

## MÉTODOS DE MUESTREO NO INVASIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA DIVERSIDAD DE MAMÍFEROS

González, S.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Uno de los factores limitantes para desarrollar estudios de caracterización genética y diseñar programas de manejo genético en mamíferos silvestres es la obtención de muestras en forma no invasiva, evitando capturar, o lesionar los individuos. El objetivo de este trabajo fue efectuar una revisión de las técnicas de muestreo no invasivas para el diagnóstico de la diversidad genética de mamíferos, subrayando las ventajas, y limitantes de ellas, analizando ejemplos de estudios de mamíferos neotropicales. Existe una amplia variedad de técnicas no invasivas que son de utilidad para el diagnóstico de especies en un área como la búsqueda de huellas, fecas, despojos y carcasas. Otro equipamiento muy útil que permite generar un banco de imágenes son las “cámaras remotas”. El avance de las técnicas de biología molecular ha posibilitado extraer y amplificar ADN de fecas que permite analizar la diversidad de especies y la variabilidad genética a nivel intraespecífico.

**PALABRAS CLAVE:** muestreo no invasivo, huellas, fecas, ADN fecal.

### SUMMARY

## NON-INVASIVE SAMPLING METHODS TO MONITOR MAMMALS DIVERSITY

One of the limiting factors to develop genetic studies in wild mammals to apply to genetic management is obtaining the sampling in a non invasive fashion avoiding capturing or stressing the individual. The objective of this paper was to review the available non invasive sampling techniques useful to apply to diagnostic the mammal genetic diversity assessing the advantages and disadvantages, and analyzing examples of Neotropical mammal's studies. There is a wide range of non invasive sampling techniques useful to determine species inhabit in an area as searching for tracks, feces, and carcass. Other useful equipment is the camera traps that can generate an image bank. With recent advances in molecular biology, it is now possible to use the trace amounts of DNA in feces and amplify it to analyze the species diversity in an area and the genetic variability at intraspecific level.

**KEY WORDS:** non invasive sampling, tracks, feces, fecal DNA.

## INTRODUCCIÓN

Las especies amenazadas de extinción generalmente son las que menos se conocen aspectos básicos de la biología y genética. El avance de las técnicas de biología molecular y paralelamente los problemas de conservación actuales han confluído en desarrollar una nueva rama dentro de la genética, “la genética de la conservación”. La genética de la conservación estudia los factores genéticos que afectan el riesgo de extinción, así como cuales son las condiciones de manejo genético necesarios a emplear para minimizar dicho riesgo (Frankham *et al.*, 2002).

La estrategia de muestreo es uno de los factores limitantes para desarrollar estudios de caracterización genética, que permitan aplicar esta información para diseñar programas manejo genético de la población. En el momento de planificar el muestreo es importante considerar cual será la estrategia más adecuada que permita obtener un número de muestras representativas, que no lesionen o alteren a los individuos o sus hábitats.

Otro aspecto importante a considerar es cual es la pregunta que motiva nuestro estudio de diversidad genética. El término diversidad genética puede estar empleado en diferentes niveles: a) Diversidad de Especies es el rango

<sup>1</sup>División Citogenética-IIBCE-Facultad de Ciencias Udelar, Montevideo- Uruguay.

de especies en un ecosistema dado y b) Diversidad Genética: es la variación genética encontrada dentro de cada especie. En cada caso se emplearan marcadores genéticos adecuados.

El objetivo de este trabajo fue efectuar una revisión de las técnicas de muestreo no invasivas para el diagnóstico de la diversidad genética de mamíferos, subrayando las ventajas, y limitantes de ellas, analizando ejemplos de estudios de mamíferos neotropicales.

## TÉCNICAS DE MUESTREO NO INVASIVO

### Huellas, Trillos y carcasas

En todas las culturas la observación y búsqueda de huellas, siempre se han utilizado para seguir el rastro de los animales que habitualmente cazaban. Para determinar la presencia y realizar estimaciones acerca de la abundancia de las especies en un área, el uso de huellas, trillos, así como los vestigios que dejan los ejemplares en los sitios de descanso, pelos y las fecas son de gran utilidad.

En la actualidad, para conocer las áreas de uso y estimar la abundancia relativa de las especies en un área, se buscan huellas y trillos. Existen publicaciones de catálogos y claves de identificación de huellas de mamíferos que son de gran utilidad.

En el caso de efectuar un inventario de mamíferos estaremos interesados por el diagnóstico a nivel de diversidad de especies en cada ecosistema del área, así como de realizar inferencias acerca del número de ejemplares que pueden estar utilizando el área.

Las huellas pueden medirse y fotografiarse para analizarlas con más detalle y poder identificar la especie con más certeza y en algunos casos puede llegar a hacerse inferencias acerca del sexo y la edad del individuo. También las huellas pueden ser replicadas por diferentes métodos como por ejemplo con yeso, parafina, arena y polvos ultravioletas, esto permitirá hacer un análisis más detallado de la muestra en caso de dudas para la determinación de la especie.

Otro material útil son los restos óseos y carcasas. Cuanto más fresco sean los restos permitirán obtener mayor información biológica y sanitaria inclusive hasta la posible causa de muerte. Para genética en cualquier estado de conservación un fragmento de tejido posibilitará la extracción de ADN en el laboratorio.

Otra forma indirecta y no invasiva de inferir las especies de micro mamíferos en un área es a través del análisis de las egagropilas, (bolos de regurgitación de búhos y

lechuzas) que contienen los restos óseos y los pelos del o/ los ejemplares que consumió.

La colecta de pelos en dormideros o colocando en los lugares de pasaje instrumentos que arranquen o peguen los pelos son muy útiles. Existen guías para determinación de especies por pelos y si el mismo presenta el bulbo piloso puede extraerse también ADN. Varios estudios de genética poblacional de especies amenazadas se han efectuado muestreando pelos de los ejemplares (González *et al.*, 1998).

### Cámaras remotas o cámaras trampa

Otra alternativa es el registro fotográfico de los ejemplares mediante el empleo de "cámaras remotas o cámaras trampa". Este equipamiento consta de un emisor infrarrojo, un receptor y una cámara fotográfica. Cuando el animal corta el rayo infrarrojo, se envía una señal a la cámara que se activa y lo registra. También puede registrarse el día, hora y año de la observación. El trabajo con este equipo permite realizar inventarios, estimar abundancia y determinar patrones de actividad (Wemmer *et al.*, 1996). En general se utilizan para efectuar inventarios y en combinación con otras técnicas no invasivas. Los bancos de imágenes digitales permiten tener un registro fotográfico de las especies e individuos monitoreados en un área.

### ADN fecal

En la última década se comenzó a trabajar en especies en peligro de extinción, utilizando protocolos de extracción de ADN de fecas. Para ello hay que poner a punto la colecta de fecas (de acuerdo a la antigüedad de la deposición), método de almacenaje y de extracción (Hoss *et al.*, 1992).

Las fecas son abundantes, su colecta puede ser totalmente no invasiva, y un gramo de fecas contiene células de la mucosa intestinal de las cuales se puede extraer abundantes cantidades del ADN (Albaugh *et al.*, 1992).

El ADN fecal es útil para estudios de campo en biología dependiendo de determinados puntos claves:

a) el largo y número de copias de la molécula de ADN que pueden ser extraídos y amplificados de fecas.; b) confirmar que el ADN amplificado por esta vía es idéntico al obtenido del mismo individuo de otros tejidos o sangre; c) eliminación del riesgo de contaminación; d) prevenir la degradación de la muestra en el laboratorio o en el campo y e) remover los inhibidores de la dieta (Wasser *et al.*, 1997).

Avances recientes en la preservación de las muestras, protocolos de extracción, y amplificación por PCR con primers adecuados han producido un desarrollo importan-

te de la escatología molecular. El ADN fecal en general se encuentra degradado y en bajas concentraciones. Sin embargo puede ser útil para amplificar por PCR con primers de ADN mt y ADN nuclear especialmente de microsátelites (Kohn & Wayne, 1997).

### Colecta y preservación de fecas

Los métodos de preservación son simples y requieren de mínimo equipamiento de campo. El equipo consiste en: tubos Falcons 50 mL, guantes, etanol 70 o 95 %, bolsas plásticas, y marcador permanente para etiquetar las muestras. Las muestras deben colectarse con guantes para evitar contaminación. Es importante etiquetar la muestra con la información del sitio, los datos de posición geográfica colocando las coordenadas por medio de un GPS, así como fecha, hora de colecta y condiciones climáticas. Otras observaciones importantes a registrar son: si las fecas estaban frescas o secas, si se observan coprófagos, adultos o larvas, así como parásitos. Todas estas informaciones van a ser útiles para replicar el muestreo en caso que sea necesario o para interpretar los resultados en el laboratorio.

### Extracción de ADN

Los protocolos comunes que se utilizan para la extracción de ADN de tejidos son útiles pero tienen problemas por que no se remueven los inhibidores que están presentes en las fecas. Los kits comerciales aseguran que la calidad y cantidad del ADN sea óptima porque remueven las sustancias inhibitoras y se concentra el ADN. La calidad y concentración del ADN extraído van a asegurar el éxito de la amplificación con el marcador molecular elegido (Kohn *et al.*, 1995).

### Construcción de marcadores moleculares

En términos generales es más fácil amplificar fragmentos de ADN entre 150 -200 pb, que no excedan de 300 pb. Además se obtienen mejores resultados cuando se amplifica el ADN mt, que cuando se intenta amplificar marcadores nucleares (González *et al.*, 2004; Kohn *et al.*, 1992).

El *ADN Mitocondrial* (ADNmt) es un pequeño genoma extranuclear de aproximadamente 16 KB en la mayoría de las especies de mamíferos, se hereda en forma materna, es haploide, no recombinante (Kohn & Wayne, 1997). Cada célula tiene múltiples copias de ADNmt (entre 10-2500 copias) y este sería el motivo que explica que la amplificación resulte más fácil que el ADN nuclear que se encuentra en forma de simple copia.

El gen del citocromo b (cyt b) del ADN mt tiene variación moderada a nivel intraspecífico siendo apropiado para estudios taxonómicos y filogenéticos.

En los cérvidos neotropicales existen áreas de simpatria entre especies y además con el ganado doméstico. Por lo tanto si se colectan fecas sin tener la oportunidad de ver el animal es esencial determinar a cual especie pertenecen las fecas. Para efectuar estudios de taxonomía se requiere previamente tener un banco de secuencias del cyt b del ADNmt de las especies que posiblemente habitan en el área. Este banco va a ser útil para el diseño de primer específicos que amplifiquen una secuencia corta entre 200-300 pb de este marcador en ADN fecal y que sea informativa para efectuar estudios taxonómicos (González *et al.*, 2004).

La región de control del ADNmt es comúnmente variable a nivel intraespecífico y apropiada para utilizar en estudios de variabilidad genética, filogeografía, para asignar unidades de manejo, y aplicaciones forenses (Kohn & Wayne, 1997). Analizando las secuencias de ADN de diferentes poblaciones e individuos pueden definirse la estructura poblacional, detectar introgresión de otra especie, detectar cuellos de botella, patrones de migración y de las historias demográficas.

Los análisis moleculares genéticos utilizando ADN fecal contribuyen a resolver casos forenses aplicados a la conservación de las especies, auxiliando para detectar infractores en el caso de caza ilegal, comercio y tráfico de especies en peligro de extinción. También son útiles para resolver aspectos de la biología de la especie tales como detectar cuellos de botella y otros eventos en la historia poblacional como estimar el tamaño efectivo, detectar selección, parentesco, relación de sexos, sistemas de apareamientos, estructura poblacional, tasa de dispersión, dieta estatus de enfermedades.

*Los Microsátelites* son secuencias cortas de ADN de copia simple del genoma nuclear que se encuentran repetidas en tandem como (CA)<sub>n</sub>. Están distribuidos en todos el genoma y son altamente polimórficos. Empleando varios loci de microsátelites pueden genotiparse los individuos. Estos marcadores se heredan en forma codominante, son útiles para el estudio de la paternidad, parentesco, variación genética, estructura poblacional y flujo génico. Los microsátelites que han sido identificados en una especie pueden ser empleados en especies relacionadas.

El monitoreo del número de ejemplares de la población se puede realizar amplificando ADN fecal, con primers que permitan amplificar microsátelites. Una vez que se ha caracterizado la población se pueden efectuar estimaciones poblacionales utilizando la técnica de "captura-recaptura" (Kohn *et al.*, 1999). Además se puede predecir la tendencia demográfica y detectar si existe una tendencia negativa cual factor pueda ser el que esta incidiendo.

Una de las limitantes que tiene el empleo de estos marcadores es que al utilizar ADN fecal existe riesgo de errores en el genotipado con microsatélites, siendo necesario hacerse por lo menos por cada muestra 3 amplificaciones para corroborar el genotipo obtenido (Gerloff *et al.*, 1995; Taberlet *et al.*, 1996, 1999). Estos errores se deberían a amplificaciones inespecíficas debido a la baja calidad y poca concentración del ADN molde fecal nuclear.

### Sexaje de muestras

Para analizar la estructura poblacional son empleados primers que amplifican un fragmento del gen SRY que está localizado en el cromosoma Y (Kohn & Wayne, 1997). Este gen es altamente conservado en mamíferos y se puede diseñar o emplear primers que amplifiquen fragmentos pequeños del gen SRY.

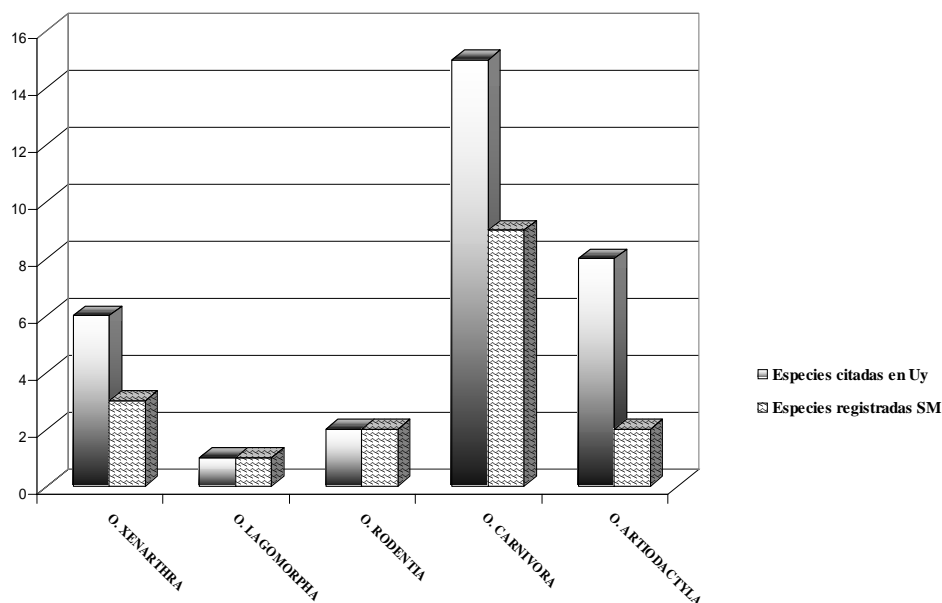
### Diagnóstico de enfermedades

Un gran número de ADN de patógenos (virus, bacterias, protistas y macro-parásitos) pueden amplificarse empleando primers específicos en el ADN fecal que permiten hacer el diagnóstico de enfermedades. El monitoreo de patógenos permite examinar el estado sanitario y posibles causas de morbi/mortalidad en la población. Si se pudiera expandir la metodología para abarcar la mayor cantidad de enfermedades posibles en la fauna silvestre se evitaría instrumentar métodos de captura que son costosos y riesgosos para los ejemplares.

## DIVERSIDAD DE ESPECIES EN UN ECOSISTEMA

### Casos Estudiados en ecosistemas del Uruguay

El Parque Nacional San Miguel ubicado en el Depto de Rocha, presenta 1557 ha que conforman diversos ecosistemas. Durante los dos últimos años hemos realizado un inventario de grandes mamíferos aplicando técnicas de muestreo no invasivas, utilizando para ello huellas, trillos, fecas y una cámara remota Trail Master (González *et al.*, 2003). La cámara fue instalada en cinco áreas diferentes del Parque por períodos de 15 días, al final de los cuales se extraía la información de los registros fotográficos. En el Parque fueron determinadas las siguientes especies: zorro perro *Cerdocyon thous*, zorro de campo *Pseudalopex gymnocercus*, gato montés *Oncifelis geoffroyi*, guazubirá *Mazama gouazoubira*, mano pelada *Procyon cancrivorus*, jabalí *Sus scrofa* y tatu *Dasypus novemcinctus*. Para el género *Leopardus* se registró un ejemplar fotografiado dorsalmente, que no permite la determinación a nivel de especie. Con las fotografías de las especies se hizo un banco de imágenes con fines educativos y de divulgación. Se efectuaron comparaciones de la diversidad de especies registrada en el Parque en relación a las especies citadas para el Uruguay (Fig. 1). Los resultados son de interés para implementar medidas de conservación y manejo.



**Figura 1.** Gráfica comparativa de la diversidad de órdenes de mamíferos en el Parque Nacional San Miguel (SM) y las de Uruguay (UY).

## Diversidad Genética a nivel intraespecífica

### Casos Estudiados en especies neotropicales

La dinámica poblacional y la ecología de los cérvidos neotropicales es aún un área inexplorada, debido a que muchas de las especies habitan en áreas de difícil acceso, con bajas densidades poblacionales, dificultando el monitoreo y el seguimiento de las especies. Las técnicas de muestreo no invasivas basadas en la colecta y morfología de las fecas brindan información valiosa acerca de la presencia de las especies en el área. Sin embargo existen varias especies de cérvidos neotropicales en simpatria siendo necesario realizar la determinación taxonómica de forma confiable. Con el objetivo de efectuar la determinación taxonómica y estimar la razón de sexos de las muestras desarrollamos una técnica basada en la amplificación de ADN fecal por PCR (González *et al.*, 2004).

Previamente se analizaron ejemplares de nuestro banco de ADN de cérvidos neotropicales de los géneros *Ozotoceros*, *Blastocerus*, *Hippocamelus* y *Mazama* y se diseñó un primer que amplifica un segmento de 280 pb de la región de control mitocondrial. Conjuntamente en la reacción se incluyeron primers de SRY para sexaje, ajustándose las condiciones de amplificación para ambos primers en la misma reacción. La reacción de PCR es testada en un gel de agarosa al 2% en el cual se detectan en los machos dos bandas una de 216 pb y otra banda de 280 pb que corresponde al producto amplificado de la región de control, amplificando sólo esta última en las hembras. El primer de la región de control amplifica en los *Mazamas* rojos (*M americana*, *M bororo* y *M nana*) dos fragmentos uno de 280 pb y otro de 320 pb. Para realizar la clasificación taxonómica en forma confiable y analizar la variabilidad genética debe secuenciarse el fragmento amplificado de la región de control.

## CONCLUSIONES

La utilización de los diferentes métodos de muestreo no invasivo en diversos proyectos de investigación de especies amenazadas ha permitido desarrollar nuevas estrategias, equipos y protocolos que permiten conocer más de estas especies y diseñar planes para la conservación y manejo de las áreas que ocupan.

En el futuro tendremos que focalizar esfuerzos en entrenar y capacitar biólogos de campo en la búsqueda de huellas, fecas, así como otras evidencias de la presencia de las especies en el área. Estas técnicas tradicionales, en conjunto con tecnologías modernas como las cámaras trampa y de biología molecular, que permiten extraer y amplificar

ADN fecal, son muy útiles para hacer inventarios globales de áreas, así como monitorear especies en particular.

## AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones que se hace referencia en el manuscrito fueron financiadas por: Neotropical Fund-Cleveland Metro Park Zoo, Wildlife Trust, Wildlife Trust Alliance y Comisión Sectorial de Investigación Científica (Csic-Udelar). Se agradece a los organizadores la invitación a participar en el mismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALBAUGH, G.P.; IYENGAR, V.; LOHANI A.; MALAYERI, M.; BALA. S. & MAIR, P.P. 1992. Isolation of exfoliated epithelial cells, a novel, non invasive approach to the study of cellular markers. *Int. Journal of Cancer*, 52: 347-350.
- FRANKHAM, J., BALLOU, J.D & BRISCOE, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- GERLOFF, U., SCHLÖTTERER, C. & RASSMANN, K. 1995. Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). *Molecular Ecology*, 4, 515-518.
- GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J.E.; LEONARD, J.A. VILÁ, C.; BARBANTI DUARTE, J.M.; MERINO, M.; BRUM-ZORRILLA, N. & WAYNE, R.K. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7:47-56.
- GONZÁLEZ, S. ROIBAL, D. & COSSE, M. 2003. Inventario de grandes mamíferos en el Parque Nacional San Miguel. VII Jornadas de Zoología del Uruguay. Sociedad Zoológica del Uruguay. 13-17 Octubre, Montevideo- Uruguay Pp 61.
- GONZÁLEZ, S., ÁLVAREZ -ÁLVAREZ, R. & MALDONADO J. E. 2004. Técnica molecular para la determinación taxonómica y análisis poblacional en cérvidos neotropicales VI International Conference on Wildlife management in Amazonia and Latinamerica, Iquitos-Perú Pp 94.
- HOSS, M. KOHN, M., KNAUER, F., SCHRÖDER, W. & PÄÄBO, S 1992. Excrement analysis by PCR *Nature*, 359, 199.
- KOHN, M., KNAUER, F., STOFFELLA, A., SCHRÖDER, W. & PÄÄBO S 1995. Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology*, 4, 95-103.
- KOHN, M.H. & WAYNE, R. K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology and Evolution*. 12:223-227.

- KOHN, M.H., YORK, E.C., KAMRADT, D.A., HAUGHT, G., SAUVAJOT, R.M. & WAYNE R.K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 7; 266:657-663.
- TABERLET, P., GRIFFIN, S. & GOOSSENS, B. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *NucleicAcids Research*, 24: 3189–3194.
- TABERLET, P.; WALTS, L.P. & LUIKART, G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution.* 14: 323-327.
- WASSER, S.K.; HOUSTON, C.S.; KOEHLER, G.M.; CADD, G.G. & FAIN, S.R. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology.* 6: 1091-1097.
- WEMMER, C., KUNZ, T. H., LUNDIE-JENKINS, G. & MCSHEA, W. J. 1996. Mammalian Sign. In: Wilson, D. E. *et al.* (ed), *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Mammals.* pp 157 – 176, Smithsonian Inst. Press. Washington and London .