UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS CONVENCIONALES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN HUMANO A PARTIR DE HISOPADOS BUCALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del

título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: DOMÉNICA ESTEFANÍA PEÑAFIEL CARANGUI

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Doménica Estefanía Peñafiel Carangui con documento de identificación N° 0302589965, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 28 de febrero del 2023

Atentamente,

Doménica Peñafiel

Doménica Estefanía Peñafiel Carangui

0302589965

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Doménica Estefanía Peñafiel Carangui con documento de identificación N° 0302589965, expreso que mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Evaluación de dos protocolos convencionales para la extracción de ADN humano a partir de hisopados bucales”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 28 de febrero del 2023

Atentamente,

_____

Doménica Estefanía Peñafiel Carangui

0302589965

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que, bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS CONVENCIONALES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN HUMANO A PARTIR DE HISOPADOS BUCALES, realizado por Doménica Estefanía Peñafiel Carangui con documento de identificación N° 0302589965, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 28 de febrero del 2023

Atentamente,

Inés Malo

Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, PhD.

0102291044

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a mi mamá Paola por su apoyo incondicional a lo largo de este camino, por su fortaleza a pesar de las adversidades y por el amor sin límites que me ha entregado, a mi papá Cristian que siempre se mostró orgulloso de mi y nunca dudó en apoyarme y a mis abuelitos que supieron llenarme de felicidad y alegría en los días difíciles.

AGRADECIMIENTO

Quiero manifestar mi agradecimiento sincero a mis maestros por brindarme conocimientos a lo largo de mi formación académica y personal, de manera especial a la Dra. Inés Malo quien ha sido un apoyo y un ejemplo de excelencia. Agradezco al M. Sc. Edmond Geraud por su ayuda en la elaboración de este trabajo y a la Ing. Sandy Gavilanes por la paciencia y el profesionalismo entregado hacia mi persona.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
ABREVIATURAS 3
CAPÍTULO 1 4
INTRODUCCIÓN 4
1.1 Introducción 5
1.2 Planteamiento del problema 6
1.3 Justificación 6
1.4 Formulación del problema o pregunta de investigación 7
1.5 Objetivos 7
1.5.1 General 7
1.5.2 Específicos 7
1.6 Hipótesis 8
1.6.1 Hipótesis Nula 8
1.6.2 Hipótesis Alternativa 8
CAPÍTULO 2 9
FUNDAMENTOS TEÓRICOS 9
2.1 El ADN humano y diagnóstico molecular 10
2.2 Extracción de ADN 10
2.2.1 Método de extracción Fenol/Cloroformo 11
2.2.2 Método de precipitación por sales 12
2.3 Cuantificación de ADN 12
2.3.1 NanoDrop 13
2.3.2 Electroforesis 15
CAPÍTULO 3 16
MARCO METODOLÓGICO 16
3.1 Nivel de investigación 17
3.1.1 Diseño de investigación 17
3.1.2 Población y muestra 17
3.1.3 Variables 17

3.1.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos 18
3.1.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos 18
3.2 Procedimiento 18
3.2.1 Fase 1. Toma de muestras 18
3.2.2 Fase 2. Preparación de las muestras 19
3.2.3 Extracción de ADN 19
3.2.3.1 Protocolo de Fenol/Cloroformo 19
3.2.3.2 Protocolo de precipitación por sales usando acetato de sodio 20
3.2.4 Cuantificación de ADN 21
3.2.5 Cualificación de ADN 21
3.3 Análisis estadístico 22
CAPÍTULO 4 23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN 23
4.1 Extracción de ADN a partir de hisopados bucales humanos mediante Método de Fenol/Cloroformo 24
4.2 Extracción de ADN a partir de hisopados bucales humanos mediante método de precipitación por sales 24
4.3 Resultados de cuantificación de ADN extraído 24
4.4 Resultados de cualificación de ADN extraído 29
4.5 Análisis estadístico de la concentración de ADN 31
CAPÍTULO 5 38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 38
5.1 Conclusiones 39
5.2 Recomendaciones 40
Referencias: 41
ANEXOS 46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 14

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN. Fuente: (Programa de control de calidad de Ácidos Nucleicos. Banco Nacional De ADN Carlos III," 2020) 14

Tabla 2 25

Cuantificación de ADN mediante Nanodrop 2000 25

Tabla 3 27

Datos de pureza obtenidos con el Protocolo 1 27

Tabla 4 28

Datos de pureza obtenidos con el Protocolo 2 28

Tabla 5 31

Criterios de validez de integridad observada en gel de agarosa. Fuente: (Programa de Control de Calidad de Ácidos Nucleicos. Banco Nacional De ADN Carlos III," 2020) 31

Tabla 6 37

Datos de prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 30
Electroforesis con muestras de ADN extraídas con el Protocolo 1. 30
Figura 2 32
Comparación de la distribución de los datos de concentración del ADN extraído. 32
Figura 3 33
Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de concentración. 33
Figura 4 34
Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de contaminación proteica... 34
Figura 5 35
Comparación de la distribución de los datos de contaminación por carbohidratos del ADN extraído. 35
Figura 6 36
Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de contaminación por carbohidratos 36
Figura 7 47
Ejecución de los protocolos de extracción de ADN 47
Figura 8 47
Condiciones para la electroforesis 47
Figura 9 48
Preparación de las muestras para la electroforesis 48
Figura 10 48
Electroforesis de las muestras 48

RESUMEN

La extracción de ADN se ha realizado por distintas técnicas y protocolos que van desde métodos convencionales hasta kits comerciales, sin embargo, la realización de pruebas con kits representa altos costos y buscar un método eficaz que permita obtener muestras viables para diagnóstico molecular es primordial. Por esta razón en este trabajo se evaluaron dos protocolos convencionales para extraer ADN de muestras no invasivas a través de un hisopado bucal. Se compararon los resultados de extracción con el Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) y Protocolo 2 (Precipitación por sales) siendo el Protocolo 1 el que más cantidad de ADN permite extraer y Protocolo 2 más calidad en el ADN de las muestras analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

Palabras claves: extracción, ADN, hisopados, cuantificación, cualificación

ABSTRACT

DNA extraction has been performed by different techniques and protocols ranging from conventional methods to commercial kits, however, testing with kits represents high costs and finding an effective method to obtain viable samples for molecular diagnosis is essential. For this reason, two conventional protocols for extracting DNA from non-invasive samples through buccal swabbing were evaluated. The extraction results were compared with Protocol 1 (Phenol/Chloroform) and Protocol 2 (Salt precipitation), with Protocol 1 extracting the highest quantity of DNA and Protocol 2 the highest quality DNA from the samples analysed by 0.7% agarose gel electrophoresis.

Key words: extraction, DNA, swabbing, quantification, qualification

ABREVIATURAS

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

TE: Tris EDTA

SDS: Dodecilsulfato sódico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Para la extracción de ADN se aplican ciertos protocolos que permiten obtener una muestra de ADN genómico de células que poseen núcleo, con alta integridad y pureza libre de contaminantes para usarla en la secuenciación de genes (Dietz et al., 2012). El ADN se extrae de las células humanas para diferentes fines, al tener una muestra pura de ADN se puede detectar enfermedades genéticas en un recién nacido, analizar muestras forenses o un gen específico (Dietz et al., 2012).

En el campo de la biología molecular el análisis de muestras de saliva como un método no invasivo, se ha convertido en una herramienta eficaz por la gran cantidad de información biológica que posee (Madera y Suárez, 2017). Este fluido contiene agua, electrolitos, proteínas, microorganismos y material genético, tanto ácido desoxirribonucleico (ADN) como ácido ribonucleico (ARN) (Dietz et al., 2012). Así mismo el proceso de descamación del epitelio de la cavidad bucal es también una fuente de ADN (Pfaffe et al., 2011). Además, se menciona que el aislamiento a partir de hisopos bucales presenta ciertas ventajas, entre las cuales se destacan la rentabilidad, menores volúmenes de muestra y conveniencia de auto recolección aparte de ser menos invasivo.

La aplicación de kits comerciales para la extracción representa elevados costos y poca disponibilidad en laboratorios de pequeña escala, por otro lado, los protocolos convencionales utilizan solventes orgánicos para la separación de proteínas y lípidos para una posterior precipitación con etanol, representado costos más bajos (Tarqui et al., 2019). Es esencial optimizar condiciones para maximizar el rendimiento y la pureza del ADN extraído por cualquier método.

1.2 Planteamiento del problema

Los avances biotecnológicos dentro de la biología molecular en el campo de la medicina han sido de gran relevancia para la prevención y diagnóstico de enfermedades, sin embargo, la mayoría de las pruebas se realizan a partir de una toma de muestra invasiva e incómoda ya que usan sangre para el análisis. Por otro lado, los costos de los métodos de extracción convencionales son menores respecto a los kits comerciales aplicados para análisis moleculares de muestras humanas. La biotecnología dentro de nuestro país es muy limitada y por eso busca reducir costos, aprovechar los recursos que se tiene y generar nuevos procesos en laboratorio para estandarizarlos.

1.3 Justificación

Las técnicas moleculares para la extracción de ADN humano se han mejorado considerablemente en los últimos años, estas incluyen el uso de kits comerciales y protocolos convenciones los cuales son más económicos (Angarita et al., 2017).

La cantidad de ADN extraído depende del tipo de muestra del que se parta y la saliva es una excelente fuente de información biológica (Pérez, 2017). Se desconocen los factores que influyen en cantidad y la pureza del ADN que se extrae a partir de hisopados bucal pero el conocimiento de estos es importante para mejorar el rendimiento de este (Van Wieren et al., 2009).

Las ventajas del uso de hisopados bucales, recae principalmente en el procesamiento rentable, una menor necesidad de volumen de la muestra a analizar y provee suficiente ADN para realizar pruebas PCR. También es conveniente por la comodidad del paciente asegurando una mejor toma de muestra (Steinberg et al., 2002).

Es por esta razón que la presente investigación se enfoca en la evaluación de dos protocolos convencionales para extraer ADN a partir de hisopados bucales y determinar cuál es el óptimo.

1.4 Formulación del problema o pregunta de investigación

¿Existen diferencias significativas en la cantidad y calidad de ADN extraído comparando los dos protocolos convencionales de extracción de ADN a partir de hisopados bucales?

1.5 Objetivos

1.5.1 General

- Evaluar la eficiencia de dos métodos de extracción de ADN a partir de hisopados bucales humanos obteniendo información sobre cantidad y calidad del ADN extraído.

1.5.2 Específicos

- Evaluar los dos protocolos convencionales mediante análisis del ADN extraído, identificando la eficiencia de estos.
- Analizar el ADN extraído mediante pruebas de laboratorio, validando su aptitud de uso para pruebas moleculares.
- Comparar con métodos estadísticos los resultados obtenidos con los dos métodos convencionales para futuras aplicaciones.

1.6 Hipótesis

1.6.1 Hipótesis Nula

Los dos protocolos convencionales de extracción de ADN a partir de hisopados bucales, no evidencian diferencias significativas en cuanto a la cantidad y calidad de ADN extraído.

1.6.2 Hipótesis Alternativa

Los dos protocolos convencionales de extracción de ADN a partir de hisopados bucales, evidencian diferencias significativas en cuanto a la cantidad y calidad de ADN extraído.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 El ADN humano y diagnóstico molecular

El código genético de los humanos está escrito en la molécula de ADN y tiene cuatro funciones principales que lo caracteriza: tiene el modelo para fabricar proteínas y enzimas, puede regular cuando se fabrican, cuando las células se dividen transporta la información y la transmite de sus progenitores (Carey, 2003).

El proyecto más importante se ha dedicado al genoma humano, desde los años 70 se han obtenido secuencias de tramos más largos cada vez y al conocer la secuencia se pueden identificar los genes que contiene y estudiar las actividades de estos (Brown, 2002). Las variaciones en la expresión del ADN pueden transmitirse a la descendencia afectando a óvulos, espermatozoides y células somáticas aunque estos últimos no se hereden; esto puede provocar mutaciones que provocan daños en la célula y organismo causando diversas patogenesias (Silva et al., 2019).

2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN es el proceso mediante el cual se obtiene ADN genómico de células nucleadas, limpiándolo de contaminantes y protegiendo su integridad; para usarlo posteriormente con estrategias aplicadas en estudios moleculares (Cruz et al., 2021).

El proceso de extracción de ADN comprende cinco pasos básicos que son consistentes en las químicas de purificación de ADN posibles: 1) disrupción de la estructura celular creando un lisado, 2) separación del ADN soluble de otros materiales insolubles, 3) unión del ADN a una matriz de purificación, 4) lavado de proteínas y contaminantes y 5) elución del ADN (Mandrekar, 2016).

La extracción de ADN se puede realizar a partir de distintos protocolos, sin embargo, sobresale la extracción orgánica y los kits comerciales. La elección del método depende de ciertos factores como son: tipo y cantidad de muestra, pureza, estudios posteriores, etc. (Fraga et al., 2004). También debe considerarse que la calidad, cantidad e integridad del ADN afecta directamente a los resultados experimentales.

2.2.1 Método de extracción Fenol/Cloroformo

Las soluciones de ácidos nucleicos contienen contaminantes indeseables, principalmente proteínas, que deben ser purificados en la extracción; un método clásico para esto es la extracción con fenol-cloroformo. El principio de este método es usar la separación de ADN, ARN y proteínas tomando en cuenta la solubilidad diferencial de estas moléculas en diferentes líquidos inmiscibles (Gautam, 2022).

Mediante este método se extrae el ácido nucleico lavando con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 21) y cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1); posteriormente se centrifuga y la fase acuosa se transfiere a otro tubo. Los contaminantes se acumulan en la fase orgánica o en la interfase y al usar proteinasa K también se eliminan las proteínas (Ambika, 2018).

Es importante mencionar que durante el proceso se genera una emulsificación que debe eliminarse primero, este método se ha usado por los científicos desde hace años y es muy preciso, reproducible y práctico, aunque es manual y peligroso (Chauhan, 2018).

2.2.2 Método de precipitación por sales

Las soluciones de acetato de sodio han sido usadas como tampón en intervalo de pH 3,6-5,6, también en la purificación y precipitación de ácidos nucleicos e incluso en investigaciones del desdoblamiento de proteínas durante cromatografía (MP BIOMEDICALS, 2016).

El principio de la extracción consiste en usar un detergente aniónico para generar una lisis celular, este detergente es capaz de inhibir la acción de las nucleasas intracelulares y también solubiliza los componentes celulares. Posterior a eso, mediante precipitación salina las proteínas se desnaturalizan y se eliminan. Para que el ADN se precipite se usa isopropanol y etanol para lavarlo antes de la resuspensión en el tampón estabilizante (ISCIII, 2011).

2.3 Cuantificación de ADN

La medición confiable de la concentración de ADN es uno de los pasos más importantes para algunas de las aplicaciones en biología molecular, principalmente se usan la espectrofotometría y la fluorometría para medir la concentración de ADN genómico y plasmídico. La espectrofotometría mide cantidades de microgramos de muestras de ADN puro, por otro lado, la fluorometría permite medir cantidades de nanogramos de ADN (Nicklas y Buel, 2003). También se usan métodos basados en gel, tinciones, técnicas de secado y la amplificación del ADN.

En los últimos 50 años los métodos de cuantificación del ADN han cambiado, los científicos han aprovechado la complejidad del ADN en cuanto a características como su doble hélice de cadenas de polinucleótidos y sus bases apiladas que forman dos ranuras, para desarrollar nuevos métodos que determinen la cantidad de ADN que contiene una muestra (DNA Advisory Board, 2000).

2.3.1 NanoDrop

Según Thermo Fisher Scientific - NL (2018) el NanoDrop utiliza algoritmos avanzados para identificar contaminantes comunes, como la contaminación por ARN en dsADN; y proporcionar concentraciones corregidas de ácidos nucleicos aplicando automáticamente el factor para la cuantificación.

Este espectrofotómetro es capaz de medir concentraciones entre 2 y 27500 ng/µL de dsADN utilizando tan solo 1 ó 2 µL de muestra, al tener un alto rango elimina la necesidad de realizar diluciones. También es un instrumento que mide con precisión, muestras de dsADN tan diluídas como 3 ng/µL y tan concentradas como 28000 ng/µL (Thermo Scientific, 2015).

Existen ciertos parámetros que analizan, uno de ellos es la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm que permite evaluar la pureza del ADN y el ARN. Para el ADN una relación de 1,8 se acepta generalmente como “pura”, si la relación es inferior puede indicar presencia de fenol, proteínas u otros contaminantes (Aguilar et at., 2016).

Tabla 1

Valores indicativos de pureza en muestras de ADN. Fuente: (Programa de control de calidad de Ácidos Nucleicos. Banco Nacional De ADN Carlos III," 2020)

Técnica de análisis	Análisis	Parámetros	Criterios de validez
Espectrofotometría	A260/280	Pureza	1,8-2,1 = Pureza óptima
			1,6-1,7 = Pureza aceptable
			Menor a 1,6 = ADN contaminado con compuestos aromáticos
			Menor a 2,1 = ADN contaminado con ARN
	A260/230	Pureza	2-2,2 = Pureza óptima
			1,8 = Pureza aceptable
			Menor a 1,8 = ADN contaminado con sales, fenol, carbohidratos
			Menor a 1,5 = ADN altamente contaminado con sales, fenol, carbohidratos

2.3.2 Electroforesis

La electroforesis es el mejor método para separar fragmentos de ADN que van desde 100 pb hasta 25 kb, se realiza en agarosa que se aísla de las algas Gelidium y Gracilaria y contiene subunidades repetidas de agarobiosa (Kirkpatrick, 1991). Al gelificar, los polímeros de agarosa forman una red cuyo tamaño de poro determina las características del tamizado molecular del gel.

Para la separación de los fragmentos, se carga el ADN en pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente, los fosfatos están cargados negativamente y al colocar en el campo eléctrico, los fragmentos de ADN migran al ánodo con carga positiva y se separan por tamaño, siendo la distancia recorrida inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (Yun Lee et al., 2012).

Las moléculas de ADN generalmente se tiñen usando bromuro de etidio, molécula que se une al ADN de doble cadena y al exponerse a luz UV muestra una fluorescencia pudiendo visualizar la posición y cantidad de los fragmentos (Amón y Ortega, 2022). Como alternativa se ha usado el tinte Syber siendo más seguro y que al teñirse es muy sensible al visualizar en geles de agarosa o acrilamida (Invitrogen, 2016).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Nivel de investigación

Al evaluar dos protocolos de extracción y analizar los resultados en calidad y cantidad, se cumple con una investigación de tipo experimental abordando los ejes cuantitativo y cualitativo.

3.1.1 Diseño de investigación

El diseño de investigación es de tipo experimental debido a que las muestras de hisopados bucales fueron sometidas a dos protocolos convencionales de extracción de ADN, analizando los resultados y comparándolos estadísticamente.

3.1.2 Población y muestra

Se eligió una población de 30 individuos sanos con edades comprendidas entre 19 y 39 años. La toma de muestras se realizó con un hisopo a cada persona, obteniendo una muestra madre, a partir de la misma, se obtuvieron dos muestras con la cantidad necesaria para realizar cada protocolo de extracción.

3.1.3 Variables

Las variables independientes son los dos protocolos convencionales para extraer ADN y las variables dependientes son las muestras de hisopado bucal. Entre las variables intervinientes está el ambiente del laboratorio, calidad de reactivos, entre otros.

3.1.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizaron diversos instrumentos para recopilar datos, entre estos se mencionan: libros, tesis, artículos científicos, publicaciones en revistas de bajo y alto impacto, manuales de uso de equipos, entre otros.

3.1.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Se emplearon gráficos y tablas para la interpretación de los resultados al momento de procesar los datos, Los datos estadísticos serán analizados con el software estadístico libre R. Los resultados de la variable dependiente se presentarán como medianas.

3.2 Procedimiento

3.2.1 Fase 1. Toma de muestras

Previo a la toma de muestras se pidió a cada uno de los participantes que se enjuaguen la boca por 30 segundos para evitar contaminación por restos de comida, posterior a eso, se rotó el hisopo durante 15 segundos en la lengua y 15 segundos en la mucosa yugal para recolectar mayor cantidad de muestra.

Las muestras de hisopados bucales se obtuvieron usando hisopos fabricados con fibras de nylon flocado con una superficie uniforme y densa de fibras, permitiendo una mejor adsorción de la muestra de saliva (Dikysa, 2022). Se rompió el punto de quiebre de cada hisopo y cada uno se almacenó en tubos cónicos de polipropileno

con tapa articulada (Eppendorf SE, 2019), los mismos que contenían 1200 µl de la solución de lisis previamente preparada.

3.2.2 Fase 2. Preparación de las muestras

Los hisopos que contenían la muestra, se colocaron en tubos cónicos que contenían 1200 µl de buffer de lisis descrito por Collins y colaboradores (1987) que se preparó con SDS 0,5%, Sucrosa 0,1 M, NaCl 0.1 M, Tris 0,1 M, EDTA 0,05 M y NaCl 0,1 M; finalmente se ajustó el pH de la solución a 8,6.

Después de colocar los hisopos en cada tubo, se agregaron 50 µl de SDS 10% para romper las membranas biológicas y purificar ácidos nucleicos (Farrell, 2010), y 10 µl de proteinasa K para degradar proteínas (Checa, 2017). Se llevaron a incubar en baño seco durante 2 horas a 56 °C.

3.2.3 Extracción de ADN

3.2.3.1 Protocolo de Fenol/Cloroformo

El protocolo planteado por Ghatak y colaboradores (2013), en su artículo “A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis”, consiste en colocar en un tubo nuevo 500 µl de la muestra incubada y agregar un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclarlos suavemente invirtiendo los tubos durante 3 minutos y centrifugar durante 10 minutos a 10 000 g. Se transfiere la capa acuosa superior a un tubo esterilizado y se añade 10 µl de RNasa A para posterior a eso, incubar en baño seco a 37 °C durante 30

minutos. Después de la incubación se añaden volúmenes iguales de solución de cloroformo:alcohol isoamílico y se centrifugan de nuevo a 10 000 g durante 10 min. 1. Luego la capa acuosa superior se transfiere a un tubo de microcentrífuga esterilizado, y se añade el doble de volumen de isopropanol refrigerado junto con un décimo de volumen de acetato de sodio 3M, y se refrigera a -20°C durante 1 hora para la precipitación. Transcurrida una hora de precipitación , se centrifuga a 10 000 g durante 10 minutos y se decanta el sobrenadante; se añade 250 µl de etanol al 70% y se disolvió el pellet; la mezcla se centrifuga a 10 000 g durante 10 min y el sobrenadante se decanta suavemente. Se seca el pellet y se resuspende en 50 µl de tampón TE. Las muestras se almacenan a -20°C para su conservación.

3.2.3.2 Protocolo de precipitación por sales usando acetato de sodio

El método usado para muestras de saliva es el que se menciona en el "Protocolo de extracción de ácidos nucleicos" (ISCIII, 2011) y consiste en tomar 500 µl de la muestra previamente incubada y añadir 10 µl RNasa con una incubación a 37 °C durante 40 minutos. Después se añade 100 µl de una solución de Acetato de sodio 3M para precipitar las proteínas del citoplasma y núcleo, se agita durante 20-30 segundos con el vórtex para posteriormente llevarlas a centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo con isopropanol y se mezcla invirtiendo 50 veces aproximadamente para centrifugar la muestra quedando el ADN en el fondo. Se decanta el sobrenadante y se añade etanol al 70%, se centrifuga durante 10 minutos a 10 000 g, se elimina el sobrenadante y se seca el pellet. Finalmente, se resuspende con 50 µl de tampón TE y se almacenan las muestras a -20 °C para conservarlas.

3.2.4 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN extraído por los dos protocolos se realizó mediante el instrumento espectrofotométrico NanoDrop 2000 usando la línea de calibración de ADN que contenía el equipo (O'Neill, 2011). Se tomó 1 µl del tampón TE, que fue la solución de resuspensión del ADN, se analizó y se generó el control para las muestras. Para el análisis las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se tomó 1 µl de cada una analizando la concentración de ácidos nucleídos a 260 nm y su pureza usando la relación 260/280.

3.2.5 Cualificación de ADN

Para evaluar la integridad del ADN obtenido por cada protocolo, se siguió la metodología descrita por EDVOTEK (2021). Se elaboró un gel de agarosa al 0,7 %, primero se partió de una solución TAE 50X y se redisolvió para obtener una solución TAE 1X. Se tomó 50 ml de la solución TAE 1X, se agregó 0,35 g de Agarosa y se calentó en el microondas en tres rondas de 30 segundos hasta que no se observen grumos. Se dejó enfriar y se añadió 1 µl de tinte de gel SYBR Safe para verter el gel en la bandeja sellada por los extremos y que contenía el peine que forma los pocillos, se solidificó por completo en 20 minutos y se retiró el peine con cuidado.

La electroforesis se realizó llevando el gel a la cámara de electroforesis y se llenó con TAE 1X hasta cubrir los pocillos. Se tomó 1 µl del tampón de carga BlueJuice y se mezcló con 9 µl de muestra para colocar en el pocillo. Se dejó correr el gel durante 15 minutos a 110 V, 3 A y 300 W, se evidenció la migración de las muestras.

Para analizar el gel, se colocó en la base de luz azul del equipo Invitrogen E-Gel Imager para generar la imagen y poder visualizar las bandas producidas por el ADN.

3.3 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad para evaluar similitud entre medianas y analizar el tipo de distribución para aceptar rechazar las hipótesis.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN a partir de hisopados bucales humanos mediante Método de Fenol/Cloroformo

Se realiza la extracción de ADN a partir del hisopado bucal, tomado con hisopos de fibras de nylon, aplicando el método de Fenol/Cloroformo específico para hisopados propuesto por Ghatak y colaboradores (2013), obteniendo 30 muestras viables para la cuantificación y cualificación.

4.2 Extracción de ADN a partir de hisopados bucales humanos mediante método de precipitación por sales

Se realiza la extracción de ADN a partir del hisopado bucal, tomado con hisopos de fibras de nylon, aplicando el método precipitación por sales específico para muestras salivales propuesto por el ISCIII (2011), obteniendo 30 muestras viables para la cuantificación y cualificación.

4.3 Resultados de cuantificación de ADN extraído

Los datos de concentración de ADN que se obtuvieron después de procesar las 60 muestras en el Nanodrop se muestran en la tabla 2. Los resultados se expresan en promedio de las 30 muestras extraídas por el Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) y las 30 muestras extraídas por el Protocolo 2 (Precipitación por sales). La concentración promedio obtenida por el Protocolo 1 fue 281,73 g/µl siendo mayor a la concentración promedio obtenida por el Protocolo 2 que fue de 26,01 ng/µl. Estos datos permiten determinar que el Protocolo 1 hace posible una extracción de una cantidad mayor de ácidos nucleicos.

Tabla 2

Cuantificación de ADN mediante Nanodrop 2000

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE ADN PROTOCOLO 1	CONCENTRACIÓN DE ADN PROTOCOLO 2
1	56,5 ng/µl	15 ng/µl
2	82,2 ng/µl	27,2 ng/µl
3	107,4 ng/µl	12,1 ng/µl
4	259,5 ng/µl	19,6 ng/µl
5	78,4 ng/µl	13,2 ng/µl
6	65,3 ng/µl	5,1 ng/µl
7	1381,4 ng/µl	23 ng/µl
8	1382,1 ng/µl	88,6 ng/µl
9	1713 ng/µl	27,5 ng/µl
10	1304,5 ng/µl	69,8 ng/µl
11	186,7 ng/µl	23,2 ng/µl
12	150,4 ng/µl	18,3 ng/µl
13	116,1 ng/µl	6,5 ng/µl
14	75,4 ng/µl	3 ng/µl
15	109,8 ng/µl	28,4 ng/µl
16	132,3 ng/µl	10,3 ng/µl
17	24,5 ng/µl	36,3 ng/µl
18	67,4 ng/µl	17,9 ng/µl
19	50,2 ng/µl	6,5 ng/µl
20	37,1 ng/µl	7,8 ng/µl
21	129 ng/µl	14,2 ng/µl
22	104,9 ng/µl	14,6 ng/µl
23	46,4 ng/µl	3,9 ng/µl
24	43,1 ng/µl	85,5 ng/µl
25	81,1 ng/µl	19,8 ng/µl
26	80,8 ng/µl	64,2 ng/µl
27	64,1 ng/µl	72 ng/µl
28	174,5 ng/µl	11 ng/µl
29	69,4 ng/µl	25,3 ng/µl
30	278,5 ng/µl	10,5 ng/µl
PROMEDIO	281,7333333 ng/µl	26,01 ng/µl

Para evaluar la pureza del ADN extraído se tomaron los datos de las relaciones de absorbancia A260/280 y A260/230, considerando que para la relación A260/280 la pureza óptima debería tener un valor entre 1,8-2,0; una pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 es indicador de contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas (Jones, 2019).

En la relación A230/260 se considera un ADN puro cuando el valor se sitúa en torno 1,8-2,2; un valor menor a 1,8 demuestra la evidencia de contaminantes y un ratio < 1.5 indica una impureza relevante que puede comprometer la funcionalidad de la muestra (Jones, 2019).

En la tabla 3 y 4 se observan los resultados de pureza obtenidos en las 30 muestras de ADN obtenidas por los distintos protocolos mencionados.

Tabla 3

Datos de pureza obtenidos con el Protocolo 1

MUESTRA	260/280	230/260
1	1,47	1,02
2	1,65	1,35
3	1,46	1,22
4	1,77	2,01
5	1,44	1,13
6	1,59	1,15
7	1,83	1,57
8	1,75	1,61
9	1,81	1,78
10	1,68	1,68
11	1,53	1,5
12	1,57	1,83
13	1,64	1,48
14	1,55	1,55
15	1,69	1,48
16	1,52	1,48
17	1,23	1,36
18	1,71	1,91
19	1,51	1,59
20	1,45	1,96
21	1,54	1,57
22	1,68	1,68
23	1,49	1,47
24	1,45	1,4
25	1,62	1,45
26	1,57	1,16
27	1,47	1,09
28	1,84	1,89
29	1,81	2,05
30	1,73	1,89
PROMEDIO	1,601666667	1,543666667

Tabla 4

Datos de pureza obtenidos con el Protocolo 2

MUESTRA	260/280	230/260
1	1,4	1,89
2	1,39	0,86
3	1,47	1,98
4	1,98	2,11
5	1,4	1,55
6	1,71	1,9
7	1,45	1,51
8	1,45	1,35
9	1,49	2,15
10	1,52	1,96
11	1,68	1,55
12	1,68	1,99
13	1,86	1,82
14	2,09	1,85
15	1,53	1,15
16	1,62	0,47
17	2,07	1,37
18	1,47	0,66
19	2,09	1,82
20	1,78	0,68
21	1,88	1,91
22	1,88	1,79
23	1,79	1,54
24	1,46	0,61
25	1,7	1,68
26	2,02	1,93
27	1,84	1,79
28	2,01	2,12
29	2,01	1,83
30	1,81	1,84
PROMEDIO	1,717666667	1,588666667

El Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) permitió obtener un promedio de 1,6016 [A260/A280], mientras que el Protocolo 2 (Precipitación por sales) mostró un promedio de 1,7176 en la misma relación. Para la relación [A230/A260] se obtuvo un valor promedio de 1,5436 para el Protocolo 1 y un valor promedio de 1,5886 para el

Protocolo 2, lo que da a entender que las muestras obtenidas por el Protocolo 2 están menos contaminadas.

El Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) permitió alcanzar una buena concentración promedio de ADN, sin embargo, la calidad de este es menor a la calidad obtenida con las muestras del Protocolo 2 (Precipitación por sales) a pesar de que la cantidad de ácido nucleico es menor en este. El análisis recae principalmente en que el Protocolo 1 muestra una contaminación que se debe considerar, sin embargo, es contaminación por compuestos aromáticos y podría corregirse para obtener mejores resultados.

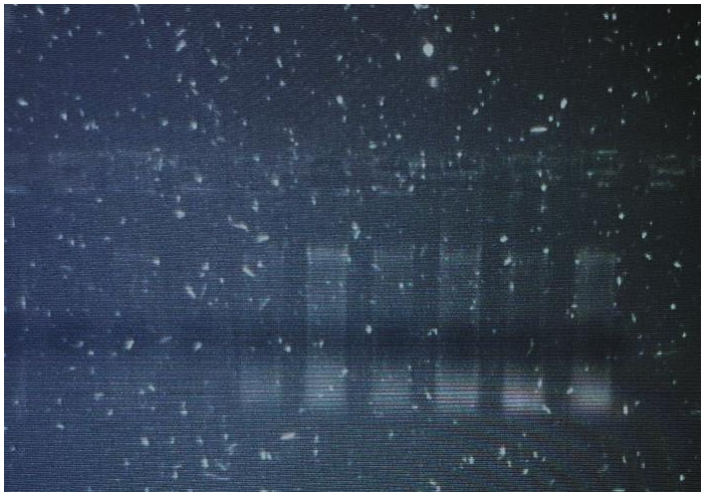
4.4 Resultados de cualificación de ADN extraído

La calidad de ADN extraído a partir de las muestras de hisopados bucales, se evaluó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. Al tener una evidente diferencia de cantidad de ADN extraído, las bandas que se marcan al procesar las muestras del Protocolo 1 son visibles, mientras que para el Protocolo 2 la visibilidad es nula en la mayoría de los casos.

En la figura 2 se observan el ADN genómico de las muestras de extracción por el Protocolo 1, las mismas que evidenciaron una mayor tinción en bandas de alrededor de 600 pb que concuerdan con una concentración de agarosa al 0,7% y un *smear* claramente visible.

Figura 1

Electroforesis con muestras de ADN extraídas con el Protocolo 1.



Nota. La figura muestra la electroforesis realizada a las muestras del Protocolo 1, se evidencian bandas. Fuente: Autora

Las muestras de extracción obtenidas con el Protocolo 2 (Precipitación por sales), no presentan un *smear* o degradación del ADN a comparación de las muestras del Protocolo (Fenol/Cloroformo) que si se observa la degradación del ácido nucleico.

El ADN extraído con el Protocolo 1 fue viable para realizar la electroforesis por la cantidad de ácidos nucleicos que contenía, por otro lado, las muestras del Protocolo 2 no contenían la cantidad suficiente de ADN para que puedan mostrar una tinción al observarlas en el Gel Imaging.

4.4.1. Análisis de la integridad del ADN observado en el gel de agarosa

Los criterios para el análisis de la integridad se fundamentaron en la metodología planteada en el Programa de Control de Calidad de Ácidos Nucleicos (2020) y se detallan en la tabla 5. Al analizar la puntuación se obtiene un valor de 2

por la presencia del *smear*, por lo tanto, las muestras analizadas tienen una integridad adecuada de acuerdo a ls criterios de validez que se han propuesto para el análisis.

Tabla 5

Criterios de validez de integridad observada en gel de agarosa. Fuente: (Programa de Control de Calidad de Ácidos Nucleicos. Banco Nacional De ADN Carlos III," 2020)

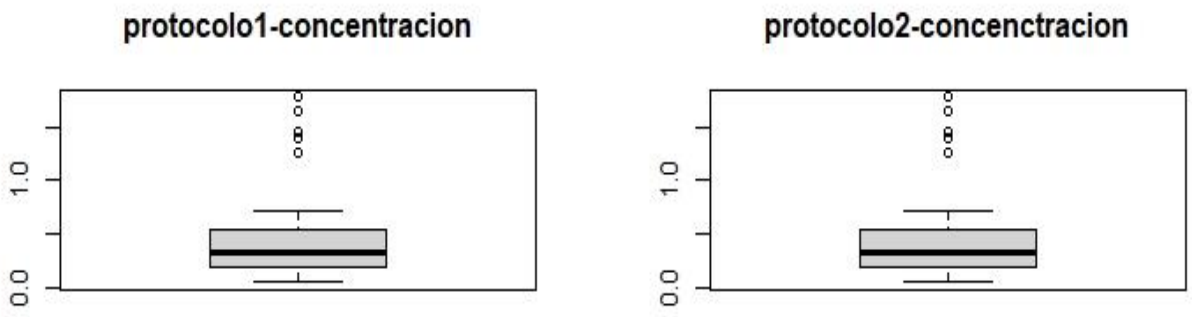
Técnica	***Parámetro***	***Criterios para la validez***	***Puntuación***
Electroforesis en Agarosa al 0,7%	Integridad del Ácido nucleico	**Integridad alta:** banda definida en la parte superior del gel	3
		Integridad adecuada: presencia de la banda superior y de un ligero *smear*	2
		Parcialmente degradado: ausencia de banda definida y presencia de *smear* concentrado en la parte superior del gel	1
		Totalmente degradado: *smear* concentrado en la parte inferior	0

4.5 Análisis estadístico de la concentración de ADN

Se realizaron pruebas para determinar si la distribución de los datos era normal en cada uno de los protocolos, se analizaron los datos de concentración de ADN extraído para el Protocolo 1 y Protocolo 2 y la gráfica generada se muestra en la Figura 2.

Figura 2

Comparación de la distribución de los datos de concentración del ADN extraído.



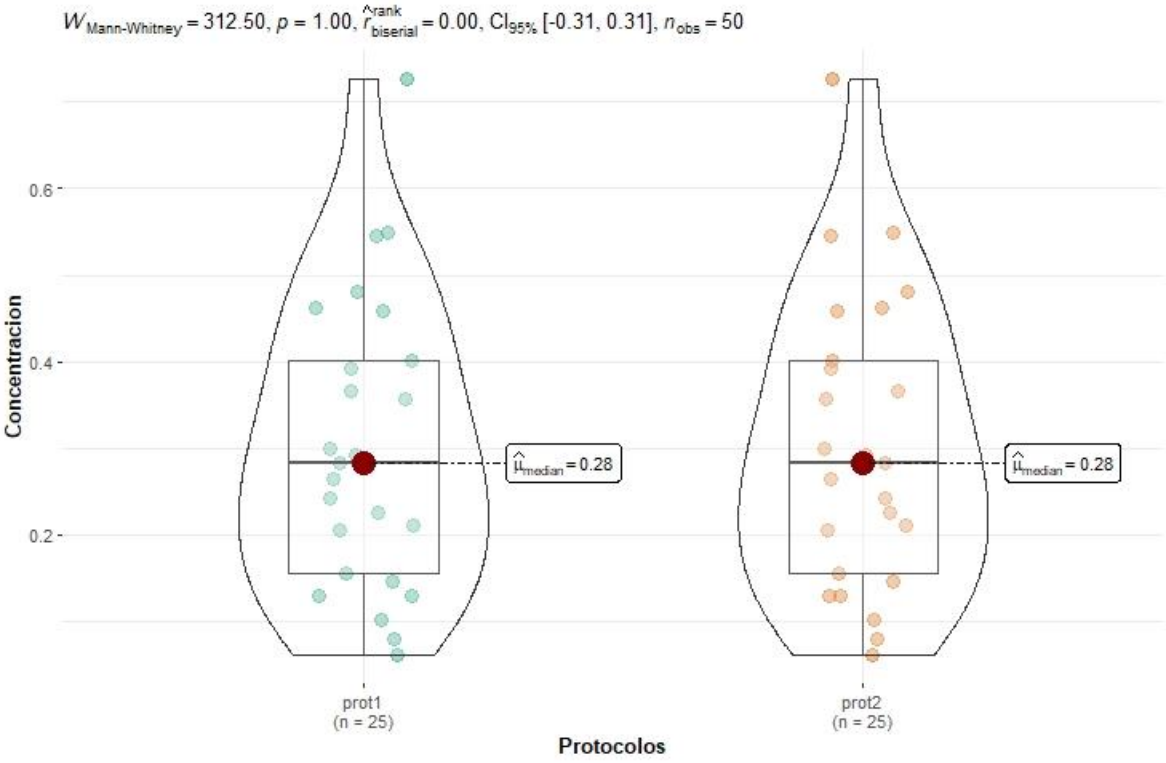
Nota. En la figura se muestra los gráficos de cajas de cada protocolo. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio.

El gráfico permite interpretar que se tiene una distribución normal al analizar las medianas representadas por las líneas en el centro de la caja, sin embargo, en los dos protocolos se muestran valores atípicos que podrían interferir con otros análisis estadísticos por lo que fueron extraídos del conjunto de datos.

Los datos que se han registrado no cumplieron las condiciones para realizar una prueba paramétrica por lo que se aplicó la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon como alternativa a la prueba t de muestras independientes y permitió comparar dos medias muestrales. El gráfico se muestra en la Figura 3 a continuación.

Figura 3

Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de concentración.



Nota. En la figura se muestran los diagramas de violín de la concentración de cada protocolo.

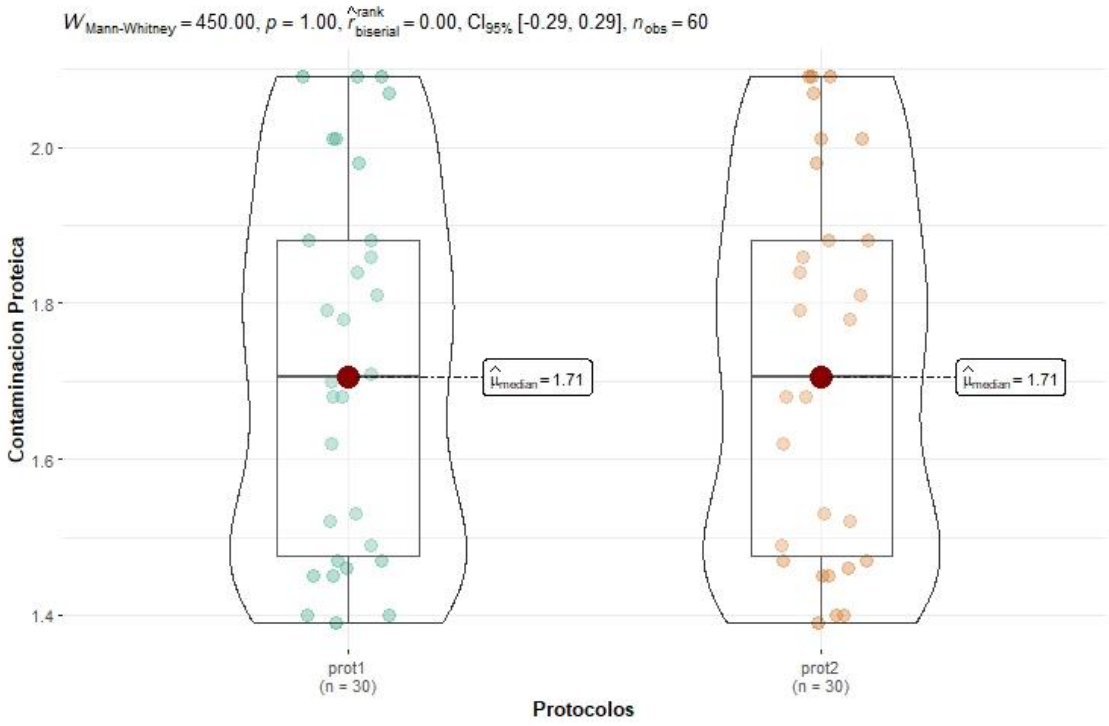
Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio.

El valor p = 1.00 y es mayor al nivel de significancia de α = 0,05 por lo que se comprueba que la diferencia entre las medianas no es significativa y por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula.

Para los datos de contaminación proteica se aplicó la misma prueba y se obtuvieron las gráficas que se muestran en la Figura 4. Las medianas al comparar los datos de contaminación proteica y al tener un valor p = 1.00, son iguales por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula.

Figura 4

Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de contaminación proteica.

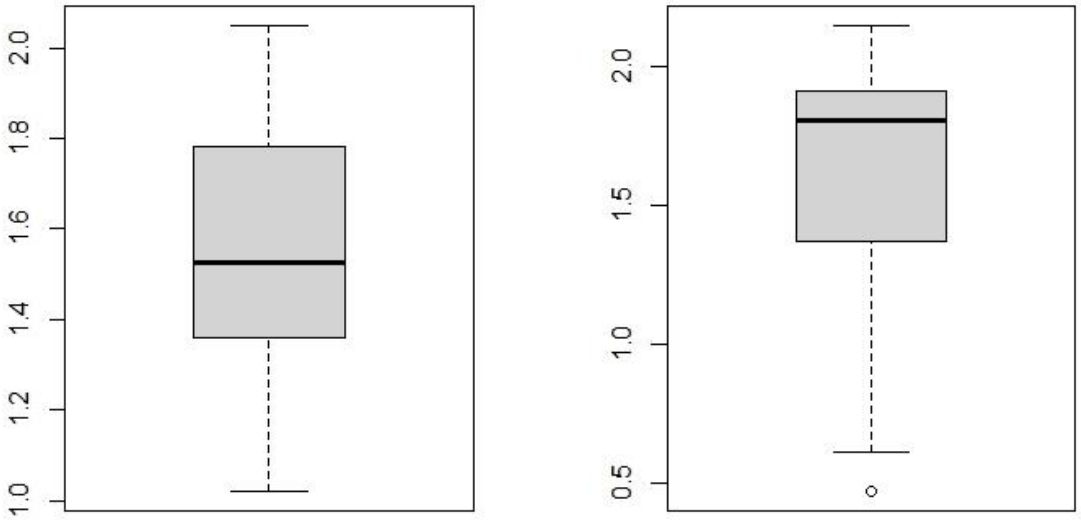


Nota. La figura muestra el diagrama de violín de la contaminación proteica de cada protocolo. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio.

Los datos de contaminación proteica que se obtuvieron al analizar las muestras por los dos protocolos, se analizaron mediante un gráfico de cajas para comprobar la distribución normal (Figura 5) y posteriormente se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon (Figura 6).

Figura 5

Comparación de la distribución de los datos de contaminación por carbohidratos del ADN extraído.

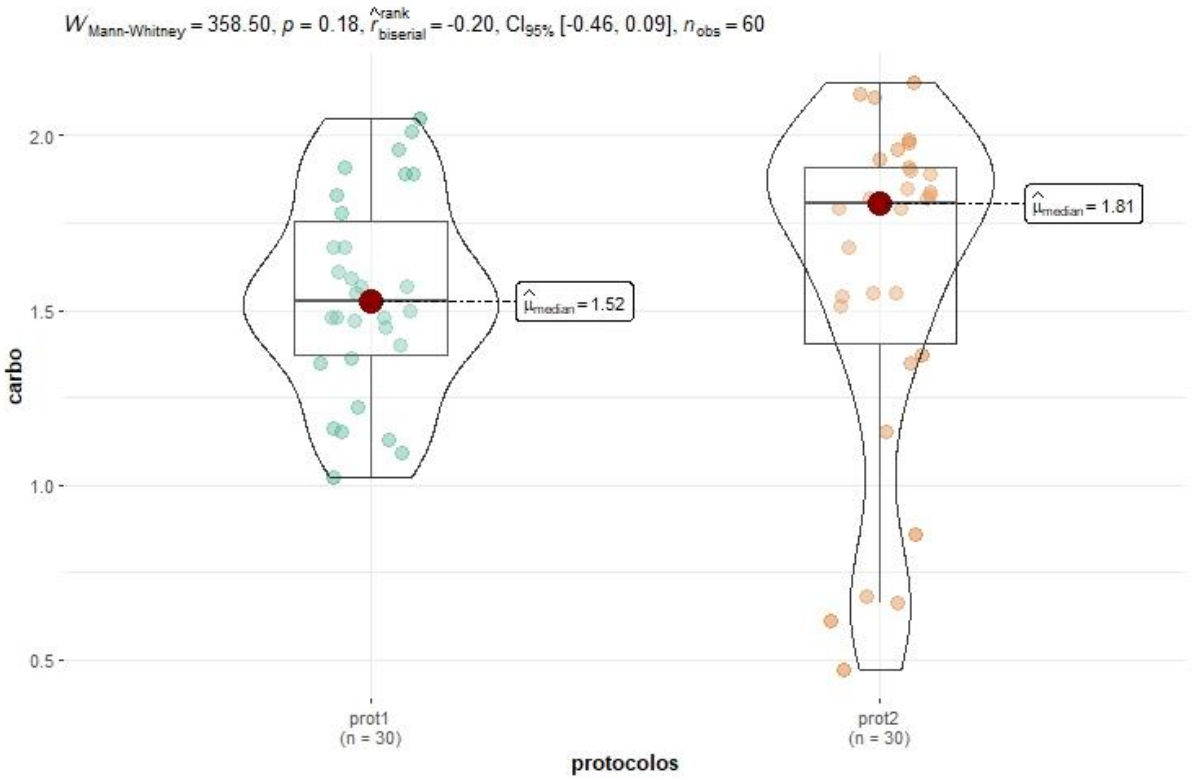


Nota. La figura muestra el gráfico de cajas de la distribución de los datos de contaminación por carbohidratos. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio.

El gráfico de cajas muestra una distribución normal para los datos de contaminación proteica obtenidos con el Protocolo 1, pero para el Protocolo 2 la distribución no es normal y se presenta un valor atípico que se eliminó para realizar la prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Figura 6

Prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada a los datos de contaminación por carbohidratos.



Nota. La figura muestra los diagramas de violín de la contaminación por carbohidratos de cada protocolo. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio.

Tomando en consideración un α = 0,20, teniendo un p = 0,18 y si se considera un intervalo de confianza del 80%, decimos que si existen diferencias entre las medianas de los dos grupos de datos. Para verificarlo, se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk a los residuos y se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Datos de prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Fuente: Elaboración propia en el programa estadístico RStudio

	W	***Valor p***	***Decisión***
RESIDUOS	0,92154	0,0008849	Con un α = 0,05 se rechaza la hipótesis nula

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) demostró mayor eficacia para la cantidad de ADN extraído basándose en la cuantificación mediante espectrofotometría considerando que, el promedio de ADN extraído es mayor comparado con el promedio de ADN extraído en el Protocolo 2 siendo la concentración más baja razón por la que no existió presencia de bandas en la electroforesis. Por otro lado, el Protocolo 2 evidencia una menor contaminación al evaluar la calidad de las muestras y los resultados del Protocolo 1 en su gran mayoría, muestran contaminación por agentes de extracción como es el fenol, lo cual pudo haber sido provocado por una mala centrifugación o residuos no separados.

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0,7% siendo esta la más óptima para el ADN analizado, sin embargo, las muestras extraídas por el Protocolo 1 (Fenol/Cloroformo) fueron las únicas que mostraron bandas teñidas al presentar mayor concentración. Uno de los factores que pudieron afectar a la integridad de las muestras fueron los ciclos de congelación y descongelación a las que fueron sometidas para los diferentes análisis.

Los análisis estadísticos proporcionaron información relevante acerca de los resultados obtenidos, no se mostraron diferencias significativas en la concentración de ADN entre los dos protocolos sin embargo al analizar la contaminación por carbohidratos se evidencian diferencias significativas, siendo el Protocolo 2 el que permite extraer ADN de mejor calidad. La elección del protocolo que se aplique y la mejora de técnicas conjuntamente con el objetivo de extracción, será determinante para la obtención de resultados con una calidad y cantidad aceptables.

5.2 Recomendaciones

Se debe buscar aplicar una técnica correcta y uniforme al momento de la toma de muestras para asegurar que se recolecte la mayor cantidad de materia a analizar y que no existan diferencias en cuanto a la cantidad y calidad extraída.

Se deben preparar correctamente las soluciones para la extracción, ya que depende de la formulación la efectividad de las mismas en cada etapa del proceso de extracción. El buffer de lisis que se usó en esta investigación fue eficaz para la ruptura celular.

Se deben optimizar los métodos de extracción tratados en esta tesis con base en los resultados obtenidos ya que son prometedores y al mejorar la técnica se podría estandarizar los protocolos.

Referencias:

Ambika, B. (2018). *DNA extraction: Comparison of methodologies*. ICAR. Retrieved January 18, 2023, from http://www.nbpgr.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20extraction-Comparison%20of%20methodologies.pdf

Angarita Merchán, Maritza, Torres Caicedo, María Inés, & Díaz Torres, Andrea Katherine. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, *16*(5), 796-807.

Brown TA. Genomes. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss; 2002. Capítulo 1, The Human Genome. Extraído de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/

Chauhan, T. (2018). *Phenol Chloroform DNA Extraction: Basics, Preparation of Chemicals and Protocol*. Genetic Education. Retrieved January 18, 2023, from https://geneticeducation.co.in/phenol-chloroform-dna-extraction-basics-preparation-of-chemicals-and-protocol/

Checa, A. (2017). *Extracción de ADN*. Conogasi. https://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn-2/

Collins, F.H., Mendez, M.A, Rasmussen, M.O., Mehaffey, P.C., Besansky, N.J. & Finnerty, V. (1987). A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the Anopheles gambiae complex. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 37(1), 37-41.

Cruz-Enríquez JA, Espinosa-Padilla SE, Medina-Torres EA. Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. Alergia Asma Inmunol Pediatr. 2021; 30 (2): 50-53.

Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN. *Banco Nacional De ADN Carlos III (Universidad De Salamanca)*. https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf

Dietz, J. A., Johnson, K. L., Wick, H. C., Bianchi, D. W., & Maron, J. L. (2012). Optimal techniques for mRNA extraction from neonatal salivary supernatant. *Neonatology*, *101*(1), 55–60. https://doi.org/10.1159/000328026

Dikysa. (2022). *Hisopos de Nylon flocado Valarame*. https://dikysa.com.mx/producto/hisopos-de-nylon-flocado-valarame/

DNA Advisory Board (2000) Forensic Sci Commun, vol 2, http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2000/index.htm

EDVOTEK. 2021. GUÍA RÁPIDA: TINCIÓN DE ADN SEGURA DE SYBR®. Recuperado de: https://www.edvotek.com/quick-guide-sybr-safe

Eppendorf SE. (2019). *Eppendorf Safe-Lock Tubes*. https://www.eppendorf.com/es-es/Tienda-virtual-y-Productos/Puntas-tubos-y-placas/Tubos/Eppendorf-Safe-Lock-Tubes-p-PF-8863

Farrell, R. E. (2010). Resilient Ribonucleases. *RNA Methodologies*, 155–172. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374727-3.00007-3

Fraga Nodarse, J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M. y Fernández-Calienes, A. (2004, sepdic). 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, 56(3). https://bit.ly/3uWxB32

Ghatak, S., Muthukumaran, R. B., & Nachimuthu, S. K. (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis.

Jones, A. (2023, January 3). TN 130 Purity Ratios Explained. DeNovix. https://www.denovix.com/tn-130-purity-ratios-explained/Journal of Biomolecular Techniques : JBT, jbt.13-2404. https://doi.org/10.7171/jbt.13-2404-001

Gautam, A. (2022). DNA and RNA Isolation Techniques for Non-Experts. *Techniques in Life Science and Biomedicine for the Non-Expert*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94230-4

ISCIII. (2011). *Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos* (1.ª ed.). https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, *62*. https://doi.org/10.3791/3923

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(4), 264–270. https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064

Madera Anaya, M. V. & Suárez Causado, A. (2017, octubre). Evaluación de dos métodos para extracción de ARN en saliva en niños. *Revista Odontológica Mexicana*, *21*(4), 245-252. https://doi.org/10.1016/j.rodmex.2018.01.005

Mandrekar, P. (2015). *DNA Purification | DNA Extraction Methods | Promega*. Promega. Retrieved January 18, 2023, from https://nld.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/

Melo-Silva, A. J., Lucena, J. P., & Hueneburg, T. (2019). The evolution of molecular diagnosis using digital polymerase chain reaction to detect cancer via cell-free DNA and circulating tumor cells. *Cell Biology International*, *44*(3), 735–743. https://doi.org/10.1002/cbin.11286

MP BIOMEDICALS. (2016). *Sodium acetate, ACS Grade*. Mpbio. https://www.mpbio.com/bs/02195496-5-sodium-acetate-cf

O'Neill, M. (2011). *Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system*. IOPscience. Recuperado 25 de octubre de 2022, de https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/307/1/012047/meta

Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clinical chemistry*, *57*(5), 675–687. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767

Pérez, D. (2017, julio). *LAS CÉLULAS EPITELIALES: EVIDENCIA IMPORTANTE EN CASOS FORENSES*. Recuperado 20 de octubre de 2022, de https://www.uv.es/gicf/3R1_Perez_Vergara_GICF_24.pdf

Sandoval-Arias, S. M. (2014). Extracción de ADN humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales en papel FTA. *Revista Tecnología En Marcha*, *27*(4), 14. https://doi.org/10.18845/tm.v27i4.2081

Steinberg, K., Beck, J., Nickerson, D., Garcia-Closas, M., Gallagher, M., Caggana, M., Reid, Y., Cosentino, M., Ji, J., Johnson, D., Hayes, R. B., Earley, M., Lorey, F., Hannon, H., Khoury, M. J., & Sampson, E. (2002). DNA Banking for Epidemiologic Studies: A Review of Current Practices. *Epidemiology*, *13*(3), 246–254. http://www.jstor.org/stable/3703393

Tarqui-Terrones, K., Silva-Molina, J. I., Beltrán-Fabián, M., Zevallos-Vara, S., & Mayta-Huatuco, E. (2019). Comparación de métodos de extracción de ADN de Giardia spp. medidos por PCR convencional. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, *36*(3), 423. https://doi.org/10.17843/rpmesp.2019.363.4160

Thermo Fisher Scientific - NL. (2018). *NanoDrop Microvolume Spectrophotometer Applications*. ThermoFisher.

https://www.thermofisher.com/nl/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop/applications.html

Thermo Scientific. (2015). *NanoDrop One Performance Data: Nucleic Acid Measurements at 260 nm*. Tools.Thermofisher. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52810-E-0416M-Performance-Data.pdf

van Wieren-de Wijer, D. B. M. A., Maitland-van der Zee, A. H., de Boer, A., Belitser, S. V., Kroon, A. A., de Leeuw, P. W., Schiffers, P., Janssen, R. G. J. H., van Duijn, C. M., Stricker, B. H. C. H. & Klungel, O. H. (2009). Determinants of DNA yield and purity collected with buccal cell samples. *European Journal of Epidemiology*, *24*(11), 677-682. https://doi.org/10.1007/s10654-009-9388-x

ANEXOS

Figura 7

Ejecución de los protocolos de extracción de ADN

Fuente: Autora

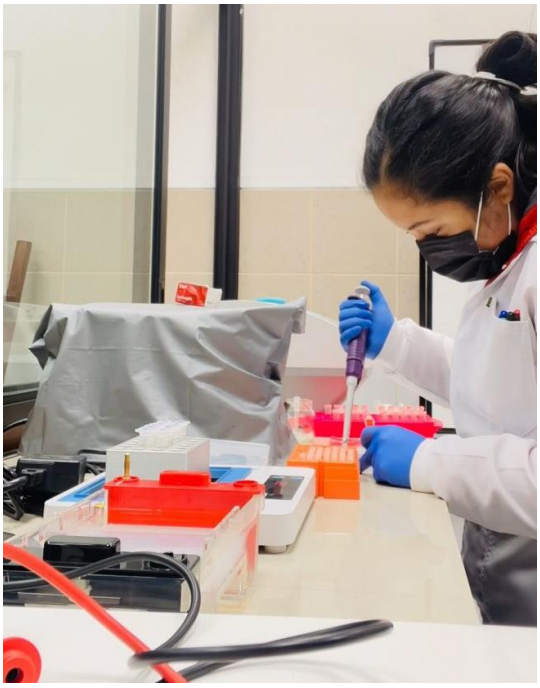
Figura 8

Condiciones para la electroforesis

Fuente: Autora

Figura 9

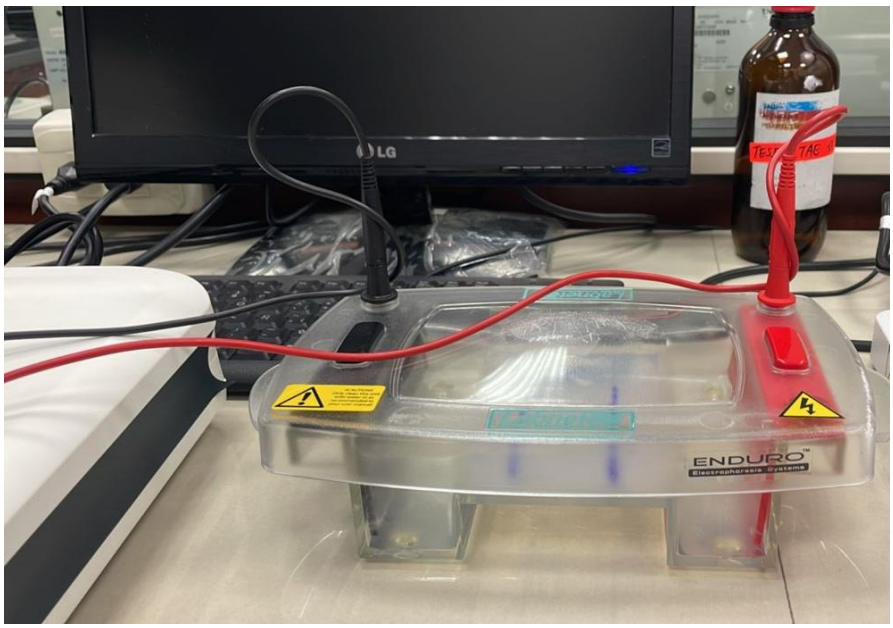
Preparación de las muestras para la electroforesis



Fuente: Autora

Figura 10

Electroforesis de las muestras



Fuente: Autora