



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ZOOTECNIA

**TESIS DE GRADO PREVIO OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
DE INGENIERO ZOOTECNISTA.**

TEMA:

**“PROTOSCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE DE CERDOS
CRIOLLOS EN QUEVEDO”**

AUTOR:

VIDAL VERA FRANK WILLIAN

DIRECTOR

ING. ZOOT. ORLY CEVALLOS FALQUEZ, MSc.

QUEVEDO – ECUADOR

2015



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ZOOTECNIA

TEMA:

**“PROCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE DE CERDOS
CRIOLLOS EN QUEVEDO”**

Autor: Vidal Vera Frank Willian

Presentado al Consejo Directivo como requisito previo a la
obtención del

Título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Aprobado:

Ing. Adolfo Sánchez Laiño MSc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE TESIS

Ing. Bolívar Montenegro Vivas MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

Dr. Juan Avellaneda Cevallos MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE TESIS

QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo: FRANK WILLIAN VIDAL VERA, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

Frank Willian Vidal Vera
EGRESADO

CERTIFICACIÓN

El suscrito, Ing. Orly Cevallos Falquez, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica:

Que el egresado FRANK WILLIAN VIDAL VERA, realizó la tesis de grado previo a la obtención del título de Ingeniero en Zootecnia, titulada **“PROTOSCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN SANGRE DE CERDOS CRIOLLOS EN QUEVEDO”** bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Orly Cevallos Falquez, MSc.
DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTO

Mi imperecedero agradecimiento al supremo señor del universo.

A mis padres: quienes con afán y sacrificio supieron guiarme por el camino del bien, del saber y del amor, y por estar siempre a mi lado en todo momento.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, a través de sus autoridades, por brindarme la oportunidad para que la juventud y la sociedad en general, logren obtener una profesión académica en la especialidad de la Zootecnia que forma parte del desarrollo de los pueblos.

A mi Director de tesis MSc. Ing. Orly Cevallos Falquez de la UTEQ. por su importante orientación y asesoría en el desarrollo de mi tesis.

A los amigos Sr. Dr. Hugo Ortiz y Lcdo. José Rosero, por su esmerada preocupación, y ayuda en el proceso investigativo y culminación de mi tesis.

A mis amigos Docentes: Ing. Bolívar Montenegro, Ing. Jaime Vera Barahona, Ing. Ítalo Espinoza, Ing. Franklin Peláez, Ing. Edgar Pinargote, en especial al Ing. Leónidas Drouet y esposa por su insistente esmero en la culminación de mi carrera universitaria.

A los Miembros del Honorable Comité Investigador de la Facultad de Ciencias Pecuarias, quienes me han brindado su amistad e incondicional apoyo, haciendo posible mi formación profesional, a todos ellos mis más gratos agradecimientos.

Frank Willian Vidal Vera

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres, Manuel y Carlota: a mi padre por su ejemplo de lucha y sus sabios consejos. A mi madre, mujer sublime, dulce y comprensiva que me impulso insistentemente a la culminación de mi carrera.

A mi esposa Isabel y mis Hijas Maholy y Samanta que son la razón de mi esfuerzo y motivo de superación, para el verdadero bienestar familiar.

A mis hermanos Neptaly, Mayra y Dalila, que durante el proceso de estudio se convirtieron en mi apoyo moral para lograr este objetivo.

Finalmente a la memoria del extinto Rector de la UTEQ Sr. Ing., Manuel Haz Álvarez, que siempre fue mi motivante para la culminación de esta carrera.

Frank Willian Vidal Vera

INDICE

	Pág.
Portada	i
Certificación.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria.....	vi
Índice	vii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Gráficos	xii
Índice de Anexos	xii
Resumen ejecutivo	xiv
Executive Summary	xv
CAPITULO I MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Problematización.....	4
1.3. Justificación.....	5
1.4. Objetivos.....	6
1.4.1. Objetivo General	6
1.4.2. Objetivos Específicos.....	6
1.5. Hipótesis	7
CAPITULO II MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN.....	8
2.1. Origen y evolución del cerdo doméstico.....	9
2.1.1. Características generales del cerdo criollo.....	10
2.1.2. Razas criollas	11
2.1.3. Taxonomía del cerdo.....	12
2.1.4. Conservación de los recursos zoo genéticos	12
2.1.5. Mejoramiento genético del cerdo criollo	15
2.1.6. Aspectos genéticos y morfo estructural del cerdo criollo	16
2.1.7. Genoma del ganado porcino	16
2.1.8. Extracción de ADN.....	17

2.1.9.	Métodos de extracción de ADN.....	18
2.1.10.	Reactivos que conforman el buffer para la extracción de ADN	19
2.1.11.	Protocolo de extracción de ADN total de animales método Salting O .	19
2.1.12.	Protocolo de extracción de ADN por método de TENs	20
2.1.13.	Amplificación de DNA en (PCR).....	21
2.1.14.	Técnica del PCR (Reacción en cadena de Polimeasa).....	22
2.1.15.	Componentes del PCR.....	23
2.1.16.	Evaluación de ADN	24
2.1.17.	Gel de Electroforesis	24
2.1.18.	Electroforesis.....	25
2.1.19.	Cuantificaciones de ADN en el Qubit	25
CAPITULO III METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		27
3.1.	Materiales y Métodos	28
3.1.1.	Localización y duración de la investigación	28
3.1.2.	Condiciones agro meteorológicas	28
3.2.	Materiales y equipos	29
3.2.1.	Materiales de campo.....	29
3.2.2.	Materiales de laboratorio.....	29
3.2.3.	Reactivos	30
3.3.	Equipos	31
3.3.1.	Equipos de laboratorio	31
3.4.	Técnicas moleculares.....	31
3.4.1.	Cuantificación de ADN extraído	35
3.4.2.	Factor y volumen.....	35
3.4.3.	Recolección de la muestra	36
3.4.4.	Tratamientos a evaluarse.....	36
3.4.5.	Diseño experimental.....	37
3.4.5.1.	Análisis de varianza	37
3.4.5.2.	Modelo matemático	38
3.4.6.	Mediciones experimentales.....	39

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. Extracción de ADN con el protocolo de Salting out.....	42
4.2. Extracción de ADN protocolo de Tens.....	43
4.3. Efecto simple de la cantidad de ADN extraído en para el protocolo	44
4.3.1. Protocolo	44
4.3.2. Volumen de sangre de cerdo criollo	44
4.4. Interacción de los factores protocolos por volumen de muestra utiliza ..	45
4.5. Efecto simple de la calidad de ADN extraído en porcino en el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.....	47
4.5.1. Protocolo	47
4.5.2. Volumen de sangre de cerdo criollo	47
4.6. Interacción de los factores protocolos por volumen de muestra utilizada	48
4.7. Correlación entre la cantidad de ADN extraída y la calidad	50
4.8. Discusión.....	50
 CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
5.1. Conclusiones.....	54
5.2. Recomendaciones	55
 CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
 ANEXOS	60

INDICE DE CUADROS

#		Pág.
1	Condiciones agro climáticas de la Finca Experimental La María UTEQ-DYCIT MOCACHE.2014	28
2	Factor y volumen para protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	35
3	Resultados de esta combinación los siguientes tratamientos a evaluarse para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2014.	36
4	Juego de primers de cerdo criollo que han sido utilizados en otras investigaciones mediante la amplificación de ADN.	37
5	Esquema del ANDEVA de las diferencias para las variables del análisis proximal para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014	37
6	Esquema del experimento para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	39
7	Escala porcentual para medir la calidad del ADN, para el protocolo extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	40
8	Promedios del efecto simple de los factores protocolos de por volumen de muestra en la variable cantidad de ADN en el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	45
9	Interacción de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra la variable cantidad de ADN en el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	46
10	Promedios del efecto simple de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de AND en cerdos criollos 2014.	48
11	Interacción de los factores, protocolo de extracción por volumen de muestra la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.	49

INDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1	Resultados de la extracción de ADN genómico en muestras de sangre de cerdos criollos.2014	42
2	Resultados de la extracción de ADN genómico de sangre de cerdos criollos con el protocolo de Tens	43
3	Interacción de los factores, protocolo de extracción por volumen de muestra en la variable cantidad de ADN en el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.	46
4	Interacción de los factores, protocolo de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2014.	49
5	Correlación de factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2014.	50

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Pág.
1	Saíno salvaje en la Finca La María de la FCP-UTEQ	61
2	Verraco Criollo en Finca La María de la FCP-UTEQ	61
3	Hembra Criolla en la Finca La María de la FCP-UTEQ	62
4	Verraco Criollo en la Finca La María de la FCP-UTEQ	62
5	Muestra de sangre de la vena Yugular, plantel porcino La María	63
6	Extracción de sangre en cerdos criollos de la Finca La María de la FCP-UTEQ	63
7	Toma de muestra de sangre de la vena Yugular, plantel porcino La María.	64
8	Congelación de muestras de sangre a -20° C de cerdo criollo.	64
9	Descongelación de muestras de sangre del cerdo criollo.	65
10	Preparación de muestras para centrifugación	65
11	Centrifugación de las muestras hasta 13.000 RPM.	66
12	Centrifugado de muestras para extracción de ADN.	66
13	Lavado de muestras de sangre del cerdo criollo.	67
14	Extracción del sobrenadante de las muestras.	67
15	Lavado de las muestras con alcohol isoamílico CIA.	68
16	Segundo lavado de muestras en extracción de ADN.	68
17	Muestras en baño maría a 60 min. a 56° C, para la extracción de ADN.	69

18	Retirado de muestras de baño maría en extracción de ADN.	69
19	Muestras de protocolo Salting Out con alcohol Isoamilico CIA.	70
20	Migración de muestras de sangre de Cerdo Criollo en extracción de ADN.	70
21	Muestras amplificadas de protocolo de Salting Out en sangre de cerdo criollo	71
22	Muestras amplificadas de protocolo de Salting Out en sangre de cerdo criollo.	71
23	Muestras amplificadas de protocolo de TENs en sangre de cerdo criollo.	72
24	Muestras amplificadas de protocolo de TENs en sangre de cerdo criollo.	72

RESUMEN

Se planteó una investigación cuyo objetivo fue realizar un protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos nacionales, con un alto grado de pureza y concentración, para la obtención de Marcadores Moleculares que permita conocer su potencialidad en la producción. La extracción de ADN a partir de sangre implica la utilización de metodologías complejas debido a problemas como la degradación, las cantidades limitantes de ADN y la presencia de sustancias inhibitoras que pueden ser co-extraídas con el ADN. En el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo se ha dificultado la estandarización de un protocolo útil para extracción y análisis de ADN de alta calidad y cantidad. Con el fin de encontrar un método que proporcione las mejores condiciones de extracción, purificación y amplificación de ADN, se realizó la comparación de dos metodologías de extracción de ADN a partir de sangre periférica, entre ellas el método de Salting out, y el método TENs utilizado actualmente en el laboratorio, permitieron la obtención de ADN de calidad y pureza necesarias para la amplificación mediante PCR a partir de volúmenes de sangre, con un volumen mínimo 100 μ L de sangre de partida. Por otro lado se emplearon las metodologías de electroforesis y espectrofotometría para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN extraído, logrando determinar el mejor método de extracción de ADN el T5. Como conclusión mediante las dos metodologías empleadas para la cuantificación de ADN, se determinó que el Salting out, el cual se basó en la extracción de ADN con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, fue el mejor método de extracción de ADN, logrando obtener buenos rendimientos y calidad.

Palabras clave: Muestras de sangre; Extracción ADN; salting-out; PCR, TENs.

SUMMARY

An investigation whose purpose was to conduct a DNA extraction protocol in national creole pigs with a high degree of purity and concentration, to obtain molecular markers designed to show its potential in production arises. DNA extraction from blood involves the use of complex methodologies due to problems such as degradation, limiting amounts of DNA and the presence of inhibitors that may be co-extracted DNA. In the Laboratory of Biotechnology of the State Technical University Quevedo has hindered the standardization of a useful DNA extraction and analysis of quality and quantity protocol. In order to find a method which provides the best conditions of extraction, purification and DNA amplification methodologies comparing two DNA extraction from peripheral blood, including salting out method was performed, and method TENS are currently used in the laboratory, allowed obtaining DNA quality and purity required for PCR amplification from blood volumes, with a minimum volume of 100 mL starting blood. Furthermore methodologies electrophoresis and spectrophotometry were used to evaluate the quality and quantity of extracted DNA, achieving determine the best method for extracting DNA T5. In conclusion by the two methodologies for DNA quantification, it was determined that the salting out, which was based on the extraction of DNA with phenol, chloroform and isoamyl alcohol was the best method for extracting DNA, obtaining good yields and quality.

Keywords: Blood samples; DNA extraction; salting-out; PCR, TENS.

CAPITULO 1
MARCO CONTEXTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN

La extracción de DNA a partir de muestras de diversa naturaleza, constituye la etapa primaria de todo análisis genético y obtener DNA relativamente puro y amplificado resulta fundamental para los posteriores procesos a los que será destinado, a la observación de investigaciones de tipo forense, a poblaciones en predisposición a enfermedades y otros aspectos científicos. Esta tarea demanda un estricto proceso de las técnicas de extracción utilizadas, con el objeto de determinar las condiciones ideales en las que se obtendrá un máximo rendimiento.

En general; los métodos de extracción de DNA tienen una serie de pasos básicos, que se cumplen independientemente del origen de la muestra. Estos son, a saber: Disrupción celular (ruptura de la bicapa lipídica de las membranas celulares por tratamiento con detergentes, agentes quelantes que secuestran cationes estabilizantes de la membrana, etc.). Los desechos de proteínas (que se constituyen en principales contaminantes del extracto), y concentración del DNA (por precipitación con alcoholes), lavado (para eliminar restos de reactivos y solventes que puedan inhibir la Taq polimerasa) y re suspensión.

Las técnicas de la biología molecular integran algún tipo de manipulación de materiales genéticos estos procedimientos han logrado adelantar el grado de los conocimientos de la cadena genética desde donde, ya podemos multiplicar organismos enteros.

Al inicio los procesos eran prolongados y monótonos y tomaban mayor tiempo para conocer la veracidad de la investigación del ADN en calidad y cantidad suficiente mediante amplificación, además algunos reactivos que se utilizan para estos procesos son tóxicos y muta génicos, actualmente se puede obtener ADN de muy buena calidad en poco tiempo gracias a los avances tecnológicos de la

ingeniería genética se puede crear ADN recombinantes (ADNr) que puede ser introducido en una célula dando lugar a sustancia de interés o social e industrial.

El cerdo criollo llegado a Ecuador desde la península Ibérica con las primeras expediciones de los conquistadores españoles lleva más de 500 años de probado aporte de riquezas, está muy bien adaptado a las condiciones agroecológicas en el Ecuador y forma parte ya no sólo de la alimentación tradicional del campesino y las ciudades sino que está integrado completamente a su historia, su cultura y su forma de vida. El objetivo esencial del estudio es caracterizar genéticamente el cerdo criollo ecuatoriano mediante la utilización de los marcadores moleculares que determinan sus relaciones filogenéticas con otras razas, como contribución a su conservación y mejora genética, no basta con transcribir artículos científico en recursos zoo genéticos que evidencian bondades mediante la secuencia genómica en la que esta especie tomando tan importantes interés en el análisis genético documentado empleando a la biología molecular como la herramienta para medir polimorfismo diseminado dentro de un genoma.

La población del Ecuador y el mundo entero se ve enfocada a una teoría de consumismo. Por ello adoptamos nuevos propósitos para hacer de la producción porcina de nuestro entorno la mayor fuerza de producción, para satisfacer las necesidades de los mercados locales, nacionales e internacionales y ofertar demandas de productos que sirvan para alimentar y curar la población humana, haciendo uso de una serie de productos y subproductos agrícolas.

Los centros científicos han aportado con una serie de investigaciones que asombran al hacer uso de las estadísticas, en el caso de los Estados Unidos, demuestra que en el año 2000 existió 67.000 pacientes en espera de un trasplante y que de ello (44.000 para hígado—4.000 para corazón y 3.600 para pulmones)

desafortunadamente solo 20.000 trasplantes se efectuaron, la investigación señala que más de 100.000 personas no fueron beneficiadas de esta práctica, miles fallecen por falta de donantes hoy en EE.UU., solo existen 7.000 donantes potenciales al año, y la demanda por trasplante aumentan en proporción al 15% cada año. La técnica de xenotrasplante (trasplantes de órganos de una especie a otra) que continúa su desarrollo irreversible buscando soluciones eficientes y objetivas para las personas que no encuentran cura mediante los métodos tradicionales.

1.1. PROBLEMATIZACIÓN.

La obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN), es el punto de partida para la mayoría de análisis genéticos; incluso contando con pequeñas cantidades de ADN, es posible amplificar genes específicos in vitro a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Hoy en día el problema que se presentan en las granjas porcinas es la deficiencia en producción y reproducción por las enfermedades congénitas que se heredan.

Esta estrategia permite que el reservorio genético que los animales poseen, continuamente enfrente las variaciones en las condiciones ambientales, permitiendo además, modificar las estrategias de mejoramiento de acuerdo con las exigencias del mercado y con los cambios en productos pecuarios que la sociedad demandará con el paso del tiempo.

1.2. JUSTIFICACIÓN.

A través de la Biología Molecular como instrumento útil de la medicina moderna para determinar mediante la extracción de ADN que se obtendrá de muestra de sangre de cerdos criollos que nos facilitara ver un diagnóstico seguro en forma temprana de la presencia de ciertas enfermedades y trastornos genéticos que se puedan presentar en la manada y que a la vez sea la causa del gran impacto negativo económicamente en la producción porcina. Esta investigación intenta generar un aporte en los sistemas de producción porcina sustentable mediante el trabajo de ayuda familiar que permite mejorar los niveles de vida de millones de familia y personas, considerando razas locales nacionales e internacionales que poseen virtualmente beneficio en el desarrollo de la producción mediante la amplificación del Ácido Desoxirribonucleico ADN.

Los animales y las plantas deben tener fuentes adecuadas de proteínas en la alimentación para crecer y conservarse de una manera directa sin embargo en diversas partes del planeta, y en países como el nuestro en vía de desarrollo resulta poco accesible conseguir la materia prima de calidad, debido a los altos costos de ésta específicamente cuando es de origen animal.

La conservación de la diversidad genética de las razas locales con planes de mejoramiento, en el presente estudio comparando el resultado de los protocolos en la extracción y conservación de ADN que nos permite obtener recursos alternativos para poder mantener una excelente producción y reproducción de los recursos zoo genético.

1.3. OBJETIVOS.

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar dos protocolos de extracción de ADN en sangre de cerdos criollos en Quevedo.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar el mejor protocolo de extracción de ADN que permita obtener amplificación y purificación de ADN de sangre de cerdos criollos.
- Comparar los protocolos de extracción a través de los volúmenes de sangre de cerdos criollos en la obtención de ADN.

1.4. HIPÓTESIS.

Con estos antecedentes se plantea las siguientes hipótesis:

- H₀** Con el protocolo de Salting Out se obtendrá una concentración de ADN que amplificará en el análisis de las técnicas moleculares.
- H₁** Con el protocolo de Salting Out no se adquirirá una concentración de ADN que amplificará en el análisis de las técnicas moleculares.
- H₀** Con el volumen de 200 μ l se logrará buena cantidad de ADN que amplificará en el análisis de las técnicas moleculares.
- H₁** Con el volumen de 200 μ l no se obtendrá buena cantidad de ADN que amplificará en el análisis de las técnicas moleculares.

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y evolución del cerdo doméstico (*Sus Scrofa dometicus*).

De acuerdo a dos teorías sobre el origen del cerdo.

Según la primera teoría el jabalí europeo (*Sus Scrofa Ferus L.*), es el antepasado único y directo del cerdo, basada en tres características básicas como son: morfología externas análogas, caracteres craneales semejantes y formula vertebral idéntica. La segunda teoría de mayor aceptación actualmente, afirma que el cerdo moderno descende del jabalí europeo como del asiático (*Sus Indicus*), se fundamenta en el criterio de que este fue el responsable del origen del cerdo asiático de orejas erectas y cortas. El jabalí europeo originó dos grupos de cerdos: los célticos, que son de orejas grandes y caídas, y los de orejas cortas y erectas. El cerdo proveniente del Mediterráneo (*Sus Mediterraneus*), se considera la fórmula intermedia entre el *Sus Scrofa Ferus L.* y el *Sus Indicus* (Monge, J., 2005).

En las primeras investigaciones realizadas sobre el origen del cerdo doméstico, la mayor parte de los naturistas, lo consideraban como descendiente del jabalí europeo (*Sus Scrofa Ferus*) domesticado. Otras investigaciones consideraban al cerdo doméstico proveniente de Asia, mientras en la actualidad se acepta la existencia de tres subgéneros, que los diferenciamos por sus características osteocraneológicas.

- a. *Sus Scrofa Ferus* o jabalí europeo, que se encuentra por toda Europa y el norte de Asia, mantienen aún su forma salvaje, siendo originario de muchas razas domésticas asentadas en gran parte de Europa.
- b. *Sus Striatus* o cerdo salvaje de Asia, tiene como área de hábitat Asia central y sudoeste, la raza doméstica provenientes del cerdo asiático

se diferencian de los cerdos de origen europeo, tanto por el cráneo de perfil cóncavo, como por la composición corporal.

- c. *Sus Mediterraneus* o cerdo de la Cuenca del Mediterráneo, considerado como procedente intermedio entre el tipo asiático y el europeo, ha sido objeto de grandes controversias en cuanto a su participación directa a la formación de las actuales razas de cerdos domésticos (Jurado, A., 2008).

2.1.1. Características generales del cerdo criollo.

El Cerdo es un mamífero domesticado de la familia de los Suidos, que se explota en casi todo el mundo como fuente de alimento. Pertenece al orden de los Artiodáctilos (con número par de dedos) y al suborden de animales con 44 dientes, incluyendo dos caninos de gran tamaño en cada mandíbula que crecen hacia arriba y hacia fuera en forma de colmillos. Los términos cerdo, puerco, cochino, marrano o chanco se usa frecuentemente e indistintamente para nombrar a esta especie animal.

El cerdo doméstico [*Sus Scrofa domesticus*] adulto tiene un cuerpo pesado y redondeado; hocico comparativamente largo y flexible; patas cortas con pezuñas (cuatro dedos) y una cola corta, la piel, gruesa pero sensible, está cubierta en parte de ásperas cerdas y exhibe una amplia gama de colores y dibujos. Como todos los suidos, son animales ligeros y sumamente perspicaces. Magníficamente adaptados para la producción de carne, dado que crecen y maduran con rapidez, tienen un periodo de gestación corto, de unos 114 días, y pueden tener camadas muy numerosas. Son omnívoros y consumen una gran variedad de alimentos altos en fibra, tal vez fue esta una de las razones que condujeron a su domesticación. Convierten los cereales, como el maíz, las leguminosas, fruta nativas del entorno, la soja (soya) en carne. Del cerdo también se aprovechan el cuero (piel de cerdo) para hacer maletas, calzado y guantes, y las

cerdas para la fabricación de cepillos. Además de ser muy útil en la medicina humana como los remplazo de válvulas cardiacas para enfermos de corazón. El proceso de obtención de la insulina que se obtenía de vacas y cerdos halla por la década de los 80, y el descubrimiento de la molécula de Heparina como anticoagulante en tratamientos de trombosis y muchos otros eventos importantes que se desprenden del cerdo (Buchot, E., 2013).

2.1.2. Razas criollas.

Manifiesta que el mayor tipo de cerdos que se explota en el territorio nacional es el criollo un animal producto de la mezcla de razas que se han adaptado a las condiciones de alimentación con alto consumo de fibras, manejo inadecuado en condiciones higiénicas - sanitarias, que sitúa pocas instalaciones tecnificadas que no han tenido selección genética. Es una animal de pelo ondulado o liso, oscuro, con poca carne y jamón, sumamente rustico a condiciones desfavorables en cuanto a peso, a la canal por tener baja conversión de alimento, alta cantidad de grasa sin tomar en cuenta la calidad de su carne, por lo tanto se describen las siguientes características: **(Montenegro, M., 2012)**

Caso Mula: Su color varía blanco, negro, bermejo o con manchas, no tiene separación interdigital y el casco está formado por un solo cuerpo, de tamaño mediano, orejas medianas, pelo generalmente rizado.

Zungo: Es de color negro de mediano tamaño sin pelo, cuerpo angosto y tiene acumulación de grasa en los hombros.

Congo Santandereano: Es de color amarillo con negro y blanco. Es resistente, manso y bueno para engordar.

Pelón: Es de color negro orejas medianas caídas sobre los ojos y ancas completamente desplomadas y carece de pelo.

Cuino: Es negro pero puede ser rojo como también pintado posee trompa pequeña, orejas proporcionadas a su tamaño y erectas de patas finas y pequeñas, de dorso corto y pequeño.

2.1.3. Taxonomía del cerdo.

- Género Sus
- Especie Sus vita tus, Sus scrofa, Sus mediterraneus
- Reino Animal
- Tipo Cordados
- Subtipo Vertebrados
- Clase Mamíferos
- Orden Ungulados
- Suborden Artiodáctilos
- Familia Suidos
- Subfamilia Suinos

(Munayco. V., 2011)

2.1.4. Conservación de los recursos zoogenéticos.

Define Biodiversidad, de acuerdo a la convención de Río de Janeiro en 1992, como el conjunto de ecosistemas, especies y variedades genéticas existentes en un país. La biodiversidad de los animales domésticos está compuesta por los recursos genéticos animales, que comprenden todas las especies, razas y estirpes que implican interés económico, científico y cultural para la producción pecuaria, tanto en la actualidad como en el futuro. Las razas son el resultado de la diversificación genética dentro de las distintas especies durante el proceso evolutivo y representan la de la especie.

Es importante mantener la mayor diversidad posible en las especies de animales domésticos, para poder contar con una adecuada fuente de variaciones que puedan ser aprovechadas en planes de mejora y

obtención de productos en mayor cantidad y calidad. Muchas razas son portadoras de variantes y combinaciones únicas de genes. En muchos casos se desconoce esta variabilidad, siendo los puntos mencionados anteriormente, argumentos a favor del estudio y conservación de estas razas locales. La pérdida de esta diversidad es permanente y puede implicar graves consecuencias debido principalmente a esta variedad oculta (Montenegro, M., 2012).

Existen algunos factores que han provocado una importante disminución de la biodiversidad, siendo uno de los principales la especialización de la producción animal moderna, que se basa más en la explotación de pocas razas altamente seleccionadas para producir productos en grandes cantidades y en condiciones ambientales controladas lo cual ha conducido a una disminución en la variabilidad de estas razas seleccionadas, la sustitución de las razas locales y un aumento en la cantidad de estas razas que se encuentran en peligro de extinción.

Los sistemas productivos intensivos han puesto en riesgo a muchas razas locales, mientras que las razas comerciales no poseen una variabilidad genética adecuada para el futuro (FAO, 1998). De esta manera se explotan intensivamente unas pocas poblaciones, mientras que las minoritarias se mantienen con grandes dificultades, lo cual conduce a la disminución en el número de individuos, llegando incluso a extinguirse (Delgado J.V., 2010).

La genética provoca un gran efecto en la mayoría de los procesos de extinción de razas. La reducción drástica o progresiva en los censos son producto de efectos ecológicos, como la pérdida de regiones de pastoreo, efectos político-social y comercial, la emigración del campo a la ciudad, tales como la implementación de planes de desarrollo rural que implican la sustitución de razas locales por razas extranjeras. Esto provoca una disminución en el número efectivo de

las poblaciones, alterando la diversidad genética y aumentando los niveles de endogamia. La migración y selección también producen pérdidas de la variabilidad genética (Montenegro, M., 2012).

En el primer caso donde los cruzamientos con razas comerciales, que se lleva muchas veces a una merma en las poblaciones de cerdos locales. Está enfocada a la selección, con el objetivo de mejorar los índices productivos, que se aplica identificando los animales de mejores características y empleándolos como reproductores, también reduce el tamaño efectivo. Pueden ser casos no alarmantes. Sin embargo para encontrarse ante la pérdida de variabilidad genética debido al bajo número de individuos reproductores.

Este tipo de selección sólo puede aplicarse en poblaciones lo suficientemente extremados. La mutación sería la única fuerza evolutiva capaz de generar variabilidad, pero debido a las bajas tasas en la que ocurre, y a qué veces se generan mutaciones negativas, no es un factor a considerar a corto plazo. Existen varios objetivos para la conservación de los recursos La personalización de poblaciones incluye la caracterización a nivel fenotípico, analizando los aspectos morfológicos de forma cualitativa y cuantitativa; y, la caracterización a nivel genético (estudios de variabilidad utilizando marcadores moleculares de ADN). Este autor considera que las razas locales son una oportunidad para futuras demandas del mercado y una forma de asegurarse frente a cambios productivos futuros, para lo cual es importante contar con variación genética.

Considera por otro lado el valor socio-económico, teniendo en cuenta que los ingresos que generan estas razas para los productores locales justifican el establecimiento de programas de conservación; también el valor ecológico y las razones culturales (Montenegro, M., 2012).

Se define a la consecución de los recursos naturales sostenibles y a la preocupación actual que parte de una mayor conciencia e importancia que esto implica en el desarrollo de la agricultura sustentable bajo técnicas programas de conservación y protocolos para contrarrestar las causas que provocan la pérdida de la diversidad, a favor del mantenimiento de la viabilidad genética.

Los programas de conservación se basan en la aplicación de técnicas y métodos para contrarrestar las causas que provocan la pérdida de diversidad, a la vez de mantener y maximizar dicha diversidad. En este contexto, la FAO define los métodos de conservación in situ y ex situ. La conservación in situ implica todas las acciones que se realicen para la conservación de las poblaciones en el propio ambiente de desarrollo. La conservación ex situ implica el mantenimiento de los recursos genéticos fuera de su ambiente original (Allison A., 2012).

2.1.5. Mejoramiento genético del cerdo criollo (*Sus Scrofa domesticus*).

Los porcinocultores se ven ampliamente beneficiados por el mejoramiento genético en sus reproductores. Como ejemplo de esto, tenemos, que gracias a la mejora genética un cerdo adquiere peso de mercado (90-110kg) en aproximadamente 100 días. Comparando con producciones pecuarias anteriores en las que un cerdo tardaba casi 200 días en alcanzar el mismo peso. El trabajo genético que se ha desarrollado principalmente en Europa y Estados Unidos conllevando a los porcinocultores a tener reproductores de altísimas conversiones peso-alimento, han tenido grandes avances en lo que se refiere al número de partos con más de 12 cerditos, logrando alcanzar en el mercado un enorme porcentaje de los mismos que genéticamente han ayudado al hombre a mantener mejores resultados experimentales en el descubrimiento de nuevas enzimas, proteínas, carbohidratos, grasas saturadas y polisaturadas, etc. perfeccionando extraordinariamente la alimentación humana (Alvarado, J. R. , 2007).

2.1.6. Aspectos genéticos y morfoestructural del cerdo criollo ecuatoriano.

La genética molecular es la estructura principal para el desarrollo productivo del cerdo criollo ecuatoriano, a través de innovaciones en la conservación de los recursos genéticos, ante lo cual es necesario la descripción, definición, tipificación e incompatibilidad de las poblaciones, mediante metodologías para utilizar y conservar los tejidos biológicos de mayor interés en futuros análisis genéticos moleculares incluyendo como muestras los tejidos de pluma, sangre, semen, folículos pilosos, y otros. El cerdo criollo como parte de variabilidad genética es una especie poco conocida, analizada valorada dentro del territorio nacional, y que se ha visto desplazada por la introducción de razas mejoradas de interés zootécnico.

En los resultados de que obtuvo Estupiñan 2007, indican que el mayor porcentaje que presentaron los cerdos fue el perfil frontonasal recto; el color de capa que se registró con mayor frecuencia fue colorada en Valencia y manchada en La Mana; sobre el color de la mucosa sobresalió la oscura en valencia y de mucosa clara en la mana; el pelaje va de abundante a escaso; se evidenciaron mayor cantidad de cerdos con orejas tipo tejas; en ambos sectores, se encontró baja población con marmellas y prevaleció el cerdo doble propósito y el magro para La Maná (Estupiñan. K, Vasco, D, 2007).

2.1.7. Genoma del ganado porcino.

Este reportaje defiende que el interés biomédico, agronómico e industrial que existe sobre este animal, dieron lugar en septiembre del 2003 al establecimiento del Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma Porcino, cuyo objetivo es establecer la secuencia completa del genoma del cerdo (Aguirre Ana , 2012).

La investigadora autora de una nota que ha sido ubicada en el mismo ejemplar de la revista Nature, para establecer la secuencia del genoma del cerdo se ha utilizado el DNA de un único ejemplar, un cerdo muy especial denominado T.J. Tabasco, un cerdo que nació en Illinois en el año 2001. Cuando Tabasco tenía un año, se extrajeron de sus orejas células con las que se generó una línea celular de fibroblastos. Esa línea celular se utilizó posteriormente para, añadiendo o eliminando genes concretos similares a los alterados en algunas enfermedades humanas y utilizando las técnicas propias de la clonación, generar cerdos modelo para esas enfermedades humanas. Los resultados del análisis de la secuencia ahora publicados revelan que el genoma del cerdo contiene 21.640 genes codificantes de proteínas. En la versión que ahora se ha publicado, los investigadores han encontrado, además, 95 nuevas familias de secuencias no codificantes repetidas entre las que hay familias de elementos móviles tipo LINE, SINE y LTRs (Allison A., 2012).

2.1.8. Extracción de ADN.

Los métodos usados para el genotipo de los animales incluye el aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) de biopsias de tejidos, seguido de la amplificación mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Es importante para el desarrollo de esta técnica, poder contar con un molde de ADN de óptima calidad.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método sencillo para extraer ADN de tejido, con un máximo grado de pureza, basado en la aplicación de un método enzimático, pero utilizando una enzima comercializada a nivel farmacéutico como Ananase, con Bromelina como principio activo. La calidad del ADN obtenido se evalúa mediante espectrofotometría y electroforesis (BIO-RAD), además de

utilizarlo en la amplificación de microsatélites mediante la técnica de la PCR (termociclador); las pruebas realizadas conducen a presentar un método de extracción de ADN con un alto grado de pureza y de fácil aplicación (González, N., Rodríguez, N., Torres, W. & O'Callaghan, J. , 2011).

2.1.9. Métodos de extracción de ADN.

Para extraer los ácidos nucleicos del material biogenético, es preciso inducir una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. La forma de la lisis idónea suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (del tejido), pero suficientemente suave para salvaguardar el ácido nucleico a través del proceso de diana. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, entre otros.);
- Tratamiento químico (detergentes, reducción con tioles, entre otros agentes caotrópicos);
- Digestión enzimática (Proteinasa K, entre otros.).

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que provoquen la rotura de las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactiven las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación (Somma, M. , 2007).

2.1.10. Reactivos que conforman el buffer para la extracción de ADN.

TRIS (Hidroximetil amino metano). Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (pH 7.0 o pH 8.0). Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del TRIS es 121.14 gr. / mol.

EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético). Es un agente quelante de iones metálicos como Ca^{++} y Mg^{++} . Inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al ADN. Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del EDTA es 372.24 gr. / mol.

NaCl (Cloruro de sodio). Las sales aumentan el poder iónico de la solución y ocasionan la precipitación del ADN. El peso molecular del NaCl es 58.44 gr. / mol.

Mercaptoetanol Es un antioxidante, escinde enlaces disulfuro y forma disulfuros. Se usa para ayudar en la desnaturalización de estructuras ricas en GC. Es generalmente usado en caso de que la plantilla tenga largas secuencias de G y C. Es generalmente usado como un agente anti-oxidante / reductor y estabiliza las enzimas.

SDS (Dodecil sulfato de sodio) Es un detergente aniónico que actúa como agente solubilizante de proteínas y de componentes de tejidos y membranas.

Acetato de potasio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$). Precipita proteínas. El peso molecular es 98 gr. / mol. (Velasco M. R., 2005).

2.1.11. Protocolos de extracción de ADN total de animales método de Salting Out.

Se desarrolló un protocolo modificado de extracción de DNA por Salting-out a partir de muestras de sangre con volúmenes

decrecientes (300; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1 y 0,5 μ l). Se llevó a cabo posteriormente una amplificación de un fragmento de 345 pb del gen de la protrombina y de un marcador STR (short tandem repeat) utilizado comúnmente para estudios de filiación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, visualizándose los ampliaciones en un gel de poliacrilamida al 6,4 %.

En todos los casos, la reacción de amplificación fue exitosa, demostrando así que el protocolo de extracción desarrollado permite obtener DNA en condiciones de pureza y cantidad suficiente a partir de pequeños volúmenes de sangre. De este modo, puede disminuirse la cantidad de muestra necesaria para realizar un estudio molecular, lo cual es fundamental en áreas como la genética forense donde la cantidad de muestra disponible puede ser limitada (Riera, M; Rojas, M; y Zapata, P., 2010).

- a. Tomar 5 μ l de sangre pura o su equivalente si está diluida.
- b. Adicionar 300 μ l de buffer de lisis.
- c. Incubar en hielo por 30 min invirtiendo los tubos ocasionalmente.
- d. Adicionar 10 μ l de Proteinasa K (10mg/ml) y digerir a 55-60 °C por 3 horas mezclando ocasionalmente por inversión (puede ser que se necesite más tiempo para la lisis).
- e. Adicionar 150 μ l de acetato de amonio 7.5 M y mezclar por inversión.
- f. Incubar a -80°C por 20 min.
- g. Centrifugar a 13000rpm por 20 ó 10 min. en agua milliQ autoclavada (Villafañe y Posso, 2009).

2.1.12. Protocolo de extracción de ADN por el método de TENS.

En el caso de muestras de sangre colectadas en EDTA lavar por dos o tres ocasiones con 200 μ l de solución salina (CINa 0,9%) y centrifugaremos por 30 seg. Este paso ayudará a eliminar el exceso de proteínas. Agregaremos 400 μ l de tampón de extracción TENS

(50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 µl de Proteinasa K (20mg/ml). Incubamos a 56 °C por 1 hora. Luego agregaremos un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) y homogenizaremos para formar una emulsión, posteriormente centrifugaremos a 10000 rpm por 10 minutos y transferiremos la parte superior "acuosa" a un nuevo tubo. Posteriormente agregaremos 2 volúmenes de Etanol 95% helado, y homogenizado para ayudar a la precipitación del ADN. A continuación centrifugaremos a 10.000 rpm por 5 minutos, y descartamos el Etanol 95% y re suspenderemos con Etanol al 70% y centrifugaremos a 10.000rpm por 5 minutos, al descartar el Etanol 70% se dejara secar a temperatura ambiente y se re suspenderá en 50 µl de TE buffer (10mM tris-HCL pH 8, y 1mM Disodium EDTA). Además se incluirá siempre un control negativo de la extracción de ADN empleando agua destilada estéril en vez de sangre total (Ferreira M. y Amores , 2009).

2.1.13. Amplificación de DNA en (PCR).

La Introducción de los Métodos en ausencia de células para multiplicar fragmentos de ADN de origen definido a partir de una mezcla completa facilita en gran medida el análisis Molecular de genes. Este método de (P.C.R) que fue creado a partir de 1985, es un método y no utiliza células para multiplicar fragmentos de ADN que pueden llevarse a cabo utilizando una maquina automatizada denominada Termociclador para establecer las condiciones de cada etapa y repetirlas cíclicamente (tiempo, temperatura, número de ciclos, etc.), y así se consigue amplificar secuencia de diversos tamaños. (Lafayette. , 2007)

La reacción de la cadena de polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, es una técnica de biología molecular que la creo y desarrollo Kary Mullis en 1985. La Bioquímica básica de la réplica de ADN con el objetivo de amplificar un sinnúmero de copias similares de una

porción particular de ADN a partir de una cadena única. La porción de ADN que se amplifica por lo general contiene información indispensable desde el punto de vista molecular a través de un fragmento específico de ADN utilizando una polimerasa que soporta altas temperaturas, como es el caso de la Taq polimerasa que proviene de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, que vive en manantiales de agua caliente (Arxius., 2007).

2.1.14. Técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de DNA (Pérez De Castro, Ana María , 2011).

La amplificación exponencial de mínimas cantidades de material genético hacen de esta técnica una herramienta útil para diagnóstico de enfermedades infecciosas y parasitarias, clonación de genes, generación de librerías de cDNA a partir de pequeñas cantidades de ARNm, generación de grandes cantidades de ADN para secuenciación, análisis de mutaciones, búsqueda de expresión diferencial de genes, y muchas otras técnicas de manipulación y análisis de ADN y ARN (Zavala, Jorge,, 2005).

2.1.15. Componentes PCR.

La reacción de PCR es preparado o mezclando varios componentes y añadiendo agua desionizada, hasta alcanzar el volumen requerido y concentración deseada de cada elementos. Actualmente se dispone de kit comerciales que poseen los componentes premezclados, simplificando notoriamente este proceso. El objetivo de la cadena de polimerasa (PCR). Es el obtener muchas copias de un fragmento de ADN para después poder visualizar oriente fragmento o copias y hacer la aplicación en otra investigación o evento científico (Pérez De Castro, Ana María , 2011).

El ADN-Polimerasa: Es una enzima cuya temperatura óptima oscila alrededor de las 72°C temperatura a la cual incorporar aproximadamente 100 nucleótido por segundo, siendo estable a altas temperaturas, incluso por encima de 92°C la Taq polimerasa es una proteína que consta de una sola cadena poli peptídica con actitud de exonucleasa 5' - 3' (Saltos Rosero N., 2012).

ADN Molde: A partir del cual queremos obtener una réplica de un segmento, en proporción del ADN que queremos amplificar. Proceso al que se conoce como ADN Molde.

Primers: Son elementos de entre 10 y 30 bases de ADN de cadena sencilla. Esta molécula son las que van a delimitar el fragmento a amplificar.

Desoxirribonucleótidos: La inserción de enzimas ADN polimerasas crea una cadena complementaria a la cadena de molde mediante la incorporación de nucleótidos al extremo, 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde.

2.1.16. Evaluación de ADN.

Una vez extraído el ADN se procederá a verificar su calidad en un gel de agarosa al 1% por medio de electroforesis (Horizon 58, Marca Life Technologies) durante 25 minutos a 86 voltios. Los resultados se visualizarán mediante fotos documentadas (Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) y las imágenes capturadas en el programa Quantityone; según la presencia, integridad y calidad del ADN extraído se procedía a realizar la técnica de PCR (**Ramos, E., 2008**).

2.1.17. Gel de Electroforesis.

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa.

Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema. La composición de gel de electroforesis es semisólida, con poros abiertos de cadenas lineares relacionadas (Padilla, C., 2011).

2.1.18. Electroforesis.

La electroforesis consiste en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (agarosa, acrilamida, almidón). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis son reguladas a través de la concentración de agarosa (o acrilamida) en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. (Posso Duque, 2009)

2.1.19. Cuantificación del ADN con el Qubit.

Anteriormente los investigadores experimentaban complejidades en las aplicaciones de extracción en ADN cuantitativo cuando se trataba de determinar la cantidad ADN. Estas experiencias negativas se hubiesen podido evitar con la nueva herramienta que hoy disponemos para brindar la cuantificación exacta del ADN y RNA o proteínas de sus muestras. La cuantificación por espectrofotometría UV brinda una herramienta de valor, pero se debe tener en cuenta que el espectrofotómetro mide también otros componentes presentes en la muestra, además al investigador le interesa cuantificar específicamente este proceso.

Esto suele generar desvíos en la medición y acarrear graves problemas en las aplicaciones posteriores. Actualmente, esto puede resolverse de manera fácil, conveniente y rentable utilizando la herramienta molecular de Cuantificación Qubit que INVITROGEN ha

lanzado al mercado. Esta herramienta de Cuantificación Qubit consiste en un Fluorómetro Qubit y kits de Tecnología Quant-iT. Dichos kits emplean colorantes selectivos que se tornan fluorescentes cuando se unen al DNA, RNA o PROTEÍNAS. Estos colorantes son específicamente para sus tarjetas y no se compatibilizan a contaminantes como fenol, sales, cloroformo y/o nucleótidos libres. Como resultado es una lectura de fluorescencia que muestra exactamente la cantidad de producto que el investigador tiene interés en cuantificar (DNA, RNA o Proteínas, etc.) (Arxius., 2007).

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.1. Localización.

La presente investigación se realizó desde junio del 2014 a octubre del 2014, en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en el km. 1 ½ vía Quevedo-Santo Domingo, en la Provincia de Los Ríos. El material biológico se recolectó en la Finca Experimental “La María” propiedad de la UTEQ. Provincia Los Ríos, localizada en el Km. 7.5, cantón Mocache de la Vía Quevedo-El Empalme, su ubicación geográfica es de 1° 03' 18" de latitud Sur, 79° 25' 24 "de longitud Oeste a una altura de 73 msnm, y bajo las siguientes características climáticas y edáficas.

3.1.2. Condiciones meteorológicas.

Cuadro 1. Condiciones agro climáticas de la Finca Experimental “La María” UTEQ – DICYT MOCACHE. 2014.

Parámetros	Promedio
Temperatura °C	25.47
Humedad Relativa %	85.84
Precipitación anual mm	2223.85
Heliofonía horas/luz/año	898.66
Evaporación promedio anual (%)	78.30
Zona ecológica	Bosques Semi Húmedo Tropical
Topografía del terreno	Plano
Textura del suelo	Franco arcillo
PH	5.9 (ligeramente ácido)

Fuente. Departamento de Agro meteorológico del INIAP. Estación Experimental Tropical Pichilingue 2014.

Autor: Frank Vidal.

3.2. Materiales y equipos.

3.2.1. Materiales de campo.

- Agujas vacutainer
- Porta vacutainer
- Jeringuillas
- Hielera
- Marcador permanente
- Alcohol
- Cámara Fotográfica
- Botas
- Mandil
- Soga

3.2.2. Materiales de laboratorio.

- Vasos de precipitación
- Matraces
- Mortero
- Espátula
- Bisturí
- Tijeras
- Hielera
- Freezer -20 °C
- Micropipetas
- Microtubos 1.5 ml.
- Microtubos para PCR
- Fundas
- Puntas amarillas
- Puntas azules
- Guantes plásticos
- Toallas desechables

- Papel periódico
- Mascarillas
- Gradilla
- Coolers
- Mandil

3.2.3. Reactivos.

- Tris EDTA
- Etanol 70 %
- Agua ultrapura (Dnase free)
- Cloruro de sodio (Cl₂ Na)
- Cloruro de Magnesio (Cl Mg₂)
- EDTA (Etil en diamino tetra acético)
- RNAsa
- Bromuro de etidio
- Tris HCl
- Tris base
- 2- Mercaptoetanol (100x) liquido
- Cloroformo
- Isoamyl alcohol
- Isopropanol
- Agarosa ultrapure
- Buffer PCR
- Cloruro de magnesio
- DNTPs set 4 x 25 µmol
- Primers
- Taq DNA polimerasa

3.3. Equipos.

3.3.1. Equipos de laboratorio.

- Balanza 0.001 g.
- Cámara fotográfica
- UV trasiluminador 20 x 20
- Baño de maría
- Ultra centrífuga
- Cámara de flujo laminar
- Congelador vertical -20 °C
- Vortex
- pH metro
- Refrigeradora grande
- Bandejas de electroforesis
- Termociclador Techne Termal Cyclor
- Autoclave
- Caja de electroforesis

3.4. Técnicas moleculares.

En este escenario se describe las técnicas moleculares con mayor relevancia que se están utilizando y desarrollando actualmente para elevar y evaluar la diversidad genética y estudiar la variación funcional a través en la extracción de ADN utilizando muestras de sangre de cerdos criollos.

Protocolo 1: Salting out:

Reactivos:

- Buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB por sus siglas en inglés) [NH₄CL y NaHCO₃].
- Buffer de lisis nuclear NLB(por sus siglas en inglés) [NaCl, 1M tris HCl pH 8.2 y 0.5 M EDTA pH 8.0].

- Solución de Cloruro de Sodio 6M.
- Cloroformo – Alcohol Isoamilico CIA
- Alcohol 95 %
- Alcohol 70 %
- Proteinasa K
- Buffer T.E. (Tris EDTA)

Procedimiento.

- Se trabajó con 300, 200, 100 µl de las muestras sanguíneas las cuales fueron centrifugadas durante 2 minutos a 10000 rpm y se eliminó cuidadosamente la parte del plasma.
- Se añadieron 400 µl de RCLB, se homogenizó las muestras por inversión repetida del tubo y se colocaron en el congelador por 5 minutos.
- Luego se agitaron por inversión suave y se centrifugaron por 2 minutos a 10000 rpm.
- Posteriormente se procedió a repetir estos dos últimos pasos por dos ocasiones más.
- Se añadieron 100µl de NLB a temperatura ambiente y 5 µl de proteinasa K.
- Se agito con vortex suave hasta que se suspendió bien el pellet. Se añadieron otros 200µl de NLB y homogeneizar con toques de vortex.
- Las muestras fueron encubadas durante una hora a 56 grado centígrados.
- Luego de la incubación se añadieron 100µl de solución de cloruro de sodio 6 M y se agitaron fuertemente por inversión.
- Se añadieron 200µl de mezcla de cloroformo- alcohol isoamilico (CIA) y se agitaron por vortex.
- Se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente y se trasvasaron cuidadosamente 350µl del sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. cuidando de no remover la interface.

- Seguidamente 2 volúmenes de etanol 700 µl al 95% frío y se agito por inversión fuerte para luego centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm.
- Se procedió a la eliminación del sobrenadante por inversión del tubo vigilando que el pellet de ADN no se desprendiera de la pared del tubo.
- Posteriormente se añadieron 500 µl de etanol 70% frío y se dio vortex hasta la re suspensión del pellet de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y se eliminó de sobrenadante por inversión, vigilando que no se desprenda del pellet del ADN.
- Se procedió al secado de la muestra del ADN durante 15 minutos para posteriormente añadir 50 µl de T.E. y se dio vortex ligero para re suspender el pellet e incubar a 56 grados centígrados por 20 minutos.
- Finalmente las muestras fueron conservadas en refrigeración a menos 4 grados centígrados.

Reactivos:

- Buffer de TENs [Tris, EDTA, NaOH, y SDS]
- Solución de Cloruro de Sodio 0,9%
- Cloroformo – Alcohol Isoamilico CIA
- Alcohol 95%
- Alcohol 70%
- Proteinasa K
- Buffer T.E.(Tris EDTA)

Protocolo 2: TENs

Procedimiento.

- Se trabajó con 300, 200,100 µl de las muestras sangre de cerdo criollo.
- Se añadieron 200 µl de NaCl (0,9%), se dio toque de vortex y se centrifugó durante un minuto a 13000 rpm para luego eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

- Posteriormente se procedió a repetir este último paso por dos ocasiones más.
- Se añadieron 400 µl de Tens y 5 µl de proteinsa K se agitó con vortex suave hasta que se re suspendió bien el pellet.
- Las muestras fueron incubadas durante una hora a 56 grados centígrados.
- Luego de la incubación, se añadieron 100 µl de solución de Cloruro de sodio al 6M y se agitaron fuertemente por inversión.
- Se añadieron 200 µl de la mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico (CIA) y se agitaron por vortex.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente y se trasvasaron cuidadosamente 350 µl del sobrenadante a un tubo de 1,5 ml cuidando de no remover la interface.
- Seguidamente se añadieron 700 µl de etanol al 95 % frío y se agito por inversión fuerte para luego centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm.
- Se procedió a la eliminación del sobrenadante por inversión del tubo, vigilando que el pellet de ADN no se desprendiera de la pared del tubo
- Posteriormente se añadieron 500 µl de etanol 70 % frío y se dio vortex hasta la re suspensión del pellet de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm y se eliminó el sobrenadante por inversión vigilando que no se desprenda el pellet de ADN.
- Se procedió al secado de la muestra del ADN durante 15 minutos para posteriormente añadir 50 µl de T.E. y se agito en vortex ligero para re suspender el pellet e incubar a 56 grados centígrados por 20 minutos.
- Finalmente las muestras fueron conservadas en refrigeración a menos 4 grados centígrados.

3.4.1. Cuantificación del AND extraído.

La concentración del ADN se determinó por el método de cuantificación por el equipo de fluorometría Qubit™ de Invitrogen previamente calibrado y Quanti T™ dsADN HS Assay Kit, que consta de un fluorómetro, una buffer de dilución y dos estándares de calibración.

Procedimiento.

- Se preparó la solución de trabajo según se detalla en la Tabla 2.1. Cada solución preparada se mezcló en un vortex por tres minutos.
- Se prepararon las muestras añadiendo μl de ADN con 90 μl de solución de trabajo, se mezcló en un vortex por tres minutos e incubó por dos minutos a temperatura ambiente.
- Pasado el tiempo de incubación se insertó los tubos en el fluorómetro, y se tomaron tres lecturas por muestra.
- Se registró las lecturas de las muestras dada por el fluorómetro Qubit™

3.4.2. Factor y volumen.

Se utilizara la sangre del ganado porcino en dos protocolos, a diferentes volúmenes.

Cuadro 2. Factor y Volumen para Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.

VOLUMEN	PROTOCOLOS	
	SALTING OUT (A)	TENS (B)
1	100	100
2	200	200
3	300	300

Fuente. Laboratorio de Biología Molecular. UTEQ 2014.
Autor: Frank Vidal.

3.4.3. Recolección de la muestra

El plantel porcino que se elegirá para este trabajo será en la Finca "La María" en la F.C.P, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, perteneciente al cantón Mocache, provincia Los Ríos.

Se seleccionaran los mejores animales, de los cuales se extraerán 6 ml de sangre (3 ml se colocaron en tubo vacutainer al vacío) para el análisis serológico RB y, 3 ml en un tubo con citrato de sodio como anticoagulante.

La sangre se la tomará de la vena yugular, las muestras del tubo vacutainer al vacío serán utilizadas para obtener el plasma para la determinación de pruebas de aglutinación en placa de RB.

3.4.4. Tratamientos a evaluarse.

Cuadro 3. Resultando de esta combinación los siguientes tratamientos a evaluarse para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos en Quevedo. 2014.

N°	Tratamientos	Código	Detalle
1	T1	a1 x b1	extracción de sangre de porcino a 100µl
2	T2	a1 x b2	extracción de sangre de porcino a 200µl
3	T3	a1 x b3	extracción de sangre de porcino a 300µl
4	T1	a1 x b1	extracción de sangre de porcino a 100µl
5	T2	a1 x b2	extracción de sangre de porcino a 200µl
6	T3	a1 x b3	extracción de sangre de porcino a 300µl

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular UTEQ 2014.

Autor: Frank Vidal.

Cuadro 4. Juego de primers del cerdo criollo que han sido utilizados en otras investigaciones mediante la amplificación de ADN.

Número	Código	Secuencia 5' 3'
1	AG	HBH (AG) 7 A
2	CT	DVD (CT) 7 C
3	CA	DBD A (CA) 7

Fuente: Memorias VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoo genéticos. 13-14-15-11/2007, en UTEQ.

Autor: Frank Vidal

3.4.5. Diseño experimental.

Para la presente investigación se utilizó un diseño Completamente al Azar (DCA) con **Arreglo factorial**, con seis tratamientos, cuatro repeticiones, dando un total de 24 unidades experimentales.

3.4.5.1. Análisis de varianza.

El esquema de análisis de varianza (**ANDEVA**) que se empleará será el siguiente:

Cuadro 5. Esquema del andeva de las diferencias para las variables del análisis proximal para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos 2014.

Fuente de variación	Grados de libertad
Tratamientos	ab -1 (5)
Factor A	(a-1) 1
Factor B	(b-1) 2
Int. AxB	(a-1)(b-1) 2
Error	(axb)(r-1) 18
Total	axbxr-1 23

Fuente: Métodos estadísticos y principio de diseño experimental 1985.UCE.2da-Edición.

Autor: German González Bahamonde.

3.4.5.2. Modelo matemático.

Las fuentes de variación para esta investigación se efectuaron mediante el siguiente modelo.

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + A \times B_{ij} + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} = El total de una Observación

u = Valor de la media general de la población.

A_i = Protocolos a utilizar (Tens y Salting Oug)

B_j = Volumen de sangre a utilizar (100, 200, 300 μ l)

$A \times B_{ij}$ = Interacción de los protocolos con los volúmenes de sangre del ganado Porcino.

E_{ij} = Efecto aleatorio (error experimental).

Para las comparaciones de las medidas de los tratamientos se empleará la prueba de rangos múltiples de Tukey al ($p \leq 0.05$), de probabilidad para determinar diferencias entre medias de los tratamientos.

Cuadro 6. Esquema del Experimento para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos .2014.

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	N° DE REPETICIONES	N° DE UNIDADES EXPERIMENTALES	SUBTOTAL
a1 x b1	1.1	4	2	8
a1 x b2	1.2	4	2	8
a1 x b3	1.3	4	2	8
a2 x b1	2.1	4	2	8
a2 x b2	2.2	4	2	8
a2 x b3	2.3	4	2	8
TOTAL				48

Fuente: Métodos Estadísticos y Diseño Experimental Básica, Segunda Edición 1985.
Autor: Frank Vidal.

3.4.6. Mediciones experimentales.

Las variables a estudiar serán:

Cantidad de ADN

Para la variable cantidad de ADN partiremos de la muestra de sangre, y estas serán colocadas en una bandeja del transluminador para observar comparativamente las bandas de ADN y ser foto documentado.

Calidad de ADN

La calidad de ADN óptimo o degradado, será medida con una escala porcentual de 0% degradado hasta 100% óptimo como se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Escala porcentual para medir la calidad del ADN, para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos .2015.

100%	Óptimo
75%	Alta
50%	Medio
25%	Bajo
0%	Degradado o nulo

Fuente: Tesis Ing. Lourdes Mero Loo. UTEQ.2014.

Autor: Frank Vidal.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Extracción de ADN con el protocolo de Salting Out.

Para el protocolo de Salting out en la que se puede observar los resultado en cuanto a la cantidad y calidad de ADN en la que fue de 1.54 ug/mL y 85,75 % respectivamente. Ver Figura 1.

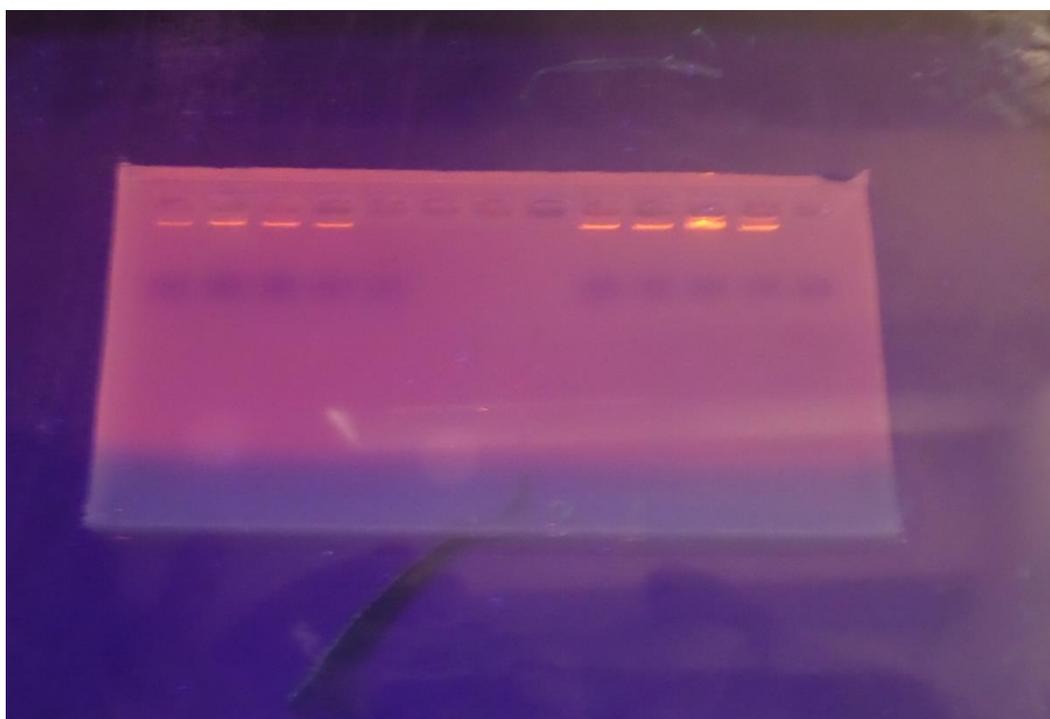


Figura 1. Resultados de la extracción de ADN genómico en muestras de sangre de cerdos criollos.

La figura 1 indica las muestras extraídas con el protocolo de Salting out en sangre de cerdo periférica total. Línea MPM= Marcador de peso molecular 1kbp, líneas 1-11, muestras de ADN_g analizados, línea C= indica el control de reactivos utilizados para la extracción. Se estimó este ADN competente para realizar las pruebas variantes de PCR.

4.2. Extracción de ADN protocolo de TENS.

Para establecer el mejor método de extracción de ADN se evaluó el protocolo de TENS en la que se puede observar los resultados en cuanto a la cantidad y calidad de ADN en la que fue de 1.51 ug/ml. y 82.75 % respectivamente. Ver Figura 2.

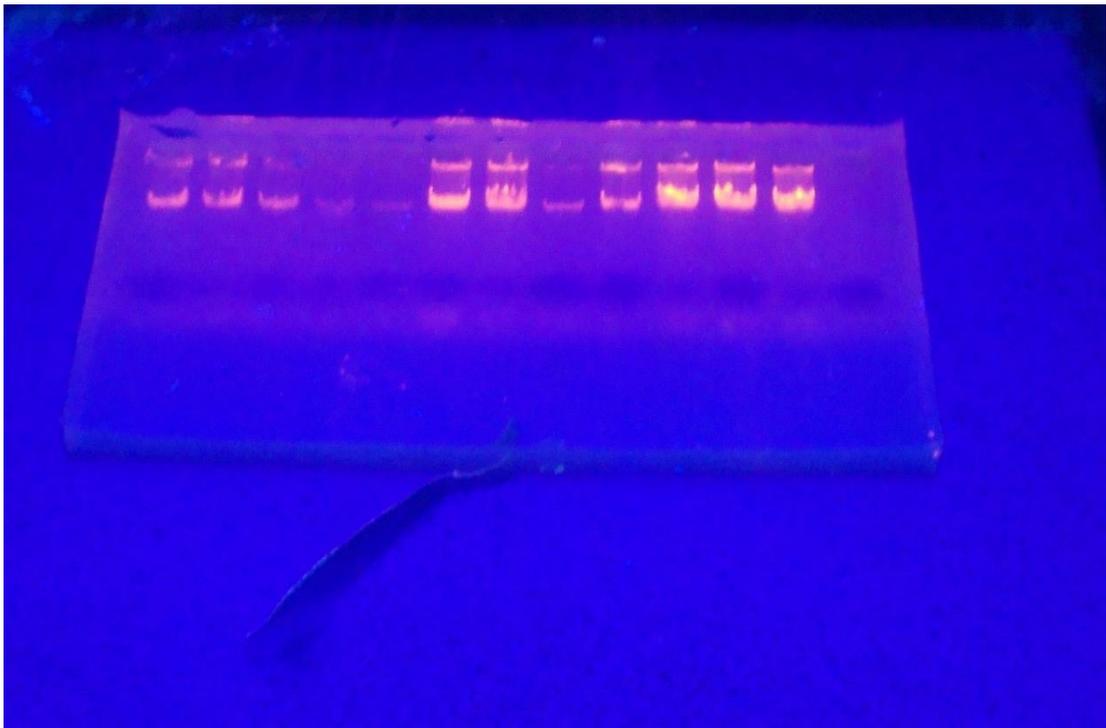


Figura 2. Resultados de la extracción de ADN genómico de sangre de cerdos criollos con el protocolo de TENS.

La figura 2 indica las muestras extraídas con el protocolo de TENS en sangre de cerdos. Línea MPM = Marcador de peso molecular 1kbp, líneas 1- 11 = Muestras de ADNg de sangre analizados, línea C= indica el control de reactivos utilizados para la extracción. Se estimó este ADN competente para realizar las pruebas de variantes de PCR.

4.3. Efecto simple de la cantidad de ADN extraído en para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2015.

4.3.1. Protocolo.

Para el efecto simple de los protocolos aplicados para la extracción de ADN en sangre de cerdos criollos en la variable cantidad de ADN, no se encontró diferencias ($p \leq 0.05$), se obtuvo un promedio de 1,48 en el protocolo de Tens y 1,53 μg en el protocolo Salting out cuadro 7. Este resultado concuerdan con Riera et al., (2010), quien utilizó un protocolo modificado de extracción de DNA por salting-out a partir de muestras de sangre con volúmenes decrecientes (300; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1 y 0,5 μl) en todos los casos, la reacción de amplificación fue exitosa, demostrando así que el protocolo de extracción desarrollado permite obtener DNA en condiciones de pureza y cantidad suficiente a partir de pequeños volúmenes de sangre. De este modo, puede disminuirse la cantidad de muestra necesaria para realizar un estudio molecular, lo cual es fundamental en áreas como la genética donde la cantidad de muestra disponible puede ser limitada.

4.3.2. Volumen de sangre de cerdo criollo.

Para el efecto simple de la cantidad de ADN extraída en sangre de cerdos criollos no se encontró diferencias ($p \leq 0.05$), se obtuvo un promedio de 1,48 cuando se utilizó 100 μl , 1,57 200 μl y 1,43 en 300 μl , siendo por tanto indistinto para la cantidad de sangre el volumen utilizado en el proceso de extracción cuadro 8.

Cuadro 8. Promedios del efecto simple de los factores, Protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable cantidad de ADN en el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2014. (F. Vidal).

Efecto simple de los tratamientos	Cantidad de ADN (ug)
1. Tens	1.48 a
2. Salting oug	1.53 a
100 µl	1.48 a
200 µl	1.57 a
300 µl	1.43 a
CV. %	16.13

Fuente: *Promedio con letras iguales no presentan diferencias estadísticas según Tukey al ($p \leq 0.05$).

Autor: Frank Vidal.

4.4. Interacción de los factores protocolos por volumen de muestra utilizada.

En la interacción de los dos factores, protocolos por volumen de muestra utilizado no se encontró diferencias ($p \leq 0.05$). Esto resultado concuerda con NIH, (2005), los resultados de la electroforesis para la cuantificación de ADN porcino, obtenido mediante la metodología de extracción usando fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, SDS 20 % y Proteinasa K 10 mg/mL y buffers de extracción Lysys Buffer pH 7.4 y SE buffer pH 8.0 se observan las muestras de ADN porcino tomado de animales de la Finca la María UTEQ.

Se puede observar la luminosidad del ADN extraído usando bromuro de etidio y bajo la acción de la luz ultravioleta. La luminosidad en cada placa representa la presencia de ADN en la muestra. Mediante este protocolo se pueden llegar a extraer cantidades relativamente altas de ADN, pero se tiene poca pureza en la muestra, lo que se

verifica por las coloraciones inconsistentes en los bordes de las placas y en los pozos del gel cuadro 9, figura 3.

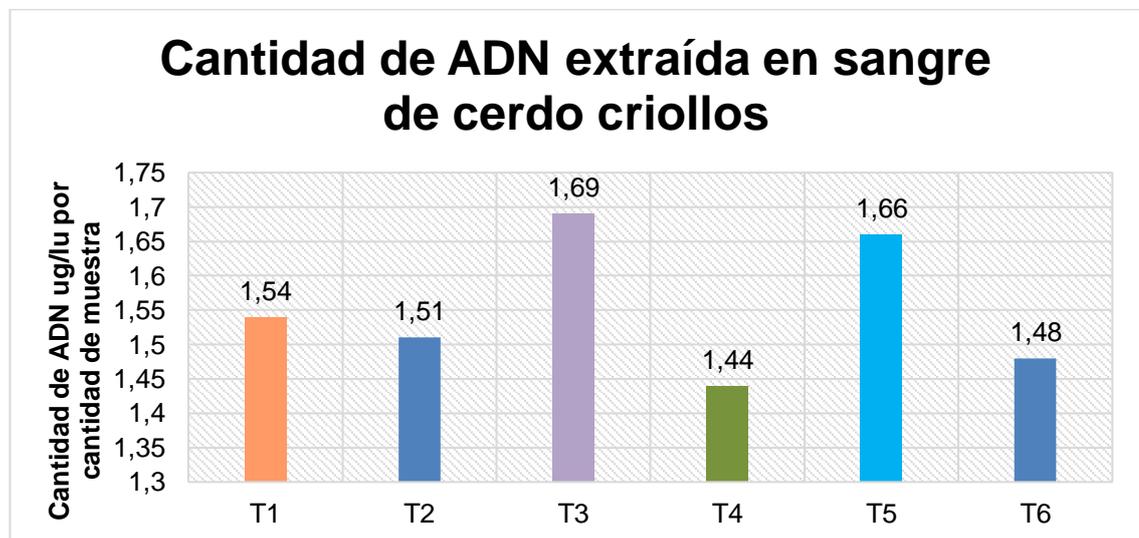
Cuadro 9. Interacción de los factores, Protocolos de extracción por volumen de muestra la variable cantidad de ADN en para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. 2014.

Tratamientos	Cantidad de ADN
T1	1,54 a
T2	1,51 a
T3	1,69 a
T4	1,44 a
T5	1,66 a
T6	1,48 a

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular UTEQ. 2014.

Autor: Frank Vidal.

Esta figura podemos observar todos los tratamientos.



Fuente: Laboratorio de Biología Molecular UTEQ.

Autor. Frank Vidal.

Figura 3. Interacción de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable cantidad de ADN en el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos en Quevedo 2014.

4.5. Efecto simple de la calidad de ADN extraído en porcino en el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.

4.5.1. Protocolo.

Para el efecto simple de los protocolos aplicados para la extracción de ADN en sangre de cerdos criollos en la variable calidad de ADN, no se encontró diferencias ($p \leq 0.05$), se obtuvo un promedio de 1,43 en el protocolo de Tens y 1,53 μg en el protocolo Salting out, este resultado concuerdan (Ramos, E., 2008) con la técnica estandarizada produjo una alta cantidad y calidad de ADN, así mismo, mediante la amplificación y generación de fragmentos de los genes por medio de PCR se evaluó la frecuencia de dos genes relacionados con prolificidad: Receptor de la prolactina (PRLR) y Estrógeno receptor (ESR). En la generación de los genotipos (RFLP) se utilizaron las enzimas Alu I para PRLR y Pvu II para ESR cuadro 9 figura 4. Por lo tanto se acepta la hipótesis donde con el protocolo de Salting Out se obtendrá una concentración de ADN que amplificará en el análisis de técnica molecular.

4.5.2. Volumen de sangre de cerdo criollo.

Para el efecto simple de la calidad de ADN extraído en sangre de cerdos criollos no se encontró diferencias ($p \leq 0.05$), se obtuvo un promedio de 1,48 cuando se utilizó 100 μl , 1,57 200 μl y 1.43 en 300 μl , siendo por tanto indistinto para la cantidad de sangre el volumen utilizado en el proceso de extracción cuadro 9. En el cual se aprueba la hipótesis alternativa con el volumen de 200 μl se logrará buena cantidad de ADN que amplificará en el análisis de técnicas moleculares.

Cuadro 10. Promedios del efecto simple de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el Protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. Autor. Frank Vidal 2014.

Efecto simple de los tratamientos	Calidad de ADN
Tens	75.75 a
Salting oug	74.00 a
100 µl	72.25 a
200 µl	80.50 a
300 µl	71.88 a
CV. %	11.12

Fuente: *Promedio con letras iguales no presentan diferencias estadísticas según Tukey al ($p \leq 0.05$).
Autor: Frank Vidal 2014.

4.6. Interacción de los factores protocolos por volumen de muestra utilizada

En la interacción de los dos factores, protocolos por volumen de muestra utilizada se encontró diferencias ($p \leq 0.05$) cuadro 10, figura 2, siendo el promedio más alto el obtenido cuando se utilizó el protocolo Salting oug en 200 µL de muestra con un promedio de 85.75% correspondiente a una calidad alta, esto resultado concuerdan con Riera (2010), de este modo, puede disminuirse la cantidad de muestra necesaria para realizar un estudio molecular, lo cual es fundamental en áreas como la genética donde la cantidad de muestra disponible puede ser limitada.

Cuadro 11. Interacción de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos. Autor. Vidal 2014.

Tratamientos	Cantidad de ADN	
T1	82.75	ab
T2	75.25	abc
T3	69.25	bc
T4	61.25	c
T5	85.75	a
T6	74.50	abc

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular UTEQ 2014.

Autor: Frank Vidal.

Es necesario resaltar que el volumen de ADN obtenido al final de la extracción con los dos protocolos, el tratamiento mejor fue el T5 suficiente para al menos 50 amplificaciones de RAMs y 25 reacciones de microsatélite, siendo fácilmente almacenado en el congelador donde puede permanecer con una baja tasa de degradación figura 4.

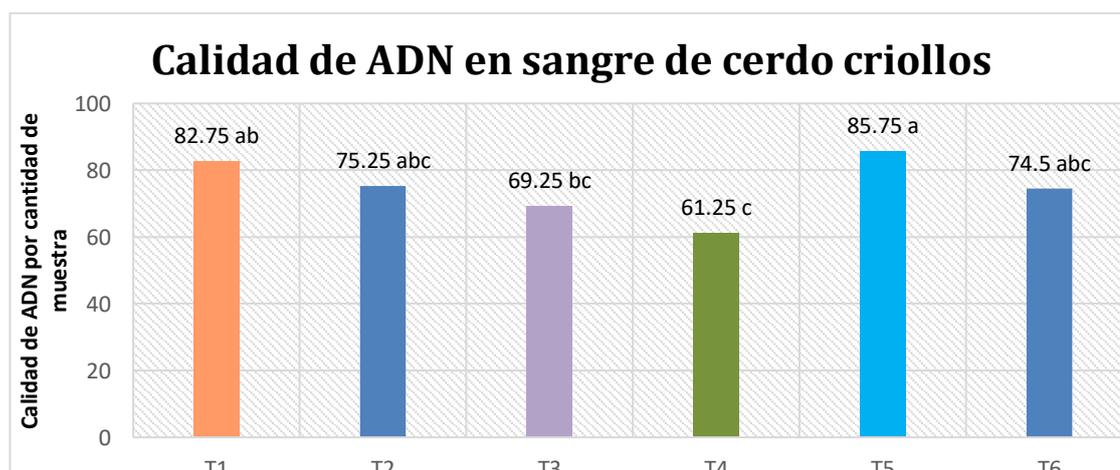


Figura 4. Interacción de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.

Autor: Frank Vidal 2014.

4.7. Correlación entre la cantidad de ADN extraída y la calidad.

Como se puede observar en la figura 5 la cantidad de ADN se observa en el tratamiento 5 la cantidad de ADN de 1,66 μg que está relacionada con la calidad de ADN 85,75., mientras que el más bajo 1,44 también se corresponde con la menor calidad 61,25.

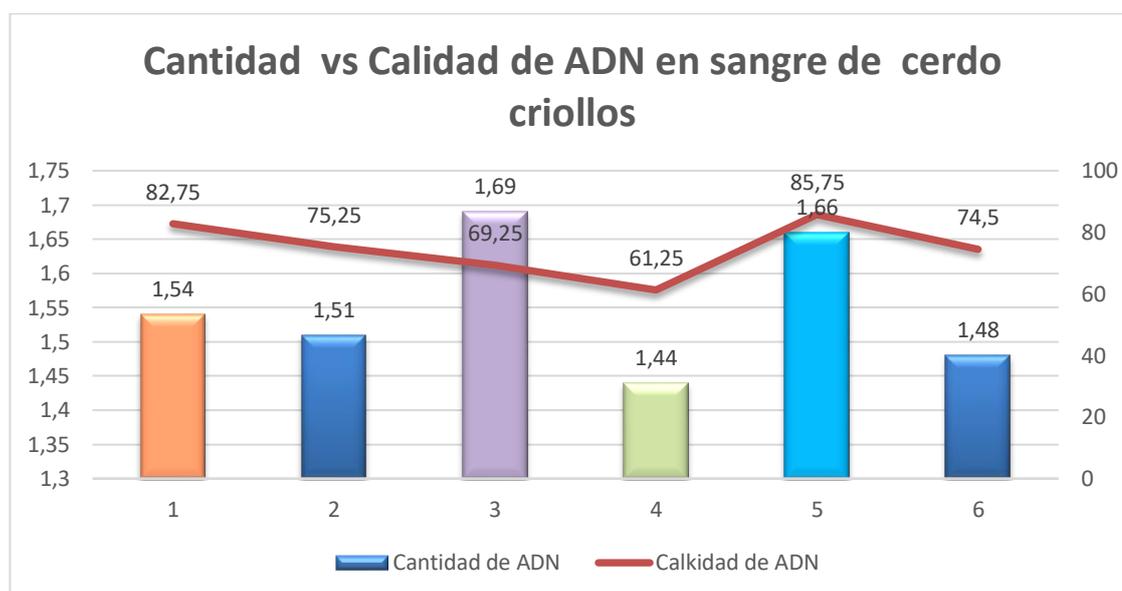


Figura 5. Correlación de los factores, protocolos de extracción por volumen de muestra en la variable calidad de ADN para el protocolo de extracción de ADN en cerdos criollos.

Autor: Frank Vidal. 2014.

4.8. Discusión.

Se procedió a la extracción de ADN mediante la comparación de dos protocolos a partir de muestras de sangre de cerdos criollos (*Sus Scrofa domesticus*) tomadas de la finca la María perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Los resultados se ponen de manifiesto en la gran sensibilidad que puede presentar el protocolo de Salting out cuando se lo emplea en trabajos de pequeños volúmenes de sangre. De tal manera es posible reducir el volumen de muestra inicial que utilizamos en la extracción

considerando un mínimo de 100 µl de sangre por cada muestra de cerdo criollo como indican los resultados de investigación. El desarrollo de los métodos moleculares ha llevado a la necesidad de crear métodos de extracción de ADN más simples y eficientes. Un método de extracción de ADN genómico lo más estandarizado posible con el que se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la RCP para de esa forma obtener patrones reproducibles de RAPD. (Somma. 2007)

Además se determina la importancia económica al tomar en cuenta que las cantidades están limitadas en el empleo de los distintos reactivos y soluciones a utilizar en cada muestra de los tratamientos, debemos considerar que anteriormente se experimentaban con técnicas y cantidades de mayor volúmenes para lo cual era compleja la investigación, como resultado se obtenían cantidades relativamente altas de ADN, de poca pureza en la extracción de la muestra analizada.

Usualmente la comparación de los protocolos de Salting out y TENS han demostrado estadísticamente resultados exitosos con diferencias no significativas permitiendo obtener ADN en condiciones de pureza y cantidad suficiente a partir de pequeños volúmenes de sangre.

Esta investigación establece que Salting out representa una técnica de mayor rendimiento en la obtención de ADN, cuyos resultados concuerdan con un estudio previo realizado (Aveiga, A. 2011) donde establece que este protocolo ayuda a extraer ADN eficientemente. Además pueden ser útiles si los emplean en el campo de la genética forense en cuyos estudios de origen para obtener ADN de excelente calidad, luego de ser amplificado molecularmente a través de microsatélites.

Una de las posibles razones según la literatura, el método de TENs fue elaborado principalmente para extracciones y secuenciación de ADN plasmídico empleado en cultivos bacterianos (Zhou. 1990).

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se evaluó dos métodos de extracción de ADN a partir de sangre de cerdos criollos basados en la extracción de TENs y Salting out, permitieron la obtención de ADN de calidad y pureza necesarias para la amplificación mediante PCR a partir de volúmenes de sangre, con un volumen mínimo 100 μ L de sangre de partida.
- Se empleó las metodologías de electroforesis y espectrofotometría para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN extraído, logrando determinar el mejor método de extracción de ADN el T5.
- Mediante las dos metodologías empleadas para la cuantificación de ADN, se determinó que el protocolo Salting out se basó en la extracción de ADN con fenol, cloroformo y alcohol isoamílico, considerando el mejor método se logró obtener buenos rendimientos en cantidad y calidad.
- Las combinaciones de cantidad y pureza del ADN, conjugados con los iniciadores o primmer se prepararon los reactivos para la mezcla PCR (óptima calidad), número de ciclos en un termociclador, las mezclas son cruciales al momento de obtener un producto de PCR para ambos protocolo.
- La presente investigación permite ayudar en el manejo genético de las pequeñas poblaciones de porcinos, para evitar procesos de endogamia.

5.2. RECOMENDACIONES.

- Probar extracciones de ADN de cerdos de otro material biológico como son: pelo, semen y hueso con nuevas variables a investigar.
- Realizar modificaciones al Tratamiento 5 para así obtener un ADN con mayor concentración, y al Tratamiento 3 para poder alcanzar una óptima pureza.
- Validar con otros protocolos de extracción que permitan obtener un ADN puro y amplificable los recursos zoogenéticos.
- Realizar de manera permanente estudio de diversidad genética de cerdos criollos en todas las regiones del Ecuador empleando protocolos que mejores los resultados y tener un banco de genes.
- Emplear en los análisis de la técnica molecular (Salting Out) el mayor número de muestras que nos permite visualizar la malla del ADN por ser de tipo inorgánica y reactivo de baja toxicidad.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.1. LITERATURA CITADA.

- Aguirre, A. 2012. Ehusfera, Genes, genomas y otras genialidades, pág. 1-12.
- Aguilar, J. 2007. Memorias VIII Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoo genéticos. 13-14-15-11/2007. pág. 248
- Allison, A. 2012. Artículo Secuenciado el genoma del cerdo , genes, genoma y otras generalidades, pág. 15.
- Alvarado, J. 2007. Enfoques integrales de producción <http://manipulacingentica.blogspot.com>
- Arxius. (2007). Plataforma de Cuantificación QUBIT Todo lo que Usted necesita para una cuantificación exacta. Invitrogen Argentina S.A. Revista Bioanálisis.
- Buchot, E. 2013. Fotografías animales <http://www.voyagesphotosmanu.html>.
- Bahamonde, G.. 1985. Métodos estadísticos y orincipios de diseño experimental. Quito-Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Pág. 361.
- Delgado J.V. 2010. Conservación de razas de especies domésticas. Genética de Animales Domésticos. Giovambattista G.
- Donnenberg, K. J. 1997. Interactions between. Trends Microbiol , 109-114.
- Estupiñan. K, Vasco, D. 2007. Tesis Estudio Morfoestructural de una población de cerdos naturalizados en los cantones Valencia y la Mana.www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C1_articulo_320092.pdf.
- Ferreira M. y Amores. 2009. Extracción de ADN a partir de muestras de biopsias.

- González, N., Rodríguez, N., Torres, W. & O'Callaghan, J. . 2011. Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima bromelina. *Revista Científica*, XXI(3) pág. 233-238.
- Jurado, A. 2008. *El Cerdo y Sus Chacinas*. Madrid. España: C & G Comunicación Gráfica.
- Lafayette. 2007. *Genética Texto y Atlas*. New York- USA. Tercera .
- Monge, J. 2005. *Producción Porcina (Primera ed.)*. San José. Costa Rica: EUNED.
- Montenegro, M. 2012. Tesis Doctoral caracterización genética de los cerdos. Estados Unidos.
- Munayco, V. 2011. *Taxonomía del Cerdo*.pág. 10-25. Estados Unidos.
- Padilla, C. 2011.1. *Electroforesis de ácido nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico*.
- Pérez De Castro, A. 2011. *Reacción en cadena de la polimerasa*. Universidad Politécnica de Valencia. Pág. 2
- Pérez, M. 2008. *Detección de microorganismos patógenos e indicadores en carne de bovino que se expanden en supermercados de la ciudad de México*. pág. 10-25.
- Posso, D. 2009. *Protocolo de electroforesis del ADN en geles de agarosa. Protocolo de laboratorio UEG*. Venezuela. Pág. 1-15.
- Ramos, E. 2008. *Estandarización de una técnica de extracción de ADN en sementales porcinos para evaluar la frecuencia de los genes ESR y PRLR con PCR-RFLP*. *Revista Complute*. Todo el documento.
- Riera, M.; Rojas, M. y Zapata P. 2010. *Protocolo de extracción de DNA por Salting –out para pequeños volúmenes de sangre*. *Rev. Ciencias Tecnológicas*. Año 12/ N.14.
- Saltos N. 2012. Tesis *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino*. Universidad de Guayaquil Facultad de Ciencias Naturales Escuela de Biología. Todo el documento.

Somma, M. 2007. Extracción y purificación de ADN (en línea). Consultado 16 de abril de 2015.

Velasco M. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Todo el documento.

Villafañe y Posso, M. 2009. Protocolo de extracción de ADN total de animales por Salting out. Todo el documento.

Zavala, J. 2005. Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular. Volumen 7. Pág. 1-14.

CAPÍTULO VII
A N E X O S



Anexo 1.

Saíno Salvaje en el Plantel Porcino Finca La María-UTEQ.



Anexo 2.

Verraco Criollo en el Plantel Porcino Finca La María-UTEQ.



Anexo 3.

Hembra Criolla en el Plantel Porcino Finca La María-UTEQ.



Anexo 4.

Verraco Criollo en el Plantel Porcino Finca La María-UTEQ.



F. VIDAL

Anexo 5.
Muestra de sangre en la yugular en el Plantel Porcino Finca La María-UTEQ.



Anexo 6.
Extracción de sangre en cerdos criollo de la Finca La María de la FCP-UTEQ.



Anexo 7.
Toma de muestra de sangre de la vena Yugular, plantel porcino La María.



Anexo 8.
Congelación de muestras de sangre a -20°C de cerdo criollo.



Anexo 9.
Descongelación de muestras de sangre del cerdo criollo.



Anexo 10.
Preparación de muestras para centrifugación.



Anexo 11.
Centrifugación de las muestras hasta 10.000 RPM.



Anexo 12.
Centrifugado de muestras para extracción de ADN.



Anexo 13.
Lavado de muestras de sangre del cerdo criollo.



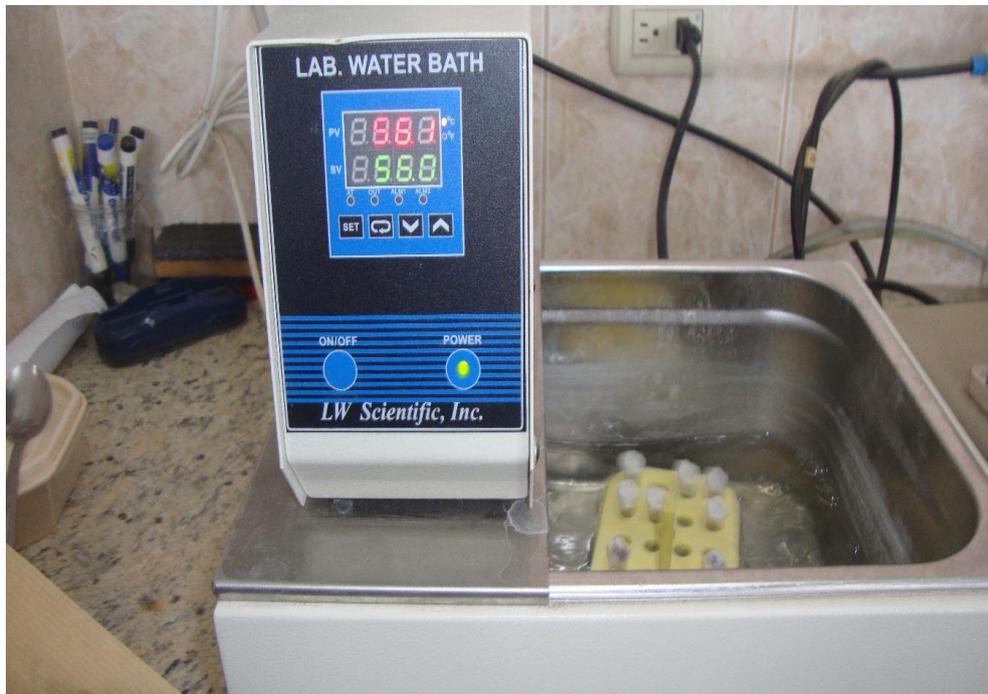
Anexo 14.
Extracción del sobrenadante de las muestras.



Anexo 15.
Lavado de las muestras con alcohol isoamílico CIA.



Anexo 16.
Segundo lavado de muestras en extracción de ADN.



Anexo 17.
Muestras en baño maría a 60 min. A 56° C, para la extracción de ADN.



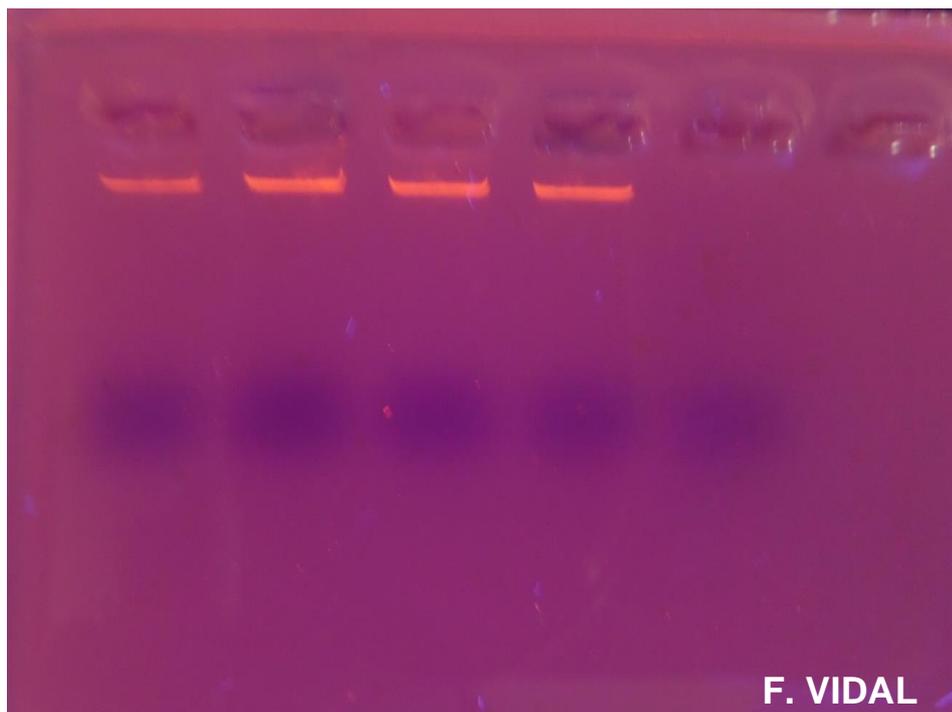
Anexo 18.
Retirado de muestras de baño maría en extracción de ADN.



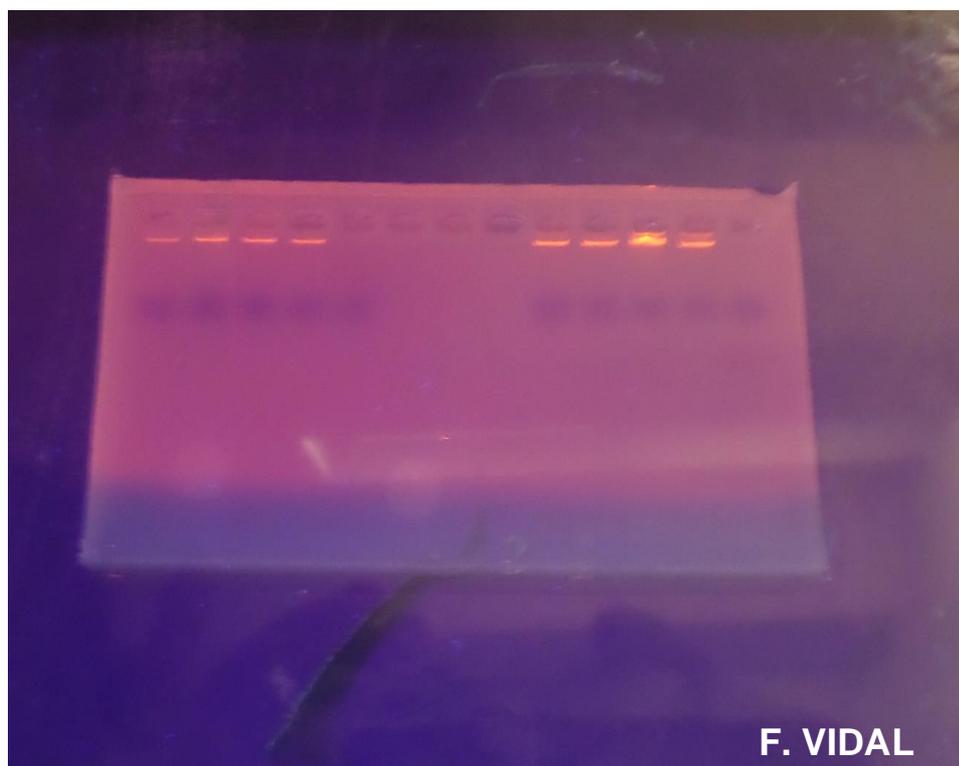
Anexo 19.
Muestras de protocolo Salting Out con alcohol Isoamilico CIA.



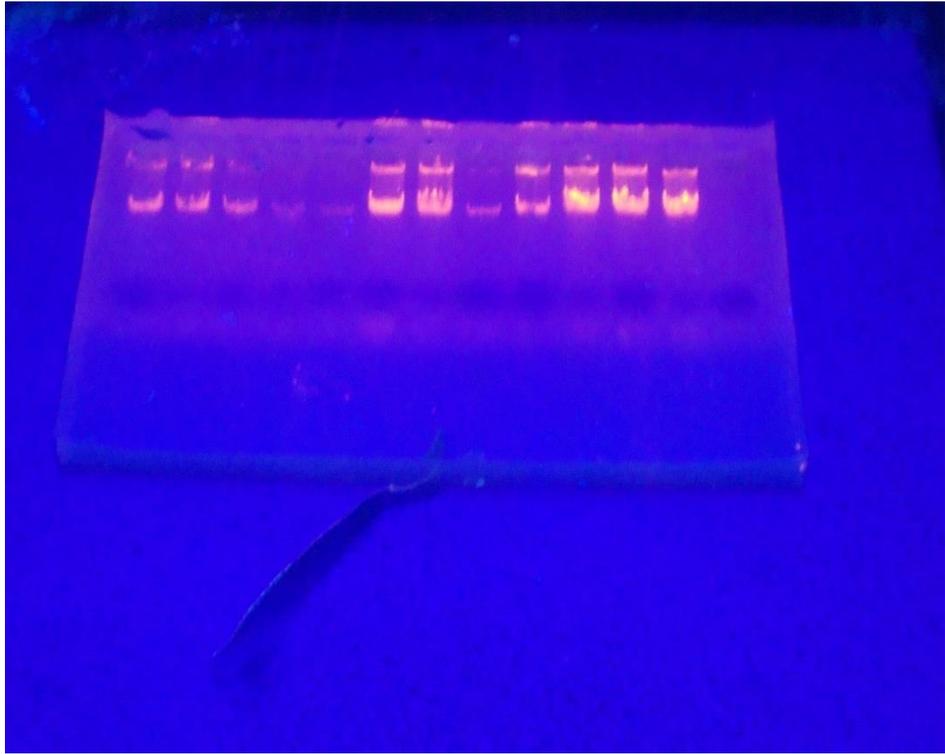
Anexo 20.
Migración de muestras de sangre de Cerdo Criollo en extracción de ADN.



Anexo 21.
Muestras amplificadas de protocolo de Salting Out en sangre de cerdo criollo.

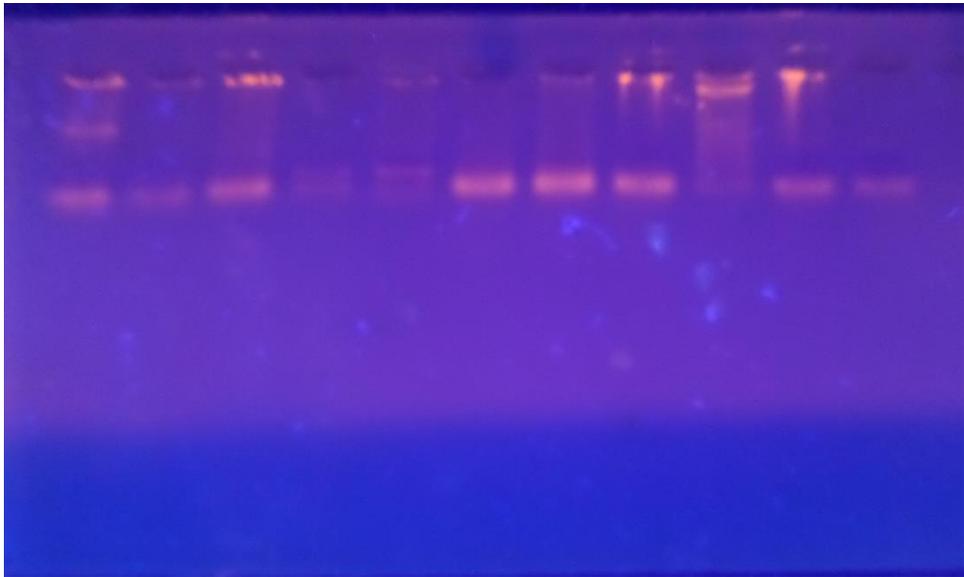


Anexo 22.
Muestras amplificadas de protocolo de Salting Out en sangre de cerdo criollo.



Anexo 23.

Muestras amplificadas de protocolo de TENS en sangre de cerdo criollo.



Anexo 24.

Muestras amplificadas de protocolo de TENS en sangre de cerdo criollo.