones de humedad durante un período de tiempo considerable. La contaminación microbiana tiene dos consecuencias para el análisis ADN (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

- El aporte de nucleasas exógenas a la muestra que producen degradación.
- El aporte de ADN exógeno de tal manera que a veces la muestra contiene más cantidad de ADN microbiano que de su propio ADN original.

En último término son procesos químicos, principalmente de hidrólisis y oxidación, los que completan la degradación del material genético (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

**a). Hidrólisis:**
La fragmentación del ADN puede producirse mediante la rotura directa de los enlaces fosfodiéster que unen las diferentes desoxiribosas entre sí o de los enlaces N-glicosídicos que conectan éstas a las bases nitrogenadas. La rotura del enlace glicosídico del ADN normalmente por protonación de la base nitrogenada, origina una posición sin base (*baseless*) en un proceso conocido como *depurinización* en el caso de rotura de una base púrica o *depirimidización*, si se trata de una pirimidina. Una vez se ha generado un sitio apurínico (*AP site*), el ADN queda debilitado y se produce su rotura, conocida como *b-eliminación*, en ese punto (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

En las células metabólicamente activas, los mecanismos de reparación intracelulares reparan los sitios apurínicos impidiendo la rotura del ADN. En el caso del material antiguo, la ausencia de estos mecanismos de reparación provoca que el ADN se hidrolice en fragmentos pequeños, en unos miles de años a temperatura moderada, principalmente por depurinización. Sin

embargo ciertas condiciones medioambientales pueden "proteger" el ADN de la depurinización y consiguiente fragmentación, ralentizando la tasa de esta última reacción (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

**b). Oxidación:**
El daño oxidativo en el ADN está producido principalmente por radicales libres superóxido ($O_2^+$), peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) e hidroxilo ($OH^-$). Todos ellos son esencialmente subproductos de reacciones celulares endógenas, aunque también pueden ser generados tras la exposición de la célula a radiaciones ionizantes o luz ultravioleta o por degradación bacteriana y/o fúngica.
Las principales manifestaciones del daño oxidativo sobre el ADN son modificaciones de los residuos de azúcar, transformaciones de las pirimidinas Citosina (C) y Timina (T) en Hidantoínas, así como aparición de posiciones sin base (*baseless*) y puentes intermoleculares. La mayoría de estas lesiones bloquean la DNA polimerasa inhibiendo, por tanto, la *PCR* (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

**1.3.2.1. Lesiones en el ADN:** El ADN es objeto de lesiones mediante agentes físicos y químicos en el medio ambiente y mediante radicales libres o agentes alquilantes en el metabolismo. El ADN también puede sufrir errores en el transcurso de su replicación y durante otros procesos metabólicos. Algunas de las modificaciones químicas pueden ser consecuencia de la oxidación de las desoxirribosas o de las bases. Estos procesos afectan a la integridad y al rendimiento de las secuencias de ADN que han de ser analizadas. Las lesiones más comunes en el ADN son (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

**1.-** Pérdida de una base.
**2.-** Alteración de una base.
**3.-** Bucle debido a delección o inserción.
**4.-** Pirimidinas ligadas.
**5.-** Rotura de hebras.
**6.-** Fragmentos de desoxirribosa.
**7.-** Cruzamiento de hebras.
**8.-** Radicales de oxígeno.
**9.-** Desnaturalización de la doble hebra de ADN.

**1.3.2.2. Problemática de los estudios de ADN antiguo:** El ADN antiguo presenta un conjunto de características que lo diferencian del ADN extraído de muestras actuales, también denominado "ADN fresco" (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

**1.** Escasez.
**2.** Fragmentación.
**3.** Modificaciones moleculares.

La contaminación con ADN de origen diferente a la muestra es consecuencia de las tres citadas características del ADN antiguo. Comparado con el ADN fresco, recuperado de muestras actuales, el ADN antiguo presenta una "baja calidad", de manera que en presencia de ambos tipos de moléculas, se producirá la amplificación preferente del primero de los dos tipos (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

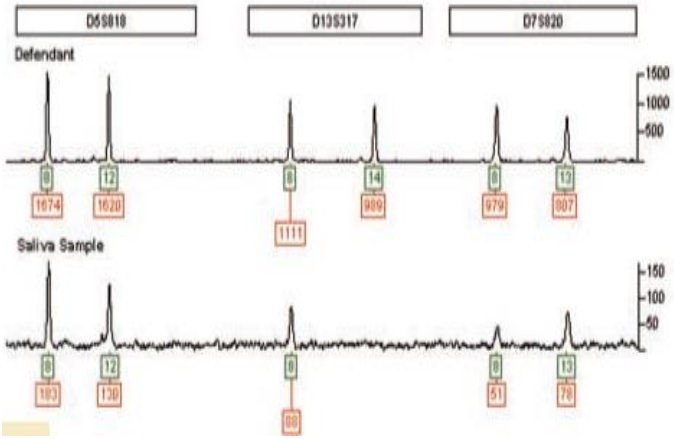
Adicionalmente, algunos de los extractos de ADN antiguo, pueden contener otras moléculas que inhiben la reacción de PCR y que han pasado a ser conocidas bajo el nombre genérico de "**inhibidores**". Esta denominación agrupa un conjunto de moléculas de naturaleza diversa, que no tiene por qué ser la misma en todos los extractos. En cuanto a la procedencia u origen de dichos inhibidores, se ha propuesto que puede tratarse (www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm):

**a).** De compuestos del suelo: ácidos húmicos y/o fúlvicos, residuos de porfirinas y/o productos de su degradación y taninos entre otros.
**b).** De subproductos de degradación orgánica: productos de degradación del propio ADN.

**1.3.3. Errores comunes en el genotipado con ADN obtenido de muestras fecales:** Los tres errores de genotipado que se producen con más frecuencia en el estudio de marcadores con microsatélites con ADN de baja concentración o degradado son (Murphy *et al.,* 2007 y Murphy *et al.,* 2003):

1. **Alelo marginado:** Si el genotipo establecido fue un heterocigoto y solamente uno de los alelos estables estuvo presente en la amplificación por PCR.

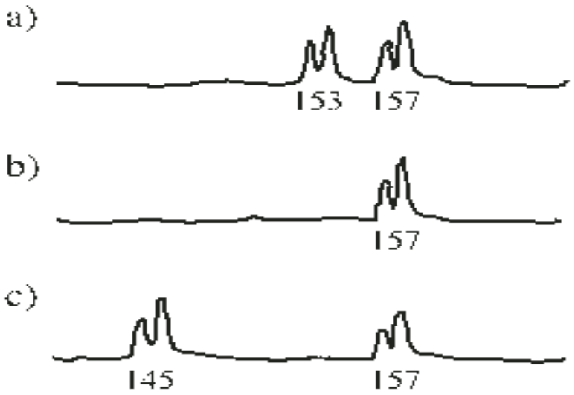
**Figura 1.**




**Fuente:** (www.bioforensics.com/.../Dropout/index.html).

2. **Alelo falso:** Si la amplificación por PCR contiene alelos no presentes en el genotipo establecido.

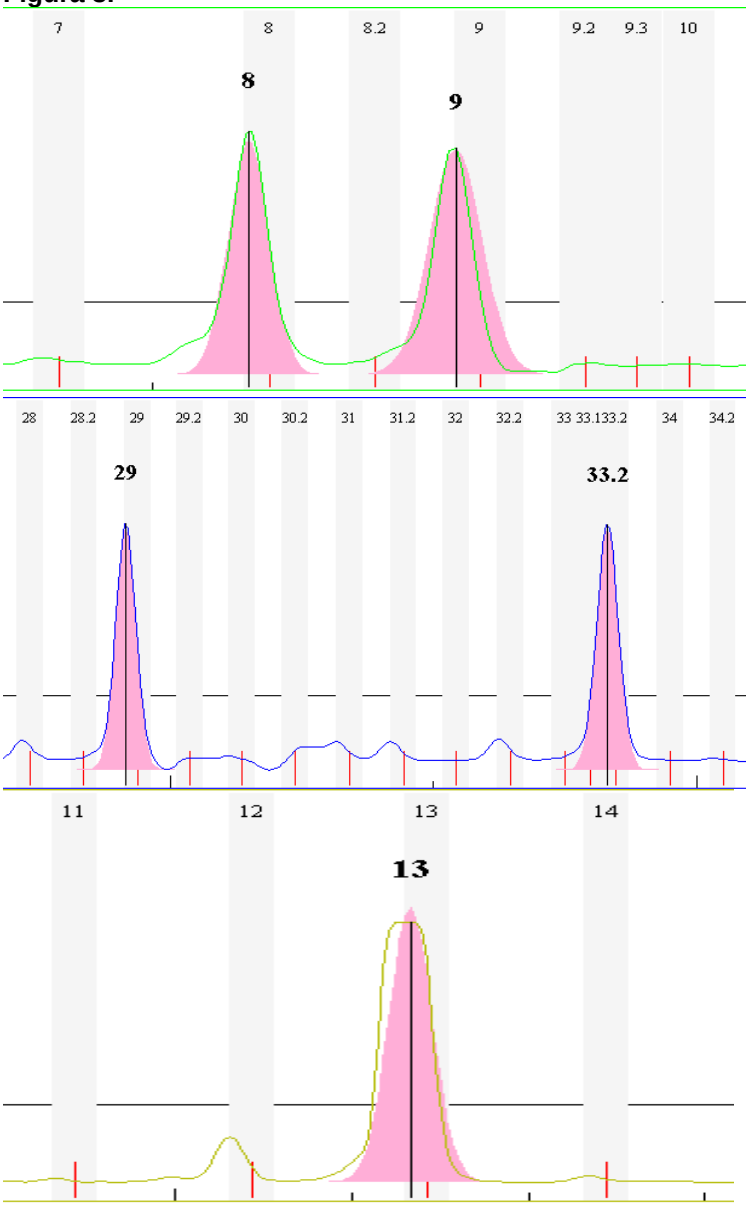
**Figura 2.**




**Fuente:** (Waits y Paetkau, 2005).

3. **Alelo múltiple:** Si el producto de PCR contiene más de dos alelos.

**Figura 3.**




**Fuente:** (www.dnamatch.de/Problem_solving/2/2.html)

Para detectar y eliminar estos errores que conducen a la generación de falsos genotipos, es necesario realizar varias réplicas de una misma muestra. Los datos obtenidos pueden ser analizados usando los softwares Genscan 2.0 y Genotyper 2.5 que permite:

- Crear el genotipo consenso de entre todas las réplicas de una misma muestra.
- Agrupar las muestras que comparten el mismo genotipo.
- Obtener información sobre los porcentajes de errores provocados por la no amplificación de un alelo o la aparición de un falso alelo durante la amplificación, que permite determinar la fiabilidad de los genotipos encontrados y calcular el número de réplicas suplementarias necesarias en cada marcador para obtener los genotipos reales con probabilidades de error por debajo de un umbral preestablecido (Bosch *et al.,* 2005).

## 1.4. EL ETANOL Y EL BUFFER DETs COMO MEDIOS DE CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.

**ETANOL:** Actúan desnaturalizando proteínas y mata con rapidez a las bacterias vegetativas cuando se aplica como solución acuosa en el espectro de 70 y 95% (Foye 1984). Las soluciones de alcohol al 100% deshidratan con rapidez a los microorganismos, bloqueando las reacciones químicas que podrían degradar el ADN, pero no los destruye, porque el proceso letal requiere moléculas de agua (Ryan y Roy, 2005).

El etanol se utiliza en antisepsia a una concentración del 70%, a esta concentración se reduce más la tensión superficial de la célula bacteriana facilitando el proceso de desnaturalización (J. A. García Rodríguez *et al.,* 1999).

**BUFFER DETs:**

- **Ácido etilendiaminotetraacético** (EDTA): Actúa como quelante de calcio bivalente y ion magnesio (Goodman and Gilman 2006), inhibiendo la actividad ADNasa que requiere la presencia de estos iones, por lo que se utiliza como

aditivo para la conservación a largo plazo de muestras de ADN disuelto (http://www.fao.org/docrep/004/Y2775S/y2775s00.HTM).

- **NaCl:** Se lo utiliza como preservante, debido a que muchos microorganismos no pueden vivir en un ambiente demasiado salado: el agua se extrae de sus células por ósmosis (Ryan and Roy 2005).

- **Tris** (tris-hidroximetilaminometano): Es una amina primaria, con la reactividad típica, por ejemplo la condensación con aldehídos y el establecimiento de un equilibrio ácido-base, mantiene un valor constante de pH que inhibe la actividad de enzymas que degradan al ADN (responsable de su capacidad tamponante). El Tris tiene un pKa de 8,06, lo que le aporta capacidad tamponante efectiva en un intervalo de pH entre 7,0 y 9,2 (Remigton 1998).

- **Dimetilsulfóxido** (DMSO): Es un solvente aprótico con notables propiedades de aumento de penetración y absorción. Inductor de interferón y aceptor de protones (Remigton 1998).
  Su capacidad preservante se debe a su alta permeabilidad dentro de las células bacterianas, destruye la pared celular causando toxicidad por daño osmótico, aumenta con la desnaturalización y liposolubilidad (Joklik *et al.,* 1994).

## 1.5. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

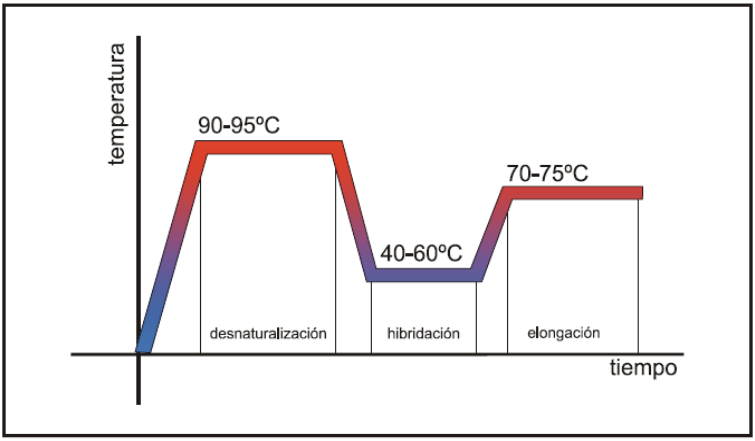
La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica análoga al proceso de replicación del ADN que tiene lugar en las células y hoy en día es una de las técnicas moleculares que ha tenido mayor impacto en los estudios de biología molecular. Una de las razones del éxito de esta técnica se debe a que es un método simple y relativamente fácil, por tal motivo, se emplea frecuentemente en el análisis del ADN, así como en los procesos moleculares que se llevan a cabo en las células (Ausubel*, et al.,* 2002).

Las aplicaciones de esta técnica son muy amplias, éstas incluyen la clonación directa del ADN genómico o del ADN complementario, mutagénesis in vitro e ingeniería del ADN, ensayos para detectar la presencia de agentes infecciosos, diagnósticos prenatales o enfermedades genéticas, análisis de la variación de secuencias alélicas y la secuenciación directa del ADN genómico y complementario (Ausubel, *et al.,* 2002).

El método de PCR incluye tres etapas críticas definidas por tiempos y temperaturas específicas (Ausubel, *et al.,* 2002):

**1).** Desnaturalización.
**2).** Alineación y
**3).** Extensión.

**Figura 4.**_ Variaciones de Tº de cada ciclo de la PCR




**Fuente:** (Ausubel *et al.,* 2002)

Cada una de estas etapas es repetida de 30 a 40 veces en ciclos térmicos. En el primer ciclo, la doble hebra templete o molde es desnaturalizada por calor a una temperatura de 90 ºC, al separarse las dos hebras de ADN, la región de interés por ser amplificada se vuelve más accesible (Ausubel, *et al.,* 2002).

La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura de entre 40 y 60 ºC, haciendo que el grueso de las hebras se mantengan separadas pero a la vez permitiendo la hibridación de las secuencias pequeñas más homólogas presentes, en este caso los oligonucleótidos adicionados (cebadores), los cuales se encuentran presentes en exceso.
Durante la última etapa caracterizada por la temperatura a 72ºC, se lleva a cabo la extensión del nuevo ADN, mediante la acción de una *ADN polimerasa* termoestable, la *Taq ADN polimerasa* (Ausubel, *et al*., 2002).

## 1.6. MARCADORES MOLECULARES (Microsatélites) Y SU UTILIDAD EN GENÉTICA POBLACIONAL.

Desde el punto de vista molecular, la variación existente, entre y dentro de los individuos de una población, también denominada "polimorfismo" derivada de cambios espontáneos en el ADN puede medirse hoy en día a través de diferentes técnicas disponibles (Aranguren-Méndez *et al.,* 2004), dentro de ellas están los microsatélites.

Los microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), que se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. Sus características generales son las siguientes (Aranguren-Méndez *et al.,* 2004 (Goossens B *et al.,* 2000):

- Presentan un elevado grado de polimorfismo.
- Su herencia es mendeliana simple.
- Son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos heterocigotos de los homocigotos).
- Son fáciles de medir y analizar.
- Tienen una confiabilidad del 100%.
- Son repetitivos y automatizables.
- Se encuentran generalmente en regiones no codificantes del genoma distribuidos uniformemente.

La alta variabilidad de este tipo de loci se debe a su gran mutabilidad. Las tasas de mutación varían según el motivo de repetición y otros factores, pero en general son del orden de $10^{-4}$, o aún $10^{-3}$, en contraste con las mutaciones puntuales, que en el

genoma nuclear se caracterizan por varios órdenes de magnitud menores (Frantz AC *et al.,* 2003).

Para los estudios de genética de poblaciones, la alta variabilidad de los microsatélites tiene connotaciones tanto positivas como negativas. Es positiva en cuanto garantiza la presencia de muchos alelos y, por tanto, un gran poder discriminatorio entre individuos, y un análisis de parentesco poderoso. La gran dispersión y gran número de loci disponibles facilita además los análisis de ligamiento (Frantz AC *et al.,* 2003).

A pesar de las grandes ventajas que poseen los microsatélites como marcadores moleculares, existen también otros factores negativos a considerar que pueden disminuir el poder y/o la sensibilidad de éstos como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos.
Estos factores son: el patrón de mutación, los alelos nulos y la homoplasia (Aranguren-Méndez *et al.,* 2004).

La Genética Poblacional representa una de las áreas en donde los microsatélites han sido más ampliamente utilizados, ya que nos permite estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (Aranguren-Méndez *et al.,* 2004, Frantz AC *et al.,* 2003, Taberlet *et al.,* 1996, Taberlet *et al.,* 1997, Goossens *et al.,* 1998, Taberlet *et al* 1999, Woods *et al.,* 1999, Miller *et al.,* 2002, Paetkau, 2003, Waits *et al.,* 2001 y Waits and Paetkau 2005).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS:

El diseño experimental de este trabajo se enfocó en determinar la calidad de ADN nuclear de Oso Andino presente en su excremento y extraído indirectamente desde dos tipos de substancias conservantes:

**a).** Etanol al 99.9% (Wasser *et al.,* 1997) y
**b).** Buffer DETs (Frantzen *et al.,* 1998).

En el caso del etanol, se aplicó un método empleado convencionalmente en el CBCM que consiste en diluir en una

proporción de 1:4 de excremento en relación a etanol (Murphy *et al.,* 2002), homogenizar dicha muestra (Wasser *et al.,* 1997) y luego tomar 200 ul de ésta suspensión homogeneizada (EOH-H) para pasar al proceso de extracción de ADN; similar procedimiento se aplicó con el buffer DETs.

Por otra parte, con otro set de muestras en etanol se aplicó un proceso posterior a la homogenización que fue el de centrifugar los tubos con la suspensión a 5000 rpm durante 30 minutos (EOH-C), eliminar el etanol sobrenadante y colectar del pellet resultante los 200 ul para la extracción.

De esta forma se cuenta con tres tratamiento de conservación/ pre-extracción: DETs, EOH-H y EOH-C.
Estos tres tratamientos fueron aplicados en dos diseños diferentes, uno para determinar su efectividad para la extracción de ADN de excretas sometidas a diferentes períodos de tiempo de degradación a la intemperie, en condiciones ambientales naturales del páramo; y un segundo experimento para determinar la efectividad de estos tratamientos como medios de conservación y extracción de ADN de muestras mantenidas en ellos a corto y mediano plazo a temperatura ambiente; de esta forma se cuenta con dos diseños generales:

El primero consistió en probar cuatro tiempos de exposición a la degradación ambiental de las muestras en las condiciones naturales de los páramos: 0, 7, 14 y 21 días (tiempo 0, 1, 2 y 3). El tiempo cero corresponde a muestras colectadas en el día de su deposición tanto en etanol como en buffer DETs y extraído su ADN inmediatamente.

**Tabla 1 .**_Tabla de diseño (Experimento de Exposición al ambiente).

| TIEMPO | TRAT. | CLIMA* | AMPLIF. | TOTAL |
|---|---|---|---|---|
| **DÍA 0 (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | Sol | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| **DÍA 1 (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | Sol | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| **DÍA 2 (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | Lluvia | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | Lluvia | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | Lluvia | PCR de 10 Loci | |
| **DÍA 3 (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | Sol | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | Sol | PCR de 10 Loci | |
| | | | | 168 muestras |

* La variable clima fue aleatoria pues no se tiene control sobre ella.

En el segundo experimento, se evaluó cuatro periodos de tiempo de conservación de muestras en Etanol y Buffer a temperatura ambiente: (0 días, 1 semana, 1 y 2 meses). El tiempo cero corresponde a muestras colectadas en el día de su deposición y extraído su ADN inmediatamente.

**Tabla 2.**_ Tabla de Diseño (Experimento de Conservación).

| TIEMPO | TRAT. | AMPLIF. | TOTAL |
|---|---|---|---|
| **CONSERVACIÓN 7 DÍAS (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | PCR de 10 Loci | |
| **CONSERVACIÓN 1 MES (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | PCR de 10 Loci | |
| **CONSERVACIÓN 2 MESES (21 muestras)** | Extracción 1 (EOH-H) | PCR de 10 Loci | 42 muestras |
| | Extracción 2 (EOH-C) | PCR de 10 Loci | |
| | Extracción 3 (BUFFER) | PCR de 10 Loci | |
| | | | 126 muestras |

**NOTA:** para los métodos de conservación solamente se tomaron 21 muestras recolectadas en el "Tiempo 0", estas muestras fueron distribuidas para la conservación en etanol centrifugado (7 muestras), etanol homogenizado (7 muestras) y en buffer homogenizado DETs (7 muestras). De éstas se tomaron las respectivas alícuotas de 200 ul para cada día de extracción de ADN nuclear indicado.

El material genético se extrajo con el kit "Qiagen Stool Mini Kit" sin ninguna modificación (www.qiagen.com). Una vez realizada la extracción de los dos experimentos, el ADN extraído se almacenó a menos 20ºC para evitar su degradación hasta realizar la amplificación por PCR.

El resultado de la extracción se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8% añadido con 3 ul de SYBR®, con las siguientes condiciones de corrida: 120V, 300mA por 45 minutos, bajo acción de luz UV de 300 nm.

Los tiempos de exposición a la intemperie, fueron establecidos en función de los períodos convencionales que usualmente se han empleado para monitorear y colectar muestras en los ecosistemas naturales de oso andino, es decir con una frecuencia menor a un mes.

De igual forma los períodos de conservación de las muestras en los tubos de colección a temperatura ambiente, emulan la situación en la que las muestras permaneciesen colectadas y almacenadas por guardaparques o parabiólogos en sus centros de trabajo sin acceso a refrigeración, que es el caso más usual en la mayoría de centros de interpretación o zonas rurales de nuestro medio, hasta por un período máximo de dos meses antes de ser remitidas al laboratorio para la extracción (Viteri, 2005) y (Cisneros y Viteri 2008).

**2.1. Recolección de las muestras:** Considerando que la fuente del ADN en este estudio son los cientos o miles de células intestinales que pueden encontrarse distribuidas en forma aleatoria e irregular sobre la superficie de cada excreta (Kohn *et al.,* 1995).

El diseño de este estudio consideró como **muestra** a una porción o alícuota de 2 $cm^3$ tomada aleatoriamente de la capa superficial (máximo 5mm de profundidad) de las excretas colectadas en un día (de 4 a 6 excretas), tomándose 7 muestras (repeticiones) para cada método a analizar.

Las excretas provinieron de dos osos en cautiverio (1 macho adulto y 1 hembra anciana), del zoológico municipal de la ciudad de Loja, de quienes se tiene previamente conocido su genotipo para los loci analizados.

Para estandarizar los potenciales efectos de la dieta en la amplificación del ADN, una semana antes y durante la recolección de las muestras, los osos fueron sometidos a una dieta compuesta de: plátano verde, papaya, sandia, maíz, aguacate, coco y manzanas en las proporciones mencionadas:

**Tabla 3.**_ Dieta propuesta para los osos en estudio.

| Alimento | Cant. kg |
|---|---|
| **MANZANA** | 0,100 |
| **SANDÍA** | 0,410 |
| **AGUACATE** | 0,430 |
| **COCO** | 0,520 |
| **PLÁTANO VERDE** | 0,400 |
| **PAPAYA** | 0,400 |
| **MAÍZ** | 1,340 |
| **TOTAL** | 3,600 |

**Fuente:** (Johnson, 1998)

Se monitoreó la deposición de los animales para colectar las excretas inmediatamente después de ser depositadas.

La recolección de excretas se realizó con mascarilla, guantes, pinzas y tubos estériles de 15ml para realizar los tratamientos de extracción y conservación que se indican más adelante.
Para estandarizar los efectos de la diferencia del volumen de muestra frente al volumen de solución de conservación (etanol o buffer), se aforaron todos los tubos en 8 ml con la solución de conservación y se adicionó muestra hasta aforar los 10 ml de volumen total, alcanzándose una relación final de solución: excreta de 4:1 (Murphy *et al.,* 2002).

El primer día de colección de excretas, se extrajeron siete muestras por tratamiento (DETs, EOH-H y EOH-C). Los 21 tubos obtenidos se denominaron (día cero) y se les extrajo el ADN inmediatamente para pasar luego a su amplificación. Estos resultados representarían el día cero tanto para las pruebas de conservación como para las pruebas de exposición al ambiente en el páramo.

En el caso de las pruebas de conservación, estos mismos tubos fueron los que se mantuvieron a temperatura ambiente en el laboratorio, extrayéndose el ADN con la periodicidad indicada (1 semana, 1 mes y 2 meses) para pasar a su amplificación y

análisis, obteniéndose todo el set de datos necesarios para este experimento.

Respecto a las pruebas de exposición al ambiente del páramo, la producción diaria de excretas (4 en promedio) se destinó para cada periodo de tratamiento de exposición (7, 14 y 21 días), así el segundo día se colectaron las excretas que se expondrían al páramo durante una semana, el tercer día se colectaron las que permanecerían por 14 días y el cuarto día las que permanecerían por espacio de 21 días.

Cada día, luego de la recolección de las excretas, éstas eran transportadas a una parcela experimental acondicionada en una zona del páramo cercana a la ciudad de Loja, en esta parcela se dejó que las excretas pasen por el proceso de degradación natural y se colectaron muestras en los tres períodos de tiempo indicados.

La parcela del páramo se instaló en un terreno plano pero sin encharcamiento y con una sombra parcial constituida por una malla plástica (sarán) que brinda una condición de sombra homogénea del 25% a toda la parcela, emulando las condiciones de sombra parcial natural que una excreta recibe de la vegetación herbácea y arbustiva propia del páramo; en este caso se ha estandarizado a un porcentaje intermedio de sombra para no tener variación entre las muestras por efecto de ésta variable.

Adicionalmente se la mantuvo protegida del ingreso de animales con alambre de púas y la malla de sombra colocada como pared.

**Fotografía 1._** Parcela en el Páramo

**2.2. Descripción de los medios de conservación y métodos de pre-extracción de ADN:** A continuación se describen en mayor detalle los tres tratamientos de conservación y pre-extracción ya citados (DETs, EOH-H y EOH-C).

**1. EOH-H:** Se toma 7 muestras aleatorias de 2 $cm^3$ cada porción y se las coloca en siete tubos corning diferentes (15 ml) que contienen 8 ml de etanol al 99.9 %, en una proporción 4 (etanol):1(excremento) (Murphy *et al.,* 2002). Se homogenizan (Wasser *et al.,* 1997) y se toma 200 ul de la suspensión para extraer el ADN nuclear con el kit "Qiagen Stool Mini Kit" sin ninguna modificación (www.qiagen.com).

**2. EOH-C:** Se repite lo mismo que para EOH-H pero antes de tomar los 200 ul de la suspensión, se centrifuga las muestras a 5000 rpm por 30 minutos, se descarta el sobrenadante de etanol, dejando solo 0,5 ml a más del pellet resultante, se vuelve a homogenizar este volumen menor y se toma 200 ul del pellet para extraer el ADN nuclear con el kit "Qiagen Stool Mini Kit" sin ninguna modificación (www.qiagen.com).

**3. DETs:** Se toma 7 muestras aleatorias de 2 $cm^3$ cada porción y se las coloca en siete tubos corning diferentes (15 ml) que contienen 8 ml de buffer DETs, en una proporción 4 (buffer):1(excremento) (Murphy *et al.,* 2002). Se homogenizan y se toma 200 ul de la suspensión para extraer el ADN nuclear con el kit "Qiagen Stool Mini Kit" sin ninguna modificación (www.qiagen.com).

**NOTA:** Inicialmente se intentó aplicar el proceso de centrifugación para muestras mantenidas en buffer, pero la alta densidad de éste inhibe la precipitación de la muestra y por ende no hay formación de pellet.

**2.3. Amplificación de ADN nuclear:** Diez microsatélites independientes utilizamos (G10B, G10H, G10J, G10P, G10M, G10O, G1OX, CXX20, UarMu50, UarMu23) desarrollados para cánidos (Ostrander *et al.,* 1993), osos cafés (*Ursus arctos*) (Taberlet *et al.,* 1997) y osos negros (*Ursus americanus*) (Paetkau and Strobeck 1994, Paetkau *et al.,* 1995) fueron evaluados para la PCR (Viteri y Waits 2002).

Los microsatélites usados presentan las siguientes características

**Tabla 4.-** Microsatélites, primers usados para la identificación individual de oso andino (*Tremarctos ornatus*).

| Nombre del microsatélite | Secuencia | Rango de tamaño (pb) |
|---|---|---|
| G10X | | 122-132 |
| F | 5'-/56FAM/CCC TGG TAA CCA CAA ATC TCT-3' | |
| R | 5'-/TCA GTT ATC TGT GAA ATC AAA A-3' | |
| UarMu23 | | 105-113 |
| F | 5'-/5HEX/GCC TGT GTG CTA TTT TAT CC-3' | |
| R | 5'-/AAT GGG TTT CTT GTT TAA TTA C-3' | |
| G10O | | 171-179 |
| F | 5'-TGG TTA TGA ATC AGG ATA TTG-3' | |
| R | 5'-/56-FAM/CAA CAG AAC AAT CCA AAG ATG-3' | |
| G10B | | 151-159 |
| F | 5'-GCC TTT TAA TGT TCT GTT GAA TTT G-3' | |

| | | |
|---|---|---|
| R | 5'/56-FAM/GAC AAA TCA CAG AAA CCT CCA TCC-3' | |
| UarMu50 | | 105-131 |
| F | 5'-/HEX/GGA GGC GTT CTT TCA GTT GGT-3' | |
| R | 5'-TGG AAC AAA ACT TAA CAC AAA TG-3' | |
| G10P | | 148-162 |
| F | 5'-/AGT TTT ACA TAG GAG GAA GAA-3' | |
| R | 5'-/5HEX/TCA TGT GGG GAA ATA CTC TGA A-3' | |
| CXX20 | | 128-134 |
| F | 5'- AGC AAC CCC TCC CAT TTA CT -3' | |
| R | 5'- /5TET/TTG TCT GAA TAG TCC TCT GCG -3' | |
| G10H | | 233-249 |
| F | 5'-/5TET/CAA CAA GAA GAC CAC TGT AA-3' | |
| R | 5'-AGA GAC CAC CAA GTA GGA TA-3' | |
| G10J | | 94-102 |
| F | 5'-/5HEX/GAT CAG ATA TTT TCA GCT TT-3' | |
| R | 5'-AAC CCC TCA CAC TCC ACT TC-3' | |
| G10M | | 209-225 |
| F | 5'-/56-FAM/TTC CCC TCA TCG TAG GTT GTA-3' | |
| R | 5'-GAT CAT GTG TTT CCA AAT AAT-3' | |

**Fuente:** (Paulina Viteri, 2007).

La PCR se llevó a cabo con el kit “Multiplex PCR” de QIAGEN: Qiagen Mastermix, Q solution y agua. Del DNA total extraído se tomó 2 ul por muestra. Además se usó un control negativo y un positivo proveniente de ADN nuclear extraído de pelos del oso andino macho en estudio.

Los primers usados se agruparon en dos juegos de amplificación por efecto de compatibilidad y traslape, para efectos de abreviación en este documento se los denomina “BOX” al set de (G1OB, G10O, G10X, Mu23 y Mu50) y el set: (G10M, G1OJ, G10P, G10H Y CXX20) está abreviado como “MJ”. El volumen por muestra fue de:

| | | |
|---|---|---|
| DNA | 2 | µl |
| Volumen PCR | 10 | µl |

**BOX**

| | | |
|---|---|---|
| Qiagen Mastermix | 5 | µl |
| Q solution 5_ | 1 | µl |
| G10 B F (10um) | 0,04 | µM |
| G10 B R (10um) | 0,04 | µM |
| G10 O F (10um) | 0,25 | µM |
| G10 O R (10um) | 0,25 | µM |
| G10 X F (10um) | 0,20 | µM |
| G10 X R (10um) | 0,20 | µM |
| Mu23 F (10um) | 0,10 | µM |
| Mu23 R (10um) | 0,10 | µM |
| Mu50 F (10um) | 0,30 | µM |
| Mu50 R (10um) | 0,30 | µM |
| H20 | 0,22 | µl |

**MJ**

| | | |
|---|---|---|
| Qiagen Mastermix | 5 | µl |
| Q solution 5_ | 1 | µl |
| G10 M F (10um) | 0,40 | µM |
| G10 M R (10um) | 0,40 | µM |
| G10 J F (10um) | 0,10 | µM |
| G10 J R (10um) | 0,10 | µM |
| G10 P F (10um) | 0,25 | µM |
| G10 P R (10um) | 0,25 | µM |
| G10 H F (10um) | 0,10 | µM |
| G10 H R (10um) | 0,10 | µM |
| CXX20 F (10um) | 0,25 | µM |
| CXX20 R (10um) | 0,25 | µM |
| H20 | 0 | |

El programa que se utilizo para la PCR fue:

**Tabla 5.**_ Condiciones de la PCR

| **PCR :** | | |
|---|---|---|
| Desnaturalización inicial | 94°C | 10 min |
| # de ciclos : | **13** | |
| Desnaturalización: | 94°c | 30 sec |
| Alineamiento: | **62°C - 0.5°C** | 90 sec |
| Extensión: | 72°C | 1 min |
| # de ciclos : | **32** | |
| Desnaturalización: | 94°c | 30 sec |
| Alineamiento: | **55°c** | 90 sec |
| Extensión: | 72°C | 1 min |
| Extensión Final | 60°C | 10 min |
| Enfriamiento | 4°C | 10 min |

(Viteri y Waits, 2002)

Posterior a la PCR se verificó la presencia de los productos obtenidos mediante gel de agarosa al 1,5% (Taq PCR Handbook, February 2008), comparando con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases para evidenciar la correcta ubicación de los productos amplificados, además de su control positivo y negativo.

**2.4. Determinación de la integridad del ADN por electroforesis:** La determinación de la calidad del ADN se interpretó en función de la intensidad de las bandas de ADN que se obtiene realizando por electroforesis en geles de agarosa. Este proceso se llevó a cabo en 300 ml de gel de agarosa diluido al 1% en amortiguador TBE 1X (http://www.promega.com) (Tris base, ácido bórico y EDTA con pH de 8,3), adicionado con bromuro de etidio 1200 ul a razón de 50 µg/ul.

Se colocó 2 µl de muestra en cada pozeta usando como colorante de corrida 1 ul de azul de bromofenol 6X diluido 1:10 (http://www.promega.com).

Los productos de PCR se analizaron mediante un gel de agarosa al 1,5% (Taq PCR Handbook, February 2008).
La electroforesis se realizó a 120 V, 300 mA durante 2 horas, empleando como amortiguador de electroforesis TBE 1X (http://www.promega.com); una vez finalizado este proceso se procedió a visualizar el gel en un transiluminador UV de 300 nm.

El análisis en geles de agarosa evidentemente reduce la capacidad de separación y discriminación de alelos que se tendría en un secuenciador de ADN, por lo tanto, a pesar de contar con 10 loci, en conjunto las muestras control obtenidas de pelo de los mismos animales presentaban un total de seis bandas. En función del genotipo ya conocido de dichos individuos (Cisneros y Viteri 2008) estas bandas corresponderían a los alelos indicados en las tablas:

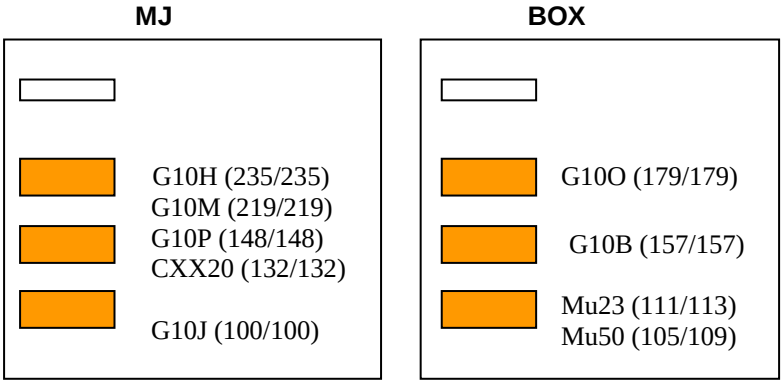
**Tabla 6.**_Genotipo del Oso Macho (Agusto)

| Microsatélites | Alelo 1 | Alelo 2 |
|---|---|---|
| CXX20 | 132 | 132 |
| G10B | 157 | 157 |
| G10H | 235 | 235 |
| G10J | 100 | 100 |
| G10M | 219 | 219 |
| G10O | 179 | 179 |
| G10P | 148 | 148 |
| Mu23 | 111 | 113 |
| Mu50 | 105 | 109 |

**Tabla 7.**_Genotipo del Oso Hembra (Nacha)

| Microsatélites | Alelo 1 | Alelo 2 |
|---|---|---|
| CXX20 | 132 | 134 |
| G10B | 157 | 157 |
| G10H | 235 | 235 |
| G10J | 100 | 100 |
| G10M | 219 | 219 |
| G10O | 179 | 179 |
| G10P | 148 | 148 |
| Mu23 | 111 | 113 |
| Mu50 | 105 | 109 |

Visualización del patrón de bandas y correspondencia genotípica:




Al ser el método de análisis estandarizado a todas las muestras, fue posible establecer las diferencias en cuanto a la presencia e intensidad de las bandas para cada tratamiento.

Para identificar las bandas se empleó una escalera dada por el programa GelEval 1.22 (Universal Binary) FrogDance Software. GelEval es un software diseñado principalmente para cuantificar imágenes de geles de electroforesis, midiendo la densidad de la banda dentro del gel y los carriles del gel por pixeles (http://www.frogdance.dundee.ac.uk).

**2.5. Análisis Estadístico:** La variable de respuesta del presente trabajo fue el valor global de intensidad de las bandas para cada muestra, para efectos de normalizar los datos, se establecieron tres categorías en función del valor de intensidad dado por el programa asignándose los siguientes valores:

**Tabla 8.**_ Categoría de Valores (GelEval)

| Rango de Intensidad | Valor Asignado |
|---|---|
| 0 a 0,0001 | 0 |
| 0,00011 A 0,001 | 0.5 |
| 0,0011 A 0,01 | 1 |

Posteriormente se sumó los valores acumulados que iría de un mínimo de cero a un máximo de 6 por muestra, dependiendo de si ninguna banda se amplificó o por lo contrario si todas se amplificaron con un valor máximo de 1 por banda.

Los datos obtenidos de acuerdo a la intensidad de las bandas por cada muestra para las 7 repeticiones, se analizaron mediante la prueba de ANOVA del programa R versión 2.8.1.
Se analizaron por separado los experimentos de exposición al ambiente y los de conservación.
Se trabajo con un nivel de confianza del 0,95%, considerándose una diferencia significativa si el *p-value* < 0,05.

En el caso de contar con valores significativos para el análisis de varianza, se aplicó la prueba de TukeyHSD, un test *a posteriori* que crea un juego de intervalos de confianza sobre las diferencias entre las medias de los niveles de un factor de diseño, de esta manera permite realizar una comparación múltiple entre dichos factores y discriminar sus diferencias significativas.

Cabe recordar que los factores de diseño para este estudio fueron:
En el caso del experimento de exposición al ambiente:
**a)** Los tratamientos de conservación / pre-extraccion (T1: EOH-H, T2: EOH-C y T3: DETs).
**b)** El tiempo de exposición al ambiente (0, 7, 14 y 21 días) y **c)** El clima en el día de su deposición (sol o lluvia).

En el caso del experimento de conservación:
**a)** Los tratamientos de conservación / pre-extraccion (T1: EOH-H, T2: EOH-C y T3: DETs) y
**b)** El tiempo de conservación (1 semana, 1 y 2 meses).

Finalmente, se compararon los resultados entre los dos sets de primers (BOX y MJ) puesto que, como se indicó en la metodología, éstos se amplificaron y corrieron en forma independiente.

Un análisis adicional fue el realizar una prueba de Chi cuadrado ($X^2$) respecto al porcentaje observado de amplificación para cada

experimento. Este porcentaje está calculado considerándose los valores máximos (valor esperado) de intensidad de amplificación de las 21 bandas de cada tratamiento (3 bandas por 7 repeticiones) por cada set de primers (BOX y MJ).

Se empleó la misma tabla de valores de amplificación establecida para la prueba de ANOVA, con valores por banda de 0, 0,5 o 1 según corresponda (Ver tabla 8), así un tratamiento con valor total de 21 bandas representa el 100% de éxito de amplificación. Al ser el valor de $X^2$ una medida de variación y al ser el valor esperado el valor máximo de porcentaje de amplificación, valores elevados de $X^2$ reflejan menor éxito de amplificación.

## 3. RESULTADOS:

Al realizar el ANOVA para el experimento de exposición al ambiente, se determinó que no existen diferencias significativas entre métodos de extracción, pero sí lo hubo en cuanto al clima, el tiempo de exposición al ambiente y entre los dos sets de primers.

**Tabla 9.-** Análisis de Varianza para Experimento de Exposición al Ambiente:

| INTENSIDAD | Pr (>F) |
|---|---|
| **Método** | 0.2432352 |
| **Clima** | 0.0001744*** |
| **Tiempo** | < 2.2e-16*** |
| **Primers** | 3.417e-11 *** |

**Valor Significativo:** 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La tabla 9 muestra los resultados de la prueba *a posteriori* entre tratamientos (métodos), tiempo, clima y primers en los experimentos de exposición al ambiente.

**Tabla 10.-** Prueba de TUKEYHSD para Experimento de Exposición al Ambiente:

- **Método:**

| MÉTODO | *p* adj |
|---|---|
| **EOH-C- EOH-H** | 0.5277356 |
| **DETs – EOH-H** | 0.8256471 |
| **DETs – EOH-C** | 0.2220464 |

- **Clima:**

| CLIMA | *p* adj |
|---|---|
| **Sol-Lluvia** | 0.0001744*** |

- **Tiempo:**

| TIEMPO | *p* adj |
|---|---|
| **D7 - D0** | 0.0000000*** |
| **D14 - D0** | 0.0000000*** |
| **D21 - D0** | 0.0000000*** |
| **D14 – D7** | 0.0000028*** |
| **D21 – D7** | 0.0055999** |
| **D21 – D14** | 0.1676525 |

- **Primers**:

| Primers | *p* adj |
|---|---|
| **BOX-MJ** | 0.0000000*** |

**Valor Significativo:** 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La tabla 11 muestra los valores de *p* para la prueba de ANOVA en los experimentos de conservación, indicando los tres factores: tratamiento, tiempo y primers, los mismos que presentan diferencias significativas.

**Tabla 11.-** Análisis de Varianza para Experimento de Conservación:

| INTENSIDAD | Pr (>F) |
|---|---|
| **Método** | 0.005322 ** |
| **Tiempo** | 1.939e-09 *** |
| **Primers** | 2.434e-12 *** |

**Valor Significativo:** 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

**Tabla 12.-** Prueba de TUKEYHSD para el Experimento de Conservación:

- **Tiempo:**

| TIEMPO | *p* adj |
|---|---|
| **dia0-cons.7dias** | 0.0000108*** |
| **dia0-cons.1mes** | 0.0000001*** |
| **dia0-cons.2meses** | 0.0000001*** |
| **cons.7dias-cons.1mes** | 0.7062219 |
| **cons.7dias-cons.2meses** | 0.7062219 |
| **cons.2meses-cons.1mes** | 1.0000000 |

- **Método:**

| MÉTODO | *p* adj |
|---|---|
| **EOH-C-EOH-H** | 0.0035156** |
| **DETs-EOH-H** | 0.2300125 |
| **DETs-EOH-C** | 0.2300125 |

- **Primers:**

| Primers | *p* adj |
|---|---|
| **BOX-MJ** | 0.0000000*** |

**Valor Significativo:** 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Las tablas 13 y 14 muestran el valor de "chi-cuadrado" para los dos experimentos, el mismo que representa el grado de variación encontrada respecto al porcentaje de éxito amplificado: observado vs. el esperado para cada tratamiento.

La tabla también muestra los valores acumulativos de dicha variación, lo cual permite contrastarla con la variación individual. Los valores en rojo señalan todos aquellos tratamientos de variación significativa (>3,84).

La primera observación a señalar es que, en el experimento de exposición al ambiente, los tres métodos de pre-extracción muestran valores acumulativos de $X^2$ similares y elevados en su amplificación, es decir con éxitos mucho menores con respecto al esperado, lo cual coincide con los análisis de ANOVA para esta variable en el mismo experimento.

Respecto a la variable “tiempo”, existen diferencias entre cada periodo, pero no se aprecia un incremento gradual de la variación como podría esperarse, si bien el día cero tiene el valor más bajo, los días siguientes muestran más bien una tendencia inversa, que, como se discutirá más adelante tendría más relación con la variable “clima”.

Finalmente, son marcadas las diferencias existentes entre los dos sets de primers, siendo el set MJ el que valores generales de variación más baja tiene y por ende un mayor éxito de amplificación.

El experimento de conservación, muestra un valor acumulativo de $X^2$ más bajo para el tratamiento de EOH-C, que a su vez presenta mejores resultados de amplificación considerando los cuatro periodos de tiempo analizados.

La variable tiempo también muestra valores crecientes de $X^2$ que es consistente con los resultados de ANOVA y Tukey, que diferencian claramente al “día 0” del resto de tratamientos y equiparan las diferencias del día 7 con un mes y dos meses, los cuales son prácticamente idénticos entre sí con un valor de 1 en la prueba de Tukey.

La tabla 15 es similar a la 14 pero ha sido retirada de ella los valores del método de EOH-H que es el que valores más altos de variación tiene y por ende menor éxito de amplificación. Lo que permite ver esta eliminación es que el tratamiento de EOH-H aporta con alrededor de un 45% de la variación total.

**Tabla 13.**_ "Chi-Cuadrado"
Experimento de Exposición al Ambiente
**Valor Significativo:** $X^2 > 3,84$ con 1gl

| MÉTODO | D0 | | D7 | | D14 | | D21 | | ∑ variación |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sol | | Lluvia | | Sol | | Sol | | |
| | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | |
| EOH-H | 5,8 | 0,01 | 8 | 13 | 12,2 | 3,9 | 6,9 | 8 | 57,81 |
| EOH-C | 4,3 | 0,2 | 10 | 14,6 | 13 | 3,9 | 10,7 | 7,4 | 64,1 |
| DETs | 3 | 0,05 | 10,7 | 8 | 18,1 | 4,3 | 10,7 | 2,3 | 57,15 |
| ∑ variación | 13,1 | 0,26 | 28,7 | 35,6 | 43,3 | 12,1 | 28,3 | 17,7 | |
| | 13,36 | | 64,3 | | 55,4 | | 46 | | |

**Tabla 14.**_ "Chi-Cuadrado"
Experimento de Conservación
**Valor Significativo:** $X^2 > 3,84$ con 1gl

| MÉTODO | D0 | | 7 DÍAS | | 1 MES | | 2 MESES | | ∑ variación |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | |
| EOH-H | 5,8 | 0,01 | 8,7 | 7,4 | 12,2 | 4,3 | 9,3 | 6,3 | 54,01 |
| EOH-C | 4,3 | 0,2 | 3,9 | 2 | 8 | 2,3 | 7,4 | 1,7 | 29,8 |
| DETs | 3 | 0,05 | 10 | 1,7 | 8 | 4,3 | 9,3 | 5,25 | 41,6 |
| ∑ variación | 13,1 | 0,26 | 22,6 | 11,1 | 28,2 | 10,9 | 26 | 13,25 | |
| | 13,36 | | 33,7 | | 39,1 | | 39,25 | | |

**Tabla 15.**_ "Chi-Cuadrado"
Experimento de Conservación excluyendo EOH-H
**Valor Significativo:** $X^2 > 3,84$ con 1gl

| MÉTODO | D0 | | 7 DÍAS | | 1 MES | | 2 MESES | | ∑ variación |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | BOX | MJ | |
| EOH-C | 4,3 | 0,2 | 3,9 | 2 | 8 | 2,3 | 7,4 | 1,7 | 29,8 |
| DETs | 3 | 0,05 | 10 | 1,7 | 8 | 4,3 | 9,3 | 5,25 | 41,6 |
| ∑ variación | 7,3 | 0,25 | 13,9 | 3,7 | 16 | 6,6 | 16,7 | 6,95 | |
| | 7,55 | | 17,6 | | 22,6 | | 23,65 | | |

## 4. DISCUSIÓN:

Nuestros resultados indican que en los experimentos de exposición al ambiente, las variables: tiempo y clima, tuvieron un impacto significativo en el porcentaje de éxito para la amplificación de ADN nuclear. Resultados similares mostraron el estudio de (Murphy *et al.,* 2007) con osos pardos.

Si bien el tiempo fue la variable más crítica, no se encuentra un patrón en los valores de *p* del test de Tukey ni en los valores de $X^2$, puesto que, respecto al primero se esperaría que entre el día 7 y el 14 existan una diferencia menos significativa que entre el día 7 y 21, pero ocurre lo contrario, de igual forma con el $X^2$, se esperaría valores más altos según se incrementa el tiempo de exposición al ambiente.

La variable que mejor explica estos resultados es la de las condiciones climáticas, puesto que si bien el páramo puede tener períodos mezclados de sol, lluvia, calor y frío extremos en un período de 24 horas, es posible también que esto ocurra en periodos más largos de uno o dos días o incluso de una semana.

El argumento central es que cada set de muestras tuvo condiciones climáticas totalmente opuestas en el día de su colocación en el páramo, lo cual posiblemente estaría influyendo en los resultados.

Como se indicó en la metodología, la baja disponibilidad de excretas obligo a establecer tandas de colección, por lo que cada set de excretas fue puesto con un día de diferencia (tres en total).

Las muestras que se colectaron el primer día ("Día 0") no tuvieron un periodo de exposición al ambiente, por lo que muestran un alto éxito general de amplificación, a diferencia de las muestras colectadas en el "día dos" que fueron evaluadas al día 14 de exposición al ambiente, en donde el día de su colocación en la parcela experimental fue predominantemente soleado.

Las muestras colectadas en el "día tres" se evaluaron al día 7 de exposición al ambiente, pero el día de su colocación en la parcela

recibieron una lluvia intensa que generó un fuerte lavado en ellas, curiosamente el lavado muestra un mayor impacto en la consistencia de éstas excretas en relación a las colocadas el día anterior, a pesar de tener las mismas condiciones físicas de la parcela.

La explicación a esta diferencia es el hecho de que las muestras colocadas el "día dos" tuvieron tiempo de secarse e incluso compactarse un poco por el sol, lo que les dio mayor resistencia al lavado por la lluvia, sin embargo las muestras colectadas el "día tres" no tuvieron esa posibilidad, lo cual no solo se evidencia en el aspecto físico (fotos 2 *vs* 3) sino también en los resultados de amplificación del ADN.

Las muestras colectadas en el "día cuatro" estuvieron expuestas por 21 días en el páramo, sin embargo; el momento de su colocación en la parcela así como al día siguiente, fueron soleados, dándoles la posibilidad de compactarse y mantener incluso una apariencia más consistente que las muestras que se expusieron menos tiempo, esto se verificó con el éxito de amplificación que presentaron, que a pesar de que es bajo, es mayor respecto a los otros tratamientos con respecto al tiempo. (Anexo 7.3 y 7.4).

De una u otra forma todas las muestras recibieron en algún momento lluvia, es preciso discutir sobre su efecto erosivo, que altera la distribución aleatoria de las células epiteliales de la superficie de la excreta, haciendo que éstas, si no son eliminadas, al menos se vayan depositando por gravedad en las partes bajas o cercanas al suelo, lo cual evidentemente va a alterar la captura de las células y la posterior amplificación del ADN, si en cambio la colección de los 2ml de cada muestra, se realiza en forma aleatoria e indistinta a lo largo de la excreta.

Otros cuatro estudios con otras especies investigaron el impacto del tiempo y las condiciones climáticas con muestras fecales y el éxito de amplificación de ADN por PCR (Farrell *et al.,* 2000; Fernando *et al.,* 2000; Lucchini *et al.,* 2002 y Piggott 2004), cabe destacar que de estos, solamente (Piggot 2004) aplicó para ADNn, los otros tres analizaron ADNmt.

(Piggot 2004) detectó un decrecimiento que fue desde el 28% hasta 5% en el éxito de amplificación de ADNn a 6 periodos de tiempo de una, dos y tres semanas además de uno, tres y seis meses, incrementando también los errores de genotipado con respecto al tiempo.

Por otra parte, (Farrell *et al.,* 2000) demostró el efecto del clima al comparar muestras fecales colectadas en clima seco y otras en clima lluvioso, el éxito en la amplificación para las primeras muestras fue del 66% respecto a las otras con 28%.

Con respecto al análisis de los datos de las muestras frescas del "día 0", la amplificación fue del 74,59%, en el análisis global de los tres tratamientos de pre-extracción, puesto que entre ellos no se encuentra diferencias significativas en ese solo periodo de tiempo, en contraste con (Murphy *et al.,* 2007) en donde el éxito en la amplificación de ADNn con muestras fecales frescas fue del 71,70%.
El 18,87% (14 días) - 39,62% (30 y 60 días) en muestras colectadas en clima seco-tibio y 20,74%(60 días) – 39,62% (3 días) para muestras colectadas en clima frío-húmedo.

A pesar de este aparente mayor éxito con muestras frescas de oso andino respecto a las de oso pardo del otro estudio, se debe resaltar que nuestro éxito de amplificación se establece en razón de la intensidad de bandas amplificadas en geles de agarosa, las cuales por su baja resolución, contemplan cada una la acumulación de hasta dos loci y por ende al menos dos alelos juntos que no se pueden discriminar en este tipo de gel.

En cambio (Murphy *et al.,* 2007), mide su éxito de amplificación en función de los genotipos completos analizados en el secuenciador, el mismo que es más específico pues permite detectar errores como pérdida de alelos, alelos falsos y alelos múltiples, lo cual evidentemente reduce el valor total del éxito amplificado permitiendo establecer discusiones y recomendaciones más precisas, por lo tanto comparaciones respecto a ese u otros trabajos similares, deben considerárselas en forma muy relativa.

Los resultados del experimento de conservación, evidencian el efecto del tiempo en el éxito de amplificación el cual es más alto en el “día 0” decreciendo hacia los siete días, en igual proporción luego de un mes y se mantiene casi invariable hacia el segundo mes, teniendo en todos los casos un mayor y significativo éxito de amplificación con el tratamiento de EOH-C, esto podría deberse a la mayor concentración de células epiteliales precipitadas en el pellet, a diferencia de EOH-H y el buffer DETs en donde el factor de dilución al homogenizar las muestras es mucho mayor.

Si bien las marcadas diferencias entre el día siete y un mes así como entre uno y dos meses, son equivalentes, dicha proporción no es correspondiente con el tiempo, pues entre un mes y dos, se tendría 60 días acumulativos del potencial de degradación, pero sin embargo el éxito de amplificación prácticamente se mantiene en el segundo mes con respecto al primero, esto permite plantear la posibilidad de que más que tratarse de degradación, podría tratarse de un efecto en la baja concentración de las células epiteliales presentes en cada muestra por efecto de la dilución mencionada.

Finalmente, en ambos experimentos se evidencia una diferencia significativa entre los dos sets de primers, incluso si analizamos solo al experimento de conservación, que no ha sido afectado por variables adicionales como el clima y dentro de este experimento si solo se considera a los dos tratamientos: EOH-C y DETs que tienen los valores de variación de $X^2$ más bajos, este patrón se mantiene.

Una posible explicación a esto es que existan diferencias en las proporciones de A-T y C-G en las secuencias de cada grupo de loci, lo cual podría afectar el éxito de amplificación en la PCR del set BOX, debido al hecho de que C-G posee tres puentes de hidrógeno en relación a A-T que solamente posee dos puentes de hidrógeno.

Para este estudio se emplearon las condiciones de PCR descritas por (Viteri y Waits, 2002) sin ninguna modificación para ambos sets de primers; pero al parecer habría que intentar hacer ajustes.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

Al colectar excretas por técnicas o muestreos no invasivos las desventajas van a ser mayores, debido a que sin lugar a duda las muestras frescas son las que mejores resultados alojan y dadas las condiciones impredecibles del clima en la región andina estudiada, definitivamente debe tratarse en lo posible de hacer colecciones más recurrentes, que permitan trabajar con excretas frescas para reducir los errores en la amplificación y genotipificación (Taberlet *et al.,* 1996; Miller *et al.,* 2002*).*

La concentración de ADN se encuentra afectada de manera directa por las condiciones climáticas del páramo, pudiéndose concluir que son particularmente críticas las condiciones que se presenten en las primeras horas después de ser depositadas, al parecer, si las muestras logran secarse inicialmente, sea por acción directa de sol o el viento, como les pasó a las muestras de los días 14 y 21, éstas pueden conservar mejor las células epiteliales y el ADN.

Bajo ésta consideración, una muestra encontrada seca en el campo no debe ser descartada respecto a su utilidad como recurso de ADN, rescatándose como útiles las partes que menos exposición directa hayan tenido a la radiación solar (flancos y parte inferior).

Cualquier muestra fresca expuesta inmediatamente a un periodo de desecación con sol (día 7 o 21) puede conservar y mantener mejor su ADN que las muestras expuestas a lluvia (días 7 y 14) debido a que su ADN va a ser fácilmente lavado y la humedad de las muestras favorecerá a la degradación por hongos y bacterias rápidamente.

En campo debido a que es difícil monitorear la deposición de los animales, definitivamente lo más recomendable sería recolectar muestras que presenten buenas condiciones físicas, de aspecto compactado, sin importar necesariamente que estén secas, puesto que son las más confiables para extraer su ADN, las muestras excesivamente lavadas presentarán problemas de Amplificación y genotipificación, aunque esto último no hemos podido verificarlo detalladamente.

Así por ejemplo en las fotografías podemos notar claramente muestras desecadas por el sol y muestras lavadas por la lluvia, esta pre-selección, puede representar un importante paso que minimice errores de amplificación y genotipificación así como genere un ahorro de recursos.

**Foto 2.**_ Aspecto físico de excreta lavada por la lluvia:

**Foto 3.**_ Aspecto físico de excreta secada por el sol: esta excreta es un día más antigua que la de la foto 3, pero sin embargo tuvo la posibilidad de compactarse por efecto del sol y resistir mejor la lluvia del día siguiente y aparentemente conservar mejor el ADN contenido:

La degradación del ADN en el tiempo, es otro factor relevante para la óptima concentración de ADN, al ser expuestas las muestras a tres períodos diferentes de tiempo a variadas condiciones climáticas vemos sin lugar a duda que existen diferencias muy significativas entre el día 0 con el día 7, 14 y 21.

Una muestra sometida a lluvia inmediatamente luego de su deposición (día 7), tiene similar nivel de degradación que una que ha estado expuesta por 21 días en el campo pero que fue inmediatamente secada por el sol. Así en nuestro estudio podemos corroborar esto al ver que existen diferencias significativas para D7 con D21, justamente por las mismas condiciones climáticas mencionadas anteriormente.

La variación que existe entre las siete repeticiones por tratamiento en la intensidad de las bandas en los productos amplificados, puede que tenga, más allá del azar, la influencia de una distribución no aleatoria de las células epiteliales del intestino en la excreta, es decir "puede ser" que las células no tengan una distribución completamente aleatoria sino agrupada a cierto sectores de mayor erosión del epitelio como segmentos de alojamiento más corrosivo por ejemplo o abultamientos, por lo que se recomendaría colectar las muestras de esos sectores, como se mencionó, esta distribución puede estar también influenciada por la lluvia.

Entre el experimento de conservación los métodos de pre-extracción (EOH-H, EOH-C y BUFFER) evidencian un éxito de amplificación significativamente superior al método EOH-C, por lo tanto para estudios posteriores en muestras de campo se recomienda conservar las excretas en etanol y aplicar el método de pre-extracción centrifugando las mismas para extraer y amplificar ADN.

Esta conclusión puede llegar a replantear el actual y creciente uso de buffer DETs en diversos lugares del mundo, medio de conservación que ha evidenciado ser efectivo pero que a su vez presenta mayores dificultades y costos de preparación.

De todas formas es preciso destacar que sería bueno extender un análisis comparativo similar a periodos de tiempo más

prolongados, en donde quizá pudiesen encontrarse mejores resultados para buffer, pero definitivamente la comparación debe hacerse con respecto al etanol centrifugado y no solamente con el etanol homogenizado como se ha estudiado hasta la fecha.

En lo posible para evitar al máximo todo tipo de degradación del ADN en las excretas luego de ser recolectada y conservada, se recomienda almacenar a -20ºC hasta la posterior extracción, para disminuir cualquier tipo de actividad bacteriana y enzimática que pueda ocasionar daño al ADN.

Si se está más de 21 días en el campo, se recomienda mantener las excretas colectadas en un campo oscuro, de esta manera también disminuiríamos el efecto de la luz sobre cualquier tipo de actividad enzimática que pueda dañar el ADN.

De los dos juegos de primers microsatélites usados vemos que se obtuvieron mejores productos amplificados para MJ con respecto a BOX en donde visualizamos claramente a través de los geles de agarosa la nitidez de los primeros en comparación con los segundos, por ello para análisis a corto plazo con BOX, se recomienda optimizar las condiciones de PCR para evitar todo tipo de error de amplificación.

Las condiciones y el tiempo de corrida para los geles de agarosa con tinción de SYBR® o bromuro de etidio varía de acuerdo al material biológico en estudio, al tamaño del gel y al peso de pb de los productos amplificados si este fuera el caso o para la cuantificación de ADN total.

No se recomienda hacer análisis de genotipificación con geles de agarosa, cuando se trabaja con microsatélites debido a que no se pueden observar los alelos claramente, además los errores pueden ser mayores debido a múltiples factores asociados como: la tinción, concentración del gel, escasa o poca cantidad de muestra, contaminación por manipulación, soluciones mal preparadas, condiciones climáticas, mal pipeteo, entre otras.

Para estudios posteriores en muestras de campo se recomienda el análisis de secuenciación para la genotipificación de los

individuos debido a la precisión de los resultados y la minimización de errores.

La manipulación adecuada de: muestras, reactivos, protocolos y equipos garantizan un trabajo de calidad con resultados satisfactorios.

## 6. BIBLIOGRAFÍA:


- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith & K. Struhl (2002). **Short protocols in molecular biology.** *5ta. Ed. Greene Publishing and Wiley-Interscience. New York, NY.* Vol. I, Chapter 2, 2.1 - 2.53 pp.

- J.A. Aranguren-Méndez, R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, & J. Jordana (2004). **Los microsatélites (STR´s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión.** *ALPA,* **13(1):** 30-42.

- M. Bosch, J. Marmi, A. Ferrando, F. López-Giráldez, O. Andrés, E. García-Franquesa, M. Ponsá, T. Kellermann, B. Guallar, F. Bisbal & X. Domingo-Roura (2005). **Genotipar sin Capturar.** Galemys 17 (nº especial): 81-102 .ISSN: 1137-8700.

- Cisneros, R. & Viteri, P (2008). **Diversidad Genética del Oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en el Parque Nacional Podocarpus.** *Memorias XXXII Jornadas Nacionales de Biología – Ecuador. (Universidad Técnica Particular de Loja).*

- Farrell, L. E., Roman, J. & Sunquist, M. E (2000).**Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats.** *Molecular Ecology,* **9:**1583-1590.

- Fernando, P. J., Pfrender, M. E., Encalada, S. E. & Lande, R (2000). **Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant.** *Heredity,* **84:** 362-372.

- Foye, W. O (1984). **Principios de Química Farmaceútica.** Tomo 2.

- Flagstad, Ø., Roed, K., Stacy, J. E., & Jakobsen, K. S (1999). Reliable noninvasive genotyping based on excremental PCR of nuclear DNA purified with a magnetic bead protocol. *Molecular Ecology,* 8:879–883.

- Frantz, A. C., Pope, L. C., Carpenter, P. J. & Roper, T. J (2003). **Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA.** *Molecular Ecology,* **12**:1649–1661.

- Frantzen, M., Silk, J., Fergusson, J., Wayne, R. & Kohn, M. (1998). **Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA.** *Molecular Ecology* **7:** 1423–1428.

- J. A. García Rodríguez (1999). **"Microbiología Clínica".** *Ed. Haurcourt Brace. Barcelona.*

- *Goodman* & Gilman (2006). Las Bases Farmacológicas de la Terapeútica. 11ª Edición.

- Goossens, B., Waits, L. P. & Taberlet, P (1998). **Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping.** *Molecular Ecology*, **7**: 1237–1241.

- Goossens B., Chikhi L., Utami S. S & Ruiter J. D (2000). A multisample, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation Genetics,* 1:157–162

- P. Hájková, B. Zemanová, J. Bryja, B. Hájek, K. Roche, E. Tkadlec & J. Zima (2006). **Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces.** *Molecular Ecology Notes,* **6:** 559-562.

- Johnson, A (1998).**Manual de Nutrición y Dietas para Animales Silvestres en Cautiverio.**

- Joklik, Willet, Amos & Wilfert (1994). **Microbiología de ZINSSER.** 2da Edición.

- (http://www.frogdance.dundee.ac.uk).

- (http://www.qiagen.com).

- (http://www.promega.com).

- (http://www.ucm.es/info/genforen/queesadnantiguo.htm).

- (http://www.dnamatch.de/Problem_solving/2/2.html).

- (http://www.bioforensics.com/.../Dropout/index.html).

- (http://www.fao.org/docrep/004/y2775s/y2775s00.htm)

- Kiss, K. & Brauning, A (1997).**El bosque húmedo de montaña. Investigación de la diversidad de un ecosistema en el Sur del Ecuador.**

- Kohn, M., Knauer. F., Stoffella, A., Schröder, W. & Pääbo, S. (1995). **Conservation genetics of the European brown bear a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences.** *Molecular Ecology*, **4**, 95–103.

- Miller, C., Joyce, P. & L. P. Waits (2002). Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics, 160:357-366.*

- Murphy, M. A., Waits, L. P. & Kendall, K. C (2000). **Quantitative evaluation of fecal drying methods for brown bear DNA analysis.** *Wildlife Society Bulletin*, **28**: 951–957.

- Murphy, M. A., Lisette P. Waits, Katherine, C. Kendall, Samuel K. Wasser, Jerry A. Higbee & Robert Bogden (2002). **An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples.** *Conservation Genetics,* **3:** 435–440.

- Murphy, M. A., Lisette P. Waits & Katherine C. Kendall (2003). The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos)*. *Molecular Ecology,* 12: 2261–2265.

- Murphy, M. A., Katherine C. Kendall, Andrew Robinson & Lisette P. Waits (2007). **The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos)* faecal DNA amplification.** *Conservation Genetics*, **8:** 1219-1224.

- Nei, M. (1987). **Molecular Evolutionary Genetics**. *Columbia University Press, New York.*

- M. Nsubuga, M. M. Robbins, A. D. Roeder, P. A. Morin, C. Boesch & L. Vigilant (2004). **Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method.** *Molecular Ecology*, **13**: 2089–2094.

- Lucchini, V., Fabri, E., Marucco, F. & Ricci, S (2002). **Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus)* packs in the western Italian Alps.** *Molecular Ecology,* **11:** 857-868.

- Ostrander, E. A., Sprague, G. F. & Rine, J (1993). Identification and characterization of dinucleotide repeat (CA)n markers for genetic mapping in dog. *Genomics,* 16: 207-213.

- Patkeau, D. & Strobeck, C. (1994) Microsatellite analysis of genetic variation in back bear populations. *Molecular Ecology*, 3: 489–495.

- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling & C. Strobeck (1995). **Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears**. *Molecular Biology,* **4:** 347-354.

- Paetkau, D. (2003). **An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories.** *Molecular Ecology,* **12:**1375–1387.

- Piggott, M. P. & Taylor, A. C. (2003). **Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species.** *Australian Journal of Zoology*, **51**: 341-355.

- Piggott, M. P (2004).**Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA.** *Wild Res,* **31**:485-493.

- Remigton (1998). **Farmacia.** 19ª Edición. Tomo 2.

- Ryan, K. J. & Roy, C. G (2005). **Microbiología Médica Scherris.** 4ta Edición, pag: 199.

- Taberlet, Griffin, S., Goossens, B. & Questiau, S (1996).**Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR.** *Nucleic Acids Res* **24:** 3189-3194.

- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhrès, E., Hanotte, O., Waits, L. P., Dubois-Paganon, C., Burke, T. & Bouvet, J. (1997) **Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population.** *Molecular Ecology*, **6**:869–876.

- Taberlet, P., L. P. Waits & G. Luikart (1999). **Noninvasive genetic sampling: look before you leap.** *Trends in Ecology and Evolution*, **14**: 323-327.

- Taq PCR Handbook. 3ra Edition. **QIAGEN.** February 2008.

- Viteri, P. & L. P. Waits (2002). A non-invasive genetic sampling pilot study of the Andean bear (*Tremarctos ornatus*) in the Cayambe-Coca Ecological Reserve, Ecuador. *XIV International Conference on Bear Research and Management, Steinkjer-Norway.*

- Viteri, M. P. (2005). **Conservación del oso andino in situ: Determinación de la variabilidad genética del oso andino (*Tremarctos ornatus*) en dos poblaciones de osos silvestres, en el norte y sur del Ecuador.** *VI International*

*Conference on Wildlife Management in the Amazon region and Latin America, Iquitos-Perú.*

- Waits, L. P., Taberlet, P., Swenson, J. E., Sandegren, F. & Franzén, R. (2000) Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 9: 421–431.

- Waits, L. P., Luikart, G. & Taberlet, P (2001). **Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines.** *Molecular Ecology*, **10**: 249–256.

- Waits, L. & Paetkau, D (2005). **Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection.** *Journal of Wildlife Management*, **4**: 1419–1433.

- Wasser, S. K., Houston, C. S., Koehler, G. M., Cadd, G. G. & Fain, S. R (1997). **Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids.** *Molecular Ecology*, **6**: 1091–1097.

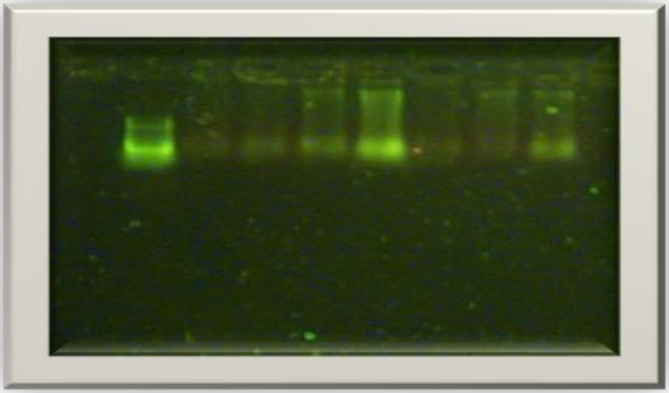
- Wehausen, J. D., Ramey, R. R II. & Epps, C. W (2004). Experiments in DNA extraction and PCR amplification from Bighorn Sheep feces: the importance of DNA extraction method. *J Heredity,* 95:503–509 1224.

- Woods, J. C., Paetkau, D. & Lewis, D (1999). **Genetic tagging of freeranging black and brown bears.** *Wildlife Society Bulletin*, **27**: 616–627.

# 7. ANEXOS

**Anexo Nº 7.1**
**Gel de Agarosa 0,8 %**
**Tinción Syber**

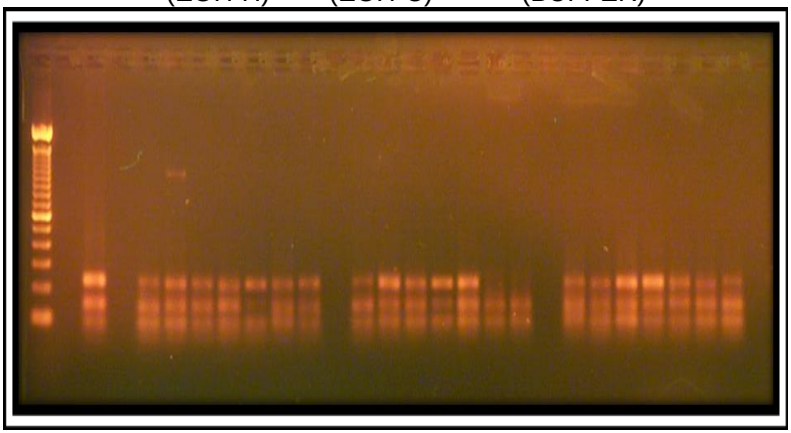
C+ M1 M2 M3 M4 M5 M6 M7



Muestras de ADN total
“DIA O” (EOH-H)

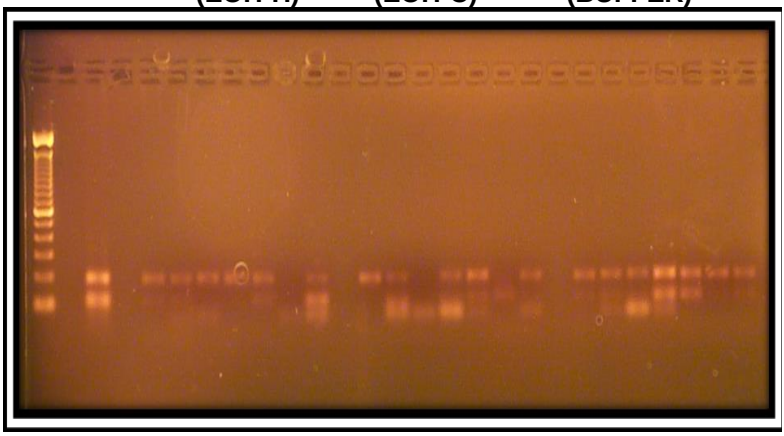
**Anexo Nº 7.2**
**Gel de Agarosa 1.5%**
**Tinción Bromuro de Etidio**

Mm C + - Trat. 1 (EOH-H) Trat. 2 (EOH-C) Trat. 3 (BUFFER)



Productos de PCR, ”Día 0 MJ”

Mm C + - Trat. 1 **(EOH-H)** Trat. 2 **(EOH-C)** Trat. 3 **(BUFFER)**

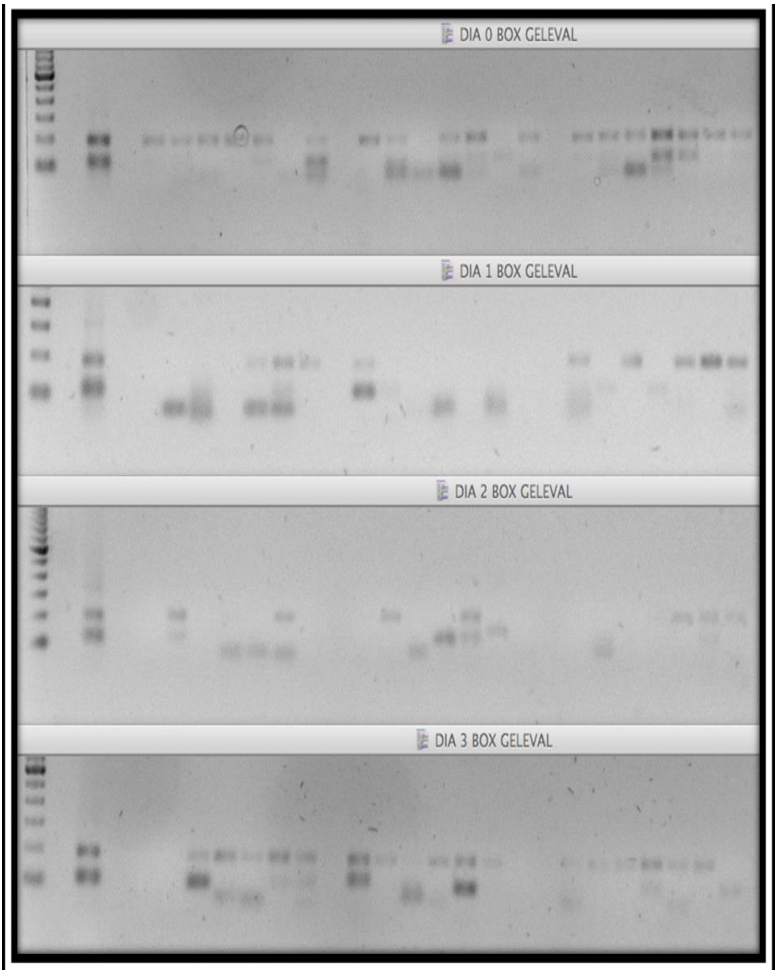


Productos de PCR, ”Día 0 BOX”

**Anexo Nº 7.3**

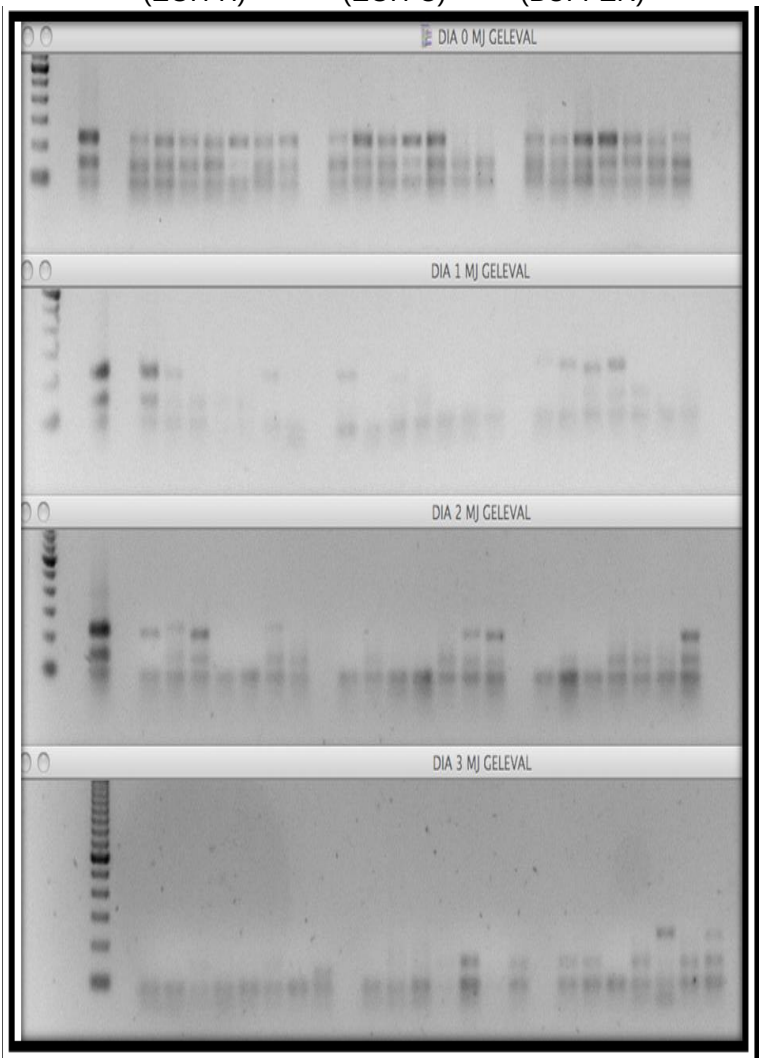
**Experimentos de Exposición al Ambiente y Métodos Pre-extracción**
**Geles BOX (Vista preeliminar GelEval)**

| Mm C + - | Trat. 1 **(EOH-H)** | Trat. 2 **(EOH-C)** | Trat. 3 **(BUFFER)** |
|---|---|---|---|



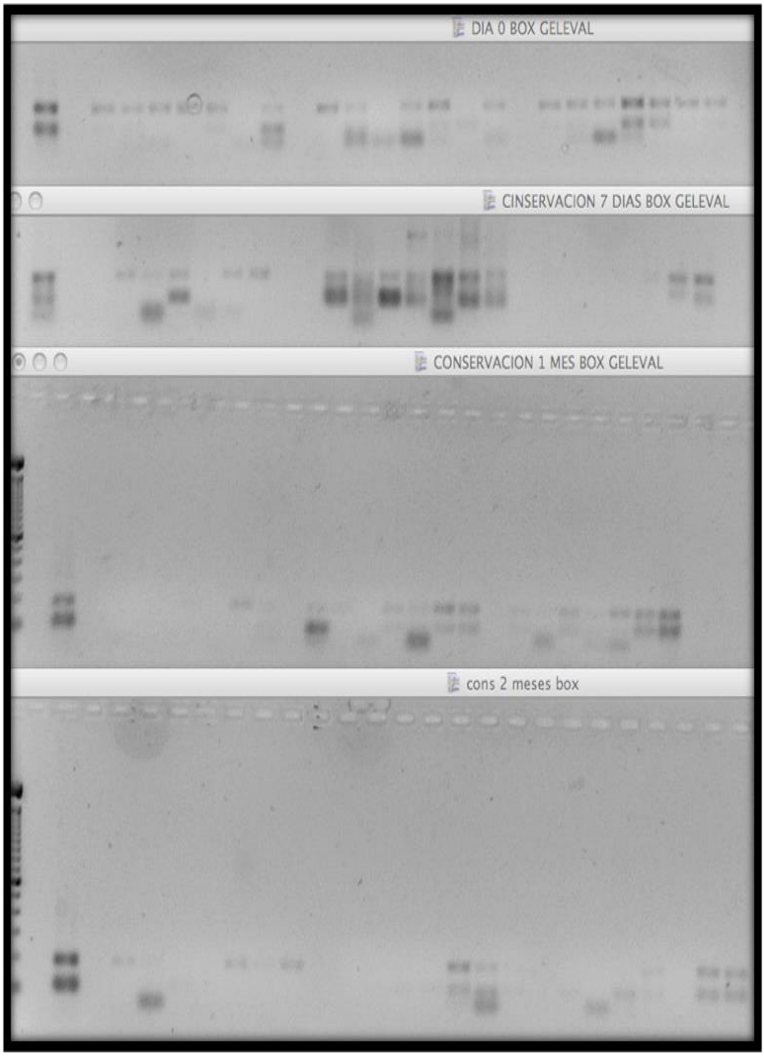
**Anexo Nº 7.4**
**Experimentos de Exposición al Ambiente y Métodos Pre-extracción**
**Geles MJ (Vista preeliminar GelEval)**

Mm C + - Trat. 1 (EOH-H) Trat. 2 (EOH-C) Trat. 3 (BUFFER)



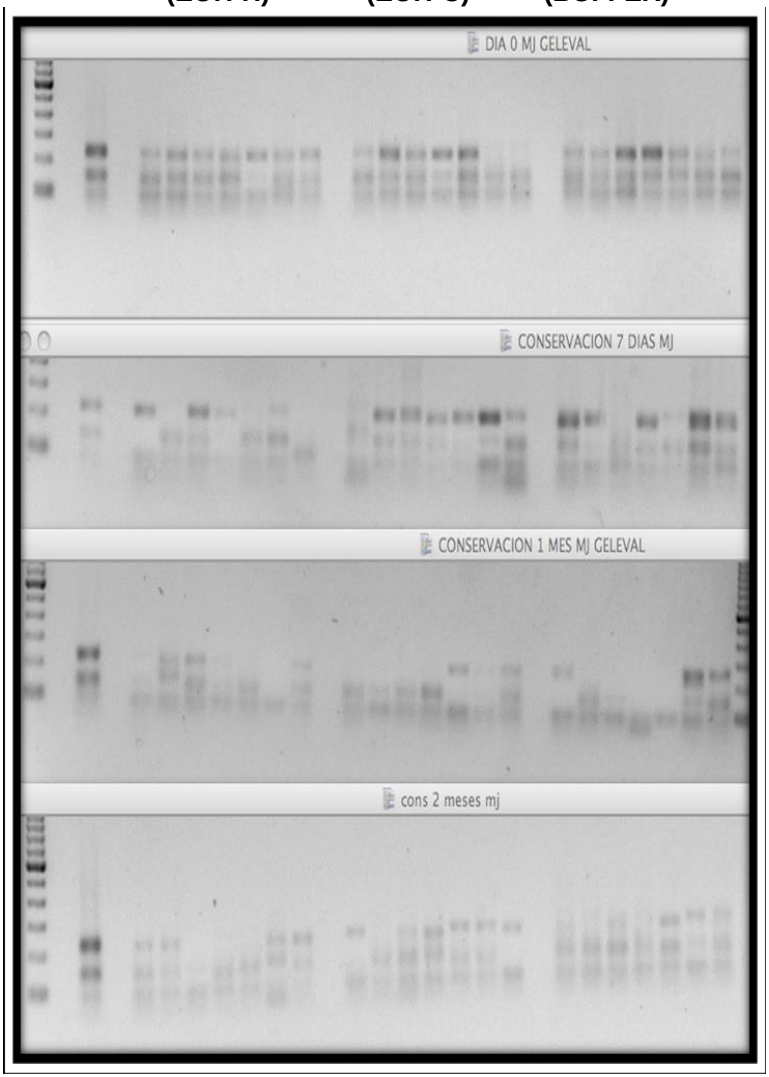
**Anexo Nº 7.5**
**Experimentos de Conservación y Métodos de Pre-extracción**
**Geles BOX (Vista preeliminar GelEval)**

| Mm C + - | Trat. 1 (EOH-H) | Trat. 2 (EOH-C) | Trat. 3 (BUFFER) |
|---|---|---|---|



**Anexo Nº 7.6**
**Experimentos de Conservación y Métodos de Pre-extracción**
**Geles MJ (Vista preeliminar GelEval)**

Mm C + - Trat. 1 **(EOH-H)** Trat. 2 **(EOH-C)** Trat. 3 **(BUFFER)**



## Anexo Nº 7.7

## Preparación de Soluciones

- **Reconstitución y Dilución de Primers STRs:**

**Líquido de dilución:** agua desionizada estéril.

Unidades, Equivalencias y Cálculos:
Para realizar los cálculos del volumen de agua desionizada estéril que debe ser adicionada a cada primer liofilizado, se deben considerar las siguientes unidades y valores de la concentración stock a la cual vamos a llegar a reconstituirlos:

1nmole= 1000 pmoles 1uM= 1 pmol/ul

**Concentración stock:** 100 uM = 100 pmoles/ul (todos los primers deberán estar a esta concentración).

Volumen de H20 para reconstitución:

=pmoles/100pmoles

Ej:

Se desea reconstituir un primer para obtener una concentración stock de 100 uM y que de acuerdo al certificado de análisis del fabricante contiene 29 moles. ¿Qué volumen de agua desionizada estéril debe ser añadida?

29 nmoles= 2 900 pmoles

Volumen de H20 para reconstitución:

= pmoles/cc
= 2900pmoles/(100pmoles/ul)
= 290 ul

Preparar 100 ul de soluciones de primers de trabajo de concentración 25 uM, a partir de los stocks de primers de concentración 100 uM.

**V1C1=** V2C2

V1= ?

**V1=** (V2C2) / C1

**V1=** (100 ul x 25 uM) / 100 Um

Entonces se debe tomar 25 ul del stock y adicionar 75 ul de agua desionizada estéril con lo cual ya se tiene la solución de trabajo de concentración 25 uM.

- **Buffer DETs:**

20% DMSO
0.25 M EDTA
100mM Tris pH 7.5
NaCl para saturación

Para 500 ml:

250 ml de 0.5 M EDTA
100 ml DMSO 20%
50 ml 1M Tris pH 7.5
100 ml H2O
NaCl para saturación

## Anexo Nº 7.8

## Porcentaje de Éxito Amplificado para Experimentos de Exposición al Ambiente y Conservación con los Métodos Pre-extracción

- **Experimento de Exposición al Ambiente:**

| MÉTODO | DÍA O BOX | DÍA 7 BOX | DÍA 14 BOX | DÍA 21 BOX |
|---|---|---|---|---|
| EOH-H | 47,62% (10/21) | 38,09% (8/21) | 23,80% (5/21) | 42,85% (9/21) |
| EOH-C | 54,76% (11,5/21) | 30,95% (6,5/21) | 21,42% (4,5/21) | 28,57% (6/21) |
| DETs | 61,90% (13/21) | 28,57% (6/21) | 7,14% (1,5/21) | 28,57% (6/21) |

| MÉTODO | DÍA O MJ | DÍA 7 MJ | DÍA 14 MJ | DÍA 21 MJ |
|---|---|---|---|---|
| EOH-H | 97,61% (20,5/21) | 21,42% (4,5/21) | 57,14% (12/21) | 38,09% (8/21) |
| EOH-C | 90,47% (19/21) | 16,66% (3,5/21) | 57,14% (12/21) | 40,47% (8,5/21) |
| DETs | 95,23% (20/21) | 38,09% (8/21) | 54,76% (11,5/21) | 66,66% (14/21) |

- **Experimento de Conservación:**

| MÉTODO | DÍA O BOX | 7 DÍAS | 1 MES | 2 MESES |
|---|---|---|---|---|
| EOH-H | 47,62% (10/21) | 35,71% (7,5/21) | 23,80% (5/21) | 33,33% (7/21) |
| EOH-C | 54,76% (11,5/21) | 57,14% (12/21) | 38,09% (8/21) | 40,47% (8,5/21) |
| DETs | 61,90% (13/21) | 30,95% (6,5/21) | 38,09% (8/21) | 33,33% (7/21) |

| MÉTODO | DÍA O MJ | 7 DÍAS | 1 MES | 2 MESES |
|---|---|---|---|---|
| EOH-H | 97,61% (20,5/21) | 40,47% (8,5/21) | 54,76% (11,5/21) | 45,23% (9,5/21) |
| EOH-C | 90,47% (19/21) | 69,04% (14,5/21) | 66,66% (14/21) | 71,42% (15/21) |
| DETs | 95,23% (20/21) | 71,42% (15/21) | 52,38% (11/21) | 50% (10,5/21) |