

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**ESCATOLOGÍA MOLECULAR EN *Lagothrix lagotricha* (Primates: Platyrrhini):
UN MÉTODO NO INVASIVO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN**

Rosana Segovia

**Proyecto final presentado como requisito para la obtención del título de Bachelor in
Science**

Quito

Febrero de 2006

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias de la Vida**

HOJA DE APROBACIÓN DE PROYECTO FINAL

**ESCATOLOGÍA MOLECULAR EN *Lagothrix lagotricha* (Primates: Platyrrhini):
UN MÉTODO NO INVASIVO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN**

Rosana Segovia

**Nombre, título académico: Dr. Gabriel Trueba
Director de proyecto final**

**Nombre, título académico: Dra. Lourdes Torres
Miembro del Comité de proyecto final**

**Nombre, título académico: Dr. David Romo
Miembro del Comité de proyecto final**

Quito, Febrero de 2006

© Derechos de autor

Rosana Soledad Segovia Limaico

2006

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Colegio de Ciencias de la Vida, en especial a Venancio Arhana, David Romo, Consuelo de Romo, Estela de la Torre, María de Lourdes Torres y Gabriel Trueba, por haber contribuido a la culminación de una etapa importante en mi vida profesional. Agradezco a todo el personal de la Estación de Biodiversidad Tiptuni por su hospitalidad y por facilitar la colección de muestras para este proyecto, a todo el personal que trabaja en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito por haberme dado un espacio para trabajar en la investigación. Un agradecimiento especial para Anthony Di Fiore en la Universidad de Nueva York por su irremplazable guía. Finalmente agradezco a mi familia y a Juan Andino por su apoyo incondicional.

Resumen

Lagothrix lagotricha es una especie de primate que se conoce como “mono lanudo” o “chorongo”. Esta especie se encuentra distribuida en la Amazonía ecuatoriana. Debido a varios problemas en su hábitat como la deforestación, la fragmentación y ser víctimas de la constante caza por su gran tamaño y valor proteico, los chorongos pueden ser una especie vulnerable a extinguirse. Por lo tanto, estudios de conservación son importantes y contribuirían al mantenimiento de la especie. El objetivo de este trabajo fue emplear un muestreo no invasivo, por medio de la colección de heces, para extraer ADN de estos primates, amplificarlo mediante PCR y obtener información molecular. Se quiso demostrar que para realizar un estudio molecular de estos animales vulnerables, no se necesita utilizar métodos que puedan alterarlos.

Las heces colectadas se preservaron en metanol 96%. El ADN de las heces se extrajo con el kit comercial de extracción “QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit” de QIAGEN. Se utilizó dos tipos de “primers” para obtener información molecular: el primero para amplificar una región de ADN mitocondrial de aproximadamente 600 bp que se podía dividir en tres fragmentos, y el otro para amplificar microsatélites.

Se estableció un protocolo de colección de heces y de extracción de ADN. Se logró la amplificación de ADN mitocondrial en un 60% de las muestras, pero no se consiguió la amplificación de microsatélites. Se amplificó ADN de *Lagothrix lagotricha*, sin embargo no se pudo identificar individuos de la población. Cuando se trabaja con escatología molecular, la amplificación depende del método de preservación de las heces, del tamaño del producto del PCR, y si se ensaya con ADN nuclear o mitocondrial. Existen tres razones por las que se piensa que las muestras de ADN extraído en esta investigación no amplificó:

el tiempo que pasó entre la colección de muestras y la extracción de ADN fue muy largo, el número de células rectales remanentes pudo haber sido muy bajo, o pudo haber un componente en la dieta de los monos que interfirió en la ejecución de las técnicas moleculares empleadas. Los experimentos se ensayaron con muy pocos “primers” para amplificar microsátélites. Se puede concluir que se necesitan repetir los ensayos realizados en esta investigación con una mayor muestra para establecer un protocolo válido. Se recomienda probar otros métodos de preservación de heces de *Lagothrix lagotricha*, extraer el ADN de las heces lo más pronto posible y realizar varias extracciones de ADN de una o varias muestras de heces por individuo.

Abstract

Lagothrix lagotricha is a primate species known as “woolly monkey” or “chorongo”. This species is distributed in Amazonian Ecuador. Due to various problems in their habitat, such as deforestation, fragmentation, and being victims of constant poaching because of their great size and protein value, the woolly monkey can be a species vulnerable to extinction. Thus, conservation studies are important and contribute to preserving the species. The objective of this study was to employ a non-invasive sample, through a collection of faeces, in order to extract DNA from these primates, amplify it through PCR and obtain molecular information. This was to demonstrate that in order to carry out a molecular study of these vulnerable animals, it is not necessary to use methods that could disturb them.

The collected faeces were preserved in 96% methanol. DNA of the faeces was extracted using the commercial extraction kit “QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit” from QIAGEN. Two types of primers were used to obtain molecular data: the first to amplify one region of mitochondrial DNA of approximately 600 bp which could be divided into three fragments, and the second to amplify microsatellites.

A collection protocol was established for fecal and DNA extraction. The amplification of mitochondrial DNA was obtained in 60% of the samples but, amplification with the microsatellites was not obtained. Although DNA from *Lagothrix lagotricha* was amplified, individuals of the population were not identified. When working with molecular scatology, amplification depends on the preservation method of the faeces, the product size of the PCR, and whether the experiment tests with nuclear DNA or mitochondrial DNA. Three reasons could explain why the DNA samples extracted in this study were not amplified: the time that passed between the collection of the sample and the DNA extraction was too long, the number of remaining rectal cells could have been too low, or a component in the monkeys' diet could have interfered in the execution of the molecular techniques employed. Furthermore, the experiments were tested with a low number of primers to amplify microsatellites. It can be concluded that the experiments done in the

investigation need to be repeated with a higher number of samples in order to establish a valid protocol. It is recommended that other preservation methods of *Lagothrix lagotricha* faeces are tested, that fecal DNA is extracted as soon as possible after collection, and that various DNA extractions are carried out from one or more fecal samples per individual.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN DE <i>LAGOTHRIX LAGOTRICA</i> EN EL ECUADOR	1
1.2. AMENAZAS DEL CHORONGO	3
1.3. EL USO DE TÉCNICAS MOLECULARES NO INVASIVAS EN MAMÍFEROS SILVESTRES	6
1.3.1. <i>El uso de marcadores moleculares para analizar ADN mitocondrial</i>	7
1.3.2. <i>El uso de microsatélites para obtener la identidad de un individuo</i>	7
2. OBJETIVOS	7
2.1. OBJETIVO GENERAL	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
3. ÁREA DE ESTUDIO	8
4. MATERIALES Y METODOS	8
4.1. MATERIALES	8
4.1.1. <i>Para coleccionar heces de los chorongos</i>	8
4.1.2. <i>Para extraer ADN de las heces</i>	8
4.1.3. <i>Para amplificar ADN de las muestras de heces por PCR</i>	9
4.2. MÉTODOS	10
4.2.1. <i>Colección de muestras en el campo</i>	10
4.2.2. <i>Extracción de ADN de las muestras de heces</i>	11
4.2.3. <i>Amplificación de una región de ADN mitocondrial mediante PCR</i>	12
4.2.4. <i>Amplificación de microsatélites mediante PCR</i>	13
5. RESULTADOS	15
5.1. COLECCIÓN DE HECES Y EXTRACCIÓN DE ADN	15
5.2. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	15
5.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	17
6. DISCUSIÓN	17
6.1. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE ADN MITOCONDRIAL	18
6.2. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	20
7. CONCLUSIONES	20
8. RECOMENDACIONES	21
BIBLIOGRAFÍA	23
TABLAS	25
TABLA 1. TAMAÑOS ESPERADOS DE LA REGIÓN COMPLETA DE ADN MITOCONDRIAL Y DE SUS CORRESPONDIENTES TRES FRAGMENTOS.	25
TABLA 2. LOS CUATRO “PRIMERS” UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES DE ADN EXTRAÍDO DE LAS HECES DE <i>LAGOTHRIX LAGOTRICA</i> .	25
TABLA 3. COMPONENTES DE LA MEZCLA NECESARIA PARA REALIZAR PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES DE <i>LAGOTHRIX LAGOTRICA</i> .	25
TABLA 4. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES DE <i>LAGOTHRIX LAGOTRICA</i> .	25
FIGURAS	26
FIGURA 1. FOTOS DE <i>LAGOTHRIX LAGOTRICA</i> .	26
FIGURA 2. MAPA DE LA LOCALIZACIÓN DEL CHORONGO EN EL ECUADOR (TIRIRA, 2001).	27
FIGURA 3. UBICACIÓN APROXIMADA DE LOS SITIOS DE MUESTREO.	28
FIGURA 4. NÚMERO DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN DE ADN MITOCONDRIAL QUE SE AMPLIFICARON POR MUESTRA PROVENIENTE DEL AÑO 2003.	29

FIGURA 5. NÚMERO DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN DE ADN MITOCONDRIAL QUE SE AMPLIFICARON POR MUESTRA PROVENIENTE DEL AÑO 2001. -----	30
FIGURA 6. PORCENTAJE DE AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL. -----	31
FIGURA 7. AMPLIFICACIÓN DE ADN MITOCONDRIAL UTILIZANDO puRe TAQ READY- To - Go PCR BEADS®. -----	33
FIGURA 8. PORCENTAJE DE AMPLIFICACIÓN DE LOS CUATRO FRAGMENTOS DE ADN MITOCONDRIAL. -----	34
FIGURA 9. PORCENTAJE DE REACCIONES DE PCR POSITIVAS PARA ADN MITOCONDRIAL. -----	35
FIGURA 10. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES UTILIZANDO puRe TAQ READY- To - Go PCR BEADS®. -----	36
FIGURA 11. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES UTILIZANDO puRe TAQ READY- To - Go PCR BEADS®, DESPUÉS DE AUMENTAR LA TEMPERATURA DE “ANNEALING”. -----	37
FIGURA 12. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES A PARTIR DE LA MEZCLA DE COMPONENTES. -----	38
ANEXOS -----	39
ANEXO 1. INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS A LAS QUE SE LES EXTRAJO ADN. -----	39
ANEXO 2. INFORMACIÓN DE LAS VEINTE MUESTRAS ANALIZADAS POR PCR. -----	40

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características y distribución de *Lagothrix lagotricha* en el Ecuador

El género *Lagothrix* comprende dos especies: *Lagothrix lagotricha* y *Lagothrix flavicauda*. *L. lagotricha* es conocida como mono lanudo (Humboldt's woolly monkey), o chorongo. Según Fooden (1963) existen cuatro subespecies que se diferencian por sus pelajes: *L. l.lagotricha*, *L. l.cana*, *L. l.lugens* y *L. l poeppigii* (Ramírez, 1988). En el Ecuador se sabe con seguridad que la subespecie que habita la Amazonía es *L. l. poeppigii* (Di Fiore, 1997), aunque podría existir otra subespecie más (S. de la Torre, com. pers.).

Este género de primates se caracteriza por ser grandes y robustos. El color del pelaje de *Lagothrix lagotricha* es café pálido o gris y puede llegar a ser oscuro. El tamaño de la cabeza con el cuerpo es por lo menos 390mm y llegan a medir máximo 580 mm; la cola puede llegar a ser hasta 1.5 veces del tamaño de la cabeza con el cuerpo. *Lagothrix* muestra algunos aspectos de dimorfismo sexual. Los machos tienen el cuerpo y la cabeza más grandes que las hembras, mientras que las hembras tienen la cola más larga. En los machos, la franja en medio del vientre es más larga, gruesa y oscura. Los caninos de los machos son tres veces más largos que sus incisivos, mientras que en las hembras los caninos alcanzan a ser máximo el doble de largo que los incisivos. (Ramírez, 1988) (Figura 1).

En el Ecuador, los chorongos habitan en el trópico y subtrópico amazónico bajo los 1800 metros sobre el nivel del mar. Los registros tienen información de su localización en los Parques Nacionales Sumaco Napo – Galeras y Yasuní, la parte baja de la Reserva Ecológica Cayambe – Coca, la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno, en el sector de Coangos y en la zona del río Nangaritza (Tirira, 2001) (Figura 2).

Los chorongos son arbóreos y rara vez bajan al suelo. Al parecer, ellos prefieren bosques húmedos y continuos por lo que son muy vulnerables a la destrucción o

perturbación de los mismos. Se ha encontrado que en el norte de Colombia, los chorongos no existían en restos forestales de menos de dos km² o en áreas de bosque secundario. Algunos investigadores comprobaron que estos monos viven en bosque primario sin ninguna o muy vaga perturbación y nunca se encuentran en bosques secundarios (Hernández – Camacho y Cooper, 1976, en Ramírez, 1988). Existen algunos datos que indican que los chorongos prefieren vivir en sitios con alta diversidad de plantas (Ramírez, 1988).

Durham (1975) indicó que los chorongos en Perú se agregan en grupos temporales de más de 51 individuos y luego se dividen en subgrupos temporales que permanecen separados del resto del grupo por más de dos horas. Los subgrupos están compuestos de hasta seis individuos que se mueven y comen en conjunto, y no existe contacto visual con los otros subgrupos. Después de dos horas o más empiezan a emitir sonidos y se mueven en dirección al sitio de donde partieron originalmente (Ramírez, 1988).

A pesar de la limitada información acerca de la dieta, se sabe que el género *Lagothrix* es básicamente frugívoro. Los chorongos se alimentan frecuentemente de hojas y restos de hojas; algunas veces comen cortezas, flores, néctar, y también se ha encontrado invertebrados en sus estómagos. Hay evidencia de que se alimentan de hojas en temporada húmeda o cuando las frutas están menos disponibles. Al parecer el agua que necesitan proviene de las frutas o la toman de las bromelias (Ramírez, 1988).

La mayoría de frutas de las que se alimentan los monos son ingeridas completamente (incluidas las semillas). Existen casos en los que se han encontrado en los estómagos de los chorongos semillas de diferentes frutos y algunas de estas han alcanzado los 2 cm de diámetro. Las observaciones sugieren que las semillas son un componente muy importante en el estómago y por eso estos primates son dispersores de semillas para ciertas especie de árboles (Ramírez, 1988).

Aunque nunca se ha visto que los chorongos ingieran invertebrados en la selva, se ha detectado la presencia de estos organismos en sus estómagos. Muchas veces se ha observado en monos de reservas que buscan insectos y arañas bajo cortezas u hojas muertas para comerlas (Ramírez, 1988).

Otras observaciones muestran que los alimentos se comparten entre los individuos que están dentro del grupo sin importar la edad, el sexo o la clase; por ejemplo, los cazadores locales de Caquetá han indicado que *Ateles* sp. y *L. lagotricha* se alimentan simultáneamente en árboles altos (Ramírez, 1988).

En el Ecuador hay muy pocos estudios acerca de esta especie, únicamente se ha conocido el trabajo de Anthony Di Fiore (1997), quién investiga el comportamiento, la distribución del tiempo en distintas actividades y la organización social en el grupo de chorongos del Parque Nacional Yasuní. Adicionalmente en el 2004, este investigador, publicó un trabajo en el cual identificó siete loci de microsatélites para *Lagothrix lagotricha* y probó la utilidad de éstos para amplificar ADN de otros primates del Nuevo Mundo (Di Fiore, 2004). Existen investigaciones que tienen datos poblacionales de los chorongos en Colombia, Brasil, Venezuela, pero no existen datos de este tipo en nuestro país.

1.2. Amenazas del chorongo

De acuerdo con el estudio de Carlos Peres (1990), la gente que habita ciertas zonas de la Amazonía brasileña subsiste de la caza de animales como fuente de proteínas. Las presas que escogen dependen del tamaño, el sabor, y la facilidad para obtenerla. Son más provechosas cuando son grandes debido a la mayor cantidad de carne que se puede obtener de ella. Los primates son una importante fuente de proteínas para grupos indígenas y colonizadores de la Amazonía brasileña. La carne no consumida por la comunidad, es

salada para posteriormente ser vendida en el pueblo. Según el artículo, una sola familia, con 3 cazadores con sus mujeres e hijos, puede matar más de 200 chorongos en un año.

Los resultados de la investigación de Carlos Peres (1990) sugieren que *Lagothrix lagotricha* constituye uno de los principales blancos para los cazadores. Las hembras de la especie con sus crías en la espalda, son los blancos preferidos debido a que se consume la carne de la madre y la cría se comercializa como mascota. El chorongo tiene una desventaja particular: debido a que vive en grupos grandes, basta un encuentro con uno o varios cazadores para que se destruya una gran parte de la población local. Esta especie de monos, junto con los monos araña, son difíciles de encontrar o están localmente extintos en algunos lugares de la Amazonía brasileña.

De acuerdo a Tirira (2001), el chorongo es el primate más cazado de la Amazonía ecuatoriana, debido a su tamaño y a la calidad de su carne considerada como la mejor de todos los monos amazónicos. Este mamífero no soporta la presión por cacería y por esta razón tiende a desaparecer en los sitios de alta caza. Otro factor que causa la fragmentación de sus poblaciones y su desaparición de áreas donde habitan, constituye la deforestación; el chorongo es intolerante a zonas de vegetación alterada debido a su dependencia para su alimentación del bosque primario. Adicionalmente, el chorongo ocupa el segundo lugar en especies de monos más encontradas en estado de cautiverio ya que se las comercializa sobre todo como mascotas.

La capacidad de la población de chorongos para recuperarse por la presión que ejerce la caza se ve afectada por las diferentes tasas de reproducción, abundancia y distribución de la población. Los primates grandes, como en el caso de los chorongos, tienen bajas tasas de reproducción. No todas las hembras maduras se encuentran activas reproductivamente al mismo tiempo por los complejos patrones que estructuran al grupo. Las hembras adquieren su madurez sexual a los cuatro años cuando empiezan a menstruar.

El período menstrual se da cada tres semanas y dura aproximadamente tres o cuatro días. El período de gestación dura de siete a siete meses y medio; el tiempo entre un nacimiento y el siguiente varía entre 12 a 24 meses y se encuentra relacionado con el tiempo de cuidado al recién nacido (Ramírez, 1988). Es decir, una hembra tendrá su primera cría a partir de los cuatro años cuando adquiera su madurez sexual y su segunda cría nacerá dos años después de la primera, cuando la madre tenga seis o siete años de edad. Si a esto se le suma la presión excesiva de la caza, es muy difícil mantener el equilibrio de las poblaciones de esta especie (Peres, 1990).

Al igual que en la Amazonía de Brasil, los chorongos del Ecuador se ven afectados por la cacería, deforestación y por su comercialización. Las poblaciones de estos primates se ven severamente fragmentadas, es notoria la desaparición de los chorongos en áreas donde se conocía su presencia. Por eso, internacionalmente la UICN la considera como una especie vulnerable (Tirira, 2001).

En términos de conservación, las poblaciones pequeñas, como lo serían las poblaciones decrecientes de chorongos en el Ecuador, disminuyen rápidamente en abundancia y se extinguen localmente. Esto ocurre debido a problemas genéticos como consecuencia de la pérdida de variabilidad genética, la endogamia y la deriva genética. La pérdida de variabilidad genética en una población pequeña limita la respuesta de la población a cambios a largo plazo en el medio, lo que conlleva a su extinción. En las poblaciones pequeñas, las frecuencias de los alelos pierden el equilibrio de una generación a otra ya que dependen de los individuos que produzcan descendencia. Cuando el tamaño de la población es reducido, las parejas reproductoras son limitadas lo que conlleva a la endogamia que se refiere al apareamiento entre parientes cercanos. Adicionalmente ocurren variaciones demográficas por variaciones aleatorias en las tasas de natalidad y mortalidad. Finalmente existen fluctuaciones ambientales debido a variaciones en la

depredación, competencia, incidencia de enfermedades y disponibilidad de alimento, así como catástrofes que ocurren irregularmente como sequías, inundaciones o incendios. Si una especie se extingue, la información genética que esta contenía y su combinación de características particulares se pierden para siempre (Primack y Ros, 2002).

1.3. El uso de técnicas moleculares no invasivas en mamíferos silvestres

Se ha dado un aumento en el empleo de técnicas moleculares no invasivas para estudiar mamíferos silvestres (M. A. J. Frantzen et al, 1998). Estudios recientes han demostrado que las especies, sexo e identidad de un animal pueden deducirse por medio de un análisis genético de sus heces con adecuados marcadores de ADN y así obtener información genética dentro de una población como es la variabilidad genética (Fedriani y Kohn, 2001). Las heces contienen células recogidas del recto, por lo tanto contiene ADN del organismo que defeca. Existen estudios que han extraído ADN de muestras de heces en osos pardos italianos, y en primates como babuinos y bonobos, para estudiar parentescos y variación genética de las poblaciones. Estos estudios usan técnicas de escatología molecular que se basan en el empleo del PCR para amplificar una región de ADN específico del individuo de estudio. Debido a que el PCR amplifica una cantidad pequeña de ADN, esta técnica es muy útil en casos donde la muestra de ADN es pequeña, vieja, degradada o contaminada en alguna forma y permite que la misma muestra de ADN pueda ser probada en repetidas ocasiones (Reed et al, 1997). Con esta metodología, se puede hacer un muestreo de un amplio número de individuos varias veces y a través de sus condiciones ecológicas naturales. Además este método no invasivo representa un avance significativo sobre metodologías que muchas veces requiere de capturas de animales o que ellos ingieran carnadas, y sobre otros métodos que recaen en una observación o muestreo esporádico (Fedriani y Kohn, 2001).

1.3.1. El uso de marcadores moleculares para analizar ADN mitocondrial

Existe una variedad de marcadores moleculares para estudiar poblaciones y la genética de un amplio rango de organismos. Se ha preferido mucho trabajar con ADN mitocondrial por los siguientes motivos:

- Existen protocolos sencillos para su aislamiento, purificación y amplificación.
- Existen varios centenares de copias de este tipo de ADN dentro de la célula en comparación del ADN nuclear que únicamente tiene dos copias.
- Su herencia es materna y no existe evidencia de recombinación con otras moléculas de ADN (Gasent et al, CSIC).

1.3.2. El uso de microsatélites para obtener la identidad de un individuo

Para obtener información de la especie y de su identidad individual se usan marcadores moleculares como los microsatélites. Estos son marcadores de repeticiones cortas de ADN nuclear altamente variable que son abundantes en los genomas eucariotas. Se piensa que son selectivamente neutrales y su utilidad para estudios de poblaciones y parentescos se encuentran bien documentados (Reed et al, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Extraer ADN de heces de *Lagothrix lagotricha* como una metodología no invasiva, lograr su amplificación por PCR y obtener información molecular para analizar la población de estudio.

2.2. Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo de colección de heces en el campo.
- Desarrollar un protocolo de extracción de ADN a partir de heces de chorongos.

- Desarrollar un protocolo de amplificación para el ADN de chorongos.
- Determinar si es posible amplificar ADN mitocondrial del chorongo a partir de una sola muestra de heces.
- Determinar si es posible amplificar microsatélites del chorongo a partir de una sola muestra de heces.

3. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio está ubicada en la Estación de Biodiversidad de Tiputini (coordenadas 0°37,5'S, 76°10,19'W) localizada en la provincia de Orellana, a la orilla norte del río Tiputini, parte de la Reserva de Biosfera Yasuní en la Amazonía ecuatoriana. La Estación de 650 hectáreas cuenta con un bosque primario de tierra firme, un bosque estacional inundado (varzea), pantanos y un lago pequeño (“Estación de Biodiversidad Tiputini”, <http://www.usfq.edu.ec>, enero 7 de 2005).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Para coleccionar heces de los chorongos

- Tubos de 10 ml de vidrio con tapa, estériles
- Paletas de helado estériles
- Fundas zip lock
- Alcohol 96%

4.1.2. Para extraer ADN de las heces

- Kit de QIAamp Blood and QIAamp Tissue de QIAgen®, (que incluyó buffers, columnas de sílica, proteinasa K y tubos de colección).

4.1.3. Para amplificar ADN de las muestras de heces por PCR

4.1.3.1. Para amplificar la región de ADN mitocondrial del ADN extraído

- PuRe Taq Ready-To-Go PCR Beads ® de Amersham
- Agua destilada estéril
- Primers para amplificar la región de ADN mitocondrial
 - Fragmento total: H16340 (5' CCTGATGTAGGAACCATATG 3') y L15926 (5' AAATTACCCCGGTCTTGTAACC 3')
 - Fragmento uno: H16340 (5' CCTGATGTAGGAACCATATG 3') y R264 (5' ACAACAAGCTTACAAGCAAGTACTA 3')
 - Fragmento dos: F222 (5' ATGGATTTACGTGTTAGATGGC 3') y R423 (5' AGGCTTTGCCACAAAGTACC 3')
 - Fragmento tres: F373 (5' AATGCACTAATTACATAGGG 3') y L15926 (5' AAATTACCCCGGTCTTGTAACC 3')
- ADN de la extracción de las muestras de heces de chorongo
- Termociclador

4.1.3.2. Para amplificar microsatélites del ADN extraído

- PuRe Taq Ready-To-Go PCR Beads de Amersham
- Agua destilada estéril
- Buffer 10x (Applied Biosystems)
- dNTP's 10mM (Applied Biosystems)
- BSA (Applied Biosystems)
- MgCl₂
- Taq (Applied Biosystems)

- ADN de la extracción de las muestras de heces de chorongo
- Primers para la amplificar microsatélites
 - R311 (5' TTAATGCCAGATGATTTTGG 3') y F311 (5' CTTCCGAAAGCCATTTCTCC 3')
 - R157 (5' TTCCAGACTGAGCTAGGATGC 3') y F157 (5' TGGCAAGTCTGGTTTCAAGC 3')
 - R1115 (5' TTTGCTTGCTCATTATTGC 3') y F1115 (5' GCTCATATTCATACATCCCTTGG 3')
 - R1118 (5' CCTTGAGGTTTTTGGGTTCC 3') y F1118 (5' TTTCTCCCTCTCAGATTACCAG 3')

4.2. Métodos

4.2.1. Colección de muestras en el campo

Para la colección de muestras de heces se llevó fundas estériles al campo. Una vez ubicado un grupo, se lo siguió hasta el sitio en que se acomodaron para dormir. Al día siguiente, se llegó al mismo lugar antes del amanecer para poder colectar las primeras heces. Luego se siguió al grupo durante todo el día. Cada muestra de heces colectada se metió en la funda plástica y se rotuló con el lugar de colección y la fecha (Anexo 1). En el caso de que las heces cayeran en una hoja, se guardó la hoja entera para evitar contaminarla. Cada muestra fue colectada individualmente sin hacer distinción de individuos.

Una vez tomadas las muestras, se las llevó al laboratorio de la Estación y se las guardó en tubos previamente esterilizados añadiendo etanol 96% para su preservación, calculando un volumen de heces y tres de alcohol. Luego se rotuló cada tubo con la identificación del sitio donde se tomó la muestra y la fecha. Se tomaron setenta muestras durante el período

del 22 de mayo de 2001 hasta el 22 de julio de 2001 y diez muestras desde el 26 de mayo de 2003 hasta el 30 de mayo de 2003.

4.2.2. Extracción de ADN de las muestras de heces

En el Laboratorio de Microbiología de la USFQ se realizó la extracción de ADN de las muestras para lo que se utilizó el QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit de QIAgen y se siguió un protocolo modificado por Wasser et al (1997). Este procedimiento fue previamente utilizado en una investigación con *Tremarctos ornatus* (Viteri, 2001). Debido a la cantidad limitada de material, no se extrajo ADN de todas las muestras colectadas, sino se escogió 48 muestras que contenían mayor cantidad de heces para realizar la extracción de ADN, además de un control positivo con sangre humana como indicativo de la viabilidad de los procedimientos utilizados en los experimentos y un negativo con agua destilada estéril como indicativo de contaminación (Anexo 1).

De acuerdo al protocolo de Wasser et al (1997), cada muestra de heces se homogenizó en el vortex, se tomó 300 µl de esta mezcla en un tubo eppendorf, se añadió 540 µl de buffer ATL (kit de extracción QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue) y 60 µl de Proteinasa K 20mg/ml. Se mezcló en el vortex y se dejó toda la noche en movimiento a 37°C para que al mismo tiempo trabaje la enzima y se vaya homogenizando.

Al siguiente día, se centrifugó los tubos a 13000 rpm por 3 minutos para separar impurezas. Se preparó nuevos tubos con 420 µl de buffer AL (kit de extracción QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue) para lisar (romper) todas las membranas celulares, se añadió 500 µl del sobrenadante al buffer AL, se mezcló en el vortex y se incubó a 70°C por 10 minutos. Aparte se repartió buffer AE (kit de extracción QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue) en tubos eppendorf para utilizar posteriormente al diluir el ADN extraído, para esto se calculó 160 µl por muestra y se dejó en incubación a 70°C mientras se realizó

el resto del procedimiento. Se añadió 300 µl de etanol 96% a cada tubo de las muestras y se mezcló en el vortex. De esta mezcla se tomó 600 µl y se transfirió a la columna de sílica con su respectivo tubo de colección, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y se descartó el filtrado del tubo de colección que contenía partículas no deseadas. Se repitió este proceso de la misma manera con la finalidad de maximizar la cantidad de ADN atrapado por la sílica. Se pasó con cuidado la columna a un nuevo tubo de colección, se la abrió, se añadió 500 µl de buffer AW (kit de extracción QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue) para lavar, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y se descartó el filtrado del tubo de colección. Nuevamente se lavó con 500 µl de buffer AW y se centrifugó a 10500 rpm por 3 minutos. Se cambió la columna de sílica a un tubo eppendorf estéril y se descartó el tubo de colección. Se diluyó el ADN de la columna de sílica con 150 µl de buffer AE que estaba previamente calentado a 70°C, posteriormente se incubaron los tubos a 70°C por 5 minutos, se centrifugaron a 8000 rpm, se descartaron las columnas de sílica y la solución resuspendida contenía ADN que se utilizó para las amplificaciones posteriores.

4.2.3. Amplificación de una región de ADN mitocondrial mediante PCR

La región de ADN mitocondrial que se amplificó era de aproximadamente 600bp. Se pudo amplificar la región completa utilizando los “primers” H16340 y L15926. Adicionalmente, esta región se dividió en tres segmentos, para los cuales se emplearon tres pares de “primers”. Para amplificar el primer segmento, llamado fragmento uno, se utilizó los “primers” H16349 y R264. Para amplificar el segundo segmento, correspondiente al fragmento dos, se utilizó los “primers” F222 y R423. Finalmente para amplificar el tercer segmento, llamado fragmento tres, se utilizó los “primers” F373 y L15926. Este conjunto de “primers” sirven para amplificar la región hipervariable uno de la región de control también llamada “D loop”. Los “primers” están diseñados en base a otros “primers”

conservados para la región completa y a una secuenciación inicial de la región en *Lagothrix*, *Ateles* y *Alouatta* realizada por Anthony Di Fiore. La Tabla 1 indica los tamaños que se esperaban de la amplificación de la región completa de ADN mitocondrial y de sus tres fragmentos correspondientes (Di Fiore, datos no publicados).

Se tomaron veinte muestras al azar de las extracciones de ADN para hacer PCR de los tres fragmentos y el fragmento total. Las muestras escogidas fueron: 1, 2, 5, 7, 8, 12, 16, 18, 19, 24, 26, 28, 30, 31, 32, 34, 35, 38, 42 y 46 (Anexo 2).

Se utilizaron los tubos de puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads de Amersham Biosciences, en los cuales vinieron los ingredientes necesarios para un PCR y solo se añadió 18.6 µl de agua destilada estéril, 1.2 µl del primer R, 1.2 µl del primer F y 4 µl de ADN extraído de las muestras de heces, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones programadas en el termociclador fueron: 94°C por 5 minutos; 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto (cuando se trabajó con el fragmento total, 1 y 2) o 53°C para el fragmento 3, y 72°C por 1 minuto y 30 segundos; 72°C por 5 minutos y finalmente se guardó los productos obtenidos de la reacción a 4°C (Di Fiore, comunicación personal). Los productos del PCR junto con un estándar de 100 bp se corrieron en geles de agarosa 2.5% a 70 voltios por una hora y media. Posteriormente se fotografió con una cámara Kodak con su ensamblaje de oscuridad Kodak EDAS 290 y las imágenes fueron procesadas en el programa Kodak 1D.

4.2.4. Amplificación de microsatélites mediante PCR

Se utilizaron cuatro pares de “primers” para amplificar microsatélites: 311 (R y F), 157 (R y F), 1115 (R y F), 1118 (R y F), cuyas características y condiciones se indican en la Tabla 2, 3 y 4 (Di Fiore, 2004).

Se realizaron varios experimentos piloto, en donde primero se probó si se lograba una amplificación con estos cuatro “primers” con las muestras 1, 5, 8 de las extracciones de

ADN que habían funcionado con los “primers” de ADN mitocondrial. Los productos se corrieron en un gel de poliacrilamida 20% con un estándar de 25 bp y se realizó una tinción de plata de acuerdo al protocolo de Sambrook (2001), para visualizar los resultados.

Debido a los resultados negativos del primer experimento, se realizaron varias modificaciones al protocolo en donde se variaron los componentes de las reacciones para tratar de lograr una amplificación. Se escogió trabajar con el “primer” 311 al azar y con las muestras de ADN de las extracciones de los individuos 1, 5, 8, 13 que dieron amplificaciones en la región de ADN mitocondrial. A continuación se presentan las variaciones con las que se trabajó en diferentes reacciones de PCR.

- Se utilizó los tubos de puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads ® de Amersham Biosciences, a los que se añadió 1.2 µl de cada “primer” (311R y 311F), 3 µl del ADN extraído y 19.6 µl de agua destilada estéril.
- Se mezcló el buffer 10x, los dNTP's, los “primers”, la Taq polimerasa (Applied Biosystems) y el ADN de la extracción de acuerdo a las especificaciones de la Tabla 3 (Di Fiore, 2004) y se realizaron dos repeticiones.
- Se reemplazó el buffer 10x por uno nuevo y se aumentó la cantidad de Taq polimerasa utilizada.
- Se disminuyó la cantidad utilizada del ADN extraído.
- Se trabajó con varias concentraciones de MgCl₂: 1.75 mM, 2.0 mM, 2.25 mM, y 2.5 mM de MgCl₂.
- Se utilizó puRe Taq Ready – To – Go PCR Beads ® y únicamente se cambió la temperatura de “annealing” de 52°C a 55°C para aumentar especificidad.
- Se utilizó puRe Taq Ready – To – Go PCR Beads ®, se duplicó la cantidad de ADN de cada muestra y se conservó la temperatura de “annealing” anterior.

- Se aumentó la cantidad utilizada de ADN a 8µl, se añadió BSA para obtener a una concentración de 0.5µg en 25 µl y se programó el termociclador para ciclar en “touchdown” bajo los límites de 60°C a 50°C. Esto significa que la temperatura de “annealing” del primer ciclo sería 60°C y en los siguientes nueve ciclos, esta temperatura iría decreciendo 1°C por ciclo hasta llegar a 50°C; de ahí en adelante, la temperatura de “annealing” se mantendría en 50°C.

Se realizó un último intento de PCR, bajo las condiciones de las Tablas 3 y 4, con las muestras 32, 34, 35, 38 y 46 que fueron positivas en la amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial. Para este experimento se utilizaron los “primers” para amplificar los locus 1115, 157 y 1118 (Di Fiore, 2004) con los que no se trabajó en el anterior grupo de experimentos. Para los “primers” 157 y 1115, se mezclaron los componentes de PCR de acuerdo a las concentraciones especificadas en la Tabla 3, pero se añadió 4µl de ADN de la extracción. Al “primer” 1118, adicionalmente se le aumentó 2.5 µl de MgCl₂ de acuerdo a las indicaciones del autor (Di Fiore, 2004).

5. RESULTADOS

5.1. Colección de heces y extracción de ADN

En total se colectaron 80 muestras de heces. Setenta se colectaron entre el 22 de mayo y el 22 de julio de 2001 y diez se tomaron desde el 26 de mayo al 30 mayo de 2003. De estas 80 muestras se extrajo ADN de 48 con el kit QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue (Anexo 1) y se utilizaron dieciocho de ellas para la amplificación de ADN (Anexo 2).

5.2. Amplificación de la región de ADN mitocondrial

De las dieciocho muestras que se utilizaron para amplificar la región de ADN mitocondrial, catorce se colectaron en el 2001 y cuatro se colectaron en el 2003. De estas

últimas cuatro, dos muestras amplificaron los cuatro fragmentos que podían amplificarse de ADN mitocondrial, las otras dos amplificaron dos y tres fragmentos respectivamente (Figura 4). De las catorce muestras colectadas en el 2001, ocho amplificaron tres fragmentos, el resto amplificaron dos, uno y ningún fragmento (Figura 5).

En el fragmento entero de la región de ADN mitocondrial, se amplificaron trece de dieciocho muestras, lo que equivale a un 72.2% (Figura 6a.). Tanto el control positivo como el negativo funcionaron adecuadamente lo que indicó que el procedimiento utilizado fue adecuado para el experimento y que no hubo contaminación. Los tamaños obtenidos fueron entre 591 y 657 bp que se encontraron en el rango esperado (Figura 7).

Se observó que el fragmento uno de la región de ADN mitocondrial se amplificó en catorce de dieciseis muestras, lo que representó a un 87.5% (Figura 6b.). Tanto el control negativo como el positivo funcionaron correctamente lo que indicó que no hubo contaminación y que los procedimientos utilizados fueron adecuados para el experimento. Los tamaños de los fragmentos fueron entre 340 y 350 bp como se esperaba.

El fragmento dos de la región de ADN mitocondrial se amplificó en trece de dieciocho muestras, lo que equivale a un 72.2% (Figura 6c.). El control negativo funcionó correctamente lo que significó que no hubo contaminación, pero el control positivo no funcionó; sin embargo se amplificó un alto porcentaje de las muestras en el tamaño esperado, de modo que puede haberse dado un error técnico con el control positivo. Los tamaños de los fragmentos obtenidos fueron entre 263 y 296 bp.

El fragmento tres de la región de ADN mitocondrial amplificó en dos de dieciocho muestras, lo que equivale a un 11.1% (Figura 6d.). A pesar de que el control negativo funcionó indicando que no hubo contaminación, el control positivo no lo hizo, de modo que puede haber ocurrido un problema técnico. Las dos muestras que sí lograron amplificarse tuvieron los tamaños de 208 y 212 como se esperaba (Figura 7).

De las dieciocho muestras ensayadas para amplificar la región completa de ADN mitocondrial y sus tres fragmentos, únicamente dos muestras amplificaron estos cuatro fragmentos, lo que equivale al 11.1%. A pesar de que se utilizó exactamente los mismos procedimientos, la amplificación del número de fragmentos de ADN mitocondrial por muestra tuvo variaciones (Figuras 8).

En general, fueron exitosos 42 de 70 intentos de PCR para la amplificación de la región de ADN mitocondrial, lo que equivale al 60% del total de las reacciones realizadas (Figura 9).

5.3. Amplificación de microsatélites

En el caso de la amplificación de microsatélites, no se obtuvieron resultados positivos. En los tres casos en que se utilizó puRe Taq Ready – To – Go PCR Beads, se obtuvieron una serie de bandas inespecíficas que no correspondían a los tamaños de bandas esperados. El tamaño de las bandas adecuadas deberían haber sido entre 191 y 203 bp (Figura 10). Al aumentar la temperatura de “annealing” para lograr más especificidad, se obtuvieron bandas más definidas, pero tampoco correspondían al tamaño que se esperaba (Figura 11). En el resto de casos en que se mezcló, uno a uno, los componentes para realizar PCR, no se logró amplificación alguna, a pesar de todas las variantes que se usaron (Figura 12).

6. DISCUSIÓN

La idea de este proyecto fue identificar molecularmente a los individuos del grupo de chorongos de la Estación de Biodiversidad de Tiputini (EBT) realizando un análisis del ADN contenido en sus heces. De esta forma se pretendía determinar la dinámica del parentesco entre los individuos. Se consideró que la EBT era un lugar propicio para llevar a cabo este proyecto ya que el grupo de chorongos era accesible, lo que facilitó la colección de muestras de heces que representa un método no invasivo en contraste con

otras metodologías invasivas como el uso de dardos, ya sea para tomar muestras de tejido o para tranquilizarlos y sacar sangre. Además estos métodos hubieran implicado gastos adicionales de aproximadamente USD 500 (“Paul Mulcahy’s Pages”, <http://www.pmulcahy.com>, enero 16 de 2005)

6.1. Amplificación de la región de ADN mitocondrial

Se debe considerar que las heces son una mezcla compleja de moléculas biológicas y que contienen sustancias que interfieren con el análisis de ADN. Además el alto contenido bacterias de las heces, combinado con el ambiente cálido y húmedo, puede causar una rápida degradación de cualquier ADN que se encuentre originalmente en la muestra (Reed et al, 1997). Adicionalmente se piensa que el ADN de las heces se ve probablemente afectado por un daño hidrolítico y oxidativo, además de una degradación enzimática, similar al ADN del tejido viejo y de los huesos (Linn, 1981 en M. A. J. Frantzen et al, 1998), por lo que un buen método de preservación es importante para poder mejorar la cantidad y calidad de ADN que se extraiga de una muestra.

El adecuado funcionamiento del protocolo de colección de heces en el campo y la extracción de ADN de las muestras, se refleja en el éxito de la amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial. Se obtuvo que las muestras colectadas en el 2003 amplificaron ligeramente mejor que las colectadas en el 2001. Adicionalmente se puede decir que el protocolo diseñado para coleccionar las heces sí funcionó ya que a pesar del tiempo que transcurrió entre la colección de las mismas y la amplificación del ADN mitocondrial, se logró obtener resultados positivos.

En general, la amplificación de la región de ADN mitocondrial tuvo éxito ya que se pudo obtener información del 60% de las muestras ensayadas. Vale mencionar que los

controles negativos siempre funcionaron adecuadamente, lo que es una garantía de que los experimentos que se llevaron a cabo no se contaminaron.

De acuerdo al estudio de Frantzen *et al.* (1998), que evaluó la efectividad de cuatro diferentes métodos de preservación de muestras de heces de babuinos, se obtuvo que el éxito de la amplificación de ADN depende del método de preservación, del tamaño del producto del PCR, y si se ensaya con ADN nuclear o mitocondrial. Se determinó que el ADN mitocondrial es más fácil de amplificar que el nuclear, sin tener mayor importancia el método de preservación. En la presente investigación se pudo observar lo mismo ya que el ADN mitocondrial no presentó problemas en su amplificación.

Cada célula diploide contiene cientos o miles de copias de ADN mitocondrial comparado con dos copias del ADN nuclear. Estas múltiples copias son más fáciles de recuperar en las muestras que están degradadas parcialmente (como el caso de las heces), y las regiones codificantes de ADN mitocondrial ofrecen un mejor rango de resolución.

En el estudio de Farrell *et al.* (2000) se identificó cuatro carnívoros por medio del análisis molecular de sus heces, amplificando una región de ADN mitocondrial. Se determinó que trabajar con este tipo de ADN es un método fácil para identificar una especie. El éxito de la amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial se miden por la presencia o ausencia de productos de PCR del tamaño esperado, ignorando su intensidad y ciertos productos inespecíficos de la amplificación. El 59% de las heces fueron amplificadas y secuenciadas con éxito en el estudio que es una cifra comparable a la que se obtuvo en la presente investigación.

En el mismo estudio de Farrell *et al.* (2000) se indica que el ADN mitocondrial muy degradado simplemente no se amplifica en lugar de una respuesta falsa, lo que constituye un posible motivo por el que el fragmento tres tuvo poco éxito en la presente investigación.

6.2. Amplificación de microsatélites

El ADN extraído de muestras de heces se supone que tiene una cantidad y calidad más baja en comparación con el ADN extraído de muestras de sangre o piel. En un estudio de escatología molecular que empleó un análisis genético molecular de heces de focas para identificar especies, sexo e individuos, se obtuvo poco éxito en la amplificación de microsatélites. Se emplearon 18 pares de “primers” para amplificarlos y de estos únicamente cinco funcionaron con las muestras de ADN provenientes de las heces. Las muestras de ADN que no amplificaron pudieron haber sido muy viejas, el número de células rectales remanentes pudo haber sido muy bajo o puede haber algún componente en la dieta que influya en el éxito de las técnicas moleculares empleadas (Reed et al, 1997). De la misma forma pudo haber ocurrido con la amplificación de microsatélites a partir del ADN extraído de muestras de heces de *Lagothrix lagotricha*. Adicionalmente, se sabe que existe un componente en la dieta de animales herbívoros que inhibe la reacción de PCR, aunque aún no se sabe exactamente el causante de este problema (Pollinger, com. pers.). Por otro lado, también se debe tomar en cuenta que se probó con pocos “primers” para amplificar microsatélites, lo que disminuye la probabilidad de encontrar resultados positivos.

Las muestras que no amplificaron no pueden atribuirse a una falla en la Taq polimerasa debido a que se observó la presencia de dímeros de primers que son indicativo de su adecuado funcionamiento de la enzima como se determinó en el estudio de Reed *et al.* (1997).

7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que el protocolo de colección de heces funcionó. Las muestras no se contaminaron entre sí y se pudo tener amplificación en un número significativo de las mismas. Las heces colectadas en el 2003 tuvieron ligeramente

una mejor amplificación que las colectadas en el 2001, a pesar de que fueron únicamente cuatro muestras del 2003 las que se analizaron en este estudio.

Se pudo llegar a un protocolo de amplificación de ADN mitocondrial con un éxito del 60%. Se determinó que para amplificar ADN mitocondrial con buenos resultados es suficiente trabajar con una extracción por muestra de heces. Se comprobó que trabajar con ADN mitocondrial es más fácil y efectivo. De los resultados obtenidos de esta parte del proyecto se puede concluir que se rescató ADN de *Lagothrix lagothricha* de las muestras de heces.

Sin embargo, para el caso de la amplificación de microsatélites no se obtuvo éxito por tres posibles razones encontradas también en otras investigaciones y que podrían aplicarse también al presente trabajo. Las muestras de heces pueden haber sido demasiado viejas, o podían contener muy pocas células rectales remanentes, o la dieta puede influenciar en las reacciones de PCR. Además se debe considerar la baja calidad de ADN proveniente de muestras de heces y que existe únicamente dos copias de ADN nuclear, mientras que del ADN mitocondrial contiene múltiples copias que facilitan su amplificación. Finalmente, faltó ensayar con un mayor número de “primers”.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que para iniciar un proyecto en escatología molecular, primero se evalúe varias formas de conservar las heces, ya sea congelándolas, desecándolas o mezclándolas en buffers de preservación específicos.

Para la extracción de ADN de las muestras es recomendable el uso de kits comerciales que ahora son más específicos para el tipo de muestra que se emplea. Considerando que ADN proveniente de las heces tiene una calidad y cantidad menor que el ADN proveniente de otro tipo de muestras, podría ser útil realizar varias extracciones de

ADN a partir de una sola muestra de heces para aumentar la probabilidad de una amplificación posterior. Sería interesante probar una extracción de ADN inmediatamente después de coleccionar la muestra, trasladando el material necesario al campo.

Adicionalmente, se recomienda aumentar el muestreo, minimizar el tiempo entre la colección de la muestra y su extracción de ADN, y aumentar el número de “primers” para lograr amplificar microsatélites. Expertos en escatología molecular recomiendan coleccionar de tres a seis heces por individuo para incrementar la probabilidad de amplificar ADN nuclear (M. A. J. Frantzen et al, 1998). Sin embargo, coleccionar un número de muestras de heces por individuo para el caso de los chorongos resulta muy complicado.

BIBLIOGRAFÍA

- Di Fiore, Anthony Francis. "Ecology and Behavior of Lowland Woolly Monkeys (*Lagothrix lagotricha poeppigii*, Atelinae) in Eastern Ecuador". University of California Davis, 1997.
- Di Fiore, Anthony and Fleischer Robert. "Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates:Platyrrhini)". Molecular Ecology Notes, 2004.
- Farrell, L. E.; Roman J.; Sunquist M. E. "Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats". Molecular Ecology (2000) 9, 1583-1590.
- Fedriani, Jose and Kohn, Michael. "Genotyping faeces links individuals to their diet". Ecology Letters, (2001) 4, 477-483.
- "Estación de Biodiversidad Tiputini". *Disponible en* <http://www.usfq.edu.ec>, enero 7 de 2005.
- Frantzen M. A. J. et all. "Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA". Molecular Ecology (1998) 7, 1423- 1428.
- Gasent, José Ma., Godoy José y Jordano Pedro. "Identificación de esturiones procedentes Ddel Guadalquivir, mediante análisis de ADN en especímenes de museo". Revista Medio Ambiente. *Disponible en* http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/revistama/revista_ma36/ma36_12.html
- Karp, Gerald. Biología celular y molecular. México: McGraw-Hill Interamericana, 1998.
- "Paul Mulcahy's Pages". *Disponible en* <http://www.pmulcahy.com>, enero 16 de 2005
- Peres, Carlos. "Effects of Hunting on Western Amazonian Primate Communities". Biological Conservation 54. 1990. 47-59.
- Pollinger, John. Comunicación personal. Noviembre 24, 2004
- Primack, Richard y Ros, Joandomenec. Introducción a la biología de la conservación, Segunda edición. Barcelona: Ariel Ciencia, 2002.
- Ramírez, Marleni. "The Woolly Monkey, genus *Lagothrix*". Ecology and Behavior of Neotropical Primates. Vol 2. Washington: WWF, 1998.
- Reed, J. Z. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. Molecular Ecology, 1997, 6, 225-234.
- Tirira, Diego. El Libro rojo de los mamíferos del Ecuador. Quito: Simbioe, 2001.
- Viteri, Paulina. Caracterización de los individuos en cautiverio y de una población

Silvestre de oso andino (*Tremarctos ornatus*) en la Reserva Ecológica Cayambe-Coca mediante el uso de técnicas de biología molecular. Quito: Ecociencia y USFQ, 2001.

Wasser S.K. et al. 1997 Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* **6**: 1091-1097

TABLAS

Tabla 1. Tamaños esperados de la región completa de ADN mitocondrial y de sus correspondientes tres fragmentos. De la región de ADN mitocondrial con la que se trabajó, se amplificó la región completa llamada fragmento total, o habían “primers” para dividir esta región en tres: fragmento uno, fragmento dos y fragmento tres (Di Fiore, datos sin publicar).

Fragmento	Set de “primers”	Tamaño esperado (bp)
Total	H16340-L15926	644
Uno	H16340-R264	336
Dos	F222-R423	270
Tres	F373-L15926	222

Tabla 2. Los cuatro “primers” utilizados para la amplificación de microsatélites de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*. Estos “primers” fueron diseñados después de un estudio que encontró trece locus de microsatélites de chorongo (Di Fiore, 2004)

Locus	Especie	Tamaño esperado (bp)
157	L. Lagothricha	215-223
311	L. Lagothricha	191-203
1115	L. Lagothricha	196-226
1118	L. Lagothricha	128-165

Tabla 3. Componentes de la mezcla necesaria para realizar PCR para la amplificación de microsatélites de *Lagothrix lagotricha*. Estos fueron los que se emplearon en la investigación que se mencionó en la tabla 2 (Di Fiore, 2004).

2.5ul buffer 10x sin Mg (Promega)
2.0 ul dNTP's 10mM
1.5mM MgCl ₂
0.5 µg BSA / 1.0 µg BSA para el primer 1118
0.625 unidades Taq (Promega)
1.2 ul de cada primer (R y F) 10 uM
3 µl DNA extraído
Agua destilada estéril hasta completar 25ul

Tabla 4. Programación del termociclador para la amplificación de microsatélites de *Lagothrix lagotricha*. Se emplearon los mismos ciclos descritos en el estudio mencionado en la tabla 2 (Di Fiore, 2004).

CONDICIONES PARA EL PRIMER 311	CONDICIONES PARA LOS PRIMER 157 Y 1115	CONDICIONES PARA EL PRIMER 1118
94 °C por 2 min	94 °C por 2 min	94 C por 2 min
40 ciclos de:	40 ciclos de:	40 ciclos de:
94 °C por 30 s	94 °C por 30 s	94 C por 30 s
52 °C por 30s	53 °C por 30s	50 C por 30s
72 °C 1 min	72 °C 1 min	72 C 1 min
-----	-----	-----
72 °C 5 min	72 °C 5 min	72 C 5 min

FIGURASFigura 1. Fotos de *Lagothrix lagotricha*.

Figura 2. Mapa de la localización del chorongo en el Ecuador (Tirira, 2001).



Figura 4. Número de fragmentos de la región de ADN mitocondrial que se amplificaron por muestra proveniente del año 2003. Se amplificó el fragmento completo de la región de ADN mitocondrial y a su vez se amplificó la región dividida en tres fragmentos llamados uno, dos y tres. En total se trabajó con cuatro fragmentos por cada muestra de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*.

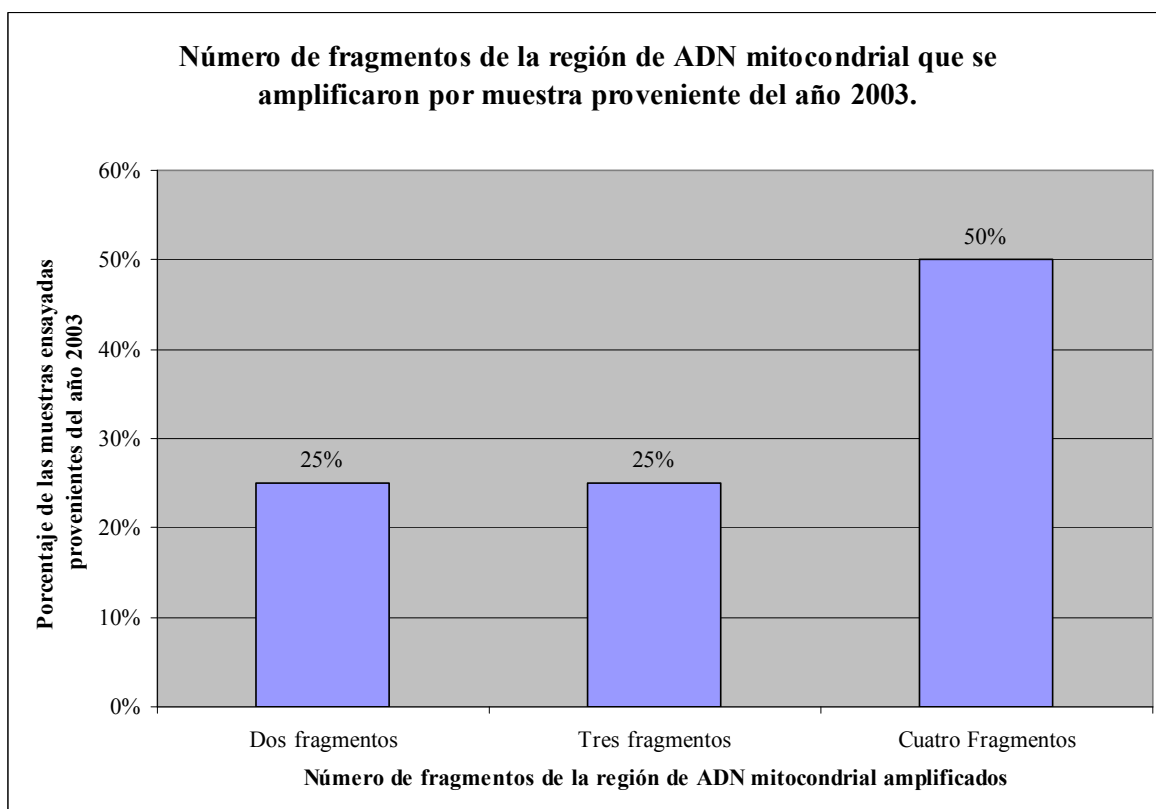


Figura 5. Número de fragmentos de la región de ADN mitocondrial que se amplificaron por muestra proveniente del año 2001. Se amplificó el fragmento completo de la región de ADN mitocondrial y a su vez se amplificó la región dividida en tres fragmentos llamados uno, dos y tres. En total se trabajó con cuatro fragmentos por cada muestra de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*.

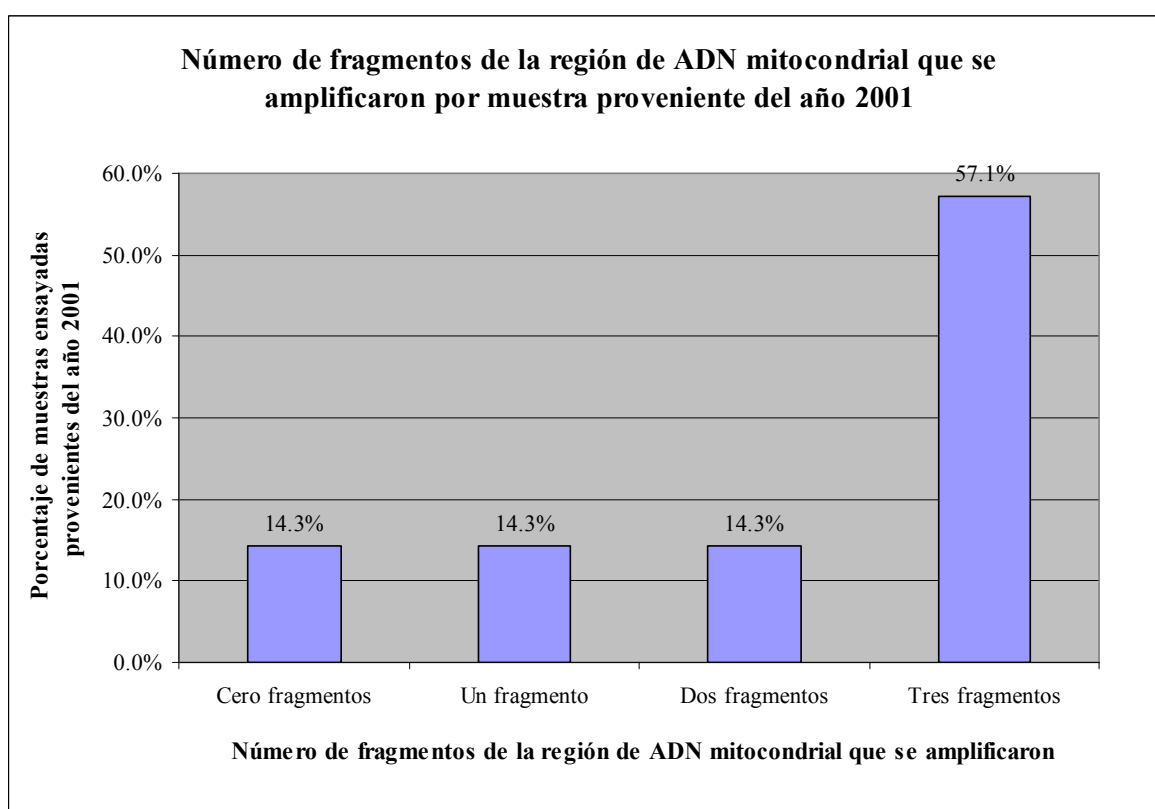
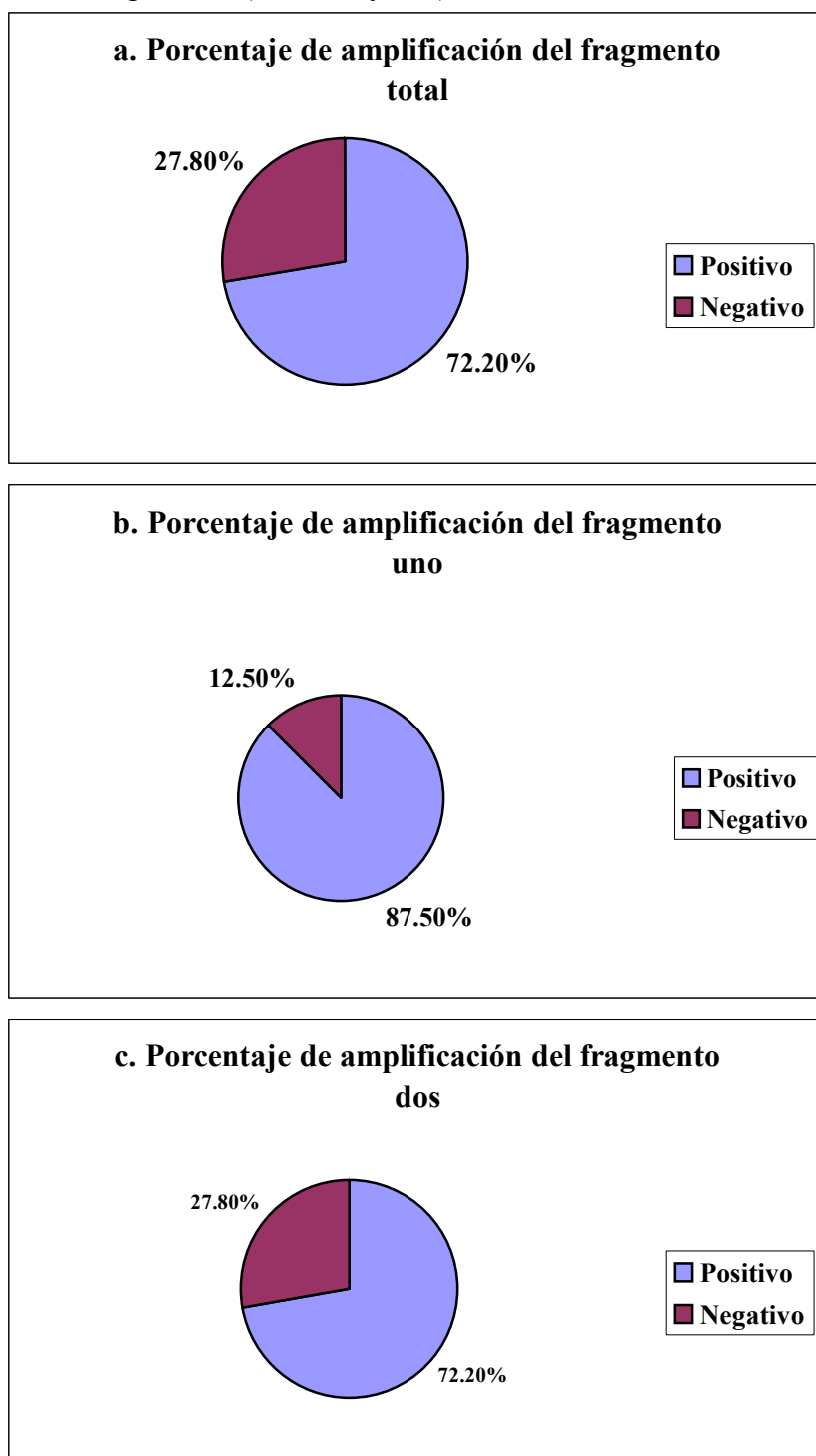


Figura 6. Porcentaje de amplificación de ADN mitocondrial. La región de ADN mitocondrial completa (fragmento total) podía amplificarse, alternativamente, dividiéndola en tres fragmentos (uno, dos y tres).



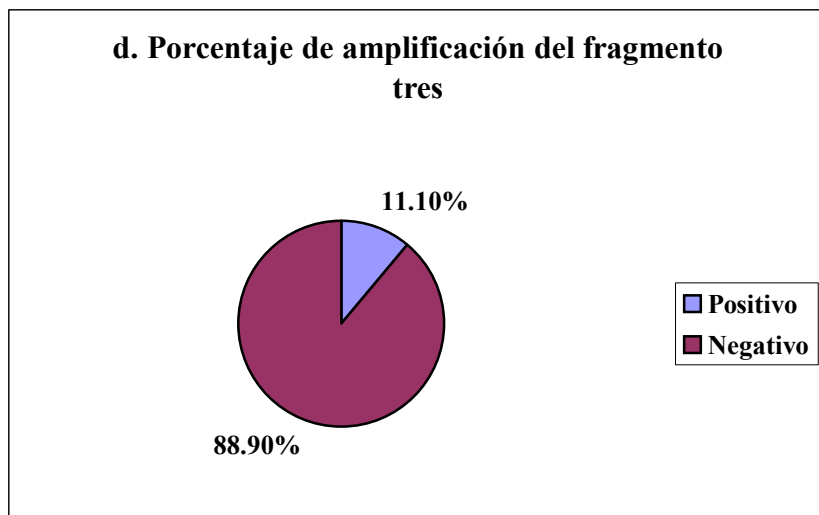


Figura 7. Amplificación de ADN mitocondrial utilizando puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads®. El estándar fue de 100 bp. Las bandas que se observan sobre los 600 bp corresponden a la amplificación del fragmento total de la región de ADN mitocondrial en los individuos 32, 34 y 35. Las dos bandas tienen un tamaño poco mayor a 200 bp corresponden a la amplificación del fragmento tres en los individuos 5 y 8.

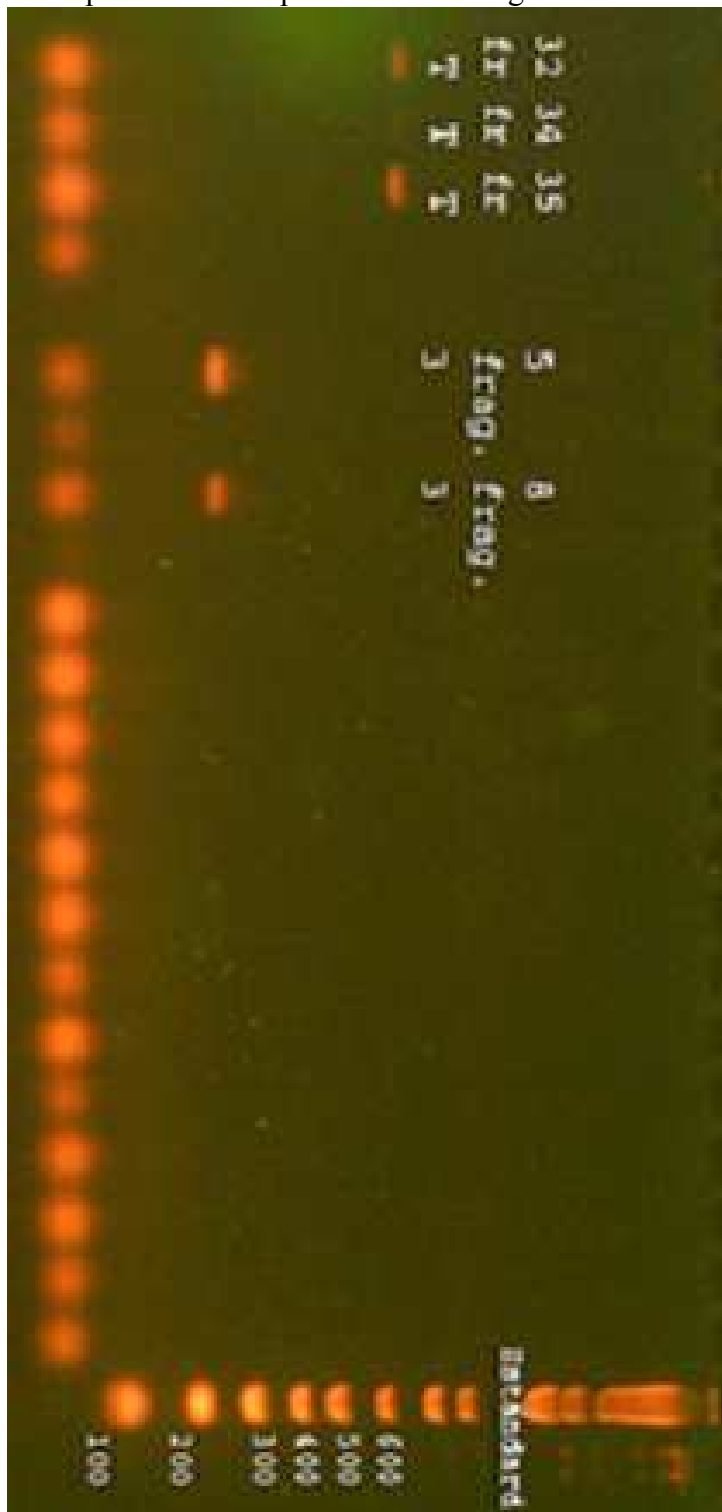


Figura 8. Porcentaje de amplificación de los cuatro fragmentos de ADN mitocondrial. De un total de cuatro fragmentos con los que se trabajó con ADN mitocondrial, se tomó en cuenta cuántos fragmentos se amplificaron por cada muestra de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*.

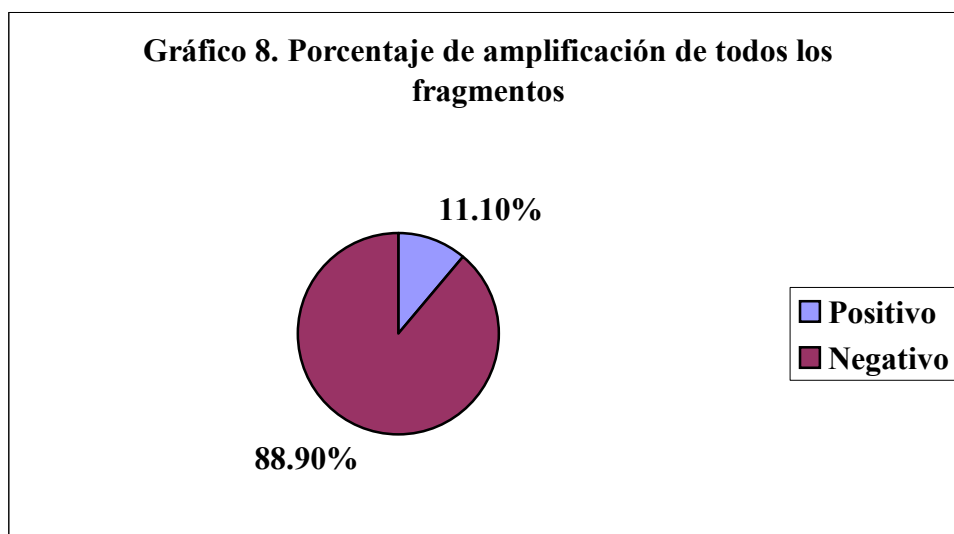


Figura 9. Porcentaje de reacciones de PCR positivas para ADN mitocondrial. Se tomó en cuenta todas las reacciones de PCR realizadas para la amplificación de la región de ADN mitocondrial, independientemente del fragmento que se ensayara.

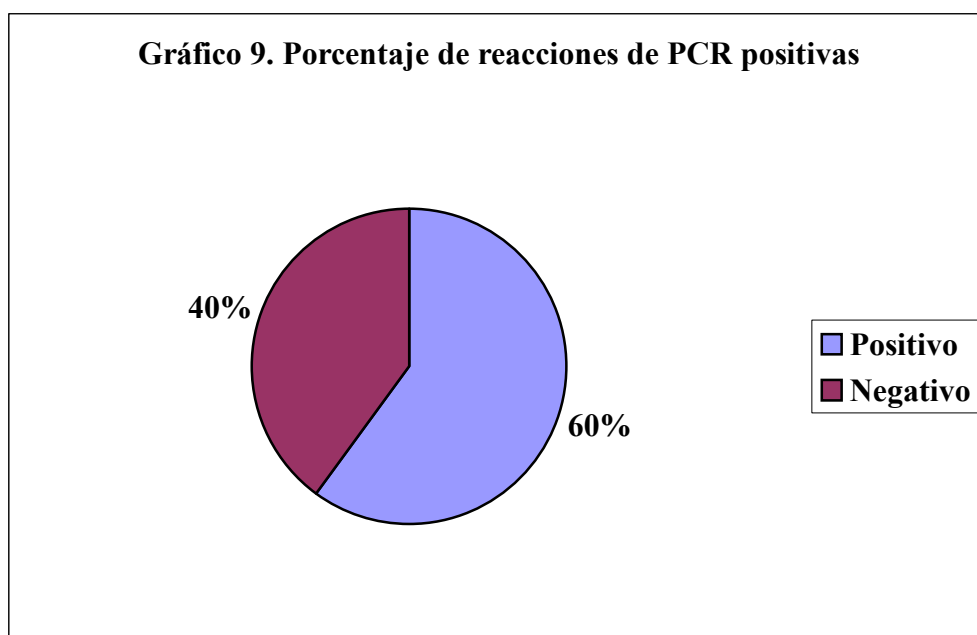


Figura 10. Amplificación de microsatélites utilizando puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads ®. El estándar fue de 25 bp. Se muestra uno de los ensayos que se realizó con el “primer” 311 y las muestras de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*, en los individuos 1, 5, 8, 13 que fueron positivos para la amplificación de ADN mitocondrial. Se observan muchas bandas en las muestras de los individuos 5 y 8 cuando en realidad debía verse una banda por cada muestra. La única banda que se observa en la muestra del individuo uno no corresponde a la que se esperaba entre 191 y 203 bp, sino que está sobre 300bp. En la muestra del individuo 13 no aparece ninguna banda.

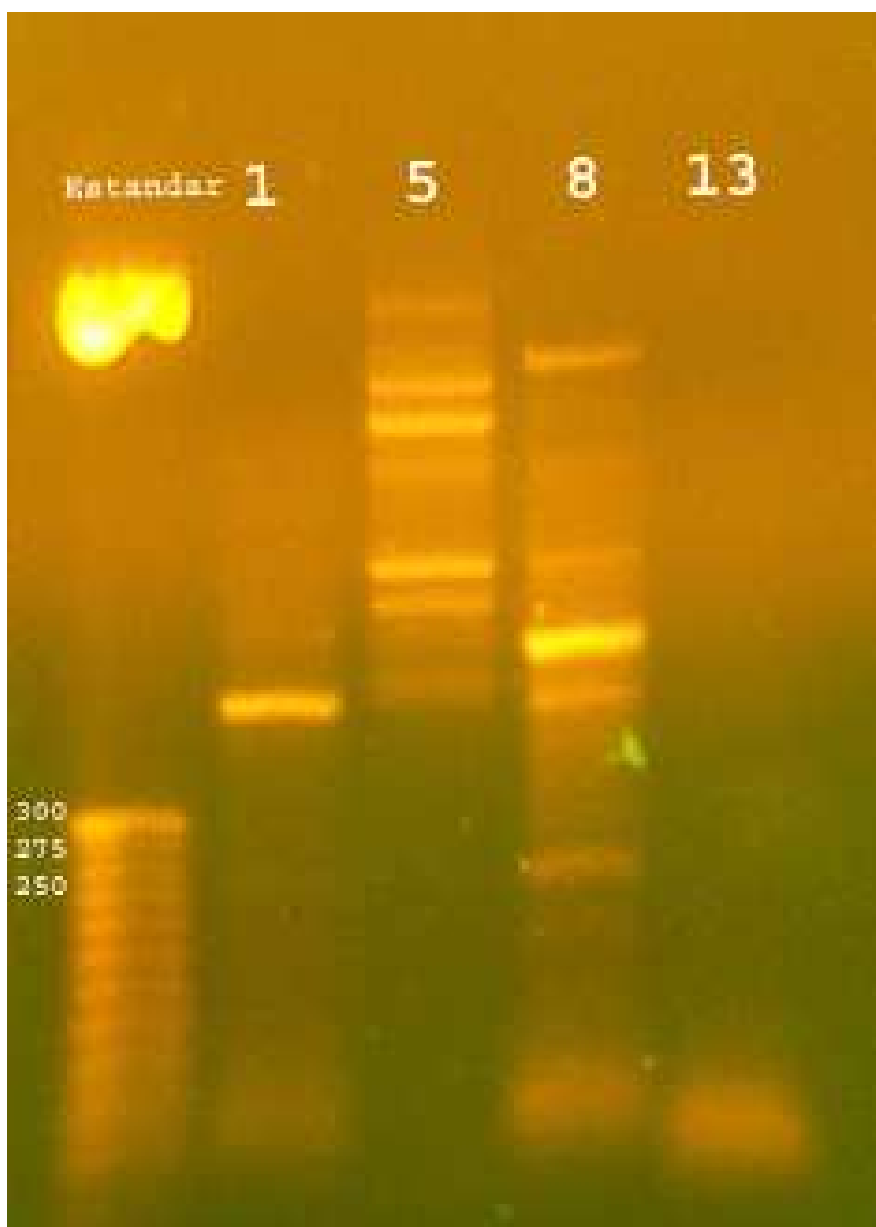


Figura 11. Amplificación de microsatélites utilizando puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads®, después de aumentar la temperatura de “annealing”. El estándar fue de 25 bp. Se muestra uno de los ensayos que se realizó con el “primer” 311 y las muestras de ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*, en los individuos 1, 5, 8, 13 que fueron positivos para la amplificación de ADN mitocondrial. La variante que se utilizó en este caso fue aumentar la temperatura de “annealing” para obtener bandas más específicas. En los individuos 1, 5 y 8 se observa una banda definida para cada uno, sin embargo estas no corresponden al tamaño esperado. En el individuo 13 no se observa amplificación alguna.

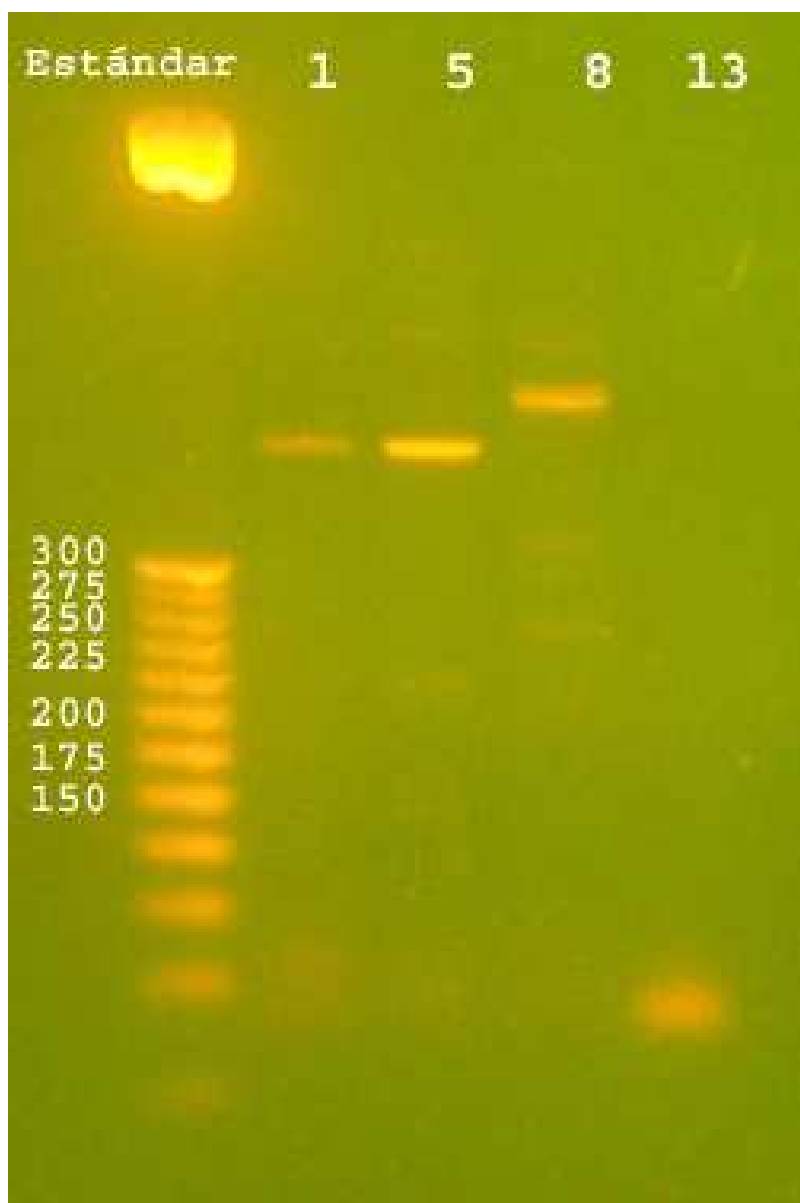
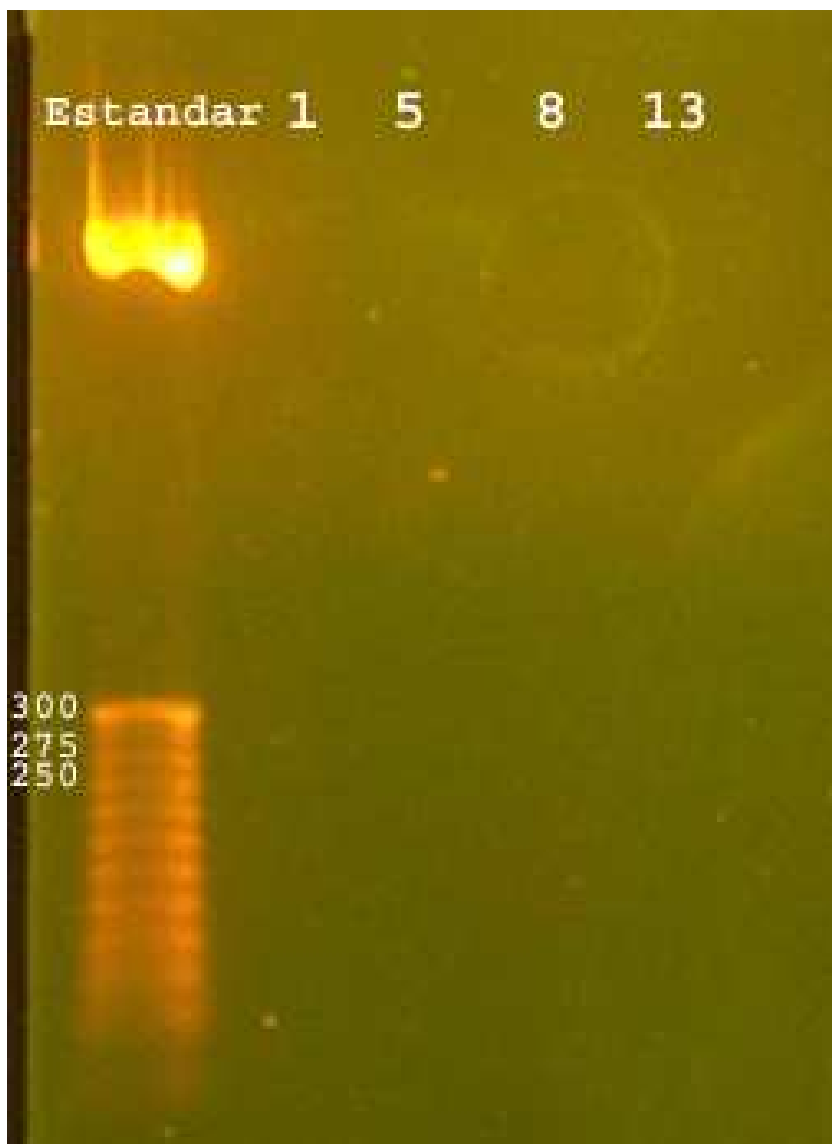


Figura 12. Amplificación de microsátélites a partir de la mezcla de componentes. En lugar de utilizar el preparado puRe Taq Ready- To - Go PCR Beads®, se mezcló uno a uno los componentes necesarios para realizar PCR. Sin embargo no se ve amplificación alguna de las muestras ADN extraído de las heces de *Lagothrix lagotricha*, en los individuos 1, 5, 8 y 13 que aparecen en los figuras 12 y 13. El estándar es de 25 bp, al igual que en las figuras anteriores.



ANEXOS

Anexo 1. Información de las muestras a las que se les extrajo ADN. De las ochenta muestras de heces de *Lagothrix lagotricha* que se colectaron en la Estación de Biodiversidad de Tiputini, se escogieron 48 de las que contenían mayor cantidad de heces para extraer ADN.

Número de muestra	Sendero	Fecha
1	Chichico 175 m	11-Jul-01
2	Chichico 175 m	11-Jul-01
3	Chichico 175 m	11-Jul-01
4	Maquisapa 600 m	09-Jul-01
5	Chorongo 400 m	29-May-03
6	Maquisapa 600 m	09-Jul-01
7	Control negativo	26-Ene-04
8	Chorongo 400 m	29-May-03
9	Chorongo 400 m	29-May-03
10	Chorongo 400 m	29-May-03
11	Chorongo 600 m	16-Jun-01
12	Control positivo	26-Ene-04
13	Chichico 175 m	11-Jul-01
14	Chichico 175 m	11-Jul-01
15	Harpía 1250 m	22-Jul-01
16	Chorongo 600 m	16-Jun-01
17	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
18	Final de Murciélagos	24-Jun-01
19	Matapalo 400 m	22-Jul-01
20	Final de Murciélagos	24-Jun-01
21	entre Harpía 1700 m y Matapalo	10-Jun-01
22	Chichico 175 m	11-Jul-01
23	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
24	Chichico 175 m	11-Jul-01
25	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
26	Chichico 175 m	11-Jul-01
27	Chorongo 600 m	16-Jun-01
28	Maquisapa 600 m	09-Jul-01
29	Chichico 175 m	11-Jul-01
30	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
31	Matapalo 400 m	22-Jul-01
32	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
33	Matapalo 725 m	02-Jul-01
34	Matapalo 725 m	02-Jul-01
35	Matapalo 725 m	02-Jul-01
36	Matapalo 725 m	02-Jul-01
37	Matapalo 725 m	02-Jul-01

38	Chorongo 400 m	29-May-03
39	Matapalo 300 m	28-May-03
40	Chorongo 400 m	29-May-03
41	Matapalo 300 m	28-May-03
42	Matapalo 300 m	28-May-03
43	Matapalo 300 m	28-May-03
44	Matapalo 725 m	02-Jul-01
45	Matapalo 725 m	02-Jul-01
46	Harpía 1250 m	22-Jul-01
47	Harpía 1250 m	22-Jul-01
48	Harpía 1250 m	22-Jul-01

Anexo 2. Información de las veinte muestras analizadas por PCR. De las 48 extracciones de ADN de las muestras de heces de *Lagothrix lagotricha*, se escogió veinte al azar para realizar las reacciones de PCR.

Número de muestra	Sendero	Fecha
1	Chichico 175 m	11-Jul-01
2	Chichico 175 m	11-Jul-01
5	Chorongo 400 m	29-May-03
7	Control negativo	26-Ene-04
8	Chorongo 400 m	29-May-03
12	Control positivo	26-Ene-04
16	Chorongo 600 m	16-Jun-01
18	Los Puentes	24-Jun-01
19	Matapalo 400 m	22-Jul-01
24	Chichico 175 m	11-Jul-01
26	Chichico 175 m	11-Jul-01
28	Maquisapa 600 m	09-Jul-01
30	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
31	Matapalo 400 m	22-Jul-01
32	Chichico 100 - 150 m	22-Jun-01
34	Matapalo 725 m	02-Jul-01
35	Matapalo 725 m	02-Jul-01
38	Chorongo 400 m	29-May-03
42	Matapalo 300 m	28-May-03
46	Harpía 1250 m	22-Jul-01