

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA

(Creada por Ley N° 25265)

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

**EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE
TÉJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Genética y Mejoramiento Genético

PRESENTADO POR:

Bach. REQUENA GUILLEN, Kenjy Keyro

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE:**

Ingeniero zootecnista

HUANCAVELICA, PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCVELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 11 días del mes de diciembre del año 2019, a horas 3:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **M.Sc. William Herminio SALAS CONTRERAS (PRESIDENTE)**, **M.Sc. Héctor Marcelo GUILLEN DOMÍNGUEZ (SECRETARIO)**, **Ing. Paul Herber MAYHUA MENDOZA (VOCAL)**, designados con Resolución de Decano N° 048-2019-FCI-UNH, de fecha 06 de mayo del 2019, y se ratifica con Resolución de Decano N° 283-2019-FCI-UNH de fecha 09 de diciembre del 2019, a fin de proceder con la calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA", presentado por el Bachiller **Kenjy Keyro REQUENA GUILLEN**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**, en presencia del **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA**, como Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas 4:26 p.m.; se invitó al público presente y al sustentante abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

APROBADO POR... MAYORIA.....

DESAPROBADO

En señal de conformidad, firmamos a continuación:



Presidente



Secretario



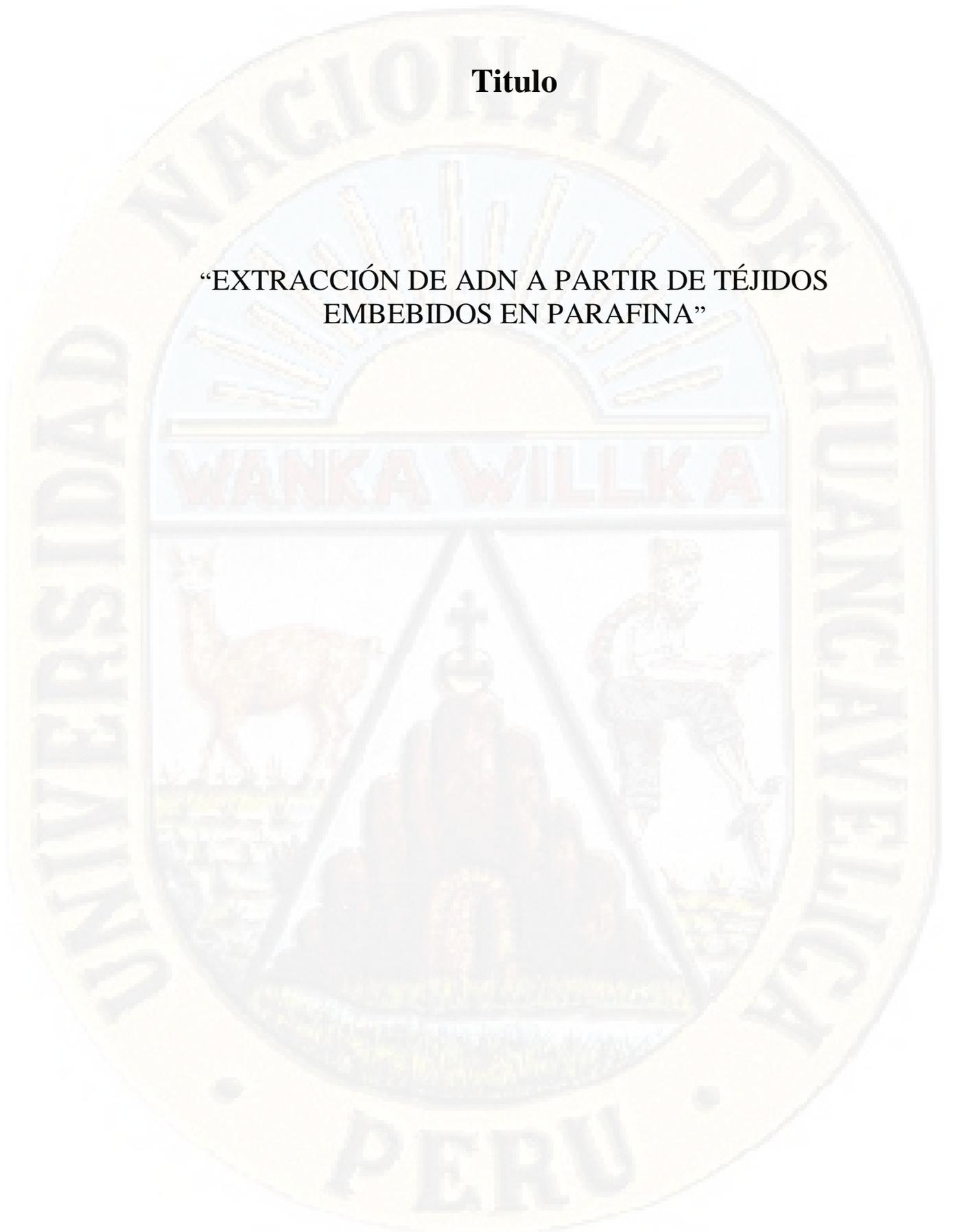
Vocal



Vº Bº Decano

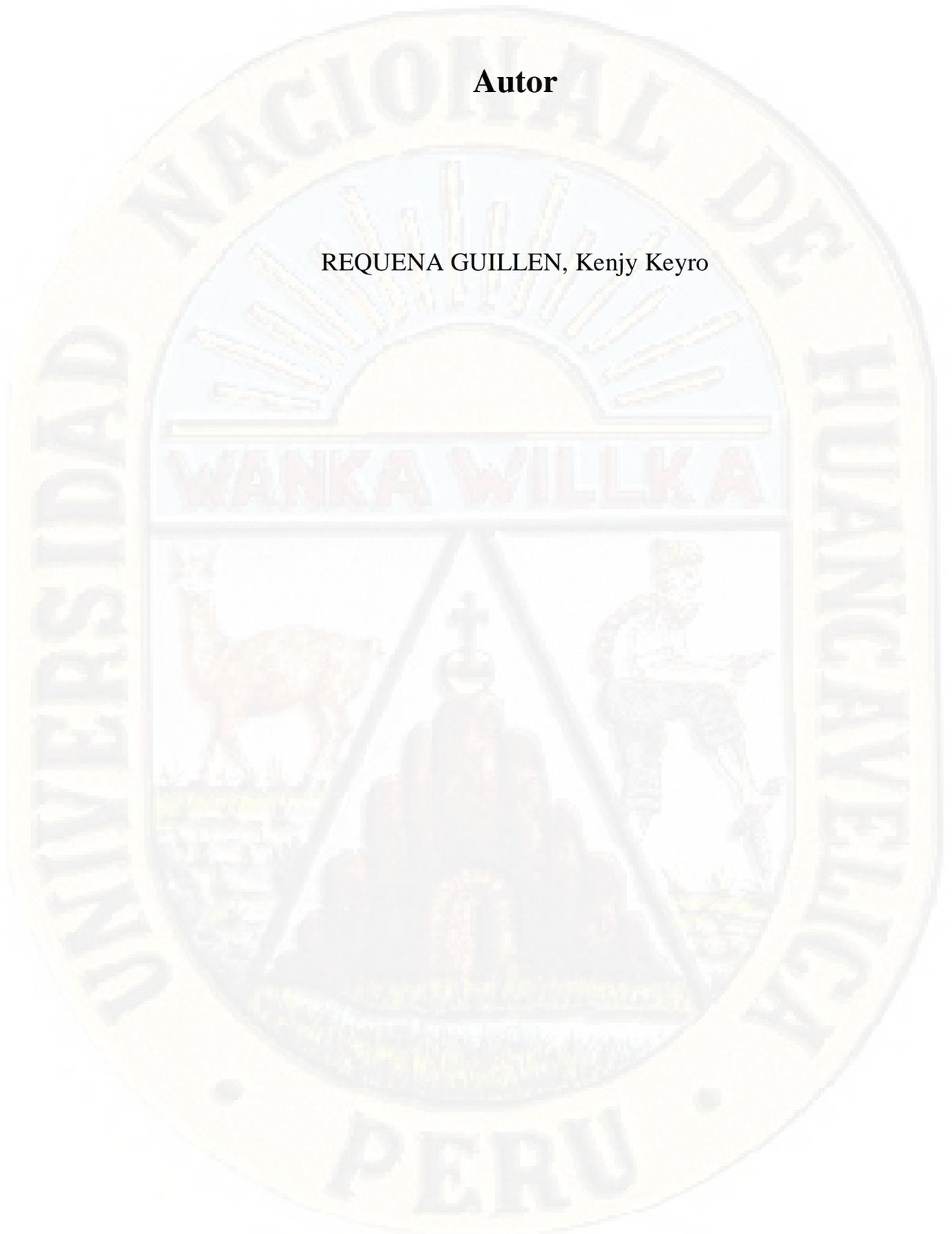
Título

“EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TÉJIDOS
EMBEBIDOS EN PARAFINA”



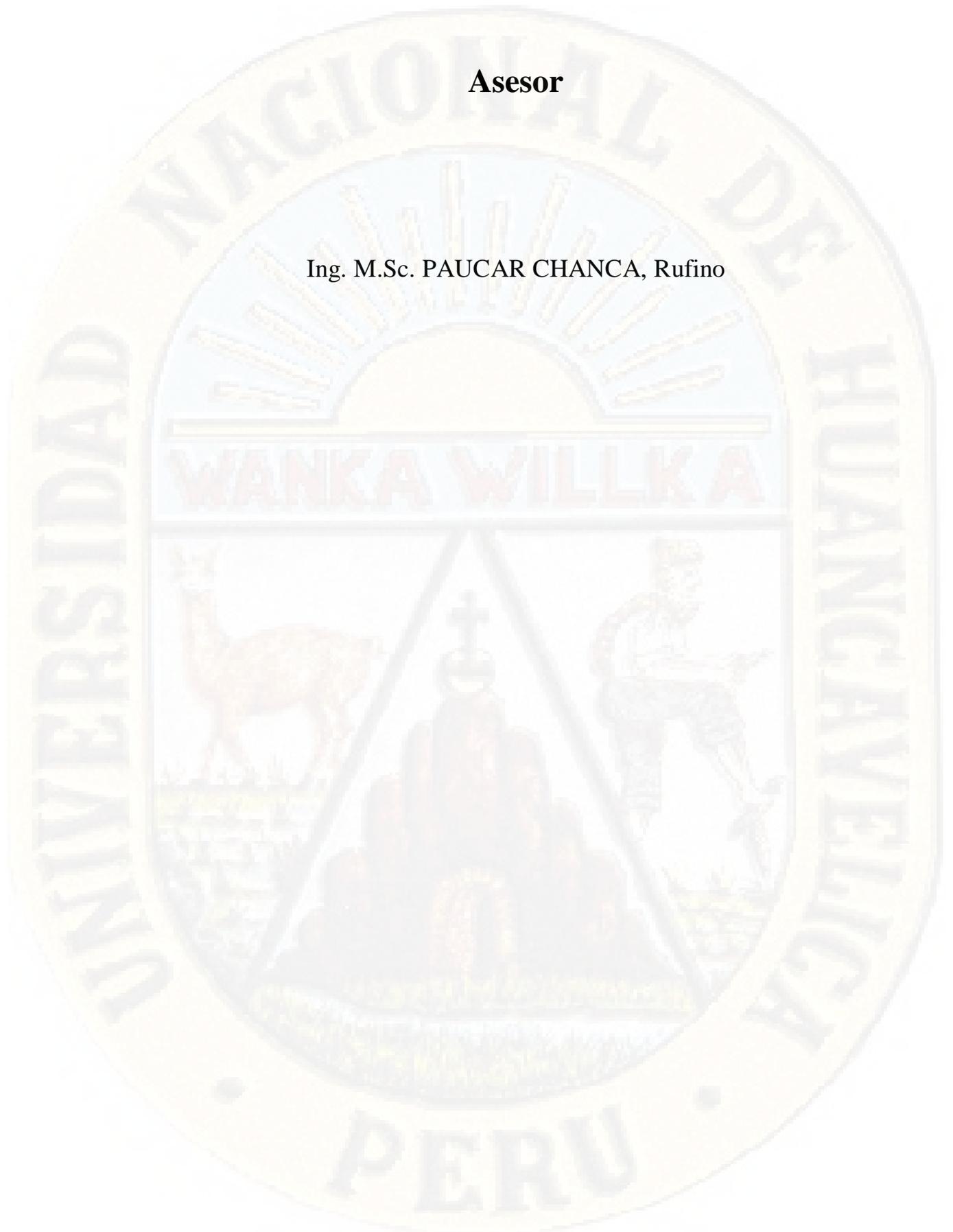
Autor

REQUENA GUILLEN, Kenjy Keyro



Asesor

Ing. M.Sc. PAUCAR CHANCA, Rufino



Dedicatoria

*En mi condición de hijo y padre,
dedico este trabajo y todo mi ser, a
mis padres “Manuel y Katty” por
todo el esfuerzo incondicional que
me otorgaron para alcanzar el
logro de mi formación profesional,
a mi hermosa hija “Nadezhda
Aishel” por ser mi inspiración,
soporte y guía que me impulsa a
seguir adelante.*

Agradecimientos

- Al Fondo de Desarrollo Socioeconómico de Camisea (FOCAM) de la Universidad Nacional de Huancavelica, por subvencionar la ejecución de la presente tesis.
- Al asesor M.Sc. Rufino Paucar Chanca, por su orientación, apoyo y tiempo compartido durante la formulación y ejecución de la presente tesis.
- A los responsables del laboratorio del LAMG a Marco Antonio Espinoza Castillo, Ladi Lali Aguilar Jara y Flor Carmen Alvarado Quezada, por su apoyo en la toma y procesamiento de muestras

ÍNDICE

Portada	
Autor	
Asesor	
Dedicatoria	
Índice	
Resumen	
Abstract	
Introducción	
	Pág.
CAPÍTULO I	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1.	Descripción del problema: 4
1.2.	Formulación del problema: 5
1.2.1.	General: 5
1.2.2.	Específico: 5
1.3.	Objetivo: 5
1.3.1.	General: 5
1.3.2.	Específico: 5
1.4.	Justificación 6
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1.	Antecedentes: 7
2.2.	Bases teóricas: 11
2.3.	Definición de términos: 13
2.4.	Hipótesis: 14
2.5.	Variables: 14
2.6.	Operacionalización de variables: 14
CAPÍTULO III	
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1.	Ámbito temporal y espacial: 15
3.2.	Tipo de investigación: 15
3.3.	Nivel de investigación: 15
3.4.	Población, muestra y muestreo: 15
3.5.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos: 16
3.6.	Técnicas de procesamiento y análisis datos: 22
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS	
4.1.	Cantidad de ADN, extraído a partir de TEP y sangre 23
4.2.	Calidad de ADN, extraído a partir de TEP y sangre 23
4.3.	Comparación entre cantidad y calidad de ADN, obtenido a partir de TEP y sangre: 26
4.4.	Discusión de resultados 27
Conclusiones	
Referencias bibliográficas	
Anexos	

RESÚMEN

La presente investigación fue llevada a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos – Lachocc (CIDCS - Lachocc), ubicada a 4680 m.s.n.m. en el distrito, provincia y región de Huancavelica, los ensayos fueron realizados en el Laboratorio de Mejoramiento Genético (LAMG) – Área de Genética Molecular de la Universidad Nacional de Huancavelica. El objetivo fue determinar la cantidad y calidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído a partir de tejidos embebidos en parafina (TEP) de alpacas, teniendo como testigo ADN extraído a partir de sangre, para lo cual, se seleccionaron aleatoriamente 52 alpacas, desde las cuales se extrajeron 26 muestras de sangre (cada uno de 2 ml) y 26 muestras de tejidos (extraídos con un sacabocado de 8 mm de diámetro), posteriormente fueron trasladados al LAMG donde fueron procesados para la determinación del índice folicular, producto de ello quedaron restos de tejidos embebidos en parafina, los cuales fueron desparafinados con un kit de desparafinación comercial (*echosafe ffpe deparaffinization*), posteriormente se realizó la extracción de ADN de las muestras de TEP y sangre utilizando el kit comercial DNA Mini Kit QIAamp (QIAGEN). Para el análisis de los datos se utilizó la prueba de T de Student y la prueba de Wilcoxon, mediante el software R, obteniendo los siguientes resultados: la cantidad (concentración) de ADN para TEP fue de 71.69 ± 31.00 ng/ul y para sangre 68.85 ± 52.84 ng/ul, no existiendo diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), el rango de índice de pureza (calidad) de ADN (A260/A280), estuvo entre 1.780 ± 0.03 nm y 1.902 ± 0.05 nm para TEP y sangre respectivamente, mostrando diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), el ADN extraído a partir de sangre tuvo una mayor pureza en comparación al ADN extraído a partir de TEP, pero cabe resaltar que los valores de pureza del ADN extraído a partir de TEP están muy cercanos a lo ideal. Por otro lado, en la prueba de integridad (calidad) del ADN por electroforesis ambas mostraron bandas no degradadas y que se encuentran superiores y cercanas a los 500pb con cortos barridos en el gel, lo cual indica una óptima calidad del ADN para TEP y sangre. Se concluye que el ADN obtenido a partir de TEP, puede ser utilizado en estudios moleculares, ya que se obtiene en buena cantidad y calidad cercana a lo óptimo.

Palabras claves: ADN, Kit comercial, parafina, extracción, embebidos.

ABSTRACT

This research was carried out at the Center for Research and Development of South American Camelids (CIDCS) - Lachocc, located at 4680 m.a.s.l. In the district, province and region of Huancavelica, the tests were conducted in the Laboratory of Genetic Improvement (LAMG) - Molecular Genetics Area of the National University of Huancavelica, the objective was to determine the quantity and quality of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from paraffin-embedded tissues (PET) of alpacas, with DNA extracted from blood as a control, for which 52 alpacas were randomly selected, from which 26 blood samples (each of 2 ml) were extracted and 26 tissue samples (extracted with a punch of 8 mm in diameter), were subsequently transferred to the LAMG where they were processed for the determination of the follicular index, product of which remains of tissues embedded in paraffin, which were deparaffinized with a kit of commercial dewaxing (echosafe ffpe deparaffinization), subsequently DNA extraction was performed from the PET and blood samples using the commercial kit DNA Mini Kit QIAamp (QIAGEN). For the analysis of the data, the Student's T test and the Wilcoxon test were used, using the R software, obtaining the following results: the amount (concentration) of DNA for PET was 71.69 ± 31.00 ng / ul and for blood 68.85 ± 52.84 ng / ul, there being no statistically significant differences ($P > 0.05$), the DNA purity index (quality) range (A_{260} / A_{280}) was between $1,780 \pm 0.03$ nm and $1,902 \pm 0.05$ nm for PET and blood respectively, showing significant statistical differences ($P < 0.05$), the DNA extracted from blood had a higher purity compared to DNA extracted from PET, but it should be noted that the purity values of DNA extracted from PET are very close to the ideal. On the other hand, in the integrity test (quality) of the DNA by electrophoresis both showed non-degraded bands that are higher and close to 500 bp with short sweeps in the gel, which indicates an optimal DNA quality for PET and blood . It is concluded that the DNA obtained from PET, can be used in molecular studies, since it is obtained in good quantity and near optimum quality.

Keywords: DNA, Commercial kit, paraffin, extraction, embedded.

Índice de cuadros

Cuadro 01. Operacionalización de variables.....	14
Cuadro 02. Programa usado en el procesador de tejidos STP 120.....	17
Cuadro 03. Concentración (ng/ul) de ADN en TEP y sangre.....	23
Cuadro 04. Pureza (A260/A280 nm) de ADN en TEP y sangre.....	23
Cuadro 05. Base de datos de la concentración de ADN por matriz de extracción.	38
Cuadro 06. Base de datos de la pureza de ADN por matriz de extracción.....	39

Índice de gráficos

Gráfico 01 y 02. Integridad del ADN, a partir de muestras de TEP migrados en gel de agarosa	24
Gráfico 03 y 04. Integridad del ADN, a partir de muestras de sangre migrados en gel de agarosa	25
Gráfico 05. Histograma del análisis de concentración de ADN entre sangre y TEP.....	34
Gráfico 06. Diagramas de cajas y bigotes del análisis de concentración de ADN entre sangre y TEP.....	34
Gráfico 07. Histograma del análisis de pureza de ADN entre sangre y TEP.....	36
Gráfico 08. Diagramas de cajas y bigotes del análisis de pureza de ADN entre sangre y TEP.....	36

Introducción

Los animales nos brindan alimento, ropa, trabajo, entretenimiento, por lo que hacer uso de ellos nos confiere la responsabilidad de velar por su bienestar desde su nacimiento hasta su muerte (Vega y Watanabe, 2016). El bienestar animal es un término amplio que engloba tanto la salud física como mental de los animales, cuando mantenemos a los animales en cautiverio su salud física y mental se puede ver afectada por factores como hambre, sed, fatiga, lesiones, enfermedades y temperaturas extremas, además por las constantes extracciones de muestras de tejido, sangre, fibra, etc. Que son usados para las investigaciones, el cual causa estrés, miedo y dolor (Friedrich, 2015).

Está comprobado que el estrés afecta al sistema inmune de los animales haciéndoles más susceptibles a las enfermedades, ocasionando así pérdidas económicas en rendimientos y gastos veterinarios a los productores que se dedican al rubro de la producción, además el producto final destinado a consumo humano tendrá baja calidad e inocuidad. (Manteca, Mainau, y Temple, 2013)

La colecta de muestras para estudios en animales, implica la generación de estrés, alteración del comportamiento individual o grupal y algunas veces la muerte del animal (Maturrano, Aguilar, Kruger, Chávez, y Rosadio, 2012) En la actualidad, con el avance de la ciencia los TEP son usados en camélidos para estudios de índice folicular lo cual está relacionado a la cantidad de fibra (Paúcar y Sedano, 2014), dejando residuos en abundancia que contienen muestras de piel que no son utilizados y se desechan, es así que la presente investigación, busca la posibilidad de aprovechar los TEP para la extracción de ADN y estos pudieran servir para estudios moleculares (Amplificación, secuenciamiento, etc.).

Debido a la carencia de información sobre este tema, el presente estudio tiene como objetivo determinar la cantidad y calidad de ADN a partir de tejidos embebidos en parafina.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema:

Las constantes tomas de muestras en el mundo de la investigación traen sufrimiento y acto de crueldad que tienen que soportar los animales casi constantemente, la crueldad puede definirse a la acción que causa sufrimiento, dolor y muerte a un ser vivo. (Vega y Watanabe, 2016), es así que se debe buscar estrategias para maximizar el uso de una muestra para diversos estudios en la investigación, como es el caso de los TEP.

En estos últimos años, los tejidos para una mejor conservación se vienen almacenando en los bancos de histopatología, para lo cual previamente estos tejidos se bañan en parafina, técnica que es conocida como TEP, los cuales pueden ser útiles para diversos estudios entre ellos el análisis de los ácidos nucleicos, la cual se ha convertido en la actualidad en una herramienta importante para el diagnóstico e investigación en patología molecular, detección de enfermedades infecciosas, estudios de malformaciones congénitas y para todo tipo de estudios retrospectivos (Meza, Ulloa, Uribe, y Gutiérrez, 2013).

Los avances en la genética molecular ofrecen en la actualidad una nueva generación de tecnología aplicada a la selección animal; así como la capacidad de “leer” directamente la información genética del ADN, sin depender necesariamente de la medición fenotípica del carácter de importancia económica (Fujita, 2007).

La aplicación de técnicas moleculares se inicia con la extracción de ADN, por lo que, la obtención exitosa de datos confiables y reproducibles depende, en gran medida, de la extracción de ADN íntegro y puro (Alejos, Aragón, y Cornejo, 2010).

Los kits comerciales disminuyen la extracción a unas cuantas horas porque reducen el número de pasos del procedimiento y son utilizados bajo las recomendaciones de cada proveedor, estos garantizan una extracción de alta

Pureza ya que tanto la recuperación del ADN como la eliminación de parafina y contaminantes son muy eficientes. (Cornejo, Serrato, Rendón, y Rocha, 2014).

Actualmente, en los programas de mejoramiento genético en alpacas y llamas, se extraen constantemente muestras de tejido y sangre que ocasiona excesivo sufrimiento al animal, uno de los análisis que requiere muestras de tejido es la determinación de índice folicular que sirve para mejorar la cantidad de fibra, producto de esta técnica se obtienen los TEP los cuales no son aprovechados y se desechan, por ello, la presente investigación propone aprovechar estos TEP, extraer ADN y corroborar la eficacia de obtener una adecuada cantidad y calidad de ADN, el cual posiblemente pueda servir para diversas técnicas moleculares como amplificación, secuenciamiento, etc. además de aprovechar estos TEP se reducirá las constantes extracciones de muestras en tejido y sangre que traen sufrimiento al animal brindándole así un mejor bienestar animal.

1.2. Formulación del problema:

1.2.1. General:

¿Cuál es la cantidad y calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina?

1.2.2. Específico:

- ¿Cuál es la cantidad de ADN extraído de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina?
- ¿Cuál es la calidad de ADN extraído de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina?
- ¿Existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)?

1.3. Objetivo:

1.3.1. General:

Determinar la cantidad y calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina.

1.3.2. Específico:

- Determinar la cantidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina.

- Determinar la calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (*Vicugna pacos*) embebidos en parafina.
- Determinar las diferencias en cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional).

1.4. Justificación

La ejecución del presente trabajo de investigación es de gran importancia, debido a que los resultados permitirán determinar si el ADN extraído a partir de TEP tiene buena cantidad y calidad, y si son comparables al ADN extraído a partir de sangre.

Esta información constituye un punto de partida para el desarrollo de trabajos de investigación utilizando técnicas de ingeniería genética (Secuenciamiento, reacción en cadena de la polimerasa “PCR”, electroforesis, etc.). Lo cual, permitirá obtener progresos genéticos importantes en los programas de mejoramiento genético.

Por otro lado, permitirá reducir la extracción constante de muestras de sangre y tejido que traen, crueldad, estrés y dolor a los animales. También permitirá aprovechar los TEP que son desechados constantemente.

Cabe señalar que la presente investigación es viable ya que se cuentan con recursos necesarios, así como el acceso directo a la información.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO:

2.1. Antecedentes:

Cuevas (2013), realizó en México el trabajo de investigación usando marcadores moleculares para verificar la genealogía de bovinos jersey, cuyo objetivo fue determinar la eficacia de 11 marcadores moleculares para verificar la genealogía de bovinos Jersey, donde obtuvo los siguientes resultados: Se utilizaron 73 muestras, 70 de sangre y 3 de semen, se utilizó el Kit comercial *DNAzol BD Reagent* para la extracción de ADN a partir de sangre y para semen con el kit Comercial *Maxwell 16 LEV blood AS1010*. Para la extracción de ADN en sangre se utilizaron 0.5 ml, dando como resultado que no cumplió con la cantidad y calidad mínima para llevar a cabo la PCR, por otro lado, para la extracción de ADN en muestras de semen se colocó 1 μL de esta muestra en un espectrofotómetro de volumen (Nanodrop 1000, thermo scientific 260/280 nm) obteniendo ADN de calidad y cantidad adecuada, por lo que fue considerada la metodología más adecuada, sin embargo, la utilización de esta metodología implica mayor costo (12%) por extracción de ADN. El promedio de cantidad fue de 53.43 ± 28.31 ng/ μl y calidad 1.86 ± 0.08 nm (Abs 260/280).

Estevam, Fernando, Maroni, y Issamu (2007), realizaron en Brasil el trabajo de investigación, evaluación de dos métodos de extracción de ADN en material de parafina para la amplificación de PCR, el objetivo fue evaluar dos métodos (la primera digestión con proteinasa K seguido de purificación con Chelex 100, el segundo un mini kit ADN QiAamp), para la extracción de ADN en material de parafina y amplificación de ADN por la técnica de PCR, utilizando 35 muestras de pacientes con carcinoma de la base de la boca. Obteniendo los siguientes resultados, la concentración de ADN a partir del material extraído con Chelex 100, fue de 120,62 ng/ μl con una desviación estándar 70.57 y para calidad en absorbancia de lectura 260/280 fue 0.8 y 1.41. Para las muestras extraídas con el minikit de ADN QIAamp el rendimiento promedio fue de 67,38 ng/l con una desviación estándar de 44.59. Sin embargo, la proporción de 260/280 lecturas

Variaron entre 1.11 y 2.53. El material se sometió a PCR y las 35 muestras tomadas con cada método. Se concluyeron que los dos métodos usados para obtener ADN en material de parafina mostró un rendimiento similar, revelando su potencial para ayudar en el diagnóstico de la biología molecular.

Bustamante, Astudillo, Pazos, y Bravo (2011), realizaron en Colombia el trabajo de investigación: Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina, con los siguientes resultados, se seleccionaron 47 bloques en parafina que contenían biopsias de pleura, pulmón y pericardio correspondientes a 24 pacientes (66,6% hombres) mayores de 18 años con inflamación granulomatosa crónica. La cantidad y la pureza de ADN total de las muestras previamente purificadas se determinó por lectura de densidad óptica a 260/280 nm en espectrofotómetro, se realizaron 10 cortes a cada muestra y se sometieron a dos métodos de extracción de ADN: 1. convencional y 2. QIAamp-DNA mini kit®. Para ambos métodos de extracción, la cantidad y calidad del ADN obtenido presentaron resultados satisfactorios para la realización de PCR. Con los siguientes resultados, en la concentración de ADN total obtenido por el método convencional presentó una media de 65.52 ± 11.47 ng/ μ L y en espectrofotómetro (260/280) varió entre 0.52 y 2.30 nm. Para las muestras extraídas por el método comercial, la concentración media de ADN fue 69.89 ± 6.02 ng/ μ l. Concluyeron que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad promedio de ADN extraída por ambos métodos (prueba de rangos con signo de *Wilcoxon* $P=0.6721$). Al comparar la pureza del material genético extraído se observaron diferencias significativas

Montenegro, Maturrano, Wheeler, y Rosadio (2012), realizaron en Lima el trabajo de investigación, determinación del sexo mediante la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa en Camélidos Sudamericanos, con el objetivo de evaluar, el desarrollo y optimizaciones de técnicas moleculares (PCR simple, múltiple y semi anidada) para determinar el sexo de camélidos sudamericanos amplificando la secuencia del gen Zinc Finger (ZF). Donde obtuvieron los siguientes resultados, se utilizó 28 muestras de sangre de alpacas, llamas y vicuñas extraídas mediante punción de la vena yugular

Obtenidas de 10 alpacas adultas, 10 llamas adultas y 8 vicuñas, 20 muestras de heces de vicuñas y guanacos conservadas en etanol al 96%, y 22 embriones de alpaca colectados entre 72 y 96 horas postmonta. La extracción de ADN de sangre se utilizó la prueba Promega Wizard DNA y kit Promega, Madison y la extracción de ADN en heces ADN fue extraído usando la prueba comercial QIAamp Mini Kit (QIAGEN), en la extracción de ADN en embriones se aplicó tres métodos (ebullición, proteinasa K y fenol-cloroformo). La concentración y la tasa de pureza del ADN extraído de todas las muestras fueron determinadas mediante espectrofotometría 260/280 nm. La calidad del ADN fue verificada mediante electroforesis. El ADN extraído de sangre de alpacas y llamas tuvo una alta concentración (45-201 ng/μL) y buena tasa de pureza (>1.8 y mínima presencia de degradación), el ADN sanguíneo de animales silvestres fue igualmente de alta concentración (39-211 ng/μl) y buena pureza (>1.8) y en los embriones no lograron detectar ADN.

Yalta (2014), realizó en Lima el trabajo de investigación: Variabilidad genética poblacional de alpacas (*vicugna pacos*) determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del fundo Itita, Puno-Perú, cuyo objetivo fue contribuir al programa de mejoramiento genético para camélidos sudamericanos y determinar la variabilidad genética y el nivel de endogamia de dos rebaños de reproducción de alpacas (*Vicugna pacos*) Huacayas blancas; así como realizar su genotipificación e identificación de marcadores STR útiles para la determinación de pruebas de paternidad y parentesco, se evaluaron 10 marcadores STR a partir de sangre y folículos pilosos de 183 alpacas blancas de la raza Huacaya. Las muestras de pelo se colectaron tomando un mechón de la base de la cola y fueron almacenadas en tubos de 1.5 ml; y las muestras de sangre fueron obtenidas mediante punción a nivel de la vena yugular. El protocolo de Sambrook permitió aislar ADN genómico de buena calidad tanto en muestras de pelo como de sangre, sin presentar signos de degradación o fragmentación, se obtuvieron mayores concentraciones de ADN en muestras de sangre que en pelo, concluyeron que las muestras con menores concentraciones amplificaron con efectividad.

Paredes (2013), realizó en Lima el trabajo de investigación: Caracterización molecular de las llamas (*Lama glama*) Ch'aku y Ccara del banco de germoplasma de alpacas de

Color y llamas del centro experimental Illpa-Inia, anexo de Quimsachata, usando marcadores microsatélites, cuyo objetivo fue la conservación de la diversidad genética de los camélidos domésticos. Donde para alcanzar dichos objetivos analizó la diversidad y el grado de diferenciación genética de 251 llamas (92 y 159 fenotipos Ch'aku y Ccara, respectivamente). La extracción de ADN genómico a partir de sangre, en llamas Ch'aku y Ccara, se llevó a cabo mediante el protocolo establecido por Sambrook y Russell. La calidad y cuantificación del ADN extraído se realizó por medio del equipo *epoch*, donde se obtuvieron concentraciones de ADN expresadas en ng/μl y la pureza del mismo por medio de la relación de absorbancia 260/280 nm, dicha relación debió estar en un rango de 1.8-2.0 esto indica que el ADN tiene una óptima calidad, se rectificó la calidad del ADN mediante electroforesis con geles de agarosa. El ADN extraído en sangre obtuvo una concentración entre promedio de 163.3 ng/μl, sin embargo, la proporción de pureza (abs 260/280) un promedio de 1.88 (abs 260/280).

Espinoza (2017), realizó en Huancavelica el trabajo de investigación: Análisis de cantidad y calidad de ADN genómico extraído en folículos y sangre de (*Vicugna pacos*) mediante el método comercial, cuyo objetivo fue determinar cuál de las fuentes de extracción de ADN: folículos pilosos o sangre se obtiene una mayor cantidad y calidad del ADN, se seleccionaron aleatoriamente 19 alpacas por tratamiento y se tomaron muestras de un trozo de la piel con folículos pilosos y 2 ml de sangre extraído de la vena yugular. La cantidad de ADN tuvo una media de 38.8 ± 19.4 para folículo piloso (T1) y 9.0 ± 2.1 ng/ul, para sangre (T2), habiendo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.01$) entre las medias de ambos tratamientos. La pureza del ADN en sangre de alpacas tuvo una media de 1.818 ± 0.057 para el T1 y 1.849 ± 0.112 nm, para el T2, no estableciéndose diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre las medias ambos tratamientos. Para la integridad del ADN obtuvo mejores resultados con el método de extracción en sangre, que presento un 58% de banda no fragmentada, mientras que, para folículos pilosos presentó un 37% de bandas con fragmentación.

2.2. Bases teóricas:

Alpacas (*Vicugna pacos*)

Las alpacas pesan entre 45 y 77 kg y su altura hasta la cruz es de 90 cm,3 superadas levemente por la vicuña, su ancestro. La estatura de la alpaca es considerablemente menor que la de la llama, compartiendo con esta y con el camello el hábito de escupir, utilizado para mostrar agresividad o como método de defensa (Stemmer, Valle, Nuernberg, Delgado, y Wurzinger, 2005).

Extracción de ADN.

Se llama extracción al método por el cual se obtiene ADN a partir de material biológico (bucal, saliva, sangre o cualquier tejido) utilizando técnicas físicas y químicas. La extracción consiste en la separación y purificación del ADN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo. (Checa, 2017)

Métodos de extracción de ADN:

Existen diversos métodos para la extracción de ADN, como la técnica de extracción por fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (FCI), técnica de extracción por gradiente de sales (GS), técnica de extracción por gradiente de sacarosa (GSC), extracción con DNAzol BD, extracción con Dneasy Bloody y Tissue de Qiagen. De los cuales el método de extracción por GS y GSC tuvieron los mejores resultados en pureza y cantidad. (Rios, Calleros, Gonzáles, Rubio, Martinez, Hernández, y Pérez, 2016)

Tejidos embebidos en parafina

El TEP es una valiosa fuente de ADN para investigación molecular, también son de fácil manejo y práctico almacenamiento, constituyen un material de archivo importante para análisis histológico de estudios clínicos retrospectivos y representan un recurso invaluable para estudiar la patogénica molecular de las enfermedades y la expresión génica, además, obvian la necesidad de conseguir tejido fresco para el diagnóstico de enfermedades para las dificultades que representa para la extracción de tejido vivo en los procesos quirúrgicos (Ayala, Salazar, Cadena, y Zarante, 2009).

Método de desparafinación

La desparafinación es el proceso de tratamientos que se realiza a una muestra para separar y eliminar las parafinas que contienen.

El método más común y el más utilizado es el que hace uso de solventes como el xileno y el etanol, existe además métodos alternos que incluyen procesos térmicos en microondas y termocicladores (Ayala et al., 2009).

Factores que influyen en la cantidad y calidad de ADN

Diversos autores han reportado que, para la realización de estudios moleculares, el ADN aislado debe ser de buena calidad y cantidad suficiente para obtener resultados satisfactorios, por lo tanto, se requiere un método de extracción óptimo que garantice la remoción adecuada de parafina y la obtención de ADN. Los ácidos nucleicos extraídos a partir de TEP tienen menor calidad que los extraídos en tejidos frescos, dificultando el análisis molecular posterior, esto se debe en primera instancia al fijador utilizado en la preservación del tejido. Fijadores como la formalina, aldehídos y alcoholes ocasionan un entrecruzamiento de las hebras, modificaciones en las bases y degradación parcial del ADN en la mayoría de los casos, otros factores que pueden influir son el tiempo de almacenamiento, el método de desparafinación utilizado y el método de extracción del material genético (Zafra, Flórez, y González, 2004).

Además, para obtener altas concentraciones de ADN que difieren de la concentración promedio, está directamente relacionada con el tamaño del tejido embebido en parafina (Bustamante et al., 2011).

Al realizar la extracción de ADN a partir de sangre, se observan que en animales de menor edad hay mayor rendimiento en calidad y cantidad de ADN, los resultados en el rendimiento de ADN se explican debido al descenso progresivo de leucocitos conforme la edad incrementa, ya que el ADN se extrae a partir de este tipo de células. (Cuevas, 2013).

Cantidad y calidad mínima para realizar los estudios moleculares

Si se dispone de suficiente cantidad para la amplificación de ADN, se usan cantidades mínimas que oscila entre 10-100 ng/ul y el máximo entre 400-500 ng/ul. En cuanto a la integridad del ADN podremos hacer un cálculo visual de cuanto ADN tenemos por muestra. (Mas, Poza, Ciriza, Zagarozza, Osta, y Rodellar, 2001). Para obtener buenos resultados en el PCR la calidad de ADN no puede estar contaminado con proteínas,

Fenol, alcoholes o algunas otras sustancias que inhibe la reacción del PCR, por lo que se debe dejar el ADN limpio para poder amplificarlo (Espinosa, 2007)

2.3. Definición de términos:

➤ **Electroforesis.** Es el proceso de separar moléculas cargadas a través de la matriz de un gel mediante la aplicación de un campo eléctrico. La matriz del gel tiene un efecto de tamiz el cual permite que las moléculas sean separadas sobre la base de su tamaño, mientras el campo eléctrico separa las moléculas sobre la base de su carga.

➤ **Bases nitrogenadas.** Son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno.

Las bases nitrogenadas aparecen en los nucleosidos y nucleótidos que forman los ácidos nucleicos del ADN y ARN.

Las bases nitrogenadas se pueden clasificar en 02 grandes grupos: bases púricas (están formados por dos anillos un pentágono y un hexágono) adenina, guanina, bases pirimidínicas (están formados por un único anillo hexagonal) que son la citosina, timina y uracilo.

ADN = adenina (A) y timina (T) o guanina (G) y citosina (C) unidas por puentes de hidrógeno.

ARN = adenina (A) y uracilo (U) o guanina (G) y citosina (C) unidas por puentes de hidrógeno.

➤ **Ácidos nucleicos.** Son moléculas muy complejas en las cuales se almacenan la información genética de las células, es lo que forma el ADN y el ARN.

Son capaces de transcribirlas y transformarlas, de manera que las células puedan realizar sus funciones vitales.

Para formar los ácidos nucleicos (ADN o ARN) tenemos que unir nucleótidos.

El nucleótido de un ADN, están formados por una molécula pentosa desoxiribosa, un grupo fosfato, y una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina. El nucleótido de un ARN, están formados por una molécula de pentosa ribosa, grupo fosfato y una de las cuatro bases nitrogenadas: adenina, uracilo, citosina y guanina.

2.4. Hipótesis:

H₀: No existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)

H_a: Existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)

2.5. Variables:

2.5.1. Variable independiente:

- Matriz de extracción:
- Tejido embebido en parafina
 - Muestra de sangre (muestra convencional)

2.5.2. Variable dependiente:

- Cantidad: Concentración.
- Calidad: Pureza e Integridad.

2.6. Operacionalización de variables:

Cuadro 01. Operacionalización de variables.

VARIABLES	INDICADORES	ESCALA
Independientes		
Matriz de extracción	Niveles (TEP y sangre “muestra convencional”)	Cualitativa (Nominal)
Dependientes		
Concentración	Ng/ml – (Nano gramos sobre mililitros)	Cuantitativo (Continua)
Pureza	(Absorbancia 260/280) (Rango entre 1.8-2.0 indica que el ADN tiene una óptima calidad)	Cuantitativo (Continua)
Integridad	Pares de bases (Pb)	Cualitativa (Nominal)

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Ámbito temporal y espacial:

Temporal: El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo entre los meses de enero y marzo del 2019.

Espacial: La presente investigación se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos - Lachocc (CIDCS – Lachocc), el cual se encuentra ubicado en el distrito, provincia y región de Huancavelica.

3.2. Tipo de investigación:

Observacional.

3.3. Nivel de investigación:

Relacional.

3.4. Población, muestra y muestreo:

Población: 500 alpacas del Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos Lachocc Huancavelica.

Muestra:

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2} \quad \boxed{n = 52} \quad (\text{Garcia, Reding, y Lopez, 2013})$$

Z 1- α /2 = Valor Tipificado de Z	Z 1- α /2 =	1.82
Z 1- β = Valor Tipificado de Z	Z 1- β =	1.64
Varianza del Grupo 1	S ₁ ² =	0.50
Varianza del Grupo 2	S ₂ ² =	0.50
Diferencia propuesta	X ₁ - X ₂	0.50

Muestreo:

Aleatorio Simple.

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Obtención del TEP:

Fase de campo: obtención de muestras de tejidos

- Se seleccionó al azar el animal, se procedió a la sujeción y la inmovilización correcta.
- Se ubicó el costillar medio del lado derecho, cortar la fibra excedente y rasurar en un área suficiente como para obtener la muestra.
- La extracción de la piel se ha obtenido por punción, con un sacabocado de 8 mm de diámetro (*previamente desinfectado*), girando y haciendo presión suavemente.
- Se colocó el tejido extraído, inmediatamente en un frasco que contiene una solución fijadora de formol al 10%
- Se aplicó la tintura de yodo como antiséptico, en la zona de la extracción del tejido.
- Las muestras fueron trasladadas al laboratorio.

Fase de laboratorio:

1) Microm STP-120 (Pre-Fijación del tejido en parafina):

Se recibió los tejidos extraídos en el laboratorio, se procedió a realizar los siguientes procedimientos de **Fijación, deshidratación, clarificado e infiltración en parafina** en el equipo procesador rotatorio de tejidos Microm STP - 120, preparando antes las muestras de la siguiente manera:

- Se incluyeron las muestras en los casets de rejilla con tapa, rotulados adecuadamente
- Los casets fueron colocados en la cesta porta muestras del STP 120.
- Los 12 vasos del STP 120, fueron llenados de reactivos y programados de la siguiente manera:

Cuadro 02. Programa usado en el procesador de tejidos STP 120.

Nº de vaso	Reactivos	Tiempo de inmersión en horas/ min	Proceso	Definición del proceso
1	Formol	01:00	Fijación	Cuya función es mantener la estructura celular y composición de las células, evitando la autólisis y putrefacción
2	Formol	01:00		
3	Alcohol 70%	01:30	Deshidratación	Cuya función es remover el agua libre y no el agua dentro de la célula
4	Alcohol 80%	01:30		
5	Alcohol 96%	01:30		
6	Alcohol 100%	01:00		
7	Alcohol 100%	01:00		
8	Alcohol 100%	01:00		
9	Xylol	01:30	Clarificación	Cuya función es clarificar y extraer restos de alcohol de la célula (del proceso anterior).
10	Xylol	01:30		
11	Parafina	02:00	Infiltración	Cuya función es endurecer el tejido.
12	Parafina	02:00		

2) Microm EC 350 (Impregnación definitiva en parafina):

Es la etapa de impregnación definitiva del tejido en parafina; donde se realizó el siguiente procedimiento:

- Se llenaron pastillas de parafina en el depósito de parafina y se calentó a una temperatura de 62°C, hasta obtener parafina líquida.
- Se encendió la crio consola, a una temperatura de -12°C.
- Se alistó los moldes de inclusión de acero inoxidable de 24x24x6 mm.
- Cada muestra de tejido extraído de la cesta porta muestras del STP 120, donde fue colocado en moldes de inclusión de acero inoxidable de 24x24x6 mm y fue cubierto por su casset.
- Se vació la parafina líquida en el casset que contenía el molde de inclusión de acero inoxidable de 24x24x6 mm.
- La muestra fue enfriada en la crio consola a -12°C, hasta que se solidifique la parafina, posteriormente desprender el molde de inclusión de acero inoxidable, obteniendo los tacos embebidos en parafina.

Proceso de desparafinación (*echosafe ffpe deparaffinization solution*)

1. Se cortaron rebanadas de TEP con un micrótopo.
2. Se colocaron las rodajas de TEP en el fondo de un tubo ependorf de 1.5 ml.
3. Se agregó 3-5 gotas de solución de desparafinación *Echosafe* a las rodajas de TEP cortadas.
4. Las rodajas de TEP se disuelven inmediatamente, se agregó suficiente solución para cubrir completamente.

Obtención de ADN:

Extracción de ADN con el kit comercial (*DNA mini kit QIAamp de QIAGEN*)

Se realizó el protocolo del kit comercial estandarizado.

- Se colocó las muestras de piel lavada y desparafinada en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, se añadió 180 ul de tampón de lisis tissue (ATL), añadir 20 ul de proteinasa K (PK), mezclar mediante agitación (15 seg), e incubar a 56°C hasta que esté totalmente lisada (12 horas).
- Se añadió 200 ul de tampón de lisis (AL), se mezcló bien por agitación (15 segundos), 3 seg de spin rápido, incubar las muestras a 56°C durante 10 min.
- Se añadió 200 ul de etanol absoluto helado (llevar a la nevera por 10 min) y se mezcló bien por agitación (15 segundos)
- Se pipeteó la mezcla flotante y fue cambiado a una columna de centrifugación con su tubo recogida de 2 ml, centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto y se descartó todo y lo filtrado que se encuentra en el tubo recogida.
- Se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo recogida de 2ml, se añadió 500 ul de tampón de lavado 1 (AW1). Centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, descartar todo y lo filtrado que se encuentra en el tubo recogida.
- Se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de recogida de 2 ml, se añadió 500 ul de tampón de lavado 2 (AW2) y centrifugo a 14000 rpm durante 4 minutos, descartar todo y lo filtrado que se encuentra en el tubo recogida.
- Se transfirió la columna de centrifugación a un nuevo tubo de centrifuga con tapa de 2 ml.
- Se alícuota tampón de elución (AE) en tubos de centrifuga con tapa en promedio 200 ul por 1 muestra e incubar a 56°C por 4 minutos

- Se adicionó 200 ul de tampón de elución (AE) “precalentada a 56°C del paso anterior” a la columna de centrifugación con el tubo de centrifugar con tapa de 2 ml por debajo, se incubó durante 1 min a temperatura de 56°C sin revolución y centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto.
- Finalmente se almacenó el ADN a -20°C de los 2 tubos, del tubo centrifugar con tapa y la columna de centrifugación que en su reddecilla aún existe presencia de ADN, por si sea necesario.

Determinación de la concentración y pureza del ADN:

La cuantificación del ADN se obtuvo a través del equipo Nanofotómetro P330 de la marca IMPLEN.

Procedimiento de instalación y programación del equipo Nanofotómetro P330:

1. Encendido del nanofotómetro P330 pulsando la tecla ON / OFF
2. Se insertó la cubeta de medición a la ranura del equipo
3. Se pulsó el 1 para la opción aplicaciones del nanovolumen
4. Se pulsó el 1 para la opción de ácidos nucleicos
5. Se pulsó la opción 1 para el ADN de doble cadena
6. Se seleccionó la tapa de color rojo (LID 10) del nanofotómetro
7. Se cambiaron las unidades a ng/ul
8. Se seleccionó el factor 50.0 ng/ul
9. Se seleccionó la absorbancia 260/280 equivalente del ADN

Calibración en cero.

10. Se pipeteó 2 ul de agua ultrapura
11. Se vertió lo pipeteado sobre el centro de la ventana de medición
12. Cubrir con la tapa roja (LID 10)
13. Pulsar la tecla en blanco
14. Se leyó en la pantalla de lecturado los resultados deben ser cero “0”
15. Se retiró la tapa, y se utilizó el kleenex para limpiar el interior de la tapa y la parte superior de la ventana de medición.

Procedimiento para el lecturado de las muestras (concentración y pureza del ADN):

16. Se pipeteo 2 ul de la muestra líquida de ADN extraída con el kit Qiaamp.
17. Se vertió lo pipeteado sobre el centro de la ventana de medición
18. Se cubrió con la tapa roja (LID 10)
19. Pulsar la tecla sample
20. Leer y anotar de la pantalla la concentración del ADN (ng/ul)
21. Leer y anotar de la pantalla el resultado del valor A260/A280 (nm) que indica la pureza del ADN.
22. Se retiró la tapa y utilizó el kleenex para limpiar el interior de la tapa y la parte superior de la ventana de medición.
23. Se repitió los pasos del 10 - 22 para cada nueva muestra de ADN

Determinación de la integridad del ADN por electroforesis:

- **Integridad de ADN obtenido:** Se determinó con el equipo de electroforesis, el cual consistió en someter a una corriente eléctrica mientras se encuentra sumergido en un gel de agarosa por donde se desplazó en función de la corriente aplicada, el tiempo de migración, el tamaño y carga de las cadenas de ADN. (Alejos, Aragón, y Cornejo, 2010)

Preparación de solución TBE 5X (1000 ml)

1. Se pesó y combinó en un matraz los siguientes reactivos
 - 54 gr – tris base
 - 27.5 gr – Ácido bórico
 - 3.72 gr – EDTA (0.02 M)
 - 1000 ml de agua ultra pura
2. Con ayuda del agitador magnético, se agitó por 10 minutos a 500 rpm
3. Con un medidor de alcalinidad, se estandarizó el pH = 8, en este nivel tiene más eficacia el funcionamiento de los reactivos, se rebajó un poco con una solución ácida (Ácido clorhídrico HCl) para estandarizar al valor deseado.

Preparación de solución TBE 0.5X (1000 ml)

1. En un matraz se tomó la preparación anterior, 100 ml de TBE 5X y se añadió 900 ml de agua ultra pura, obteniendo así el TBE 0.5X.

Preparación de agarosa:

1. Se pesó 1.6 gr de agarosa en polvo.
2. En un matraz se vertió 150 ml de TBE 0.5X
3. Con movimientos lentos se combinó ambos, se debe impedir el pegado del polvo en las paredes del matraz.
4. Se llevó al microondas por 2 minutos, hasta obtener una combinación clara, sin grumos o burbujas.
5. Se esperó unos segundos para que disminuya la temperatura.
6. Se agregó 10 μ L de GELRED (Útil para teñir el ADN)
7. Se armó la bandeja plástica formadora del molde de gel de agarosa con su respectivo peine para crear los orificios o pocillos en el molde del gel de agarosa.
8. Se vertió sobre la bandeja plástica formadora de gel de agarosa, la solución preparada anteriormente puntos 4 y 7.
9. Se dejó enfriar por 35 minutos aproximadamente, hasta observar la solidificación de la solución preparada y la formación del molde del gel de agarosa.
10. En la bandeja de electroforesis, se midió y vertió 700 ml de TBE 0.5X.
11. Una vez enfriado y formado el molde del gel de agarosa, se desarmó cuidadosamente la bandeja plástica formadora del gel de agarosa y sumergió sobre el punto 10, además se debe separar el peine y corroborar la formación de los pocillos en el molde del gel de agarosa.
12. Se incluyó un fondo negro por debajo de la bandeja de electroforesis.
13. Se cortó y dobló una parte de papel parafilm
14. Con ayuda de una pipeta (1-10 μ L), se pipeteó en el papel parafilm con una sola puntilla, 2.5 μ L de tampón de carga (azul de bromofenol, sileno y glicerina) para 1 muestra y con repeticiones del número total de muestras calculadas.
15. Se pipeteó 5 μ L de muestra y se combinó correctamente (absorbiendo y expulsando 2 veces) con el 2,5 μ L de tampón de carga del paso anterior (punto 14), obteniendo un volumen total de 7,5 μ L.

16. Se pipeteó el volumen total combinado (7,5 µl de muestra) y se cargó en el pocillo del molde del gel de agarosa.
17. Cada pocillo estuvo cargada una muestra diferente.
18. En el último pocillo del molde del gel de agarosa, se vertió 10µl de marcador de ADN.
19. Se tapó la bandeja de electroforesis.
20. Se conectó los ganchos positivos y negativos respectivamente.
21. Se encendió la caja reguladora de voltaje y configurar a 80 Voltios.
22. Se esperó por 4 horas aproximadamente, hasta observar el desplazamiento de las bandas de ADN de negativo a positivo, hasta alcanzar los $\frac{3}{4}$ partes de la bandeja de electroforesis.
23. Alcanzado el nivel de migración del ADN hasta las $\frac{3}{4}$ partes de la bandeja de electroforesis, se apagó la caja reguladora de voltaje, y se retiró los ganchos.
24. Se llevó el molde del gel de agarosa a la bandeja del fotodocumentador de geles.
25. Se Encendió la laptop que se encuentra conectado al fotodocumentador y abrir el programa instalado para el equipo mencionado (Smartview).
26. Se abrió el programa Smartview, activar la opción de luz uv e intensidad de uv, se observó y capturo las bandas de ADN migrados en el molde de gel de agarosa.
27. Por último se capturó las imágenes y guardaron en la carpeta deseada.

3.6. Técnicas de procesamiento y análisis datos:

Para el análisis de datos se utilizó estadística descriptiva y la prueba de T de Student para muestras independientes. Se realizó un análisis exploratorio, pasando luego por las pruebas de Shapiro Wilks y de Levene para evaluar la normalidad y homogeneidad de varianzas de las variables en estudio. En las variables que no cumplieron con los supuestos de varianzas mencionados se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Cantidad de ADN, extraído a partir de TEP y sangre

Cuadro 03. Concentración (ng/ul) de ADN en TEP y sangre:

Cantidad	N	Min.	Máx.	Media	Desviación estándar
TEP	26	26	167	71.69 ^a	± 31.00
Sangre	26	18.5	260	68.85 ^a	± 52.84

*Letras iguales en la misma columna indican que no existe diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos para TEP, se observa que la concentración mínima y máxima de ADN es de 26 ng/ul y 167 ng/ul respectivamente, y una media de concentración de ADN de 71.69 ± 31.00 ng/ul.

La concentración mínima y máxima de ADN extraída a partir de muestras de sangre es de 18.5 ng/ul y 260 ng/ul respectivamente, y una media de concentración de ADN de 68.85 ± 52.84 ng/ul.

4.2. Calidad de ADN, extraído a partir de TEP y sangre

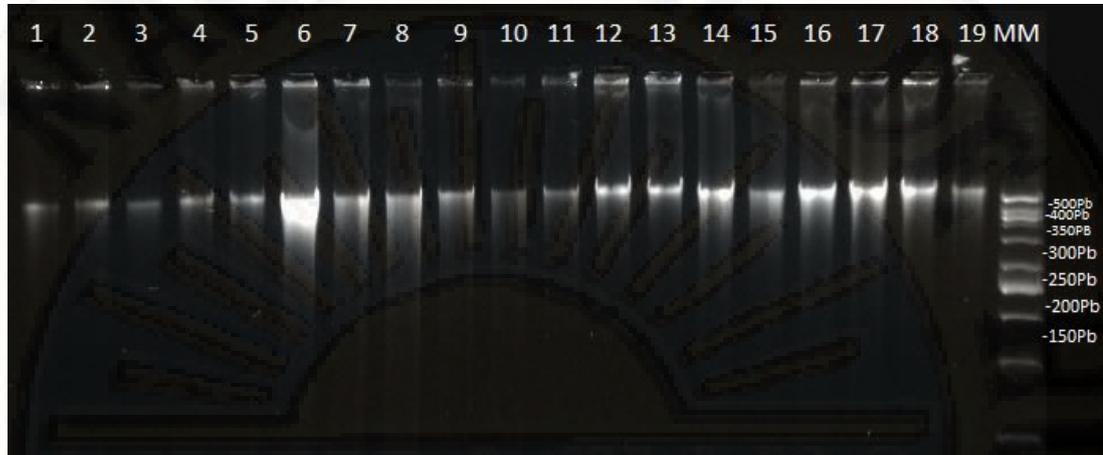
Cuadro 04. Pureza (A260/A280 nm) de ADN en TEP y sangre:

Calidad	N	Min.	Máx.	Media	Desviación estándar
TEP	26	1.696	1.827	1.780 ^a	± 0.03
Sangre	26	1.816	2.033	1.902 ^b	± 0.05

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas ($P<0.05$).

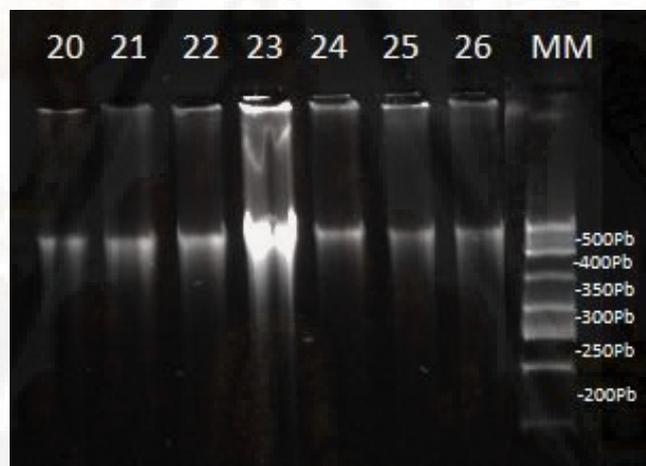
Los valores encontrados para pureza fueron de 1.780 ± 0.03 nm y 1.902 ± 0.05 para TEP y sangre respectivamente.

Gráfico 01. Integridad del ADN, a partir de muestras de TEP migrados en gel de agarosa



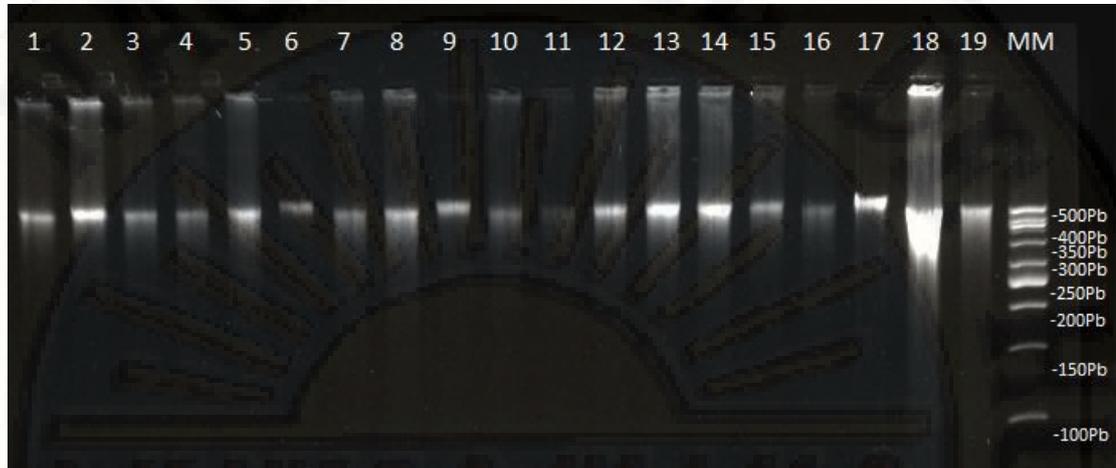
En el grafico se observa la migración de ADN extraído a partir de TEP, utilizando la técnica de electroforesis, con barridos cortos, notorios y cercanos a los 500pb. Lo que indica una buena integridad del ADN.

Gráfico 02. Integridad del ADN, a partir de muestras de TEP migrados en gel de agarosa



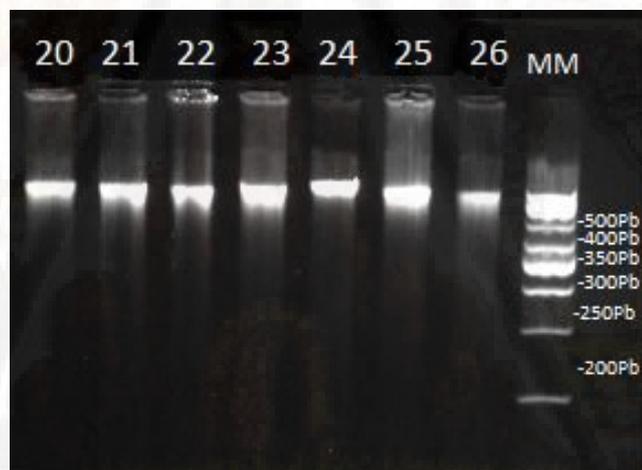
En el grafico se observa la migración de ADN extraído a partir de TEP, utilizando la técnica de electroforesis, con barridos cortos, notorios y cercanos a los 500pb. Lo que indica una buena integridad del ADN.

Gráfico 03. Integridad del ADN, a partir de muestras de sangre migrados en gel de agarosa



En el grafico se observa, la migración de ADN extraído a partir de sangre (muestra convencional) utilizando la técnica de electroforesis, con barridos cortos, notorios y cercanas a los 500pb. Lo que indica una buena integridad del ADN.

Gráfico 04. Integridad del ADN, a partir de muestras de sangre migrados en gel de agarosa



En el grafico se observa la migración de ADN extraído a partir de sangre (muestra convencional) utilizando la técnica de electroforesis, con barridos cortos, notorios y cercanas a los 500pb. Lo que indica una buena integridad del ADN.

4.3. Comparación entre cantidad y calidad de ADN, obtenido a partir de TEP y sangre:

- La cantidad de ADN obtenido a partir de TEP y sangre son iguales estadísticamente.
- La calidad de ADN obtenido a partir de TEP y sangre son diferentes estadísticamente.

4.4. Discusión de resultados

Cantidad de ADN en TEP y sangre:

Estos resultados son similares con los obtenidos por Estevam et al., (2007) quienes reportaron la concentración de ADN de 67.38 ± 44.59 ng/ul a partir de muestras en material parafinado de carcinoma de la boca de humanos con el minikit QIAamp y Bustamante et al., (2011) reportaron la concentración de ADN de 69.89 ± 6.02 ng/ul, a partir de biopsias embebidas en parafina en pleura y pericardio en humanos con el kit QIAamp-DNA. Los resultados son similares probablemente por el uso del mismo kit de extracción. Por otro lado, resultados superiores de 123 ng/ul de ADN fueron reportados por Montenegro et al., (2012) a partir de muestras de sangre de alpacas utilizando el kit Promega Wizard. Estevam et al., (2007) reportaron la concentración de ADN 120.62 ± 70.5 ng/ul a partir de muestras en material parafinado de carcinoma de la boca en humanos con el kit chelex100. Los resultados son superiores en sangre probablemente porque el tiempo de incubación de lisis fue mayor entre (20 horas) a 55°C , además, agregó más volumen de solución de lavado 800 μl con 4 repetición por lavado y en TEP probablemente tienen mejores resultados, porque las técnicas de desparafinación es diferente, sus muestras fueron desparafinados con 100 ul de solución Tween 0,5%. después los tubos se calentaron a 90°C durante 10 minutos y se enfrió a 55°C . Además, en la extracción de ADN, usaron el chelex100, el cual ayuda al proceso de lisis a parte de los tampones de purificación, lavados y precipitación.

Por otro lado, resultados inferiores de ADN 9.0 ± 2.1 ng/ul fue reportado por Espinoza (2017) a partir de sangre en alpacas utilizando el kit DNeasy BloodyTissue y Cuevas (2013) reportó la concentración de ADN 53.43 ± 28.31 ng/ul a partir de muestras de sangre en bovinos con el kit Maxwell16 LEV blood AS1010. Los resultados son inferiores en sangre de alpaca porque el tiempo del proceso de lisis fue menor solo 10 minutos y en sangre de bovinos por utilizar menos cantidad de muestra de sangre solo 50 μl para extraer ADN.

Pureza de ADN en TEP y sangre:

Estos resultados son similares con los obtenidos por Montenegro et al., (2012) quienes reportaron una pureza >1.8 nm en ADN obtenido a partir de muestra de sangre en alpacas. Así mismo, Cuevas (2013) indicó una pureza de 1.860 ± 0.08 nm a partir de muestras de sangre de bovinos y Paredes (2013) indicó una pureza de 1.880 nm a partir de muestra de sangre en llamas. Son similares probablemente porque utilizaron el mismo kit de extracción de ADN. Por otro lado, resultados inferiores de 1.1 nm fueron reportados por Estevam et al., (2007) en ADN a partir de muestras con carcinoma de la boca en material de parafina y Bustamante et al., (2011) indicaron una pureza de 1.41 nm a partir de biopsias de pleura, pulmón y pericardio embebidas en parafina. Los resultados a partir de TEP son inferiores probablemente por la eficiencia de los procedimientos en la manipulación o por presencia de restos de fenoles que no fueron adecuadamente removidos.

Integridad de ADN en TEP y sangre:

En los gráficos 1 y 2, para muestras de TEP, se observa un barrido casi notorio y cortos, según señala el marcador de peso molecular, se observa la mayoría de las bandas cercanas a los 500pb.

En los gráficos número 3 y 4 para muestras de sangre, se observa un barrido corto en todas las muestras y un 35% de las muestras con un barrido más intenso, según señala el marcador de peso molecular, se observa la mayoría de las bandas a los 500pb.

Conclusiones

La cantidad (71.69 ± 31.00 ng/ul.) de ADN obtenido a partir tejidos embebidos en parafina, es suficiente, ya que la cantidad mínima requerida para realizar estudios moleculares es de 10 ng/ul.

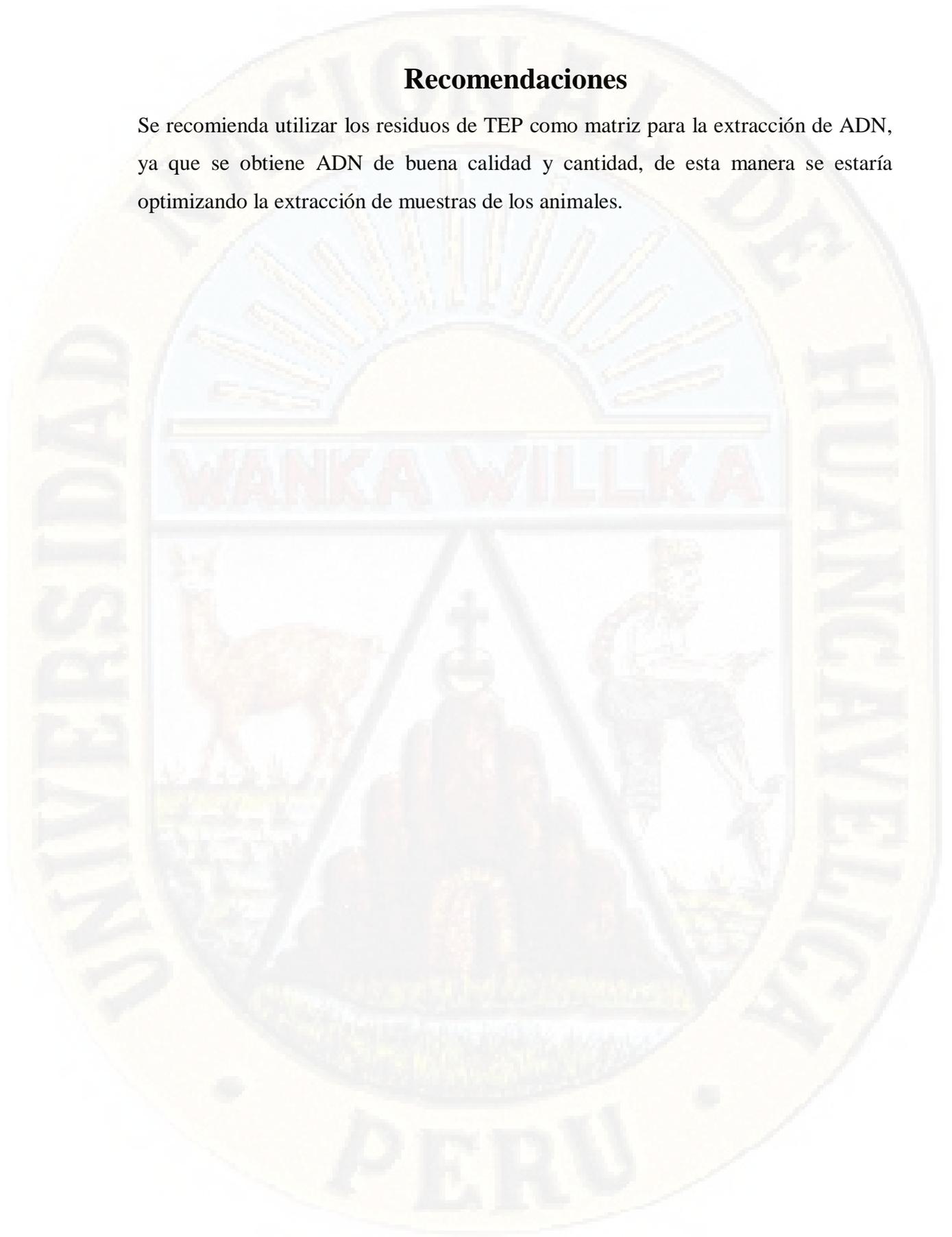
La calidad (pureza = 1.780 ± 0.03 nm) del ADN obtenido a partir de tejidos embebidos en parafina se encuentra muy cerca del rango óptimo.

La cantidad de ADN obtenido a partir de tejidos embebidos en parafina y sangre son similares.

La calidad de ADN obtenido a partir de sangre es de mejor calidad, que el ADN obtenido a partir de tejidos embebidos en parafina.

Recomendaciones

Se recomienda utilizar los residuos de TEP como matriz para la extracción de ADN, ya que se obtiene ADN de buena calidad y cantidad, de esta manera se estaría optimizando la extracción de muestras de los animales.



Referencias bibliográficas

- Alejos, V. L., Aragón, M. M., y Cornejo, R. A. (2010). Extracción y purificación de ADN. 2-14.
- Ayala, R. P., Salazar, S. M., Cadena, C. P., y Zarante, M. I. (2009). Comparación de 3 métodos de extracción de dna de tejidos embebidos en parafina. *genética*, (p. 18).
- Bustamante, J. A., Astudillo, M., Pazos, A. J., y Bravo, L. E. (2011). Evaluación de dos métodos de extracción de adn a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biológica Colombiana*, 11-14.
- Bustinza. (1984). Rendimiento del vellón de la Alpaca. Problemática Sur Andina N° 7. IIDSA. *Universidad Nacional del Altiplano. Puno. Perú.*
- Bustinza. (1991). Mejoramiento genético de alpacas y llamas. Producción de rumiantes menores-alpacas. *Edit. Novoa C. y Flores A. Lima-Perú.*
- Carrasco, D. S. (2005). Metodología de investigación científica. *San Marcos - Perú*, 2.
- Checa, R. A. (2017). Extracción de ADN. *Bioquímica y biología molecular*, 3-4.
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A. B., y Rocha, M. M. (2014). Herramientas moleculares Aplicadas en Ecología (Aspectos teóricos y prácticos). *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 5.
- Cuesta y Herrero. (2004). Introducción al muestreo. (p.90).
- Cuevas. (2013). Uso de marcadores moleculares para verificar la genealogía de bovinos jersey. 36 - 40.
- Espinosa Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. 12.
- Espinoza, B. M. (2017). Análisis de cantidad y calidad de ADN genómico extraído en folículos pilosos y sangre de Vicugna pacos "ALPACAS" mediante el método comercial. 50-62.
- Estevam, S. L., Fernando, G. J., Maroni, N. C., y Issamu, M. G. (2007). Evaluación de dos métodos de extracción de ADN de parafina. (p.123-125).
- Friedrich, N. O. (2015). Bienestar animal. *Bienestar animal en general y en varias especies*, 1-2.
- Fujita. (2007). Genómica y su aplicación en producción animal. *Centro de genética y biología molecular - facultad de medicina Universidad de San Martín de Porres Vol. 15*, p. 21-22.
- García, G. J., Reding, B. A., y López, A. J. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación en educación médica 2*, 217-224.
- Manteca, X., Mainau, E., y Temple, D. (2013). Estrés en animales de granja; concepto y efectos sobre la producción. *Farm animal welfare education centre (FAWEC)*, 1-2.

Martinez, G. S. (1998). Detección de mutaciones en el oncogen k - ras en neoplasias epiteliales colorrectales. *S. 12 - 15.*

Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., y Rodellar, C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Laboratorio de Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España) - AquaTIC, 3-4.*

Maturrano, H. L., Aguilar, L. J., Kruger, D. P., Chávez, I. J., y Rosadio, A. R. (2012). Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*vicugna vicugna mensalis*). *Scielo Perú, 3.*

Meza, G., Ulloa, J. C., Uribe, A. M., y Gutiérrez, M. F. (2013). Técnica no convencional de extracción de adn partir de tejido embebido en parafina para uso en la reacción en cadena de la polimerasa. *Extracción de ADN de tejido en parafina, (p. 35-36).*

Montenegro, V. V., Maturrano, . L., Wheeler, J. C., y Rosadio, A. R. (2012). Determinación del sexo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en camélidos sudamericanos. *Rev Inv Vet Perú, (377-379).*

Paredes, R. G. (2013). Caracterización molecular de las llamas (*Lama glama*) Ch'aku y Ccara del banco de germoplasma de alpacas de color y llamas del centro experimental Illpa-Inia anexo Quimsachata, usando marcadores microsátélites. *Universidad Agraria La Molina, 34.*

Paucar, S. Y., y Sedano, D. I. (2014). Correlación entre índice folicular, peso de vellón y diámetro de fibra en alpacas de raza huacaya de color blanco. *38.*

Rios, S. E., Calleros, E., Gonzáles, Z. A., Rubio, J., Martinez, O., Martinez, A., Pérez, M. R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta universitaria, 4-5.*

Stemmer, A., Valle, Z. A., Nuernberg, M., Delgado, J., y Wurzinger, M. (2005). La llama de Ayopaya: descripción de un recurso genético autóctono. *Archivos de Zootecnia,, 5-6.*

Supo, J. (2015). De niveles, tipos y diseños de investigación científica. *Investigacion científica.*

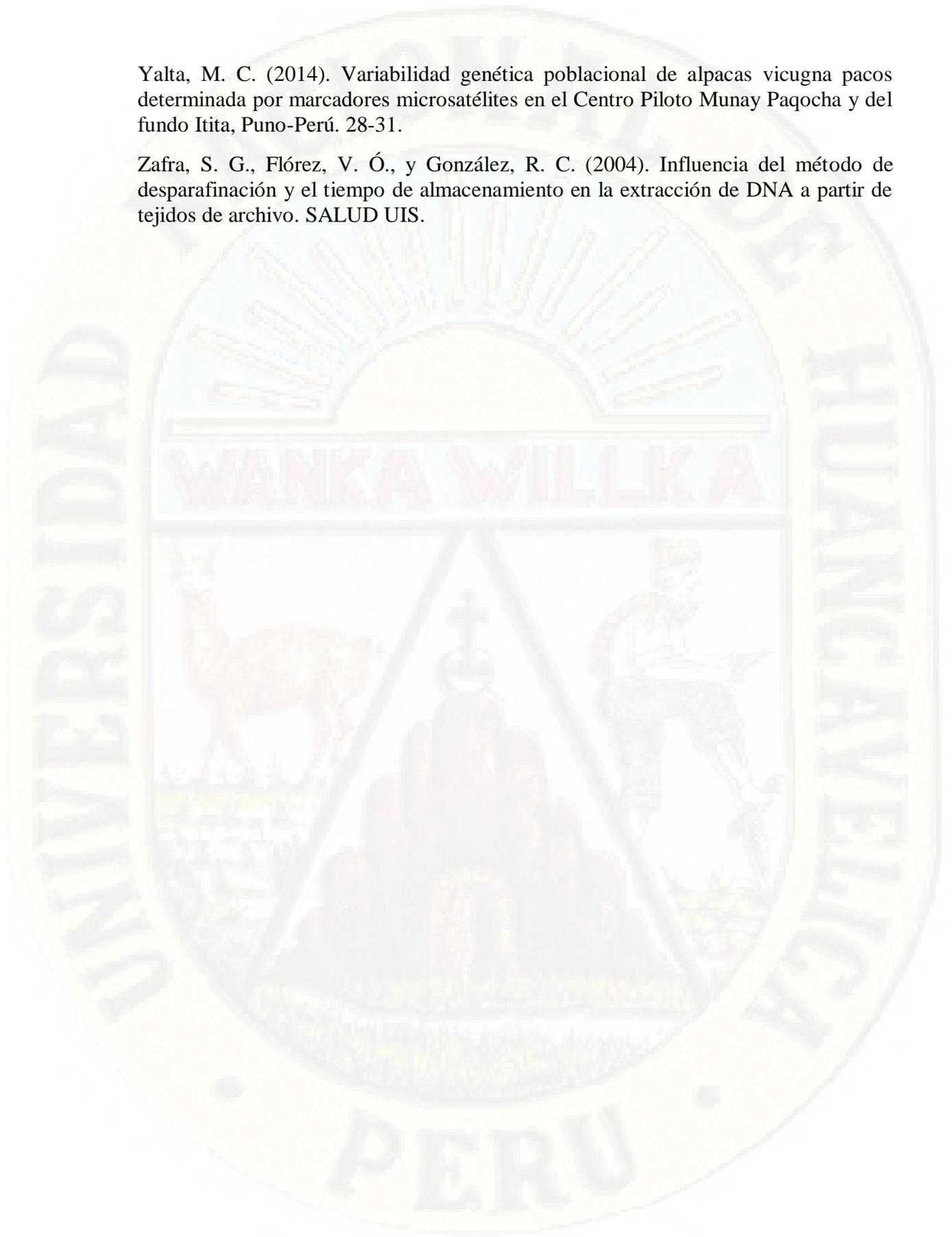
Tamayo, A. L. (2002). Asociación y predicción del riesgo de lesión intraepitelial escamosa y cáncer cervicouterino en función de los factores: infección por el virus del papiloma humano, gineco obstétricos, comportamiento sexual, sociodemográficos y antecedentes genéticos. *Universidad de Colima, 54-150.*

Vega, S., y Watanabe, R. (2016). Análisis de la Ley 30407 «Ley de Protección y Bienestar Animal» en el Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 1-2.*

Wheeler. (1991). Origen, evolución y status actual (de los camélidos). En: S. Fernández-Baca, ed. Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Santisgo - Chile. *FAO/RLA.*

Yalta, M. C. (2014). Variabilidad genética poblacional de alpacas vicugna pacos determinada por marcadores microsatélites en el Centro Piloto Munay Paqocha y del fundo Itita, Puno-Perú. 28-31.

Zafra, S. G., Flórez, V. Ó., y González, R. C. (2004). Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. SALUD UIS.



Anexos

A. Resultados de análisis estadísticos de la cantidad (concentración) de ADN entre sangre y TEP.

Gráfico 05. Histograma del análisis de concentración de ADN entre sangre y TEP.

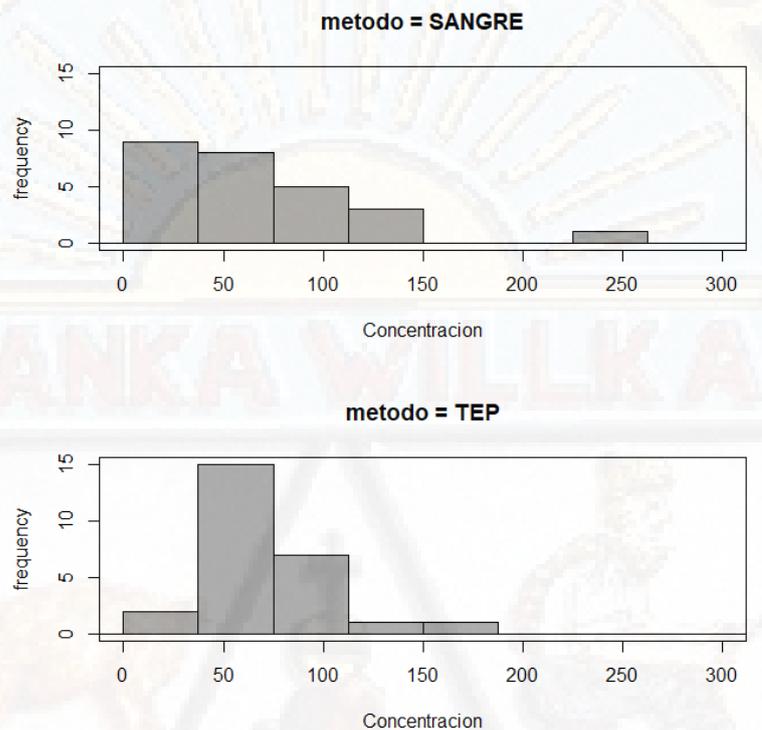
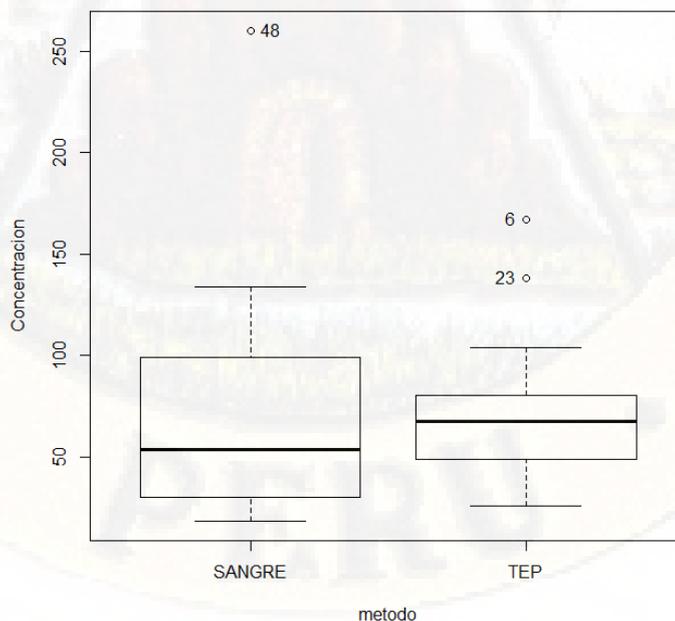


Gráfico 06. Diagramas de cajas y bigotes del análisis de concentración de ADN entre sangre y TEP.



Prueba de normalidad

```
Rcmdr> normalityTest (Concentración ~ método, test="shapiro.test", data=Cantidad)
```

Método = SANGRE

Shapiro-Wilk normality test

Data: Concentración

W = 0.80442, p-value = 0.0002095

Método = TEP

Shapiro-Wilk normality test

Data: Concentración

W = 0.8914, p-value = 0.01011

Prueba de homogeneidad de varianzas

```
Rcmdr> leveneTest(Concentración ~ método, data=Cantidad, center="mean")  
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")
```

Df	F value	Pr (>F)
group 1	4.7873	0.03337 *

Prueba de WILCOXON para 2 muestras

```
Rcmdr> wilcox.test(Concentración ~ método, alternative="two.sided", data=Cantidad)
```

Wilcoxon rank sum test with continuity correction

Data: Concentración by método

W = 280.5, p-value = 0.2968

B. Resultados de análisis estadísticos de la calidad (pureza) de ADN entre sangre y TEP.

Gráfico 07. Histograma del análisis de pureza de ADN entre sangre y TEP.

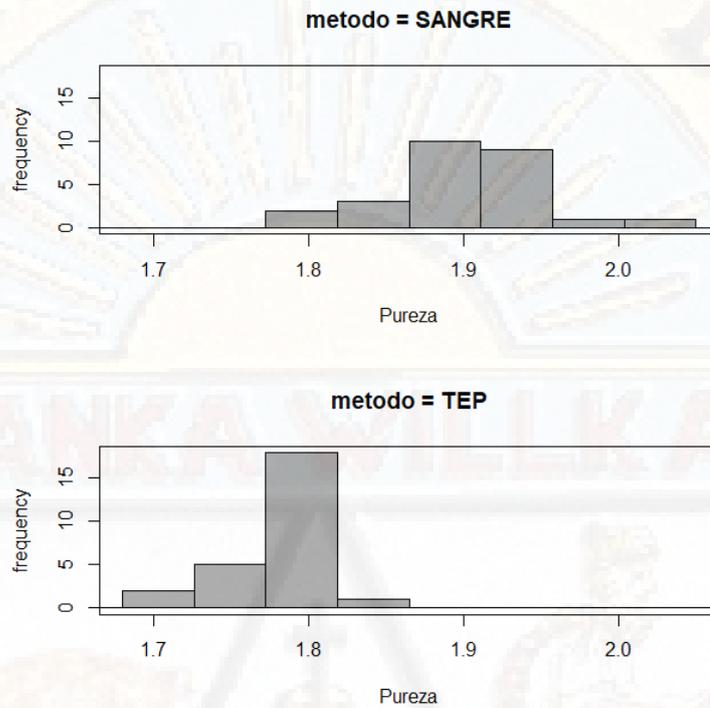
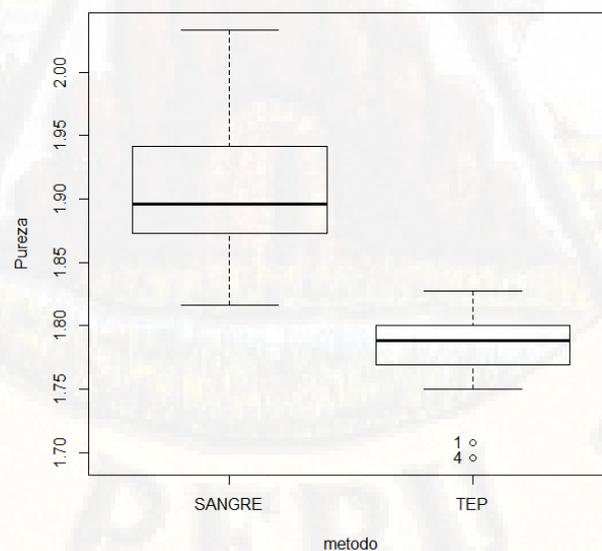


Gráfico 08. Diagramas de cajas y bigotes del análisis de pureza de ADN entre sangre y TEP.



Prueba de normalidad

```
normalityTest(Pureza ~ metodo, test="shapiro.test", data=Pureza)
```

Método = SANGRE

Shapiro-Wilk normality test

Data: Pureza

W = 0.97031, p-value = 0.6314

Método = TEP

Shapiro-Wilk normality test

Data: Pureza

W = 0.897, p-value = 0.01343

Las observaciones en TEP no siguen una distribución normal

Homogeneidad de varianza

```
LeveneTest(Pureza ~ método, data=Pureza, center="mean")
```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "mean")

	Df	F value	Pr (>F)
--	----	---------	---------

group 1	7.5	0.008527	**
---------	-----	----------	----

Prueba de wilcoxon para 2 muestras

```
wilcox.test(Pureza ~ método, alternative="two.sided", data=Pureza)
```

Data: Pureza by método

W = 673, p-value = 9.21e-10

alternative hypothesis: true location shift is not equal to 0

C. Concentración (ng/ul) de ADN por matriz de extracción:

Cuadro 05. Base de datos de la concentración de ADN por matriz de extracción

Nº	TEP	SANGRE
1	55.50	51.50
2	38.50	101.00
3	68.50	134.00
4	67.00	43.00
5	37.00	28.50
6	167.00	55.50
7	78.00	23.50
8	75.00	30.00
9	39.50	42.00
10	42.00	20.00
11	26.00	34.50
12	70.00	72.00
13	63.00	73.00
14	81.00	38.00
15	61.50	62.00
16	104.00	18.50
17	72.50	122.00
18	80.50	117.00
19	67.00	101.00
20	97.00	99.00
21	67.00	32.00
22	97.50	260.00
23	138.00	88.00
24	48.50	97.50
25	75.50	21.50
26	47.00	25.00
<i>Promedio</i>	71.69	68.85

D. Pureza A260/280 (nm) de ADN por matriz de extracción:

Cuadro 06. Base de datos de la pureza de ADN por matriz de extracción.

Nº	TEP	SANGRE
1	1.708	1.873
2	1.750	1.888
3	1.827	1.854
4	1.696	1.911
5	1.805	1.900
6	1.815	1.820
7	1.753	1.880
8	1.807	1.875
9	1.795	1.867
10	1.750	1.818
11	1.793	1.816
12	1.795	1.846
13	1.800	1.947
14	1.800	1.919
15	1.809	2.033
16	1.769	1.947
17	1.790	1.944
18	1.789	1.887
19	1.787	1.980
20	1.764	1.941
21	1.787	1.939
22	1.773	1.930
23	1.781	1.892
24	1.796	1.875
25	1.776	1.955
26	1.774	1.923
<i>Promedio</i>	1.780	1.902

E. Fotografías de los procedimientos para la obtención de tejido de alpacas:



Foto 01. Alpacas por seleccionar al azar



Foto 02. Alpacas entrando a la manga



Foto 03. 55 Alpacas seleccionadas al azar



Foto 04. Materiales para la extracción De tejido



Foto 05. Ubicación del costillar medio



Foto 06. Cortado de la fibra excedente



Foto 07. Lavado de la zona ubicada



Foto 08. Rasurado de la zona a extraer el tejido



Foto 09. Zona limpia, lista para extraer el tejido con sacabocado de 8 mm de diámetro



Foto 10. Presión ligera con movimientos rotatorios



Foto 11. Tejido marcado y cortado con ayuda del sacabocado



Foto 12. Extracción de tejido con bisturí y pinza



Foto 13. Tejido extraído y sumergido en formol



Foto 14. Aplicación de yodo en la zona afectada



Foto 15. Muestra rotulada y sumergida en formol.

PROCEDIMIENTOS EN LABORATORIO PARA CONSERVACION DEL TEJIDO - PRE PARAFINACION



Foto 16. Preparación del equipo MICROM STP – 120



Foto 17. Preparación de alcohol de 70, 80, 96 y 100%.

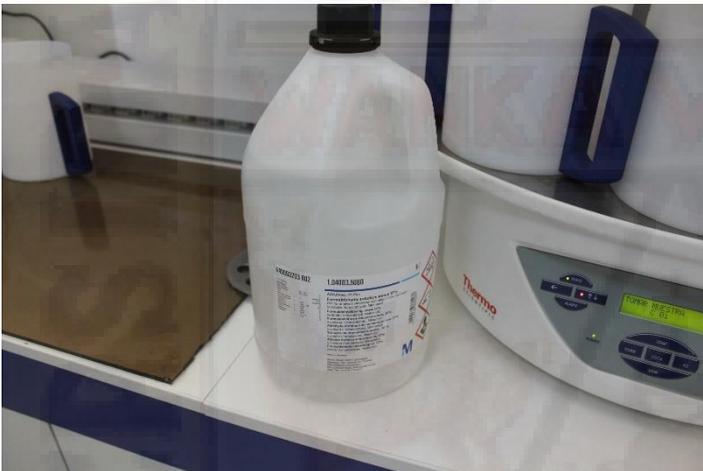


Foto 18. Formol

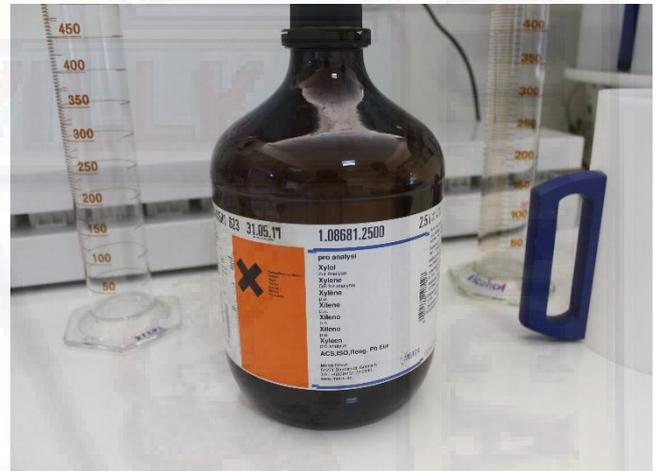


Foto 19. Xilol

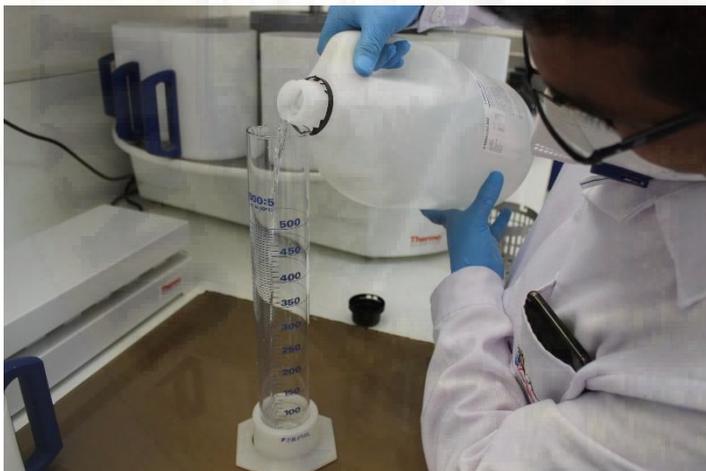


Foto 20. Medición de 1 litro los reactivos, formol, alcohol, xilol y parafina líquida



Foto 21. Llenado de los reactivos en las jarras del equipo MICRON STP - 120



Foto 22. Jarras llenas de reactivo, listas para funcionar

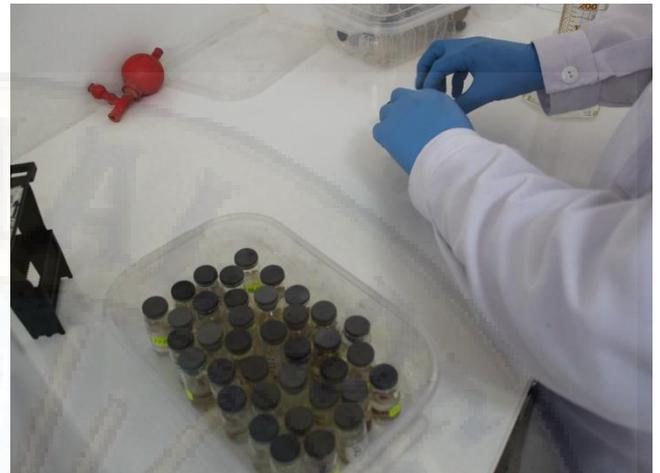


Foto 23. Preparación de tejidos, sumergidos en formol



Foto 24. Preparación de



Foto 25. Rotulado de casets

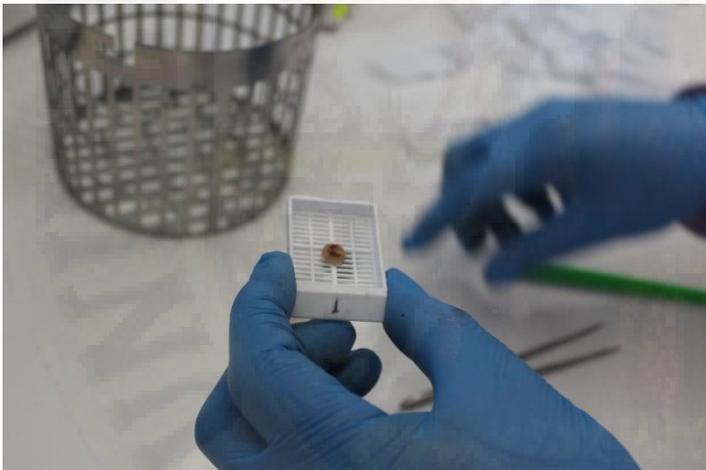


Foto 26. Inclusión del tejido al caset con rejilla

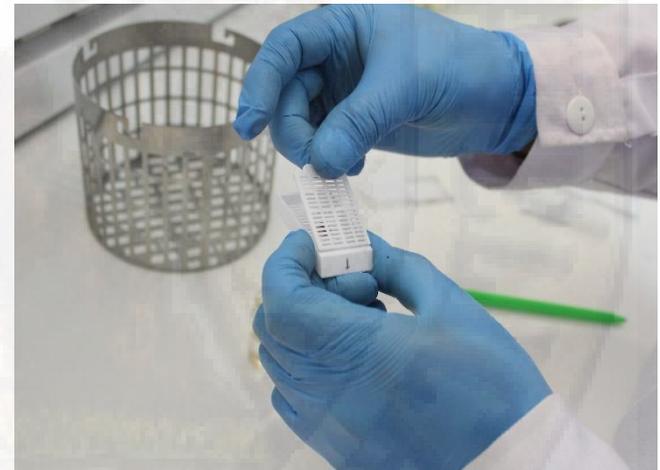


Foto 27. Tapado de caset



Foto 28. Inclusión del caset en la rejilla del equipo MICROM STP-120

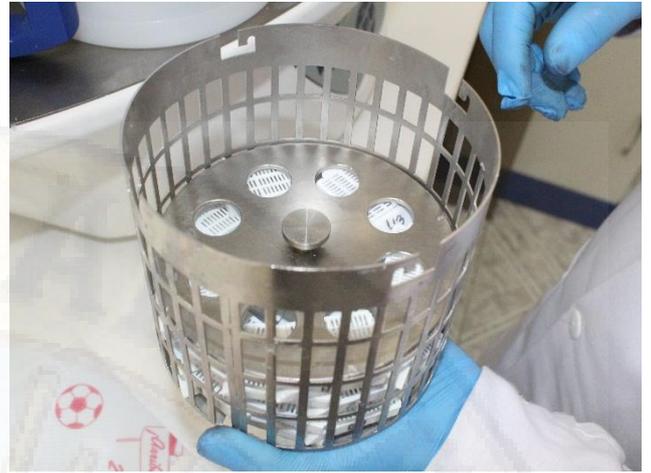


Foto 29. Inclusión del casets en la canastilla del equipo MICROM STP-120



Foto 30. Canastilla incorporada al MICROM STP-120

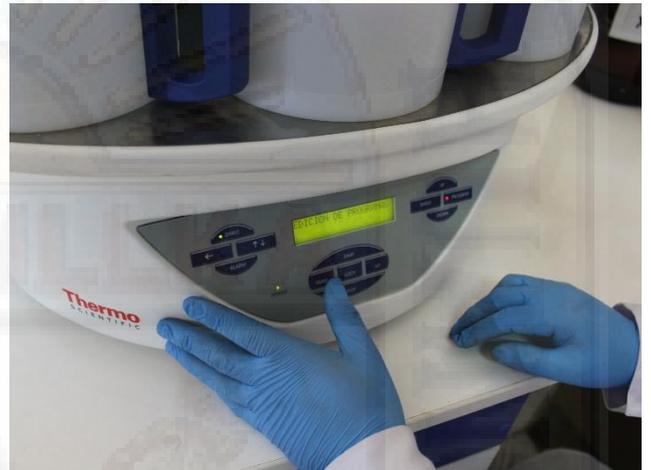


Foto 31. Programación del equipo MICROM STP – 120, realizando la **Fijación, deshidratación, clarificado e infiltración en parafina** en el equipo procesador rotatorio de tejidos

PROCEDIMIENTOS EN LABORATORIO PARA IMPREGNACION DEFINITIVA EN PARAFINA MICROM EC-350



Foto 32. Retirado de canastilla después de 24 horas del MICROM STP-120



Foto 33. Retirado de casets de la canastilla

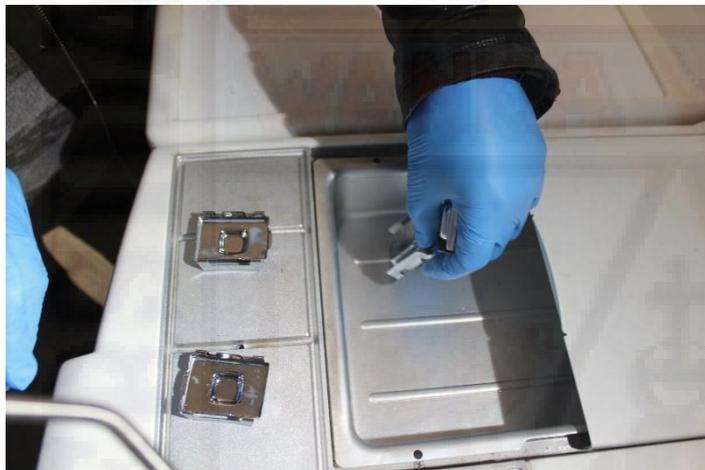


Foto 34. Preparación de moldes de inclusión en acero inoxidable de 24x24x6 mm



Foto 35. Preparación de pinzas



Foto 36. Separado de tejido del caset



Foto 37. Tejido situado en los moldes de inclusión

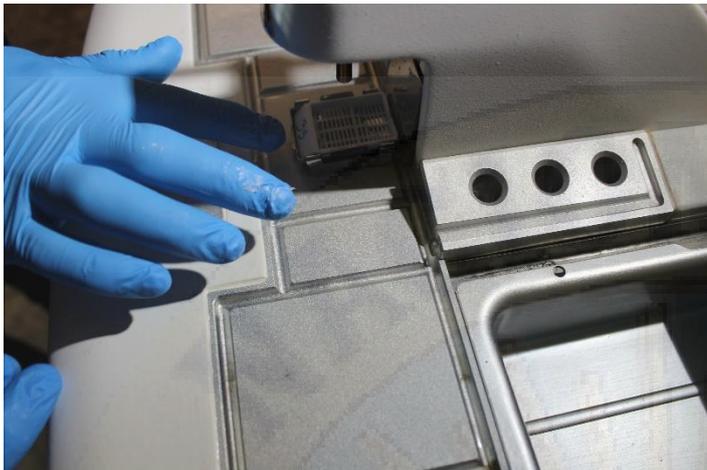


Foto 38. Canastilla sin tapa, incluida en el molde de inclusión

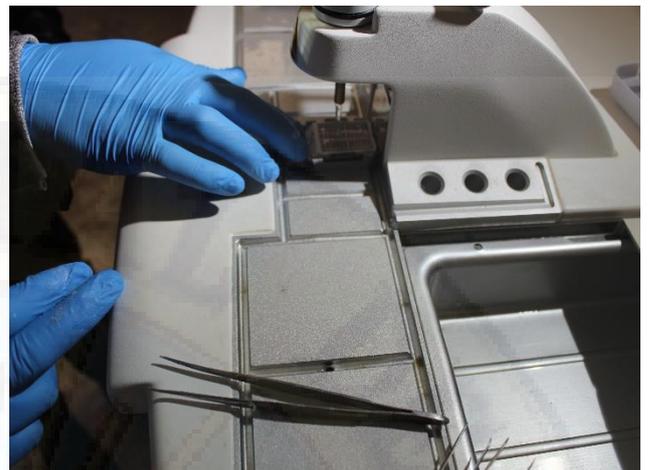


Foto 39. Agregado de parafina líquida a la canastilla por debajo, el tejido y el molde de inclusión



Foto 40. Canastilla y molde al ras con parafina líquida



Foto 41. La muestra será enfriada en la crio consola a -12°C , hasta que se solidifique la parafina, posteriormente desprender el molde de inclusión de acero inoxidable, obteniendo los tacos embebidos en parafina.



Foto 42. Muestras solidificándose en la crio consola del MICROM EC-350



Foto 43. Muestra solidifica de parafina o tacos de parafina

DESPARAFINACIÓN (ECHOSAFE FFPE DEPARAFFINIZATION SOLUTION)

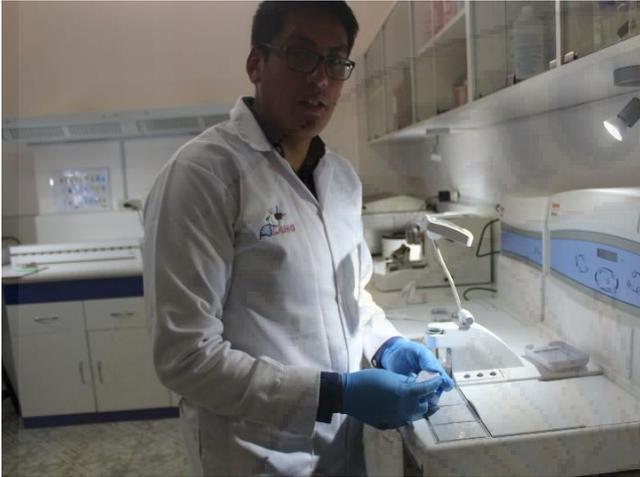


Foto 44. Corte de rebanadas de TEP con un micrótopo



Foto 45. Rodajas de TEP en el fondo de un tubo ependorf de 1.5 ml



Foto 46. Agregue 3-5 gotas de solución de desparafinación EchoSAFE a las rodajas de TEP



Foto 47. Las rodajas de parafina se disuelven inmediatamente. Agregue suficiente solución para cubrir completamente.

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DE ADN CON EL KIT COMERCIAL DNA mini kit QIAamp de QIAGEN

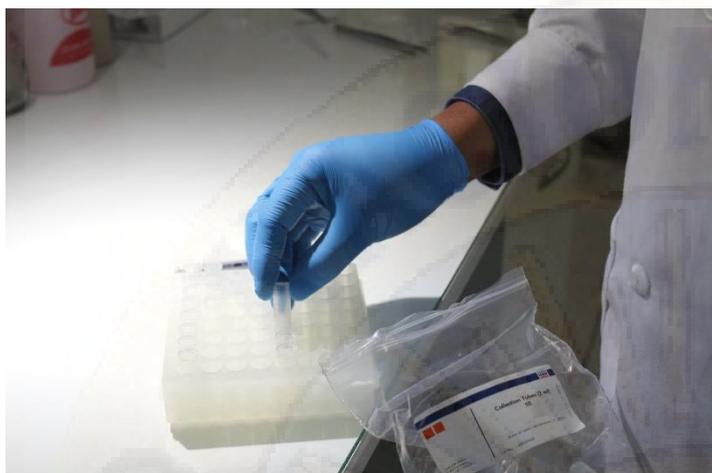


Foto 48. Se colocó las muestras desparafinadas y lavadas en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml



Foto 49. Añadir 180 UL de tampón ATL y 20 UL de proteinasa K



Foto 50. Buffer ATL



Foto 51. Proteinasa K



Foto 52. Mezclar con spin rápido por 20 segundos



Foto 53. Incubación de muestras a 56°C por 12 horas (Totalmente lisada)

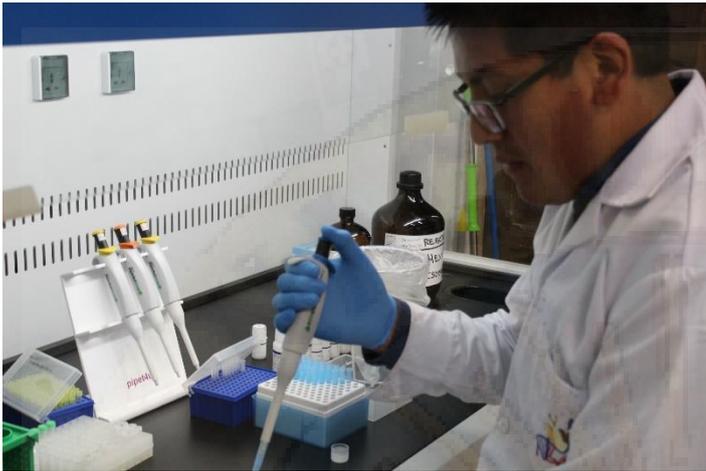


Foto 54. Añadir 200 UL de buffer AL

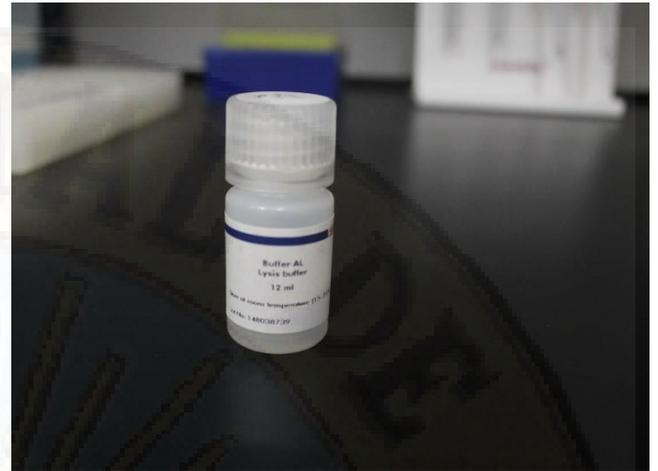


Foto 55. Buffer AL



Foto 56. Mezclar bien con spin rápido



Foto 57. Incubar las muestras a 56°C durante 10 min



Foto 58. Al mismo tiempo del paso anterior alicuotar y llevar etanol absoluto a la nevera por 10 min

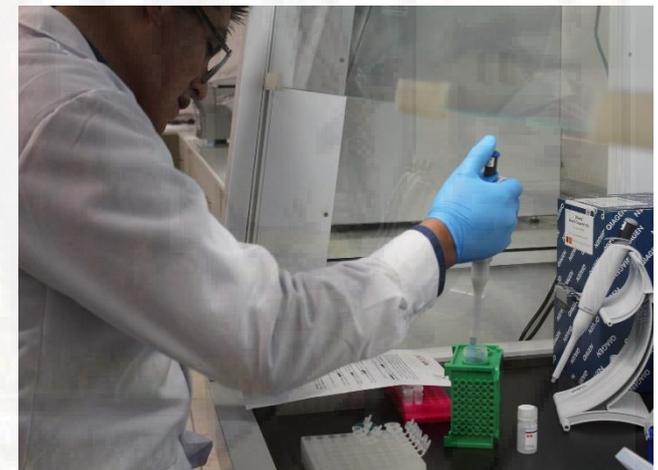


Foto 59. Añadir a la muestra incubada, 200 UL de etanol absoluto bien helado y mezclar por agitación.

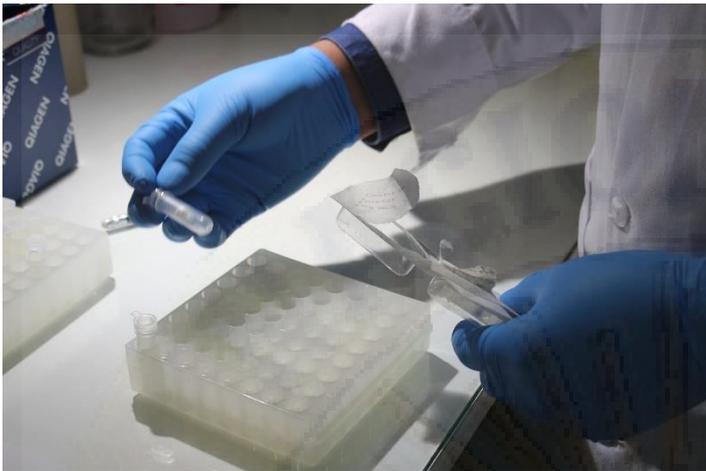


Foto 60. Separar de su envoltorio el número necesarios de columnas de centrifuga con su tubo recogida de 2ml y ubicarlo en gradillas



Foto 61. Rotular las columnas de centrifugación con su tubo recogida de 2 ml de acuerdo al número de muestra



Foto 62. Pipetear la mezcla flotante



Foto 63. Cambiar lo pipeteado a las columnas de centrifugación con su tubo recogida de 2 ml, según el numero rotulado de cada muestra.



Foto 64. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto

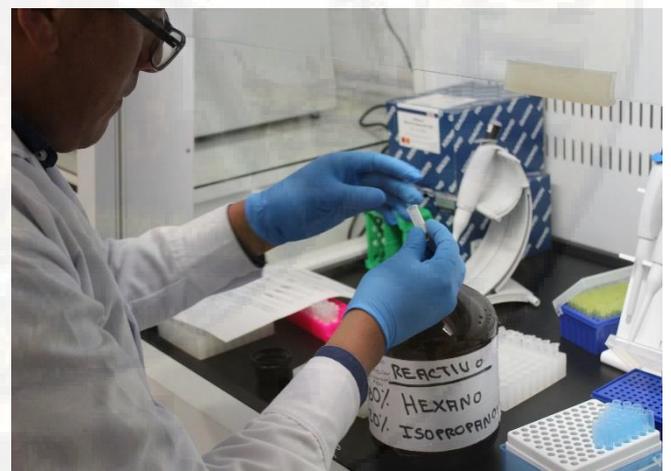


Foto 65. Descartar el tubo recogida de 2ml con su contenido filtrado.



Foto 66. Separar nuevos tubos recogidas de 2 ml en gradillas

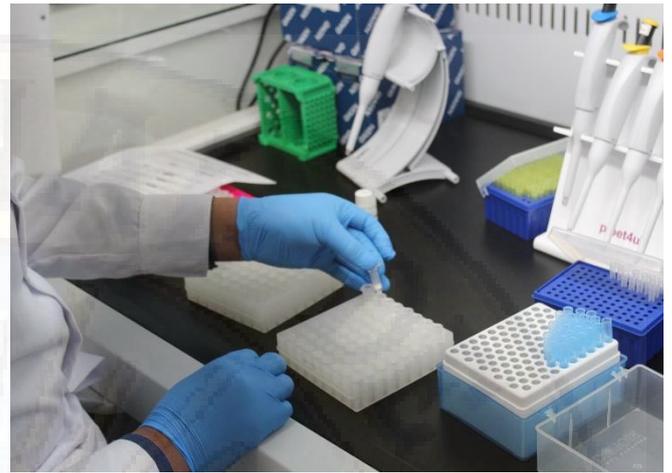


Foto 67. Transferir la columna de centrifugación en los nuevos tubos recogidas de 2 ml.



Foto 68. Añadir 500 UL de Buffer AW1

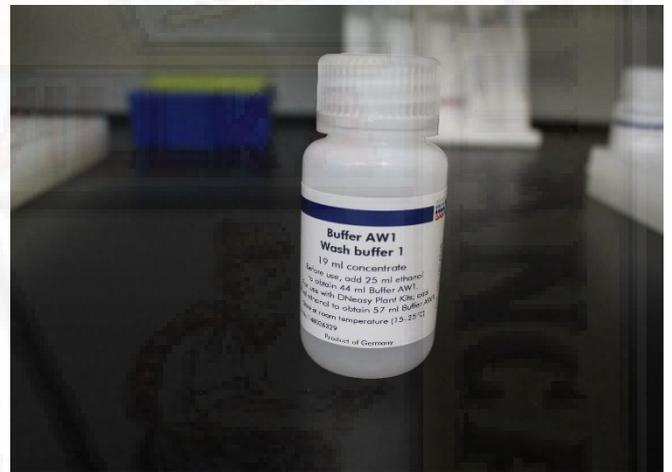


Foto 69. Buffer AW1



Foto 70. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto

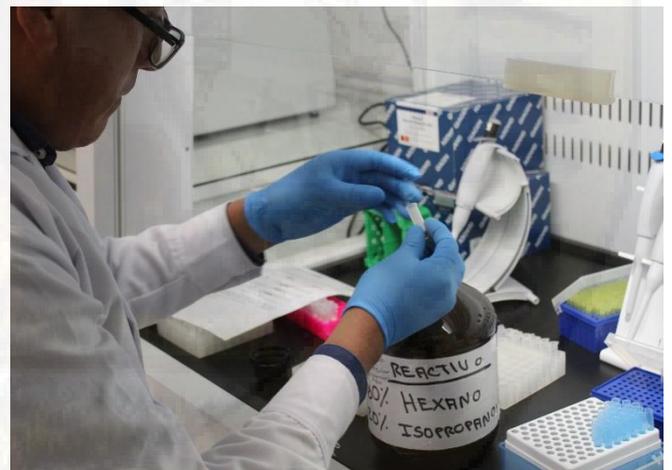


Foto 71. Descartar el tubo recogida de 2ml con su contenido filtrado.



Foto 72. Separar nuevos tubos recogidas de 2 ml en gradillas

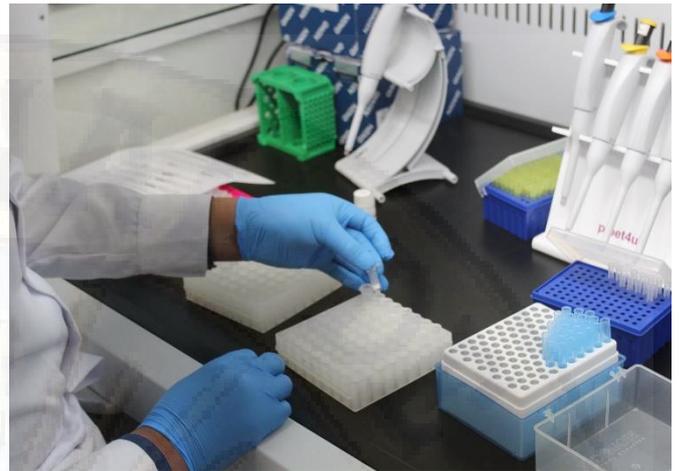


Foto 73. Transferir la columna de centrifugación en los nuevos tubos recogidos de 2 ml.

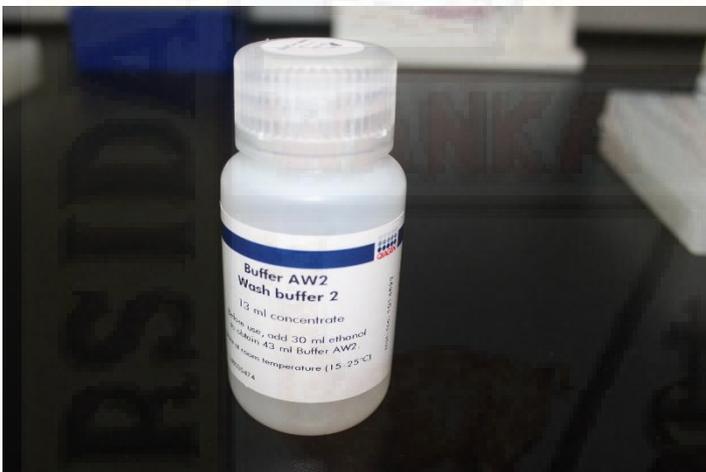


Foto 74. Añadir 500 UL de buffer AW2



Foto 75. Centrifugar a 14000 RPM durante 4 minutos

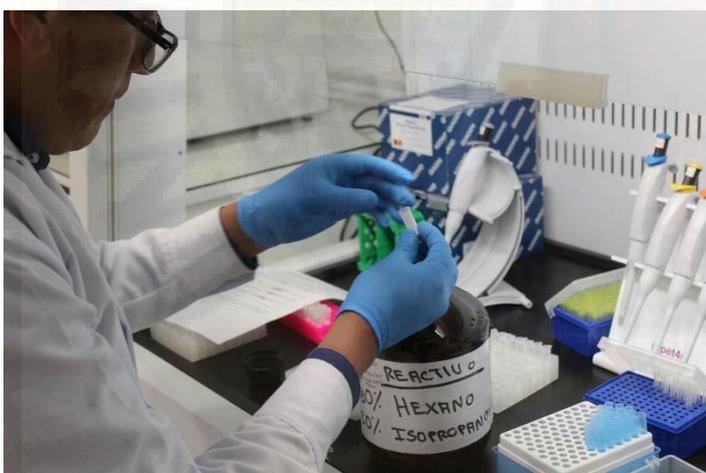


Foto 76. Separar y descartar el tubo recogida de 2ml con su contenido filtrado.



Foto 77. Separar nuevos tubos eppendorf de 2 ml



Foto 78. Rotular los tubos eppendorf de 2 ml de acuerdo al número de muestra



Foto 79. Transferir la columna de centrifugación en los nuevos tubos eppendorf de 2 ml.

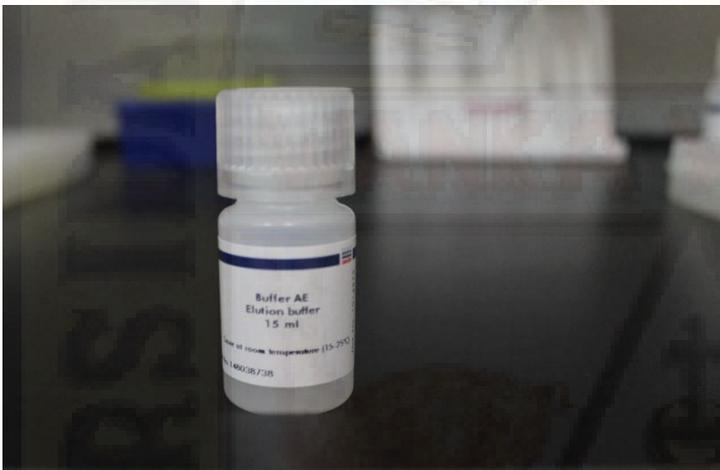


Foto 80. Alicoutar buffer AE en tubos eppendorf en promedio 200 UL por muestra



Foto 81. Incubar la alicouta a 56°C por 4 minutos

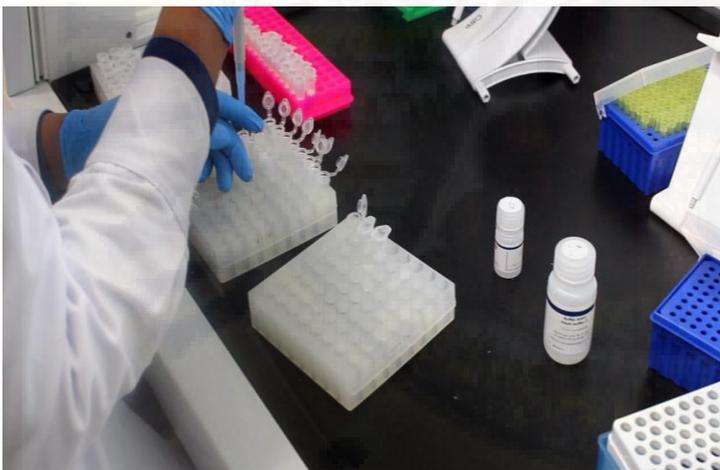


Foto 82. Adicionar 200 UL de tampón AE (Precaentada a 56°C) a la columna de centrifugación que está por debajo con los tubos eppendorf de 2 ml



Foto 83. Incubar durante 1 minuto a 56°C sin revolución

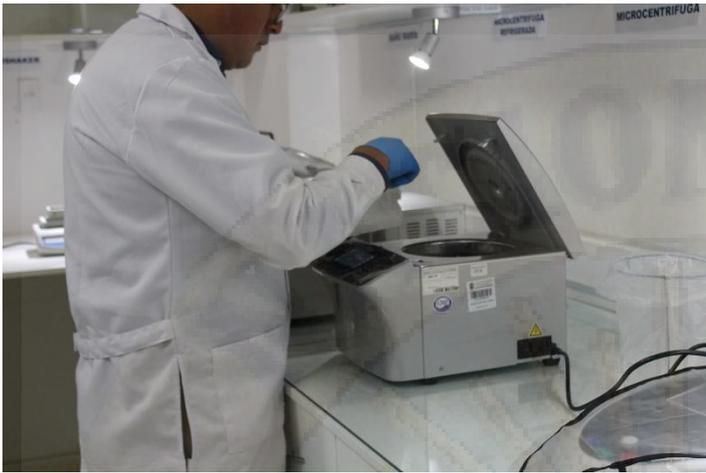
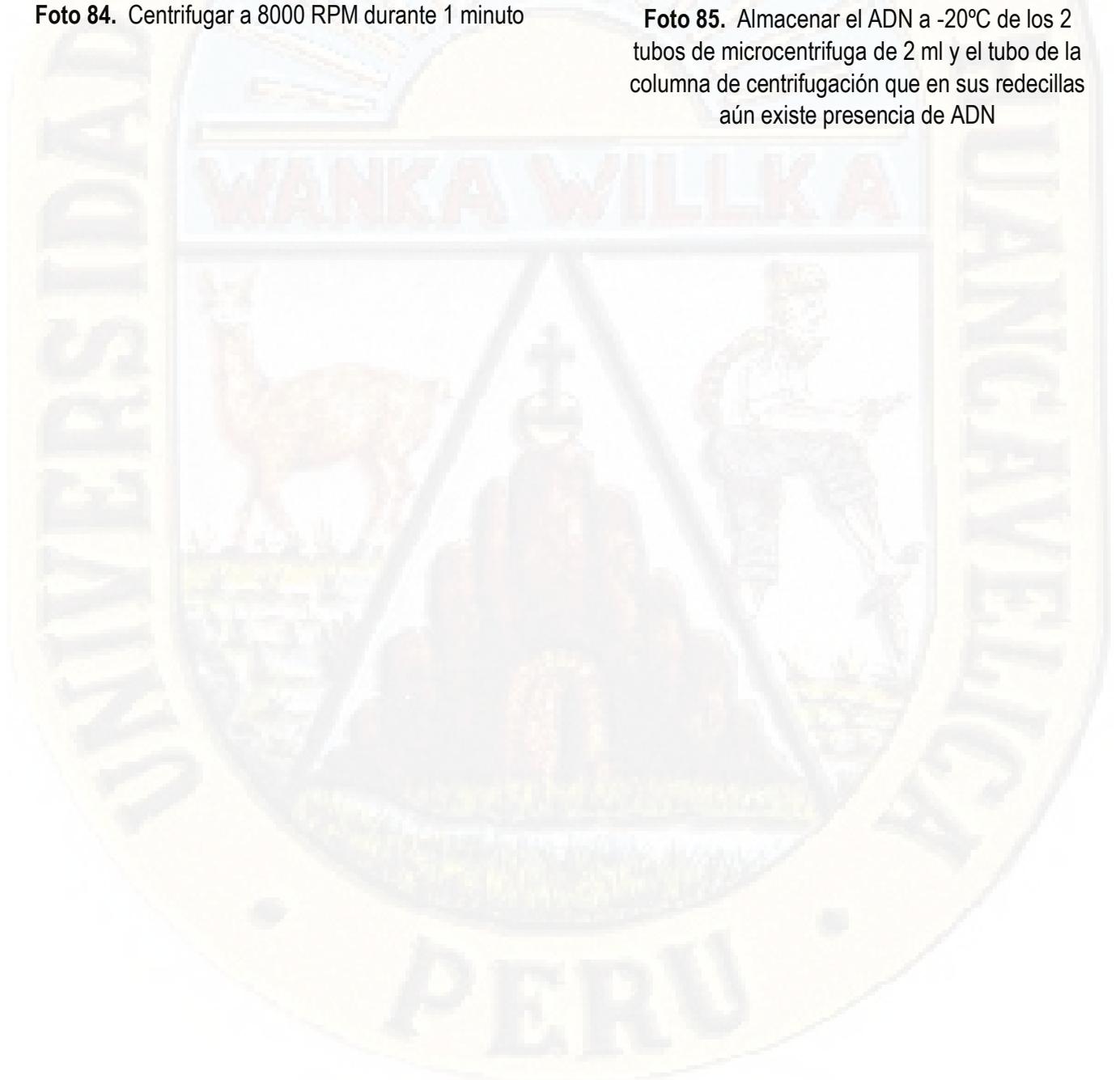


Foto 84. Centrifugar a 8000 RPM durante 1 minuto



Foto 85. Almacenar el ADN a -20°C de los 2 tubos de microcentrifuga de 2 ml y el tubo de la columna de centrifugación que en sus redcillas aún existe presencia de ADN



NANOFOTOMETRO P 330: PARA DETERMINAR LA CANTIDAD Y PUREZA DE ADN



Foto 86. Nanofotometro P-330



Foto 87. Preparar y stockear puntillas de 10UL



Foto 88. Lid 10 IMPLM



Foto 89. Pipeta de 2 a 20 UL



Foto 90. Retirar las muestras de la congeladora



Foto 91. Encender el nanofotometro P-330, pulsando la tecla ON y programar para realizar los análisis de concentración y pureza de las muestras



Foto 92. Alicuitar agua ultra pura en un tubo eppendorf

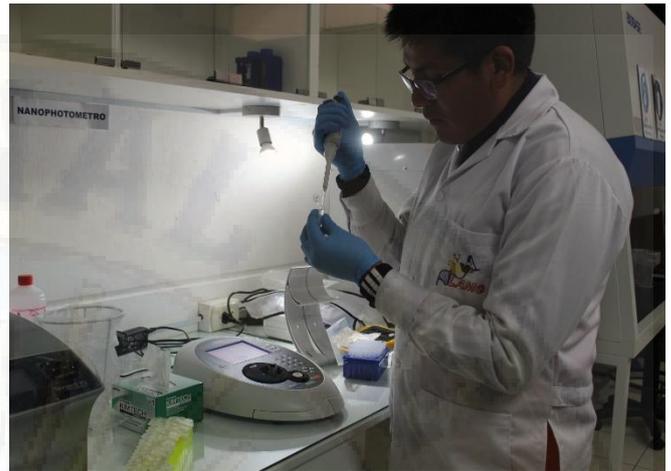


Foto 93. Pipetear 2UL de agua ultrapura



Foto 94. Verter lo pipeteado sobre el centro de la ventana de medición



Foto 95. Eliminar la puntilla usada



Foto 96. Cubrir el centro de ventana de medición con la tapa roja LID 10



Foto 97. Pulsar la tecla que dice en blanco para calibrar el Nanofotometro P-330



Foto 98. Lecturar la pantalla, teniendo como resultados todos en 0



Foto 99. Retirar la tapa LID 10 y utilizar el kleenex para limpiar el interior de la tapa y la parte superior de la ventana de medición



Foto 100. Para analizar una muestra, se tiene que realizar un Vortex (incluido en el Nanofotometro) para expandir el ADN sedimentado en la base del tubo eppendorf



Foto 101. Pipetear 2UL de muestra de ADN extraída con el Kit comercial DNA mini kit QIAamp



Foto 102. Verter lo pipetado sobre el centro de la ventana de medición



Foto 103. Eliminar la puntilla usada

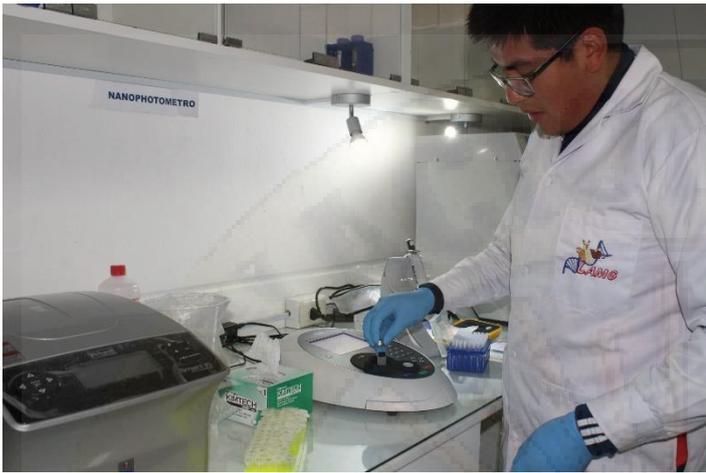


Foto 104. Cubrir el centro de ventana de medición con la tapa roja LID 10

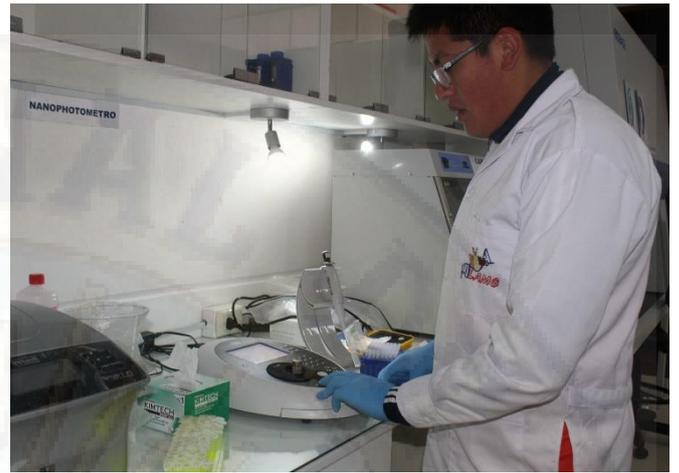
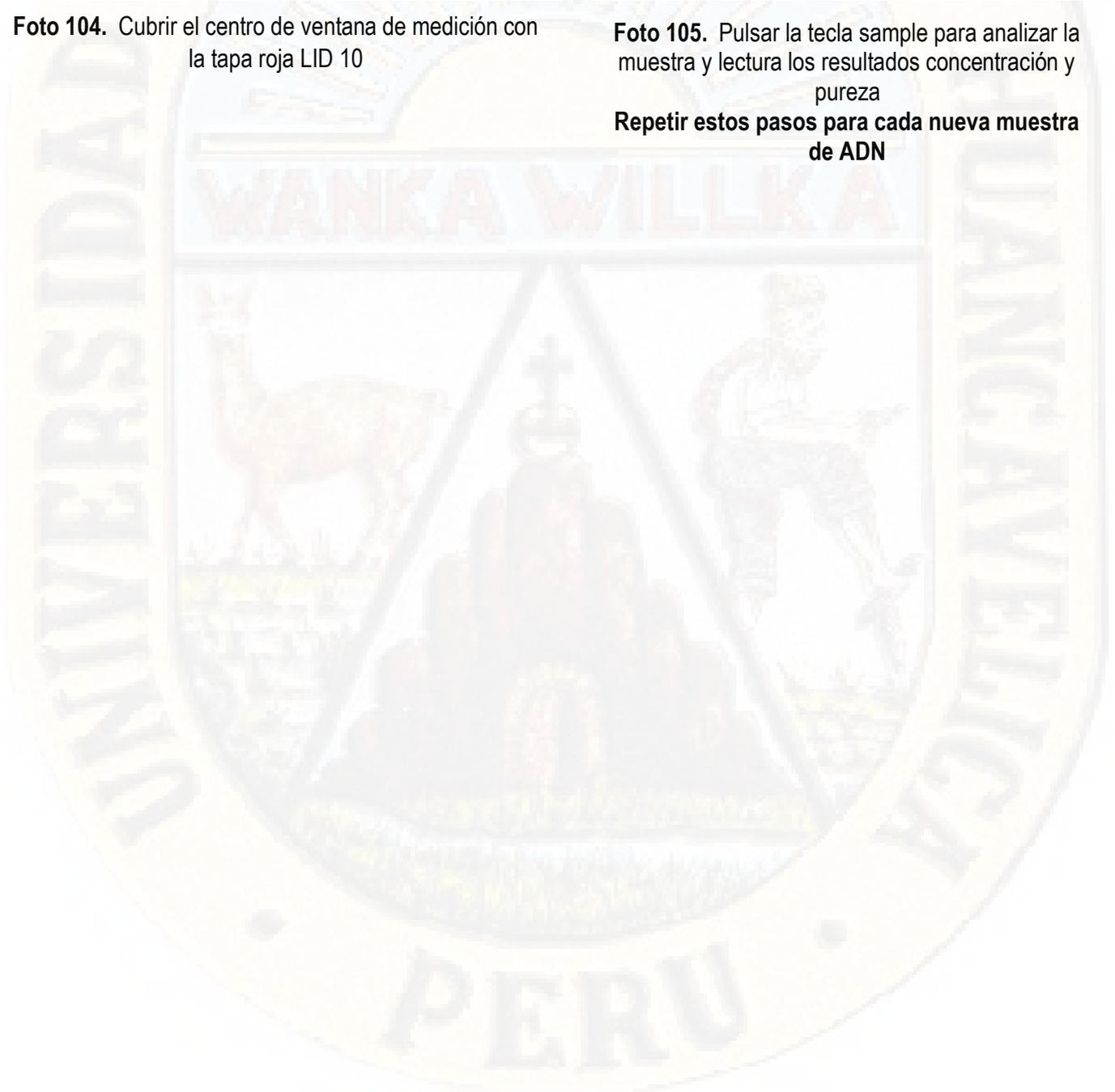


Foto 105. Pulsar la tecla sample para analizar la muestra y lectura los resultados concentración y pureza
Repetir estos pasos para cada nueva muestra de ADN



RESULTADOS DE CONCENTRACION Y PUREZA A PARTIR DE TEP

dsDNA		Sample
A230	0.193 A	1
A260	0.112 A	
A280	0.066 A	
A320	0.001 A	
Concentration		55.5
A260/A280	1.708	
A260/A230	0.578	Units
		ng/μl

Foto 106. Resultado de concentración y pureza N° 1

dsDNA		Sample
A230	0.144 A	2
A260	0.077 A	
A280	0.044 A	
A320	0.000 A	
Concentration		38.5
A260/A280	1.750	
A260/A230	0.535	Units
		ng/μl

Foto 107. Resultado de concentración y pureza N° 2

dsDNA		Sample
A230	0.154 A	3
A260	0.141 A	
A280	0.079 A	
A320	0.004 A	
Concentration		68.5
A260/A280	1.827	
A260/A230	0.913	Units
		ng/μl

Foto 108. Resultado de concentración y pureza N° 3

dsDNA		Sample
A230	0.153 A	4
A260	0.141 A	
A280	0.086 A	
A320	0.007 A	
Concentration		67.0
A260/A280	1.636	
A260/A230	0.918	Units
		ng/μl

Foto 109. Resultado de concentración y pureza N° 4

dsDNA		Sample
A230	0.104 A	5
A260	0.074 A	
A280	0.041 A	
A320	0.000 A	
Concentration		37.0
A260/A280	1.805	
A260/A230	0.712	Units
		ng/μl

Foto 110. Resultado de concentración y pureza N° 5

dsDNA		Sample
A230	0.198 A	6
A260	0.336 A	
A280	0.186 A	
A320	0.002 A	
Concentration		167
A260/A280	1.815	
A260/A230	1.704	Units
		ng/μl

Foto 111. Resultado de concentración y pureza N° 6

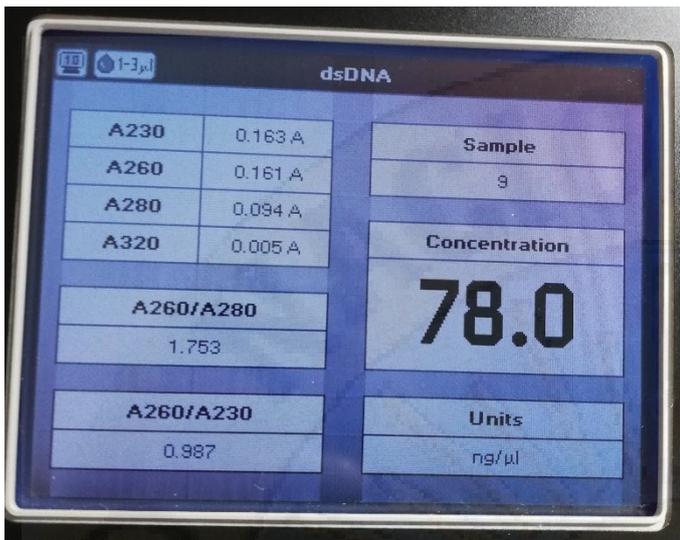


Foto 112. Resultado de concentración y pureza N° 7



Foto 113. Resultado de concentración y pureza N° 8



Foto 114. Resultado de concentración y pureza N° 9



Foto 115. Resultado de concentración y pureza N° 10



Foto 116. Resultado de concentración y pureza N° 11



Foto 117. Resultado de concentración y pureza N° 12



Foto 118. Resultado de concentración y pureza N° 13



Foto 119. Resultado de concentración y pureza N° 14



Foto 120. Resultado de concentración y pureza N° 15



Foto 121. Resultado de concentración y pureza N° 16



Foto 122. Resultado de concentración y pureza N° 17

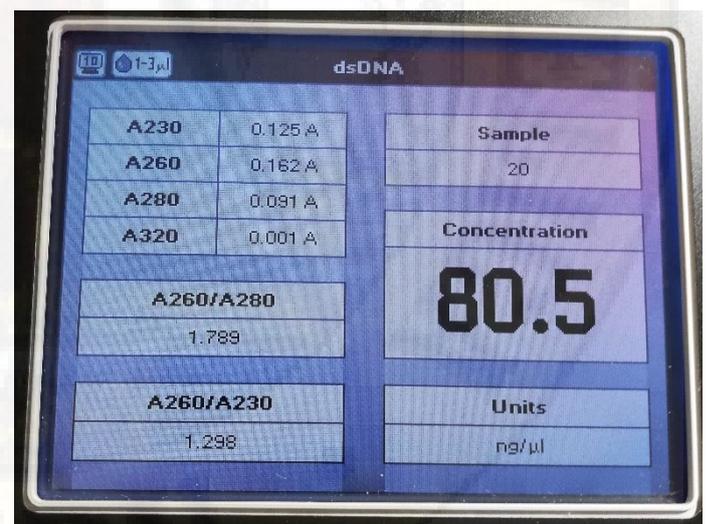


Foto 123. Resultado de concentración y pureza N° 18

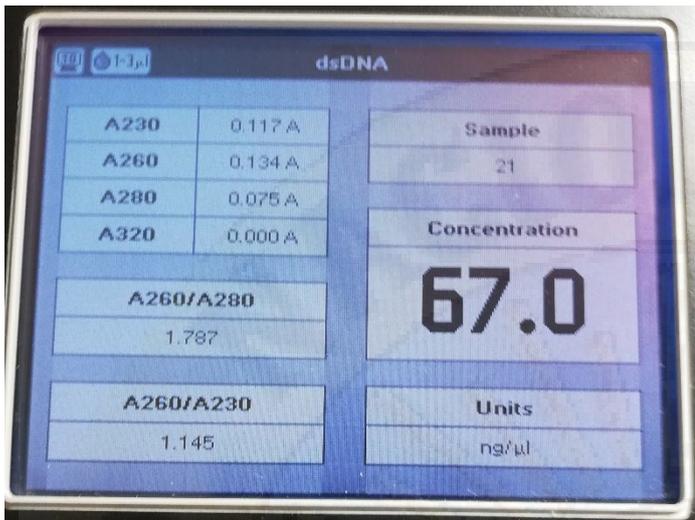


Foto 124. Resultado de concentración y pureza N° 19



Foto 125. Resultado de concentración y pureza N° 20



Foto 126. Resultado de concentración y pureza N° 21

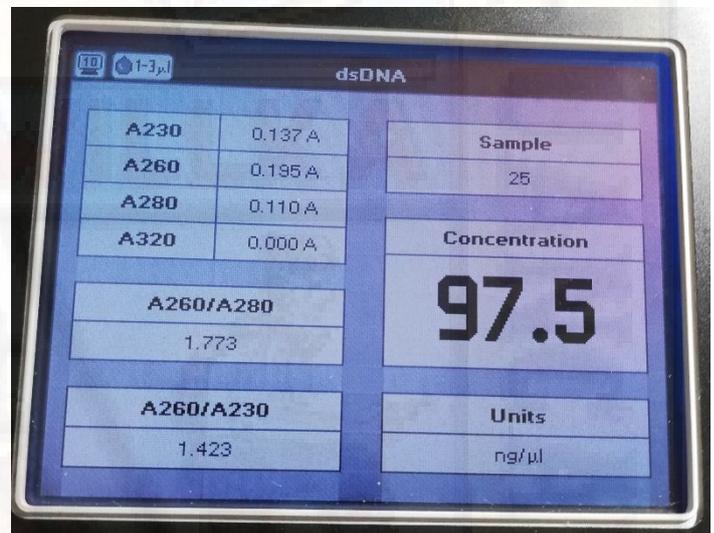


Foto 127. Resultado de concentración y pureza N° 22



Foto 128. Resultado de concentración y pureza N° 23

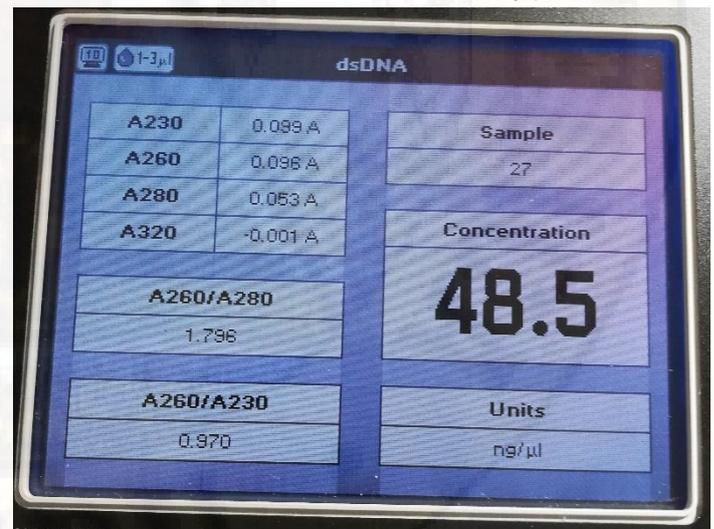


Foto 129. Resultado de concentración y pureza N° 24



Foto 130. Resultado de concentración y pureza N° 25



Foto 131. Resultado de concentración y pureza N° 26

RESULTADOS DE CONCENTRACION Y PUREZA A PARTIR DE SANGRE



Foto 132. Resultado de concentración y pureza N° 1

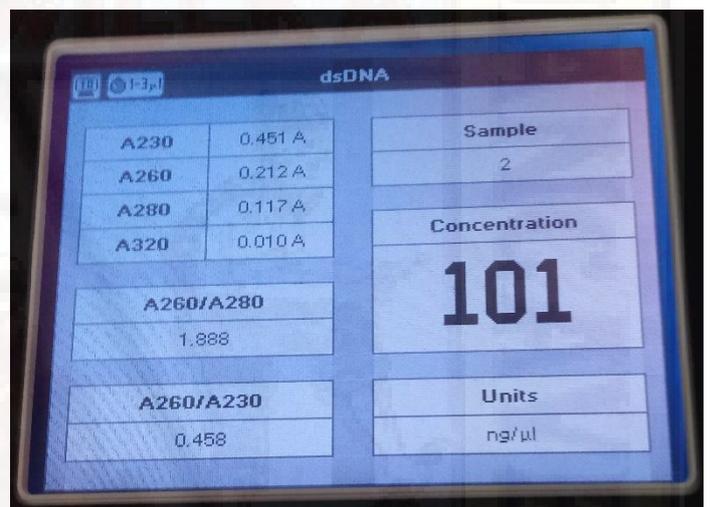


Foto 133. Resultado de concentración y pureza N° 2



Foto 134. Resultado de concentración y pureza N° 3

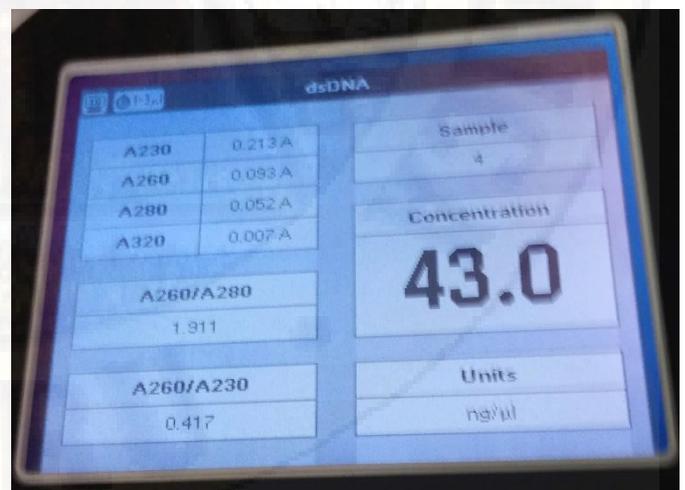


Foto 135. Resultado de concentración y pureza N° 4

dsDNA		Sample
A230	0.081 A	6
A260	0.055 A	
A280	0.028 A	
A320	-0.002 A	
A260/A280		Concentration
1.900		28.5
A260/A230		Units
0.687		ng/μl

Foto 136. Resultado de concentración y pureza N° 5

dsDNA		Sample
A230	0.123 A	7
A260	0.110 A	
A280	0.060 A	
A320	-0.001 A	
A260/A280		Concentration
1.820		55.5
A260/A230		Units
0.895		ng/μl

Foto 137. Resultado de concentración y pureza N° 6

dsDNA		Sample
A230	0.062 A	8
A260	0.045 A	
A280	0.023 A	
A320	-0.002 A	
A260/A280		Concentration
1.990		23.5
A260/A230		Units
0.734		ng/μl

Foto 138. Resultado de concentración y pureza N° 7

dsDNA		Sample
A230	0.085 A	9
A260	0.060 A	
A280	0.032 A	
A320	0.000 A	
A260/A280		Concentration
1.875		30.0
A260/A230		Units
0.706		ng/μl

Foto 139. Resultado de concentración y pureza N° 8

dsDNA		Sample
A230	0.091 A	10
A260	0.063 A	
A280	0.044 A	
A320	-0.001 A	
A260/A280		Concentration
1.867		42.0
A260/A230		Units
0.913		ng/μl

Foto 140. Resultado de concentración y pureza N° 9

dsDNA		Sample
A230	0.036 A	11
A260	0.033 A	
A280	0.021 A	
A320	-0.001 A	
A260/A280		Concentration
1.918		20.0
A260/A230		Units
1.081		ng/μl

Foto 141. Resultado de concentración y pureza N° 10

dsDNA		Sample
A230	0.086 A	12
A260	0.067 A	
A280	0.036 A	
A320	-0.002 A	
Concentration		34.5
A260/A280		1.816
A260/A230		1.190
Units		ng/μl

Foto 142. Resultado de concentración y pureza N° 11

dsDNA		Sample
A230	0.102 A	14
A260	0.144 A	
A280	0.078 A	
A320	0.000 A	
Concentration		72.0
A260/A280		1.846
A260/A230		1.412
Units		ng/μl

Foto 143. Resultado de concentración y pureza N° 12

dsDNA		Sample
A230	0.070 A	15
A260	0.144 A	
A280	0.073 A	
A320	-0.002 A	
Concentration		73.0
A260/A280		1.947
A260/A230		2.028
Units		ng/μl

Foto 144. Resultado de concentración y pureza N° 13

dsDNA		Sample
A230	0.070 A	16
A260	0.144 A	
A280	0.073 A	
A320	-0.002 A	
Concentration		38.0
A260/A280		1.947
A260/A230		2.028
Units		ng/μl

Foto 145. Resultado de concentración y pureza N° 14

dsDNA		Sample
A230	0.100 A	17
A260	0.124 A	
A280	0.061 A	
A320	0.000 A	
Concentration		62.0
A260/A280		2.033
A260/A230		1.240
Units		ng/μl

Foto 146. Resultado de concentración y pureza N° 15

dsDNA		Sample
A230	0.051 A	55
A260	0.034 A	
A280	0.016 A	
A320	-0.003 A	
Concentration		18.5
A260/A280		1.947
A260/A230		0.685
Units		ng/μl

Foto 147. Resultado de concentración y pureza N° 16

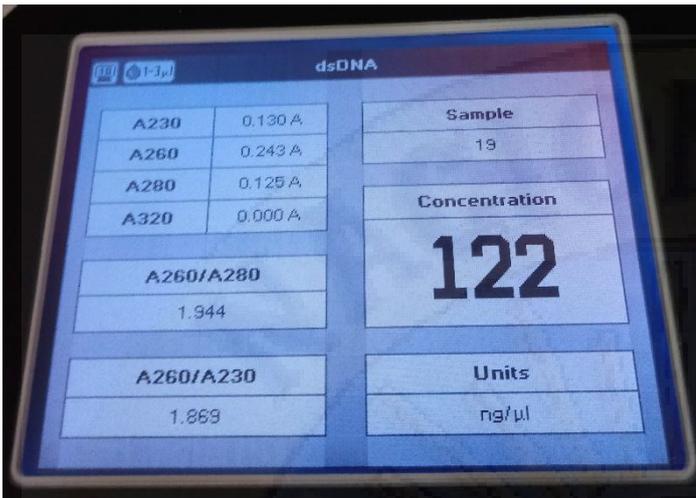


Foto 148. Resultado de concentración y pureza N° 17

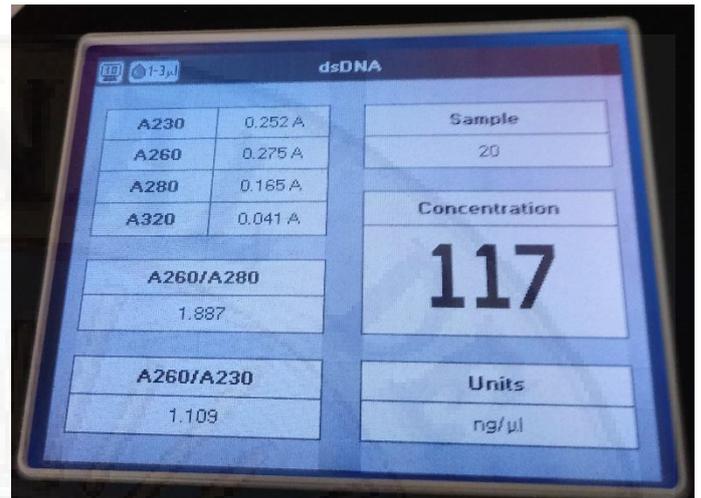


Foto 149. Resultado de concentración y pureza N° 18

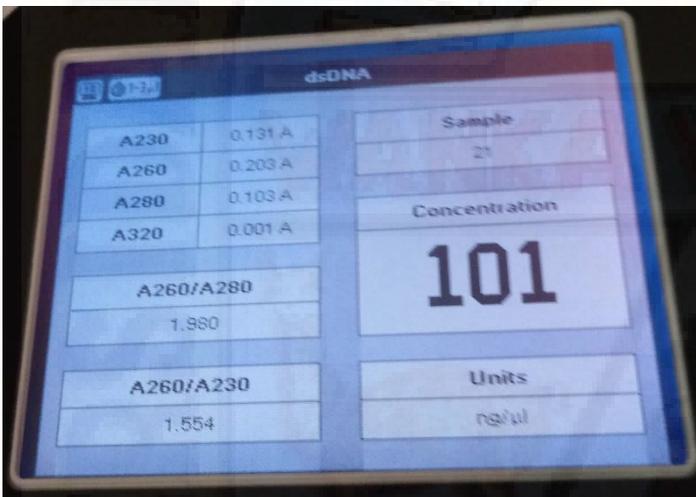


Foto 150. Resultado de concentración y pureza N° 19

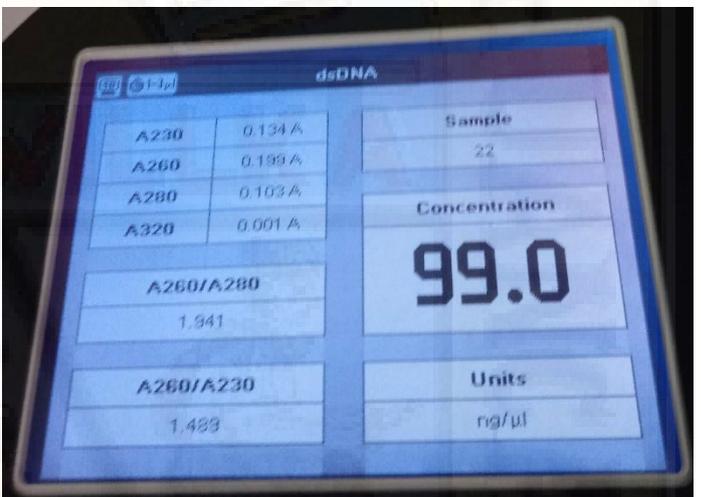


Foto 151. Resultado de concentración y pureza N° 20

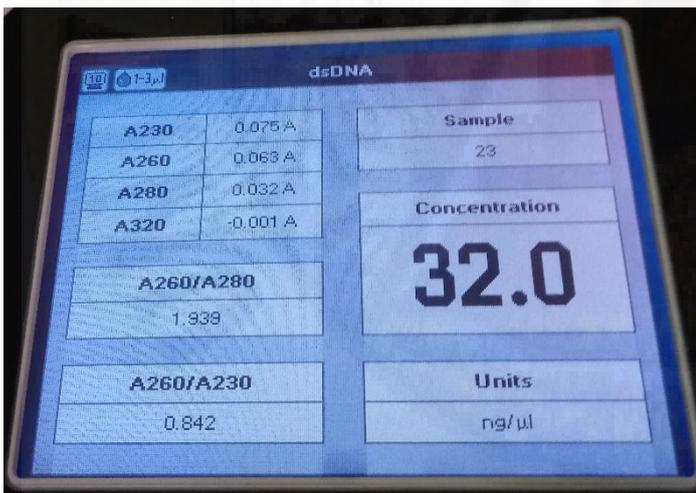


Foto 152. Resultado de concentración y pureza N° 21

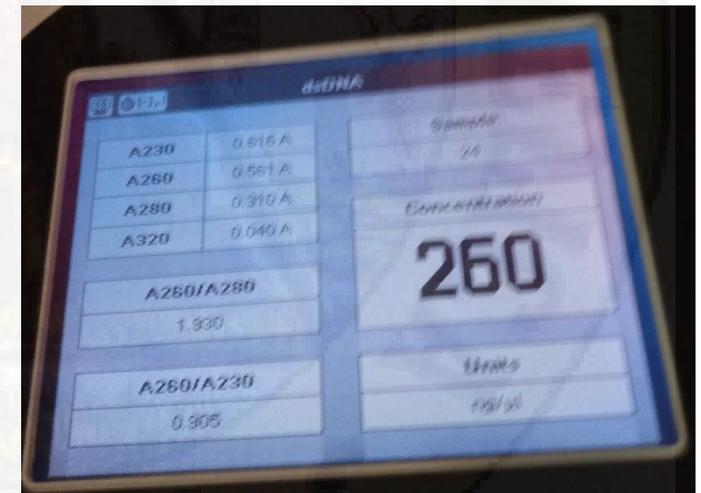


Foto 153. Resultado de concentración y pureza N° 22

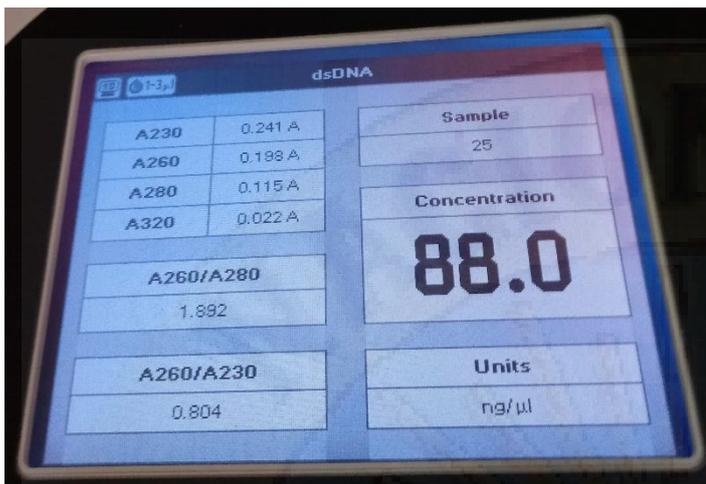


Foto 154. Resultado de concentración y pureza N° 23

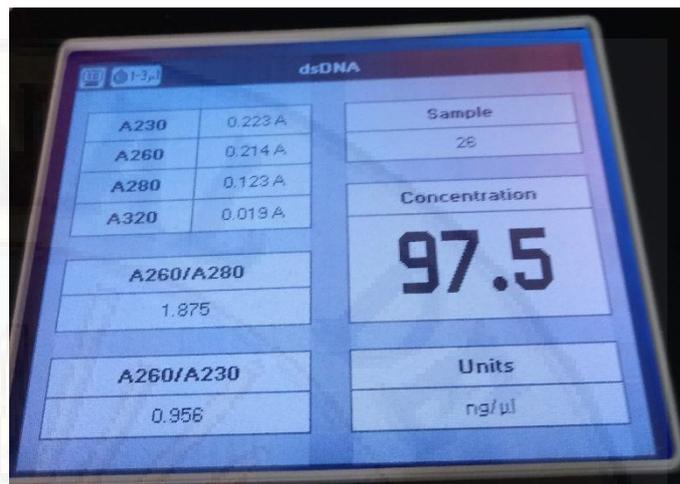


Foto 155. Resultado de concentración y pureza N° 24

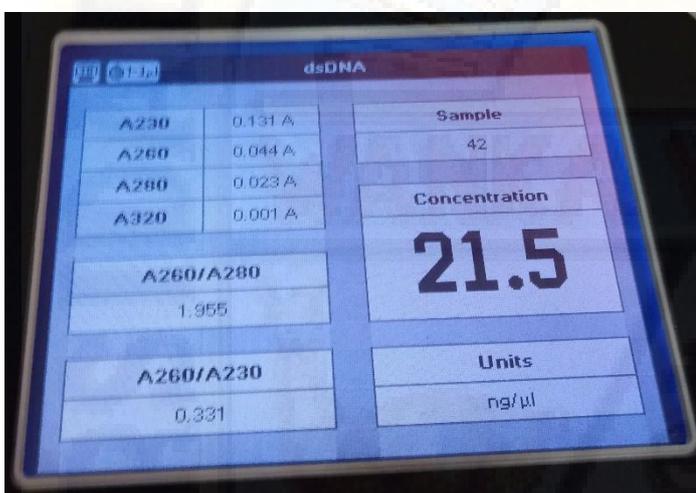


Foto 156. Resultado de concentración y pureza N° 25

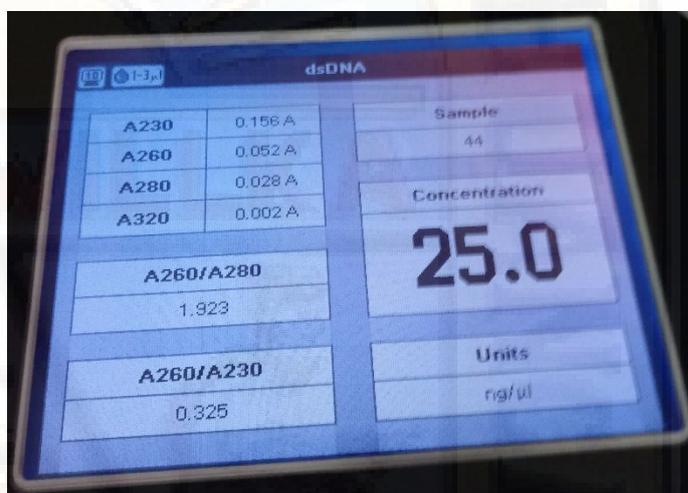


Foto 157. Resultado de concentración y pureza N° 26

PROCEDIMIENTO DE ELECTROFORESIS PARA DETERMINAR LA CALIDAD (INTEGRIDAD) DE ADN:

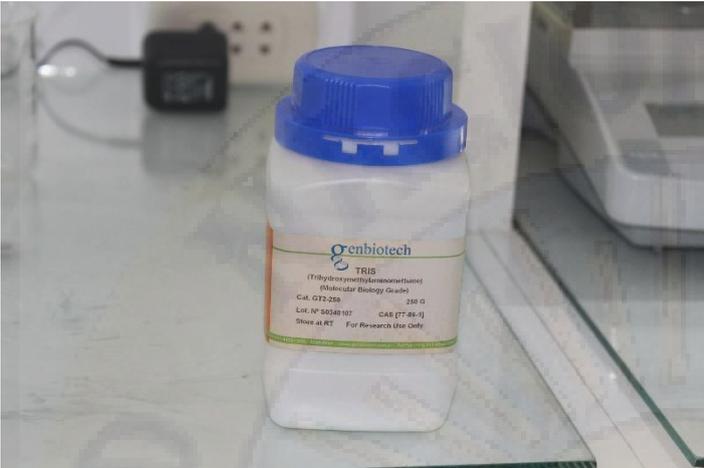


Foto 158. Tris



Foto 159. Ácido bórico

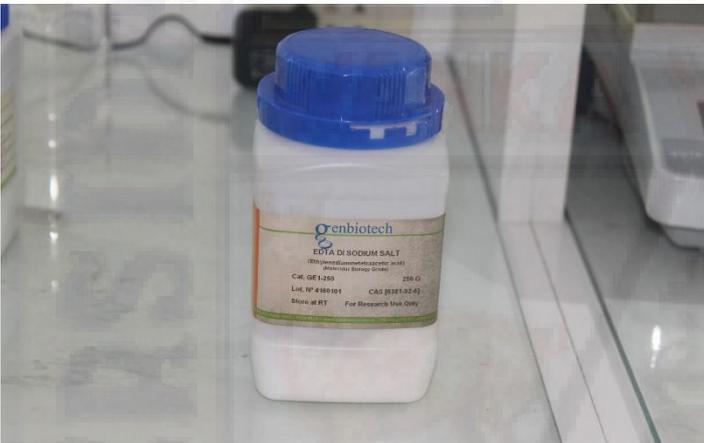


Foto 160. EDTA

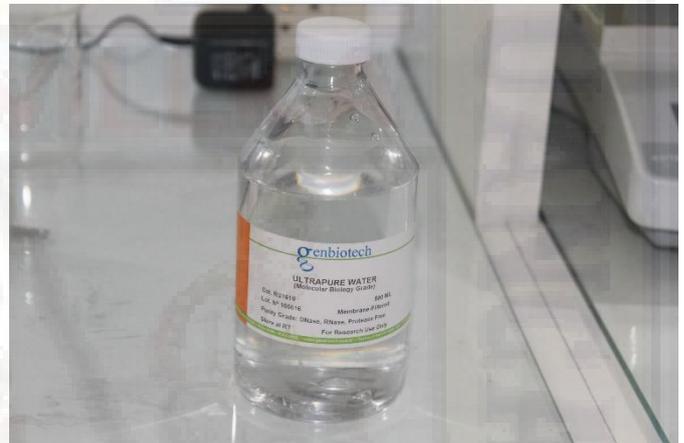


Foto 161. Agua ultra pura.



Foto 162. Pesar con papel aluminio los reactivos anteriores, 54gr de tris base, 27.5gr de ácido bórico, 3.72gr de EDTA y 1000 ml de agua ultrapura.

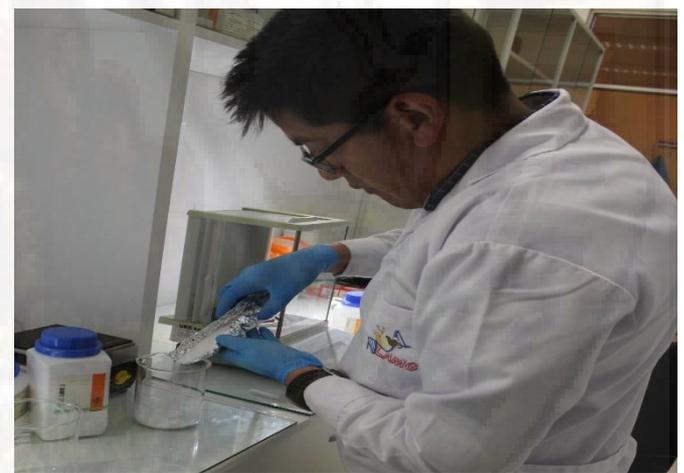


Foto 163. Combinar todo lo pesado en un matraz.



Foto 164. Con ayuda de un agitador magnético, agitar por 10 min a 500 RPM



Foto 165. Con un PH metro, alcanzar el PH de 8, rebajar con ácido clorhídrico para estandarizar al valor deseado.



Foto 166. PH alcanzado al valor deseado.



Foto 167. Ácido clorhídrico (HCL), utilizado para rebajar el alcalino, hasta llegar al PH=8.



Foto 168. Pesar 1.6gr de agarosa en polvo

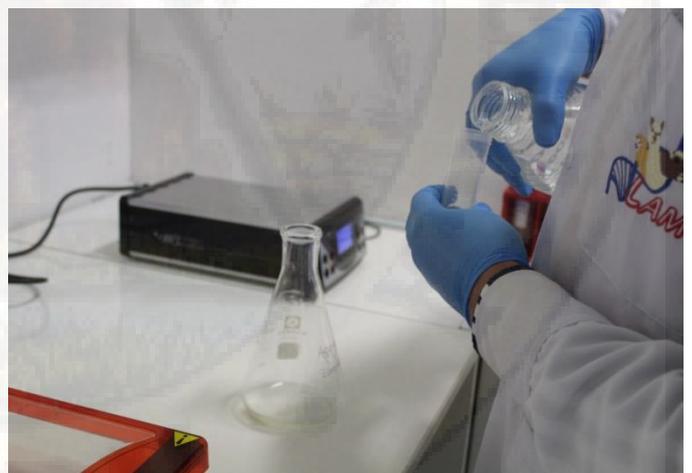


Foto 169. En un matraz verter 150 ml de TBE 0.5X

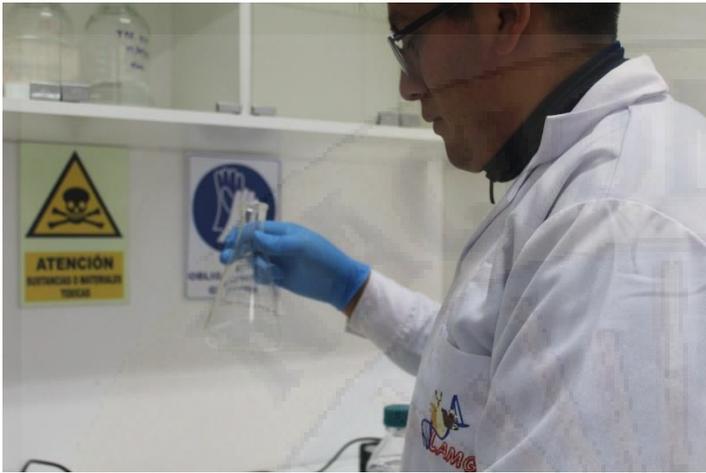


Foto 170. Combinar con movimientos lentos



Foto 171. Llevar el matraz al microondas por 2 minutos, hasta observar la combinación clara sin grumos y burbujas.

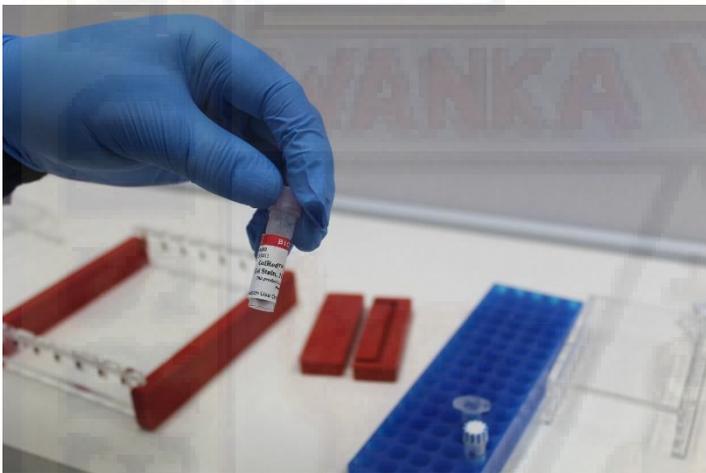


Foto 172. GELRED



Foto 173. Pipetear 10 μ L de GELRED



Foto 174. Agregar 10 μ L de GELRED al matraz con agarosa y TBE 0.5X y dejar entibiar.



Foto 175. Armar la bandeja plástica, formadora del molde del gel de agarosa

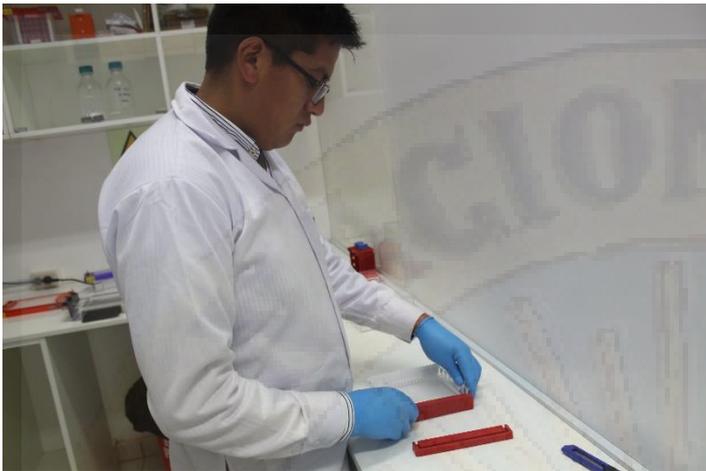


Foto 176. Incluir en el armado de la bandeja plástica el peine que dará origen a los pocillos en el molde del gel de agarosa

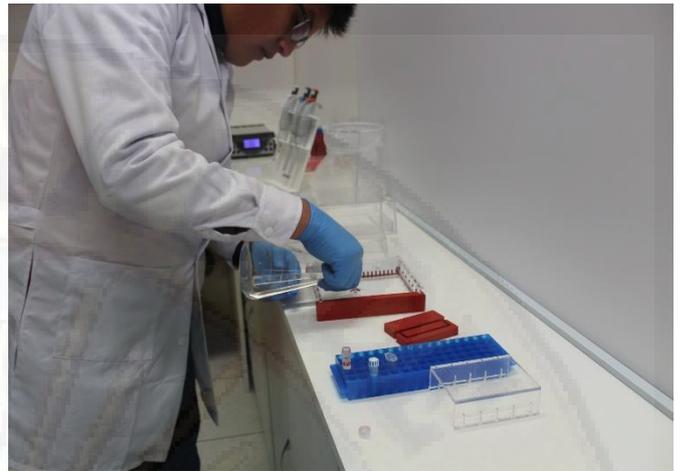


Foto 177. Verter sobre la bandeja plástica formadora del molde del gel de agarosa, la solución preparada con agarosa, TBE y gel red, dejar enfriar y solidificar por 35 minutos

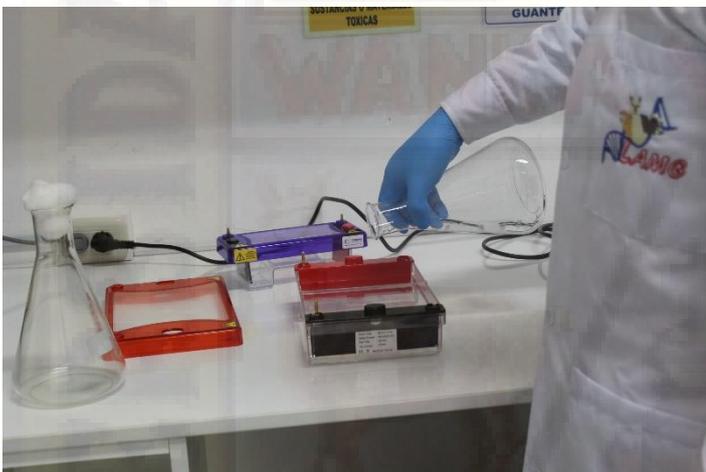


Foto 178. En la bandeja de electroforesis, medir y verter 700 ml de TBE 0.5X

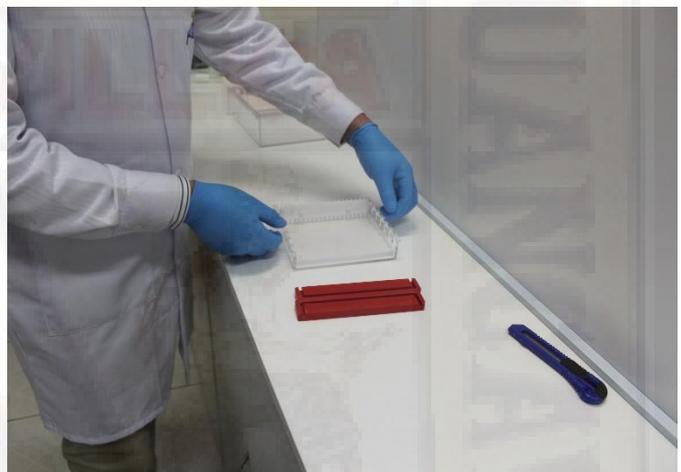


Foto 179. Una vez solidificado el molde del gel de agarosa, desarmar cuidadosamente la bandeja de plásticos laterales

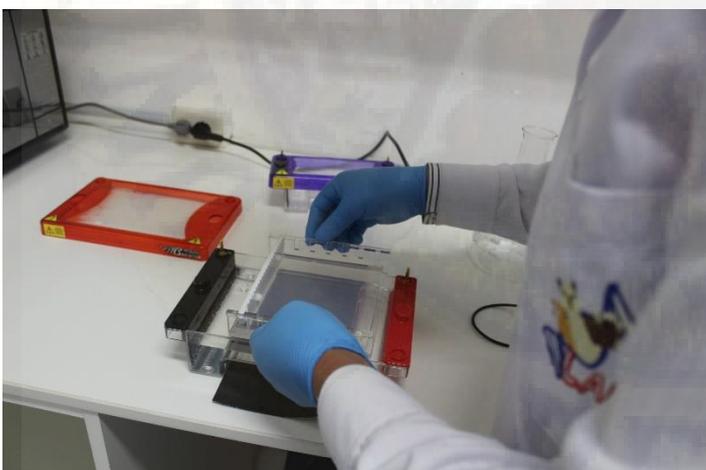


Foto 180. Sumergir el molde del gel de agarosa, en la bandeja de electroforesis que contienen 700 ml de TBE 0.5X

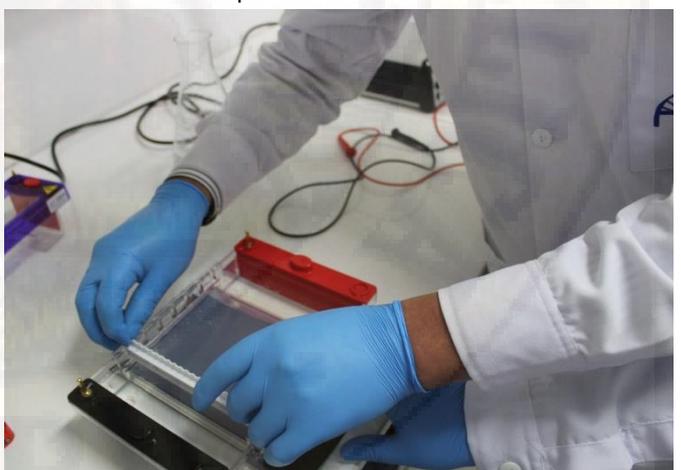


Foto 181. Cuidadosamente, retirar el peine que dio origen a los pocillos en el molde del gel de agarosa

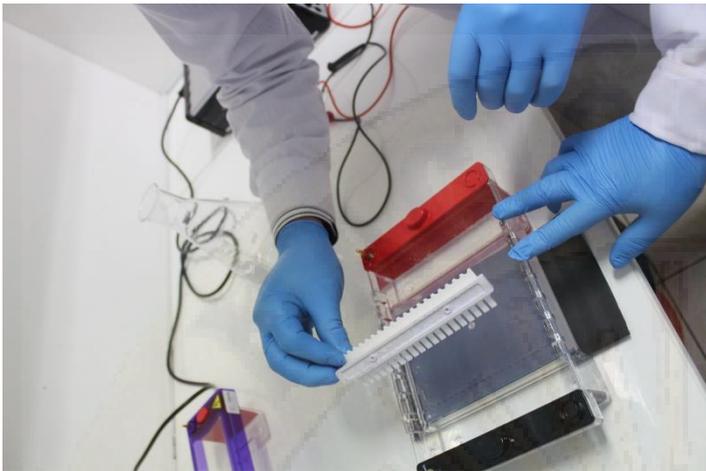


Foto 182. Cuidadosamente, retirar el peine que dio origen a los pocillos en el molde del gel de agarosa

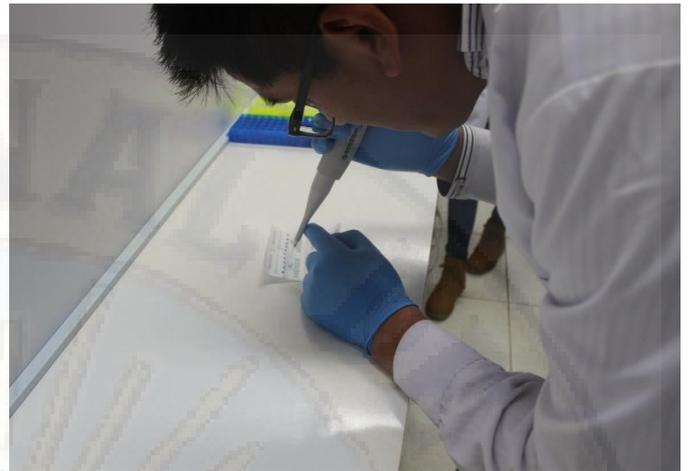


Foto 183. En un papel parafilm, pipetear 2.5µl de tampón de carga (azul de bromofenol, sileno y glicerina), por 01 muestra.



Foto 184. Tampon de carga (azul de bromofenol, sileno y glicerina)

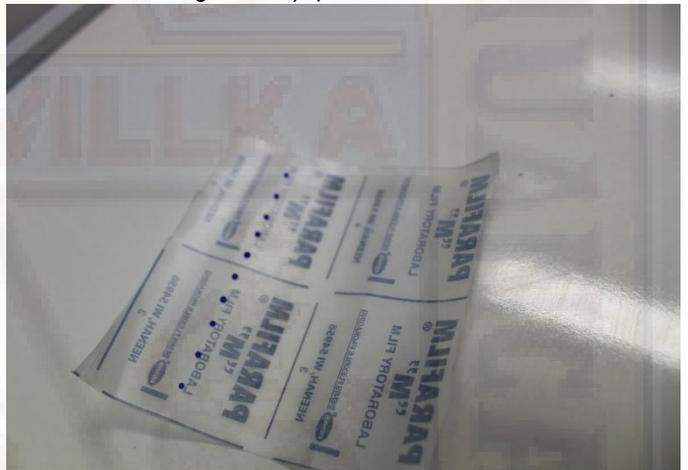


Foto 185. Tampones de cargas para 10 muestras



Foto 186. Muestra de alpaca, desparafinado y extraído el ADN, pipetear 5µl de muestra

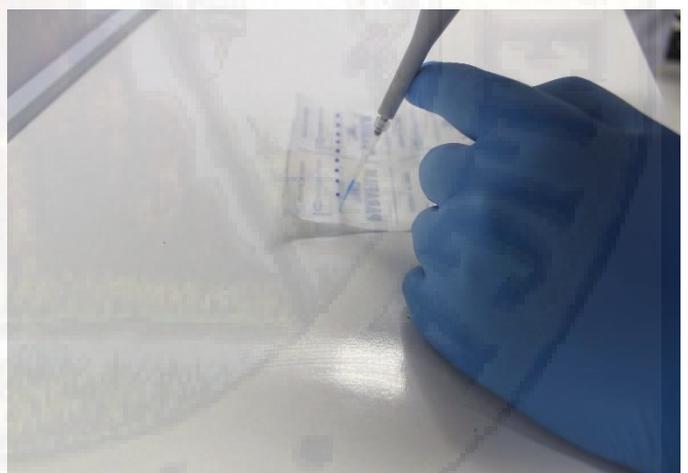


Foto 187. Combinar el 2.5µl de tampón de carga con el 5µl de muestra de alpaca.

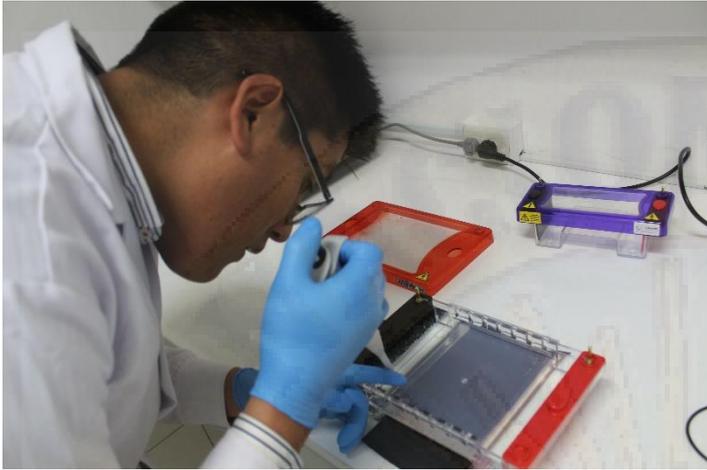


Foto 188. Pipetear la solución de tampón de carga y muestra de alpaca con el volumen de $7.5\mu\text{l}$ y cargar en los pocillos de molde del gel de agarosa.

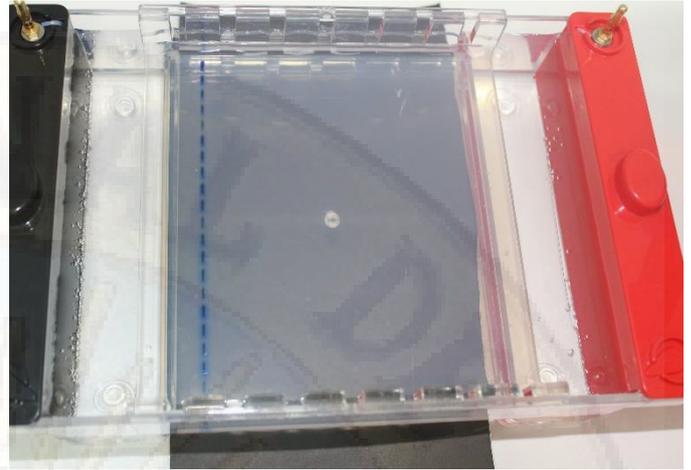


Foto 189. Cada pocillo es una muestra diferente, en el último pocillo debe ser cargado con $10\mu\text{l}$ de marcador de ADN

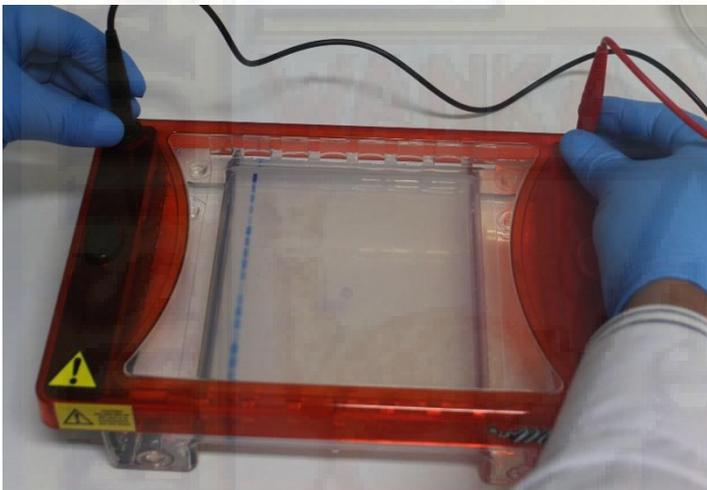


Foto 190. Tapar y conectar los ganchos positivos y negativos respectivamente, encender la caja de voltaje a 80 voltios

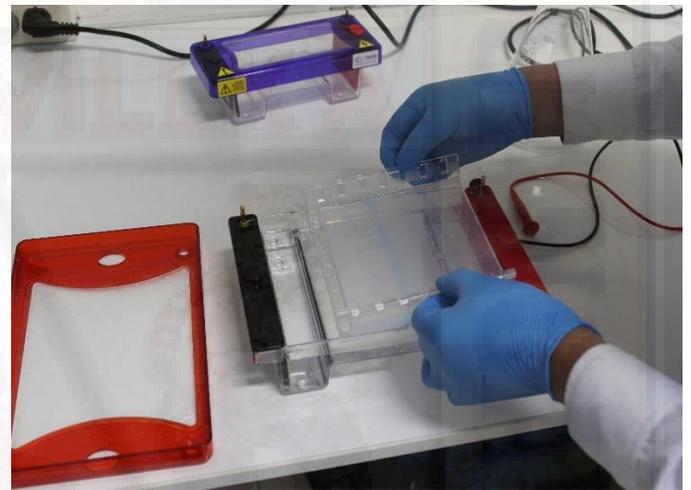


Foto 191. Pasado 4 horas del encendido de la caja de voltaje, se puede observar la migración de ADN de la carga negativa a la carga positiva, hasta las $\frac{3}{4}$ partes de la bandeja de electroforesis



Foto 192. Encender el fotodocumentador de gels



Foto 193. Abrir y jalar la bandeja del fotodocumentador



Foto 194. Dejar caer al medio de la bandeja el molde del gel de agarosa

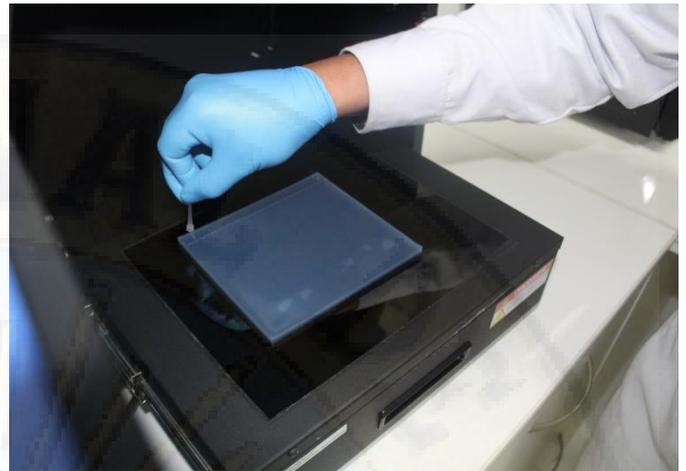


Foto 195. Molde del gel de agarosa al medio de la bandeja del fotodocumentador de geles



Foto 196. Cerrar la bandeja, encender LUZ UV y activar la INTENSIDAD DE UV, dar captura de imagen y guardar en la carpeta deseada.

RESULTADOS DE ELECTROFORESIS CON EL EQUIPO DE FOTODOCUMENTADOR DE GELES

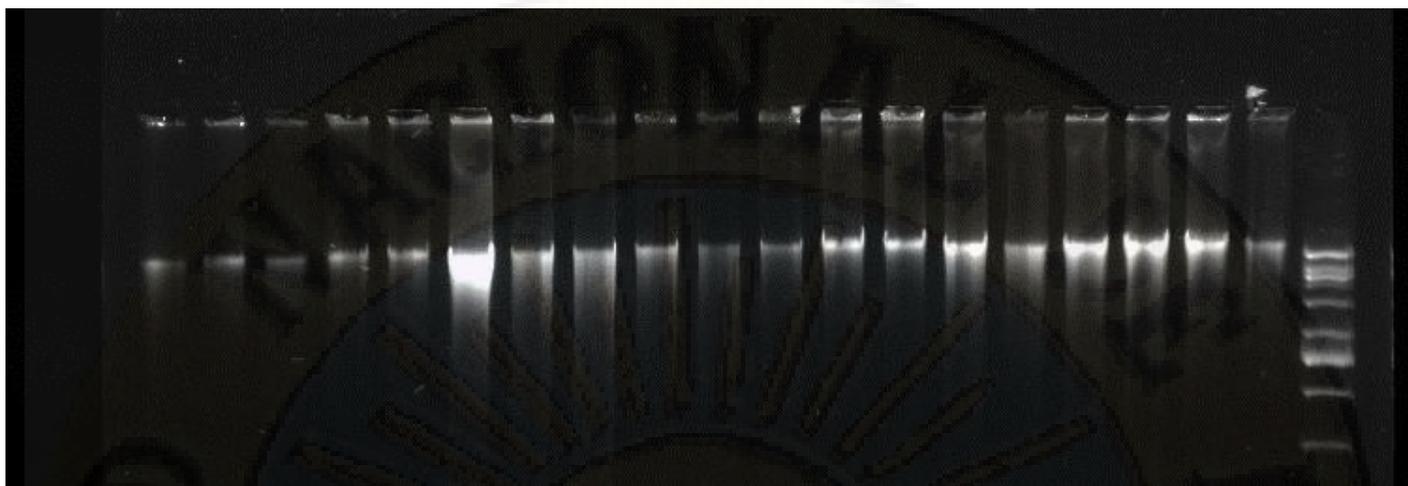


Foto 197. Bandas de ADN a partir de TEP migrados en el molde del gel de agarosa.

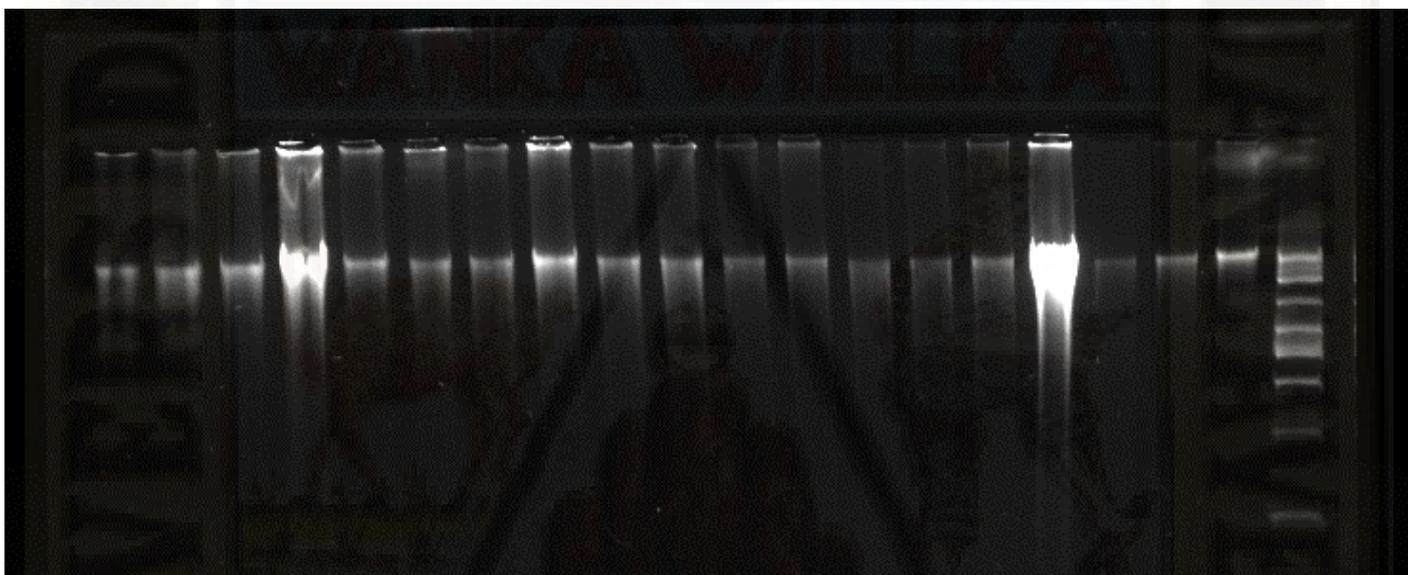


Foto 198. Bandas de ADN a partir de TEP migrados en el molde del gel de agarosa.

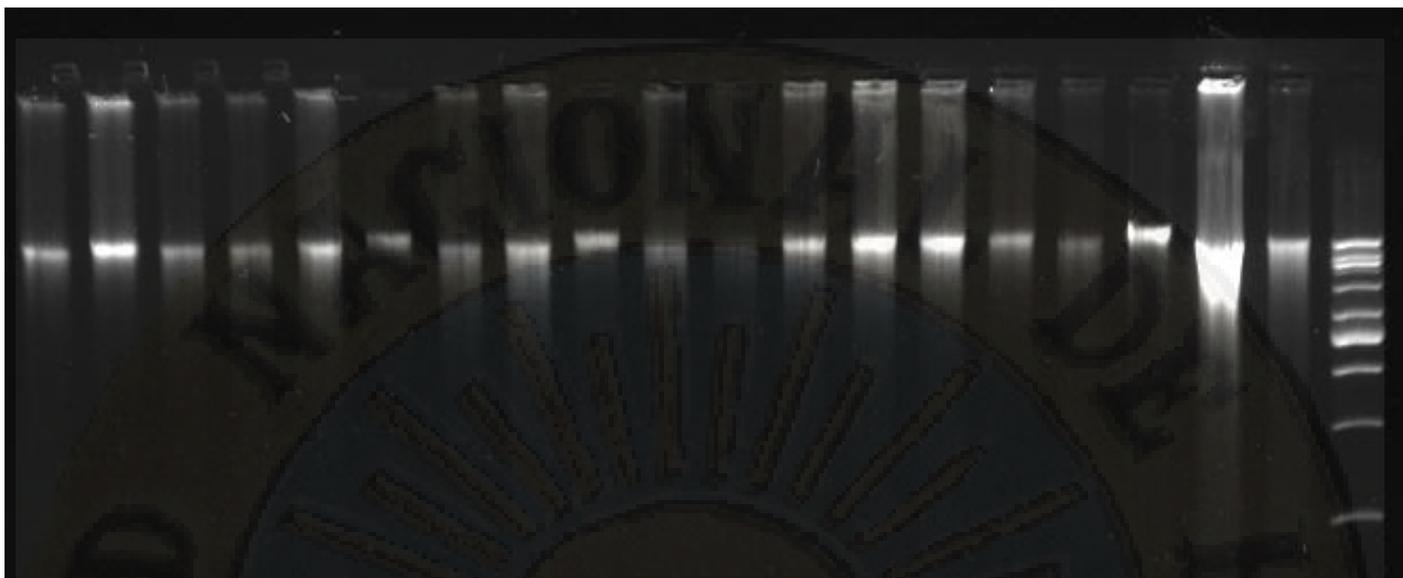


Foto 199. Bandas de ADN a partir de sangre migrados en el molde del gel de agarosa.

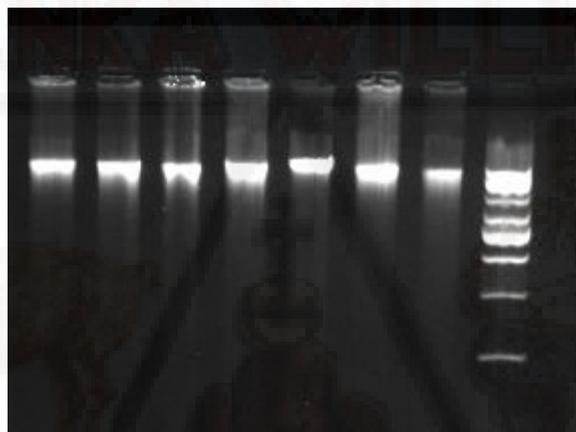


Foto 200. Bandas de ADN a partir de sangre migrados en el molde del gel de agarosa.

MATRIZ DE CONSISTENCIA
EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TÉJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADOR	INSTRUMENTO	METODOLOGIA
<p>PROBLEMA GENERAL: ¿Cuál es la cantidad y calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina?</p> <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ ¿Cuál es la cantidad de ADN extraído de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina? ➤ ¿Cuál es la calidad de ADN extraído de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina? ➤ ¿Existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)? 	<p>OBJETIVO GENERAL: Determinar la cantidad y calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Determinar la cantidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina. ➤ Determinar la calidad de ADN extraídos de los tejidos de alpacas (<i>Vicugna pacos</i>) embebidos en parafina. ➤ Determinar las diferencias en cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional). 	<p>H₀: No existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)</p> <p>H_a: Existe diferencias en la cantidad y calidad de ADN extraídos a partir de TEP y sangre (muestra convencional)</p>	<p>VARIABLES INDEPENDIENTE:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Matriz de extracción <p>VARIABLES DEPENDIENTES:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Cantidad ➤ Calidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Tejidos embebidos en parafina - Muestra de sangre (muestra convencional) - Concentración - Pureza - Integridad 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ NANODROP: Para determinar la cantidad de concentración en el ADN. ➤ ELECTRO FORESIS: Para la determinación de calidad del ADN. 	<p>Tipo: Observacional. Nivel: Relacional. Diseño: Estadística descriptiva y la prueba de T Student (para muestras independientes) luego las pruebas de Shapiro Wilks, Levene y la prueba no paramétrica de Wilcoxon. POBLACION: 500 alpacas del Centro de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos Lachocc Huancavelica. Muestra: $n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$ 52 alpacas Muestreo: Aleatorio Simple</p>