

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección mediante PCR de especies de carnívoros responsables de ataques
al ganado**

Iván Daniel Alcázar Salazar

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 21 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Detección mediante PCR de especies de carnívoros responsables de ataques
al ganado**

Iván Daniel Alcázar Salazar

Nombre del profesor, Título académico María de Lourdes Torres, PhD

María José Pozo, MBS

Quito, 21 de diciembre de 2020

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Iván Daniel Alcázar Salazar

Código: 00137265

Cédula de identidad: 171958089-4

Lugar y fecha: Quito, 21 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en: <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El crecimiento acelerado de la población humana ha resultado en una ampliación de la frontera productiva. Por otro lado, la pérdida de hábitat y fuentes naturales de alimento obligan a ciertas especies silvestres a buscar fuentes alternativas de sustento, y encontrarlas, por ejemplo, en el ganado vacuno. En Ecuador la falta de datos sobre los conflictos carnívoro-ganado da lugar a conceptos erróneos. Los ganaderos generalmente asocian los ataques con grandes carnívoros silvestres y como medida preventiva los cazan y matan para evitar perder su ganado. Sin embargo, los eventos de depredación al ganado son ocasionalmente perpetrados por perros salvajes, por lo tanto, la implementación de técnicas de detección moleculares podría ser beneficiosa para determinar la identidad del depredador. Este conocimiento será útil para evitar la caza de especies de carnívoros silvestres que son vulnerables o están en peligro de extinción. Según la Lista Roja Ecuatoriana de especies amenazadas, grandes carnívoros como el puma (*Puma concolor*) y el jaguar (*Panthera onca*) son especies vulnerables. El oso de anteojos (*Tremarctos ornatus*) se encuentra catalogado en peligro de extinción. Este proyecto se basa en estandarizar un protocolo de identificación molecular por PCR a partir de saliva obtenida de pumas, jaguares y osos de anteojos en cautiverio, así como de perros domésticos. Para esto, se extrajo ADN de muestras de saliva y se usaron primers específicos para cada especie. Una vez establecidos los protocolos de PCR, podrán ser utilizados para la identificación de las especies de carnívoros responsables del ataque al ganado a través de toma de muestras de saliva en las heridas del animal agredido. Esto también permitirá generar bases de datos confiables y establecer protocolos de acción efectivos para preservar la vida tanto del ganado como de los grandes carnívoros silvestres.

Palabras clave: carnívoros silvestres, conflicto humano-carnívoro, PCR, detección ADN

ABSTRACT

The accelerated growth of human population has resulted in an expansion of the productive frontier. On the other hand, the loss of habitat and natural food sources forces certain wild species to look for alternative sources of sustenance, and sometimes finding them in cattle. In Ecuador, the lack of data on carnivore-livestock conflicts leads to misconceptions. Ranchers generally associate the attacks with large wild carnivores and as a preventive measure they hunt and kill them to avoid losing their cattle. However, livestock predation events are occasionally perpetrated by wild dogs, therefore, the implementation of molecular detection techniques could be beneficial to determine the identity of the predator. This knowledge will be useful to avoid hunting wild carnivore species that are vulnerable or in danger of extinction. According to the Ecuadorian Red List of threatened species, large carnivores such as pumas (*Puma concolor*) and jaguars (*Panthera onca*) are vulnerable species. The spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) is listed as endangered. This project is based on standardizing a molecular identification protocol of PCR from saliva obtained from pumas, jaguars, and spectacled bears in captivity, as well as domestic dogs. For this, DNA was extracted from saliva samples and specific primers were used for each species for the standardization of the PCR protocols. Once these protocols are established, they can be used to identify carnivores responsible for predation events by obtaining saliva samples from the wounds of an attacked animal. This can also be used to generate reliable databases and establish effective action protocols to preserve the lives of both cattle and large wild carnivores.

Keywords: wild carnivores, conflict human - carnivore, PCR, DNA detection

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	11
Conflictos humano-carnívoro	11
Situación del oso andino en Ecuador	12
Situación actual del puma en Ecuador	12
Situación actual del jaguar en Ecuador	13
Perros ferales y su impacto en los conflictos carnívoro-humano	14
Monitoreo de poblaciones animales a través de identificación molecular en Ecuador	14
METODOLOGÍA	16
Protocolos de muestreo	16
Toma de muestras.....	16
Extracción de ADN	17
Selección de primers	17
Amplificación de regiones específicas	17
Amplificación región COI Oso Andino.	17
Amplificación región ATP6 en Jaguar.	18
Amplificación región 16S en Puma.	18
Amplificación región Cyt en Perro.	19
Amplificación región ND5 en Ganado Vacuno.	19
RESULTADOS	20

Amplificación región CO1 en Oso Andino	20
Amplificación región ATP6 en Jaguar	20
Amplificación región 16S en Puma	20
Amplificación región CyT en Perro	21
Amplificación región ND5 en Ganado Vacuno	21
<i>DISCUSIÓN</i>	22
 Importancia de un método de detección molecular	22
 Extracción de ADN a partir de muestras de saliva	23
 Desafíos en la estandarización de protocolos de PCR	24
 Prueba de la metodología en un conflicto real	24
 Estrategias para preservación de las especies animales	25
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>.....	27
<i>TABLAS</i>	28
<i>FIGURAS</i>.....	31
<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	34.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	28
Tabla 2	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	31
Figura 2	31
Figura 3	32
Figura 4	32
Figura 5	33

INTRODUCCIÓN

Conflictos humano-carnívoro

Los conflictos entre humanos y grandes carnívoros se describen como un acontecimiento puntual o recurrente en donde existe un perjuicio económico al ser humano como resultado de un ataque al ganado o aves por parte de un carnívoro. Por lo general, estos ataques desencadenan en la muerte del animal doméstico (Castaño-Uribe et al., 2016). Estos acontecimientos ocurren con frecuencia en zonas aledañas a áreas protegidas o bosques poco intervenidos en donde se llevan a cabo actividades productivas como ganadería o agricultura (Anaya-Zamora et al., 2017). Las pérdidas económicas muchas veces conllevan a que los habitantes de zonas rurales y ganaderos tomen represalias contra cualquier carnívoro silvestre que habite la zona al considerarlo un posible depredador. (Narváez y Zapata-Ríos, 2016).

En Ecuador, el aumento en la frecuencia de los eventos de depredación pone en alto riesgo a especies como el oso andino (*Tremarctos ornatus*), que está en peligro de extinción, así como el puma (*Puma concolor*) y el jaguar (*Panthera onca*), que se encuentran clasificadas como especies vulnerables dentro del territorio ecuatoriano (Tirira, 2001). Estos grandes carnívoros sufren diferentes tipos de presiones antropogénicas directas e indirectas, que afectan al número de individuos que conforman sus poblaciones. Las presiones directas se refieren a la caza de estos animales para obtener recursos de alto valor como pieles, alimento, colmillos, o como medida preventiva para salvaguardar su integridad y la de su ganado (Naranjo y Dirzo, 2009). Por otro lado, las presiones indirectas son, por ejemplo, la pérdida de hábitat, escases de alimento y contaminación de los ecosistemas (Guerra-Vargas y Mancera-Pineda, 2015). Las presiones antropogénicas indirectas a su vez aumentan el número de eventos de conflicto entre humano y carnívoro, al acercar las zonas de producción al hábitat natural de los animales, siendo uno de los motivos que desencadenan en su caza (Tirira, 2001).

Situación del oso andino en Ecuador

El oso de anteojos u oso andino está distribuido a lo largo de la Cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia, en los bosques que se encuentran en las estribaciones de la cordillera. Tiene un gran protagonismo en el equilibrio de los ecosistemas ya que es un polinizador por excelencia. En Ecuador se estima que se cuenta con menos de 2500 individuos adultos de esta especie, distribuidos en poblaciones de máximo 250 individuos adultos, por lo que la conservación a largo plazo de las poblaciones está en alto riesgo (Tirira, 2001). Los individuos adultos de esta especie generan un alto número de conflictos con las poblaciones humanas debido a que cada individuo macho adulto cubre grandes extensiones de territorio. Dentro de dicho territorio suelen incluirse terrenos que han sido destinados a plantaciones de diversos productos, ganadería o avicultura. Al ser omnívoros tienen un alto impacto económico ya que además de ser depredadores de ganado consumen cultivos como maíz (Castellanos et al., 2005). En Ecuador se conoce que es una especie que sufre caza constante debido al alto número de conflictos reportados, donde se asume que el oso andino es el responsable. (Castellanos y Laguna, 2011).

Situación actual del puma en Ecuador

El puma es una especie de felino que habita en América desde Canadá hasta la Patagonia. Su alta capacidad de adaptación a los diversos ecosistemas le permite habitar en todas las regiones continentales del Ecuador. Esta especie cumple un rol importante dentro de la cadena trófica natural al alimentarse de herbívoros pequeños, medianos y grandes (Laundré y Hernández, 2010). Las poblaciones de pumas dentro del territorio ecuatoriano no se encuentran monitoreadas, ni existen registros específicos del número de individuos. Sin embargo, se conocen las regiones donde habitan. Partiendo de esta información, se puede estimar poblaciones muy reducidas de pumas a lo largo de la Costa y Sierra ecuatorianas ya que los ecosistemas de estas zonas se encuentran gravemente intervenidos (Tirira, 2011). Debido al

nivel de conservación y la amplia extensión de bosques no intervenidos, se estima que en la Amazonía baja centro-sur y en estribaciones orientales de los Andes podrían existir poblaciones saludables y con un número considerable de individuos (Tirira, 2001). En 2011, se realizó una mención especial del puma en el Libro Rojo de especies amenazadas dentro del territorio ecuatoriano con la finalidad de hacer un énfasis en la falta de datos relevantes sobre esta especie tales como: el número de individuos de las diferentes poblaciones, estrategias para la conservación de esta especie y datos de conflictos con seres humanos (Tirira, 2011).

Situación actual del jaguar en Ecuador

El jaguar es el felino más grande que habita en el continente americano, logra alcanzar un peso de hasta 150 kilogramos. Está distribuido desde México hasta Argentina a lo largo de bosques con una altitud menor a 2000 metros sobre el nivel del mar. Es una especie importante dentro de la cadena trófica al ser depredador de herbívoros grandes y medianos (Tirira, 2001). Un estudio publicado en el año 2016 por Espinosa y colaboradores muestra que las poblaciones de jaguares dentro del territorio ecuatoriano se encuentran gravemente amenazadas. Al monitorear dos parques nacionales con cámaras trampa y extrapolarlo a la situación de toda la Región Amazónica, se determinó la presencia de aproximadamente 1250 individuos divididos en tres poblaciones grandes. De las tres poblaciones, se estima que únicamente la población de la zona norte que cuenta con más de 650 individuos podría persistir durante los próximos 200 años bajo las condiciones actuales (Espinosa et al., 2016). Por otra parte en la Región Costa existen poblaciones de jaguares muy deterioradas que pueden ser causantes de ataques al ganado, ya que los jaguares que habitan los parches de selva de la región se ven obligados a buscar recursos en las zonas ganaderas y agrícolas aledañas (Figuerola, 2019).

Perros ferales y su impacto en los conflictos carnívoro-humano

Los perros ferales son perros que no tienen alimento y refugio provisto intencionalmente por el humano y evitan acercarse a los mismos (Boitani y Ciucci, 2010). Se estima que en todo el mundo existen 500.000 millones de perros, de los cuales el 75% no tiene un dueño. En Ecuador se estima que hay cerca de 1.500.000 individuos (Barba, 2017). Las razas grandes de perros tienen herramientas evolutivas que los convierten en cazadores por excelencia (Koster, 2009). Al tener una gran población y atacar en grupos, pueden ser los causantes de muertes de ganado. Esto es un problema importante para la preservación de las poblaciones de grandes carnívoros como los pumas, jaguares y osos andinos, ya que son individuos de estas especies quienes sufren las represalias por las muertes de ganado vacuno (Bonacic, 2007).

Monitoreo de poblaciones animales a través de identificación molecular en Ecuador

Tener información sobre los conflictos es fundamental para generar bases de datos en donde se determine la frecuencia de los ataques sobre el ganado, las zonas donde se generan los conflictos, la especie causante del ataque y los motivos del ataque. Esto permitirá tomar decisiones acertadas para reducir el número de conflictos, reducir la caza de carnívoros, y, a su vez, minimizar las pérdidas económicas de los ganaderos (Castaño-Uribe et al., 2016). En el país, actualmente se determina la identidad del depredador identificando en conjunto: el tipo de herida, la zona anatómica en donde se produjo, heces de un posible carnívoro y observando huellas de patas en la tierra; lo cual no es eficiente en todos los casos. (Narváez y Zapata-Ríos, 2016).

Los análisis moleculares son técnicas de laboratorio que utilizan el material genético de los seres vivos para extraer información importante con alta confiabilidad (Lai, 2001). Estos análisis pueden ser utilizados para identificar especies de carnívoros y monitorearlas con alto éxito (Wheat et al., 2016). Los marcadores moleculares más utilizados dentro de la ecología son fragmentos de ADN mitocondrial, microsatélites y SNPs (polimorfismos de nucleótidos

únicos). Además, se pueden utilizar técnicas de secuenciación de nueva generación para monitorear a especies animales (Goossens y Salgado-Lynn, 2013). La amplificación de un fragmento utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) entra dentro de los análisis moleculares de bajo costo que facilitan el estudio de las poblaciones animales y a su vez la metodología base de esta investigación. Los análisis mediante PCR pueden partir de muestras de piel, músculo, cabello, sangre, heces o saliva (De Barba et al., 2014).

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en inglés es un proceso en el cual se amplifica un fragmento específico de ADN contenido dentro de una muestra. El proceso necesita de varios reactivos en concentraciones específicas como: agua libre de DNAsas, buffer, $MgCl_2$, dNTPs, primers, ADN polimerasa, la muestra de ADN con el fragmento target y, en algunos casos, ciertos coadyuvantes. (Fumière et al., 2006). Para la amplificación de una región target se necesitan primers específicos, que se unan al ADN base por complementariedad, delimitando el fragmento de interés. Los primers específicos para cada una de las especies se pueden encontrar realizando una revisión bibliográfica o bien diseñándolos *in silico* partiendo de bases de datos de secuenciamiento. Los primers escogidos idealmente deben tener una longitud entre 18 y 22 pares de bases, una concentración GC cercana al 50%, no tener nucleótidos repetidos una alta cantidad de veces y se debe evitar la complementariedad dentro de la secuencia de los primers seleccionados (Al-mohanna, 2014).

METODOLOGÍA

Protocolos de muestreo

Toma de muestras.

Las muestras se recolectaron utilizando dos protocolos diferentes. En el protocolo 1 se obtuvo la muestra de saliva, con un hisopo estéril. El hisopo se dejó secar por 24 horas a temperatura ambiente y se almacenó en un sobre de papel a -20 °C hasta ser utilizado para los análisis moleculares posteriores (Blejwas et al., 2006). Por otro lado para el protocolo 2, el hisopo estéril con el que se obtuvo la muestra de saliva se colocó en un tubo Eppendorf con 500 μ l de etanol al 100% e inmediatamente se almacenó a -20°C (Wheat et al., 2016).

Las muestras de saliva de los diferentes carnívoros se tomaron en tres zoológicos de Ecuador: Zoológico de Guayllabamba en Quito, Zoológico San Martín en Baños, y bioparque Amaru en Cuenca. En el Zoológico de Guayllabamba se tomaron muestras de dos osos andinos, un jaguar y dos pumas, por duplicado y utilizando los dos protocolos previamente descritos. En el caso del puma las muestras se recolectaron de una cabeza de ganado vacuno previamente introducida en su jaula, la cual se presume fue lamada por el carnívoro. En el Zoológico San Martín ubicado en la ciudad de Baños se tomaron muestras de dos osos andinos, dos jaguares y dos pumas, por duplicado y utilizando los dos protocolos previamente descritos. En el caso de un puma las muestras se recolectaron de las heridas del cuerpo de una gallina. En el bioparque Amaru de la ciudad de Cuenca se tomaron muestras de dos osos andinos, dos jaguares y cuatro pumas, por duplicado y utilizando los dos protocolos previamente descritos. Las muestras fueron tomadas por los operarios del bioparque.

En el caso de los perros, al ser animales domesticados, se hizo un hisopado directo del hocico, procurando extraer la mayor cantidad de saliva posible. Se extrajeron las muestras por duplicado para cada protocolo. Para tener un control, también se extrajo ADN de muestras de carne de res adquiridas en un supermercado.

Extracción de ADN

Se utilizó el Kit PureLink Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen para extraer ADN de los hisopados de las muestras de saliva de los animales, y de la muestra de carne de res (ThermoFisher Scientific, 2020). Se realizaron dos eluciones cada una con un volumen de 25 μ l para que el ADN esté lo más concentrado posible. Luego de realizar la extracción de ADN se realizó una cuantificación en un Nanodrop 2000 para obtener la concentración final y los índices de calidad. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, durante 40 minutos a 80 voltios, para analizar la integridad del ADN genómico que se extrajo.

Selección de primers

Se buscaron primers específicos para las cinco especies: oso andino, jaguar, puma, perro y ganado vacuno. Los primers específicos se encontraron mediante una revisión bibliográfica exhaustiva y aquellos seleccionados son los que se observan en la Tabla 1.

Amplificación de regiones específicas

Amplificación región COI Oso Andino.

Se utilizó como base las concentraciones y condiciones de termociclado descritas en Shahzadi et al. (2014) que son: volumen final de la reacción de 25 μ l, 4 μ l de ADN de las muestras, 10 mM de cada primer, 1X de buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 1.5 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador descrito es: denaturación inicial 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 58 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Partiendo de este protocolo inicial, se realizaron modificaciones (gradientes de temperatura, gradiente de concentración de ADN y cambios en la concentración de primers) para establecer las condiciones finales de la PCR estandarizada. Los resultados se revelaron al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Sybr Safe como agente intercalante.

Amplificación región ATP6 en Jaguar.

Se utilizaron las concentraciones y condiciones de termociclado descritas en Haag et al. (2009). El volumen final de la reacción descrita es de 20 μ l, los cuales contienen 2 μ l de ADN de las muestras, 0.2 mM de cada primer, 1X de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.5 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 2 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 90 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 3 minutos. Este protocolo permitió amplificar esta región a partir de muestras de saliva extraídas de jaguar. No existieron modificaciones al protocolo descrito en Haag et al. (2009). Los resultados se revelaron al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Sybr Safe como agente intercalante.

Amplificación región 16S en Puma.

Se utilizaron las concentraciones y condiciones de termociclado descritas en Lang et al. (2013). El volumen final de la reacción descrita es de 50 μ l, los cuales contienen 10 mM de Tris-HCL, 50 mM de KCL, 0.1% de Triton, 2.5 mM de MgCl₂ ADN de las muestras, 0.2 mM de cada primer, 1X de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,3 μ M de cada uno de los 3 primers, 250 μ M de dNTPs y 1 unidad de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 2 minutos a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 94 °C durante 60 segundos, 53 °C durante 90 segundos, 72 °C durante 90 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Se hicieron varios cambios al protocolo inicial para adaptarlo a los reactivos disponibles en el laboratorio. Además se eliminó el primer reverse universal, trabajando únicamente con los primers 16SUF y 16SER. . Los resultados se revelaron al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Sybr Safe como agente intercalante.

Amplificación región Cyt en Perro.

Se utilizaron las concentraciones y condiciones de termociclado descritas en Abdel-Rahman et al. (2009). El volumen final de la reacción multiplex descrita es de 50 μ l, los cuales contienen 25 ng de ADN, 25 μ M de cada primer, 10X de buffer, 0.2 mM de MgCl₂, 0.3 mM de dNTPs y 2 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 4 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 60 segundos, 52 °C durante 60 segundos, 72 °C durante 60 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Se hicieron varios cambios al protocolo inicial para utilizar únicamente un par de primers y no realizar una PCR multiplex como la descrita en el artículo (Abdel-Rahman et al., 2009). Los resultados se revelaron al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Sybr Safe como agente intercalante.

Amplificación región ND5 en Ganado Vacuno.

Se utilizaron las concentraciones y condiciones de termociclado descritas en Motalib et al. (2017). El volumen final de la reacción descrita es de 25 μ l, los cuales contienen 2 μ l de ADN de las muestras, 0.4 mM de cada primer, 5 μ l de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.625 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 3 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 40 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Este protocolo permitió amplificar esta región a partir de muestras de carne de ganado vacuno. No existieron modificaciones al protocolo descrito en Motalib et al. (2017). Los resultados se revelaron al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando Sybr Safe como agente intercalante.

RESULTADOS

Amplificación región CO1 en Oso Andino

Se logró amplificar una banda específica para oso con una longitud de 705pb como se puede observar en la Figura 1. Se estandarizó de esta manera el protocolo de amplificación de la región CO1 en osos andinos partiendo de muestras de saliva.

El volumen final de la reacción fue 25 μ l, que contenía 2 μ l de ADN de las muestras, 0.2 mM de cada primer (CO1F y CO1R), 1X de buffer, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs y 1.5 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 58 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 1 minuto y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Amplificación región ATP6 en Jaguar

Se logró amplificar una banda no específica para jaguar con una longitud de 175pb como podemos observar en la Figura 2. Se estandarizó de esta manera el protocolo de amplificación de la región ATP6 en jaguar partiendo de muestras de saliva. El volumen final de la reacción fue 20 μ l, que contenía 2 μ l de ADN de las muestras, 0.2 mM de cada primer, 1X de buffer, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0.5 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 2 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 55 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 90 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Amplificación región 16S en Puma

Se logró amplificar una banda específica para puma con una longitud de 138pb como se puede observar en la Figura 3. Se estandarizó de esta manera el protocolo de amplificación de la región 16S en puma partiendo de muestras de saliva. El volumen final de la reacción fue 15 μ l, que contenía 3 μ l de ADN de las muestras, 0.5 mM de cada primer, 1X de buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 1 unidad de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 2 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 55

°C durante 45 segundos, 72 °C durante 90 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 3 minutos.

Amplificación región CyT en Perro

Se logró amplificar una banda específica para perro con una longitud de 809pb como podemos observar en la Figura 4. Se estandarizó de esta manera el protocolo de amplificación de la región Cyt en perro partiendo de muestras de saliva. El volumen final de la reacción fue 15 μ l, que contenía 2 μ l de ADN de las muestras, 0.5 mM de cada primer, 1X de buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 1.5 unidades de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 5 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Amplificación región ND5 en Ganado Vacuno

Se logró amplificar una banda específica para perro con una longitud de 106pb como podemos observar en la Figura 5. Se estandarizó de esta manera el protocolo de amplificación de la región ND5 en ganado vacuno partiendo de muestras de carne. El volumen final de la reacción fue 11 μ l, que contenía 2 μ l de ADN de las muestras, 0.5 mM de cada primer, 1X de buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 1 unidad de Taq polimerasa. El protocolo del termociclador fue: denaturación inicial 5 minutos a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos y un paso de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

DISCUSIÓN

Importancia de un método de detección molecular

Los métodos utilizados en Ecuador actualmente para la detección de un carnívoro responsable de un ataque al ganado se basan en analizar: las heces del posible causante del ataque, huellas de patas pertenecientes al depredador, la forma de las heridas y el lugar anatómico donde se las encuentra (Narváez y Zapata-Ríos, 2016). Estos métodos, que se utilizan simultáneamente, no permiten identificar con exactitud qué especie de carnívoro fue la responsable del evento de depredación. Sin embargo, las técnicas moleculares nos brindan la posibilidad de monitorear las poblaciones animales con una mayor eficacia. Específicamente, el uso de la PCR para identificar una especie a partir de una muestra de ADN es altamente confiable (Fumière et al., 2006). Para lograr esta confiabilidad, los primers que se utilizan son fundamentales, porque nos permiten amplificar regiones específicas de la especie. Lo cual se traduce en determinar cual animal es el causante del conflicto de manera más precisa. (Tamay de Dios et al., 2013).

Como fue mencionado anteriormente, el monitoreo de poblaciones animales mediante la detección del causante del ataque utilizando la técnica de PCR tiene una alta confiabilidad. En la mayoría de los estudios reportados se parte de: piel, músculo, cabello sangre o heces para realizar estos análisis moleculares (De Barba et al., 2014). Sin embargo, existen diversas investigaciones en las que se ha utilizado saliva para monitorear poblaciones obteniendo resultados satisfactorios. Un estudio logró utilizar restos de saliva encontrados en salmones que no fueron consumidos en su totalidad para monitorear poblaciones de osos pardos (*Ursus arctos*) (Wheat et al., 2016). En otro estudio que fue realizado en la región escandinava se encontró que a partir de saliva obtenida de las heridas del ganado se podía conocer si el atacante había sido un lobo o un perro (Sundqvist et al., 2008).

Extracción de ADN a partir de muestras de saliva

Los protocolos adecuados de toma de muestras de saliva son fundamentales para obtener material genético de buena calidad y a partir del mismo determinar al depredador de manera confiable. Son diseñados para lograr obtener suficiente ADN y preservarlo en condiciones óptimas para un posterior análisis molecular (Barriga y Hernández, 2016). Los dos protocolos utilizados en este estudio se seleccionaron de publicaciones que obtuvieron buenos resultados usando estas técnicas. Además, fueron probados previamente tomando muestras de saliva de perro y comprobando que se pudo obtener ADN de buena calidad al realizar una amplificación partiendo del protocolo descrito en Galov et al., (2013). Se han logrado amplificaciones exitosas a lo largo del proyecto, sin embargo las concentraciones de ADN se encuentran dentro de un rango entre 0 y 9 ng/ μ l (Tabla 2). Son valores de concentraciones bajas y una de las posibles causas recae sobre la tasa alta de degradación del ADN en saliva. Un estudio en el que se buscaba determinar el tiempo de degradación in sílico del ADN presente en muestras de saliva determinó que es cercano a 5 horas cuando se mantiene una temperatura ambiental de 24 grados centígrados y cercana a las 3 horas cuando la temperatura se mantiene a 37 grados centígrados. Por lo cual, hay que tomar en cuenta las condiciones climáticas a las cuales se toma la muestra (Yao et al., 2016). Se sabe además que la degradación del ADN depende de otros factores como las condiciones de las soluciones de almacenamiento, las posteriores congelaciones y descongelaciones, la humedad, el tiempo de almacenamiento y la metodología de extracción utilizada (Duque-Ortiz et al., 2017).

En el paso de extracción del material genético se utilizó el kit comercial PureLink Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen que permite extraer ADN genómico partiendo de una muestra de saliva con alta confiabilidad (ThermoFisher Scientific, 2020). Este método de extracción nos permite obtener la mayor cantidad de ADN genómico posible de las muestras

de saliva (Restrepo, 2010). Además, permite sugerir que las concentraciones bajas no se deben al paso de extracción sino a la toma de muestras.

Desafíos en la estandarización de protocolos de PCR

La estandarización de protocolos es un proceso en el cual existen dificultades que se tienen que superar. La ausencia de amplificación de la banda deseada y la amplificación de bandas inespecíficas se pueden solucionar mediante gradientes de temperatura de annealing crecientes o decrecientes, gradientes de concentración de $MgCl_2$, y mediante la adición de compuestos como BSA, o coadyuvantes como Tritón (Gene Link, 2014). Los gradientes de temperatura de annealing permiten modificar la tasa a la cual se unen los primers con la secuencia específica dentro del ADN genómico, porque a la temperatura óptima existe la amplificación de la banda deseada sin la formación de uniones inespecíficas entre los primers y el ADN (Naqib et al., 2019). El $MgCl_2$ es un cofactor de la polimerasa y hacer gradientes de este compuesto permite encontrar su concentración óptima. El BSA permite controlar a los inhibidores de la polimerasa y los coadyuvantes como tritón potencian el correcto funcionamiento de esta enzima (Gene Link, 2014). Al probar la especificidad de los primers ATP de jaguar, se observó la amplificación de una muestra de perro. En este caso, si bien se logró la amplificación de bandas en el tamaño esperado, este par de primers no se pueden considerar específicos para jaguar, y por lo tanto, deben reemplazarse (Roques et al., 2011).

Prueba de la metodología en un conflicto real

La metodología nos brinda el resultado esperado en condiciones controladas, ya que la toma de muestras se realiza directamente del hocico del carnívoro o poco tiempo después de que el carnívoro se alimentó de un animal y dejó su saliva impregnada en los restos. A largo plazo, se busca determinar la eficacia de la metodología al tomar muestras de un conflicto real.

Las muestras se tomarían de la herida en el cuerpo del ganado vacuno con la ayuda de la policía ambiental, Luego de tomar las muestras de las heridas del ganado vacuno atacado se deben realizar las ampliaciones ya estandarizadas para determinar el depredador causante del conflicto. Si se logra obtener un resultado satisfactorio significará que la metodología funciona en escenarios reales, y podrá servir para identificar el carnívoro causante de conflictos a nivel nacional (Azuara et al., 2016).

Estrategias para preservación de las especies animales

Luego de estandarizar una metodología que nos permita determinar a las especies causantes del ataque al ganado de una manera confiable, se recomienda incluir esta información en una base de datos (Peek et al., 2012). Esta servirá como un respaldo importante, para conocer con exactitud cuales son los carnívoros responsables de los conflictos con una ubicación espacial y temporal. Con esta información se podrán tomar decisiones acertadas de prevención con el fin de manejar de mejor manera los conflictos. El tener información del carnívoro causante del ataque será útil para estructurar programas de educación para que los dueños del ganado conozcan acerca de quienes son los depredadores de sus animales. Además, si se comprueba que el causante del conflicto es un grupo de perros ferales no existirá necesidad por parte de los dueños del ganado o las comunidades aledañas al sitio del conflicto de cazar a un carnívoro silvestre (Azuara et al., 2016). A largo plazo, se espera que se reduzca la caza de carnívoros silvestres. Estos grandes carnívoros están amenazados en el territorio ecuatoriano, y se espera que esta reducción en la caza ayude las poblaciones de estas especies a recuperarse en número, poder sobrevivir un periodo de tiempo mayor y sigan brindando todos los beneficios ecosistémicos que son necesarios para preservar las maravillas naturales de nuestro país (Relva y Sanguinetti, 2016).

En países como EE.UU, las poblaciones de grandes carnívoros como los osos o lobos han sido muy estudiadas y monitoreadas (Peek et al., 2012) . Se tiene una base de datos importante que se actualiza constantemente, esto permite a las autoridades pertinentes enseñar a los ganaderos a manejar de mejor manera sus animales. Dependiendo de la frecuencia y el riesgo potencial a que ocurra un conflicto se toman medidas para precautelar tanto la vida del ganado como la de los seres humanos que viven y trabajan en zonas ganaderas (Peek et al., 2012). Además, tener esta base de datos es importante para dar a conocer a las personas las cifras reales de los conflictos (Peek et al., 2012). En muchos casos se sobreestima el número real de conflictos y se genera un resentimiento social importante en contra de los grandes carnívoros (Caruso et al., 2018). Una base de datos permite además conocer en qué zonas se generan los conflictos y utilizar esta información como un indicador de que los ecosistemas cercanos a estas zonas tienen un alto grado de estrés antropogénico (Azuara & et.al, 2016).

Conocer más a detalle el desempeño de las poblaciones naturales y la forma en la cual interaccionan con las presiones antropogénicas permite avanzar y diseñar nuevas técnicas de conservación. Para lograr que las decisiones relacionadas a la conservación de especies naturales se necesitan concientizar a la población humana (Castaño-Uribe et al., 2016). Por lo general, se desconoce el potencial que tienen los perros para cazar presas que parecerían muy grandes ya que lo hacen en manada y atacan animales que han perdido el instinto de defensa propia contra los carnívoros. El ganado vacuno ha seguido una línea evolutiva en la que ha perdido habilidades natas de defensa personal, esto se debe a la selección artificial que busca animales aptos para consumo, pero menos aptos para defenderse ante un ataque de un depredador (Valderrama et al., 2016).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Tener un método de detección molecular de carnívoros responsables de ataques al ganado es fundamental ya que puede contribuir a la conservación de especies silvestres y a un mejor manejo de la ganadería en el país. Esta metodología se puede ampliar a otras especies de interés dentro del territorio ecuatoriano. Además, es importante construir una base de datos donde se incluya información sobre los conflictos humano-carnívoro durante un periodo largo de tiempo. Esto nos permitirá conocer de mejor manera el efecto antropogénico sobre las poblaciones de animales silvestres. Las muestras de saliva encontradas en las heridas del ganado atacado deberían ser tomadas por la policía ambiental en un periodo corto de tiempo luego de que el conflicto sea reportado, siguiendo los protocolos establecidos, para evitar la contaminación de las muestras y la degradación del ADN presente en la saliva. Finalmente, se espera lograr resultados exitosos al trabajar en un equipo conformado por investigadores, policía ambiental, comunidades y ciudadanía en general.

TABLAS

Tabla 1. Primers seleccionados

Especie	Región	Primers	Tamaño esperado	Secuencia de los primers	Referencia
Oso	COI	CO1F, CO1R	705 pb	CO1F: TCGTAACTGCCCATGCA	Shahzadi et al., 2014
				CO1R: TATG(A/G)TG(A/G)GCTCA(C/T)ACGA	
Jaguar	ATP6	ATP6F, ATP6R	175 pb	ATP6F: ATGAACGAAAATCTATTCGC	Wang et al., 2018
				ATP6R: CCAGTATTTGTTTTGATGTTAGTTG	
Jaguar	ND5	ND5F, ND5R	147 pb	ND5F: TCCGGCTATAGTATTTATTTCTTCC	Roques et al., 2011
				(Específico jaguar)	
Jaguar	16S	16SUF, 16SER	138 pb	ND5R: YGTAGCACTTTKYGTCACATGA	Duing Lang et al., 2013
				(Universal felinos)	
Puma	ND5	ND5UF, ND5ER	113 pb	16SF: AGAGACCCATAATTTTC (Específico)	Roques et al., 2011
				16SR: GGGTAACTTGTTCCGTTGATC (universal)	
Puma	ND5	ND5UF, ND5ER	113 pb	ND5F: GCAGTCATCTCAAAGTACTGACTG	Roques et al., 2011
				(Específico jaguar)	
Puma	ND5	ND5UF, ND5ER	113 pb	ND5R: YGTAGCACTTTKYGTCACATGA	Roques et al., 2011
				(Universal felinos)	

Perro	ZFy	ZFyF, ZFyR	242 pb	YintF: GCACTGCTAAATCAACCAC	Galov et al., 2013
				YintR: CAAGTTCTGCTTTGGTTCT	
	Cyt	CytF, CytR	809 pb	CytF: GGAGTATGCTTGATTCTACAG	Abdel- Rahman at al., 2009
				CytR: AGAAGTG GAATGAAT GCC	
Ganado	ND5	ND5F, ND5R	106 pb	ND5F: GTTTCATTTTAGCAATAGCATGG	Motalib et al., 2017
				(Específico vaca)	
				ND5R: TCCAATCAAGGGTATGTTTGAG	
				(Específico vaca)	

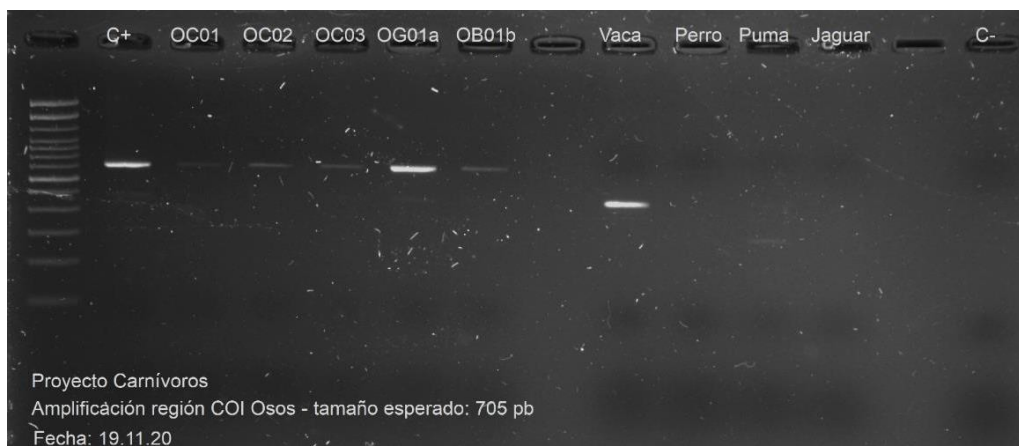
Tabla 2. Concentraciones de ADN Nanodrop 2000

#	ID muestra Baños	Concentración (ng/ul)	260nm/ 280nm	260nm/ 230nm
1	OB001(a)	0,4	-1,42	12,97
2	OB001(a)*	2,3	2,13	0,30
3	OB002 (a)	0,6	-0,52	2,35
4	OB002(a)*	0,2	-0,18	-0,23
5	OB001 (b)	7,1	0,66	0,08
6	OB001 (b)*	6,5	1,05	0,16
7	OB002 (b)	9,1	0,68	0,10

8	OB002 (b)*	5,3	0,78	0,10
9	PB001(a)	0,3	1,21	-0,29
10	PB001(a)*	1,2	2,68	0,23
11	PB002 (a)	1,1	2,32	0,24
12	PB002(a)*	0,5	1,22	0,11
13	PB001 (b)	4,4	1,53	0,31
14	PB001 (b)*	1,3	2,42	0,31
15	PB002 (b)	4,3	1,97	1,48
16	PB002 (b)*	3,8	2,14	0,34
17	JB001 (a)	3,0	0,71	0,09
18	JB001 (a)*	0,9	1,71	0,2
19	JB001 (b)	1,5	0,85	0,07
20	JB001 (b)*	1,3	1,75	0,15

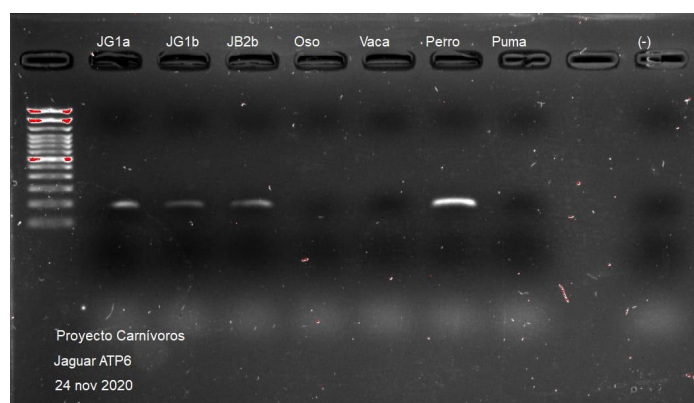
*Toma de muestra repetida, mismo protocolo especie y lugar

FIGURAS



Fuente: Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la amplificación de la región COI (primers: COIF / COIR), específica para osos. En la figura se observan bandas en 705 pb específicas para osos. Las bandas observadas en vaca y puma se encuentran por debajo de los 500 pb. Ladder: 100 bp (Invitrogen).



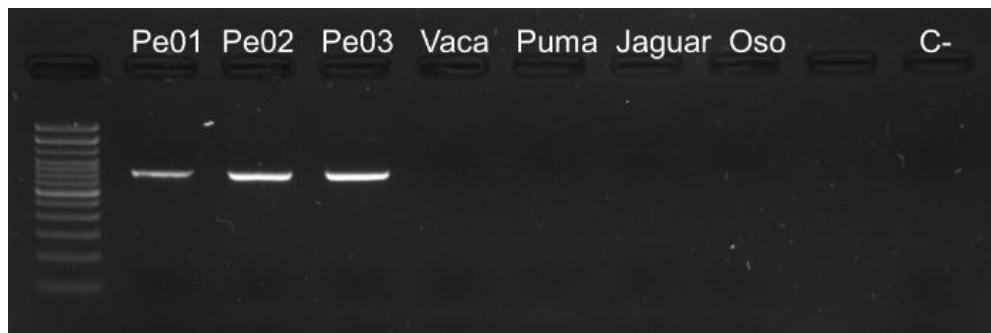
Fuente: Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la amplificación de la región ATP6 (primers ATP6F / ATP6R), específica para jaguar. En la figura se observan bandas en 175 pb. Se obtuvo amplificación de la banda en muestras de jaguar y perro. Ladder: 100 bp (Invitrogen).



Fuente: Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la amplificación de la región 16S (primers: 16SF / 16SR), específica para pumas. En la figura se observan bandas en 138 pb específicas para pumas. Ladder: 100 bp (Invitrogen).



Fuente: Laboratorio de Biotecnología Vegetal USFQ

Figura 4 . Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la amplificación de la región CytF (primers: CytF / CytR), específica para perros. En la figura se observan bandas en 809 pb específicas para perros. Ladder: 100 bp (Invitrogen).

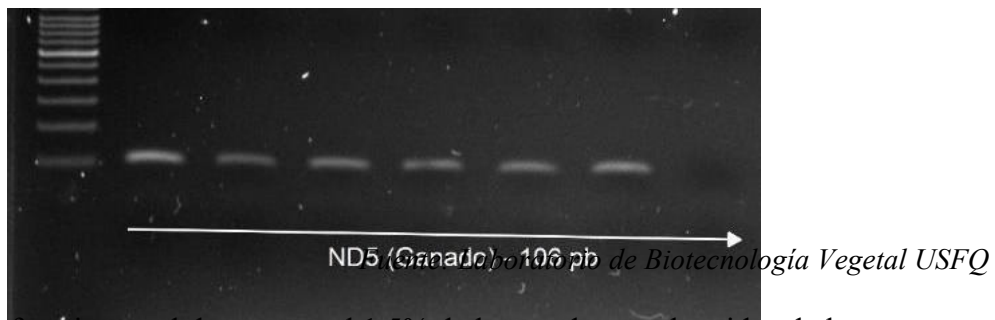


Figura 5 . Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos obtenidos de la amplificación de la región ND5 (primers: ND5F / ND5R), específica vaca. En la figura se observan bandas en 106 pb específicas para vaca. Ladder: 100 bp (Invitrogen).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Rahman, S., El-Saadani, M., Ashry, K., & Haggag, A. (2009). Detection of Adulteration and Identification of Cat's, Dog's, Donkey's and Horse's Meat Using Species-Specific PCR and PCR-RFLP Techniques. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1716-1719.
- Al-mohanna, M. (2014). GUIDELINES FOR DESIGNING PRIMERS. .
- Anaya-Zamora, V., López-González, P., & Pineda-López, R. (2017). Factores Asociados en el Conflicto Humano-Carnívoro en un Área Natural Protegida del Centro de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 381-393.
- Azuara, D., & et.al. (2016). PROTOCOLO DE ATENCIÓN A CONFLICTOS CON FELINOS SILVESTRES POR DEPREDACIÓN DE GANADO. *Gobierno Federal de México*.
- Barba, E. (2017). ESTIMACIÓN POBLACIONAL DE PERROS CALLEJEROS EN 20 SECTORES CENSALES DEL SUR DE QUITO POR MEDIO DE UN MUESTREO CENSAL CON EL MÉTODO CAPTURA Y RECAPTURA. *UDLA-FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD*.
- Barrera, G., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P., Guzmán, C., & Villamizar, L. (2016). Real Time PCR: a useful methodology for detection and quantitation of granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24-31.
- Barriga, A., & Hernández, S. (2016). Utilidad de las muestras de saliva en el diagnóstico por el laboratorio. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*, 13-18.
- Barroso, A., Dunner, S., & Cañón, J. (1998). Detection of Bovine Kappa-Casein variants A, B, C y E by means of Polymerase Chain Reaction-single strand Conformation Polymorphism . *J. Anim. Sci.*, 1535-1538.
- Blejwas, K., Williams, C., Shin, G., McCollough, D., & Jaeger, M. (2006). Salivary DNA Evidence Convicts Breeding Male Coyotes of Killing Sheep. *Journal of Wildlife Management* , 1087-1093.
- Boitani, L., & Ciucci, P. (2010). Comparative social ecology of feral dogs and wolves. *Ethology Ecology & Evolution*.
- Bonacic, C. (2007). EVALUACIÓN DEL CONFLICTO ENTRE CARNÍVOROS SILVESTRES Y GANADERÍA. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE* .
- Cadena, G. (2013). Estudio para la estimación de la población de perros callejeros en Mercados Municipales del Distrito Metropolitano de Quito. DMQ.
- Caruso, M., Altrichter, M., & Tálamo, A. (2018). Situación del Jaguar (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) y el papel de las áreas protegidas en la conservación de la especie. *FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES UNIVERSIDAD NACIONAL DE SALTA*.
- Castaño-Urbe, C., Lasso, C., Hoogesteijn, R., Diaz-Pulido, A., & Payán, E. (2016). *CONFLICTOS ENTRE FELINOS Y HUMANOS EN AMÉRICA LATINA*. Colombia: Instituto Humbolt.
- Castellanos, A., & Laguna, A. (2011). Suggestions for Mitigating Cattle Depredation and Resulting Human-Bear Conflicts in Ecuador. *International Bear News*.
- Castellanos, A., Torres, A., & Peñafiel, M. (2005). Conflictos de los sistemas productivos con biodiversidad: Estudio de caso: Depredación a ganado vacuno por oso Andino (*Tremarctos ornatus*) en la Cuenca del río Cosanga, Ecuador.
- Código Orgánico del Ambiente. (2017).
- De Barba, M., Adams, J., Goldberg, C., Stansbury, C., Arias, D., Cisneros, R., & Waits, L. (2014). Molecular species identification for multiple carnivores. *Conservation Genetics Resources*, 821–824.

- Espinosa, S., Albuja, L., Tirira, D., Zapata-Ríos, G., Araguillin, E., Utreras, V., & Noss, A. (2016). Análisis del estado de conservación del jaguar en Ecuador. . 319-338.
- Figueroa, S. (2019). *INTERACCIONES ENTRE EL SER HUMANO Y EL JAGUAR (PANTHERA ONCA) QUE AMENAZAN SU SOBREVIVENCIA A LARGO PLAZO EN LA AMAZONÍA DEL ECUADOR*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Fumière, O., Dubois, M., Baeten, V., Holst, C., & Berben, G. (2006). Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. . *Analytical and bioanalytical chemistry.*, 1045-1054.
- Galov, A., Sindičić, M., Gomerčić, T., Arbanasić, H., Baburić, M., Škrivanko, M., & Tihomir, F. (2013). PCR-based Y chromosome marker for discriminating between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis lupus familiaris*) paternal ancestry. *Conservation Genetics Resources*, 275-277.
- Gene Link. (2014). PCR Additives & Enhancers.
- González, P. (2019). Ataques de perros a ganado doméstico.
- Goossens, B., & Salgado-Lynn, M. (2013). Advances and difficulties of molecular tools for carnivore conservation in the tropics.43-53. . *Raffles Bulletin of Zoology*, 43-53.
- Guerra-Vargas, L., & Mancera-Pineda, J. (2015). EVALUACIÓN DE AMENAZAS ANTROPOGÉNICAS EN ECOSISTEMAS DE PLAYA EN SAN ANDRÉS, UNA ISLA PEQUEÑA DEL CARIBE SUROCCIDENTAL. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 33-54.
- Haag, T., Santos, A., De Angelo, C., Srbek-Araujo, A., Sana, D., Morato, R., . . . Eizirik, E. (2009). Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. *Genetica*, 505–512.
- Harms, V., Nowak, C., Carl, S., & Muñoz-Fuentes, V. (2015). Experimental evaluation of genetic predator identification from saliva traces on wildlife kills. *Journal of Mammalogy*, 138–143.
- Koster, J. (2009). Hunting Dogs in the Lowland Neotropics. *Journal of Anthropological Research*.
- La Casa, M., & Lozano, J. (2016). *El libro de los carnívoros*. Barcelona: Photodigiscoping.
- Lai, M. (2001). Basic Molecular Biology Techniques. Methods in molecular medicine. .
- Lang, L. D., Tessier, N., Gauthier, M., Wissink, R., Jolicoeur, H., & Lapointe, F.-J. (2013). Genetic Confirmation of Cougars (*Puma concolor*) in Eastern Canada. *Northeastern Naturalist*, 383-396.
- Laundré, J., & Hernández, L. (2010). What We Know about Pumas in Latin America.
- Motalib, M., Eaqub, M., Abd, S., Shuhaimi, A., Mohd, M., & Zaidul, I. (2016). Targeting double genes in multiplex PCR for discriminating bovine, buffalo and porcine materials in food chain. *Elsevier*, 175-184.
- Naranjo, E., & Dirzo, R. (2009). Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna. *México D.F.*, 247-276.
- Narváez, V., & Zapata-Ríos, G. (2016). *Guía para la identificación de ataques a animales domésticos causados por carnívoros grandes*. Quito: Ministerio del Ambiente y Wild Live Conservation Society.
- Peek, J., Dale, B., Mahoney, S., Hristienko, H., & Murray, D. (2012). Management of Large Mammalian Carnivores in North America. *The Wildlife Society*.
- Perez, A. (2010). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). *Universidad politécnica de Valencia*.
- Relva, M., & Sanguinetti, J. (2016). ECOLOGÍA, IMPACTO Y MANEJO DEL CIERVO COLORADO (*Cervus elaphus*) EN EL NOROESTE DE LA PATAGONIA, ARGENTINA. *Mastozoología Neotropical*, 221-238.

- Restrepo, L. (2010). Estandarización y optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de heces de ocelote. *Pontificia Universidad Javeriana*.
- Roques, S., Adrados, B., Chávez, C., Keller, C., Magnusson, W., Palomares, F., & Godoy, J. (2011). Identification of neotropical felid faeces using RCP-PCR. *Molecular Ecology Resources*, 171-175.
- Shahzadi, I., Janjua, S., Abbas, F., & Galbreath, G. (2014). A universal primer set to amplify the cytochrome c oxidase subunit gene in bears. *Ursus*, 74-78.
- Sundqvist, A., Ellegren, H., & Vilà, C. (2008). Wolf or dog? Genetic identification of predators from saliva collected around bite wounds on prey. *Conservation Genetics*, 1275-1279.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (s.f.).
- ThermoFisher Scientific. (24 de 04 de 2020). Obtenido de Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Mini Kit:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K182001#/K182001>
- Tirira, D. (2001). *LIBRO ROJO DE LOS MAMÍFEROS DEL ECUADOR*. Quito.
- Tirira, D. (2011). *Libro Rojo de los Mamíferos*. Quito: Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- Torres-Romero, E., Espinoza-Medinilla, E., López-Bao, J., & Palomares, F. (2019). Fecal DNA analysis to identify feline species in Los Ocotones, Chiapas, Mexico. *Ecosist. Recur. Agropec.*, 167-173.
- Valderrama, C., Hoogesteijn, R., & Payán, E. (2016). Manual de campo para el manejo del conflicto entre humanos y felinos. *Panthera y USFWS*, 81.
- Wheat, R., Allen, J., Miller, S., Wilmers, C., & Levi, T. (2016). Environmental DNA from Residual Saliva for Efficient Noninvasive Genetic Monitoring of Brown Bears (*Ursus arctos*). *PLoS One*.
- Yao, W., Mei, C., Nan, X., & Hui, L. (2016). Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Elsevier*, 142-148.