



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

Proyecto de Investigación previo a la  
obtención del título de Ingeniero  
Agropecuario.

**Título del Proyecto de Investigación:**

**“COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN  
DE ADN A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MOLECULAR”**

**Autor:**

**Ronald Ignacio Cox Intriago**

**Director del Proyecto de Investigación:**

**Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez**

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2018**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **Ronald Ignacio Cox Intriago**, 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 normatividad institucional vigente.

---

**Ronald Ignacio Cox Intriago**  
**C.I. 092749680-2**  
**AUTOR**



**Acreditada**

Teléfonos : FCP (Fax) 783 487 UTEQ (593-05) 750 320 / 751 430 / 753 302

Fax UTEQ : (593 -05) 753 300 / 753 303 / 752 177

[E.mail.info@uteq.edu.ec](mailto:info@uteq.edu.ec) /fcp\_91@yahoo.es

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS  
UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO  
CAMPUS UNIVERSITARIO LA MARÍA  
Km. 7 ½ Vía Quevedo-El Empalme, Entrada a Mocache



CASILLAS

Guayaquil

:10672

Quevedo : 73

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

*La Primera Universidad Agropecuaria del País. Acreditada*

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, **Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el estudiante **Ronald Ignacio Cox Intriago**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “**COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MOLECULAR**”, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Atentamente,

---

**Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez**  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, el suscrito Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado **“COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MOLECULAR”**, de autoría del señor **Ronald Ignacio Cox Intriago**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 6%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.

Documento TESIS  
Presentado 201...  
Presentado por nacho152009@live.com  
Recibido fcevallos.uteq@analysis.orkund.com  
Mensaje TESIS PARA URKUND [Mostrar el mensaje completo](#)  
6% de estas 20 páginas, se componen de texto presente en 10 fuentes.

INF\_PRACTICA DE LABORATORIO.doc  
TESIS.vidal.pdf  
[http://www.invenmar.org.co/documents/10182/14479/boletin+invenmar-44\(2\).pdf](http://www.invenmar.org.co/documents/10182/14479/boletin+invenmar-44(2).pdf)  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-97612015000200010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612015000200010)  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-97612015000200010](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612015000200010)  
LAB\_Grupo 5.docx

88% posterior tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV o directamente al espectrofotómetro mediante espectro de absorción de 200 a 350 nm. El ADN purificado se puede cuantificar

mediante espectrofotómetro a 260 nm y su pureza se puede verificar mediante la relación 260/280 nm.

El paso 3 puede realizarse con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente el ADN permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis. Finalmente se lava con alcohol y se eluye el contenido

CITATION L1112 \1 12298 (28). 2.2.9.

Marcadores moleculares Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica

controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores

idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio CITATION Azo06 \1 12298 (29).

Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez  
DOCENTE TUTOR



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

## **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

**“COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MOLECULAR”.**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario.

Aprobado por:

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Dr. Italo Espinoza Guerra

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Dr. Diego Romero Garaicoa

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Ronald Cabezas Congo M. Sc.

## AGRADECIMIENTO

Me van a faltar páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial mi Madre y mi Padre que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria y me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

Así mismo, agradezco infinitamente a mis amigos/as *John Jairo Pinargote, Solanyi Tigselema, Nataly Herrera y Fiama Orejuela*, que han sido parte esencial en esta etapa universitaria, siempre aconsejándome dándome el apoyo necesario.

De igual forma, agradezco a mi Director de Tesis el Dr. Orly Cevallos, que gracias a sus consejos y correcciones hoy puedo culminar este trabajo. A los Profesores que me han visto crecer como persona, y gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme dichoso y contento.

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Landy Intriago por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Ronald Cox por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanas Sullin, Layllin y Jennifer por sus consejos y enseñanzas motivándome a superarme cada día más.

A mis amigo/as que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos teniendo una amistad sincera e incondicional: John Jairo Pinargote, Solanyi Tigselema, Nataly Herrera y Fiana Orejuela.

A los docentes de la facultad de ciencias pecuarias, que me enseñaron tanto de la profesión como de la vida, impulsándome siempre a seguir adelante.

A mi director de tesis, Dr. Orly Cevallos, gracias por la orientación y asesoramiento en el desarrollo del trabajo de investigación.

***Ronald Ignacio Cox Intriago***

## RESUMEN

Esta investigación se basó en evaluar tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de tejido pulmonar bovino para estudio molecular, en el camal municipal del cantón Quevedo, donde se extrajeron las muestras de los distintos tratamientos. Los análisis de extracción y purificación de ADN fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos; y cuatro repeticiones. Para las diferencias de medias de los tratamientos se empleó la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Fueron estudiadas variables de cantidad y calidad de ADN, además se realizó un análisis económico de los protocolos. Dentro de los resultados el T2, alcanzó mayores valores en cuanto a cantidad y calidad; con promedios de 23,32 ng/uL y 28,31% respectivamente; mientras que el T1 fue menos eficaz al momento de extraer volumen de ADN con un promedio de 7,04 ng/uL y un porcentaje bajo con 8,31% en cuanto a la calidad. Respecto al análisis económico de extracción de ADN el tratamiento que presentó mayor costo fue el T3 con \$ 405,18, mientras que el de menor costo fue el T1 con \$ 326,93; esto debido a que cada protocolo requiere de equipos y reactivos específicos, además las horas de trabajo de cada equipo implementado genera variabilidad en el uso de energía de cada tratamiento.

**Palabras claves:** Tejido pulmonar, Bovino, post-mortem, protocolo, ADN

## ABSTRACT

This research was based on evaluating three protocols for the extraction and purification of DNA from bovine lung tissue for molecular study, in the municipal slaughterhouse of the Quevedo, where the samples of the different treatments were extracted. DNA extraction and purification tests were performed in the Molecular Biology Laboratory belongs to Universidad Técnica Estatal de Quevedo. We used a completely randomized design (DCA), with three treatments; and four repetitions. For the mean differences of the treatments, the Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) was used. Variables of DNA quantity and quality were studied, and an economic analysis of the protocols was carried out. Within the results, T2 reached higher values in terms of quantity and quality; with averages of 23.32 ng / uL and 28.31% respectively; while T1 was less effective when extracting DNA volume with an average of 7.04 ng / uL and a low percentage with 8.31% in terms of quality. Regarding the economic analysis of DNA extraction, the treatment with the highest cost was T3 with \$ 405.18, while the lowest cost was T1 with \$ 326.93; This is because each protocol requires specific equipment and reagents, plus the work hours of each implemented equipment generates variability in the energy use of each treatment.

**Key words:** Lung tissue, Bovine, post-mortem, protocol, DNA

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página.
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT .....	ix
CÓDIGO DUBLIN .....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
1.1. Problema de investigación.....	4
1.1.1. Planteamiento del problema. ....	4
1.1.2. Diagnóstico.....	4
1.1.3. Pronóstico.....	4
1.1.4. Formulación del problema.....	5
1.1.5. Sistematización del problema.....	5
1.2. Objetivos. ....	5
1.2.1. Objetivo general. ....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6
CAPITULO II.....	7

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
2.1. Marco conceptual. ....	8
2.2. Marco referencial. ....	9
2.2.1. Sistema respiratorio. ....	9
2.2.1.1. Pulmones. ....	9
2.2.1.1.1. La pleura. ....	10
2.2.1.1.2. Los alvéolos. ....	10
2.2.2. Extracción de ADN a partir de tejidos. ....	10
2.2.3. ADN (Ácido desoxirribonucleico). ....	11
2.2.4. Cromosoma. ....	11
2.2.5. Fenotipo. ....	11
2.2.6. Gen. ....	12
2.2.7. Genoma. ....	12
2.2.8. Etapas en la extracción de ADN. ....	12
2.2.8.1. Lisis de las células o virus. ....	13
2.2.8.2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN. ....	13
2.2.8.3. Purificación. ....	13
2.2.8.3.1. Precipitación del ADN. ....	13
2.2.8.3.2. Lavado del pellet. ....	13
2.2.8.3.3. Recuperación. ....	13
2.2.9. Marcadores moleculares. ....	14
2.2.10. Extracción de ADN. ....	15
2.2.11. Cuantificación del ADN. ....	15
2.2.12. Purificación del ADN. ....	15
2.2.13. Cantidad de ADN. ....	16

2.2.14. Calidad de ADN.....	16
2.2.15. Protocolos en extracción de ADN.....	16
2.2.15.1.Homogeneización del tejido.....	17
2.2.15.2.Lisis celular.....	17
2.2.15.3.Separación de proteínas y lípidos.....	17
2.2.15.4.Precipitación del ADN.....	18
2.2.15.5.Redisolución del ADN.....	18
2.2.16. Daños moleculares en el ADN.....	19
2.2.16.1.Tipos de daño en el ADN.....	20
2.2.17. Contaminación del ADN.....	20
2.2.18. Almacenamiento del ADN.....	20
2.2.19. Protocolo tens.....	22
2.2.19.1.TRIS (Hidroximetil amino metano).....	22
2.2.19.2.EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético).....	23
2.2.19.3.NaCl (Cloruro de sodio).....	23
2.2.20. Protocolo fenol-cloroformo.....	23
2.2.21. Lisis de extracción.....	23
CAPITULO III.....	24
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
3.1. Localización.....	25
3.1. Tipo de investigación.....	26
3.1.1. Exploratoria.....	26
3.2. Métodos de investigación.....	26
3.2.1. Método inductivo.....	26
3.3. Fuentes de recopilación de información.....	26

3.3.1. Primarias.....	26
3.3.2. Secundarias.....	27
3.4. Diseño de la investigación.....	27
3.6. Instrumentos de investigación.....	28
3.6.1. Variables a estudiar.....	28
3.6.1.1. Calidad de ADN.....	28
3.6.1.2. Cantidad de ADN.....	28
3.6.1.3. Análisis económico de cada uno de los protocolos.....	28
3.7. Tratamientos de los datos.....	28
3.8. Recursos humanos y materiales.....	34
3.8.1. Humanos.....	34
3.8.2. Materiales y Equipos.....	34
3.8.2.1. Material biológico.....	34
3.8.2.2. Materiales de laboratorio.....	34
3.8.2.3. Materiales de laboratorio.....	35
3.8.2.4. Materiales de campo.....	35
CAPÍTULO IV.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1. Cantidad (ng/uL) de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).....	38
4.2. Calidad (%) de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).....	39
4.3. Análisis económico de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).....	40
CAPÍTULO V.....	41
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	41

5.1.	Conclusiones. ....	42
5.2.	Recomendaciones.....	43
CAPITULO VI.....		44
BIBLIOGRAFÍA.....		44
6.1.	Referencias Bibliográficas .....	45
CAPITULO VII.....		52
ANEXOS .....		52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página.</b>
<b>Tabla 1</b>	Características agroclimáticas del cantón Quevedo provincia de Los Ríos.	25
<b>Tabla 2</b>	El esquema del análisis de varianza.	27
<b>Tabla 3</b>	Esquema del experimento.	29
<b>Tabla 4</b>	Cantidad promedio de ADN extraído por protocolo.	38
<b>Tabla 5</b>	Calidad promedio de ADN extraído por protocolo.	39
<b>Tabla 6</b>	Valores registrados de Análisis económico en protocolos para extracción de ADN.	40

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>		<b>Página.</b>
<b>Anexo 1</b>	Análisis de varianza para la variable cantidad (ng/uL) en extracción de ADN en tejido pulmonar en bovinos.	53
<b>Anexo 2</b>	Análisis de varianza para la variable calidad (ng/uL) en extracción de ADN en tejido pulmonar en bovinos.	53
<b>Anexo 3</b>	Valores registrados de Análisis económico en protocolos para extracción de ADN.	54
<b>Anexo 4</b>	Extracción in situ de tejido pulmonar bovino.	56
<b>Anexo 5</b>	Preparación de muestras.	57
<b>Anexo 6</b>	Realización de los tres protocolos para la extracción de ADN bovino.	58
<b>Anexo 7</b>	Muestras antes de retirar el líquido de la parte acuosa.	59
<b>Anexo 8</b>	Extracción de ADN.	60
<b>Anexo 9</b>	Exponer el gel a la luz UV.	61
<b>Anexo 10</b>	Lectura de los geles.	61
<b>Anexo 11</b>	Protocolo de Tens. Bando electroforético del protocolo de tens presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).	62
<b>Anexo 12</b>	Protocolo con Fenol-Cloroformo. Bando electroforético del protocolo Fenol-Cloroformo presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).	62
<b>Anexo 13</b>	Protocolo de lisis de extracción. Bando electroforético del protocolo Lisis de extracción presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).	63

## CÓDIGO DUBLIN

<b>Título:</b>	<b>COMPARACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO PULMONAR PARA ESTUDIO MOLECULAR</b>				
<b>Autor:</b>	Ronald Ignacio Cox Intriago				
<b>Palabras clave:</b>	Tejido pulmonar	Bovino	post-mortem	protocolo	ADN
<b>Fecha de publicación:</b>					
<b>Editorial:</b>					
<b>Resumen:</b>	<p>Esta investigación se basó en evaluar tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de tejido pulmonar bovino para estudio molecular, en el camal municipal del cantón Quevedo, donde se extrajeron las muestras de los distintos tratamientos. Los análisis de extracción y purificación de ADN fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos; y cuatro repeticiones. Para las diferencias de medias de los tratamientos se empleó la prueba de Tukey (<math>p \leq 0,05</math>). Fueron estudiadas variables de cantidad y calidad de ADN, además se realizó un análisis económico de los protocolos. Dentro de los resultados el T2, alcanzó mayores valores en cuanto a cantidad y calidad; con promedios de 23,32 ng/uL y 28,31% respectivamente; mientras que el T1 fue menos eficaz al momento de extraer volumen de ADN con un promedio de 7,04 ng/uL y un porcentaje bajo con 8,31% en cuanto a la calidad. Respecto al análisis económico de extracción de ADN el tratamiento que presentó mayor costo fue el T3 con \$ 405,18, mientras que el de menor costo fue el T1 con \$ 326,93; esto debido a que cada protocolo</p>				

	<p>requiere de equipos y reactivos específicos, además las horas de trabajo de cada equipo implementado genera variabilidad en el uso de energía de cada tratamiento.</p>
<b>Abstract:</b>	<p>This research was based on evaluating three protocols for the extraction and purification of DNA from bovine lung tissue for molecular study, in the municipal slaughterhouse of the Quevedo, where the samples of the different treatments were extracted. DNA extraction and purification tests were performed in the Molecular Biology Laboratory belongs to Universidad Técnica Estatal de Quevedo. We used a completely randomized design (DCA), with three treatments; and four repetitions. For the mean differences of the treatments, the Tukey test (<math>p \leq 0.05</math>) was used. Variables of DNA quantity and quality were studied, and an economic analysis of the protocols was carried out. Within the results, T2 reached higher values in terms of quantity and quality; with averages of 23.32 ng / uL and 28.31% respectively; while T1 was less effective when extracting DNA volume with an average of 7.04 ng / uL and a low percentage with 8.31% in terms of quality. Regarding the economic analysis of DNA extraction, the treatment with the highest cost was T3 with \$ 405.18, while the lowest cost was T1 with \$ 326.93; This is because each protocol requires specific equipment and reagents, plus the work hours of each implemented equipment generates variability in the energy use of each treatment.</p>
<b>Descripción:</b>	78 hojas : dimensiones, 29 x 21cm + CD-ROM
<b>Uri:</b>	

# INTRODUCCIÓN

La extracción del ADN, es el paso inicial en los procedimientos de un laboratorio de genética, consiste en aislar la molécula de ADN de cualquier tipo de célula nucleada, en condiciones de alta calidad, pureza y buena cantidad, que permita su caracterización genética (1). Los métodos usados para el genotipo incluyen el aislamiento de ácido Desoxirribonucleico (ADN), seguido de la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y los análisis de micro satélites. Diferentes tejidos se utilizan para la extracción del ADN genómico, usando distintos protocolos (2).

Variaciones a nivel de ADN contribuyen a la caracterización genética de las poblaciones ganaderas, y esto puede ayudar a identificar posibles eventos de hibridación y últimas tendencias evolutivas. En ganadería, tales variaciones en el ADN también pueden estar asociadas con, o ligadas a los rasgos económicos, que son gobernados por muchos genes, cada uno con un pequeño efecto. Esos genes principales suelen estar involucrados en la biología de un rasgo, y son los genes candidatos para identificar marcadores (3).

Las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético permitiendo la identificación de especies implementando diversas técnicas moleculares (4). La colecta y conservación de las muestras para la obtención de ADN de alta calidad es parte clave de los diferentes protocolos de análisis genéticos. En la obtención de muestras se utilizan métodos invasivos y no invasivos. Los primeros usan muestras de tejidos internos (músculo, hígado, riñón), que pueden producir la muerte del animal, además de dañar la materia prima en la comercialización. La segunda no necesita sacrificar el animal, el ADN es extraído a partir de tejidos como: aletas, sangre, células bucales, escamas y óvulos que se conservan en alcohol etílico 70 o 100% (5).

La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Con la finalidad de que el usuario

conozca las diferentes opciones y elija la más apropiada, de acuerdo con sus objetivos y recursos (6).

La confiabilidad de los resultados depende inicialmente de la calidad y cantidad de la muestra, la cual está directamente relacionada con los métodos utilizados en el procesamiento del tejido. Por ello, es importante definir las condiciones de manejo de los tejidos para poder utilizarlos en los análisis moleculares. Es sumamente importante la selección de un adecuado método de desparafinación y purificación que no continúe afectando la integridad de las biomoléculas y garantice la obtención de ADN (7).

Los métodos de extracción no recuperan todo el ADN contenido en la muestra; se han reportado pérdidas de hasta 75%, lo que se puede deber a los sustratos en que se encuentran y la metodología que se usa, es por ello que el presente trabajo tuvo como principal objetivo la selección de un método sencillo para extraer y purificar ADN de tejido pulmonar, con un alto grado de pureza y de fácil aplicación.

**CAPITULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

El uso de marcadores y micro satélites permiten que el análisis del potencial genético de una comunidad o una población sea determinada con mayor precisión, antes de la expresión de su fenotipo. De este modo se puede estimar la diversidad genética, necesaria para estudiar prácticas de manejo y conservación. Sin embargo, la viabilidad de estos estudios es frecuentemente limitada por la dificultad de aislar ADN, en cantidad y calidad suficiente, desde pequeñas muestras de tejidos (8).

El uso de apropiados métodos de muestreo, el tipo de tejido y la utilización de protocolos viables de extracción del ADN son puntos críticos en los distintos estudios (9). Es por tanto necesario promover el uso de nuevas tecnologías basadas en biotecnología, biología molecular y nanotecnología.

### **1.1.2. Diagnóstico.**

A través de la implementación de protocolos para extracción y purificación de ADN a partir de tejido pulmonar de bovinos sacrificados en el matadero municipal del Cantón Quevedo, se obtendrá información que permitirá establecer la cantidad y calidad del ADN extraído.

### **1.1.3. Pronóstico.**

Al determinar el presente estudio, se promoverán un mayor número de investigaciones orientadas a estimar una mayor utilidad en análisis genéticos, lo que permitirá disminuir considerablemente la probabilidad de error en la identificación de individuos.

#### **1.1.4. Formulación del problema.**

¿Cuál de los tres protocolos a implementar permitirá estimar la concentración de ADN en las muestras para estudio molecular?

#### **1.1.5. Sistematización del problema.**

- ¿La implementación de protocolos para extracción de ADN será eficaz en la cantidad de ADN extraído en tejidos post-mortem de bovinos?
- ¿La implementación de protocolos para extracción de ADN será eficaz en la calidad de ADN extraído en tejidos post-mortem de bovinos?
- ¿Cuál de los protocolos de extracción y purificación de ADN será el mejor para estudio molecular?

### **1.2. Objetivos.**

#### **1.2.1. Objetivo general.**

- Evaluar tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de tejido pulmonar para estudio molecular.

#### **1.2.2. Objetivos específicos.**

- Evaluar la cantidad de ADN extraído de tejido pulmonar mediante el protocolo Tens, fenol-cloroformo, lisis extracción.
- Determinar el porcentaje de calidad de ADN extraído de tejido pulmonar mediante el protocolo Tens, fenol-cloroformo, lisis extracción.

- Realizar un análisis económico a cada uno de los protocolos Tens, fenol-cloroformo, lisis extracción.

### **1.3. Justificación.**

El estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos se aborda mediante marcadores moleculares, segmentos de ADN con o sin función conocida que proporcionan información sobre la variación alélica y permiten distinguir individuos.

La calidad y cantidad de ADN extraído destacan como factores limitantes para la realización de pruebas moleculares, al encontrar nuevos métodos de extracción de ADN o mejorar los existentes se facilita el uso de este tipo de material en estudios retrospectivos, contribuyendo a la investigación etiológica y epidemiológica de las patologías (10).

En los laboratorios donde se realizan investigaciones relacionadas con la genómica se precisa tener las herramientas necesarias para realizar la extracción de ADN de cualquier tipo de muestra sea animal o vegetal con la finalidad de analizarla; es en la cadena de ADN donde se encuentra todo el código genético de un organismo, por lo que las técnicas de secuenciación son esenciales para el desarrollo de la genómica.

Existen diferentes métodos de extracción de ADN que permiten medir la expresión genética como nunca antes se había logrado, sin importar el tamaño de la muestra, por lo que se pueden diseñar experimentos más valiosos para lograr avanzar en una parte tan importante del conocimiento de los sistemas biológicos como es la expresión de los genes; por lo cual surge el interés de abordar con un protocolo que facilite los procedimientos que tienen que ejecutar los investigadores para desarrollar la extracción de ADN de manera eficaz.

**CAPITULO II**  
**FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Marco conceptual.**

### **Tejido pulmonar.**

El tejido interior de los pulmones es esponjoso y está formado por gran número de estructuras denominadas alveolos pulmonares. Los alveolos se hallan en comunicación con los bronquios, de manera que se hinchan o expanden al llenarse de aire se deshinchán o colapsan al expulsarlo (11).

### **Post-mortem.**

El latinismo post-mortem, cuyo significado literal es después de muerto, se emplea para referirse a la exploración médica de los cadáveres con el fin de obtener información relevante sobre las causas y las circunstancias de la muerte de un ser vivo (12).

### **Matadero.**

Sitio donde se sacrifica y desuella el ganado destinado al abasto público (13).

### **Protocolo.**

El Protocolo de investigación o proyecto es el documento mediante el cual, se orienta y dirige la ejecución de la investigación, en él se materializa la etapa del planeamiento de la investigación y servirá de guía en las etapas sucesivas del trabajo, por lo que debe ser lo más claro, concreto y completo posible (14).

## **2.2. Marco referencial.**

### **2.2.1. Sistema respiratorio.**

El aparato respiratorio está constituido por pulmones y los sistemas de conducción del aire (vías aéreas).

- ✓ Vías aéreas anteriores: cavidad nasal, faringe, laringe y tráquea.
  
- ✓ Vías aéreas posteriores: tráquea, bronquios (primarios, secundarios, etc.), bronquiolos, bronquiolos respiratorios, conductores alveolares, alvéolos (15).

Es el responsable de aportar el oxígeno necesario para la respiración celular y eliminar el dióxido de carbono generado durante el metabolismo celular. Ambas moléculas son intercambiadas entre la sangre y el aire. También lleva a cabo otras funciones como aportar el aire para la emisión de sonidos, hacer circular el aire sobre el epitelio olfativo de la cavidad nasal para permitir la olfacción y también produce ciertas hormonas (16).

#### **2.2.1.1. Pulmones.**

Se ubican a ambos lados de la caja torácica formando el mediastino. Intervienen en la oxigenación de la sangre, participando así en el ciclo respiratorio. Los pulmones están formados por tejido conectivo que encierran los bronquios. Son huecos y están cubiertos por una doble membrana lubricada (serosa) llamada pleura. El pulmón derecho es más grande que el izquierdo (debido al espacio ocupado por el corazón). La función de los pulmones es realizar el intercambio gaseoso con la sangre (Hematosis), por ello los alvéolos están en estrecho contacto con capilares. En los alvéolos se produce el paso de oxígeno hacia la sangre y el paso de dióxido de carbono desde la sangre a los pulmones (17).

#### **2.2.1.1.1. La pleura.**

Es una membrana serosa de tejido conjuntivo, elástica que evita que los pulmones rocen directamente con la pared interna de la caja torácica que recubre ambos pulmones.

Posee dos capas:

- La pleura parietal o externa: que recubre y se adhiere al diafragma y a la parte interior de la caja torácica, y
- La pleura visceral: que recubre el exterior de los pulmones, introduciéndose en sus lóbulos a través de las cisuras.

Entre ambas capas existe una pequeña cantidad (unos 15 cc) de líquido lubricante denominado líquido pleural (18).

#### **2.2.1.1.2. Los alvéolos.**

Los alvéolos pulmonares son los divertículos (bolsa) terminales del árbol bronquial. En ellos se produce el intercambio gaseoso entre el oxígeno inspirado y el dióxido de carbono exhalado (17).

### **2.2.2. Extracción de ADN a partir de tejidos.**

La extracción de ADN consta de una etapa de lisis, que consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido y otra de purificación (19).

Existen distintos métodos de extracción de diferentes tipos de tejidos, algunos basados en la hidrólisis con proteinasas, otros en exposición a ultrasonidos y otros usando detergentes o álcalis. Los métodos que utilizan la hidrólisis con proteinasas tienen como principio básico el

uso de la proteinasa K, la cual digiere proteínas y remueve contaminantes a partir de las preparaciones de ácidos nucleicos (20).

La viabilidad de estudios moleculares recae en gran medida en la habilidad del investigador para aislar el ADN en una buena calidad y cantidad con la mínima cuantía de tejido, pues la fidelidad y reproducibilidad de la prueba dependen de la suficiente calidad y cantidad del ADN aislado de una mínima cantidad de tejido, lo que enfatiza la importancia de la investigación básica para mejorar las técnicas moleculares (21).

### **2.2.3. ADN (Ácido desoxirribonucleico).**

Es la molécula responsable de almacenar todas las características (genes) de un individuo y transmitir las a su descendencia. Químicamente es una estructura química compleja cuyos componentes (denominados nucleótidos) se organizan de manera lineal, generando enormes secuencias de información (22).

### **2.2.4. Cromosoma.**

Corpúsculos intranucleares coloreados llamados cromosomas (cromo=color; soma=cuerpo), visibles principalmente durante el proceso de división celular (mitosis y meiosis). Los cromosomas se observan al microscopio durante la metafase, cuando el DNA se ha duplicado y la cromatina está muy condensada (23).

### **2.2.5. Fenotipo.**

Es la manifestación y expresión del genotipo. En biología y ciencias de la salud, se denomina fenotipo a la manifestación visible del genotipo en un determinado ambiente. El fenotipo de un organismo individual es la apariencia física y la constitución, o manifestación específica de un determinado rasgo, como el tamaño o el color de ojos; esto varía entre los diferentes individuos, aunque puede ser similar en rasgos familiares. El fenotipo es, por lo tanto,

cualquier característica detectable de un organismo determinado por una interacción entre su genotipo y su medio ambiente.

El fenotipo es una característica bioquímica, fisiológica, o un rasgo físico específico. El conjunto de la variabilidad fenotípica recibe el nombre de polifenismo o polifasia. Adicionalmente existen ciertas acciones bioquímicas como la metilación de ciertas bases del DNA para que se modifiquen, lo que permite que algún gen, al ser trasferido, pueda producir una variación o plasticidad fenotípica. Así pues, todo fenotipo siempre es el resultado de una expresión genotípica y epigenética (24).

### **2.2.6. Gen.**

Unidad fundamental, física y funcional, de la herencia, que transmite información de una generación a la siguiente; tramos de DNA compuesto de una región que se transcribe y una secuencia reguladora que hace posible la transcripción (25).

### **2.2.7. Genoma.**

El genoma es el conjunto del material hereditario de un organismo, la secuencia de nucleótidos que especifican las instrucciones genéticas para el desarrollo y funcionamiento del mismo y que son transmitidas de generación en generación, de padres a hijos. Por tanto, el genoma de un organismo es el depositario de la información que permite que cada organismo se desarrolle y responda a las exigencias impuestas por el medio (26).

### **2.2.8. Etapas en la extracción de ADN.**

Los pasos necesarios para una correcta extracción y purificación del ADN mediante un procedimiento químico son:

#### **2.2.8.1. Lisis de las células o virus.**

Las sales caotrópicas ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos consiguiendo su desnaturalización. La adición de un detergente como el SDS es necesaria a menudo para eliminar las membranas (19).

#### **2.2.8.2. Degradación de la fracción proteica asociada al ADN.**

Se consigue mediante la adición de una proteasa. La fracción proteica puede precipitarse mejor con la ayuda de sales como el acetato de amonio o el acetato sódico (27).

#### **2.2.8.3. Purificación.**

Consta de 3 fases:

##### **2.2.8.3.1. Precipitación del ADN.**

El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar etanol frío o isopropanol y recuperar mediante una centrifugación. El alcohol del sobrenadante se llevará las sales añadidas previamente.

##### **2.2.8.3.2. Lavado del pellet.**

Se realiza con alcohol frío volviendo a centrifugarse. Si se emplea un estuche comercial este paso puede realizarse con la ayuda de minicolumnas de sílica que retienen específicamente el DNA permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis. Finalmente se lava con alcohol y se eluye el contenido (28).

##### **2.2.8.3.3. Recuperación.**

El sedimento se puede resuspender en agua o tampón Tris tras ser secado completamente.

La confirmación de la presencia de ADN se lleva a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio y observación con luz UV o directamente por espectrofotometría mediante espectro de absorción de 200 a 350 nm. El ADN purificado se puede cuantificar mediante espectrofotómetro a 260 nm y su pureza se puede verificar mediante la relación 260/280 nm.

El paso 3 puede realizarse con la ayuda de minicolumnas equipadas con una membrana de sílica que retiene específicamente el ADN permitiendo el paso de las moléculas y sales que acompañan la reacción de lisis. Finalmente se lava con alcohol y se eluye el contenido (28).

### **2.2.9. Marcadores moleculares.**

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (29).

Los distintos tipos de marcadores moleculares disponibles pueden ser distinguidos por la tecnología que se utiliza para revelar la variabilidad del ADN. Los marcadores varían en cuanto a su capacidad para detectar diferencias entre los individuos, sus costos de aplicación, facilidad de uso, consistencia, capacidad múltiple (evaluar varios loci al mismo tiempo) y de repetición (30).

Estos marcadores se obtienen a través de ciertas técnicas y secuenciaciones, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes. Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros. La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de

ADN y la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro (6).

### **2.2.10. Extracción de ADN.**

La extracción consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN y se basa en las características fisicoquímicas de la molécula. El ADN está constituido por dos cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Los nucleótidos están integrados por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada (adenina, guanina, timina o citosina). La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Las bases de cadenas opuestas se unen mediante puentes de hidrógeno y mantienen estable la estructura helicoidal (6).

### **2.2.11. Cuantificación del ADN.**

Trata de relacionar el número de moléculas de ADN obtenidas. La cuantificación de ADN no solo permite inferir la autenticidad de las muestras, sino que aporta información relevante para la implementación o modificación de protocolos de extracción y amplificación acordes con la cantidad del material genético disponible. (31).

### **2.2.12. Purificación del ADN.**

La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular. El método clásico de purificación de ácidos nucleicos se basa en el uso de disolventes orgánicos tóxicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo la más conocida.

No obstante, se han desarrollado métodos alternativos que emplean una alta concentración salina en vez de disolventes orgánicos. Con ello se consigue el mismo objetivo de desproteínizar la muestra, sin los inconvenientes de toxicidad antes mencionados. Este sistema es conocido también con el nombre de “purificación salina” (del inglés, “salting out”) (32).

Los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes. Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza. Un contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN es el ARN (ácido ribonucleico). Esta molécula se degrada por incubación con la enzima ARNasa (22).

### **2.2.13. Cantidad de ADN.**

Las cantidades de DNA por célula varían mucho entre los seres vivos. Por lo general, se observa un incremento en la cantidad de DNA en función de la complejidad evolutiva (33).

### **2.2.14. Calidad de ADN.**

La calidad del ADN es un factor que va a condicionar el tipo de aplicaciones que se puedan desarrollar tanto a nivel diagnóstico como de investigación (34).

### **2.2.15. Protocolos en extracción de ADN.**

A lo largo del tiempo se han diseñado distintos protocolos con la finalidad de obtener una cantidad y calidad de ADN adecuados, así como garantizar la eliminación de inhibidores potenciales que dificulten el tratamiento posterior de la molécula. Los métodos tradicionales, desarrollados en los años 50, utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas del ADN y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. En general, los protocolos tradicionales consisten de cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (6).

### **2.2.15.1.Homogeneización del tejido.**

Rotura de las células o tejidos para obtener un lisado celular (o tisular) en el que la fracción deseada se encuentre en condiciones adecuadas para su purificación (35).

En el proceso de homogeneización pueden utilizarse diferentes medios mecánicos, y además diferentes compuestos que faciliten una mejor disgregación del tejido. La centrifugación es el procedimiento más utilizado para separar un homogeneizado en diferentes partes o fracciones. También es posible fragmentar las membranas plasmáticas mediante equipos especiales de homogeneización de tejidos presurizados en los cuales las células son forzadas a través de un espacio muy estrecho entre el émbolo y la pared del recipiente. El agua fluye dentro de las células cuando se les coloca en una solución hipotónica (36).

### **2.2.15.2.Lisis celular.**

La lisis celular es la rotura de la membrana celular. Todas las células tienen una membrana hecha de fosfolípidos que separan el contenido celular del ambiente extracelular. Los fosfolípidos son anfipáticos y tienen embebidas las proteínas de membrana. La naturaleza de los lípidos y las proteínas varía dependiendo del tipo de célula.

En la célula animal la membrana es la única barrera, pero en plantas y bacterias la membrana se encuentra rodeada por una pared celular. La pared celular bacteriana está compuesta por péptidoglucanos. Estos tipos de barrera extracelular confieren forma y rigidez a las células. La técnica escogida para la ruptura celular tiene que considerar el origen del tejido para evaluar su facilidad o dificultad de destrucción. Además el método debe ser compatible con la cantidad de material que será procesado y las aplicaciones de este (37).

### **2.2.15.3.Separación de proteínas y lípidos.**

La separación de las proteínas se hace en base a la forma y la masa de la proteína (38). Los lípidos son biomoléculas orgánicas insolubles en el agua, que pueden extraerse de las células y

de los tejidos mediante disolventes no polares, por ejemplo, el cloroformo, el éter o el benceno (39).

En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos. La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico. Estos reactivos contaminan fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación (40).

#### **2.2.15.4.Precipitación del ADN.**

Este método se basa nuevamente en la solubilidad diferencial del ADN. Una muestra de ADN en solución acuosa precipita al agregársele cationes (para neutralizar las cargas negativas que posee) y alcohol. El alcohol disminuye la constante dieléctrica del solvente acuoso, provocando una disminución en la solubilidad del ADN, que en presencia de altas concentraciones de sales, precipita. Este método es ampliamente utilizado como una forma de concentrar ADN. Se utilizan dos tipos de alcohol en este método. El etanol y el isopropanol (41).

La diferencia entre ambos es la capacidad de disminuir la constante dieléctrica. Mientras que el isopropanol posee una mayor capacidad y por lo tanto es posible usar menor volumen (solo 0,7 volúmenes, contra 2,5 volúmenes de etanol), tiene la desventaja de precipitar más sales y por lo tanto rinde un ADN de menor pureza que el etanol. La elección se basa en el volumen manejable, prefiriéndose el etanol siempre que sea posible debido a la mejor calidad del ADN obtenido (41).

#### **2.2.15.5.Redisolución del ADN.**

Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar el ADN para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida. Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 (low TE) para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ADN es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular. Una opción que evita la fragmentación consiste en incubar a 55°C el ADN, 1 a 2 horas con agitación suave (40).

### **2.2.16. Daños moleculares en el ADN.**

El ADN es un material altamente estable, tal como requiere el almacenamiento de información genética, pero también es una molécula orgánica que puede sufrir cambios espontáneos, incluso en las condiciones normales de la célula, que, si no son reparados, pueden conducir a mutaciones (42).

Los daños en el ADN pueden generar cambios en la expresión de genes, crecimiento celular e incluso tumores. Estos daños pueden ser atribuidos a diversos procesos metabólicos endógenos, que producen radicales libres de oxígeno (RLO) y nitrógeno (RLN) altamente reactivos, que alteran bases y atacan directamente el ADN. Además de estos agentes generados endógenamente se encuentran los agentes genotóxicos exógenos, tales como la luz ultravioleta y otros tipos de radiación (X,  $\gamma$ , rayos cósmicos), aminas aromáticas, hidrocarburo de arilo, cloruro de vinilo y ciertos metales que generan, directamente o indirectamente, daños en la molécula de ADN. Se ha estimado que cada célula puede experimentar hasta 105 lesiones espontáneas en un día, lo cual indica que la molécula de ADN es constantemente agredida y alterada por distintos factores (43).

Las células cuentan con mecanismos complejos que vigilan la integridad del ADN activando vías de reparación, básicamente cuando ocurren errores durante la replicación celular. De esta forma, la respuesta celular por daños en el ADN y su reparación es mediada por vías de

señalización, que requiere múltiples proteínas sensoras, transductoras y efectoras, en una red de interacción de diferentes vías de reparo.

Los procesos de reparación del ADN reconocen, remueven y reparan errores en la molécula, constituyendo los principales mecanismos celulares que garantizan la estabilidad genética y, consecuentemente, la propia supervivencia de la célula (43).

#### **2.2.16.1. Tipos de daño en el ADN.**

Las lesiones en el ADN pueden ocurrir espontáneamente o pueden estar causadas por la exposición a agentes mutagénicos. La desaminación, la depurinización y el daño oxidativo de las bases nitrogenadas son algunos de los daños que se producen en el ADN de forma espontánea. La desaminación consiste en la pérdida de grupos amino. En condiciones normales la desaminación de la citosina produce uracilo, base nitrogenada que no forma parte del ADN; esta base se aparea preferentemente con la adenina en lugar de hacerlo con la guanina, produciendo así la conversión de un par de GC en un par de AT (44).

#### **2.2.17. Contaminación del ADN.**

La sangre contiene una serie de compuestos como proteínas, lípidos, glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas y plasma, que pueden contaminar la muestra de ADN. El contaminante principal del ADN de animal extraído por muestras de sangre es hemo, el componente no proteico de la hemoglobina (45).

#### **2.2.18. Almacenamiento del ADN.**

El rápido crecimiento de las investigaciones genómicas necesita de la conservación de un gran número de muestras biológicas, que incluyen ADN, ácido ribonucleico (ARN), proteínas, células y tejidos. La preservación y el almacenamiento de estos materiales son de interés para la comunidad científica en una amplia gama de campos y disciplinas. Sin embargo, es importante señalar que, al considerar el significado de los términos "preservación" y "almacenamiento", se debe recordar que las perspectivas pueden variar considerablemente.

Por ejemplo, la muestra necesaria para probar un producto farmacéutico tendrá que ser estable durante unos años, mientras que las que se utilizan en la biología evolutiva se conservan durante millones de años, por lo que las aplicaciones posteriores en las que pueden emplearse estas muestras son muy diferentes y, por tanto, la calidad y la cantidad de ADN requerido variarán (46).

A la hora de almacenar muestras, hay muchos métodos de identificar las muestras desde los más sencillos de escribir una etiqueta a mano hasta los más sofisticados con codificaciones 2D, pero en todos los casos hay que asegurarse de una completa trazabilidad de la muestra:

✓ **Escribir la identificación en el propio tubo o en una etiqueta a mano.**

Es un trabajo muy costoso para el personal del laboratorio y una manera muy poco segura de buscar la trazabilidad de una muestra, incluso cuando se trabaja con un número muy pequeño de muestras. Hay un elevado riesgo de una mala identificación de las muestras debido a una incorrecta anotación o interpretación del código de la muestra por parte del personal del laboratorio o incluso por un borrado accidental del mismo debido a los solventes utilizados en el laboratorio o el propio proceso de almacenamiento (-20°C ó -80°C).

✓ **Utilizar tubos con codificación alfanumérica y cajas con códigos de barras.**

Es un sistema semi-único que implica una menor mano de obra por parte del personal del laboratorio ya que los tubos vienen ya colocados en su correspondiente posición por parte del fabricante de los tubos; incrementa la trazabilidad de las muestras siempre y cuando el tubo se relacione estrictamente con la caja que lo contiene, pero proporciona mucho riesgo de una pérdida de la trazabilidad de las muestras en caso de caída accidental de los tubos de su caja o cuando se está trabajando con varias cajas simultáneamente. No proporciona una completa trazabilidad de las muestras (47).

✓ **Utilizar etiquetas de códigos de barras (1D o 2D) en los tubos.**

Es una labor bastante costosa para el personal del laboratorio ya que hay que imprimir y etiquetar todos y cada uno de los tubos y requiere bastante inversión inicial en cuanto al sistema específico de impresión de etiquetas; por otro lado hay que asegurarse de que las etiquetas soporten las temperaturas a las que se van a almacenar los tubos para no correr el riesgo de que se desprendan a lo largo del tiempo.

✓ **Utilizar tubos con codificación 2D fija en el fondo del tubo.**

Actualmente hay dos sistemas disponibles - Tracker o Datamatrix y TraXis - y ambos sistemas proporcionan una trazabilidad completa de la muestra a lo largo del tiempo al mismo tiempo que no ocasiona un trabajo extra al personal del laboratorio.

En ambos casos, el código y el tubo vienen como un solo producto ya que la misma se graba mediante un láser sobre el propio plástico del fondo del tubo (hay que asegurarse que la codificación 2D no viene simplemente pegada, en cuyo caso podría caerse durante el almacenamiento a -20 °C o -80 °C); esto garantiza que la codificación nunca se puede caer de tubo a lo largo de toda su vida útil.

Por otro lado, hay que destacar que la codificación de cada uno de los tubos individuales es comprobada antes de salir de la fábrica, para asegurar al 100% el control de calidad de los mismos (47).

### **2.2.19. Protocolo tens.**

Amortiguador TEN (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0).

#### **2.2.19.1. TRIS (Hidroximetil amino metano).**

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

### **2.2.19.2. EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético).**

Es un agente quelante de iones metálicos como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . 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. / g/mol.

### **2.2.19.3. 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 (48).

### **2.2.20. Protocolo fenol-cloroformo.**

El fundamento de este sistema de separación es la solubilidad de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos en solventes orgánicos, pero tiene como inconvenientes la toxicidad del fenol, procedimientos laboriosos y múltiples procesos de centrifugado y pipeteo que aumentan el riesgo de contaminación (49).

### **2.2.21. Lisis de extracción.**

Se puede distinguir dos tipos de mecanismos de lisis celular: aquellos basados en la acción mecánica, como el pulverizado del tejido con hielo seco o nitrógeno líquido, o los basados en la degradación enzimática de la pared celular (si está presente) y la lisis de las membranas celulares mediante detergentes (50).

La elección del detergente para la lisis celular dependerá de la aplicación que se le quiera dar y también del tipo de célula. Para la elección del detergente correcto es importante tener en cuenta, además los tampones usados, el pH, la concentración de sal y la temperatura (51).

**CAPITULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### 3.1. Localización

La presente investigación se llevó a cabo en el cantón Quevedo, situada al 1° 20' 30" de Latitud Sur y los 79° 28' 30" de Longitud occidental, dentro de una zona subtropical. Específicamente en el matadero municipal, donde se extraerán las muestras de los distintos tratamientos. Los análisis de extracción y purificación de ADN se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), ubicado en el Km. 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo de Los Tsáchilas, en la provincia de Los Ríos.

La recolección de muestras consistió en la extracción de tejido pulmonar post-mortem en los bovinos sacrificados en el matadero municipal del cantón Quevedo, posterior a ello se procedió a movilizar las muestras hasta las inmediaciones de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en el laboratorio de Biología Molecular, donde mediante la aplicación de tres protocolos, se procedió a extraer y purificar ADN.

En la siguiente tabla se muestra las características de las condiciones agrometeorológicas del sitio experimental.

**Tabla 1** *Características agroclimáticas del cantón Quevedo provincia de Los Ríos.*

<b>Parámetros</b>	<b>Promedio</b>
<b>Altura (msnm)</b>	11,99
<b>Precipitación anual (mm)</b>	2061
<b>Temperatura (°C)</b>	24,9
<b>Humedad relativa Anual (%)</b>	82
<b>Evaporación promedio anual (mm)</b>	956,4
<b>Velocidad del viento (m/seg)</b>	2,0

### **3.1. Tipo de investigación.**

#### **3.1.1. Exploratoria.**

El presente estudio se efectuó en el matadero municipal del cantón Quevedo, provincia de Los Ríos, la misma que fue de carácter exploratoria, la cual se realizó para conocer el tema que se abordaba, lo que permitió tener una mayor familiarización con algo que hasta ese momento se desconocía (53).

### **3.2. Métodos de investigación.**

#### **3.2.1. Método inductivo.**

Se implementó este método de investigación permitiendo plantear variables de estudio para evaluar la cantidad, calidad y protocolo más adecuado para la extracción de ADN a partir de tejido pulmonar para estudio molecular de bovinos sacrificados en el matadero municipal del Cantón Quevedo.

### **3.3. Fuentes de recopilación de información.**

#### **3.3.1. Primarias.**

La información bibliográfica fue obtenida a través de revistas científicas, libros, tesis y buscadores académicos que provee al investigador conocimientos importantes para llevar a cabo la presente investigación.

### 3.3.2. Secundarias.

Estas fuentes se encuentran basadas en fuentes primarias e implican análisis, síntesis o interpretación. Son obtenidas de índices, revistas de resúmenes, comentarios, enciclopedias, entre otros.

### 3.4. Diseño de la investigación

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con tres tratamientos y cuatro repeticiones. Para la diferenciación de medias de los tratamientos se implementó la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabla 2** *El esquema del análisis de varianza.*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Formula</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tratamiento	t-1	2
Error experimental	t (r-1)	9
Total	t.r-1	11

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

#### Modelo matemático

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ = Variable de respuesta variable dependiente

$\mu$  = Media o promedio de la población

$T_i$ = Efecto de los tratamientos en estudio

$E_{ij}$ = Efecto del error experimental

### **3.6. Instrumentos de investigación.**

#### **3.6.1. Variables a estudiar.**

##### **3.6.1.1. Calidad de ADN**

La evaluación sobre la condición del ADN se determinará a partir de la espectrofotometría, y se expresará en porcentaje del 1 al 100%. usando como cocientes respectivos de pureza 1.8 y 2.0; A la vez que se comprobará mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X. La electroforesis se realizará a 90 voltios por 30 min.

##### **3.6.1.2. Cantidad de ADN**

La concentración y pureza del ADN se determinará por espectrofotometría a 260 nm, comparado con un blanco, usando como cocientes respectivos de pureza 1.8 y 2.0; A la vez que se comprobará mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en tampón TAE 1X. La electroforesis se realizará a 90 voltios por 30 min. Para especies con pesos moleculares bajos, como es el caso de la sangre, se usarán concentraciones de agarosa al 1,2%.

##### **3.6.1.3. Análisis económico de cada uno de los protocolos**

Costo de producción mediante proformas de los insumos aplicados en los protocolos, de esa misma manera el coste de la energía y el agua.

### **3.7. Tratamientos de los datos.**

El planteamiento de los tratamientos de la investigación se presenta en la siguiente tabla 3:

**Tabla 3** *Esquema del experimento.*

<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>	<b>N° de muestras/Tratamiento</b>
Tens	4	24
Fenol-cloroformo	4	24
Lisis extracción	4	24
Total		72

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

### **Extracción por el método de TENS**

#### Pasos previos a la extracción:

- A. Se maceraron muestras de tejido pulmonar de 300 mg.

#### Extracción:

1. Se agregaron 400 µl de tampón de extracción TENS (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 5 ul de proteinasa K (20mg/ml).
2. Se incubó a 56 °C durante 1 hora.
3. Se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1). Posterior a ello se procedió a homogenizar para formar una emulsión.
4. Se centrifugó 10000 rpm durante 10 minutos.
5. Se transfirió la parte superior “acuosa” a un nuevo tubo.
6. Se agregó 2 volúmenes de Etanol 95% helado. Luego se procedió a homogenizar para ayudar a la precipitación del ADN.
7. Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos.

8. Se descartó el Etanol 95%, para luego resuspenderlo con Etanol al 70%.
9. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos.
10. Se procedió a descartar el Etanol 70%, para luego dejar secar.
11. Se resuspendió con 50  $\mu$ l de TE.

### **Protocolo con fenol-cloroformo**

1. Se colocó aproximadamente 300 mg de tejido.
2. Se agregó 550  $\mu$ l de solución de tampón de Lisis TENS (50mM de Tris-HCl; pH 8.0, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl y 1% de SDS), y 7  $\mu$ l de proteinasa K (20mg/ml).
3. Se incubó en baño maría a 50 °C por 12 horas.
4. Se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo (25:24). Para posteriormente homogenizar y formar una emulsión.
5. Se centrifugó 10000 rpm durante 10 minutos.
6. Se transfirió la parte superior “sobrenadante” a un nuevo tubo.
7. Se agregó 750  $\mu$ l de Etanol absoluto y 300  $\mu$ l de acetato de sodio. Y en seguida se incubó en un congelador a -20°C por 2 horas.
8. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos.

9. Se descartó el Etanol absoluto y el acetato de sodio.
10. Posteriormente las muestras de ADN se centrifugaron con 600 ul de etanol al 70% a 10000 rpm durante 5 minutos.
11. Se descartó el Etanol 70% y se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. Se resuspendió el tampón de TE (10 Mm de Tris UP pH 8.0 y 1 mM de EDTA) 100 ul.
13. Se agregó 0.5 ul de ARNsa (30 ug/mL) e incubó en baño maría a 37 °C durante 40 minutos, para finalmente conservarla a – 20 °C hasta su posterior análisis.

#### **Protocolo de Lisis de extracción**

1. Se mezcló 300 mg de tejido previamente pulverizado con Nitrógeno líquido y se agregó 1 mL de lisis de extracción ( 1,4 M de NaCl, 20 mL de EDTA, 100 mM de Tris HCl y 2% P/V de CTAB Y 300 ul de 2β-mercaptoetanol).
2. Se mezcló por inversión e incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Se Incubó 5 minutos en hielo.
4. Se agregó 20 ul de RNAsa A, luego se procedió a mezclar por inversión e incubar durante 20 minutos a 37 ° C. Durante la incubación se invirtieron los tubos 2 o 3 veces.
5. Se agregó 10 ul de proteinasa K, para luego mezclar por inversión e incubar a 60 °C durante 20 minutos. Durante la incubación se invirtieron los tubos 2 o 3 veces.
6. Se procedió a incubar 5 minutos en hielo.

7. Se agregó 600 ul fenol: cloroformo: isoamilico (25:24:1) y se agitó por inversión.
8. Se centrifugó a 10000 rpm a 8 °C durante 12 minutos.
9. Se recuperó con cuidado 200 ul del sobrenadante y se puso en un tubo para microcentrifugar de nuevo 1.5 mL. Nota: En caso de que el sobrenadante se haya encontrado turbio, hubiera sido necesario repetir los pasos del 7 al 9.
10. Se agregó 50 ul de acetato de amonio 10 M y se mezcló por inversión varias veces.
11. Se agregaron 500 ul de isopropanol frío (a -20 °C) y se mezclaron por inversión varias veces.
12. Se mantuvo la mezcla a -20 °C durante 2 horas, para favorecer la precipitación de ADN.
13. Se centrifugó a 10500 rpm a 8 °C durante 5 minutos.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante.
15. Se agregó 1 mL de etanol al 70% frío (a - 20 °C).
16. Se mezcló por inversión hasta observar que el botón se haya desprendido del micro tubo.
17. Se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
18. Se centrifugó a 10000 rpm a 8 °C por 5 minutos.

19. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no desprender el botón de ADN.
20. Se colocaron los tubos para microcentrifuga de 1.5 mL en el contenedor de vacío a 500 atm a 55 °C durante 10 minutos para secar el ADN.
21. Se revisó que el botón de ADN se encuentre completamente seco; en caso de no estarlo lo más recomendable es repetir el paso 20 durante el tiempo que sea necesario.
22. Se rehidrató el ADN en 200 ul de Buffer TE 1X o agua inyectable. Si el botón de ADN es pequeño se podría hidratar con 50 o 100 ul.
23. Se mezcló por inversión hasta observar que el botón se desprendía del micro tubo.
24. Se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente.
25. Se centrifugó a 10000 rpm a 8 °C por 5 minutos.
26. Se eliminó el sobrenadante cuidando de que no se desprenda el botón de ADN.
27. Se colocaron los tubos para microcentrifuga de 1.5 mL en el contenedor de vacío a 500 atm a 55 °C durante 10 minutos para secar el ADN.
28. Se revisó que el botón de ADN se encuentre completamente seco; en caso de no haberlo estado es recomendable repetir el paso 20 durante el tiempo que sea necesario.
29. Se rehidrató el ADN en 200 ul de Buffer TE 1X o agua inyectable. Si el botón de ADN es pequeño se podría hidratar con 50 o 100 ul.

### **3.8. Recursos humanos y materiales.**

#### **3.8.1. Humanos.**

Talento humano que contribuirá a la realización del presente proyecto de investigación:

- Director del proyecto de investigación Dr. Orly Fernando Cevallos Falquez.
- Estudiante y autor del Proyecto de Investigación Ronald Ignacio Cox Intriago.

#### **3.8.2. Materiales y Equipos.**

##### **3.8.2.1. Material biológico.**

- Muestras de tejido pulmonar bovino (post- mortem)

##### **3.8.2.2. Materiales de laboratorio.**

- Balanza 0,001g
- Cámara fotográfica
- Bañomaría
- Uv transiluminador 20x20
- Microcentrífuga
- Vortex
- Esterilizadora
- Potenciómetro
- Caja electroforética
- Termociclador
- Congelador vertical – 20°C
- Refrigeradora
- Agitador calentador
- Foto documentador

- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis
- Cabina extractora
- Computador de mesa

### **3.8.2.3. Materiales de laboratorio**

- Potenciómetro (pHmetro)
- Set de micropipetas (1 ml, 200  $\mu$ l, 50  $\mu$ l y 20  $\mu$ l con puntas estériles) Autoclave.
- Probetas y recipientes para soluciones Bisturí, tijeras Recipientes para las muestras (Tubos Falcón de 10 ml y envases estériles)
- Solución desinfectante (Etanol al 70%).
- Guantes de látex
- Marcador resistente al agua
- Cooler para el transporte de muestras
- Vasos de precipitación
- Matraces
- Tubos Falcón 15 mL
- Tubos Falcón 50 mL
- Frascos
- Microtubos 1.5 mL
- Microtubos PCR individuales 0.2 mL
- Portaobjetos

### **3.8.2.4. Materiales de campo**

- Caja térmica
- Algodón
- Jeringas de 10  $\text{cm}^3$
- Tubo vacutainer
- Alcohol

- Bisturí
- Guantes de latex
- Mascarillas

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Cantidad (ng/uL) de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).

De acuerdo al análisis de la varianza, los tratamientos mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Siendo el T2, el protocolo más destacado en la extracción de ADN de tejido pulmonar bovino, con un promedio de 23,32 ng/uL, seguido del T3 con una media de 14,62 ng/uL. Finalmente el T1 fue el protocolo menos eficaz al momento de extraer volumen de ADN con un promedio de 7,04 ng/uL (Tabla 4).

Datos similares obtuvieron Guevara *et al.* (54), en su ensayo donde evaluaron de igual forma tres protocolos, los cuales dos de ellos registraron valores similares en la cantidad de ADN extraído, alcanzando promedios muy cercanos a los obtenidos por el T1 de la presente investigación, los mismos que oscilaron entre 8.83 y 6.33 ng/uL, datos que son relativamente bajos en comparación a lo obtenido por T2, la respuesta a ello podría estar en el estudio realizado por Lopera *et al.* (55), quienes afirman que el uso de apropiados métodos de muestreo, tipos de tejido y la utilización de protocolos viables, son fundamentos esenciales para la eficaz extracción del ADN. Lo cual se corrobora en el mismo estudio, debido a que también emplearon un protocolo con Fenol-Cloroformo y obtuvieron un promedio de 358 ng/uL en la extracción de ADN proveniente de aletas de pescado, lo cual contrasta con lo obtenido en la presente investigación (23,32 ng/uL). Por ello, es importante resaltar la importancia de una extracción exitosa de ADN, ya que es fundamental para el progreso de estudios biológicos que incluyen identificación molecular, inferencia filogenética y genómica así como análisis de secuencias (56).

**Tabla 4** Cantidad promedio de ADN extraído por protocolo.

Tratamientos	Cantidad (ng/uL)	
Tens	7,04	b
Fenol-Cloroformo	23,32	a
Lisis de Extracción	14,63	a b
C.V.	11,60	
( $p < 0,05$ )	<0,0014*	

Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey  $p \leq 0,05$ ). CV: Coeficiente de variación; NS= No significativo; \*Significativo, \*\*Alta significancia, ND= No determinado.

## 4.2. Calidad (%) de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).

En cuanto a la calidad, se reflejaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, de modo que el protocolo que alcanzó mayor porcentaje de calidad durante la extracción de ADN, fue el T2 con un promedio de 28,31%. Contrario a esto, el T1 (protocolo de Tens) obtuvo el registro más bajo con 8,31%.

Uno de los factores que podría incidir en los bajos porcentajes obtenidos podría estar en la investigación realizada por Jiménez *et al.* (57), donde determinan que la calidad del ADN se ve profundamente afectada por el proceso de preservación al que se ven sometidos los tejidos. Lo cual coincide con el estudio efectuado por Bustamante *et al.* (58), donde al aplicar el almacenamiento con fijación en formalina 10% e inclusión en parafina de tejido humano que contenían biopsias de pleura, pulmón y pericardio, determinó que este método afectaba tanto calidad como cantidad de ácidos nucleicos que se pueden obtener por muestra. Por tanto, la importancia de la calidad del ADN extraído radica en el papel que juega al momento de realizar cualquier técnica de amplificación, la cual necesita un método de extracción de ADN lo más estandarizado posible con el que se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa: porque los cambios en la pureza afectan los perfiles de amplificación y esto se manifiesta en la presencia de bandas falsas y en la poca reproducibilidad del ensayo (59).

**Tabla 5.** Calidad promedio de ADN extraído por protocolo.

Protocolos	Calidad (%)	
Tens	8,31	b
Fenol-Cloroformo	28,31	a
Lisis de Extracción	21,08	a
C.V.	13,31	
(p<0,05)	<0,0001**	

Promedios en cada columna con letras iguales no difieren estadísticamente (Tukey  $p \leq 0,05$ ). CV: Coeficiente de variación; NS= No significativo; \*Significativo, \*\*Alta significancia, ND= No determinado.

### 4.3. Análisis económico de ADN extraído de tejido pulmonar mediante tres protocolos (Tens, fenol-cloroformo, lisis de extracción).

En la tabla 6 se muestra el análisis económico de protocolos de extracción de ADN mostrando mayor costo el T3 (405,18) y menor costo el T1 (326,93). Existe diferencia entre los tratamientos con respecto al costo, debido a que cada protocolo requiere de equipos y reactivos específicos, además las horas de trabajo de cada equipo implementado genera variabilidad en el uso de energía que cada tratamiento requiere para obtener ADN.

**Tabla 6** Valores registrados de Análisis económico en protocolos para extracción de ADN.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>TOTAL</b>	<b>TOTAL</b>
<b>COSTOS VARIABLES</b>	6,58	6,58	6,58
<b>MATERIA PRIMA</b>	116,68	131,43	159,88
<b>MANO DE OBRA DIRECTA</b>	87,72	122,81	122,81
<b>COSTOS INDIRECTOS</b>	11,03	11,03	11,03
<b>COSTOS FIJOS</b>	104,92	105,44	104,87
<b>TOTAL DE EGRESOS</b>	\$326,93	\$377,29	\$405,18

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones.

- Los registros obtenidos en la variable cantidad (ng/uL), determinaron que el protocolo que mayor volumen de ADN extrajo por muestra fue el tratamiento 2 (protocolo con Fenol-cloroformo) con un registro promedio de 23,32 ng/uL, seguido de cerca por el tratamiento 1 (protocolo Lisis de extracción) con un registro de 14,63 ng/uL. Finalmente el tratamiento 3 (protocolo de Tens) registró datos no tan eficientes, con un valor promedio de 7,04 ng/uL.
- En cuanto a la variable calidad, el tratamiento que mayor porcentaje de calidad registró fue el T2 (protocolo con Fenol-cloroformo) con un registro promedio de 28,31%, seguido por T3 (protocolo Lisis de extracción) con 21,08 %. Contrario a esto el tratamiento que menor registro de calidad presentó fue el T1 (protocolo de Tens) con 8,31%.
- Por otro parte, el análisis económico permitió determinar cuál protocolo guarda una mayor ventaja en cuanto a la relación costo/rendimiento, ya que se determinó que el T2 pese a ser junto al T3 los protocolos con mayor eficiencia en cuanto calidad y cantidad en extracción de ADN, arrojaron los costos más elevados con 377,29 y 405,18\$ respectivamente, lo cual contrasta con lo obtenido por el T1 con un costo de 326,93\$. Sin embargo, tomando en cuenta los registros obtenidos en las variables cantidad y calidad se podría determinar que el T2 (protocolo con Fenol-cloroformo), pese a ser el segundo protocolo más costoso, sería el protocolo más factible al momento de realizar extracciones de ADN en tejido pulmonar bovino.

## **5.2.Recomendaciones**

- Determinar el efecto negativo que podría tener el tiempo en la conservación del tejido pulmonar al momento de aplicar un protocolo de extracción de ADN.
  
- Aplicar otros métodos que permitan extraer ADN a partir del tejido pulmonar, para de esta manera determinar si existe algún otro método con mayor efectividad, que el protocolo con Fenol-Cloroformo evaluado en la presente investigación.
  
- Promover el uso de protocolos para la extracción de ADN, debido al bajo costo de inversión que requieren en comparación a los Kit de extracción de ADN, los cuales podrían superar hasta cuatro veces más la cantidad de inversión.

**CAPITULO VI**  
**BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Referencias Bibliográficas

1. Villa-Loaiza M, Granda-Agudelo D, Gusmão , Ibarra-Rodríguez AA. Variación de perfiles genéticos obtenidos por PCR con y sin extracción de ADN a partir de manchas de sangre. *Actualidades Biológicas*. 2017; 39(106): p. 79-87.
2. González , Rodríguez , Torres , O'Callaghan , De Jesús. Protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando la enzima bromelina. *Revista Científica*. 2011; 21(3): p. 233-238.
3. Rezaei , Mirhosseini , Hossein-Zadeha. Análisis de PCR-RFLP del gen de leptina y su asociación con características de la leche en ganado nativo (*Bos indicus*) de Irán. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 2015; 6( 1 ): p. 15-24.
4. Vega Contreras , Galvis Serrano F, Salazar Mercado. Relaciones evolutivas de los peces *Prochilodus reticulatus* y *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae). *Revista de Ciencias*. 2017; 21( 1 ): p. 163-173.
5. Caetano Nunes Pazdiora R, Selvaraj , Marmolejo F, Muñoz E, Guzmán I. Una metodología no invasiva para la extracción de ADN de *Coryphaena Hippurus*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*. 2015; 44( 2 ): p. 395-399.
6. Cornejo , Serrato , Rendón , Rocha. *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. SEMARNAT-INECC ed. Tlalpan; 2014.
7. Bustamante JA, Astudillo M, Pazos AJ, Bravo LE. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de Biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biológica Colombiana*. 2011; 16( 2 ): p. 83-98.
8. Lopera N, Ribeiro R, Gomes P, Jacometo C, da Silva T. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modifi cada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*. 2008; 35(1)(77-86).

9. VALERO T. Comparación de métodos de extracción de ADN con muestras de aleta de *Oreochromis sp.* y *Atractosteus tropicus*: extracción con fenol-cloroformo y extracción modificada con cloruro de sodio. Tesis. San Carlos: Universidad de San Carlos de Guatemala , Centro de estudios del Mar y Acuicultura; 2010.
  
10. BUSTAMANTE A, ASTUDILLO , PAZOS AJ, BRAVO LE. EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE BIOPSIAS FIJADAS. *Acta Biológica Colombiana*. 2011 Junio; 16(2)(83-97).
  
11. Alés M, Ania J, Junquera C. Auxiliares de Enfermería Del Servicio Navarro de Salud-osasunbidea. Temario Volumen i. Segunda+ ed. Mad E, editor. España: Mad, S.L.; 2007.
  
12. Navarro J. Definición ABC. [Online].; 2016 [cited 2018 Julio 1. Available from: <https://www.definicionabc.com/ciencia/post-mortem.php>.
  
13. Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española. [Online].; 2018 [cited 2018 Julio 1. Available from: <http://dle.rae.es/?id=Oa8UWkD>.
  
14. González I. Partes componentes y elaboración del protocolo de investigación y del trabajo de terminación de la residencia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2010; 26(2)(387-406 ).
  
15. Regueiro M, van Lier E, Petrocelli H, López Á. Fagro. [Online].; 2017 [cited 2018 08 25. Available from: <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/06a%20-%20Anatomia%20y%20fisiologia%20del%20aparato%20respiratorio.pdf>.
  
16. Megías M, Molist P, Pombal M. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Órganos Animales. Sistema Respiratorio. Uvigo ed. Vigo: Creative Commons; 2016.
  
17. JICA. Manual del Protagonista. Anatomía y Fisiología Animal. MAG ed. Nicaragua; 2016.
  
18. Angulo , González , Jiménez. Técnicas prácticas de radiología Málaga: Vértice; 2010.

19. Microbial. La extracción y purificación del ADN para el análisis por PCR. Mitos y Realidades. NewsletterMicrobial. 2009 Enero-Febrero;(3).
20. González N, Rodríguez , Torres W, O'Callaghan J. otocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de tejido de oreja del ratón y la rata, usando enzima bromelina. Revista Científica. 2011 mayo-junio; XXI(3).
21. Hleap J, Cárdenas H, García F. Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos. Pan-American Journal of Aquatic Sciences. 2009; 4(4).
22. Rocha P. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. PALMAS. 2002; 23(3).
23. Bueno M. Cromosomas, Vehículos en la organizacioón y transmisión de los caracteres. Acta Biológica Colombiana. 2011; 16(3).
24. Zerón A. Biotipos, fenotipos y genotipos. ¿Qué biotipo tenemos? (Segunda parte). Revista Mexicana de Periodontología. 2011 Enero-Abril; 2(1).
25. Canteras J. La evolución del concepto de gen. Biología, ideología y sociobiología. EIKASIA. 2012 Enero;(83).
26. Gonzalez F. ¿Qué es el Genoma? Artículo de Sitio Web. Valencia: Universitat de València.; 2013.
27. Ortiz A. purificación DNA Genómico. Componentes celulares. Informe. Morelos: Universidad politécnica del Estado de Morelos, Ingenieria en Biotecnología; 2016.
28. Cortés L. Secuenciación y clonación de los genes dihidrofolatoreductasa (dhfr) y dihidropteroatosintetasa (dhps) de la cepa RH y de 2 aislamientos de Toxoplasma gondii. Tesis. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Maestría Infecciones y Salud en el Trópico; 2012.

29. Azofeifa Á. USO DE MARCADORES MOLECULARES EN PLANTAS; APLICACIONES EN FRUTALES DEL TRÓPICO. AGRONOMÍA MESOAMERICANA. 2006 Julio; 17(2)(221-242).
30. Ríos , Mejía , Ticul. Marcadores moleculares: una REVOLUCIÓN en la ZOOLOGÍA. Comunicaciones libres. 2009 julio-septiembre.
31. Pérez L, Rodríguez F, Langebaek C, Groot H. Cuantificación en tiempo real de un conjunto de muestras colombianas de relevancia histórica mediante la detección de un fragmento corto de la región hipervariable II del ADN mitocondrial. Biomédica. 2016; 36(475-82).
32. Dorado G. Purificación y análisis de DNA cromosómico bacteriano. Universidad de Córdoba. 2009.
33. Sendra R. Problemas, Ejercicios de Genética. Universitat de València (UV). Documento de Word. Valencia: Universitat de València, Genética, Biología y Química; 2013.
34. Cortell M, Iborra P, Rubio L, Carretero P, García M, Mazcuñán T, et al. Protocolo para la evaluación de la calidad del ADN obtenido de muestras biológicas para su uso en diagnóstico e investigación biomédica. Biobancos. 2014 Noviembre.
35. Rivero C, Rocha M, Rodríguez L. Técnicas en bioquímica Centrifuga. Presentación PowerPoint. Carabobo: Universidad de Carabobo, Departamento de Bioquímica y Fisiología Núcleo Aragua; 2014.
36. Martell P. HOMOGENEIZACIÓN DE TEJIDOS. artículo. Coyoacán: Universidad del Valle de México Campus Tlalpán-Coyoacán, Ciencias de la Salud; 2014.
37. Correa M. Célula y Ruptura celular. Informe. Ambato: Universidad Técnica de Ambato, Ingeniería Bioquímica; 2011.
38. UNSAM. BIOQUIMICA DE PROTEÍNAS. Presentación PowerPoint. San Martín:

- Universidad Nacional de General San Martín; 2017.
39. Alcántara R, Guadarrama S, Resendiz D. Extracción, separación y caracterización de lípidos. Reporte de Práctica. Cuautitlán: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
  40. Castillo J. Extracción de ADN. Manual. México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático; 2014.
  41. UNSAM. Ácidos Nucleicos. Trabajo Práctico. San Martín: Universidad Nacional de General San Martín; 2018.
  42. Brandan N, Aguirre M, Llanos I, Rodríguez A. Conceptos de Genética. UNNE ed. Corrientes; 2011.
  43. Tafurt Y, Marin M. Principales Mecanismos de Reparación de daños en la molécula de ADN. Biosalud. 2014 julio-diciembre; 12(2).
  44. Salazar A, Sandoval A, Armendáriz J. Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. primera ed.: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA; 2013.
  45. Audain K. Geniolandia. [Online].; 2018 [cited 2018 08 26. Available from: <https://www.geniolandia.com/13104179/la-diferencia-entre-la-extraccion-de-adn-de-animales-y-plantas>.
  46. Duque A, Relova D, Perez A, Burger Y, Lobo E. Termoestabilidad del ADN deshidratado de *Mycoplasma gallisepticum*. Salud Animal. 2017 septiembre-diciembre; 39(3).
  47. Cultek. Biobancos. Dossier Informativo Madrid; 2014.
  48. Velasco R. MARCADORES MOLECULARES Y LA EXTRACCIÓN DE ADN. ASUBAGROIN FCA Unicauca. 2005 Febrero; 3(1).
  49. Baena J, Ramos A, Gómez C, Gómez D. Comparación de métodos de extracción de ADN

- en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. UNAL. 2013 enero-junio; XV(1).
50. Genyca. [Online].; 2018 [cited 2018 diciembre 1. Available from: <https://www.aulagenyca.com/extraccion-de-adn/>.
  51. Raing. [Online].; 2018 [cited 2018 Diciembre 1. Available from: <http://diccionario.raing.es/es/lema/tamp%C3%B3n-de-lisis>.
  52. Hidrología INdMe. Anuario Meteorologico Olmedo J, editor. Quito; 2017.
  53. Universia Costa Rica. Universia Costa Rica. [Online].; 2017 [cited 2018 Marzo 1. Available from: <http://noticias.universia.cr/educacion/noticia/2017/09/04/1155475/tipos-investigacion-descriptiva-exploratoria-explicativa.html>.
  54. Guevara M, Paternina L, Blanco P, Vertel M. Comparación y utilidad de tres métodos de extracción de ADN a partir de potenciales vectores de enfermedades rickettsiales (Acari: Ixodidae) en Colombia. XXV Simposio Internacional de Estadística. 2015 Agosto.
  55. Lopera N, Povh J, Ribeiro R, Gomes P, Jacometo C, da Silva T. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. Ciencia e Investigación Agraria. 2008 Octubre; 35(1).
  56. Martín E, Ruiz M, Silenzi G, Bonano M. Comparación de métodos de extracción de ADN para el género *Astylus* (Coleoptera: Melyridae). Acta zoológica lilloana. 2017 Junio; 61(1).
  57. Jiménez G, Villalobos M, Jiménez E, Palma W. Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica. 2007 Septiembre; 1(1).
  58. Bustamante J, Astudillo M, Pazos J, Bravo L. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no

óptimas. *Acta Biológica Colombiana*. 2011 Junio; 16(2).

59. Fraga J, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández A. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de Triatomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2004 Diciembre; 56(3).
60. Tamay L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*. 2013 Mayo-Agosto; 2(2).
61. Velásquez I, Padierna L. Control de Calidad en Materia prima para Hemoderivados: Métodos tradicionales vs Métodos Moleculares. *MedLab*. 2015; 7(2).
62. Fernández E, Pérez A, Turbón D, Arroyo E. ADN Antiguo: química y aplicaciones. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 2003 Julio-Septiembre;(31).

**CAPITULO VII**  
**ANEXOS**

**Anexo 1** *Análisis de varianza para la variable cantidad (ng/uL) en extracción de ADN en tejido pulmonar en bovinos.*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	1726,44	4	431,61	4,95	0,0036
Tratamiento	1458,80	2	729,40	8,36	0,0014
Bloque	264,68	2	132,34	1,52	0,2363
Error	2529,92	29	87,24,		
Total	4256,36	33			

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

**Anexo 2** *Análisis de varianza para la variable calidad (ng/uL) en extracción de ADN en tejido pulmonar en bovinos.*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
Modelo.	3166,13	4	791,53	9,00	0,0001
Tratamientos	2259,40	2	1129,70	12,85	0,0001
Bloques	924,68	2	462,34	5,26	0,0112
Error	2549,10	29	87,90		
Total	5715,24	33			

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

**Anexo 3** Valores registrados de Análisis económico en protocolos para extracción de ADN.

	unidad	T1		T2			T3		
		cantidad	total	unidad	cantidad	total	unidad	cantidad	total
<b>COSTOS VARIABLES</b>									
Recoleccion de muestras	horas	3	6,58	horas	3	6,58	horas	3	6,58
<b>Subtotal</b>		<b>3</b>	<b>6,58</b>	<b>0,00</b>	<b>3</b>	<b>6,58</b>	<b>0,00</b>	<b>3</b>	<b>6,58</b>
<b>MATERIA PRIMA</b>									
pulmones	gramos	1100,00	5,00	gramos	1100,00	5,00	gramos	1100,00	5,00
Tris-HCl	gramos	1,82	0,57	gramos	1,82	0,57	gramos	1,82	0,57
EDTA	gramos	1,80	0,57	gramos	1,80	0,57	gramos	0,72	0,23
NaCl	ml	3,25	0,27	ml	3,25	0,27	ml	45,50	3,73
SDS	gramos	0,76	0,45	gramos	0,76	0,45	gramos	0,00	0,00
Proteinasa K	mg	20,00	35,80	mg	28,00	50,12	mg	40,00	71,60
fenol/cloroformo/isoamil	ml	9,60	0,48	ml	9,60	0,48	ml	14,40	0,72
Etanol 95%	ml	19,20	0,21	ml	32,40	0,36	ml	0,02	0,00
acetato de sodio	libras	0,00	0,00	libras	0,02	0,16	libras	0,00	0,03
ARNsa	ml	0,00	0,00	ml	0,72	0,13	ml	0,48	0,09
CTAB	kilos	0,00	0,00	kilos	0,00	0,00	kilos	0,02	4,00
2β-MERCAPTOETANOL	ml	0,00	0,00	ml	0,00	0,00	ml	0,30	0,58
Isopropanol	litros	0,00	0,00	litros	0,00	0,00	litros	0,01	0,00
AGAROSA ULTRA PURE	gramos	0,60	1,53	gramos	0,60	1,53	gramos	0,60	1,53
bromuro de etidio	ul	2,50	0,00	ul	2,50	0,00	ul	2,50	0,00
BLUEJUICE	ml	0,72	0,13	ml	0,72	0,13	ml	0,72	0,13
TAE 50X	Litro	0,50	45,00	litro	0,50	45,00	litro	0,50	45,00
Nitrogeno liquido	kilos	6,67	26,68	kilos	6,67	26,68	kilos	6,67	26,68
<b>Subtotal</b>		<b>1167,42</b>	<b>116,68</b>	<b>0,00</b>	<b>1189,36</b>	<b>131,43</b>	<b>0,00</b>	<b>1214,27</b>	<b>159,88</b>
<b>MANO DE OBRA DIRECTA</b>									
Laboratorio	horas	40	87,72	horas	56	122,81	horas	56	122,81

<b>Subtotal</b>			<b>87,72</b>		<b>122,81</b>		<b>122,81</b>
<b>COSTOS INDIRECTOS</b>							
Alcohol antiséptico	Litro	0,05	0,19 litro	0,05	0,19 litro	0,05	0,19
Agua	m3	0,01	0,00 m3	0,01	0,00 m3	0,01	0,00
Luz	horas	2	0,19 horas	2	0,19 horas	2	0,19
Caja de Mascarillas		1	3,50	1	3,50	1	3,50
Caja de guantes		1	7,00	1	7,00	1	7,00
Rollo de toallas de cocina	toallas	1	3,00 toallas	1	3,00 toallas	1	3,00
Finnipipette Labtip Yellow		333	3,33	333	3,33	333	3,33
Finnipipette Labtip Blue		333	4,00	333	4,00	333	4,00
Microtubos		93	2,98	93	2,98	93	2,98
<b>Subtotal</b>			<b>24,19</b>		<b>24,19</b>		<b>24,19</b>
<b>COSTOS FIJOS</b>							
Microcentrifuga	minutos	20	0,0108 minutos	15	0,0081 minutos	22	0,0119
Vortex	minutos	6	0,0006 minutos	6	0,0006 minutos	6	0,0006
Agitador calentador	minutos	10	0,0022 minutos	10	0,0022 minutos	10	0,0022
Balanza	minutos	20	0,0005 minutos	20	0,0005 minutos	20	0,0005
Micropipetas	minutos	30	0,0017 minutos	30	0,0017 minutos	30	0,0017
Foto documentador	minutos	5	0,0004 minutos	5	0,0004 minutos	5	0,0004
Fuente de poder	minutos	10	0,0004 minutos	10	0,0004 minutos	10	0,0004
Cámara de electroforesis	minutos	10	0,0426 minutos	10	0,0426 minutos	10	0,0426
Nevera indurama	horas	220	1,1301 horas	220	1,1301 horas	220	1,1301
Congelador -40	horas	220	103,66 horas	220	103,66 horas	220	103,6554
Cabina extractora	minutos	10	0,0264 minutos	10	0,0264 minutos	10	0,0264
Computadora de mesa	minutos	10	0,0017 minutos	10	0,0017 minutos	10	0,0017
Baño maría	horas	1	0,0473 horas	12	0,5671 horas	0	0,00
<b>Subtotal</b>			<b>104,92</b>		<b>105,44</b>		<b>104,87</b>
<b>TOTAL EGRESOS</b>			<b>340,08</b>		<b>390,44</b>		<b>418,33</b>

**Elaborado:** Ronald Cox Intriago.

**Anexo 4** *Extracción in situ de tejido pulmonar bovino.*



a.) Faenamiento del ganado bovino en el camal del cantón Quevedo.



b.) Selección de pulmón de ganado bovino.



c.) Aturdimiento del ganado bovino.



d.) Elección de diferentes tamaños de tejido pulmonar, para después ser pesada en valores de 300 mg.

**Anexo 5 Preparación de muestras.**



a.) Procediendo a pesar en la balanza los valores 300 mg



c.) Macerando las muestras con nitrógeno líquido.



b.) Introduciendo el tejido pulmonar una vez macerado al tubo. eppendorf



d.) Muestras de tejido pulmonar en baño maría.

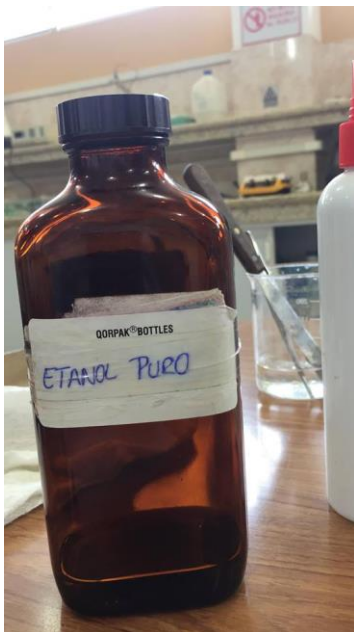
**Anexo 6** Realización de los tres protocolos para la extracción de ADN bovino.



a.) Muestras colocadas en centrifuga.



b.) Transferir la parte superior "acuosa" a un nuevo tubo.



c.) Frasco de etanol



d.) TE (10 Mm de Tris UP pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

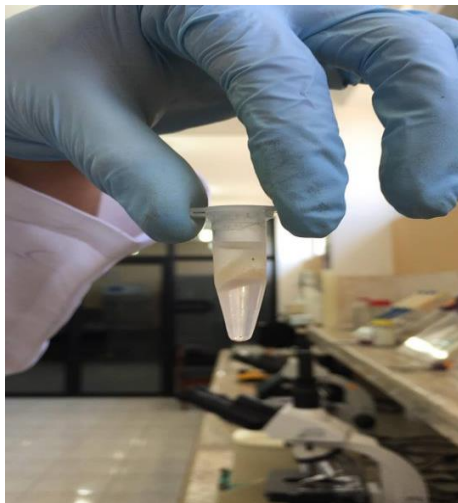
**Anexo 7** Muestras antes de retirar el líquido de la parte acuosa.



a.) Muestras de los 3 protocolos de extracción de ADN.



b.) Muestras después de pasar por el vortex.

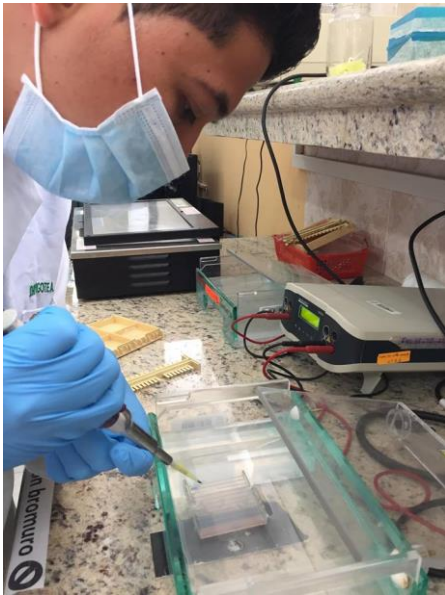


c.) Sobrenadante de una muestra.

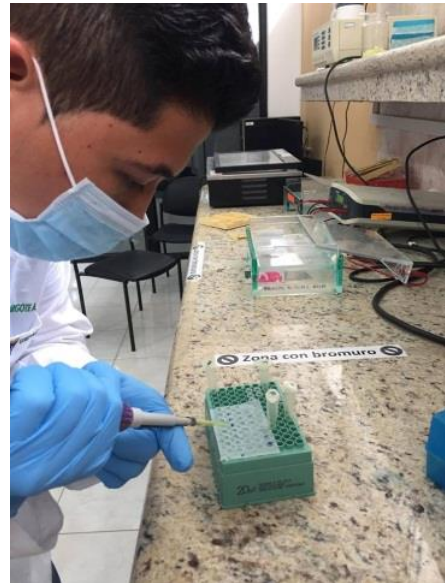


d.) Muestras después de pasar por el proceso de centrifugación.

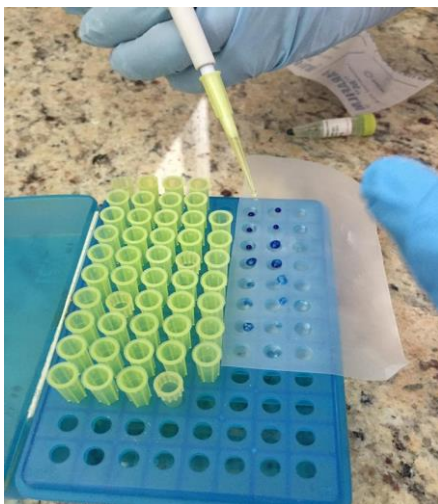
## Anexo 8 Extracción de ADN.



a.) Colocando ADN en el gel.



b.) Coger ADN y mezclar con pequeñas gotas azules.



c.) Ubicando en el parafil pequeñas gotas azules (juice blue).



d.) Programar la cámara a 100 voltios una vez introducido el ADN en el gel.

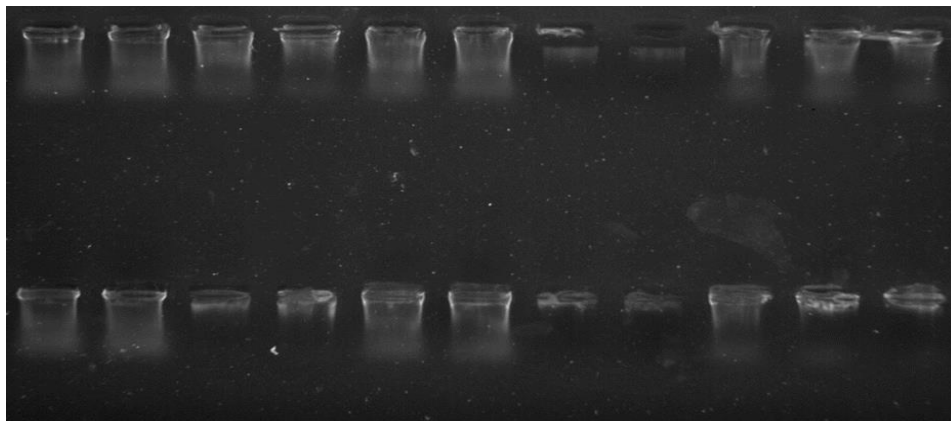
**Anexo 9** *Exponer el gel a la luz UV.*



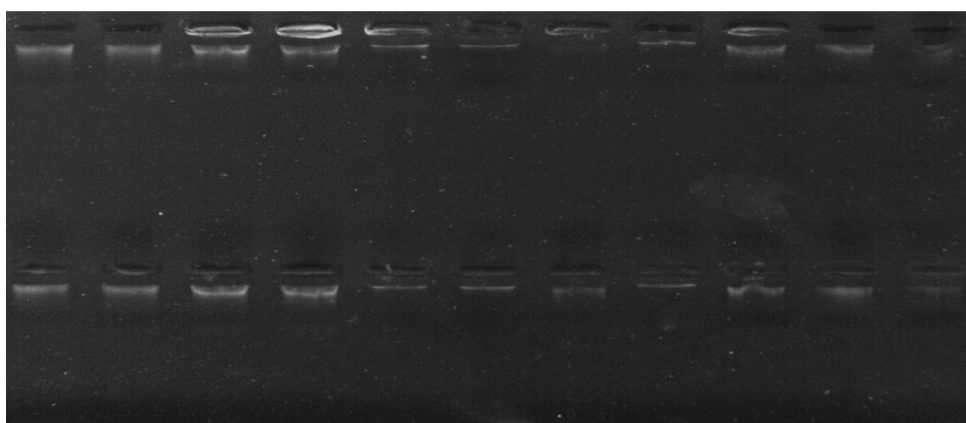
**Anexo 10** *Lectura de los geles.*



**Anexo 11** *Protocolo de Tens. Bando electroforético del protocolo de tens presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).*



**Anexo 12** *Protocolo con Fenol-Cloroformo. Bando electroforético del protocolo Fenol-Cloroformo presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).*



**Anexo 13** *Protocolo de lisis de extracción. Bando electroforético del protocolo Lisis de extracción presentado en geles de agarosa al 0.8%. PB. Pares de bases empelados. A. bando lader 1kb. Y B. bando ADN genómico en diferentes concentraciones de muestra (300).*

