

PRIMER PASO EN LA BÚSQUEDA DEL GENOMA DE UNA TORTUGA MARINA

Fotografía: Luis Carlos Celis.
Dirección editorial Universidad Jorge Tadeo Lozano

Estandarización de un protocolo para la extracción de DNA a partir de microvolúmenes de glóbulos rojos de tortuga cabezona, *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758)

López Barrera Ellie Anne¹, Hoyos Rueda Lina María², Pulido Jiménez Mauricio³, Bernal Villegas Jaime⁴

1. Aspirante a B. Sc. Mar., Universidad Jorge Tadeo Lozano

2. Aspirante a B. Sc., Pontificia Universidad Javeriana

3. Coordinador Centro de Biología Molecular, Gimnasio Campestre

4. Director Centro de Biología Molecular, Gimnasio Campestre

RESUMEN

Caretta caretta es una de las tortugas marinas que se encuentra en el Caribe colombiano y es considerada una especie en peligro de extinción. El conocimiento que se tiene sobre tortugas marinas en nuestro país es muy limitado y ello impide la implementación de planes de manejo y conservación para estas. En el presente trabajo se estandarizó un procedimiento para extraer DNA a partir de microvolúmenes de glóbulos rojos de tortuga. El protocolo produjo rendimientos entre 1460 y 7350 ng de DNA empleando tan solo 50 μ L de células rojas. El análisis electroforético y la amplificación aleatoria de fragmentos de DNA mediante PCR mostraron que el DNA obtenido no presenta ningún tipo de degradación ni contaminación con RNA y que su calidad permite utilizarlo en diversos procedimientos analíticos. Este método es el primer aporte para futuras investigaciones orientadas a la identificación y caracterización molecular de individuos y poblaciones de tortugas marinas en Colombia.

Palabras clave: *Caretta caretta*, extracción de DNA, RAPD-PCR.

SUMMARY

Caretta caretta is one of the marine turtles found in the Colombian Caribbean and it has been considered an endangered species. The knowledge on marine turtles in our country is very limited and it has not allowed the implementation of plans for their management and conservation. This paper standardized a protocol to extract DNA from microvolumes of this turtle's red cells. The protocol produced between 1460 and 7350ng of DNA using only 50 μ L of red cells. The electrophoretic analysis and the RAPD-PCR showed that the DNA obtained is neither degraded nor contaminated with RNA and its quality allows its use in diverse analytical procedures. This method is the first contribution to future investigations oriented towards the identification and molecular characterization of individuals and populations of marine turtles in Colombia.

Key Words: *Caretta caretta*, DNA extraction, RAPD-PCR.

INTRODUCCIÓN

Las tortugas marinas han sido categorizadas a nivel mundial como especies en peligro de extinción y por lo tanto se encuentran incluidas en las listas rojas elaboradas para Colombia por el Instituto Alexander Von Humboldt y la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN), las cuales son reguladas por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). A pesar de que en Colombia existen normas jurídicas orientadas a la protección de estas especies, las acciones que se han adelantado son pocas, el número de grupos de investigación que trabajan en el tema es reducido, estos no operan de manera coordinada y por lo tanto el conocimiento sobre las tortugas marinas es precario y desordenado (INVEMAR, 2002).

En el Caribe colombiano se pueden encontrar cuatro especies de tortugas marinas: *Dermochelys coriacea*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata* y *Caretta caretta*. Esta última es conocida con los nombres comunes de tortuga cabezona, boba o caguama; su caparazón puede alcanzar hasta 105 cm. de largo y su peso varía entre 100 y 180 Kg. Posee cinco o más pares de escudos costales en el caparazón y tres pares de escudos marginales en el plastrón. La región cefálica es ancha en la parte posterior y redondeada en la parte anterior; presenta dos pares de escamas prefrontales y tres postoculares (Figura 1). Su coloración varía de rojizo a amarillo verdoso (Figura 2), presenta aletas delanteras cortas con dos uñas en cada una de ellas y las extremidades y la cola son medianamente oscuras, amarillentas en la parte lateral y ventral (Mortimer & Pritchard, 2000).

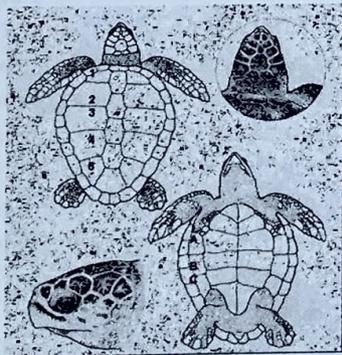


Figura 1. 1-5: Escudos costales del caparazón, A-C: escudos marginales del plastrón.



Figura 2. Ejemplar de *Caretta caretta*.
Fotografía: Luis Carlos Celis.
Dirección editorial Universidad Jorge Tadeo Lozano

Caretta caretta es una tortuga de hábitos alimentarios omnívoros; durante sus primeros años de vida habita en ambientes pelágicos (oceánicos) asociada a nudos de algas (*Sargassum spp.*) u objetos flotantes como troncos; cuando llega al estadio juvenil se desplaza hacia aguas menos profundas para alimentarse en suelos blandos o duros (Ernst, *et al*, 1994; Bjorndal, 1997). Alcanza su madurez sexual entre los 15 y 30 años de edad y se dirige a zonas costeras donde las hembras pueden compartir playas de anidación con otras tortugas (Urioste, 2001).

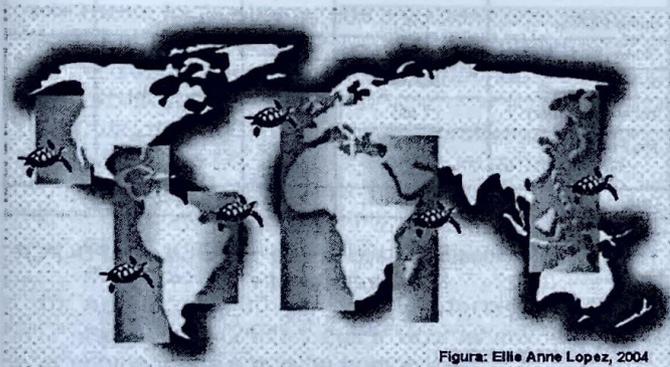


Figura: Ellie Anne Lopez, 2004

Figura 3. Mapa de distribución de *Caretta caretta*.

Su distribución es muy amplia, se puede encontrar en los océanos Pacífico, Atlántico e Índico y en los mares Caribe y Mediterráneo; es la única tortuga marina con un rango de anidación más allá de los trópicos (Figura 3)(Pritchard,1976). En el Caribe colombiano se pueden observar individuos de esta especie en la franja costera comprendida entre los departamentos de Sucre y Guajira y también en el Archipiélago de San Andrés y Providencia; se observa más frecuentemente entre el Parque Nacional Natural Tayrona y la alta Guajira (INVEMAR, 2002).

Tomando como referencia el informe final del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras José Benito Vives de Andrés (INVEMAR) realizado en el 2002 sobre la distribución y estado actual de conservación de las tortugas marinas en el Caribe colombiano, *Caretta caretta* es la especie más vulnerable ya que ocupa la menor extensión de playa para anidar (360 Km. lineales), presenta el menor índice de anidación y por lo tanto una baja ocurrencia de avistamientos.

Esta disminución en el número de tortugas anidantes es producida por factores como la depredación de los huevos por parte de animales o por el hombre, el consumo de tortugas adultas o juveniles por humanos y la acumulación de desechos orgánicos (madera, pastos, algas o restos coralinos) e inorgánicos (plásticos, vidrios, latas, cauchos) en las proximidades de las playas elegidas por esta especie para depositar sus huevos.

La problemática descrita anteriormente junto con la falta de conocimiento de las técnicas de campo hace difícil la recolección de muestras biológicas para el estudio de los individuos. Por lo tanto, la estandarización de un procedimiento para la extracción de DNA de *Caretta caretta* a partir de pequeños volúmenes de sangre periférica es de gran utilidad para futuras investigaciones orientadas a la identificación y caracterización molecular de individuos y poblaciones de tortugas marinas en Colombia. A través de los resultados que arrojen estos trabajos será posible generar información que permita implementar planes de manejo y conservación para estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica fueron tomadas de cuatro ejemplares de *Caretta caretta* pertenecientes a los acuarios Mundo Marino y El Rodadero de Santa Marta. Una vez seleccionados los individuos, la superficie de los senos cervicales dorsales del cuello, de donde se extrajo la muestra, fue desinfectada con alcohol 70%. El ejemplar se acomodó con el cuello en un ángulo ligero con el fin de aumentar el flujo de sangre hacia este y la cabeza del animal fue cubierta con una toalla húmeda para mantenerlo tranquilo mientras se tomaba la muestra (Figura 4). Empleando agujas de calibre 40 x 0.8 mm y jeringas de 1mL. se recolectaron 0.5 mL de sangre por individuo en tubos con heparina sódica (la cual actúa como anticoagulante). Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Centro de Estudios en Biología Molecular del Gimnasio Campestre para realizar la extracción de DNA.



Figura 4. Toma de muestra de sangre de un ejemplar de *Caretta caretta*.

Extracción de DNA a partir de glóbulos rojos

El DNA genómico fue aislado de glóbulos rojos usando una modificación del método de Norrgard & Graves, 1996. Los glóbulos blancos y el plasma fueron separados de los glóbulos rojos mediante centrifugación; estos últimos se lavaron con PBS 1X (Buffer Salino Fosfato) frío para eliminar los restos de plasma sanguíneo y heparina. Se tomaron 50 μ L de glóbulos rojos y se adicionó buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 2mM EDTA, pH 8.0) y SDS 10%. Tras la ruptura celular, se hicieron extracciones sucesivas con fenol puro, fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Para precipitar el DNA se adicionó acetato de amonio 7.5 M y posteriormente se utilizó etanol absoluto; enseguida se hizo un lavado con etanol 70% y finalmente el DNA fue secado, resuspendido en agua destilada y almacenado a 4°C. (Tabla 2).

Cuantificación del DNA

Con el fin de evaluar la calidad del DNA obtenido y determinar el rendimiento del protocolo respecto a la cantidad de células empleadas al inicio del proceso, las muestras de cuatro individuos fueron separadas electroforéticamente en gel de agarosa 1% (teñido con bromuro de etidio). Para cuantificar el DNA, el gel fue analizado con el programa Gene Tools, el cual calcula la cantidad de DNA presente en una banda muestra comparando su intensidad relativa con la de las bandas de un patrón de referencia que son previamente cuantificadas.

Verificación de la calidad del DNA mediante RAPD-PCR

Para corroborar la calidad del DNA obtenido mediante este protocolo, se hizo una amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos mediante (RAPD-PCR). Las condiciones de la reacción y las condiciones del ciclaje se presentan en la tabla 1.

Reactivo	Concentración Final	Ciclaje		
		Tiempo	Temperatura	No. Ciclos
Buffer PCR	1X			
Cloruro de Magnesio	2 mM	5 min.	94°C	1
dNTP's	0.2 mM			
Iniciador (Primer)	1 μ M	1 min.	94°C	45
Taq Polimerasa	1 unidad	45 seg.	36°C	
		45 seg.	72°C	
DNA	5 ng	5 min.	72°C	1

Tabla 1. Condiciones de reacción y de ciclaje para RAPD-PCR de *Caretta caretta*.

Resultados y Discusión

Los glóbulos rojos se lavaron con PBS 1X con el propósito de eliminar los restos de plasma sanguíneo y heparina sódica, la cual es tóxica para las células cuando permanece en contacto con estas durante largos períodos de tiempo o cuando está presente en altas concentraciones respecto al volumen de sangre.

Al someter los glóbulos rojos a la acción del buffer de lisis aumenta la turgencia de la célula debido a que el agua entra a esta como consecuencia de la diferencia en las concentraciones de solutos entre el interior y el exterior de la misma. La adición de SDS 10% (detergente de carga negativa), el cual denatura las proteínas integrales de la membrana, provoca la lisis de las células. El EDTA presente en el buffer atrapa los iones de magnesio y calcio libres en el medio (acción quelante), lo que permite la inactivación de las nucleasas que pueden degradar el DNA (Wintrey *et al.*, 1997).

1. En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL adicionar 500 μ L de sangre heparinizada y posteriormente agregar 500 μ L de PBS 1X (Buffer Salino Fosfato) frío.
2. Agitar durante 2 minutos muy suavemente para evitar la lisis celular; posteriormente centrifugar durante 3 minutos a 4000 r.p.m. y descartar el sobrenadante.
3. Repetir el paso anterior dos veces más.
4. Transferir a un tubo de microcentrifuga 50 μ L de glóbulos rojos, adicionar 425 μ L de buffer de lisis (10 mM Tris/Cl pH=8.0, 100 mM NaCl, 2mM EDTA pH=8.0) y 25 μ L de SDS 10%.
5. Agitar por inversión.
6. Adicionar 500 μ L de Fenol puro y agitar vigorosamente hasta obtener una emulsión homogénea.
7. Centrifugar 10 min. a 4000 r.p.m. y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio.
8. Adicionar 500 μ L de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) y agitar vigorosamente hasta obtener una emulsión homogénea.
9. Centrifugar durante 10 min. a 4000 r.p.m. y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio.
10. Adicionar 500 μ L de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1) y agitar vigorosamente hasta obtener una emulsión homogénea.
11. Centrifugar durante 10 minutos a 4000 r.p.m. y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio.
12. Repetir el paso anterior una vez más.
13. Agregar 100 μ L de Acetato de Amonio 7.5 M y agitar por inversión suavemente, posteriormente dividir el volumen en dos tubos eppendorf de 1.5 mL.
14. Agregar a cada tubo 1 mL de Etanol absoluto frío, agitar suavemente hasta que se observe el precipitado de DNA y dejar que decante durante 20 minutos.
15. Descartar el sobrenadante y adicionar 1 mL de Etanol 70%, agitar suavemente y centrifugar durante 15 minutos a 4000 r.p.m.
16. Descartar el sobrenadante y secar los pellets al baño de maría a 65°C.
17. Resuspender cada pellet en 100 μ L de agua destilada estéril.

Tabla 2. Protocolo para la extracción de DNA de sangre de *Caretta caretta*.

Las extracciones con fenol puro y fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1) garantizan la remoción de proteínas del tejido que se está trabajando dado que estos solvente orgánicos denaturan tanto las proteínas asociadas al DNA como las pro-

teínas estructurales de membrana. Adicionalmente, el cloroformo cumple dos funciones importantes: inactiva las RNAsas y retiene las moléculas de RNA, lo cual permite extracciones de buena calidad (Wintrey *et al.*, 1997).

Las sucesivas extracciones con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) permiten remover las trazas de fenol; adicionalmente el cloroformo facilita la separación de las fases acuosa y orgánica debido a que su densidad es mayor que la de la fase acuosa; el alcohol isoamílico reduce la viscosidad de la fase acuosa donde se halla el DNA (Sambrook & Russell, 2001).

Para hacer el DNA más pesado y facilitar la precipitación etanólica, se empleó acetato de amonio 7.5 M debido a que el ión amonio (NH_4^+), a diferencia del sodio (Na^+) y el potasio (K^+), es altamente volátil y por lo tanto fácilmente removible de la preparación mediante lavados con etanol 70%; estos lavados evitan que en las preparaciones de DNA genómico se presenten elevados contenidos de sales que reduzcan la solubilidad de este e interfieran en procedimientos analíticos como electroforesis y espectrofotometría (Sambrook & Russell, 2001).

Para evaluar la integridad física del DNA obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%). No se observó ningún tipo de degradación ni presencia de RNA (Figura 5), lo que significa que a pesar del uso de diversas sustancias químicas a lo largo del procedimiento, ninguna de ellas provoca ruptura de la cadena de DNA. El protocolo presentó un rendimiento que varía entre 1460 y 7350 ng de DNA partiendo de tan sólo 50 μ L de glóbulos rojos (Tabla 3). Tal resultado responde al hecho de que los reptiles como *Caretta caretta* presentan seis tipos de células sanguíneas (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos, células del plasma y trombocitos) (Dessauer, 1970; Work, *et al.*, 1998) (Figura 6), las cuales son nucleadas, lo que significa que todas ellas son potenciales proveedoras de DNA, a diferencia de otros organismos como los mamíferos en los cuales los glóbulos rojos no poseen núcleo (Randall, *et al.*, 2002). El rendimiento de la extracción con relación al volumen de células con las que se inicia el procedimiento nos permite concluir que es un protocolo eficiente.



Figura 5. DNA genómico de *Caretta caretta*. 1-2: Individuos acuario Mundo Marino; 3-4: Individuos acuario El Rodadero.

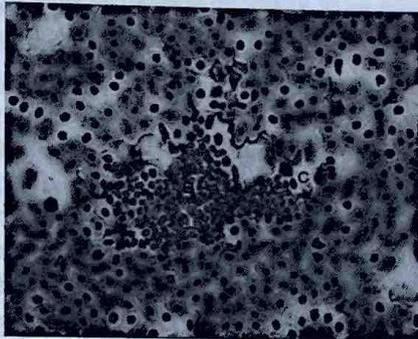


Figura 6. Extendido de sangre de *Caretta caretta*. A. Eritrocito, B. Linfocito, C. Granulocitos.

Individuo	Concentración (ng/μl)	Cantidad total (ng)
1	7.3	1460
2	9.55	1910
3	27.55	5510
4	36.75	7350

Tabla 3. Cuantificación del DNA de cuatro individuos de *Caretta caretta* obtenido mediante el protocolo estandarizado.

Los RAPDs permitieron corroborar que el DNA obtenido puede ser utilizado para amplificaciones por PCR (Figura 7). Los patrones de bandeo logrados con el iniciador A8 muestran diferencias entre los individuos analizados, lo cual es reflejo de la sensibilidad de la técnica utilizada para la detección de variaciones a nivel genético. Por tanto, queda claro que el DNA obtenido mediante este procedimiento no presenta ningún tipo de contaminante (lípidos, fenol, etanol, proteínas, etc.) que pueda interferir con la técnica de RAPD-PCR, la cual es muy sensible a este tipo de moléculas. Otros aspectos para destacar de este protocolo son su bajo costo, su reproducibilidad y además un corto período de ejecución, lo cual hace factible su implementación en cualquier laboratorio.



Figura 7. RAPD's correspondientes a dos individuos, empleando dos iniciadores (primers). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles 2-3: Individuos 1 y 3 respectivamente analizados con el primer A8; Carriles 4-5: Individuos 1 y 3 respectivamente analizados con el primer B6.

Este protocolo de extracción de DNA se constituye en un primer aporte para el inicio de investigaciones en genética molecular de tortugas marinas en Colombia, orientadas a determinar el lugar de origen de los individuos o poblaciones que llegan a nuestras costas. Adicionalmente, otras áreas de la investigación como la filogenia y la sistemática, las cuales actualmente son abordadas desde la perspectiva de la biología molecular, pueden apoyarse en este tipo de avances metodológicos. La información lograda a través de los estudios efectuados por estas áreas de la ciencia permitirá el desarrollo de planes de manejo y conservación que garanticen la supervivencia de estas especies.

GLOSARIO

Electroforesis: Técnica analítica en la que se emplea un campo eléctrico para separar fragmentos de DNA que difieren en su tamaño. Puesto que el DNA es una molécula de carga negativa, los fragmentos pequeños migran más rápido que los grandes.

DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD, por su sigla en Inglés): Técnica basada en PCR que se emplea para determinar la huella genética de un individuo. Este procedimiento es muy utilizado para distinguir poblaciones o individuos de una misma población.

Omnivoría: Característica que hace referencia a que el animal se alimenta tanto de carne como de plantas.

Zona Pelágica: Comprende la columna de agua del mar abierto hasta una profundidad de 180 m.

Lisis Celular: Ruptura de la célula.

Nucleasas: Conjunto de enzimas que tienen la capacidad de degradar ácidos nucleicos.

Espectrofotometría: Método analítico de laboratorio que se basa en la medición de las cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud de onda. Mediante esta técnica es posible determinar la identidad y la concentración de una sustancia que se halla disuelta en una muestra.



Tortuga *Caretta caretta*.
Fotografía: Luis Carlos Celis.
Dirección editorial Universidad Jorge Tadeo Lozano

BIBLIOGRAFÍA

1. Bjorndal, K. A. 1997. Foraging Ecology and Nutrition of Sea Turtles. En: The Biology of Sea Turtles. Pp: 199-231.
2. Dessauer, H. 1970. Blood Chemistry of Reptiles: Physiological and Evolutionary Aspects. En: Biology of the Reptilia. Vol 3 (Edited by GANNSC. & PARSONST.) Pp. 1-72. Academic Press, New York.
3. Ernst, C.H.; J.E. Lovich & W. Barbour. 1994. Turtles of the United States and Canada. Smithsonian Inst. Press, Washington and London. 578 Pp.
4. INVEMAR, 2002. Determinación de la distribución y del estado de conservación de las tortugas marinas en el Caribe Colombiano. Informe Final. Convenio SECAB-INVEMAR, Santa Marta, Colombia.
5. Mortimer, J. & P. Pritchard. 2000. Taxonomía, Morfología externa, e Identificación de especies. En: Eckert, K. L; K. A. Bjorndal; F.A. Abreu-Grobois & M. Donnelly. Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE. Publicación 4.. 278 Pp.
6. Norrgard, J. & J. Graves. 1996. Determination of the natal origin of a juvenile loggerhead turtle (*Caretta caretta*) population in Chesapeake Bay using mitochondrial DNA analysis. NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396.173 Pp: 129-136.
7. Pritchard, P.C.H. 1976. Living turtles of the world. T.F.H. Publication., Inc, Jersey City, New Jersey. 288 Pp.
8. Randall, D; W. Burggren & K. French. 2002. Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. Fifth edition. Freeman and Company. New York. USA. 727 Pp.
9. Sambrook, J. & D. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 3 Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
10. Urioste, J. 2001. Curso de Formación de Guías para la observación de cetáceos. Charla de Tortugas Marinas. Canarias, España.
11. Wintrey, M. R.; M. A. Rott & A.T. Wortman. 1997. Unraveling DNA: Molecular Biology for the laboratory. Prentice Hall Inc. USA. 1997
12. Work, T.; R. Raskin; G. Balazas & S. Whittaker. 1998. Morphologic and cytochemical characteristic of blood cells from Hawaiian green turtles. American Journal Veterinary Research. Vol 59 (10): 1252-1257.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen
a los biólogos Ricardo Tapias,
del acuario El Rodadero,
Javier Giraldo, del acuario
Mundo Marino, Aminta Jáuregui,
docente de UJTL, por su
colaboración en la obtención
de las muestras,
y al Dr. Víctor Núñez,
Coordinador del Programa
de Biotecnología Agrícola
de Corpoica por el apoyo
logístico requerido para
la ejecución de este trabajo.