



TÉCNICAS DE MUESTREO PARA ANÁLISIS GENÉTICOS

Introducción

En los próximos renglones se pretende delinear los procedimientos de recolección de muestras de material adecuado para análisis genéticos. Un biólogo de campo o veterinario tiene numerosas opciones de muestras adecuadas para este tipo de análisis. Cualquier muestra de pelo o materia fecal puede transportar ADN de buena calidad, **si se colecta y preserva apropiadamente.**

Consideraciones Generales de Muestreo

La mayor dificultad para coleccionar material biológico con propósitos genéticos es evitar la degradación del ADN. Los principales agentes degradadores de ADN en muchas muestras son las enzimas ADNasas. Estas pueden estar ya presentes en la misma muestra, o ser producidas por los microorganismos que crecen en la misma. De todos modos, el objetivo principal es inactivar o impedir que estas enzimas actúen.

Existen varias formas para inactivar enzimas, pero éstas son usualmente costosas o requieren de reactivos que generalmente no están disponibles para muchos biólogos y veterinarios de campo. Sin embargo, prevenir la actividad de las ADNasas es mucho más fácil y se consigue generalmente al deshidratar la muestra. Las formas más comunes, eficientes y fáciles de hacerlo son:

1. Deshidratación de la muestra con silica gel u otro desecante. Se pueden encontrar usualmente en los supermercados, tiendas de arte y tiendas de flores (flores secas). Las muestras desecadas son usualmente fáciles de transportar, aunque pueden existir algunas restricciones en los países a donde se van a importar, debido a que pueden transportar esporas viables, virus y bacterias potencialmente patógenas para seres humanos y ganado en dichos países.
2. Deshidratación de la muestra con etanol (70 – 100%). A menor concentración mas fácil su transporte, porque es menos inflamable. Sin embargo, a menor concentración, mayor será la degradación del ADN. Por eso no se recomiendan concentraciones inferiores al 70%, Adicionalmente, no se recomiendan alcoholes diferentes al etanol (por ejemplo metanol), porque éstos interfieren en los procesos de extracción y amplificación de ADN.

De ésta forma, muchas muestras que usted colecciona estarán o desecadas o preservadas en etanol. Además, usted debe tener en mente:

1. **Etiquetado:** Etiquete siempre sus muestras y tenga una libreta de apuntes extra. Las etiquetas en las muestras deben incluir un número de referencia, la fecha en que fue coleccionada, la localidad y la especie. El número de referencia debe ser usado para referenciar la muestra en la libreta de apuntes con la misma información de la etiqueta, además del nombre del recolector, la medida de GPS del punto exacto de muestreo, y cualquier otra observación que se considere pertinente. La medida de GPS es información esencial para muchos análisis genéticos, y debe ser tomada siempre. Finalmente, utilice marcadores apropiados para etiquetar sus muestras. Por ejemplo, cuando etiquete un tubo con etanol, use marcadores permanentes, los cuales no se borrarán con el etanol, o papel cocido marcado con lápiz, y coloque el papel dentro del tubo. Lo ideal es que use las dos técnicas.

- Evite la contaminación:** Es muy fácil contaminar las muestras con ADN humano. Para muchos análisis esto no es problema, porque se usan métodos específicos para las especies en consideración, o se usan procedimientos que no recogen el ADN humano de la muestra. No obstante, podría ser un problema para algunas aplicaciones, sobre todo si estamos intentando sexar individuos. No es necesario usar guantes y máscara si usted está en campo, pero debe tener cuidado de evitar manipular cualquier muestra con sus manos. Más pretenciosamente, nosotros queremos evitar la contaminación indirecta entre las muestras. Por consiguiente, esterilice siempre su escalpelo antes de tomar una muestra del tejido, use siempre una ramita nueva para manipular una muestra nueva de estiércol, y siempre use una jeringa nueva para coleccionar una muestra nueva de sangre.
- Mayor cantidad no es a menudo lo mejor:** A veces uno tiene la tentación de coleccionar la mayor cantidad de material como fuese posible. Sin embargo, llenar totalmente un tubo con muestra de tejido o heces no es la mejor manera de conservar material genético. Al llenar totalmente el tubo con muestra de material biológico se deja muy poco espacio para el agente conservador. Si usted está conservando sus muestras de heces en etanol, debe asegurarse que hay bastante etanol en el tubo para cubrir la muestra entera. Así usted se asegura que las muestras se conservarán. ¡De otra forma, solo obtendremos un montón de muestras inútiles! Ahora, si usted encuentra un buen montón de estiércol fresco y siente la necesidad de coleccionar todo el material posible, usted puede dividir la muestra en dos o tres tubos diferentes.

Tipos de Muestras

Pelo - una de las mejores muestras

El pelo es probablemente una de las mejores muestras para coleccionar. Es fácil de conservar y transportar y es muy fácil extraer de él ADN de buena calidad. Si usted está trampeando animales en campo o puede tener acceso a animales de origen conocido en parques zoológicos, éste es probablemente el mejor método. Además, si usted está en una salida de campo y puede encontrar fácilmente lugares donde los animales se hayan rascado, los pelos que obtenga seguramente serán también muestras de buena calidad.

Si usted va a arrancar muestras de pelo de un animal, busque siempre los vellos gruesos y limpios que sean difíciles de extraer. Estos vellos normalmente contienen los folículos capilares, o bombillas, en las cuales hay tejido viviente del que se puede extraer ADN. La cantidad de ADN de 5 a 10 de estos vellos es suficiente para estudios genéticos.

Las muestras de pelo se conservan mejor en seco, en sobres sellados sin cera. Usted puede etiquetar sus muestras escribiendo la información en los sobres. Los sobres debidamente sellados y etiquetados se pueden guardar en un recipiente seco o en una bolsa plástica con sílica gel o algún otro agente desecante. Los sobres sin cera son porosos, lo cual permite a la muestra mantenerse ventilada.

Materia Fecal - probablemente la segunda mejor muestra

La materia fecal o heces son muy fáciles de coleccionar y proveen ADN bastante bueno cuando se coleccionan frescas. La otra gran cosa acerca de este tipo de muestras es que no necesitamos permiso de CITES para transportarlas, y si se conservan en el etanol no se requiere de permiso de importación en la mayoría de países. No obstante, en algunos países podría requerirse de permiso de exportación. Finalmente, éstas son excelentes porque se evita estresar al animal al no requerirse ninguna manipulación, y normalmente podemos obtener mayor cantidad de muestras de esta manera.

Dos cosas para tener presente cuando se coleccionan heces son: primero, que queremos que sean lo más frescas posibles y segundo, que sólo queremos la capa exterior. La capa exterior fue la última parte que estuvo en estrecho contacto con la pared intestinal, así que ésta es la capa con las células del animal. Si la capa exterior tiene cualquier tipo de hongo, insectos, o cualquier otra posible contaminación probablemente

el extracto de ADN no trabajará. Por otro lado, si usted está muestreando en un ambiente muy seco y la capa exterior está muy seca, nosotros podemos trabajar con este ADN, incluso aunque el material tenga varias semanas de colectado. Otra cosa importante para tener presente es evitar manipular las heces con las manos desnudas. De ésta forma evita contaminar las muestras y a su vez conserva su propia salud. La mejor solución es quebrar una pequeña rama de un árbol cercano, e inclusive romperla por la mitad y usar este pedazo para manipular el estiércol.

Para coleccionar una muestra, abra el tubo de muestreo (use preferiblemente tubos de 5 ml.), colocando la tapa boca arriba. Con una mano sujete la ramita y con la otra lleve la boca del tubo cerca del lugar donde va a tomar la muestra. Use la ramita para raspar alrededor de 1cm^2 de la superficie y deposítela dentro del tubo. Usted puede coleccionar otra muestra igual de alguna otra porción del estiércol. Usted debe tener ahora alrededor de 2ml de estiércol en los tubos. Usted debe entonces llenar el tubo con etanol (entre 70-100%) y de esta manera tener su muestra en una proporción de 3:2 de etanol y estiércol.

Cierre el tubo y envuelva la tapa en parafilm evitar goteos, descarte la ramita y use una nueva para cada tubo de muestreo - esto es muy importante para evitar la contaminación cruzada entre los tubos. Recuerde etiquetar todas sus muestras. Las muestras de heces conservadas de esta manera pueden guardarse a la temperatura ambiente.

En el caso de animales que defecan en el agua, hay estudios en los que se extrajo con éxito ADN de muestras de excremento de delfines y dugongos. En el caso del delfín, los investigadores estaban con los animales cuando defecaron y pudieron muestrearlos inmediatamente después de que defecaron. De esta manera, las muestras estaban muy frescas. En el caso del dugongo, se encontraron las muestras flotando después de un tiempo indeterminado, coleccionadas individualmente en bolsas plásticas, y congeladas hasta que la extracción de ADN fuera posible. Si usted encuentra estiércol de tapir de tierras bajas aparentemente intacto flotando o bajo el agua, nosotros sugerimos remover la parte superficial con una bolsa plástica limpia (una por muestra), y entonces usar el procedimiento descrito anteriormente. Se requiere de varias pruebas para verificar si este protocolo es adecuado, pero la muestra debe transportar alguna cantidad de ADN si está relativamente fresca.

Como un comentario final, el muestreo debe hacerse en campo. En campo, nosotros estamos tentados a coleccionar tanto estiércol como sea posible, y después procesarlo en el laboratorio. Esto debe evitarse lo máximo posible llevando a cabo todo el procedimiento en campo. Así usted evita posibles contaminaciones cruzadas y lo hace todo de una vez.

Muestras de Tejido - buen ADN, difícil transportar

Las muestras del tejido pueden proporcionar muy buen ADN, sin embargo son difíciles transportar debido al CITES y otras regulaciones. Mas aún, si usted está trampeando animales, trabaja en un área donde hay rutas de atropellamiento o cacería, sería toda una vergüenza que usted pudiese coleccionar varias de estas muestras para después tener que arrojarlas a la basura. Cuando colecciona muestras del tejido, siempre tenga presente que se requiere muy poco material y que debe esterilizar su escalpelo antes de coleccionar una nueva muestra.

Si usted se encuentra con una ruta de atropellamiento o está trampeando animales, la mejor parte para muestrear es la oreja. Un pequeño fragmento de 1cm^2 o menos proporciona ADN de excelente calidad y cantidad. Un pequeño pedazo de oreja es mucho mejor, por ejemplo, que una porción de músculo, porque no se pudre tan fácilmente. No obstante, si usted se encuentra con la carne fresca (digamos que se topa con un cazador), huela la carne, si hay malos olores entonces el extracto de ADN probablemente no trabajará. Si no huele mal, entonces puede cortar unos mm^2 de tejido para analizar.

La mejor manera de conservar las muestras de tejido es sumergirlas en el etanol. Usted tiene que estar atento a que haya suficiente etanol en el tubo de muestreo para cubrir toda la muestra. Si usted está muestreando sólo un par de mm^2 de tejido, usted puede usar tubos de 2ml y llenarlos con etanol. De

nuevo, usted debe envolver la tapa con parafilm para evitar goteos y etiquetar los tubos apropiadamente. Las muestras de tejido conservadas de esta manera pueden conservarse a temperatura ambiente.

Muestras de Sangre - ADN excelente, pero costoso

La sangre produce probablemente el ADN de mejor calidad, sin embargo es caro obtener y extraer el ADN. Además, obtener la muestra implica casi siempre derribar el animal, lo cual no es ideal si se requiere gran cantidad de muestras.

La mejor manera de conservar sangre puede ser o usando Vacutainers (de tapa púrpura - con EDTA) o el Easy Blood Buffer (EBB). Si se usa Vacutainer, asegúrese de mezclar bien de tal manera que el EDTA entre en solución, y mantenga en refrigeración. Si usa EBB debe mezclar un volumen de sangre con un volumen de EBB, y también guardar en refrigeración. Nosotros normalmente necesitaremos sólo una pequeña cantidad de sangre para poder extraer ADN. Por consiguiente, aproximadamente 1ml de sangre debe ser más que suficiente para los estudios genéticos.

Otros Tipos de Tejido

Los huesos y dientes pueden proporcionar cierta cantidad de ADN, pero es una fuente inestable y difícil. Adicionalmente, los huesos pueden ser difíciles de transportar. Por consiguiente, nosotros no recomendamos usar este material para el análisis genético.

Consideraciones para el Envío

Si va a enviar muestras a otro país, nosotros le recomendamos usar un servicio de mensajería como FedEx o UPS. Esto va a implicar costos de envío un poco más altos, pero a cambio usted logrará que sus muestras lleguen más rápido a su destino. Adicionalmente, debe declarar un valor nominal de US\$1.00 en los formularios de aduana e indicar "Valor para costos aduaneros únicamente". Las aduanas interpretarán que valores más altos significan que nosotros estamos comprando las muestras que usted nos envía, y esto dará como resultado que se asignen tasas e impuestos de importación. También recuerde incluir con la factura de envío una copia de sus permisos CITES para exportación/importación

Lecturas Sugeridas

- Fernando, P., and D. J. Melnick. 2001. Molecular sexing eutherian mammals. *Mol Ecol Notes* **1**:350-353.
- Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. K. Wayne, and M. H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Mol Ecol* **7**:1423-1428.
- Kohn, M. H., and R. K. Wayne. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution* **12**:223-227.
- Parsons, K. M. 2001. Reliable microsatellite genotyping of dolphin DNA from faeces. *Mol Ecol Notes* **1**:341-344.
- Parsons, K. M., J. F. Dallas, D. E. Claridge, J. W. Durban, K. C. Balcomb Iii, P. M. Thompson, and L. R. Noble. 1999. Amplifying dolphin mitochondrial DNA from faecal plumes. *Mol Ecol* **8**:1766-1768.
- Reed, J. Z., D. J. Tollit, P. M. Thompson, and W. Amos. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol Ecol* **6**:225-234.
- Taberlet, P., and L. P. Waits. 1998. Non-invasive genetic sampling. *Trends in Ecology & Evolution* **13**:26-27.
- Wasser, S. K., C. S. Houston, G. M. Koehler, G. G. Cadd, and S. R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Mol Ecol* **6**:1091-1097.

Sitios de Internet Sugeridos

Field Vet Program (WCS) - www.fieldvet.org

Wildlife Genetics, Inc - www.wildlifegenetics.ca/pages/samples