

**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y RENDIMIENTO DE ADN GENÓMICO DE  
SANGRE DE PERROS EN DOS PROTOCOLOS BASADOS EN LA  
TÉCNICA DE “SALTING OUT”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRESENTA:**

**YENI VANESSA DIONICIO SALVADOR**

**DIRECTORES:**

**DR. OSWALDO MARGARITO TORRES CHABLÉ  
MC. GUADALUPE ARJONA JIMÉNEZ**

**VILLAHERMOSA, TABASCO, OCTUBRE DE 2019.**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Asunto: Autorización de impresión  
de Trabajo Recepcional.**

**Fecha: 24 de octubre de 2019.**

**LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON  
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y  
TITULACIÓN DE LA UJAT.  
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted que con base en el artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo autoriza al (la) C. Yeni Vanessa Dionicio Salvador, con matrícula 132C13173, egresado(a) de la Licenciatura de Médico Veterinario Zootecnista de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, la impresión de su Trabajo Recepcional bajo la modalidad de Tesis, titulado: Evaluación de la calidad y rendimiento de ADN genómico de sangre de perros en dos protocolos basados en la técnica de "SALTING OUT".

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**

**Ph.D. ROBERTO ANTONIO CANTÚ GARZA  
DIRECTOR**

**U.J.A.T.**



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS AGROPECUARIAS  
DIRECCIÓN**

C.c.p.- Expediente Alumno.

Archivo

Ph.D.RACG/MC.AMA

Miembro UUMEX desde 2008

**Consortio de  
Universidades  
Mexicanas**  
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25, Carret. Villahermosa-Teapa  
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México  
Tel. (+52 993) 358-15-85 y 142-9150

Correos electrónicos: [direccion.daca@ujat.mx](mailto:direccion.daca@ujat.mx), [daca.direccion@gmail.com](mailto:daca.direccion@gmail.com)

[www.ujat.mx](http://www.ujat.mx)

[www.facebook.com/ujat.mx](http://www.facebook.com/ujat.mx) | [www.twitter.com/ujat](http://www.twitter.com/ujat) | [www.youtube.com/UJATmx](http://www.youtube.com/UJATmx)

## CARTA DE AUTORIZACION

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada Evaluación de la calidad y rendimiento de ADN genómico de sangre de perros en dos protocolos basados en la técnica de "Salting out", de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 24 días del mes de octubre del año 2019.

AUTORIZO

---

**YENI VANESSA DIONICIO SALVADOR**  
Pasante de Medicina Veterinaria y Zootecnia

## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.- Justificación.....	4
1.2.- Objetivo general.....	4
1.3.- Objetivos específicos.....	4
2.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1.- Aspectos generales de la extracción de ADN.....	5
2.2.- Extracción de ADN empleando la técnica de Salting out.....	7
2.3.- Evaluación del ADN obtenido.....	9
2.3.1.- Evaluación de la calidad del ADN usando espectrofotometría (Nanodrop®).....	9
2.3.2.- Evaluación de la calidad del ADN por medio de gel de agarosa.....	12
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1.- Muestras biológicas.....	16
3.2.- Metodología para realizar la extracción de ADN.....	16
3.2.1.- Protocolo 1.....	16
3.2.2.- Elaboración de las soluciones a utilizar durante la extracción del ADN usando el protocolo 1.....	17
3.2.3.- Protocolo 2.....	19
3.2.4.- Elaboración de las soluciones a utilizar durante la extracción del ADN usando el protocolo 2.....	20
3.2.5.- Cuantificación y evaluación del ADN por espectrofotometría (Nanodrop®).....	20
3.3.- Análisis de los datos obtenidos por espectrofotometría.....	21
3.4.- Evaluación del ADN empleando gel de agarosa.....	21
4.- RESULTADOS.....	22
5.- DISCUSIÓN.....	25
6.- CONCLUSIONES.....	28
5.- LITERATURA CITADA.....	29

## 1. INTRODUCCIÓN.

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de muestras de distinta naturaleza biológica constituye la etapa previa para realizar análisis moleculares y genéticos. Obtener ADN relativamente puro y capaz de ser replicado mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es fundamental para los posteriores usos a los que será destinado, como son las investigaciones forenses, poblacionales y el diagnóstico de enfermedades (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014).

Existen diversos protocolos para llevar a cabo la extracción de ácidos nucleicos. El uso de cada técnica depende de la naturaleza biológica de la muestra, el tiempo destinado para realizar la extracción, la calidad y cantidad de ADN que se requiera obtener, el riesgo potencial al cual se expone el personal del laboratorio si se emplean reactivos peligrosos durante la extracción y el costo de los reactivos empleados para el procesamiento de las muestras (Falcón y Valera, 2007).

En general; los métodos de extracción de ADN tienen una serie de pasos básicos, que se cumplen independientemente del origen de la muestra. Estos son, 1) Disrupción celular (ruptura de la bicapa lipídica de las membranas celulares por tratamiento con detergentes, agentes quelantes, sales, etc.); 2) Eliminación de las proteínas (que constituyen los principales contaminantes del extracto); 3) Concentración del ADN (por precipitación con alcoholes); 4) Lavado (para eliminar restos de reactivos y solventes que puedan inhibir la *Taq polimerasa*) y 5) Re-suspensión del ADN puro en una solución (Riera *et al.*, 2010; Nasiri *et al.*, 2005; Kramvis *et al.*, 1996).

El uso de sales para la extracción de ADN (Salting out) es una técnica la cual fue originalmente descrita por Miller *et al.* (1988), se caracteriza por ser una técnica de extracción sencilla y económica, sin embargo no ha sido reportado su uso como método de extracción de ADN genómico procedente de sangre de perros. Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la calidad y el rendimiento de ADN

genómico de sangre de perros en dos diferentes protocolos basados en la técnica de Salting out.

#### 1.1.- Justificación.

La obtención de ADN es un paso básico para los análisis moleculares y genéticos. La técnica de extracción Salting out tiene como principal ventaja el bajo costo económico en comparación con otras técnicas. Además, no involucra el uso de reactivos dañinos para la salud humana como son fenoles o cloroformo. Sin embargo, es necesario evaluar la cantidad y pureza del ADN obtenido mediante el uso de esta técnica a fin de que este tenga la calidad y cantidad que se requiere para poder ser usado en técnicas de diagnóstico moleculares como la PCR, secuenciación y posteriores estudios bioinformáticos, con lo cual se contribuya al diagnóstico molecular de diversas enfermedades.

#### 1.2.- Objetivo general.

- ✓ Evaluar la cantidad y calidad de ADN extraído a partir de sangre entera de perros empleando dos diferentes protocolos basados en la técnica de Salting-out.

#### 1.3.- Objetivos específicos.

- ✓ Cuantificar la cantidad de ADN obtenido de muestras de sangre de perros empleando ambos protocolos de extracción.
- ✓ Evaluar cualitativamente la pureza e integridad del ADN obtenido empleando los dos protocolos de extracción.
- ✓ Realizar un análisis costo-beneficio comparando el costo de extracción de una muestra en cada protocolo.

## 2.- REVISIÓN DE LITERATURA.

La presente revisión de literatura contempla aspectos generales de la extracción de ADN, algunas técnicas empleadas para la extracción de ADN, el uso de kits comerciales para extracción de ADN y el uso de la espectrofotometría para la evaluación de la cantidad y calidad de ADN.

### 2.1.- Aspectos generales de la extracción de ADN.

El trabajo en el laboratorio de biología molecular requiere un alto grado de entrenamiento del personal y requiere de una serie de precauciones generales para no contaminar las muestras biológicas con otros ácidos nucleicos, ADNasas o proteasas que degraden la muestra hasta el punto que no pueda obtenerse material genético de la misma. Por tanto, el área de trabajo debe mantenerse limpia y desinfectada, también hay que utilizar guantes para protección personal y para evitar contaminar las muestras, así como trabajar con materiales y soluciones estériles y preferentemente se debe trabajar en una campana de flujo laminar (Falcón *et al.*, 2007).

El ADN a diferencia del ARN es muy estable y sólo se requiere mantener las muestras congeladas antes de su extracción y seguir los protocolos de extracción y buen manejo de muestras para evitar su contaminación (Sambrook *et al.*, 1989).

El ADN es obtenido de células a través de métodos que rompen las paredes celulares y disuelven las membranas. Sin embargo, paralelamente, en esta etapa se debe prevenir la fragmentación del ADN por tratamientos mecánicos y la degradación del mismo por procesos enzimáticos. En general, cuando una célula es expuesta a condiciones traumáticas (tales como los métodos de extracción de ADN) se liberan al medio grandes cantidades de enzimas ADNasas, las cuales se encargan de destruir el ADN expuesto para prevenir posibles errores en sus secuencias (mutaciones) o para impedir su transferencia a otras células (Ausubel *et al.*, 2002).

En general para la primera etapa en la extracción del ADN se emplean soluciones amortiguadoras de extracción que contienen sales como son el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS), Tris y Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA), las cuales mantienen el pH entre 7 y 8, lo que incrementa la vida media y viabilidad del ADN y funcionan como agentes quelantes de los cofactores de las enzimas ADNasas. Algunos detergentes se emplean en altas concentraciones para solubilizar las membranas celulares como el SDS, agentes biológicos, como las enzimas pectinasas para disolver las paredes celulares y agentes inhibidores de proteínas como el dithiothreitol (DTT) y  $\beta$ -mercaptoetanol los cuales desestabilizan algunas ADNasas (Sambrook *et al.*, 2001).

Una vez liberado el ADN durante el proceso de extracción, es necesaria la purificación del mismo para aislarlo de los agentes contaminantes que propician la degradación del ADN. Los agentes contaminantes pueden degradar el ADN o largo plazo e inhibir algunas reacciones enzimáticas, tales como la acción de las polimerasas; las cuales son usadas para amplificar o secuenciar el ADN. Se utilizan una gran variedad de técnicas y reactivos para purificar el ADN como son el detergente catiónico CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), agentes caotrópicos como el isotiocinato de guanidina y el cloruro de guanidina y solventes orgánicos como el cloroformo y el fenol. En la mayoría de los casos se llevan a cabo diversos pasos hasta alcanzar la purificación del ADN de acuerdo a las características de la muestra biológica (Ausubel *et al.*, 2002; Sambrook *et al.*, 2001; Sambrook *et al.*, 1989).

Una vez que se ha liberado el ADN durante el proceso de extracción el siguiente paso consiste en la concentración del mismo para su uso posterior en las diversas aplicaciones moleculares. Existen diversos métodos para llevar a cabo la concentración de ADN obtenido de la muestra, en la literatura el más usado es la precipitación con alcohol y centrifugaciones que permiten precipitar el ADN formando un pellet en el fondo del tubo y permite la decantación de los demás componentes no deseados (Moore *et al.*, 2002; Hänni *et al.*, 1995).

El principio para el uso de alcoholes para precipitar las moléculas de ADN se basan en la capacidad de los alcoholes para eliminar el agua alrededor de los ácidos nucleicos y exponer los grupos fosfatos cargados negativamente. Los iones positivos de las sales disueltas se unen a estos grupos fosfatos y reducen las fuerzas repulsivas entre las diferentes cadenas de polinucleótidos, conduciendo a que estos formen complejos muy densos que finalmente precipitan (Falcón *et al.*, 2007).

Diversas sales han sido empleadas para lograr la precipitación de ácidos nucleicos. Entre las sales más comunes se encuentran el acetato de amonio, que tiene la ventaja de reducir la precipitación de polímeros contaminantes, tales como oligonucleótidos y polisacáridos. Sin embargo, los iones amonio inhiben algunas enzimas usadas en las reacciones posteriores en el ADN, por lo que a veces no se recomienda su uso (Sambrook *et al.*, 2001).

Otras sales ampliamente usadas son el cloruro de litio recomendada para precipitar selectivamente ARN, el cloruro de sodio que se recomienda cuando el amortiguador de extracción contiene SDS y el acetato de sodio, el cual es el más utilizado en las precipitaciones preparativas. La elección de la sal a usar durante el proceso de extracción depende de las características particulares de la muestra (Ausubel *et al.*, 2002).

## 2.2.- Extracción de ADN empleando la técnica de Salting out.

Existen diversas técnicas para la extracción de ADN, como se mencionó anteriormente el método de extracción depende de la naturaleza biológica de la muestra y de lo que se requiera hacer posteriormente con el ADN.

La técnica de Salting out (basado en sales) tiene la ventaja de no emplear sustancias nocivas para la salud humana como los solventes orgánico fenol y cloroformo además de no involucrar lavados tediosos con detergentes y tampoco involucra el uso de columnas comerciales de alto costo. Salting out es un método de extracción desarrollado a finales de los 80's y se basa en el uso de una mínima

concentración de detergentes y sales que provocan la ruptura y posteriormente la des-proteinización de la muestra (Miller *et al.*, 1988).

Salting out se basa principalmente en la precipitación salina de las proteínas celulares por deshidratación y posterior precipitación con una solución saturada de NaCl (Miller *et al.*, 1988). La metodología empleada por estos investigadores se basa en resuspender células sanguíneas obtenidas en tubos con EDTA en tubos de centrifugación de polipropileno de 15 mL con 3 mL de solución de lisis buffer (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl y 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 8.2). Las células lisadas serán digeridas toda la noche a 37 °C con 0.2 mL de SDS al 10 % y 0.5 mL de solución de proteinasa K (1 mg de proteinasa K en 1 % SDS y 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA). Después de llevarse a cabo la digestión 1 mL de solución de NaCl (6 M) se adiciona a cada tubo y se agita vigorosamente por 15 min. El pellet de proteína se precipita al fondo del tubo y el sobrenadante conteniendo el ADN se transfiere a otro tubo de polipropileno de 15 mL. Posteriormente, se adicionan dos volúmenes en relación a la muestra inicial de etanol absoluto y son invertidos manualmente en varias ocasiones hasta que el ADN se precipite. El pellet de ADN será removido empleando una espátula de plástico o una punta de pipeta y se transferirá a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le adicionara 100-200  $\mu$ L de TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 7.5) para resuspender el ADN. Se permitió un tiempo de re-suspensión del ADN de 2 h antes de su cuantificación (Miller *et al.*, 1988).

A partir de esta metodología se han realizado diversas modificaciones relacionadas a la muestra biológica, tiempo de extracción, pureza del ADN entre otras que han mejorado los resultados obtenidos durante la extracción del ADN.

Algunas de las modificaciones realizadas a la técnica han sido no utilizar una degradación enzimática de proteínas (proteínasa K) para la obtención de ADN genómico a partir de sangre entera en humanos (Suguna *et al.*, 2014), cambios en algunas sales (acetato de sodio o acetato de potasio) sus concentraciones o

tiempos de incubación en frío (Fraga *et al.*, 2004) y los alcoholes empleados para la precipitación del ADN.

### 2.3.- Evaluación del ADN obtenido.

La evaluación de la cantidad de ADN es necesaria para algunas aplicaciones posteriores de ADN en el campo de la biología molecular. La presencia de impurezas en el ADN extraído puede conducir a una medida errónea de la cantidad de ADN e inhibir algunas reacciones como la PCR.

La concentración de ADN se puede evaluar usando la capacidad de absorbancia (densidad óptica) de los ácidos nucleicos, electroforesis en gel de agarosa, colorantes fluorescentes de unión al ADN y un sistema de cuantificación acoplado a fosforilación-luciferasa. Los dos métodos más comunes de medición de la pureza de ADN y la concentración son absorbancia (medido utilizando un espectrofotómetro) y el análisis en gel de agarosa (Turner *et al.*, 2005).

#### 2.3.1.- Evaluación de la calidad del ADN usando espectrofotometría (Nanodrop®).

Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta (UV) debido a los anillos heterocíclicos de los nucleótidos; la cadena principal de azúcar-fosfato no contribuye a la absorción. La longitud de onda de absorción máxima tanto para el ADN y el ARN es de 260 nm ( $\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$ ) con un valor característico para cada base (Lee *et al.*, 2012).

La  $\lambda_{max}$  de los ácidos nucleicos es constante, sin embargo el coeficiente de absorción de ácidos nucleicos depende de su medio ambiente (solución de dilución y residuos de reactivos utilizados durante de la extracción, pH, entre otros). Así, la absorbancia de nucleótidos aislados es mayor que la del ADN, ARN y ADNs de cadena sencilla (monocatenario), el cual es a su vez es mayor que la del ADN de doble cadena (bicatenario). En ese sentido, la absorción de ADN bicatenario sería aproximadamente 40 % menor a la exhibida por una mezcla de nucleótidos libres

de la misma concentración. Esta diferencia se debe a las propiedades estructurales del ácido nucleico y se llama el efecto hipocrómico. Este efecto resulta de interacciones hidrofóbicas y dipolo-dipolo entre los sistemas de electrones de las bases individuales hechas posibles por su apilamiento en la disposición paralela de la doble hélice (Gerstein *et al.*, 2001).

Antes de medir la absorbancia, es importante asegurarse de que el ADN se encuentra completamente en solución pipeteando arriba y abajo. Ocasionalmente el ADN se encuentra fuertemente adherido en el fondo o en las paredes del tubo de serología regularmente empleando para su almacenamiento principalmente en caso de medir ADN post-congelación o recién re-suspendido, en tales casos es recomendable incubar a 37 °C hasta alcanzar la descongelación o esperar a que se descongele totalmente la muestra durante 30 minutos aproximadamente a temperatura ambiente y cerciorarse que el pellet de ADN haya sido disuelto totalmente (Sambrook *et al.*, 2001).

Al realizar la medición podrá observarse que la relación será aproximadamente igual a la media ponderada de los coeficientes de A260/A280 estimados para cada nucleótido si se mide de forma independiente (Cuadro 1), lo que explica por qué la proporción aceptada de 1.8 para el ADN puro es una aproximación. La relación se puede calcular después de restar la absorbancia de ácido no nucleico en A320, bajo la siguiente fórmula:

Pureza de ADN (A260 / A280) = (A260 lectura/A320 lectura) ÷ (lectura A280/A320 lectura).

De forma general, se reconoce como ADN de alta pureza cuando se encuentra en un rango A260/A280 = 1.8-2.0 y rango A260/A230 = 2.0-2.2 (Wilfinger *et al.*, 1997). Tomando en consideración el comportamiento de absorbancia de los ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos orgánicos puede indirectamente estimarse la pureza del ADN obtenido. Así, rangos de absorbancia por encima o debajo de los rangos A260/A280 nm y A260/A230 nm indican contaminantes con rangos de absorbancia mayores o menores a los del ADN. Del mismo modo, la

absorbancia a 230 nm se acepta como el resultado de otro tipo de contaminación; por lo tanto, la relación de A260/A230 es también con frecuencia calculada. Los valores de A260/A230 de ADN puro son a menudo superiores a las respectivas absorbancias A260/A280 (Wilfinger *et al.*, 1997). Las medidas de absorbancia son por lo tanto empleadas en la actualidad para identificar contaminantes o posibles errores durante la extracción de los ácidos nucleicos.

Cuadro 1.- Coeficientes de absorción máximo para cada nucleótido a diferente pH y rango de absorción 260/280 nm.

Base	pH	$\lambda_{max}$ nm	A260/A280 nm
Adenina	1	262.5	4.50
	7	260.5	
	12	269	
Citosina	1	276	1.51
	7	267	
	14	282	
Guanina	1	276	1.15
	7	276	
	11	274	
Tiamina	4	264	1.47
	7	264	
	12	291	

$\lambda_{max}$  nm: Absorbancia máxima expresada en nanómetros. A260/A280 nm: Relación de absorbancia máxima calculada para ADN de alta pureza (Gerstein, 2001; Turner *et al.*, 2005 y Wilfinger *et al.*, 1997).

Algunos cambios relacionados con una relación A260/A230 baja son:

- ✓ Presencia de carbohidratos (principalmente estructurales en plantas).
- ✓ Presencia de fenol residual durante la extracción del ADN.
- ✓ Guanidina residual (a menudo utilizado en los kits con columna de sílice).
- ✓ Glicógeno utilizado para la precipitación de ADN.

Algunos cambios relacionados con una relación A260/A230 elevada son:

- ✓ Hacer una medida de la solución blanco (empleada para calibrar el Nanodrop) cuando el pedestal se encuentra sucio.
- ✓ Usar una solución no apropiada como solución blanco. La solución blanco debe tener el mismo pH y fuerza iónica similar a la solución de muestra (p. ej. Solución de TE). El uso de agua para la medición de muestra blanco para muestras disueltas en TE pueden resultar en una bajo rango de A260/A230.

Las proporciones anormales A260/A280 generalmente indican que la muestra se encuentra contaminada por proteínas o algún reactivo como el fenol o que existe un problema con la medición.

Una relación A260/A280 disminuida puede deberse a:

- ✓ Fenol residual o algún otro reactivo empleando durante la extracción.
- ✓ Una muy baja concentración de ADN obtenido durante la extracción ( $> 10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ).

Una relación A260/A280 elevada no es por lo general un indicativo de presencia de ARN (Thermo-Scientific, 2011; Ausubel *et al.*, 2002; Glasel, 1995).

### 2.3.2.- Evaluación de la calidad del ADN por medio de gel de agarosa.

La agarosa es un copolímero alternante de 1,3-ligado  $\beta$ -D-galactosa y 1,4-ligados 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa, con poca frecuencia sustituido con carboxilato, piruvato o residuos de sulfato. Las moléculas de agarosa en solución tienen una estructura al azar a altas temperaturas, sin embargo después de su enfriamiento las cadenas de agarosa forman haces de fibras helicoidales unidas por enlaces de hidrógeno no covalentes; la gelificación se produce a temperaturas todavía más bajas cuando los haces de fibras llegan a unirse todos entre sí en "zonas de unión" por la formación de enlaces de hidrógeno adicionales. Los cambios en las ramificaciones se producen en las zonas de unión por reordenamientos de puentes de hidrógeno (Stellwagen, 2009). Estas propiedades de la agarosa la convierten en

un medio especial para poder visualizar biomoléculas e inclusive calcular su tamaño aproximado.

De acuerdo con la estructura molecular del ADN, los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción y visualización en geles de agarosa (Ausubel *et al.*, 2002).

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica que se emplea para separar macromoléculas en función de su tamaño. El término electroforesis describe la migración de las partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico. Es relativamente una técnica sencilla y rápida que permite diferenciar fragmentos de DNA que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. La concentración de agarosa y el voltaje con los que se debe trabajar depende del tamaño del fragmento de ADN que se quiera visualizar (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014).

Muchas macromoléculas biológicas importantes (por ejemplo, los aminoácidos, los péptidos, las proteínas, los nucleótidos y los ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables, los cuales a un pH obtienen cargas eléctricas (cationes o aniones). Según la naturaleza de la carga neta, las partículas cargadas migrarán hacia el cátodo o hacia el ánodo. Así, por ejemplo, cuando se aplica un campo eléctrico a un gel con pH neutro, los grupos fosfato del ADN cargados negativamente lo harán migrar hacia el ánodo (Somma *et al.*, 2010). Cuando se aplica una diferencia de potencial, las moléculas que poseen distintas cargas globales comenzarán a separarse debido a sus diferentes movilidades electroforéticas. Incluso las moléculas con cargas semejantes empezarán a separarse si sus tamaños moleculares son distintos. La velocidad de migración electroforética depende de la densidad de carga de la molécula, del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis. El voltaje no se puede incrementar indiscriminadamente porque se genera un excesivo calor. La pobre separación de las partículas se puede deber a un bajo voltaje (Somma *et al.*, 2010).

Para poder observar las bandas de ADN en el gel de agarosa es necesario realizar una tinción. Se pueden emplear sustancias coloreadas o fluorescentes que se unan a las proteínas o los ácidos nucleicos. En el primer caso suelen ser colorantes orgánicos que interactúan con las proteínas de forma poco selectiva, principalmente electrostática. Ejemplos: azul brillante de Coomassie, negro amido, rojo Ponceau. Para los ácidos nucleicos se usa el azul de metileno o, más frecuentemente, compuestos fluorescentes e intercalantes, como el bromuro de etidio. Un compuesto intercalante es aquél que se introduce entre los pares de bases apilados del ADN (Jiménez-Arce *et al.*, 2007).

Posterior a la electroforesis, el gel se sumerge en un recipiente con una disolución del colorante y se espera a que aquél se impregne y así el colorante se una a las moléculas separadas en el gel. Después el gel debe ser lavado para eliminar el exceso de tinción no unida específicamente, posteriormente puede ser observado por medio de un transluminador de rayos UV o un fotodocumentador (Jiménez-Arce *et al.*, 2007).

Finalmente, se debe analizar la integridad del ADN en el gel de agarosa. Si el ADN está íntegro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y disminuye la reproducibilidad de las técnicas moleculares para las cuales se ha extraído el ADN (Alejos-Velazquez *et al.*, 2014). En la Figura 1 se puede observar un gel de agarosa con diferentes representaciones de la integridad del ADN. En el carril uno se observa un marcador de masa molecular, en los carriles dos y tres no se observa ADN, en el carril 4 y 7 se observan muestras de ADN con una fragmentación leve, en el carril cinco se observa una muestra de ADN con una elevada fragmentación y en el carril seis se observa una muestra de ADN íntegra.

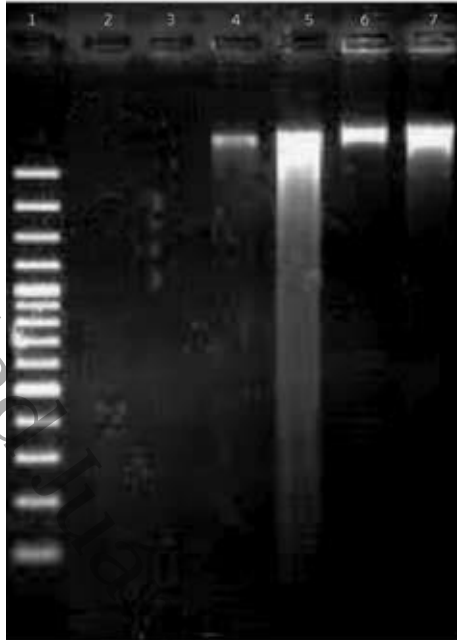


Figura 1.- Representación de un gel de agarosa para visualización de la integridad del ADN. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 y 3 vacíos, carril 4 y 7 muestras con poca fragmentación, carril 5 muestra fragmentada, carril 6 muestra íntegra (Stellwagen, 2009).

Una adecuada interpretación tanto de la espectrofotometría como del gel de agarosa para determinar la evaluación de la pureza e integridad del ADN proporciona al investigador información valiosa para futuros análisis moleculares tales como la PCR, clonación y purificación de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa con fines de secuenciación. En ese sentido, si alguna de las técnicas moleculares anteriormente mencionadas no produjera los resultados esperados o no pudiera llevarse a cabo satisfactoriamente el investigador podría realizar una revisión retrospectiva de los datos obtenidos tanto en espectrofotometría como en el gel de agarosa con la finalidad de encontrar el error y mejorar el procedimiento subsecuentemente (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014; Sambrook *et al.*, 2001).

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Tropicales y Transmitidas por Vectores de la División Académica de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

#### 3.1.- Muestras biológicas.

Se realizó la extracción de ADN con los protocolos propuestos en un total de 50 muestras de sangre entera de perros. Las cuales se obtuvieron del "banco de muestras" del Laboratorio de Enfermedades Tropicales y Transmitidas por Vectores de la DACA-UJAT. Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y una alícuota de 100  $\mu$ L fue colocada en tubos Eppendorf® de 1.5 mL para realizar el procedimiento de extracción de ADN.

#### 3.2.- Metodología para realizar la extracción de ADN.

La extracción de ADN a partir de las muestras de sangre se realizó empleando el método de Salting-out, al cual se le hicieron algunas adecuaciones (protocolo 1 y protocolo 2); debido a que este método no ha sido adaptado para la extracción de ADN a partir de sangre entera de perros.

##### 3.2.1.- Protocolo 1.

- 1.- Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de sangre con EDTA.
- 2.- Se agregaron 180  $\mu$ L de solución de lisis de eritrocitos, se mezcló en vortex e incubó 5 min a temperatura ambiente (TA).
- 3.- Se centrifugó a 13,000 rpm x 5 minutos y se descartó el sobrenadante (se repitieron tres veces los pasos 2 y 3).
- 4.- Se agregaron 60  $\mu$ L de solución de lisis de leucocitos, 10  $\mu$ L de solución de proteinasa K y 2  $\mu$ L de SDS al 20 % y se mezcló en vortex.

5.- Se incubó la mezcla por una hora a 65 °C agitando el preparado en vortex cada 10 minutos.

6.- Se agregó a la mezcla 30  $\mu$ L de Acetato de potasio (KAC), se mezcló levemente en vortex e incubó en hielo por 30 minutos.

7.- Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min y se pasó el sobrenadante a un tubo de serología nuevo usando micropipeta.

8.- Se agregó 200  $\mu$ L de isopropanol absoluto (frío), se invirtió el tubo diez veces, posteriormente se dejó precipitar toda la noche y se siguió el procedimiento al día siguiente.

9.- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min y se decantó.

10.- Se agregó 200  $\mu$ L de etanol al 70 % (frío), e invirtió el tubo diez veces.

11.- Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se decantó.

12.-Se secó el pellet por 30 min en campana (se observó que no quedaran residuos de alcohol en las paredes o fondo del tubo).

13.- Se resuspendió el pellet en 50  $\mu$ L de solución de tris con EDTA pH 8.0 (TE), se invirtió el tubo diez veces y se dejó reposar 5 min a TA.

3.2.2.- Elaboración de las soluciones a utilizar durante la extracción del ADN usando el protocolo 1.

Se realizó una solución para lisar eritrocitos empleando detergentes de fuerte actividad para romper las membranas de los eritrocitos. La solución se encontró compuesta de:

- ✓ Tris-HCl 10 mM pH 8.0.
- ✓ Triton X-100 al 1 %.
- ✓ Sacarosa al 11 %

Para la realización de 100 mL de solución, primero se colocaron 99 mL de agua destilada y 1 mL de Triton X-100 para obtener una concentración de Triton X 100 al 1 %, posteriormente se colocaron 11 g de sacarosa a la solución y se disolvieron con ayuda de un agitador magnético. Una vez alcanzada la disolución completa de la sacarosa se colocaron 121 mg de Tris y se mantuvieron en agitación constante hasta alcanzar su disolución completa. Posteriormente, con ayuda de un medidor de pH electrónico se aforó la solución agregando unas gotas de HCl hasta alcanzar un pH de 8.0.

También se elaboró una solución de lisis de leucocitos a base de saturación de NaCl, protegiendo el ADN con EDTA para evitar su degradación. La solución se elaboró con los siguientes reactivos:

- ✓ Tris-HCl 10 mM pH 8.0
- ✓ NaCl 400 mM
- ✓ EDTA 2 mM (PM: 372.24 g mol<sup>-1</sup>)

Para la elaboración de 100 mL de solución de lisis de leucocitos se colocaron 2.33 g de NaCl en 100 mL de agua destilada y se colocó la solución en un agitador magnético hasta alcanzar su disolución completa. Posteriormente, se colocaron 121 mg de Tris y una vez disuelto se agregaron 74 mg de EDTA. La solución fue aforada con gotas de HCl hasta alcanzar un pH de 8.0.

Para la degradación de la fracción proteica se empleó una solución con dos agentes degradadores de proteínas (degradación enzimática y por detergente) y EDTA para mantener protegido el ADN. La solución para lisis proteica fue elaborada con los siguientes reactivos:

- ✓ Proteinasa K
- ✓ SDS al 1 %
- ✓ EDTA 2 mM (PM: 372.24 g mol<sup>-1</sup>)

El procedimiento para elaborar la solución de lisis proteica se realizó colocando 1 g de SDS en 100 mL de agua destilada, posteriormente se colocaron 74 mg de EDTA en la solución y finalmente 100 mg de proteinasa K hasta alcanzar la disolución completa con ayuda de un agitador magnético. Esta solución debió mantenerse en refrigeración y se sugiere hacer alícuotas para evitar contaminación, degradación o menor actividad de la enzima.

Otras soluciones que fueron elaboradas por ser necesarias en la técnica:

- ✓ Solución de SDS al 20 % (20 g de SDS en 100 mL de agua destilada).
- ✓ Isopropanol absoluto.
- ✓ Acetato de potasio (KAC) 3 M (PM: 98.15 g mol<sup>-1</sup>). (29.45 g en 100 mL de agua destilada).
- ✓ Etanol al 70 %.

### 3.2.3.- Protocolo 2.

1. Se añadieron 300  $\mu$ L de buffer de extracción a la muestra de tejido o sangre (100  $\mu$ L), se cerró el tubo de 1.5 mL y se selló la tapa de cada tubo con Parafilm®.
2. Se incubó en baño María por 1 hora a 65 °C.
3. Se maceró con un pistilo o embolo de una jeringa de 3mL. Se dio vortex por 5 segundos, se sellaron los tubos con parafilm y se colocaron nuevamente en baño maría toda la noche.
4. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL con 300  $\mu$ L de isopropanol.
5. Se mezcló y dejó a TA por 10 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos.
6. Se decantó el sobrenadante.

7. Se secó el pellet por 15-20 minutos y se resuspendió en 30  $\mu$ L de Buffer TE.

3.2.4.- Elaboración de las soluciones a utilizar durante la extracción del ADN usando el protocolo 2.

Buffer de extracción

200 mM TRIS-HCL PH 7.5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0.5 % SDS

Preparación de buffer de extracción para solución de trabajo (50 mL)

10 mL TRIS-HCL 1M

2.5 mL NaCl

2.5 mL EDTA 0.5M PH 8

2.5 mL SDS 10 %

C.B.P. 32.5 mL de H<sub>2</sub>O destilada

3.2.5.- Cuantificación y evaluación del ADN por espectrofotometría (Nanodrop®).

Para la evaluación de la cantidad y pureza del ADN se utilizó un NanoDrop™ 2000 Thermo Fisher Scientific®. El NanoDrop® se estandarizó empleando TE como solución blanco, el brazo del equipo fue limpiando antes y después de la estandarización del equipo utilizando toallitas desechables sin pelusa. Una vez resuspendido el ADN se procedió a su evaluación colocando 1  $\mu$ L de la muestra de

ADN en el NanoDrop® y se tomó lectura de la relación A260/A280 de cada muestra (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014; Falcón *et al.*, 2007).

### 3.3.- Análisis de los datos obtenidos por espectrofotometría.

Los datos obtenidos fueron evaluados por medio de estadística descriptiva, se obtuvieron las medidas de tendencia central (media  $\pm$  desviación estándar), mediana, moda, rangos máximos y mínimos, ANOVA y prueba de comparación de medias mediante el estadístico de Diferencia Mínima Significativa, utilizando el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM Corporation, Armonk, NY). Los datos obtenidos fueron comparados con datos reportados en la literatura.

### 3.4.- Evaluación del ADN empleando gel de agarosa.

Para observar la integridad del ADN se realizó una electroforesis empleando gel de agarosa al 1.5 %. Una vez elaborado el gel se llevó a cabo la electroforesis a 80 volts por 20 minutos para observar el ADN (Alejos-Velazquez *et al.*, 2014; Stellwagen, 2009).

#### 4.- RESULTADOS.

Se evaluaron un total de 50 muestras de sangre entera de perros. Las mismas muestras fueron evaluadas en ambos protocolos con la finalidad de realizar una comparación bajo las mismas condiciones. Una vez finalizados los procedimientos de extracción, las muestras fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y manejadas bajo cadena fría durante el procedimiento de evaluación de la cantidad y la calidad del ADN en el Nanodrop®. Los resultados de la cantidad de ADN promedio en cada protocolo, la relación 260/280 y 260/230 para determinar la calidad del ADN obtenido se encuentran en el Cuadro 2. Puede apreciarse que el protocolo de extracción 1 produjo una mayor cantidad de ADN en comparación con el protocolo 2. Así también las medias obtenidas de las relaciones 260/280 y 260/230 fueron numéricamente mejores para el protocolo de extracción 1.

Cuadro 2.- Evaluación de la cantidad y calidad del ADN obtenido en los protocolos evaluados.

Variables	Protocolos	n	Media	DE	IC
ADN ng/ $\mu\text{L}$	1	50	321.56	356.75	220.17- 422.94
	2	50	175.48	324.16	83.36 – 267.61
Relación 260/280	1	50	1.75	0.16	1.69 – 1.79
	2	50	1.20	0.17	1.14 – 1.24
Relación 260/230	1	50	2.14	0.42	2.02 – 2.27
	2	50	1.10	5.32	0.40 - 2.26

n= Número de muestras evaluadas. DE= Desviación estándar. IC= Intervalos de confianza.

Las tres variables evaluadas fueron sometidas a una prueba de normalidad mediante la prueba no paramétrica de Kolmogorov-Smirnov empleando el paquete estadístico SPSS. Los resultados de las tres variables presentaron un nivel de significancia menor a 0.05 (ADN  $\alpha= 0.0024$ , Relación 260/280  $\alpha= 0.0015$  y Relación 260/230  $\alpha= 0.0020$ ) por tanto, la normalidad de los datos fue constatada y se

procedió a realizar una análisis de varianza (ANOVA) de un factor. Los resultados del ANOVA pueden observarse en el Cuadro 3.

Cuadro 3.- ANOVA de la cantidad y la calidad del ADN obtenido de dos protocolos basados en la técnica de Salting-Out.

Variables	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F	$\alpha$
ADN	533425.73	1	4.59	0.03
Relación 260/280	7.56	1	264.73	0.0013
Relación 260/230	27.12	1	1.90	0.17

$\alpha$ = Nivel de significancia.

El análisis de varianza realizado muestra diferencias estadísticas entre los protocolos evaluados para las variables producción de ADN y para la relación 260/280, mientras que para la relación 260/230 no se observaron diferencias entre los protocolos.

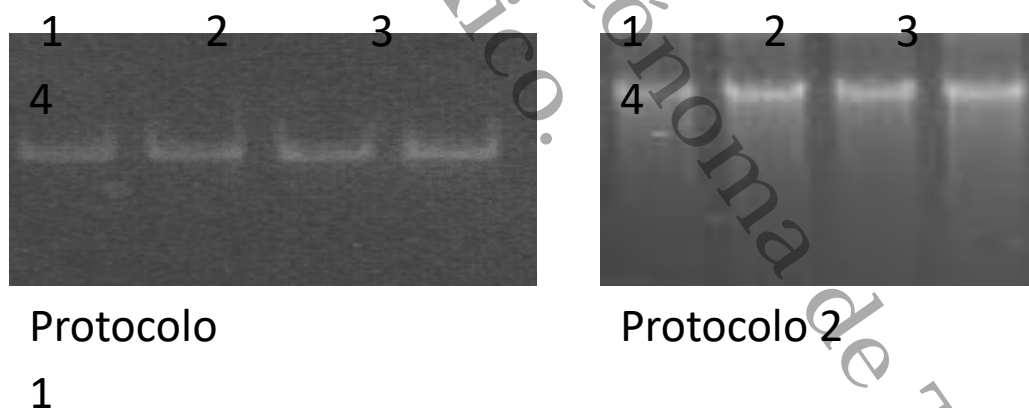


Figura 2.- Gel de agarosa al 1.5% mostrando la integridad de las bandas de ADN obtenidas de los protocolos evaluados.

Los resultados de la integridad del ADN obtenidos en ambos protocolos se observó en geles de agarosa de 1.5%. Los resultados mostraron una mayor

integridad en el protocolo 1 mientras que el protocolo 2 mostró signos de degradación en algunas muestras.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 5.- DISCUSIÓN.

Cuando se realiza la extracción de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica se busca obtener la mayor cantidad posible de ADN o ARN a partir de una muestra biológica (Falcón y Valera, 2007). Además, la técnica de extracción empleada debería ser capaz de brindar un ADN o ARN libre de impurezas (Shokrzadeh y Mohammadpour, 2018). Dentro de los principales contaminantes encontrados en una muestra de ADN recién obtenida se encuentran las proteínas y otros compuestos celulares como carbohidratos o lípidos provenientes de las membranas celulares, o bien sales o alcoholes provenientes de las soluciones de extracción (Shokrzadeh y Mohammadpour, 2018).

En los protocolos evaluados en el presente estudio puede observarse una mayor cantidad y pureza del ADN obtenido a partir del protocolo 1. En general, la cantidad de ADN obtenida en ambos protocolos fue menor a la obtenida por Samadi *et al* (2011) empleando la combinación de sales y precipitación con cloroformo y alcohol isoamílico. Sin embargo, las concentraciones promedios de las relaciones 260/280 y 260/230 fueron similares a las obtenidas en el protocolo 1 del presente estudio. Así también, los resultados obtenidos en el protocolo 1 concuerdan con lo reportado por Río-Sánchez *et al* (2016) quienes evaluaron un protocolo basado también en la técnica de Sallting-out y reportaron resultados similares en producción de ADN así como en la relación 260/280.

Las diferencias entre el protocolo 1 y 2 del presente estudio se deben a los diferentes pasos y sales empleadas. El protocolo 1 implica un poco más de tiempo durante el procesamiento de las muestras en comparación con el protocolo 2. No obstante, la diferencia entre la cantidad de ADN puede deberse a que el paso con la solución de lisis de eritrocitos en el protocolo 1 fue repetido en tres ocasiones para eliminar la mayor cantidad de hemoglobina la cual puede ser un contaminante del ADN (sin embargo esto hace un poco más laborioso el procedimiento). Así también, la adición de proteinasa K en el protocolo 1 contribuye a la degradación de proteínas capaces de contaminar el ADN que se extrae, lo cual ocasiona que la

relación 260/280 de las muestras de ADN obtenidas disminuya su valor (Strauss, 1998). Sin embargo, es posible que en condiciones en las cuales no se cuente con reactivos como proteinasa K el protocolo 2 pueda ser empleado, aunque el uso del ADN obtenido mediante este protocolo deberá ser evaluado para poder ser usado en técnicas como la PCR, principalmente para evidenciar que la calidad sea suficiente para amplificar el fragmento de ADN que se desea evaluar. En ese sentido, se han detectado límites de detección empleando PCR convencional tan bajos como 5.3 pg equivalentes a 0.0053 ng (Chandrashekhar *et al.*, 2015) por lo que la cantidad de ADN obtenida en el protocolo 2 debería ser suficiente para amplificar el fragmento de ADN deseado mediante PCR convencional.

Los protocolos evaluados son relativamente rápidos de realizarse, baratos, técnicamente sencillos en su elaboración y no emplean sustancias tóxicas o mutagénicas. Adicionalmente, se ha comprobado en diversos estudios que esta metodología es eficiente para obtener ADN capaz de ser empleado en estudios de genómica, tipificación y en estudios bioinformáticos (Suguna *et al.*, 2014; Chandrashekhar *et al.*, 2015; Río-Sánchez *et al.*, 2016).

Por otra parte, debe considerarse que los protocolos evaluados fueron estandarizados a partir de una muestra biológica pequeña (100  $\mu$ L de sangre). En general se considera que el ADN obtenido a partir del protocolo 1 posee una cantidad y calidad suficiente para realizar diversas técnicas moleculares. Además, ofrece una técnica alternativa para la obtención de ADN para detectar patógenos que afectan a perros mucho más económica que los kits de extracción de ADN comúnmente empleados en trabajos de investigación como por ejemplo, el QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen) empleado en una gran diversidad de estudios (Augustine *et al.*, 2017; Vargas-Hernández *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2019) y que tiene un costo aproximado hoy en día de 53.78 pesos mexicanos por muestra (obtenido de la página web <https://www.qiagen.com/mx/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/#orderinginformation> 22 de agosto de 2019). El costo promedio calculado por el procesamiento de cada muestra fue de 7.017 pesos mexicanos para el

protocolo 1, y 6.40 pesos mexicanos para el protocolo 2, lo cual resulta mucho menor a los 53.78 pesos mexicanos promedio invertidos cuando se emplean kits comerciales para la extracción de ADN.

Por tanto, la estandarización y evaluación de los protocolos basados en Salting-out ofrecen una alternativa promisorio para el desarrollo de técnicas moleculares, especialmente cuando se emplea sangre entera de perros para la detección de patógenos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## **6.- CONCLUSIONES.**

Los protocolos evaluados presentaron diferencias estadísticas tanto en la cantidad como en la calidad del ADN recuperado. La cantidad y calidad del ADN obtenido de muestras de sangre entera de perros mediante el uso del protocolo 1 presentó la suficiente cantidad y calidad para ser empleado en diversas técnicas moleculares. El ADN obtenido usando el protocolo 1 también mostró mayor integridad cuando se observó en gel de agarosa al 1.5 % comparado con el ADN obtenido empleando el protocolo 2. Los costos de obtención de una muestra de ADN empleando los protocolos evaluados resulta ser menores comparados con los costos de obtención de una muestra empleando kit comerciales.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 5.- LITERATURA CITADA.

- Alejos-Velazquez L, Aragón-Martínez M, Cornejo-Romero A: Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología Aspectos teóricos y prácticos. Edited by Cornejo-Romero A, Serrato-Díaz A, Rendón-Aguilar B, Rocha-Munive M. 1a ed: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), 2014. pp. 27-52.
- Augustine, S., Sabu, L., Lakshmanan, B. Molecular identification of *Babesia* spp. in naturally infected dogs of Kerala, South India. *Journal of Parasitic Diseases* 2017, 41(2):459–462.
- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K: *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing and Wiley-Interscience, 2002.
- Chandrashekhar KM, Isloor S, Veeresh BH, Hegde R, Rathnamma D, Murag S, Veeregowda BM, Upendra HA, Hegde NR. Limit of detection of genomic DNA by conventional PCR for estimating the load of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. *Folia Microbiológica*, 2015, 60(6):465-472.
- Clements DN, Wood S, Carter SD, Ollier WE: Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. *Research in veterinary science* 2008, 85:74-9.
- Falcón L, Valera A: Las herramientas moleculares. *Ecología Molecular*. Edited by Eguiarte L, Souza V, Aguirre X. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad., 2007. pp. 499-516.

- Fraga N, Rodríguez J, Fuentes O, Castex M, Fernández-Calienes 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, 56:203-7.
- Gerstein A: Nucleotides, Oligonucleotides, and Polynucleotides. *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. Edited by Gerstein A. Wiley-Liss, Inc., 2001. pp. 267-89.
- Glasel JA: Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 1995, 18:62-3.
- Golczer G, Arrivillaga J: Modificación de un protocolo estándar de extracción de ADN para flebotominos pequeños (Phlebotominae: Lutzomyia). *Revista Colombiana de Entomología* 2008, 34:199-202.
- Hänni C, Brousseau T, Laudet V, Stehelin D: Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic acids research* 1995, 23:881.
- Jiménez-Arce G, Villalobos-Quesada M, Jiménez-Montero E, Palma-Platero 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, 1:10-9.
- Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC: Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIAamp blood kit, GeneReleaser, and the phenol-chloroform method. *Journal of clinical microbiology* 1996, 34:2731-3.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH: Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* 2012:3923.

- Lima C, Colella V, Latrofa MS, Cardoso L, Otranto O, Alho AM. Molecular detection of *Leishmania* spp. in dogs and a cat from Doha, Qatar. *Parasites & Vectors* 2019, 12:125
- Miller S, Dykes D, Polesky H: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 1988, 16:1215.
- Moore D, Dowhan D: Purification and concentration of DNA from aqueous solutions. *Current protocols in molecular biology* 2002:2.1. -2.1. 10.
- Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaei MJ, Rahbarizadeh F: Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of clinical laboratory analysis* 2005, 19:229-32.
- Riera MA, Rojas ME, Zapata PD: Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología* 2010, 4-7.
- Ríos-Sánchez E, Calleros E, González-Zamora A, Rubio J, Martínez OC, Martínez A, Hernández S, Pérez-Morales R. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4):56-65.
- Samadi SS, Zununi VS, Soltanzad F, Kafil V, Barzegari A, Atashpaz S, Barar J.. Highly effective DNA extraction method from fresh, frozen, dried and clotted blood samples. *BiolImpacts* 2011, 1:(3)183–187.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: Cold spring harbor laboratory press* New York, 1989.
- Sambrook J, Russell D: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor ed, 2001.

- Shokrzadeh M, Mohammadpour A. Evaluation of a modified salt-out method for DNA extraction from whole blood lymphocytes: A simple and economical method for gene polymorphism. *Pharm Biomed Res* 2018, 4(2): 28-32.
- Somma M, Querci M: Análisis de la presencia de microorganismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Edited by Europe. WHOOf. 2010. p. 34.
- Stellwagen NC: Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* 2009, 30:S188-95.
- Strauss WM. Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue. *Current Protocols in Molecular Biology* 1998, 42: 221-223.
- Suguna S, Nandal D, Kamble S, Bharatha A, Kunukulol R: Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2014, 6:198-9.
- Thermo-Scientific: Assessment of Nucleic Acid Purity. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers. Thermo Fisher Scientific – NanoDrop Products Wilmington, Delaware USA, 2011.
- Turner P, McLennan A, Bates A, White M: *Molecular Biology*: School of Biological Sciences. University of Liverpool, Liverpool, UK., 2005.
- Vargas-Hernandez G, André MR, Cendales DM, Marquez de Sousa KC, Gonçalves LR, Hoepfner RMC, Zacarías MRA, Tinucci-Costa M. Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Rev. Bras. Parasitol.* 2016, 25( 4 ): 459-464.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P: Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 1997, 22:474-6, 8-81.

Zumbo P: Phenol-chloroform Extraction. Weill Cornell Medical College Department of Physiology & Biophysics 2012:7.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

# Evaluación de la calidad y rendimiento de ADN genómico de sangre de perros en dos protocolos basados en la técnica de "Salting Out"

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="#">dokumen.pub</a> Internet	125 palabras — 3%
2	<a href="#">www.coursehero.com</a> Internet	70 palabras — 2%
3	<a href="#">es.scribd.com</a> Internet	57 palabras — 1%
4	<a href="#">matheo.uliege.be</a> Internet	22 palabras — 1%
5	<a href="#">docplayer.es</a> Internet	20 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 20 PALABRAS