



2. MATERIAL Y METODOS

2.1.- RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN

El material fue recogido en el campo por la guardería especializada que siguió meticulosamente un protocolo previamente establecido para evitar contaminaciones y asegurar el buen estado de conservación de las muestras de ADN. Las muestras se recogieron y se manejaron utilizando guantes, mascarillas y pinzas estériles desechables. Las muestras de pelos y heces se conservaron *in situ*, siempre en seco. Los pelos en sobres de papel y una pequeña parte de excremento (aproximadamente 3 g) en tubos de plástico que contenían silicagel.

Sobre los tubos y los sobres se reseñaban los datos de lugar y fecha de colecta así como el nombre del recolector. Con la totalidad de los datos de las muestras recogidas se hizo una base de datos que se muestra en el anexo I.

Las muestras se separaron en dos partes, uno de los lotes permanece en el MNCN como testigo para poder repetir el análisis si fuera necesario y el segundo lote se llevó al Laboratoire de Biologie des Populations d'Altitude perteneciente a la Universidad Joseph Fourier de Grenoble (Francia) donde se realizó la primera parte del análisis molecular.

2.2.- ANALISIS DE LABORATORIO

2.2.1.- EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción a partir de pelo se ha realizado con Chelex según el protocolo propuesto por Walsh *et al.* (1991). Después de verificar la presencia de raíz en la base de un único pelo, ésta era cortada sobre un tubo que contenía agua destilada y Chelex. El tubo era agitado suavemente durante algunas horas, después era incubado a 100°C para desnaturalizar las proteínas. El Chelex es una resina que impide la degradación del ADN uniéndose a las nucleasas. Un control negativo (tubo tratado de la misma manera que el resto pero sin raíz) se incluyó para detectar las posibles contaminaciones por ADN extraño al portado por la muestra.

La extracción a partir de heces se hizo según el protocolo propuesto por Boom *et al.* (1990) o método de la sílice. Un pedazo de excremento se coloca en un tubo con tampón de extracción que sirve para desnaturalizar las proteínas celulares, estos tubos se incuban a una temperatura de 60°C durante 12 a 14 horas. Después de centrifugar dichos tubos se recoge el sobrenadante (que contiene el ADN) que se coloca en otro tubo con tampón de extracción y la sílice, a la cual se adhiere el ADN. El sobrenadante se tira y la sílice se lava. El ADN se separa de la sílice y se resuspende en TE (tampon de conservación Tris-EDTA).

Después de extraer el ADN se procedió a amplificarlo por PCR (reacción en cadena por la polimerasa), método *in vitro* que produce importantes cantidades del ADN problema, a partir de una secuencia bien definida de ADN (cebador) con cantidades ínfimas de partida. Como el ADN extraído es muy escaso se aplica un tipo de PCR especial denominado "PCR booster" según el protocolo de Ruano *et al.* (1989). Esta técnica propone el uso de dos fases: una primera fase en la que los productos de amplificación se añaden con concentraciones muy diluidas y una segunda fase, en el mismo tubo, en la que los cebadores se incorporan con una concentración superior. Con este método se consigue aumentar la eficacia evitando la aparición de artefactos originados por el solapamiento de los cebadores y se obtiene mayor rendimiento del ADN amplificado. Los cebadores utilizados para esta primera fase de amplificación de control han sido los correspondientes al microsatélite MU64, el cual exclusivo del género *Ursus*.

Una vez terminada la extracción y amplificación de las muestras, las que resultaron con amplificación positiva se etiquetaron definitivamente y se conservaron en congeladores de -20°C.

2.2.2.- AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

La técnica de PCR desarrollada por Kary Mullis en 1987, permite la amplificación de secuencias de ADN a partir de muestras que sólo contienen pequeñas cantidades de ADN. Esta técnica es apropiada para estudios sobre extractos degradados obtenidos a partir de pelo, heces, ejemplares de museos, etc. El principio del PCR está

representado en la figura 2. Se eligen dos cebadores con longitudes 20 a 30 nucleótidos que coinciden con los extremos de la secuencia deseada. Cada uno de ellos es complementario con una de las dos hebras del ADN modelo. La reacción está constituida por tres etapas. En la primera se produce la desnaturalización o separación de las dos cadenas de la doble hélice de ADN; se efectúa en un corto período de tiempo a temperatura elevada. En la segunda fase, a

temperatura más baja, los cebadores hibridan específicamente con la secuencia correspondiente de las hebras de ADN simple. Durante la última etapa, la ADN polimerasa, en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato va alargando los cebadores, sintetizando así una secuencia complementaria al ADN modelo. Los parámetros de temperatura y duración de cada etapa, así como el número de ciclos y la concentración de los componentes de la reacción deben ser específicos para obtener un mayor rendimiento. Los parámetros óptimos son diferentes para cada par de cebadores. La *Taq* polimerasa es la enzima elegida porque actúa a temperaturas muy elevadas como a las utilizadas durante la desnaturalización. Toda la reacción de PCR se realiza en un termociclador que realiza el proceso automáticamente.

Para estudiar los microsatélites, la reacción se efectúa en dos etapas: una primera de amplificación en la que se usan los cebadores externos diluidos; y una segunda donde se usa un cebador interno y otro externo con concentración normal. Los productos de PCR son así más específicos y no aparecen artefactos. Después se hacen migrar los productos de PCR sobre un gel control de agarosa. Si la amplificación ha sido positiva el producto amplificado se congela hasta el momento de ser utilizado.

El principal problema para el uso del PCR es la necesidad de conocer la secuencia que enmarca el fragmento (microsatélite) de ADN que queremos amplificar, a fin de sintetizar los cebadores específicos. Para amplificar los microsatélites es necesario un largo proceso que implica cortar el ADN completo con enzimas de restricción, clonar para aumentar el volumen de los fragmentos y por último buscar entre todos ellos las secuencias altamente repetidas con sondas. Las secuencias de microsatélites utilizadas para definir los cebadores utilizados en este trabajo han sido clonadas por Peatkau y Strobeck (1994) y Peatkau *et al.* (1995).

En este estudio, las condiciones de PCR utilizadas son específicas para la amplificación a partir de unas pocas moléculas de ADN. Las superficies del laboratorio, los productos de amplificación y de extracción pueden estar contaminados por moléculas foráneas que provienen de las células de la base del cabello, de la piel o que pueden ser movilizadas por las corrientes de aire. Este ADN extraño (no perteneciente al espécimen de oso analizado) puede ser amplificado resultando un falso positivo. Se considera amplificación positiva a aquella que coincide con la "amplificación control positiva", es decir, la amplificación del mismo *locus*, a partir de un extracto de ADN, obtenido de hígado (tejido completo) de oso. Además, es muy importante trabajar con un control negativo por cada PCR, un último tubo que contiene todos los reactivos pero sin el extracto problema. Si no hay contaminación entonces no habrá banda. Para evitar contaminaciones se deben realizar las extracciones en un lugar diferente a donde se realicen las amplificaciones y durante las extracciones se han de seguir una serie de normas de prevención (uso de guantes, mascarilla, batas desechables) que aseguren el proceso. Debemos tener en cuenta que las muestras de heces y pelos encontrados sobre el terreno portan ADN degradado (por las condiciones ambientales hasta su recolección), es decir cualquier célula perteneciente a los manipuladores de dicha muestra contiene más ADN que las contenidas en nuestra muestra.

Figura 2.- Amplificación en cadena por la polimerasa (PCR). Representación esquemática de los fragmentos de ADN obtenidos a partir de un fragmento inicial después de los tres primeros ciclos. Observamos que a partir del tercer ciclo son comunes los fragmentos cortos que poseen en su extremo 3' las secuencias complementarias a los cebadores y no la secuencia del ADN inicial.

2.2.3.- SEXADO

Para proceder al sexado, sobre las muestras extraídas se realizó una amplificación con PCR de dos genes, uno específico para mamíferos machos denominado SRY (*Sex determining Region* del cromosoma Y) y uno nuclear, específico de osos MU64. El cromosoma Y juega un papel crítico en la determinación del sexo masculino: los genes determinantes del sexo provocan el desarrollo de los testículos y la aparición de los caracteres secundarios masculinos como consecuencia de la acción de los productos hormonales inducidos por éstos. Los mapas genéticos realizados sobre hembras fenotípicas y con genotipo XY habían permitido localizar sobre el brazo corto del cromosoma Y una región que podía portar el gen TDF (*Testis Determining Factor*). Posteriormente se identificó una región de 35 Kb a la que se denominó SRY (Sinclair *et al.*, 1990; Maclaren, 1990; Gubbay, 1990), que codificaba para una proteína específica en machos. Además, se encontraron proteínas homólogas a ésta en todos los

mamíferos euterios analizados (Maclaren, 1990). El descubrimiento definitivo para conocer el papel de este gen se hizo al encontrar que la supresión de 4 de sus nucleótidos ocasionaba un cambio de lectura provocando hembras fenotípicas con genotipo XY (Berta *et al*, 1990). El gen SRY es el responsable de la iniciación de una cascada de expresiones en el tejido gonadal del feto que hace que se comiencen a formar los testículos (Koopman *et al*, 1990). Los cebadores utilizados para esta amplificación se definieron a partir del alineamiento de las secuencias publicadas de hombre, ratón y conejo (Gubbay *et al*, 1990; Sinclair *et al*, 1990). El gen SRY consta de una secuencia altamente conservada (Coriat *et al*, 1993).

Cuando el gen SRY se amplifica, sobre el gel de agarosa aparece una única banda y el individuo queda sexado como macho. Es decir, si el individuo analizado es hembra, no aparecerá ninguna banda. Esto supone un problema, puesto que si el proceso de amplificación no ha sido satisfactorio (si en el extracto de ADN extraído existe algún inhibidor o la molécula de ADN que porta dicho gen está degradada) el resultado también será la ausencia de banda y por lo tanto estaremos cometiendo un error, sobreestimando el número de hembras. Para verificar que la reacción de PCR funciona, se emplea un control interno de modo que al tiempo que amplificamos el gen SRY añadimos los cebadores que codifican para un gen nuclear, que esta presente tanto en machos como hembras, el microsatélite MU64. Así obtenemos por cada amplificación dos bandas en el caso de los machos y una única banda para las hembras.

2.2.4.- MÉTODO DE FIABILIDAD DE RESULTADOS PARA PEQUEÑAS CANTIDADES DE ADN

Por el proceso de PCR una región específica del ADN se replica en varios millones de copias, dependiendo de la cantidad de ADN de partida. Típicamente se usan como muestra para el PCR cantidades entre nano a microgramos, lo que corresponde entre 300 a 300.000 copias de una única secuencia específica. En los estudios moleculares que se realizan sobre muestras antiguas, pruebas forenses, especímenes de museos, pelo o heces, la cantidad de ADN del que se dispone es muy bajo. Bajo tales circunstancias existe la posibilidad de que uno de los alelos de un individuo heterocigoto no sea detectado, originando una lectura incorrecta de dicho *locus*. Esta clase de problema se ha detectado en estudios de microsatélites a partir de heces (Gerloff *et al*, 1995). El ADN que sirve como matriz para la amplificación (una centésima parte del extracto de pelo o heces) puede ser excesivamente poco, a veces 3 ó 4 picogramos solamente y depende directamente de la cantidad de células por extracción. Cuando se trabaja con esta poca cantidad de ADN existe una gran probabilidad de no pipetear los dos alelos de un *locus*. Si el *locus* es heterocigoto y sólo se pipetea uno de los dos alelos, sólo se amplifica uno y el resultado se interpretará como un homocigoto. Navidi *et al*. (1992) sugirieron el uso de tubos múltiples para solucionar el problema y Taberlet *et al* (1996b) han puesto a prueba dicha sugerencia para comprobar cuantas veces ha de ser repetido un experimento para obtener una identificación genética fiable sobre un *locus* heterocigoto, cuando existe la limitación de disponer de una pequeña cantidad de ADN. Cuanto mayor sea el número de PCRs, menor será el número de *loci* que pueden ser analizados. Se efectuó una simulación matemática para estimar la probabilidad de carecer de un alelo cuando en realidad estaba presente, calculando así el número de repeticiones que son necesarias para obtener un resultado correcto. El modelo matemático asume que:

- El extracto de ADN contiene igual número de alelos A y B
- Una única secuencia específica puede ser detectada y amplificada
- Cada secuencia específica tiene la misma probabilidad de ser amplificada (esta suposición se relaciona con estudios previos según los cuales se ha mostrado que sólo entre un 60% a un 70% de las moléculas de ADN pueden ser amplificada (Li *et al*, 1988; Arnheim *et al*, 1991).
- Se pueden realizar 100 PCRs usando el mismo extracto de ADN y la secuencia específica de ADN se distribuirá al azar entre los 100 tubos de PCR
- Si la proporción inicial entre los alelos A y B (A/B o B/A) en el tubo de PCR es mayor o igual a 5, entonces sólo se detectará el alelo más común (esta suposición se incluye por la dificultad de detectar un alelo cuando la intensidad de la banda del espectrograma es cinco veces más débil que la del otro alelo).

El muestreo al azar de la secuencia específica de ADN en concentraciones muy diluidas se puede observar en la tabla 1. El número de alelos amplificados varía mucho entre tubos, y algunos tubos no contienen ninguna amplificación. La figura 3 muestra la probabilidad de obtener una PCR positiva (algún alelo A o B), sólo el alelo A, y ambos alelos (genotipo correcto) cuando se usan diferentes concentraciones de ADN de partida.

Si disponemos de ocho unidades de ADN muestra (casi 56 pg de ADN) por *locus*, entonces sólo necesitaremos una única amplificación por PCR para obtener un resultado positivo con un 99% de confianza. Cuando usamos entre 2.4 a 8 unidades de ADN hay un

alto riesgo de no detectar un alelo. Los resultados de la simulación (figura 3) nos ayudan a designar un proceso experimental apropiado. Bajo estas condiciones se observa que son necesarios siete experimentos independientes para identificar correctamente un individuo heterocigoto.

Tabla 1.-

Distribución estocástica de los alelos A y B entre 10 tubos, usando para las amplificaciones ADN equivalente al contenido de media, una o dos células. La distribución estocástica y el análisis de resultados han sido determinados de acuerdo con el modelo matemático presentado arriba.

	ADN de ½ célula por PCR	ADN de 1 célula por PCR	ADN de 2 células por PCR
tubo 1	BB	BBB	BBBB
tubo 2	A	B	AAA
tubo 3	-	AA	AB
tubo 4	BA	AAB	BAAA
tubo 5	BB	AAB	A
tubo 6	A	BA	BABABB
tubo 7	-	BA	ABBBABA
tubo 8	A	BB	ABB
tubo 9	-	-	BAAAB
tubo 10	-	BAB	AABBBAAA
Sin amplificación +	4	1	0
Sólo alelo A	3	1	2
Sólo alelo B	2	3	1
Genotipo correcto	1	5	7

Figura 3.- Resultados de las simulaciones concernientes a la caracterización genética de un individuo heterocigoto que porta los alelos A y B. Probabilidad de los productos de amplificación de obtener una amplificación positiva (alelo A o B) una caracterización correcta (alelo A y B), y solamente un alelo (alelo A solamente), según la cantidad de ADN por tubo.

Cuando el número de repeticiones (n) es igual a 7, la probabilidad de detectar sólo uno de los dos alelos es menor del 1%, con un nivel de confianza del 99%. Se estima (Taberlet et al, 1996a) en base a este modelo matemático, que al menos 5 unidades de muestra de ADN (casi 35 picogramos en mamíferos) por *locus* son necesarias para seguir este método. Este proceso de tubos múltiples debería ser sistemáticamente usado cuando se hagan estudios de individualización de *loci* sobre ADN nuclear de fósiles, ejemplares de museos, muestras forenses y pelos o heces encontrados al azar sobre el área de campeo de los animales.

En la *figura 4* se ilustra el problema anteriormente presentado: una única extracción positiva amplificada para un mismo *locus* siete veces en tubos independientes. En ella se observa claramente que no se amplifican los dos alelos en todos los experimentos de amplificación.

Con este mismo método de trabajo, es necesario repetir 9 veces el sexado. Si aparece la banda correspondiente al sexo masculino se finaliza el número de repeticiones, pero es necesario repetir el experimento 9 veces para confirmar que el sexo es femenino (ausencia de banda SRY) con una confianza del 99%.

2.2.5.- ELECTROFORESIS

Las extracciones positivas amplificadas para los microsatélites seleccionados fueron corridas sobre un gel de acrilamida al 6% (figura 5). Como marcador de talla se utilizó TAMRA350 (Perkin Elmer). Los geles se hicieron sobre un secuenciador de ADN modelo ABI PRISM-377 de Perkin Elmer.

2.2.6.- ANÁLISIS Y LECTURA DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.

El análisis de los fragmentos amplificados para cada uno de los microsatélites (*loci*) se realizó con el programa ABI PRISMA GeneScan Analysis v 2.0.2 (Perkin Elmer, 1995). Los cebadores de estos microsatélites se marcaron con fluorescencia, leídos por el software del ABI PRISM-377 (figura 5) y transformados en una imagen con los distintos colores fluorescentes usados. El programa ABI PRISMA GeneScan cuantifica el tamaño de los fragmentos de ADN por la posición de dichas bandas sobre el gel después de la electroforesis.

La lectura de los *loci* y el etiquetado de los alelos se realizó mediante el programa Genotyper DNA Fragment Analysis Software v 1. 1 (Perkin Elmer, 1994).

Figura 4.- Resultado de siete amplificaciones independientes del locus MU64. A partir del mismo extracto proveniente de pelo recogido sobre el área de campeo. La talla de los alelos para este individuo son de 206 y 214. En la amplificación 1 se han obtenido los dos alelos, en la 2 no se amplificó nada, en las amplificaciones 3 y 4 sólo se ha obtenido el alelo 214, en la amplificaciones 5 y 7 se ha obtenido el alelo 206.

Figura 5.- Imagen obtenida por el ABI 377 (Perkin Ehner), una vez que los microsatélites (marcados con fluorescencia amarilla, azul y verde) han migrado a lo largo del gel de poliacrilamida. En rojo se observan los fragmentos de peso molecular conocidos utilizados como marcador de talla, en nuestro caso TAMRA350. Esta imagen se transforma posteriormente y se cuantifica dependiendo de la posición de los fragmentos de ADN.

Este programa es capaz de convertir los datos de cuantificación y tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por el programa anterior, en genotipos.

2.2.7.- MEDIDA DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Los genotipos obtenidos se han utilizado para obtener los parámetros de variabilidad genética intrapoblacional, calculados con el programa BIOSYS (Swofford y Selander, 1989). A partir de los genotipos individuales utilizados se obtienen las frecuencias alélicas y con ellas, el número medio de alelos por *locus* (A) y las heterozigosis esperada y observada (H_e , H_o). Además, a partir de las frecuencias alélicas se han calculado los parámetros F_{ST} y F_{IS} (Wright, 1969). Con F_{ST} se ha estimado la tasa de migración entre las dos poblaciones según $F_{ST}=1/1,+ 4 Nm$, donde N es la talla de la población y m es la tasa de migración (Slatkin, 1987).