



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN CARNE DE TORTUGA MARINA VARADAS EN PLAYAS DE LA PENÍNSULA DE
SANTA ELENA ENTRE MAYO Y JUNIO DE 2023”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

SALTOS COELLO FRANCESCO

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph.D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2023

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DE TRES PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN
EN CARNE DE TORTUGA MARINA VARADAS EN PLAYAS DE LA PENÍNSULA DE
SANTA ELENA ENTRE MAYO Y JUNIO DE 2023”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

SALTOS COELLO FRANCESCO

TUTOR:

Blga. JANETH GALARZA TIPÁN, Ph.D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2023

DEDICATORIA

A la Voluntad de Dios y su Plan Divino, a mi Mamita del Cielo.

A mi Mami y a mi Papi, a mis Hermanas, a Bente, a mis Profesoras y Profesores, a todos mis Amigos, a todos los que me aman y yo los amo: todos son un Canal de Gracia por el que recibo del Amor de Dios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las autoridades y personal académico de la Facultad de Ciencias del Mar de Universidad Estatal Península de Santa Elena por su predisposición y apoyo en la ejecución de este Trabajo de Investigación, en especial al Decano Blgo. Richard Duque Marín, M.Sc. y al director de la Carrera de Biología Ing. Jimmy Villón Moreno M.Sc.

Un agradecimiento especial a la Bióloga Janeth Galarza Tipán, Ph.D., mi tutora de este Trabajo de Investigación, quien además de guiarme correctamente con sus correcciones profesionales y experiencia; me demostró apoyo, disponibilidad y confianza en todo momento.

Extiendo mis agradecimientos también a todos mis compañeros que me ayudaron en el trabajo arduo de laboratorio.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



**Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.
DECANO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS DEL MAR**



**Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE LA CARRERA DE
BIOLOGÍA**



Firmado electrónicamente por:
ISABEL JANETH
GALARZA TIPAN

**Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.
DOCENTE TUTOR**



**Blgo. Douglas Vera Izurieta, M.Sc.
DOCENTE DEL ÁREA**



**Abg. María Rivera González, Mgt.
SECRETARIA GENERAL**

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, **FRANCESCO SALTOS COELLO**, declaro bajo juramento que la responsabilidad por las ideas, contenido y análisis de los resultados expuestos en este trabajo de Integración Curricular pertenecen exclusivamente a los autores, y el patrimonio intelectual de los mismos, a la Universidad Península de Santa Elena (UPSE).

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom, positioned above a solid horizontal line.

Saltos Coello Francesco

C.I. 0927279968

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	XIX
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. JUSTIFICACIÓN.....	3
4. OBJETIVO PRINCIPAL.....	5
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
6. HIPÓTESIS.....	5
7. MARCO TEÓRICO.....	6
7.1 Importancia y conservación de tortugas marinas.....	6
7.2 Descripción de las especies.....	8
7.2.1. Familia Dermochelyidae.....	9
7.2.2. Familia Cheloniidae.....	9
7.3. Fundamentos de la extracción de ADN.....	12
7.3.1. Lisis de la membrana celular.....	12
7.3.2. Separación de materia orgánica.....	18
7.3.3. Aislamiento de ADN.....	18
7.3.4. Precipitación de ADN.....	20
7.3.5. Lavado de ADN.....	21
7.3.6. Purificación de ADN.....	22
7.3.7. Resuspensión.....	23

7.3.8.	Detección.	24
7.4.	Protocolos de extracción de ADN en tortugas marinas.	25
8.	MARCO METODOLÓGICO.	27
8.1.	Área de estudio.	27
8.2.	Caracterización de los especímenes.	30
8.3.	Claves para la identificación de las especies.	30
8.4.	Valoración del estado de descomposición.	32
8.5.	Identificación de causas de muerte.	36
8.6.	Colección y preservación de muestras.	38
8.7.	Protocolos de extracción de ADN.	39
8.7.1.	Protocolo de sal común (NaCl) (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020).	40
8.7.2.	Protocolo de gradiente de sales (GS) (Lahiri & Nurnberger, 1991).	42
8.7.3.	Protocolo de gradiente de sacarosa (GSC) (Daly, Steen, Fairbrother, & Idle, 1996)..	43
8.8.	Cuantificación de ADN por espectrofotometría.	44
8.9.	Análisis estadístico.	45
8.9.1.	Análisis Probit.	45
8.9.2.	Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor.	45
9.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	46
9.1.	Frecuencia de varamientos.	46
9.2.	Identificación y descripción de los especímenes.	47

Sexo.....	49
Causas de muerte.....	50
Estados de descomposición.....	52
9.3. Curvas de ADN.....	54
9.4. Contaminación de las muestras.....	56
9.5. Concentración y pureza de ácidos nucleicos.....	60
9.5.1 Métodos de extracción.....	60
9.5.2. Métodos de preservación.....	65
9.5.3. Tipos de tejido.....	67
9.5.4. Estado de descomposición.....	69
9.6. Costos y peligrosidad de reactivos.....	72
Peligrosidad de reactivos.....	74
9.7. Viabilidad de los protocolos utilizados.....	74
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	76
10.1. Conclusiones.....	76
10.2. Recomendaciones.....	78
11. BIBLIOGRAFÍA.....	79
12. ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Claves de identificación de especies de tortugas marinas (Wyneken , 2004).....	11
Figura 2: Esquema básico de la lisis celular (Chauhan, 2018).....	13
Figura 3: Tampón Tris después de la titulación de la solución base Tris: (A) con HCL; (B) alrededor de pH 8, contiene Tris base débil; (C) su ácido conjugado; y (D) en equilibrio actúa como tampón cerca del rango de pH fisiológico (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).....	16
Figura 4: El EDTA quelata cationes divalentes como el magnesio y el calcio. (A) Estructura de EDTA; (B) "M" representa los cationes divalentes libres como el magnesio y el calcio; y (C) EDTA quelata los cationes divalentes, lo que hace que no estén disponibles para la ADNasa y alguna otra actividad como la unión a la pared celular y la formación de complejos histona-ADN (Jadhav , Ranjani, & Senthil, 2015) (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).....	17
Figura 5: Papel de la sal en la precipitación del ADN (Jadhav , Ranjani, & Senthil, 2015). (A) Las moléculas de ADN en solución acuosa tienen carga negativa y se repelen entre sí; (B) el acetato de sodio se disocia en el agua en iones de sodio y acetato; y (C) el ion de sodio protege la carga negativa de las moléculas de ADN al neutralizarla y ayuda en la agregación y precipitación (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).....	23
Figura 6: Mapa de la provincia de Santa Elena con las playas monitoreada para el registro de varamientos de tortugas marinas.....	28
Figura 7: Cantidad de varamientos por Estaciones. En rayas, se muestra lo registrado por (Suárez, 2015) en la misma estación.....	46
Figura 8: Registros de especies de tortugas marinas varadas en las playas de Santa Elena en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015) y Manabí (Solórzano, 2015) (Tutiven, 2020).	48

Figura 9: Identificación del sexo de tortugas marinas varadas en la Península de Santa Elena y en comparación con otros autores (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).....	50
Figura 10: Causas de muerte registradas en varamientos de tortugas marinas en la Península de Santa Elena y en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).	51
Figura 11: Estados de descomposición calificados en observaciones externas y en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).....	53
Figura 12: Recopilación de las mejores réplicas analizadas de los 18 especímenes colectados. A la izquierda se muestran los códigos de las muestras con sus colores específicos expresados en la Gráfica.....	56
Figura 13 y 14: A la izquierda se muestra la probabilidad media (95% de confianza) de contaminación usando los diferentes métodos de preservación (0=ARNLT; 40=ET40; 96=ET96). A la derecha se muestran los valores desglosados de contaminación según el tipo de preservación y los protocolos de extracción. Nótese que los menores eventos de contaminación los presenta mediante el método de NaCl y los de la mayor cantidad de eventos, GSC.....	59
Figura 14: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los métodos de extracción aplicados.....	61
Figura 15: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los métodos de extracción aplicados.	61
Figura 16: Comparación de los valores de concentración de ADN obtenidos por otros autores aplicando los protocolos de extracción en muestras de distinta procedencia y tejidos.	62
Figura 17: Comparación de los valores de pureza de ADN obtenidos por otros autores aplicando los protocolos de extracción en muestras de distinta procedencia y tejidos.	63

Figura 18: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los métodos de preservación aplicados.	66
Figura 19: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los métodos de preservación aplicados.	66
Figura 20: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según el tipo de tejido.	68
Figura 21: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según el tipo de tejido.	68
Figura 22: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los estados de descomposición de las muestras.	70
Figura 23: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los estados de descomposición.	70
Figura 24: Precio por muestra de los protocolos de extracción de ADN.	73
Figura 25: Precio por muestra de los métodos de preservación y de extracción, en conjunto.	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Descripción de las estaciones monitoreadas en la Península de Santa Elena entre mayo y junio de 2023.....	29
Tabla 2: Características específicas para la identificación de tortugas marinas en Ecuador (Rueda-Almonacid, Mittermeier, Rodríguez-Mahecha, & Mast, 2007).....	31
Tabla 3: Criterios para evaluar la pureza de ADN según los análisis de A260:280 y 260:30 (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020) (Thermo Scientific, 2011).....	54
Tabla 4: Contaminación (probabilidad) según los métodos de extracción y preservación utilizados; así como las fuentes de contaminación, general, por sales, por proteínas, por sales y proteínas.	59
Tabla 5: Indicaciones de peligrosidad de los reactivos con algún grado de peligrosidad según (MSDS, 2023).....	74
Tabla 6: Posición de los métodos de extracción (arriba) y preservación (abajo), siendo 1 el valor más conveniente y 3 el método menos conveniente según los criterios.	75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Tabla de modificaciones.....	90
Anexo 2: Tabla de referencia para valorar estados de descomposición.....	90
Anexo 3: Resumen de las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados.....	91
Anexo 4: Selección de las mejores muestras de cada uno de los 18 especímenes.	91
Anexo 5: Tabla de metadatos con los criterios usados para la identificación de las especies.	92
Anexo 6: Línea de regresión para el criterio de estados de descomposición.....	93
Anexo 7: Gráfica de interacciones de concentración de ADN para todos los criterios.	93
Anexo 8: Gráfica de interacciones para la pureza en todos los criterios analizados.	94
Anexo 9: Identificación del espécimen y toma de muestra.	102
Anexo 10: Zona de corte y extracción de muestra en bícep.	102
Anexo 11: Muestras secándose luego de haber sido lavadas con agua destilada.	102
Anexo 12: Corte de 50 mg de 24 réplicas de cada muestra.	102
Anexo 14: Total de muestras por procesar.	102
Anexo 13: Ejemplo de pellet de ADN extraído.	102

ABREVIATURAS

Códigos de identificación.

MB: Mar Bravo.

AC: Anconcito.

MV: Monteverde.

CH: Chanduy.

OL: Olón.

CU: Curia.

SR: Santa Rosa.

BA: Ballenita.

SA: San Antonio.

X: Método de NaCl.

Y: Método de GSC.

Z: Método de GS.

ARNLT: ARN Later.

ET40: Etanol al 40%.

ET96: Etanol al 96%.

GLOSARIO

ADN: El ADN, o ácido desoxirribonucleico, es el material que contiene la información hereditaria en los humanos y casi todos los demás organismos.

Buffer o tampón: Es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido débil y su base conjugada, es decir, sales hidrolíticamente activas.

Espectrofotometría: Es una técnica analítica utilizada para medir cuánta luz absorbe una sustancia química, midiendo la intensidad de la luz cuando un haz luminoso pasa a través de la solución muestra

Extracción de ADN: Consiste en la separación y purificación del ADN con el fin de poder estudiarlo, analizarlo o manipularlo.

Gradiente: Es una serie de vectores asociados a determinados puntos del espacio (campo vectorial), que indican cuáles son las direcciones de mayor cambio en un campo escalar

Lisis celular: Proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material celular.

Precipitación: Proceso de obtención de un sólido a partir de una disolución.

Preservante: Sustancia que estabiliza las células e impide la degradación y liberación del ADN genómico celular.

Quelante: Que tiene la propiedad de combinarse con los iones positivos bivalentes y trivalentes, formando complejos estables, desprovistos de toxicidad.

Solvente orgánico: Es un compuesto, generalmente líquido, que contiene carbono y que posee la característica de disolver otras sustancias

1. RESUMEN

La identificación *post-mortem* de especies de tortugas marinas se lleva a cabo normalmente mediante la observación externa de los individuos que cumplen con claves morfológicas únicas. Sin embargo, la categorización de estos criterios muchas veces está sujeto a errores o vacíos por la falta del cumplimiento de requisitos mínimos de identificación. El desarrollo de innovaciones en tecnologías moleculares, métodos estadísticos y herramientas genéticas han contribuido de manera significativa en aspectos de la biología y manejo de la conservación de tortugas marinas.

El presente estudio tiene como objetivo comparar tres protocolos de extracción de ADN en carne de tortuga marina mediante el análisis y cuantificación de ADN para la obtención de un método sencillo, económico, reproducible y no contaminante. Las muestras fueron obtenidas de tortugas marinas en diferentes estados de descomposición varadas en playas de la Península de Santa Elena durante mayo y junio de 2023. Los métodos analizados fueron modificaciones de: protocolo de sal común (NaCl); protocolo de gradiente de sales (GS); y protocolo de gradiente de sacarosa (GSC). También se estudiaron los preservantes ARNLT, Etanol al 40% y Etanol al 96%.

Según los criterios evaluados, se concluyó que el protocolo por gradiente de sales resultó ser el más conveniente según sus valores de concentración de ADN ($120 \pm 73.85 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, ANOVA, $p=0.000$) y con una pureza 260:280 aceptable de 1.60 ± 0.23 ($p=0.043$). seguido del método de NaCl y como peor opción el de GSC. Se determinó también que sí es posible extraer ADN en muestras de tortugas marinas descompuestas y que es preferible tomar muestras de ligamentos en lugar de músculos. El preservante seleccionado como mejor opción fue ET40 con una media de concentración de $97.51 \pm 57.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y pureza 260:280 de 1.58 ± 0.27 . Pero sus diferencias no fueron significativas, pues $p=0.314$ y 0.228 , respectivamente.

Palabras clave: Tortuga marina, Protocolo, Extracción, ADN, Cuantificación, Preservante.

ABSTRACT.

Post-mortem identification of sea turtle species is normally carried out by external observation of individuals that match unique morphological keys. However, the categorization of these criteria is often subject to errors or gaps due to the lack of compliance with the minimum identification requirements. The development of innovations in molecular technologies, statistical methods and genetic tools have contributed significantly to aspects of sea turtle conservation biology and management.

The aim of this study was to compare three protocols for extracting DNA from sea turtle meat by analyzing and quantifying nucleic acid to obtain a simple, economical, reproducible, and non-contaminating method. Samples were obtained from sea turtles in different states of stranding on beaches of the Santa Elena Peninsula during May and June 2023. The methods analyzed were modifications of: (1) common salt (NaCl) protocol; (2) salt gradient (SG) protocol; and (3) sucrose gradient (SCG) protocol. The DNA preservatives RNA Later, 40% Ethanol and 96% Ethanol were also studied.

According to the evaluation criteria, we concluded that the salt gradient protocol turned out to be the most convenient according to its DNA concentration values ($120 \pm 73.85 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, ANOVA, $p=0.000$) and with an acceptable purity value of 260:280 of 1.60 ± 0.23 (ANOVA, $p=0.043$). followed by the NaCl method and the GSC as the worst option. It will also limit that it is possible to extract DNA in samples of decomposed stranded sea turtles and that it is preferable to take samples of ligaments instead of muscles. The preservative selected as the best option was 40% ethanol, with a mean concentration of $97.51 \pm 57.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ and a purity 260:280 of 1.58 ± 0.27 . But their differences were not significant, since $p=0.314$ and 0.228 , respectively.

Key words: Sea turtle, Protocol, Extraction, DNA, Quantification, Preservative.

2. INTRODUCCIÓN.

La identificación *post-mortem* de especies de tortugas marinas se lleva a cabo normalmente mediante la observación externa de los individuos que cumplen con claves morfológicas únicas. Sin embargo, la categorización de estos criterios muchas veces está sujeto a errores o vacíos por la falta del cumplimiento de requisitos mínimos, por lo que la determinación de las especies se imposibilita en algunos escenarios, tales como el faenamiento (que se tienen sólo fragmentos de cuerpo, carne fileteada, sangre o huevos), descomposición extrema, pérdida de características clave, cadáveres incompletos o ubicados en zonas de difícil acceso; por lo que resulta de vital importancia aplicar técnicas moleculares que resuelvan aquellos inconvenientes.

Para la aplicación de aquellas técnicas moleculares es importante utilizar métodos con los que se obtenga muestras de ADN de alta calidad y concentración, por lo que se requiere estandarizar protocolos reproducibles aplicados a individuos, condiciones y/o tejidos particulares. Cuando se obtienen las muestras de fauna silvestre, es muy común que sólo puedan tomarse pequeñas cantidades sin lastimar al animal, siendo esto un limitante para los estudios genéticos pues existe menos posibilidad de obtener ADN de buena calidad (García, Lagares, Yunez, Manjarrez, & Onofri, 2008) (Krestoff, y otros, 2021).

Las muestras fueron obtenidas de tortugas marinas en diferentes estados de descomposición varadas en playas de la Península de Santa Elena durante mayo y junio de 2023. La obtención de ADN en muestras de carne de tortuga marina se realizó mediante análisis de concentración y pureza. Los métodos analizados son modificaciones de: (1) protocolo de sal común (NaCl) según (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020); (2) protocolo de gradiente de sales (GS) según (Lahiri & Nurnberger, 1991); y (3) protocolo de gradiente de sacarosa (GSC) de (Daly, Steen, Fairbrother, & Idle, 1996).

En la Provincia de Santa Elena, no se registra información sobre estudios moleculares o identificación a nivel molecular de tortugas varadas por lo que el presente estudio pretende aportar información para resolver las problemáticas anteriormente mencionadas, cuyo objetivo es comparar tres protocolos de extracción de ADN en carne de tortuga marina mediante el análisis y cuantificación del ácido nucleico para la obtención de un método sencillo, económico, reproducible y no contaminante.

3. JUSTIFICACIÓN.

La conservación de tortugas marinas en Ecuador quizás se vea limitada por la falta de evidencia científica que revele el impacto real de aquellas actividades antropogénicas. Gran parte de las investigaciones sobre el estado actual de las tortugas marinas en Ecuador y el mundo se ha sesgado en la identificación, protección y control de zonas de forrajeo, apareamiento y anidación; así como el registro de varamientos y mortalidades asociadas a enfermedades o interacciones con pesquerías mediante monitoreos u observaciones a bordo (Coello & Herrera, 2011) (CIT, 2021). No se han realizado esfuerzos para aumentar la línea base del conocimiento de tortugas marinas en el ámbito genético, habiendo algunas investigaciones sobre la filogeografía y conectividad genética en *C. mydas* y *E. imbricata* (Valdez, y otros, 2018) (MAAE, WildAid, & GIZ, Plan de Acción para la Conservación de las Tortugas Marinas en Ecuador 2020 - 2030, 2020).

La genética forense se ha utilizado como una herramienta útil de investigación para reducir la pesca incidental y tráfico o comercio ilegal de vida silvestre; ya sea mediante la identificación de las especies, poblaciones, conectividad genética o identidad individual de las muestras confiscadas (Pertwi, Sembiring, Cahyani, & Al Malik, 2020) (Johnson, Wilson-Wide, & Linacre, 2014) (Dalton & Kotze, 2011) (Staats, y otros, 2016) (Arenas, y otros, 2017).

El desarrollo de innovaciones en tecnologías moleculares, métodos estadísticos y herramientas genéticas han contribuido de manera significativa en aspectos de la biología y manejo de la conservación de tortugas marinas. La determinación de sitios natales de adultos reproductores, la identificación de la conectividad genética entre las colonias y las zonas de forrajeo, los análisis filogeográficos y de estructuras poblacionales son algunas de las razones clave que pueden ser abordadas usando las herramientas moleculares.

Al igual que las innovaciones en otros campos como en telemetría animal y modelado de poblaciones, los avances en genética molecular continúan desempeñando un rol central en la profundización de nuestra comprensión de la biología de las tortugas marinas (Komoroske, Jensen, Stewart, Shamblin, & Dutton, 2017).

4. OBJETIVO PRINCIPAL.

Comparar tres protocolos de extracción de ADN en carne de tortuga marina mediante el análisis y cuantificación del ácido nucleico para la obtención de un método sencillo, económico, reproducible y no contaminante.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Aplicar tres protocolos de extracción de ADN mediante el uso de enzimas, solventes orgánicos, agentes quelantes o sales, así como métodos mixtos, para determinar su efectividad en el análisis de ácidos nucleicos.
- Evaluar la calidad y cantidad de ADN según la procedencia de la muestra valorando sus estados de descomposición y el tipo de tejido.
- Evaluación de dos métodos de preservación de muestras mediante el análisis de la pureza, calidad y cantidad de ácidos nucleicos para el desarrollo de una técnica estandarizada con carne de tortuga marina.

6. HIPÓTESIS.

Hipótesis Nula (H0): “La media de los valores de concentración y pureza del ADN será la misma entre los tres protocolos de extracción evaluados”.

Hipótesis Alternativa (H1): “La media de los valores de concentración y pureza del ADN será diferente entre los tres protocolos de extracción evaluados”.

7. MARCO TEÓRICO.

7.1 Importancia y conservación de tortugas marinas.

Las tortugas marinas cumplen con roles importantes para el mantenimiento de las funciones ecológicas, estructura y dinámica de los ecosistemas marinos (Bjorndal & Jackson, 2003). A niveles poblacionales altos, las tortugas marinas son un eslabón esencial en la cadena trófica cumpliendo como depredadores, presas y competidores; actúan también como huéspedes de parásitos, sustratos de epibiontes, transportadores de nutrientes, e incluso como modificadores del paisaje removiendo grandes cantidades de arena en las playas de anidación (Bjorndal & Jackson, 2003).

En conjunto, sus especies se distribuyen en aguas tropicales y subtropicales de todo el mundo, cuyas poblaciones han sido drásticamente reducidas debido, en gran parte, a las interacciones con los seres humanos durante siglos ocurriendo impactos que han pasado prácticamente desapercibidos (Bjorndal & Jackson, 2003). Entre las amenazas que afectan estas especies están: captura directa e incidental por pesquerías comerciales, degradación de las playas donde anidan, extracción de arena, destrucción de sus nidos, desarrollo urbano, introducción de depredadores ferales, polución marina, cambio climático, degeneración de su hábitat, entre otros (Bjorndal & Jackson, 2003) (MAAE, WildAid, & GIZ, Plan de Acción para la Conservación de las Tortugas Marinas en Ecuador 2020 - 2030, 2020).

La conservación de especies migratorias como las tortugas marinas es fundamental para comprender los vínculos migratorios clave y así desarrollar medidas de conservación adecuadas (Pertiwi, Sembiring, Cahyani, & Al Malik, 2020). Estas especies viajan regularmente cientos o miles de kilómetros entre el área en la que se reproducen o anidan y donde se alimentan (Pertiwi, Sembiring, Cahyani, & Al Malik, 2020). Trabajos recientes han determinado que la mayoría de

las zonas de forrajeo parecen albergar múltiples poblaciones reproductoras (Dethmers, Jensen, Fitzsimmons, & Broderick, 2010) (Nishizawa, Joseph, & Yee Kuen, 2018). Por lo tanto, la destrucción del hábitat en zonas de forrajeo, así como la disminución de sus poblaciones reproductoras, puede tener un efecto adverso en colonias remotas.

Los esfuerzos para la conservación de las tortugas marinas enfrentan varios desafíos, p. ej. destrucción del hábitat, pesca incidental, consumo de huevos y carne de tortuga, o producción de artesanías a partir de sus derivados (Madduppa, y otros, 2019). En Ecuador, el consumo de los derivados de tortugas marinas (carne, sangre, grasa y huevos) se considera como parte de la herencia cultural de las comunidades costeras, quienes les atribuyen ciertas propiedades medicinales para tratar enfermedades como anemia, tuberculosis o asma; e incluso como estimulante sexual. A lo largo de la historia, las tortugas marinas han sido un importante recurso pesquero comercial (en especial *L. olivacea*) y fuente de proteína para la mayoría de las comunidades costeras ecuatorianas (Hurtado, 1982). En un principio, lo que se consumía era su carne, pero rápidamente sus productos (pieles y carnes) fueron destinados al comercio externo, reportándose volúmenes de captura de alrededor de 100.000 tortugas al año; además de un comercio interno no mayor a 10.000 tortugas por ciertas comunidades pesqueras (Hurtado, 1982) (Hurtado, 1987).

En la década de los 70's, la carne de tortuga marina era comercializada comúnmente en los mercados de mariscos y continuó de esa manera hasta que en 1981 se declaró su protección total y luego se emitió el Acuerdo Ministerial No. 212 (R.O. 581 del 12 de diciembre de 1990, aún vigente), que establece una veda indefinida de tortugas marinas y prohíbe la captura, procesamiento y comercialización interna y externa (Hurtado, 1982).

Sin embargo, las interacciones de estas especies con las pesquerías se registran a manera de pesca incidental por parte de flotas industriales y artesanales que operan con diferentes artes de pesca (MAAE, WildAid, & GIZ, Plan de Acción para la Conservación de las Tortugas Marinas en Ecuador 2020 - 2030, 2020).

7.2 Descripción de las especies

En el territorio marítimo y costero ecuatoriano, se han registrado cinco de las ocho especies de tortugas marinas que existen en todo el mundo, todas ellas enlistadas en el Apéndice I de CITES (CITES, 2023): tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), verde o negra (*Chelonia mydas*), carey (*Eretmochelys imbricata*), laúd o baula (*Derochelys coriacea*) y caguama o cabezona (*Caretta caretta*). A pesar de los esfuerzos para su conservación tanto locales como regionales, todas estas especies se encuentran dentro de la Lista Roja de IUCN como especies vulnerables, en peligro, en peligro crítico de extinción o amenazadas (IUCN, 2023).

Existen dos familias de tortugas marinas: Cheloniidae y Dermochelyidae; las primeras tienen caparazón duro, mientras que las otras no tienen caparazón de queratina ni escamas, sino que su protección corporal corresponde a tejido conectivo blando. La mayoría de las especies de Cheloniidae tienen dos dedos, siendo el dedo I más grande y puede ser más fuerte y curvo en los machos adultos, el cual tendría una función reproductiva. Las tortugas de la familia Dermochelyidae no tienen escamas en la cabeza y su única cobertura de queratina en su cuerpo se localiza en las mandíbulas. Las tortugas de caparazón duro, por su parte, poseen escamas de queratina distribuidas dorsal y lateralmente en la cabeza de forma específica. Estas pueden ser: prefrontales, supraoculares, postoculares, frontales, frontoparietales, parietales, interparietales, temporales y timpánicas (Wyneken, 2004).

Para este estudio se caracterizaron sólo las escamas prefrontales, las cuales son las más utilizadas para la identificación de las especies, y estas se distribuyen en pares. Puede existir la presencia de escamas supernumerarias o “escamas extra” más pequeñas que separan estos pares de escamas prefrontales (Wyneken , 2004).

7.2.1. Familia Dermochelyidae.

Dermochelys coriacea.

La tortuga laúd o galápagos (*Dermochelys coriacea*) es la única especie de la familia Dermochelyidae. La frecuencia de observaciones a bordo o varamientos de estas especies en las costas de Ecuador es mínima porque se encuentra en Peligro Crítico de Extinción según la UICN (Wallace, Tiwari , & Girondot, 2013) (MAAE, WildAid, & GIZ, 2020). Se caracteriza por ser de color negro con manchas blancas distribuidas por el cuerpo. Posee cinco crestas o quillas dorsales que se extienden a lo largo del caparazón y dos quillas como márgenes en los costados. Presenta también estas quillas en el plastrón (Wyneken , 2004). Tienen una muesca o “corte” en cada lado de la mandíbula y sus extremidades no tienen dedos (Wyneken , 2004).

7.2.2. Familia Cheloniidae.

Chelonia mydas.

El color del caparazón de estas especies varía con la edad, siendo negro con plastrón blanco en las primeras etapas de vida, luego cambia a marrón con plastrón amarillo en juveniles y verde grisáceo con manchas amarillas y marrones en las tortugas adultas. Existe un morfotipo en algunas partes del Pacífico denominadas “melánicas” o negras con plastrón amarillo crema.

Estas tortugas tienen un par de escamas prefrontales, caparazón liso sin escamas superpuestas con cuatro pares de escudos laterales y cuatro pares de escudos inframarginales en el plastrón con dos poros de Rathke (uno en la escama axilar y otro en la inguinal); tienen un dedo en cada extremidad (Wyneken , 2004) (Rueda-Almonacid, Mittermeier, Rodríguez-Mahecha, & Mast, 2007).

Caretta caretta.

El color del caparazón de los neonatos es de marrón con gris con plastrón de color crema. En adultos, el color marrón predomina en su caparazón y plastrón canela. Algunos morfotipos también pueden tener los colores canela con matices de negro. Los escudos del caparazón se traslapan o superponen en los individuos juveniles (también poseen quillas) pero no en adultos. Poseen 5 pares de escudos laterales y 3 pares de escudos inframarginales. El escudo nucal está en contacto con el primer escudo lateral. Las caguamas tienen la cabeza grande y tienen dos dedos con uñas en cada extremidad, así como también dos pares de escamas prefrontales (Wyneken , 2004).

Eretmochelys imbricata.

El color de los neonatos de las tortugas carey son de café caoba oscuro en el caparazón y plastrón. En su proceso de desarrollo, el caparazón adquiere patrones de rayas amarillas, negras o café en los escudos. Poseen 4 pares de escudos laterales y 4 pares de escudos inframarginales. El escudo nucal no está en contacto con el primer escudo lateral, lo cual corresponde a una característica distintiva entre esta especie y *Caretta caretta*. Su cabeza es el doble de larga que es de ancha y posee una ramphoteca o pico córneo largo que se estrecha al final. Tienen dos pares de escamas prefrontales y dos dedos con uñas en cada extremidad (Wyneken , 2004).

Lepidochelys olivácea.

Su caparazón es inicialmente de color marrón y gris en neonatos, cambiando a color oliva o gris oscuro en adultos. Tiene forma redonda con más de 6 escudos laterales, 6 o más escudos vertebrales y 4 escudos inframarginales con poros característicos. Poseen dos pares de escamas prefrontales, muchas escamas supraoculares y dos dedos con uñas en cada extremidad (Wyneken , 2004).

SPECIES IDENTIFICATION

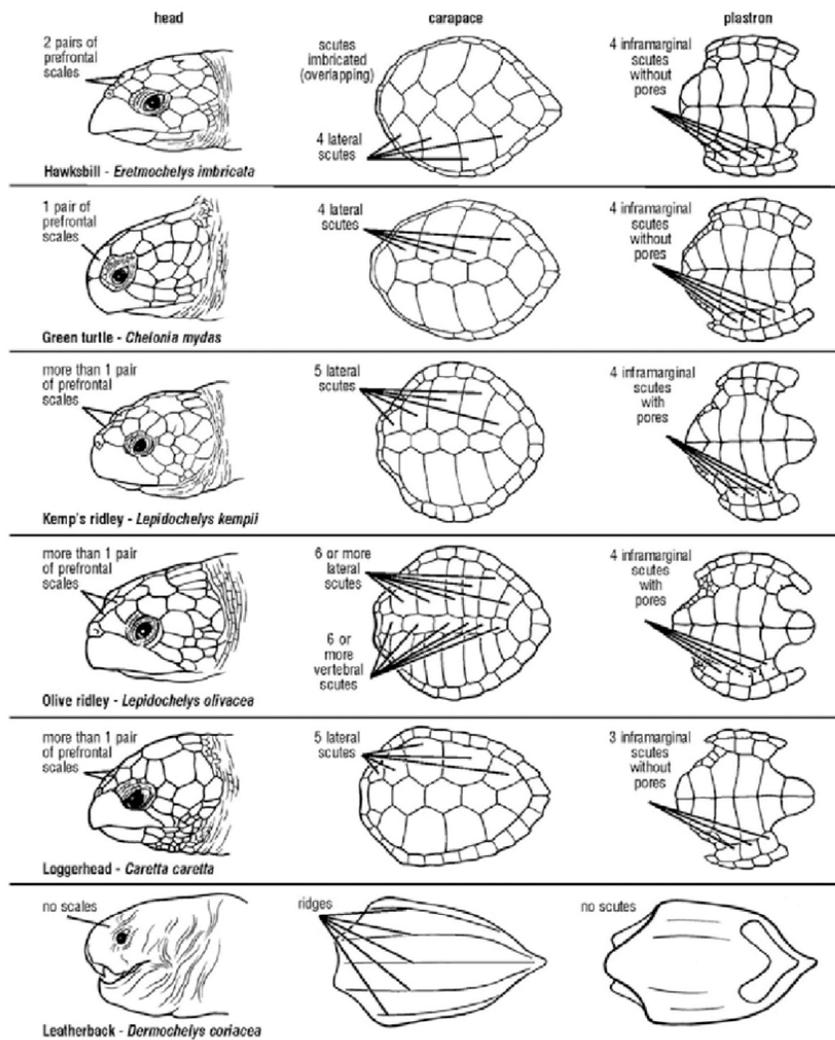


Figura 1: Claves de identificación de especies de tortugas marinas (Wyneken , 2004).

7.3. Fundamentos de la extracción de ADN.

La extracción de ADN es un esquema crucial para aislar el ADN de una célula. Es una técnica complicada pero sensible que requiere conocimiento del manejo de muestras de ADN. Es un proceso de varios pasos regido por varios procedimientos químicos, mecánicos y enzimáticos (Chauhan, 2018).

La lisis de la pared/membrana celular y de la membrana nuclear, la estabilización del ADN, la recolección y la rehidratación del ADN son algunos pasos clave en el proceso de extracción del ADN. La tasa de éxito de la extracción de ADN depende en gran medida del paso iniciador: lisis de la membrana/pared celular (Chauhan, 2018).

7.3.1. Lisis de la membrana celular.

Un tampón de lisis es una solución preparada con varios productos químicos, que se utiliza en biología molecular y celular para alterar o romper la pared o membrana celular y liberar componentes celulares. Se utiliza para aislar ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas de la célula. En la extracción de ADN, el tampón de lisis celular se prepara y utiliza exclusivamente para aislar el ADN de la célula. Es un esquema de lisis química que utiliza varios productos químicos para descomponer la pared/membrana celular, estabilizar y solubilizar el ADN. Detergentes, buffers, sales, inhibidores de proteasa y estabilizadores de ADN son sustancias químicas comunes que deben estar presentes en el tampón de lisis (Chauhan, 2018). Esta etapa es importante ya que, según (Chauhan, 2018):

- Contiene los ingredientes que ayudan a mantener el pH de la solución, proporcionando así un entorno constante para diversas actividades biológicas.

- Contiene los ingredientes que lisan eficazmente la pared/membrana celular y la envoltura nuclear al romper los constituyentes y solubilizarlos mediante un tratamiento químico.
- Ayuda a eliminar los constituyentes de la pared celular, las proteínas, las enzimas y los orgánulos celulares del ADN.
- El tampón de lisis celular también estabiliza el ADN al evitar la degradación del ADN. Separa el ADN de otros desechos celulares y lo aísla de manera efectiva.
- Un tampón de lisis de buena calidad y bien mantenido mejora los rendimientos de ADN en muchos pliegues. Este propósito puede lograrse mediante lisis celular eficaz, lisis nuclear y estabilización del ADN.
- La lisis eficaz también mejora la calidad de las muestras de ADN. Previene el ADN por degradación enzimática, elimina las proteínas de unión al ADN y mejora la calidad.
- Además, el tampón de lisis contiene ingredientes que no interfieren con el procesamiento posterior, como la amplificación por PCR, la digestión de restricción y la secuenciación del ADN.

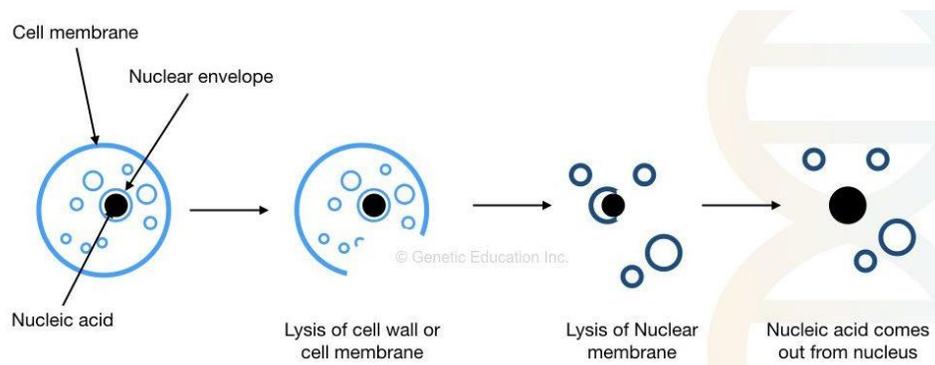


Figura 2: Esquema básico de la lisis celular (Chauhan, 2018).

Métodos físicos.

Los métodos físicos generalmente implican algún tipo de trituración o trituración de la muestra para romper las paredes celulares o el tejido resistente. Un método común de alteración física es congelar y moler muestras con un mortero bajo nitrógeno líquido para obtener un material en polvo que luego se expone a condiciones de lisis química o enzimática (Promega, 2023). Los trituradores pueden ser dispositivos manuales simples o automatizados, capaces de interrumpir varias placas de 96 pocillos. Los métodos físicos a menudo se usan con materiales de entrada más estructurados, como tejidos o plantas. Otros dispositivos utilizan el batido o la agitación de las perlas en presencia de perlas metálicas o cerámicas para romper las células o los tejidos, o la sonicación para romper los tejidos y lisar las células (Promega, 2023).

Métodos químicos.

Los métodos químicos se pueden usar solos con materiales fáciles de lisar, como células de cultivo de tejidos o en combinación con otros métodos. La ruptura celular se logra con una variedad de agentes que rompen las membranas celulares y desnaturalizan las proteínas. Los productos químicos comúnmente utilizados incluyen detergentes (p. ej., SDS) y caotropos (p. ej., sales de guanidina y soluciones alcalinas) (Promega, 2023).

- **Detergentes:** Los detergentes son un componente crucial de un tampón de lisis celular. Una célula contiene una bicapa lipídica. Los detergentes pueden alterar esta capa, solubilizarla y liberar componentes celulares en la solución. SDS, Triton X-100, Tween 20 y CTAB son detergentes comunes utilizados (Chauhan, 2018).

- **Sales:** Las sales tienen muchas funciones durante la lisis celular. Estabilizan el ADN, preservan la integridad del ADN, lo protegen de la actividad de las nucleasas, mantienen el equilibrio iónico y estabilizan la solución. KCl, NaCl y MgCl₂ se han utilizado en el tampón de lisis de extracción de ADN para diversos fines. NaCl ayuda a eliminar las proteínas que están unidas al ADN. También ayuda a mantener las proteínas disueltas en la capa acuosa para que no precipiten en el alcohol junto con el ADN al neutralizar las cargas negativas en el ADN para que las moléculas puedan unirse (Chauhan, 2018).

La ósmosis ocurre cuando la célula se somete a una solución hipo o hipertónica. Si las células se mantienen en una solución hipotónica, el agua entra dentro de la célula, lo que provoca que se hinche, aumente la presión interna y, finalmente, estalle. Por otro lado, en una solución hipertónica, el agua tiende a salir de la célula y, finalmente, la célula se encoge y se arruga, lo que conduce a la plasmólisis (Chauhan, 2018). Por lo tanto, la concentración de sal juega un papel importante en la lisis celular.

- **Buffer:** Tris es un (hidroximetil) aminometano de fórmula molecular (HOCH₂)₃CNH₂, que tiene tres alcoholes primarios y un grupo amino con un pKa de 8,1, es un tampón eficaz entre pH 7 y 9. Cuando el pH se ajusta a 8, con HCl, contiene una mezcla de base débil y su ácido débil conjugado (Figura 3), que puede actuar como tampón y aumenta aún más la permeabilidad de la pared celular. Cuando la pared celular y las membranas se rompen durante la trituración del tejido, termina la compartimentación, se libera material citoplasmático, por lo que se altera el pH y, en consecuencia, se altera la estabilidad de biomoléculas como el ácido nucleico.

El tampón juega un papel importante en tales situaciones y el tampón Tris mantiene el pH de la solución (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

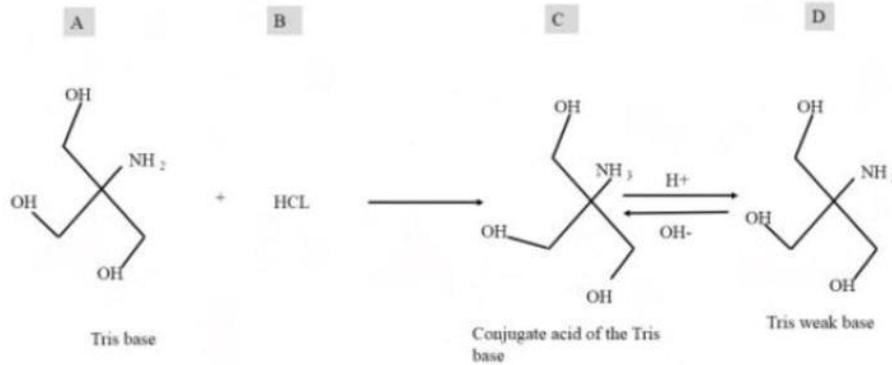


Figura 3: Tampón Tris después de la titulación de la solución base Tris: (A) con HCL; (B) alrededor de pH 8, contiene Tris base débil; (C) su ácido conjugado; y (D) en equilibrio actúa como tampón cerca del rango de pH fisiológico (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

Agentes quelantes: EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) quela cationes divalentes, como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Figura 4), que está presente en las enzimas y reduce la actividad enzimática de DNasa y RNasa. Los cationes divalentes son los cofactores de muchas enzimas que aumentan la actividad de la enzima. Por ejemplo, la enzima ADNasa requiere iones Mg^{2+} como cofactor para su actividad. La quelación de iones Mg^{2+} con EDTA hace que la enzima ADNasa no funcione y, por lo tanto, protege el ADN. Los iones Mg^{2+} también se requieren para la agregación de ácido nucleico con proteína; mientras que los iones Ca^{2+} son necesarios para la cementación de la capa media de la pared celular y la estabilidad de la membrana. Por lo tanto, aprovecharlos con EDTA da como resultado la desestabilización de la integridad de la enzima (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

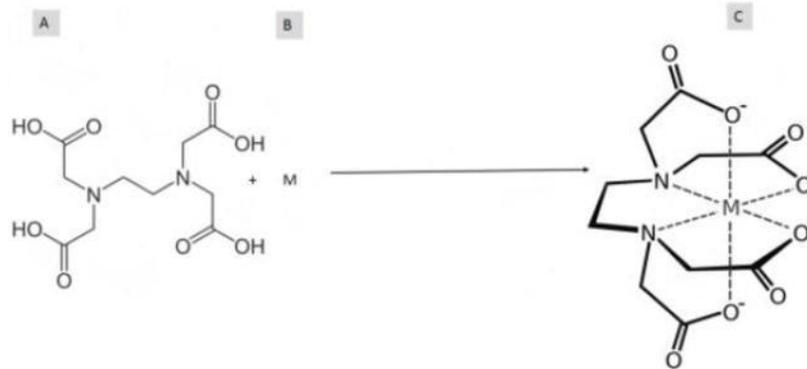


Figura 4: El EDTA quela cationes divalentes como el magnesio y el calcio. (A) Estructura de EDTA; (B) "M" representa los cationes divalentes libres como el magnesio y el calcio; y (C) EDTA quela los cationes divalentes, lo que hace que no estén disponibles para la ADNasa y alguna otra actividad como la unión a la pared celular y la formación de complejos histona-ADN (Jadhav , Ranjani, & Senthil, 2015) (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

Métodos enzimáticos.

Los métodos enzimáticos se utilizan a menudo con materiales más estructurados en combinación con otros métodos con tejidos, materiales vegetales, bacterias y levaduras. Las enzimas utilizadas ayudan a romper los tejidos y las paredes celulares resistentes. Dependiendo del material de partida, los tratamientos enzimáticos típicos pueden incluir: lisozima, zimolasa y liticasa, proteinasa K, colagenasa y lipasa, entre otros. Los tratamientos enzimáticos pueden ser aptos para un procesamiento de alto rendimiento, pero pueden tener un costo por muestra más alto en comparación con otros métodos de interrupción (Promega, 2023).

En muchos protocolos, a menudo se usa una combinación de ruptura química y otra, ya que la ruptura química de las células inactiva rápidamente las proteínas, incluidas las nucleasas (Promega, 2023).

7.3.2. Separación de materia orgánica.

Según el material de partida, es posible que sea necesario eliminar los desechos celulares de los lisados celulares antes de la purificación del ácido nucleico para reducir el arrastre de materiales no deseados (proteínas, lípidos y sacáridos de las estructuras celulares) a la reacción de purificación, lo que puede obstruir las membranas o interferir con el flujo posterior. aplicaciones Por lo general, la limpieza se logra mediante centrifugación, filtración o métodos basados en perlas (Promega, 2023).

La centrifugación puede requerir más tiempo práctico, pero puede tratar grandes cantidades de desechos. El filtrado puede ser un método rápido, pero las muestras con una gran cantidad de residuos pueden obstruir el filtro. Una vez que se genera un lisado aclarado, el ADN se puede purificar mediante muchos métodos químicos diferentes, como sílice, intercambio iónico, celulosa o métodos basados en precipitación (Promega, 2023).

7.3.3. Aislamiento de ADN.

Después de la creación del lisado, los restos celulares y las proteínas se precipitan utilizando una solución salina de alta concentración o solventes orgánicos. La alta concentración de sal hace que las proteínas se salgan de la solución y luego la centrifugación separa el ácido nucleico soluble de los restos celulares y la proteína precipitada (Promega, 2023).

- **Fenol:** Solvente orgánico que no es miscible con agua y se usa junto con el cloroformo y el alcohol isoamílico para la purificación del ADN para eliminar las proteínas y los polisacáridos contaminantes. Cuando se agita el fenol con el extracto celular, los componentes no polares de la célula se fraccionan en fenol, dejando los polares en agua. El ADN es insoluble en fenol porque el fenol es una solución no polar.

Por otro lado, la proteína tiene grupos polares y no polares debido a la larga cadena de diferentes aminoácidos. Diferentes aminoácidos tienen diferentes grupos presentes en su cadena lateral. Además, el plegamiento de la proteína en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria depende de la polaridad de los aminoácidos. Los enlaces entre los aminoácidos se rompen por la adición de fenol y la proteína se desnaturaliza y finalmente la proteína se desdobra (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

La centrifugación después de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en pasos de relación 25:24:1 da tres capas, es decir, acuosa, interfase y, en el fondo, fase orgánica. A pH neutro a alcalino, los ácidos nucleicos tienen carga negativa y son polares. Por lo tanto, es hidrófilo y permanece en fase acuosa. En solución acuosa, el aminoácido hidrofóbico forma un núcleo protector. Sin embargo, después de la desnaturalización, los núcleos no polares (hidrofóbicos) quedan expuestos, lo que provoca la precipitación de proteínas y algunos polisacáridos en la interfase. La combinación de fenol-cloroformo reduce la partición de poli (A) y ARNm en la fase orgánica y reduce la formación de complejos de proteínas de ARN insolubles en la interfase. El fenol retiene alrededor de 10 a 15% de la fase acuosa, lo que da como resultado una pérdida similar de ARN; el cloroformo previene esta retención de agua y por lo tanto mejora los rendimientos (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

- **Cloroformo:** El cloroformo (CHCl_3) o triclorometano es un solvente no polar (hidrofóbico), en el que las proteínas y los lípidos no polares se disuelven para promover la partición de lípidos y desechos celulares en la fase orgánica, dejando el ADN aislado protegido en la fase acuosa.

El cloroformo asegura la separación de fases de los dos líquidos porque tiene una mayor densidad ($1,47 \text{ g cm}^{-3}$) y fuerza una separación más precisa de las fases orgánica y acuosa, lo que ayuda a eliminar la fase acuosa con una contaminación cruzada mínima de la fase orgánica. Como el cloroformo es volátil por naturaleza, no obstaculiza el proceso posterior (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

- **Alcohol isoamílico:** El cloroformo entra en contacto con el aire y forma gas fosgeno (COCl_2 , cloruro de carbonilo), que es dañino. Si simplemente usamos cloroformo solamente, el gas atrapado causa formación de espuma, se forma espuma entre las interfases durante el proceso de extracción y dificulta la purificación adecuada del ADN, lo que se evita cuando se usa cloroformo junto con alcohol isoamílico o isopentanol $\{(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}\}$ u octanol $\{\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}\}$ evitando la emulsificación de una solución. El alcohol isoamílico o isopentanol no es miscible en la solución acuosa porque es un compuesto alifático de cadena larga que contiene cinco átomos de carbono y estabiliza la interfase entre la capa orgánica y la acuosa. La fase acuosa contiene ADN y la fase orgánica contiene lípidos, proteínas y otras impurezas. El alcohol isoamílico ayuda a inhibir la actividad de la RNasa y ayuda a prevenir la solubilización en la fase fenólica de moléculas largas de ARN con porciones largas de poli(A). Esto aumentará la pureza del ADN (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

7.3.4. Precipitación de ADN.

Isopropanol/etanol. El alcohol se usa para precipitar el ADN fuera de la solución de extracción, por lo que se pueden lavar todas las sales y productos químicos y luego disolverlo en el solvente final, generalmente agua o alguna variante de la solución Tris-EDTA.

El ADN permanece disuelto en una solución acuosa porque el ADN tiene un esqueleto de fosfodiéster, que es de naturaleza hidrófila. La molécula de agua forma una capa de hidratación alrededor del ADN mediante la formación de enlaces de hidrógeno. El isopropanol/etanol se utiliza en la precipitación del ADN, que rompe la capa de hidratación. El isopropanol es una buena opción para la precipitación de ADN.

La cantidad de isopropanol requerida es menor (0,6 a 0,7 volúmenes de sobrenadante), ya que el isopropanol tiene una mayor capacidad para reducir la constante dieléctrica del agua que el etanol (2 a 3 volúmenes) y también requiere una buena cantidad de sal para funcionar. El ARN que tiene 2'OH extra permanece unido al hidrógeno con agua con más fuerza que el ADN tiende a permanecer soluble en ella, por lo que se puede realizar una precipitación selectiva del ADN. El isopropanol también disuelve solventes no polares como el cloroformo, por lo que también se pueden eliminar las impurezas del paso anterior (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

Generalmente se practica el uso de isopropanol helado, pero muchos investigadores dicen que debe usarse a temperatura ambiente, de lo contrario, también precipitará polisacáridos (Shepherd & McLay, 2011). Aunque el rendimiento de ADN aumentará a baja temperatura, puede aumentar las impurezas (Michiels, Van den Ende, Tucker, Van Riet, & Van Laere, 2003).

7.3.5. Lavado de ADN.

Etanol 70%. El precipitado de ADN se lava de nuevo con etanol al 70 % para enjuagar el exceso de sal que pudiera haber junto con los tampones de extracción del sedimento, se centrifuga y se desecha el etanol, dejando el ADN en el precipitado. El precipitado se seca al aire o al vacío. Debe evitarse el secado excesivo, ya que el ADN convierte la forma B en forma D, que es difícil de disolver más adelante (Jadhav, Ranjani, & Senthil, 2015) (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

7.3.6. *Purificación de ADN.*

Acetato de sodio/acetato de amonio/acetato de potasio/cloruro de sodio/cloruro de litio/cloruro de potasio. El papel de la sal en el protocolo de extracción es neutralizar las cargas en el esqueleto de fosfato de azúcar del ADN. El acetato de sodio con pH 5,2 se usa comúnmente para la precipitación de ácido nucleico junto con etanol (Maniatis , Fritsch, & Sambrook, 1982). En solución, el acetato de sodio se disocia en Na^+ y $[\text{CH}_3\text{COO}]^-$. Los iones de sodio cargados positivamente neutralizan la carga negativa en los grupos PO^{3-} en la columna de fosfato de azúcar de los ácidos nucleicos, lo que reduce la repulsión entre las moléculas de ADN, lo que hace que la molécula de ADN sea mucho menos hidrófila y, por lo tanto, mucho menos soluble en agua. La atracción electrostática entre los iones Na^+ en solución y los iones PO^{3-} en el ácido nucleico está dictada por la Ley de Coulomb, que se ve afectada por la constante dieléctrica de la solución.

El agua tiene una constante dieléctrica alta, lo que dificulta que el Na^+ y el PO^{3-} se unan. Esto es útil en la agregación y formación de masa enmarañada. También se le llama salazón. Sin embargo, no se ve cuando se usa sal sola. Requiere la solución con baja constante dieléctrica, que permita esta interacción. Esto se ve afectado por el etanol o el isopropanol, que tiene una constante dieléctrica mucho más baja, lo que facilita que el Na^+ interactúe con el PO^{3-} , proteja su carga y haga que el ácido nucleico sea menos hidrofílico, lo que hace que el ADN se caiga de la solución (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

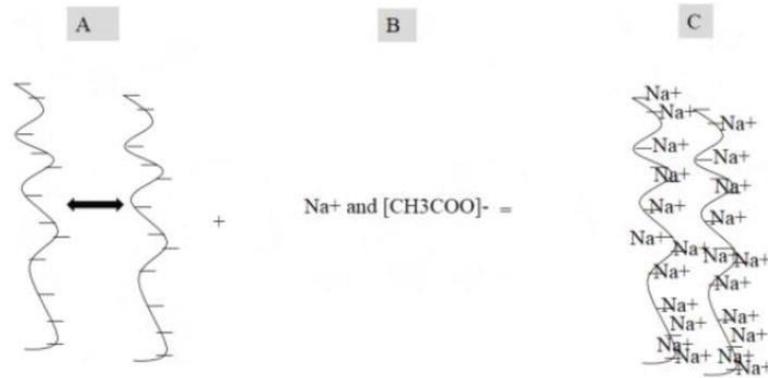


Figura 5: Papel de la sal en la precipitación del ADN (Jadhav , Ranjani, & Senthil, 2015). (A) Las moléculas de ADN en solución acuosa tienen carga negativa y se repelen entre sí; (B) el acetato de sodio se disocia en el agua en iones de sodio y acetato; y (C) el ion de sodio protege la carga negativa de las moléculas de ADN al neutralizarla y ayuda en la agregación y precipitación (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

7.3.7. *Resuspensión.*

Tampón Tris-EDTA (TE)/agua estéril. En tiempos más antiguos, en los métodos de aislamiento de ADN, el ADN solía almacenarse seco y diluido cuando era necesario. Hoy en día, para el almacenamiento a largo plazo, es prudente almacenar el ADN en un tampón que mantenga su pH y evite que se degrade. El tampón TE contiene Tris (10 mM) y EDTA (1 mM), donde Tris es el componente amortiguador y EDTA el componente quelante. Para el aislamiento de ADN, el pH generalmente se establece entre 7,5 y 8,5, la ligera alcalinidad del tampón TE también evita la posibilidad de hidrólisis ácida que puede alterar aún más la estabilidad del ADN almacenado en agua.

El constituyente trisamino del tampón TE tiene la capacidad de proteger las hebras de ADN del daño por radiación, tanto en estado sólido como en solución fluida. Como la radiación produce radicales libres, puede romper cadenas de ADN. Por lo tanto, en la solución fluida a temperatura ambiente, Tris actúa eliminando los radicales hidroxilos (Cullis, Elsy, Fan, & Symons, 1993). El propósito del EDTA es quelar los iones Mg^{2+} en solución necesarios para la acción de la DNasa o RNasa, protegiendo así el ADN de las DNasas o RNasa (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

Se puede utilizar agua estéril para el almacenamiento de ADN de corta duración. Si se utiliza el tampón TE para el almacenamiento de ADN, debe diluirse aún más con agua estéril para diluir la concentración de EDTA y hacer que los iones de magnesio estén disponibles para la actividad de la polimerasa durante la PCR, ya que, si el ADN tiene que enviarse para la secuenciación después, los componentes del tampón en TE dificultan la proceso. El mismo EDTA que quela los iones para degradar el magnesio también dificulta la acción de las polimerasas de ADN durante la PCR, lo que se puede superar agregando más magnesio a la mezcla maestra, o tal vez diluyendo la muestra de ADN para que las concentraciones ya bajas de EDTA en realidad no interrumpan PCR. De hecho, en un gran número de casos, no lo hacen (Heikrujam, Kishor, & Mazumder, 2020).

7.3.8. Detección.

Espectrofotómetro

La densidad óptica (DO) del ADN de la muestra se compara con una curva estándar de concentración de ADN conocida para conocer la concentración del ADN de la muestra (Ali, 2019).

Electroforesis en gel de agarosa

El ADN también se puede cuantificar o detectar mediante aplicaciones de enzimas de restricción para producir pequeños fragmentos de ADN y ejecutarlos en gel de agarosa. En este método, el ADN se tiñe con bromuro de etidio que se intercala en la doble hélice de la molécula de ADN y da color azul. Los fragmentos de ADN más pequeños corren más rápido que los más grandes porque los fragmentos de ADN más pequeños enfrentan menos obstáculos al atravesar el gel (Ali, 2019).

7.4. Protocolos de extracción de ADN en tortugas marinas.

Los métodos de extracción de ADN en muestras de tortugas marinas varían según los autores, época y tipo de muestras. El protocolo más utilizado en épocas recientes para el tratamiento de tejidos de origen forense probablemente es el de (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991) con una solución de Chelex al 10% (García, Lagares, Yunez, Manjarrez, & Onofri, 2008) (Madduppa, y otros, 2019) (Pertwi, Sembiring, Cahyani, & Al Malik, 2020). También es común el uso de kits de extracción como “*Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit*” (Dalton & Kotze, 2011) (Valdés & Cháves, 2015), “*GSYNC Extraction Kit For Tissue and Blood*” (Madduppa, y otros, 2019), entre otros según la preferencia de los investigadores la extracción de ADN. También usan el método enzimático con Proteinasa K (Encalada, Eckert, & Bowen, 1994) (Krestoff, y otros, 2021) (Nishizawa, Joseph, & Yee Kuen, 2018) o Colagenasa Tipo II y mediante solventes orgánicos como fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (García, Lagares, Yunez, Manjarrez, & Onofri, 2008)

Los investigadores (García, Lagares, Yunez, Manjarrez, & Onofri, 2008) compararon protocolos de extracción en muestras de cáscara de huevos eclosionados, contenido de los huevos, caparazones de neonatos y tejido del cordón umbilical de tortugas marinas. No presentaron evidencia sobre la concentración de ADN y pureza. Los métodos consistieron en variaciones de lo establecido originalmente por (Walsh, Metzger, & Higuchi, 1991) con resina Chelex al 5 y 20%; a la aplicación del método clásico de fenol-cloroformo propuesto por (Sambrook & Russel, 2001); así como un protocolo que usa buffer TE y Proteinasa K. Los resultados de aquella investigación recomiendan usar la resina Chelex para obtener altas cantidades de ADN de alta calidad en poca cantidad de muestra.

Ha existido la documentación de la degradación de tejidos blandos (p. ej., sangre, saliva) sometidos a diferentes tipos de exposición ambiental; por ejemplo, la luz ultravioleta (Hall, Sims, & Ballantyne, 2014), altos niveles de humedad y temperatura (Dissing, Sondervang, & Lund, 2010) (Al-Kandari, Singh, & Sangar, 2016) y la inmersión en agua dulce o salada (Borde, Tonmany, & Champod, 2008) (Frippiat, Gastaldi, & van Grunderbeeck, 2017) (Helmus, Zorell, Bajanowski, & Poetsh, 2018) (Meixner, y otros, 2020). Sin embargo, estos estudios investigaron un conjunto controlado de variables en un entorno de laboratorio, en lugar de exposiciones de campo y, a menudo, solo durante días o semanas.

También se han examinado los efectos de la exposición ambiental sobre la degradación del ADN en los tejidos duros (huesos, dientes), incluida la exposición a los rayos UV, los altos niveles de humedad y temperatura, el entierro y la inmersión en agua dulce o salada (Perry, Bass, Riggsby, & Sirotkin, 1988) (Schwartz, Schwartz, Mieszerski, McNally, & Koblinsky, 1991) (Alaeddini, Walsh, & Abbas, 2010). Dentro de esta categoría se encuentra (Krestoff, y otros, 2021) que corresponde al único estudio genético sobre la degradación de tejidos óseos de tortugas marinas.

8. MARCO METODOLÓGICO.

8.1. Área de estudio.

Los monitoreos fueron realizados a lo largo de las playas de la Península de Santa Elena en motocicleta y a pie entre mayo y junio de 2023. Se abordaron los tres cantones de la Provincia de Santa Elena: Salinas, La Libertad y Santa Elena, como se muestra en la Figura 6. La geomorfología de las playas era diferente entre sí, siendo unas playas más viables para los monitoreos en motocicleta que otras, para las cuales era estrictamente necesario hacerlo a pie. Por ejemplo, la zona sur de Santa Elena se caracterizó por playas de difícil acceso y con inclinaciones elevadas, la mayoría de ellas se realizaron los monitoreos a pie o al borde de las carreteras contiguas. Las playas del norte de la Provincia consistían en playas planas y accesibles en motocicleta.

Se dividieron las playas en nueve Estaciones (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9) de diferentes distancias definidas por la cercanía entre ellas, como muestra en la Tabla 1. Se monitoreó 70 km de borde costero que en 19 monitoreos resultó en 137 km de playa recorrida. Las frecuencias de los monitoreos variaron entre las estaciones y fueron establecidas según la accesibilidad de las playas y la frecuencia de varamientos que se iban registrando en esa área, priorizando aquellas con mayor cantidad de varamientos y que podían monitorearse en moto para recorrer mayores distancias.

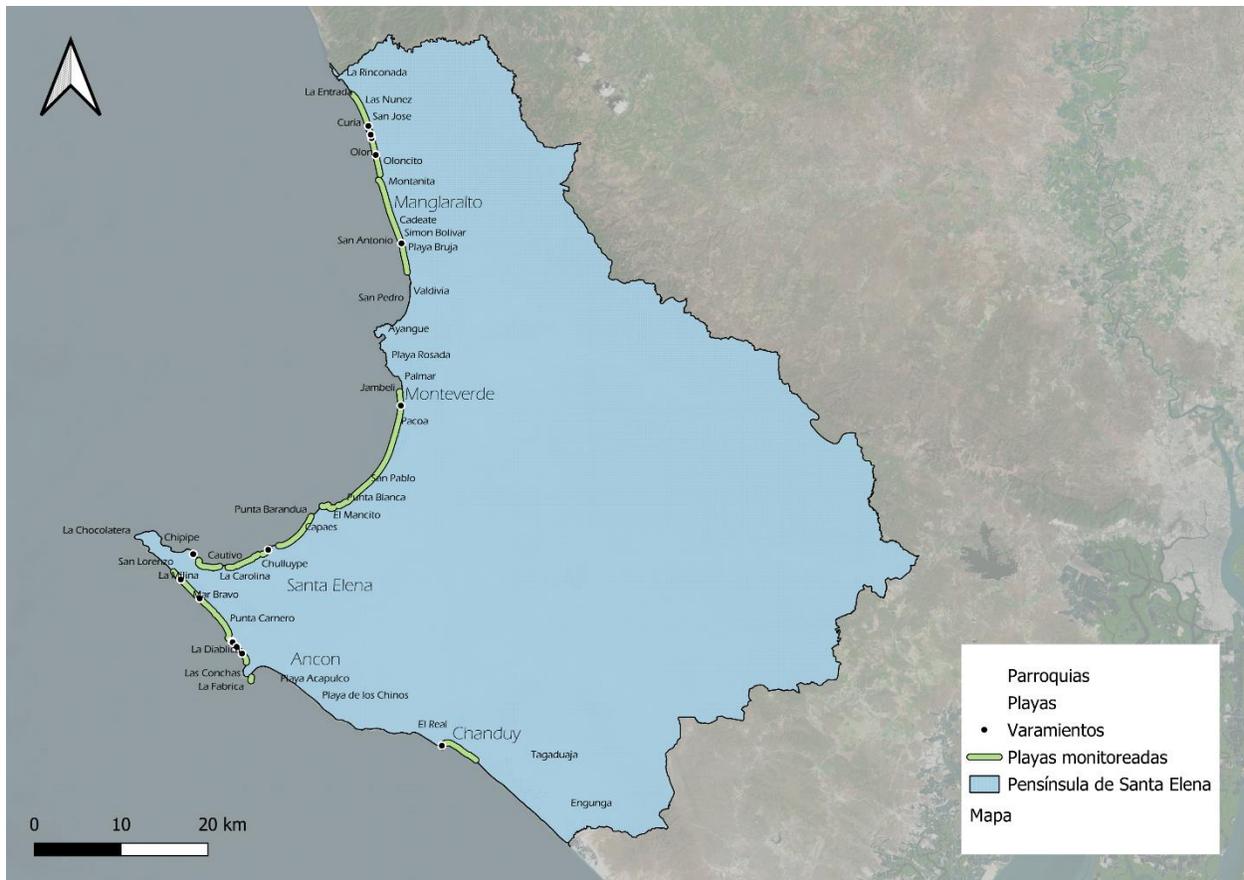


Figura 6: Mapa de la provincia de Santa Elena con las playas monitoreada para el registro de varamientos de tortugas marinas.

Fuente: Elaboración propia (QGIS).

Tabla 1: Descripción de las estaciones monitoreadas en la Península de Santa Elena entre mayo y junio de 2023.

Estación	Playas	Intervalo geográfico		Parroquia	Cantón	Distancia de playa (km)	Frecuencia de monitoreo	Distancia total recorrida (km)
		Desde	Hasta					
E1	Chanduy	-2.407349, -80.692316	-2.420975, -80.657135	Chanduy	Santa Elena	5	2	10
E2	La Diablica Las Conchas La Fábrica	-2.293589, -80.915151	-2.338790, -80.890928	Anconcito	Salinas	4	3	12
E3	Mar Bravo Punta Carnero	-2.224561, -80.972103	-2.290777, -80.914718	Salinas		10	1	10
E4	San Lorenzo Santa Rosa La Milina La Carolina	-2.215153, -80.943844	-2.218469, -80.922432			3	3	9
E5	Malecón de La Libertad Cautivo Chulluyipe	-2.221064, -80.914070	-2.207295, -80.882638	La Libertad	La Libertad	3	2	7
E6	Ballenita Capaes Punta Barandúa El Mancito	-2.206934, -80.881412	-2.153298, -80.792956	Santa Elena	Santa Elena	9	2	17
E7	Punta Blanca San Pablo Pacoa Monteverde Jambelí Palmar	-2.152794, -80.792090	-2.021154, -80.737805			15	2	30
E8	Valdivia Playa Bruja Libertador Bolívar San Antonio Cadeate Manglaralto Montañita	-1.899752, -80.730885	-1.820451, -80.756982			Manglaralto	11	2
E9	Oloncito Olón Curia Las Núñez La Entrada	-1.815693, -80.757703	-1.734734, -80.782646	10	2		20	
Total						70	19	137

8.2. Caracterización de los especímenes.

Los varamientos fueron identificados en la playa y al encontrar el cadáver se observó el área circundante, se tomaron fotografías del área y de los restos del animal; así como los datos para la bitácora y georreferenciación o GPS usando el programa de libre acceso Handy GPS v. 40.4; luego se prepararon los restos mortales del individuo para una mejor identificación, limpiando las partes del cuerpo con exceso de arena o moviéndola a un lugar seguro lejos del alcance del agua.

Las mediciones se realizaron *in situ*, sin necesidad de una necropsia. Se midió con una cinta métrica la longitud y anchura del caparazón- ancho curvo (AC), largo curvo (LC), ancho recto (AR), largo recto (LR)- así como la caracterización (superposición) y contabilización de sus escudos vertebrales, costales e inframarginales. También se tomó en cuenta la cantidad de escamas prefrontales. Se valoraron entonces, por el tamaño y forma; la edad, el sexo y la especie a la que pertenecían los restos mortales del individuo (Poppi & Marchiori, 2013). El sexo de las tortugas pudo ser determinado mediante la comparación entre la longitud de la cola y la del caparazón. Si la cola sobrepasaba el margen posterior del caparazón, siendo también éste caparazón alargado en la parte inferior, se trataba de un macho. Si la cola, en cambio, no era tan larga con respecto al caparazón, siendo éste ancho con tendencia a ser circular, era una hembra.

8.3. Claves para la identificación de las especies.

Para identificar a las especies, se tomó como referencia el informe de (Wyneken , 2004), que ofrece una descripción anatómica completa de las tortugas marinas. Las características externas que son utilizadas para la identificación de las especies, generalmente son las: “escamas de la cabeza, la forma de las mandíbulas, el número de dedos en las aletas, y el número y arreglo de las placas o escudos en el caparazón” (Wyneken , 2004). Véase Tabla 2.

Los escudos del caparazón se enumeran de al frente hacia atrás y los de la concha superior corresponden a los marginales, costales o laterales, vertebrales y nucales; así como los inframarginales en el plástron o concha inferior (Wyneken , 2004).

Tabla 2: Características específicas para la identificación de tortugas marinas en Ecuador (Rueda-Almonacid, Mittermeier, Rodríguez-Mahecha, & Mast, 2007).

Especie	Nombre común	Tamaño promedio (cm)	Cabeza	Caparazón (escudos)	Plastrón	
			Nº de pares de escamas prefrontales	Nº de pares de escamas laterales	Nº de pares de escamas inframarginales	Presencia de poros de Rathke
<i>Dermochelys coriacea</i>	Laúd o galápagos	170	0	0	0	No
<i>Chelonia mydas</i>	Verde o negra	85	1	4	4	Sí
<i>Caretta caretta</i>	Cabezona o caguama	88	2	5	3	No
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Carey o carape	83	2	4	4	No
<i>Lepidochelys olivacea</i>	Golfina	65	2	6+	4	Sí

8.4. Valoración del estado de descomposición.

El examen macroscópico del cadáver consistió en una inspección externa completa del mismo, siguiendo un orden sistemático de cada tortuga con orientación cráneo caudal y dorso ventral evaluando así los cambios autolíticos o *post-mortem* de la mayoría del cuerpo. Se tomó en consideración cualquier cambio anatómico o estructural externo e incluso interno para valorar el estado de descomposición del individuo según la escala propuesta por (Reséndiz & Lara, 2017).

La clasificación de las condiciones del cadáver para determinar su estado de descomposición se detalla a continuación. En Anexos, se describe la Tabla utilizada para determinar el estado de descomposición de los ejemplares, que desglosa las características externas descritas en este Capítulo según (Reséndiz & Lara, 2017).

1. Muerte reciente o fresca.

Factible de realizar necropsia, toma de muestras para histopatología, bacteriología, toxicología, microscopía electrónica, biología molecular.

Características externas.

- El caparazón puede presentar extravasación de líquidos celulares y/o moderada a gran cantidad de grasa.
- Percebes vivos en caparazón y plastrón.
- La piel se oscurece.
- Se aprecian músculos de tono rojo oscuro.
- Aunque se considera fresco, el olor no es tan fuerte durante al menos 2 días (Modificado de Mancini, 2009).

Características internas.

- Comienzo de pérdida de funciones biológicas básicas.
- Comienzo de muerte celular y tisular (Trigo y Valero, 2002).
- Alteraciones del caparazón: cese de la circulación sanguínea, caída de la tensión arterial y silencio auscultatorio (Trigo y Valero, 2002).
- Ausencia de movimientos respiratorios en las paredes del plastrón (Adaptado de Wobeser, 1996).
- Ausencia en la actividad del sistema nervioso central (inmovilidad, insensibilidad, arreflexia) (Adaptado de Cooper, 2009).
- Comienzan a aparecer alteraciones morfológicas (cambios *post mortem*) y el inicio de la biodegradación natural (Modificado de Mancini, 2009 y adaptado de Trigo y Valero, 2002).

2. *Cambios post-mortem inmediatos.*

Características externas.

- Destrucción parcial del caparazón. Estos cambios dependen del tiempo, temperatura y humedad, tamaño corporal y peso del organismo, estado nutricional y tipo de dieta, especie y estado de salud (cuando el animal estaba vivo), entre otros (Adaptado de Cooper y Cooper, 2007).
- El caparazón comienza a doblarse por el sol.
- La piel y los músculos se oscurecen y endurecen.
- El organismo puede comenzar a hincharse.

- El olor es fuerte y desagradable (Modificado de Mancini, 2009).

Características internas.

- Se observan cambios autolíticos de moderados a severos.
- Alteraciones cadavéricas: deshidratación cadavérica, algor mortis, rigidez cadavérica, lividez cadavérica, hipóstasis visceral, inicio de enfisema post mortem (período de enfisema: 2-7 días y más) (Adaptado de Trigo y Valero, 2002).

3. *Cambios post-mortem avanzados.*

Características externas.

- Destrucción del caparazón por factores exógenos (Linacre, 2009)
- El caparazón se endurece.
- Los escudos empiezan a romperse del caparazón.
- La piel está dura, rígida y seca al tacto.
- Se aprecian huesos de las aletas.
- Los cráneos son visibles.
- Los músculos están secos y oscurecidos (Monificado de Mancini, 2009).

Características internas.

- La tortuga presenta cambios autolíticos avanzados y cambios degenerativos notables.

- Enfisema *post mortem*, imbibición *post mortem*, pseudomelanosis, pérdida de color y/o ruptura *post mortem*, se observa desplazamiento *post mortem* (Adaptado de Trigo y Valero, 2002).

4. *Caparazón y esqueleto.*

Características externas.

- Último período de descomposición descrito como reducción del esqueleto (más de 3 meses aprox.) (Adaptado de Linacre, 2009).
- Desaparición total de los restos blandos cadavéricos, a excepción de los huesos que componen el esqueleto óseo como último resto del caparazón (Adaptado de Cooper y Cooper, 2010).
- El caparazón está seco y rígido.
- Queda poco tejido muscular.
- En algunos casos se pierde la sucesión vertebral y se puede observar la cabeza y los huesos dispersos (Modificado de Mancini, 2009).

5. *Sólo caparazón.*

Características externas.

- Generalmente, el caparazón se encuentra quemado por el sol y sin unión a los huesos.
- No se observa piel ni músculos (más de 5 meses aprox.) (Modificado de Mancini).

6. *Sólo huesos.*

Características externas.

- Huesos encontrados dispersos y en algunos casos uno junto a otro (Modificado de Mancini, 2009).

8.5. Identificación de causas de muerte.

También se tomó como referencia las clasificaciones establecidas por (Reséndiz & Lara, 2017). No se realizó necropsia de los animales por falta de conocimiento básico sobre Medicina Forense Veterinaria y Patología Veterinaria, por lo que la evaluación de las causas de muerte fue cualitativas y visibles externamente.

1. Consumo.

Se define como muerte destinada al consumo cuando la muerte se produjo por causa violenta o no violenta, como consecuencia de la acción premeditada o captura, cuyo fin principal fue la muerte del animal. En estos casos el caparazón o los restos presentan signos de una lesión generalmente usando cortes limpios con cuchillo en zonas específicas (Modificado de Wobeser 1996 y Cooper, 2009), huellas de quemaduras, arpón en tejido vivo (Modificado de Mancini, 2009) como finalidad dañar o mutilar para el consumo. Las partes del cuerpo más consumidas son a la altura del músculo pectoral y aletas por su cantidad de carne. De esta manera, la ausencia de estas partes del cuerpo acompañadas de un corte puede ser consideradas como muerte o pesca objetivo.

2. Pesca incidental.

Cuando la muerte se produce por causa violenta o no violenta como consecuencia de una circunstancia accidental (Adaptado de Linacre, 2009). En estos casos, se presentó evidencia cerca del lugar, dentro o sobre los restos del individuo, la presencia de restos de cabos o redes, hilos nylon, anzuelos; o, si correspondía a muerte por impacto o golpes, cráneos o caparazones rotos; marcas de cuchillos en el caparazón, entre otros.

3. Muerte natural.

Se considera que la muerte se ha producido por una causa natural no violenta, generalmente como consecuencia de enfermedades (fibropapiloma u otras) o depredadores (mordedura de tiburón) (Modificado de Mancini, 2009). En este caso sólo pudo evaluarse la presencia de mordeduras de depredadores.

4. Causa desconocida o indeterminada.

Cuando la muerte es producida por causas que no son posibles determinar mediante los métodos establecidos.

8.6. Colección y preservación de muestras.

Los especímenes encontrados estaban en un estado físico único, unos enteros y otros con sus restos corporales dispersos o incompletos. Por lo que, la colecta de muestras también fue específica para cada cadáver, pues se tomaban las muestras más viables a criterio del investigador. Los criterios empleados para la toma de muestras fueron, según los métodos modificados de (Work, 2000): (1) la limpieza de la zona de corte; (2) se priorizaban las partes del cuerpo con mayor cantidad de tejido muscular -al menos 50g- como las extremidades; (3) en caso de carecer de la cantidad de tejido muscular necesaria se tomaban muestras de cloaca o tejido conectivo blando como el que recubre internamente el caparazón; (4) si el cadáver tampoco tenía remanentes de tejido conectivo blando y se encontraba totalmente seco, se tomaron muestras de ligamentos que recubrían huesos o el interior del caparazón.

Luego de identificar el lugar de corte, se enjuagó el área con agua destilada y con un bisturí se cortó la zona realizando un cuadrado de unos 5x8 cm. Hubo especímenes con los cuales fue necesario usar tijeras para cortar la piel seca y dura. Si era una extremidad superior, se tomaban las muestras a la altura del bíceps, si era de cloaca se tomaba la parte más blanda y si eran ligamentos se seleccionaban los más frescos a la vista. Las muestras fueron lavadas con agua destilada, se guardaron en fundas pequeñas de cierre hermético y se rotularon con un código correspondiente al lugar, fecha y número de espécimen encontrado (LL-DDMM-N). Por ejemplo, una segunda tortuga encontrada en Anconcito ese día (04 de mayo) en la misma playa, tendría el código: AC04052. Fueron puestas inmediatamente a congelación dentro de una hielera.

La preservación de las muestras fue efectuada el mismo día luego de los monitoreos. En el Laboratorio de Biología Molecular de UPSE, se lavaron las muestras con abundante agua destilada hasta que no quedara remanentes de arena, *biofilm* bacteriano o mal olor predominante.

Se cubrieron las muestras con papel toalla junto a la llama de un mechero de alcohol para que se elimine el exceso de agua. Se cortaron 24 réplicas (50 mg, en la balanza analítica) de cada muestra que fueron distribuidas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, 6 en cada uno, previamente rellenos con: 300 µL Invitrogen™ Solución de estabilización RNAlater, 300 µL de Etanol al 96% y 300 µL de Etanol al 40%. También se ubicaron 6 réplicas en tubos Eppendorf vacíos para reservas de muestras sólo en congelación. Cada tubo fue rotulado en la parte superior con sus respectivos códigos. De todos los métodos de preservación anteriores, sólo con etanol al 96% había sido probado con diferentes autores en carne de tortuga marina, sobre los otros métodos, el presente estudio es la única referencia, al menos de lo que se ha podido evidenciar. Las muestras fueron puestas en congelación a -20°C hasta próximo uso.

8.7. Protocolos de extracción de ADN.

Se evaluaron tres protocolos de extracción de ADN. Todos aquellos fueron modificados con la finalidad de ajustar el método según el tipo de muestra. Los protocolos utilizados fueron: (1) método de extracción de ADN sin modificaciones usando sal común (NaCl) y enzima Proteinasa K propuesto por (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020) (quienes modificaron al 65% el método original de Aljanabi & Martinez, 1997); (2) el método modificado al 55% de gradiente de sales (GS) no enzimático propuesto por (Lahiri & Nurnberger, 1991); y (3) el método modificado en un 61% por gradiente de sacarosa (GSC) de (Daly, Steen, Fairbrother, & Idle, 1996). Los criterios utilizados para la determinación del porcentaje de modificación se muestran en Anexos.

Recordando que en el presente estudio se utilizaron muestras de tejido muscular y fibroso conjuntivo (ligamentos) en estado sólido, fue necesario modificar los métodos anteriores, pues el de (Aljanabi & Martinez, 1997), (Escalante, 2020) y (Rodríguez, 2017) usaron micelios, tejido vegetal y muestras de carne de cangrejo, mientras que (Lahiri & Nurnberger, 1991) y (Daly, Steen,

Fairbrother, & Idle, 1996) usaron muestras de sangre. Estos dos últimos fueron los que sufrieron más modificaciones en relación al tratamiento de los productos de centrifugación y separación de materia orgánica; mientras el primero sólo fue modificado en la concentración y cantidad de reactivos a partir del método original de (Aljanabi & Martinez, 1997). Por aquella razón, se estableció un formato en los protocolos con la finalidad de que las muestras fueran tratadas de manera similar.

El formato establecido fue según el protocolo con las muestras sólidas, el cual fue el de NaCl. Los pasos para la extracción de ADN aplicados en el presente estudio se detallan a continuación: lisis celular, incubación, desnaturalización de proteínas, separación de materia orgánica mediante centrifugación, extracción del sobrenadante con ADN, precipitación y purificación de ADN, lavado del pellet, incubación y resuspensión.

8.7.1. Protocolo de sal común (NaCl) (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020).

Se utilizaron dos réplicas de las 18 muestras preservadas en Etanol al 96% y solución de ARN Later, procesando así un total de 72 muestras mediante este protocolo. Cabe recalcar, que si bien este método es 65% modificado con relación al método original de (Aljanabi & Martinez, 1997), no tiene ninguna modificación a los aplicados por (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020).

Se desechó el contenido del preservante en el tubo Eppendorf y se aseguró que se hayan eliminado los excesos. Los 50 mg de muestra fueron extraídos del tubo y cortados con un bisturí en trozos muy pequeños; fueron introducidos nuevamente en su recipiente. Luego se vertió 200µL de tampón de extracción (0.05M Tris pH 8– 0.1M EDTA pH 8), 40 µL de SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio) y se trituró en el mismo tubo con un pistilo vigorosamente hasta que mayor parte de la muestra quede disuelta.

Se agregaron 400 μL de tampón de extracción, correspondiente a los 600 μL especificados en el protocolo, 30 μL más de SDS al 10% (70 μL en total) y 20 μL de Proteinasa K (20 mg mL⁻¹). Se homogeneizó la muestra y se incubó en baño María a 55°C por 15 min. Después se añadieron 200 μL de NaCl 5M y se centrifugó a 10 000g por 5 min.

Se transfirieron aproximadamente 800 μL de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5mL y se rotularon con sus respectivos códigos para evitar confusiones o pérdidas de muestra. La cantidad de sobrenadante extraído no aplicaba en todos los casos, pues algunas muestras poseían mayor cantidad de materia orgánica en suspensión y, por lo tanto, menor cantidad de sobrenadante. Se agregó 1 volumen de etanol absoluto junto con la décima parte (1/10) del volumen del sobrenadante de acetato de sodio 3M para la purificación de ADN. Se dejó reposar durante toda la noche a -20°C (al menos 12h).

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 10 000g durante 5 min. Aquí el pellet se debería tornar visible, adherido al fondo del tubo Eppendorf o flotando en el líquido, por lo que es de sumo cuidado que, al eliminar el sobrenadante, la pastilla o pellet de ADN no se pierda. Luego de eliminar el líquido de precipitación, se lavó el pellet con 800 μL de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 12 000g durante 5 min asegurándose que el pellet haya quedado adherido al tubo. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se secó completamente el pellet a unos 40°C. La pastilla se resuspendió en 50 μL de agua ultrapura (Invitrogen™ Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa) que puede almacenarse a -20°C.

8.7.2. Protocolo de gradiente de sales (GS) (Lahiri & Nurnberger, 1991).

Los tipos de preservantes, la cantidad de réplicas utilizadas (72) y la preparación de las muestras (eliminación del preservante, corte en trozos pequeños) fue la misma que la descrita en el protocolo anterior (NaCl).

Se vertió 200 μ L de 1200 μ L de tampón de extracción (0.01 M Tris pH 8; 0.002 M EDTA, 0.01 M KCl, 0.01 M MgCl₂), 40 μ L de SDS al 10% y se trituró en el mismo tubo con un pistilo vigorosamente hasta que mayor parte de la muestra quede disuelta. Se agregaron otros 1000 μ L de tampón de extracción y se homogeneizó. Se incubó en baño María a 55°C por 15 min. Después se añadieron 150 μ L de NaCl 3M y se centrifugó a 12 000g por 5 min.

Se transfirieron aproximadamente 500 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5mL y se rotularon con sus respectivos códigos. Se agregó 1 volumen de etanol absoluto (aproximadamente 1 000 μ L) junto con la décima parte (1/10 o 50 μ L) del volumen del sobrenadante de acetato de sodio 3M para la purificación de ADN. Se dejó reposar durante toda la noche a -20°C (al menos 12h).

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 10 000g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 000 μ L de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 10 000g durante 5 min asegurándose que el pellet haya quedado adherido al tubo. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se secó completamente el pellet a unos 40°C. La pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura (Invitrogen™ Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa) y se incubó en baño María a 65°C durante 15 min para mejorar la dilución del ADN. La muestra puede almacenarse a -20°C.

8.7.3. Protocolo de gradiente de sacarosa (GSC) (Daly, Steen, Fairbrother, & Idle, 1996).

La cantidad de réplicas utilizadas (72) y la preparación de las muestras (eliminación del preservante, corte en trozos pequeños) fue la misma que la descrita en los protocolos anteriores.

Se vertió 200 μ L de 1200 μ L de tampón de extracción (0.32 M de sacarosa, 0.01 M Tris pH 7.4; 0.0015 M EDTA, 0.005 M $MgCl_2$), 40 μ L de SDS al 10% y se trituró en el mismo tubo con un pistilo vigorosamente hasta que mayor parte de la muestra quede disuelta. Se agregaron otros 1000 μ L de tampón de extracción y se homogeneizó. Se incubó en baño María a 65°C por 30 min. Después se añadieron 200 μ L de NaCl 5M y se centrifugó a 12 000g por 5 min.

Se transfirieron aproximadamente 500 μ L de sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5mL y se rotularon con sus respectivos códigos. Se agregó 1 volumen de etanol absoluto (aproximadamente 1 000 μ L) junto con la décima parte (1/10 o 50 μ L) del volumen del sobrenadante de acetato de sodio 3M para la purificación de ADN. Se dejó reposar durante toda la noche a -20°C (al menos 12h).

Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 10 000g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 000 μ L de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 10 000g durante 5 min asegurándose que el pellet haya quedado adherido al tubo. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y se secó completamente el pellet a unos 40°C. La pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura (Invitrogen™ Agua destilada UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa) y se incubó en baño María a 65°C durante 15 min para mejorar la dilución del ADN. La muestra puede almacenarse a -20°C.

El resumen de los protocolos aplicados en este estudio se muestra en Anexos.

8.8. Cuantificación de ADN por espectrofotometría.

Para poder usar el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c, fue necesario primero leer el Manual del Usuario e instalar el software del mismo (NanoDrop 2000/2000c V. 1.6.198). Se debe asegurar que los lentes estén completamente limpios. Para limpiar se tuvo que usar un pañuelo resistente con agua ultrapura. Es necesario calibrar el lector con solución blanco, que es agua ultrapura. Se debe agregar 5 μL de agua ultrapura y presionar el botón “Blank”, se espera y luego se prueba la calibración efectuando una lectura presionando el botón “Measure”. El resultado debe ser de 0.0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ que indica la ausencia de materia contaminante. Se tuvo que repetir los blanqueos hasta cumplir con aquella condición para proceder con el análisis de las muestras. También se debió establecer el Factor 50 en el software, lo cual indica la conversión de la absorbancia a 260 nm a la concentración de ADN.

La identificación de las muestras en estos casos fue ligeramente diferente a las establecidas en el campo, aquí se agregó el tipo de protocolo de extracción (siendo X para NaCl, Y para GS, Z para GSC), el tipo de preservante (ET para etanol al 96%, LT para ARN Later y ET40 para etanol al 40%), además del número de réplica, quedando por ejemplo: SA04061ZET2 para el ADN de la réplica número 2 de la primera tortuga encontrada en San Antonio el 04 de junio extraído con el método de gradiente de sacarosa (GSC).

Una cantidad de la muestra del ADN resuspendido (5 μL) fue ubicada en el lector del espectrofotómetro. Se efectuó la lectura dos veces de la misma muestra para asegurarse que las lecturas son correctas valorando así los resultados obtenidos, pero no se identificaron estas réplicas como independientes, sino siempre con el mismo código. Entonces, si en un protocolo se tenían 72 muestras, se efectuaron 144 lecturas que en los tres protocolos serían 432 datos por analizar.

8.9. Análisis estadístico.

Con base a los criterios anteriores, para el análisis estadístico se seleccionaron de entre todas las muestras, sólo las curvas visiblemente viables sin contaminación y ejemplares con buena concentración de ADN. Para lo cual se efectuaron diagramas de barra y circulares, análisis Probit, ANOVA de un solo factor con gráficas de intervalos, modelamiento de efectos mixtos para obtener comparaciones de medias por el método de Tukey con gráficas factoriales y de interacciones, entre otros. El software utilizado para lo siguiente fue Minitab® 17.

8.9.1. Análisis Probit.

El Análisis Probit permitió determinar la probabilidad de que exista contaminación de muestras según los protocolos y preservantes utilizados. Para realizar el análisis, se aplica una tensión (o estímulo, en este caso preservantes o protocolos) a un número de unidades (muestras) y luego se registra si cada muestra se contamina (definido como un evento) o no se contamina (Minitab, LLC, 2023). Así se pudo examinar cómo cambia la probabilidad de un evento de contaminación a medida que cambian los métodos de extracción o preservación.

8.9.2. Análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor.

Para ejecutar un ANOVA, debe tener una variable de respuesta continua (en este caso A260 o concentración de ácidos nucleicos, 260/280) y al menos un factor categórico (métodos de extracción o de preservación, tipo de tejidos y estado de descomposición) con dos o más niveles (Minitab LLC, 2023). El procedimiento funciona comparando la varianza entre las medias de los factores para determinar si las medias son diferentes y obteniendo un valor p que da como referencia la significancia de los datos obtenidos según los protocolos aplicados (Minitab LLC, 2023). Los análisis de ANOVA fueron acompañados con gráficas de intervalos, gráficas factoriales de efectos principales y gráficas de interacciones con un desglose más específico de datos.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1. Frecuencia de varamientos.

Se registraron un total de 18 especímenes varados en las playas de la Península de Santa Elena durante los meses de mayo y junio. La Estación 2 (E2: Anconcito) fue la que presentó mayor cantidad de varamientos (N=6), seguida de E9 (Olón a La Entrada) con N=5 cadáveres de tortugas. La Figura 7 muestra la cantidad de varamientos en las otras Estaciones. El estudio realizado por (Suárez, 2015) registró 90 varamientos de tortugas marinas desde febrero de 2014 hasta mayor de 2015, desde las playas de San Pedro hasta Olón, lo cual equivale a la Estación 8 y parte de la Estación 9 del presente informe. (Suárez, 2015). En los meses correspondientes al presente informe que fueron entre mayo y junio (todo el mes de mayo y los primeros días de junio), (Suárez, 2015) registró 6 varamientos en mayo de 2014, de acuerdo con lo presentado aquí, con un total de 6 varamientos en E9.

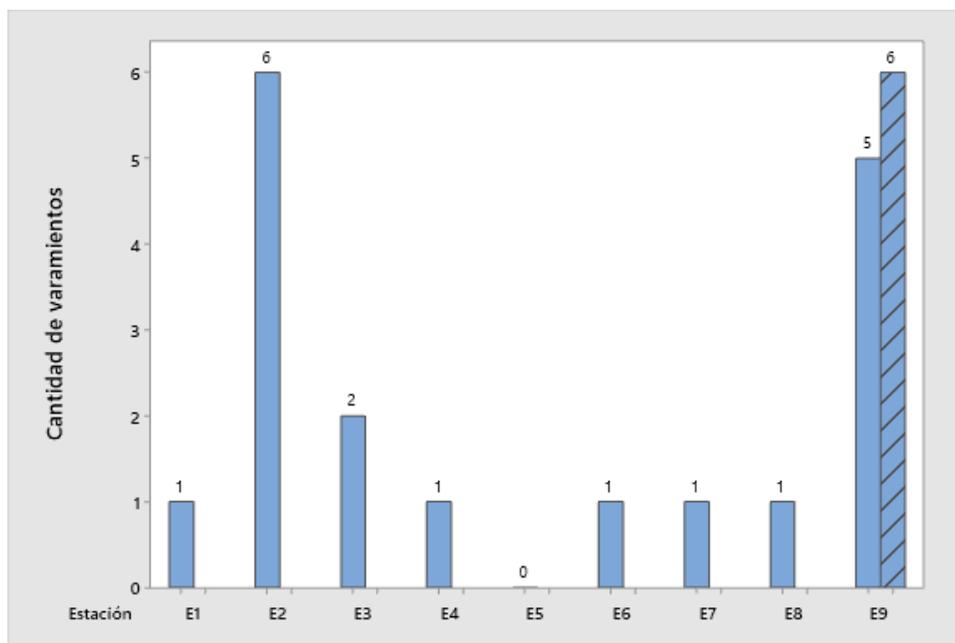


Figura 7: Cantidad de varamientos por Estaciones. En rayas, se muestra lo registrado por (Suárez, 2015) en la misma estación.

La Tabla en Anexos muestra los metadatos registrados en la zona y brinda información específica sobre los especímenes encontrados: geolocalización, biometría y morfometría, edad, sexo, especie, causa de muerte, estado de descomposición, tipo de tejido y zona del cuerpo en que fue tomada la muestra. Además de otros datos que facilitaron la identificación de la especie.

9.2. Identificación y descripción de los especímenes.

La especie más frecuentemente registrada fue *C. mydas* con una prevalencia del 67% (N=12) y un registro único de *L. olivacea* (5.6%). Los otros 5 individuos (28%) no pudieron ser identificados mediante los métodos convencionales aplicados. Se compararon las especies con las registradas en la Península de Santa Elena por (Suárez, 2015) en la parroquia de Manglaralto, (Menéndez, 2015) en Anconcito; en Manabí por (Solórzano, 2015) en la playa de San Lorenzo y (Tutiven, 2020) quien hizo una recopilación de los datos de varamientos atendidos en el Centro de Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla entre 2014 y 2019. (Suárez, 2015) y (Solórzano, 2015) coinciden que la especie más frecuente fue *L. olivacea* seguida de *C. mydas* y unos cuantos registros de *E. imbricata* y *D. coriácea*, lo cual no va de acuerdo con lo determinado en este estudio. Por su parte, (Tutiven, 2020) y (Menéndez, 2015) registraron 60% y 57.1% de varamientos de *C. mydas*, respectivamente, además del 37.9% y 38.1% de *L. olivacea*, de acuerdo con los resultados del presente informe.

Cabe recalcar que los datos obtenidos por (Tutiven, 2020) tienen un aval de profesionales en Medicina Veterinaria del Centro de Rehabilitación de Fauna Marina (CRFM), quienes son expertos en la descripción de especies; mientras que, tanto en este estudio, como en los de (Menéndez, 2015), (Solórzano, 2015) y (Suárez, 2015); se realizó la identificación en el campo mediante técnicas de observación externa, siendo así susceptibles a errores de identificación por la falta de experticia y uso de herramientas inadecuadas.

Algunas de ellas fueron imposibles de determinar (27.8%) ya sea por el estado del cuerpo y descomposición del cadáver, ausencia de escudos o escamas preorbitales, entre otros; razón por la cual es de suma importancia que la identificación de las tortugas marinas sea mediante el uso de herramientas genéticas y de biología molecular. Véase Figura 8.

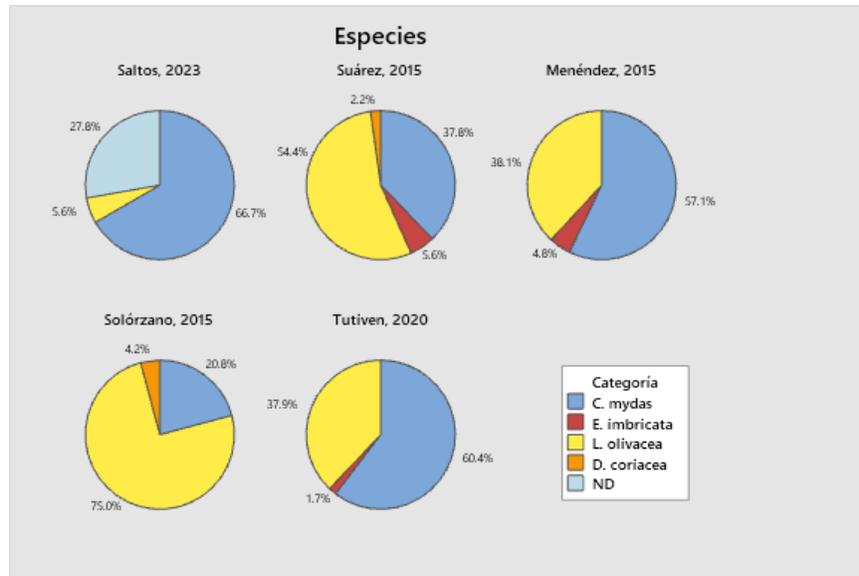


Figura 8: Registros de especies de tortugas marinas varadas en las playas de Santa Elena en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015) y Manabí (Solórzano, 2015) (Tutiven, 2020).

La ubicación geográfica, los distintos tamaños de muestra evaluados, así como la época del año; son otros factores que impiden establecer criterios de similitud entre estos grupos, pero al menos se pueden tomar como referencia y evidencia. A continuación, se muestra la comparación y análisis de otros parámetros evaluados, como sexo, edad, causa de muerte, y estado de descomposición.

Sexo.

La mayoría de las especies encontradas fueron hembras (55.6%), seguidas del 11.1% de machos, estableciéndose una proporción de 5:1 hembras/machos; y un 33.3% de los especímenes no pudieron ser determinados gran parte debido a que faltaba la cloaca por el estado de descomposición de los cadáveres (Figura 9).

Estos resultados están de acuerdo a los reportados por (Suárez, 2015), quien publicó un 51.1% de hembras, 5.6% de machos y 43.3% de su población no pudo determinarse el sexo. (Menéndez, 2015) reporta en cambio poblaciones muy dominantes por hembras (90.5%) en relación a los machos varados (4.8%) y no determinados (4.8%). Es sabido que, por el cambio climático y el calentamiento global, la proporción sexual de las tortugas marinas ha variado prevaleciendo la cantidad de hembras con respecto a machos en una proporción de 5.8:1 (hembras/machos) en tortugas carey (Chavarría, Melara, Liles, & Castro-Menjivar, 2020); y de 7:3 en neonatos de golfinas (Valadez, Silva, & Hernández, 2000).

Los varamientos de tortugas marinas son causados mayormente por causa directa de origen antropogénico. (Darquea & Alfaro-Sigueto, 2018) indicaron que las tortugas más capturadas en la pesca incidental fueron del 46.08% para *C. mydas*, 26.6% en *L. olivacea*, coincidiendo con (Coello & Herrera, 2011). Estas capturas se deben a que estas especies se distribuyen en esta zona del Pacífico siendo más propensas a su captura en ciertas épocas del año (Alava y otros, 2005).

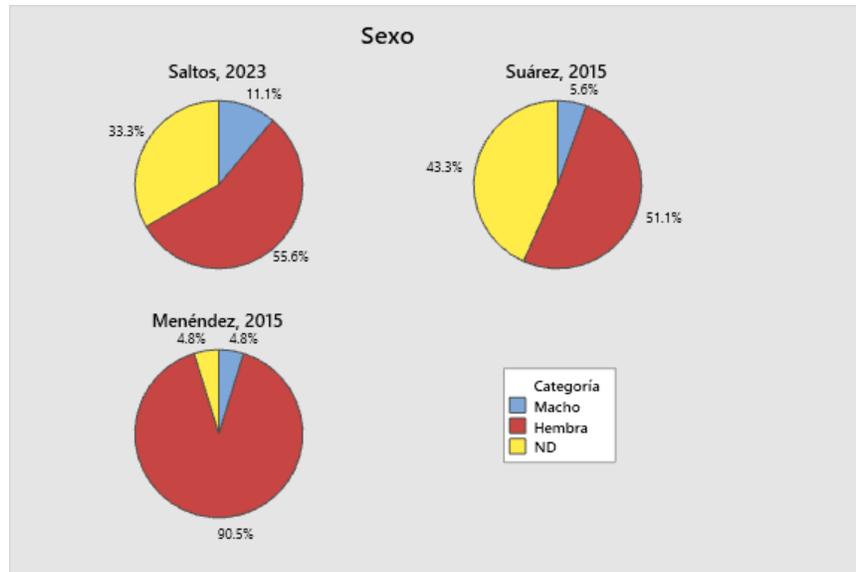


Figura 9: Identificación del sexo de tortugas marinas varadas en la Península de Santa Elena y en comparación con otros autores (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).

Causas de muerte.

La herramienta más efectiva para evaluar las causas de muerte es mediante técnicas de necropsia, así como análisis microbiológicos para la detección de enfermedades infecciosas. Un estudio a profundidad externo e interno proporcionaría resultados veraces sobre el origen y características de la muerte del individuo. En el presente estudio, no se pudo realizar necropsias por la falta de conocimientos básicos en la materia. Así, mediante evaluaciones externas del animal *in situ* pudo determinarse que las causas de muerte más comunes fueron por colisión o golpes en el caparazón o cráneo (47.1%) seguido de la misma proporción (5.9%) en muertes por consumo o faenamiento y por anzuelos. El 41.2% de los especímenes registrados carecían de evidencias que proporcionen indicios sobre su causa de muerte, al menos de forma superficial. (Suárez, 2015) realizó necropsias básicas *in situ*, observando también el interior del animal y logró determinar que el 25% murió por colisión, 9.2% por anzuelos, 5.3% por consumo y 56.6% no pudo determinar.

Al igual que este estudio, (Suárez, 2015) indicó que la mayoría de muertes es por colisiones o golpes. (Menéndez, 2015) también coincide que sus datos registraron una mayor cantidad de muertes por colisión (8.7%) que por anzuelos (4.3%) como se muestra en la Figura 10.

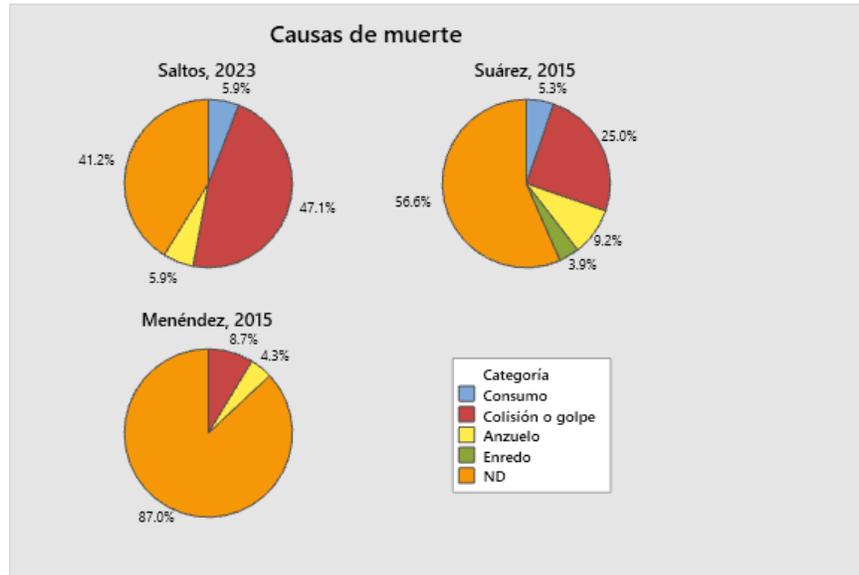


Figura 10: Causas de muerte registradas en varamientos de tortugas marinas en la Península de Santa Elena y en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).

Las artes de pesca que más inciden en las muertes de tortugas marinas en Ecuador son palangre, redes de enmalle y redes de arrastre (Darquea & Alfaro-Sigueto, 2018) (Coello & Herrera, 2011). El palangre es especialmente agresivo con las tortugas marinas, pues al tratarse de *longlines* de hasta 3km y más de 400 anzuelos, al tragarse se enganchan en el tracto digestivo impidiendo la alimentación por tortuga y una alta probabilidad de muerte por inanición (Vergara, 2020). Se ha reportado que un 55% de las tortugas son afectadas por palangres de las cuales un 45% mueren si el enganche es profundo (Swimmer y otros, 2014) (Lewison y otros, 2004). El anzuelo tipo J es el más dañino con una probabilidad de enganche del 19.3 cada 1000 anzuelos, mientras que los anzuelos circulares reducen la mortalidad de la captura incidental (Kerstetter & Graves, 2006).

La segunda causa de muerte de tortugas marinas es por redes de enmalle según (Coello et al., 2011) con una tasa de enmallamiento del 70%. Si las tortugas se enredan en las mallas existe la posibilidad de que sean liberadas, a diferencia que, si la tortuga ingiriera anzuelos, situación en las cuales normalmente los pescadores cortan el hilo, pero no logran extraer el anzuelo. Según lo anterior, aquello explicaría la relación obtenida en que la segunda causa de muerte fuera por anzuelos después de colisiones al igual que (Suárez, 2015) y (Menéndez, 2015).

Estados de descomposición.

En el presente estudio, se analizaron muestras que en su mayoría se encontraban con efectos *post-mortem* (EPM) avanzados (38.9%), seguidos de tortugas con efectos *post-mortem* inmediatos (33.3%), el 16.7% se encontraban sólo en esqueleto y caparazón, y el 11.1% de muestras eran frescas.

La comparación de los estados de descomposición es un poco más ambigua entre los autores debido a que los criterios tomados en consideración por cada uno de ellos fueron diferentes. Sin embargo, con fines explicativos se trató de ajustar los datos obtenidos por (Menéndez, 2015) y (Suárez, 2015) a los criterios evaluados aquí, los cuales fueron: fresca (1), con efectos *post-mortem* inmediatos (2), con efectos *post-mortem* avanzados (3), sólo esqueleto y caparazón (4), sólo caparazón (5) y sólo esqueleto (6)- en paréntesis se muestra el código de cada estado y a continuación se ubicarán según la similitud de los criterios establecidos por los otros investigadores. (Menéndez, 2015) evaluó la condición corporal según si la tortuga estaba: viva (0), fresca (1), moderadamente descompuesta (2), severamente descompuesta (3), caparazón seco (5) y esqueleto (6). (Suárez, 2015) usó los términos: viva, fresca (1), moderadamente descompuesta (2) y muy descompuesta (3). (Suárez, 2015) determinó que el 8.1% de las tortugas estaban frescas, seguido del 50% de ellas en estado avanzado y 41.9% con efectos *post-mortem* inmediatos.

Los varamientos registrados por (Menéndez, 2015) consistían en el 4.8% de tortugas con EPM inmediatos, 52.4% en estado avanzado, el 19% sólo caparazón y el 23.8% sólo huesos. De esta manera pudo determinarse que, para análisis genéticos en tortugas marinas, existe más posibilidad de encontrarse individuos en estado de descomposición 3 (EPM avanzados, 48.8%) que muestras frescas o moderadamente descompuestas (7.2%), como se muestra en la Figura 11 (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).

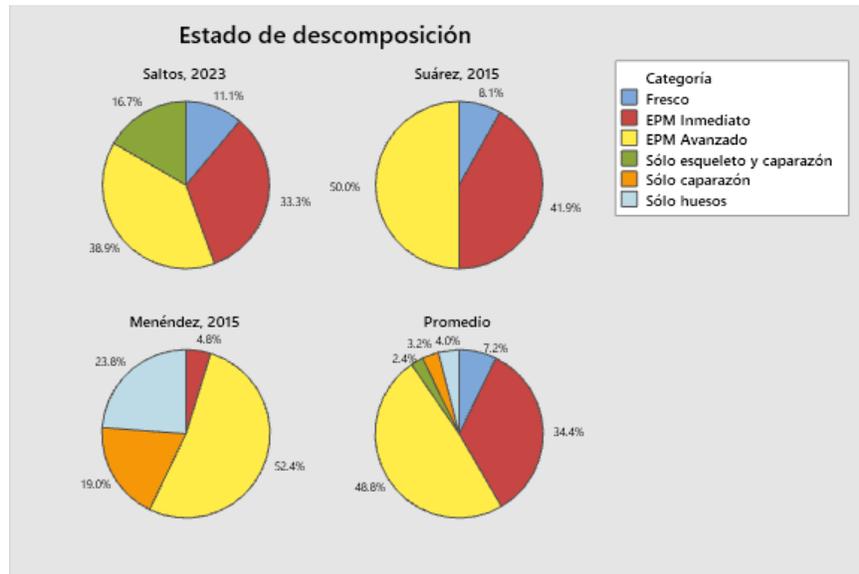


Figura 11: Estados de descomposición calificados en observaciones externas y en comparación con (Menéndez, 2015) (Suárez, 2015).

9.3. Curvas de ADN.

Las proporciones de 260:280 y de 260:230 pueden indicar medidas de pureza, pero no siempre es así. Estos valores pueden indicar cuantitativamente la viabilidad de una curva de ADN, y es que determinan la presencia o ausencia de contaminantes como sales o proteínas. La curva de ADN se caracteriza por tener una depresión convexa en 230 nm o menos, un pico cóncavo en 260 nm y otra depresión convexa en 280 nm. Es decir, en la presencia de una muestra con ADN puro debe existir baja concentraciones de sal u otros contaminantes como carbohidratos o fenol en 230 nm, alta concentración de ADN en 260 y baja concentración de proteínas o ARN residual en 280 nm. En la Tabla 3 se muestran los criterios usados para evaluar las curvas resultantes de ADN.

Tabla 3: Criterios para evaluar la pureza de ADN según los análisis de A260:280 y 260:30 (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020) (Thermo Scientific, 2011).

Criterio		Validez
A260:280	$\geq 1.8 - 2.1$	Pureza óptima.
	$\leq 1.6 - 1.7$	Pureza aceptable.
	< 1.6	Contaminación con compuestos aromáticos, fenol u otro agente usado en los protocolos. Una muy baja concentración de ácidos nucleicos ($< 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$)
	> 2.1	Contaminación con ARN.
A260:230	$> 2 - 2.2$	Pureza óptima.
	> 1.8	Pureza aceptable.
	< 1.8	Contaminación con sales, fenol, carbohidratos, guanidina u otros productos de los kits de extracción.
	< 1.5	Contaminación excesiva con sales, fenol, carbohidratos, entre otros. Glucógeno usado para la precipitación.
	> 2.2	Se blanqueó en un pedestal sucio, se usó la solución blanco inapropiada (debe tener el mismo pH o fuerza iónica que la solución estudiada).

El análisis cuantitativo de las curvas de ADN resulta de gran importancia para valorar la concentración de ADN y su pureza; sin embargo, éstos valores, aunque se encuentren dentro de los rangos de pureza aceptada o tengan altos valores de A260, no siempre indican una curva esperada debido a las múltiples interacciones que pueden existir entre estas variables por fuentes de contaminación. Por ejemplo, la depresión de la curva esperada en 230 nm, en las lecturas aparecía en 240 nm, dando como resultados valores 260/230 muy bajos indicando altos eventos de contaminación. Pero la mayoría de ellos en realidad no estaban contaminados, sino que la curva había sufrido un “*shift*” o desplazamiento y proporcionando lecturas de 260/230 inválidas para el análisis de la pureza. La absorbancia de contaminantes en menores longitudes de onda normalmente cambia la longitud de onda de la depresión (Thermo Scientific, 2011).

La contaminación química residual de los protocolos pudo influir en una sobreestimación de la concentración del ácido nucleico y/o afectar negativamente en el análisis de éste (Thermo Scientific, 2011). Entonces, altos niveles de A260 no significaba que se tuvieran altas concentraciones de ADN en sí, sino que se traten de contaminantes que cambiaron en este valor. En los eventos de contaminación se tenían, por ejemplo, valores altos de A260 pero también los de A280. Por aquella razón, se seleccionaron cualitativamente las curvas que no estaban contaminadas para el análisis y sólo se tomó el valor de 260:280 como referencia para el análisis de pureza. En la Figura 12 se muestran las mejores curvas seleccionadas cualitativamente y cuantitativamente tomando como referencia los valores de concentración de ADN de las muestras más destacadas de los 18 especímenes.

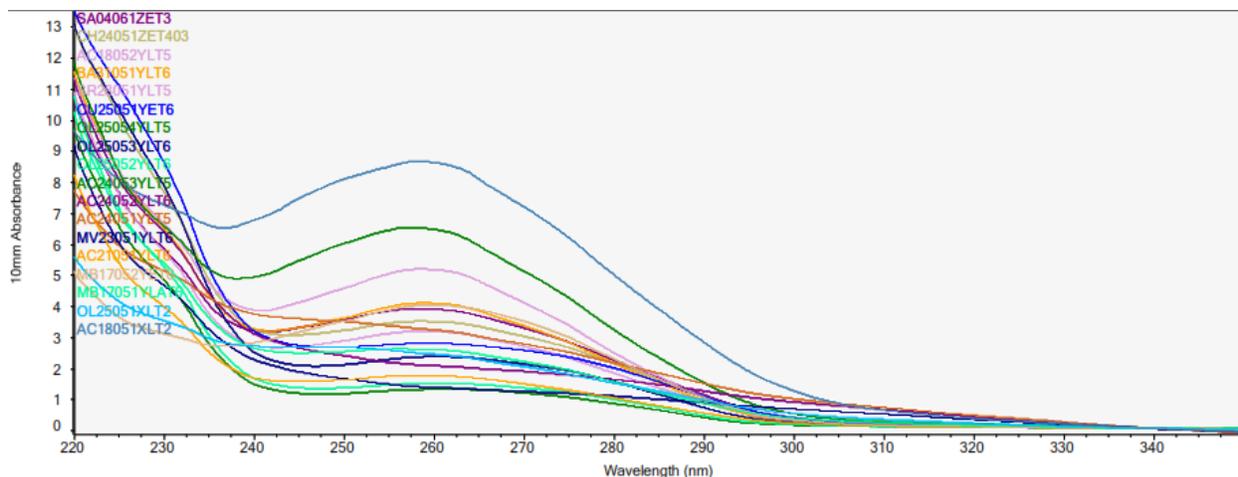


Figura 12: Recopilación de las mejores réplicas analizadas de los 18 especímenes colectados. A la izquierda se muestran los códigos de las muestras con sus colores específicos expresados en la Gráfica.

9.4. Contaminación de las muestras.

El análisis Probit determina, mediante el tratamiento de datos binarios, la probabilidad de que un evento suceda. Así, se contabilizaron los eventos de contaminación para cada una de las gráficas en bruto de espectrometría, dando como resultado que, del total de 437 muestras analizadas, 104 de ellas resultaron contaminadas. Las muestras que fueron preservadas con ET96 tuvieron mayor probabilidad (36.36%) de que resulten contaminadas y las que fueron preservadas con ARNLT (6.25%) resultaron con menor porcentaje de contaminación. Las muestras preservadas con ET40, cuyo ADN fue extraído sólo mediante el método GSC, resultó en 20.54%, como se muestra en la Figura 13.

Con la finalidad de establecer una relación entre las variables “Métodos de extracción” y “Métodos de preservación”, ambos interactuando con la probabilidad de ocurrencia de eventos de contaminación, se observa que el método con menos probabilidad de contaminación es el de NaCl con 2.77% si se usa ARNLT y de 9.56% si es mediante ET96; mientras que el método con mayores eventos de contaminación es el de GSC con 20.54% si se usa ET40 y 55.40% si la muestra se preserva con ET96 (Figura 14).

Las fuentes de contaminación de las muestras son importantes de analizar debido a que la extracción de ADN consta de diversas etapas, entre las que destacan la lisis celular y la desnaturalización de proteínas. Si algunos de los ingredientes utilizados en los métodos de extracción fallan en su función, se justificaría esta anomalía en la ocurrencia de eventos de contaminación. La contaminación por sales y carbohidratos se refleja en picos menores a 260 nm, especialmente en 230 y 240 nm (también en longitudes de onda menores). Los porcentajes promedios de los métodos de extracción ponen en evidencia que la ocurrencia de los eventos de contaminación por sales y carbohidratos son mayores a los resultantes por contaminación de proteínas en todos los métodos de preservación.

Las probabilidades de ocurrencia de este tipo de contaminación en las muestras analizadas fueron del 4.86% en las muestras preservadas con ARNLT, del 19.17% en muestras con ET40 y 35% en las que fueron preservadas con ET96. De todas ellas, nuevamente, el método de extracción con NaCl refleja la menor cantidad de eventos ocurridos y GSC con la mayor cantidad. El mismo patrón se repite en las muestras contaminadas por proteínas, con 2.77%, 8.21% y 21.36%, valores respectivos a ARNLT, ET40 y ET96. En este caso, las muestras preservadas con ARNLT y extraídas con el método de NaCl no presentaron eventos de contaminación y con la preservación mediante ET96, tan sólo el 2.73% de las muestras resultaron contaminadas por proteínas. A este análisis se le sumaron las probabilidades de que ocurra contaminación por sales y proteínas en conjunto, situación que deja a la curva de espectrofotometría prácticamente inservible para el análisis de ADN. Los resultados fueron de 1.38% (ARNLT), 6.85% (ET40) y 19.99% (ET96), de los cuales las muestras obtenidas mediante el método de NaCl no mostraron ningún evento de contaminación por sales y proteínas simultáneamente.

Por ejemplo, la mayor incidencia de contaminación en el protocolo de GSC fue aparentemente por sales o carbohidratos debido al uso de sacarosa, que quizás no fue eliminada correctamente por los reactivos utilizados. Los protocolos modificados que no habían sido probados en ensayos anteriores fueron los que tuvieron mayor cantidad de eventos de contaminación, GS con un 55% de modificación y GSC con 61% de modificaciones. NaCl fue el método con menos eventos de contaminación resultando en una probabilidad del 6.17% de que éste suceda; seguido de GS con una probabilidad del 26.78% y finalmente GSC con el porcentaje de 37.97%. como se muestra en la Tabla 4.

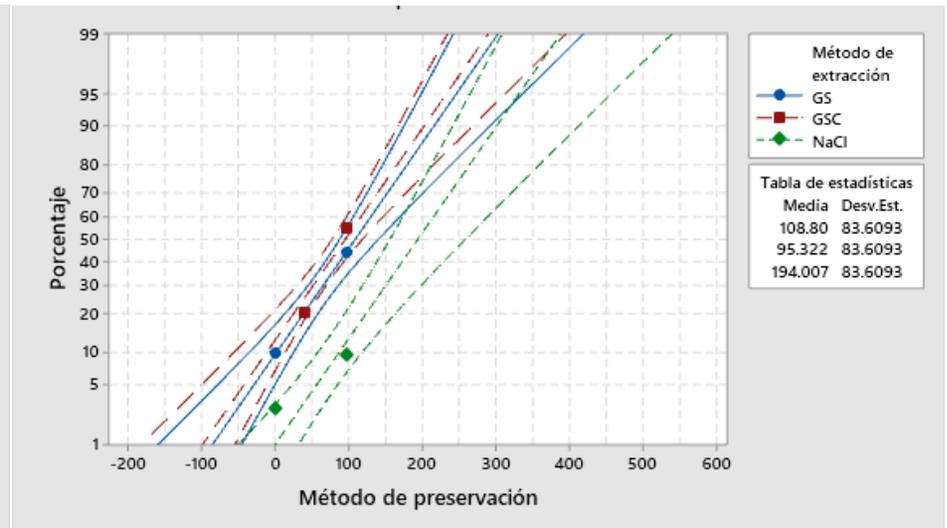
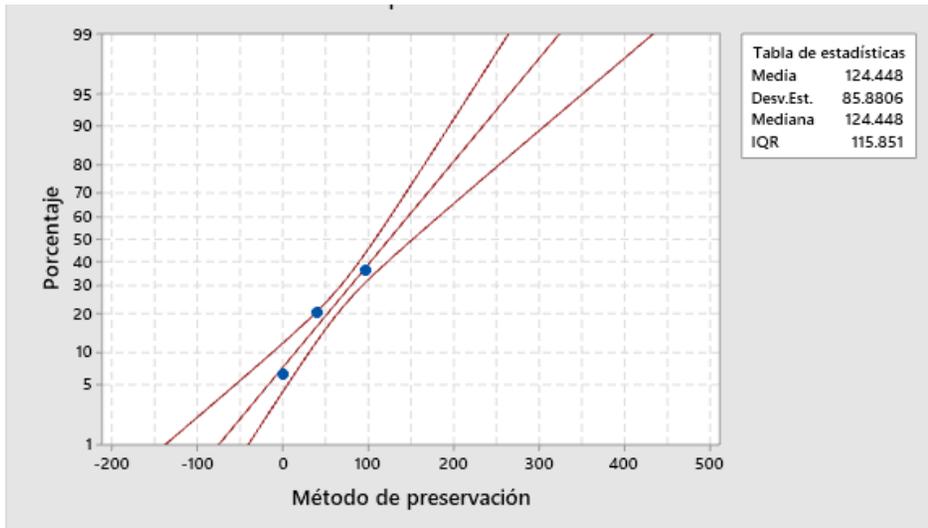


Figura 13 y 14: A la izquierda se muestra la probabilidad media (95% de confianza) de contaminación usando los diferentes métodos de preservación (0=ARNLT; 40=ET40; 96=ET96). A la derecha se muestran los valores desglosados de contaminación según el tipo de preservación y los protocolos de extracción. Nótese que los menores eventos de contaminación los presenta mediante el método de NaCl y los de la mayor cantidad de eventos, GSC.

Tabla 4: Contaminación (probabilidad) según los métodos de extracción y preservación utilizados; así como las fuentes de contaminación, general, por sales, por proteínas, por sales y proteínas.

Método de extracción	General			Promedio	Por sales (<240nm)			Promedio	Por proteínas (280nm)			Promedio	Por sales y proteínas			Promedio
	ARNLT	ET40	ET96		ARNLT	ET40	ET96		ARNLT	ET40	ET96		ARNLT	ET40	ET96	
GS	9.72	-	43.83	26.78	6.94	-	42.46	24.70	5.55	-	19.17	12.36	2.77	-	17.8	10.29
GSC	-	20.54	55.4	37.97	-	19.17	55.4	37.29	-	8.21	41.89	25.05	-	6.85	41.89	24.37
NaCl	2.77	-	9.56	6.17	2.77	-	6.84	4.81	0	-	2.73	1.37	0	-	0	0.00
Media	6.25	20.54	36.36	21.05	4.86	19.17	35	19.68	2.77	8.21	21.36	10.78	1.38	6.85	19.99	9.41

9.5. Concentración y pureza de ácidos nucleicos.

9.5.1 Métodos de extracción.

Al suprimir 208 muestras que resultan en contaminación y seleccionando 229 muestras que reflejaban una curva fidedigna de ADN, indica que el método con mayores valores de absorbancia en 260 nm y por lo tanto con mayor concentración de ADN, fue el GS (N= 78) con una media de $120 \pm 73.85 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, seguido de GSC (N= 67) con $101.91 \pm 64.92 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, finalmente al método de NaCl (N=84) con $49.60 \pm 70.83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Véase la Figura 14. Las diferencias de los métodos de extracción fueron estadísticamente significativas entre sí, pues el valor $p=0.000$ cumpliéndose que $p < 0.05$ para tener significancia. A pesar de que el método de NaCl fue el menos contaminado, a la vez fue el que resultó en las menores cantidades de ADN presentes en la muestra. Esto pudo deberse al corto tiempo de acción en que la Proteinasa K actuó en la muestra, sabiendo que la enzima sirve para la lisis celular, resultaría importante que se aplique durante 24h según el método original de (Aljanabi & Martinez, 1997) que ha sido probado exitosamente por (García, Lagares, Yunez, Manjarrez, & Onofri, 2008) y (Krestoff, y otros, 2021).

Es probable que los altos valores presentes en GSC pueden ser el resultado de los contaminantes mas no del ADN en sí. Esta hipótesis es respondida cuando se estudian los valores de 260/280. En el primer caso para el ANOVA de un solo factor en “260/280 vs método de extracción”, se aprecia que los valores más altos correspondían al método de NaCl (1.64 ± 0.25), seguido de GS (1.60 ± 0.23) y finalmente de GSC (1.54 ± 0.27) (Figura 15), como era de esperarse basado en los Análisis Probit, pues los datos siguen la misma tendencia. El nivel de significancia para este grupo de datos fue de $p=0.043$, siendo estos resultados estadísticamente significativos.

Los valores anteriores corresponden a purzas aceptables para los métodos de NaCl y GS, mientras que para los de GSC pueden considerarse como muestras contaminadas por residuos de carbohidratos o sales al aplicarse los protocolos, por lo que no se recomienda la aplicación de este protocolo basándose en las modificaciones efectuadas.

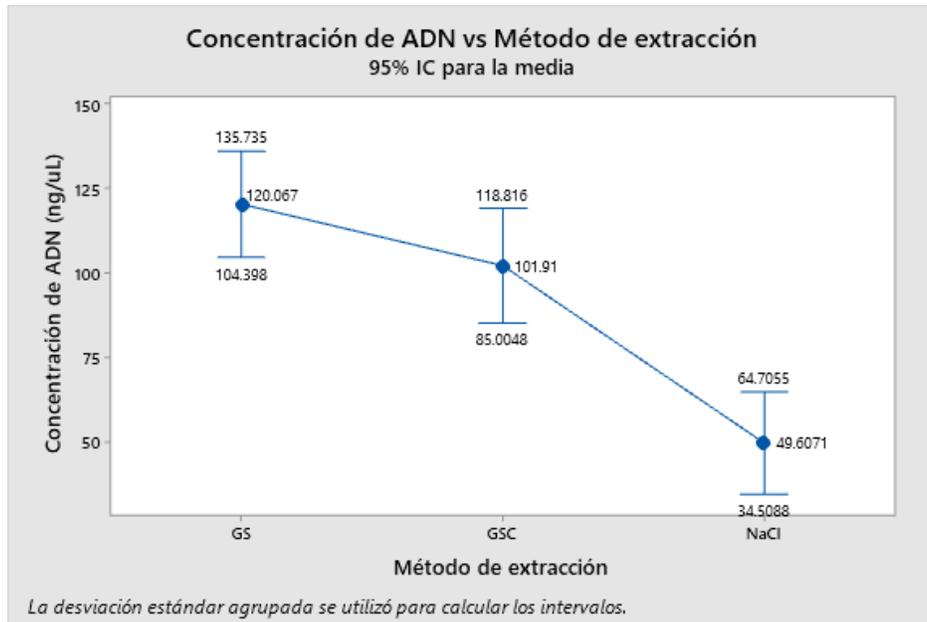


Figura 14: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los métodos de extracción aplicados.

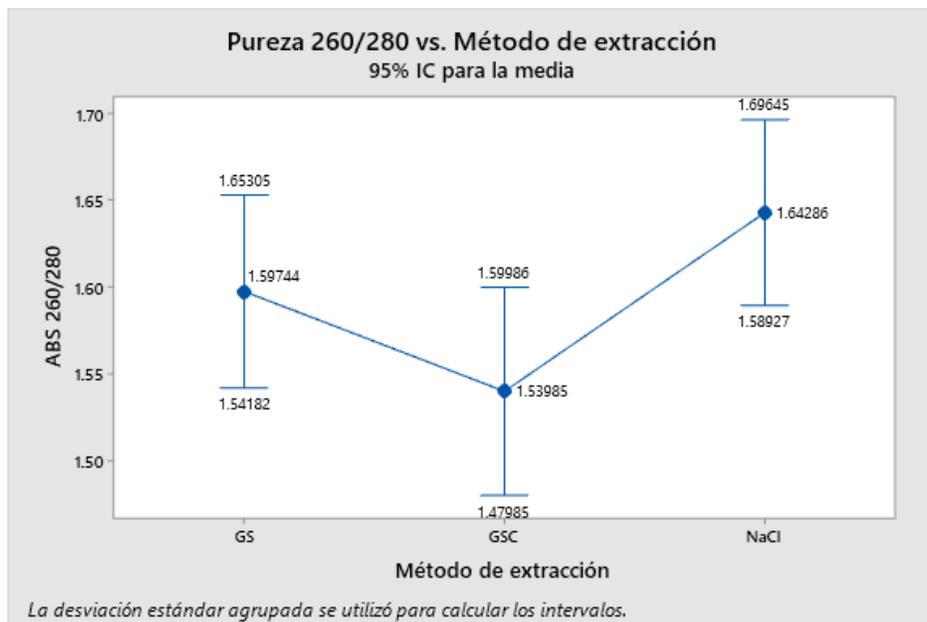


Figura 15: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los métodos de extracción aplicados.

Los resultados obtenidos en materia de concentración y pureza de ADN por (Ríos-Sánchez, y otros, 2016) para los métodos de GS y GSC, junto los que reportaron (Escalante, 2020) y (Rodríguez, 2017) usando el protocolo de NaCl se muestran en la Figura 16. En cuanto a concentración de ADN, (Ríos-Sánchez, y otros, 2016) determinaron los valores de 136.76 y 211.93 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente para los métodos GS y GSC. Estos datos representan un 12.2% más a la concentración obtenida por GS y un 51.91% más a lo determinado mediante GSC. En lo que corresponde a NaCl, hay un 74.35% de diferencia con lo reportado por (Rodríguez, 2017) quien tuvo una concentración de ADN de 193.38 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, mientras que (Escalante, 2020) determinó una concentración de 93.05 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ lo cual difiere un 46.68% con la presente investigación.

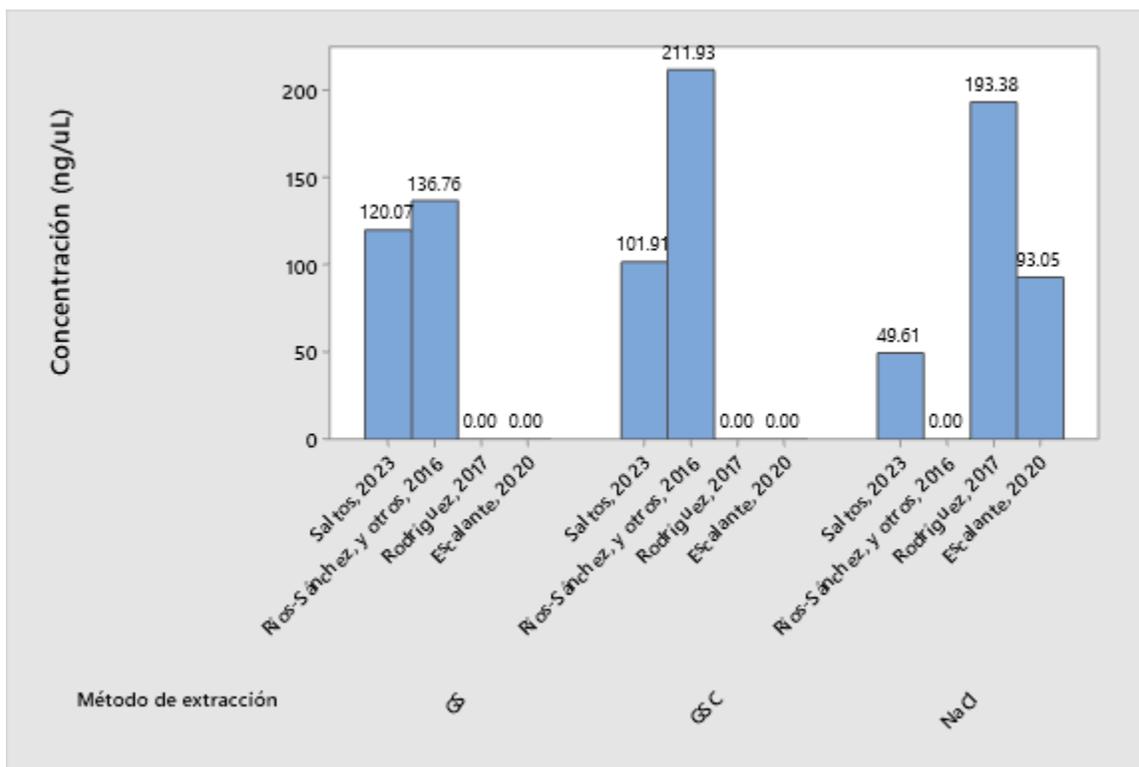


Figura 16: Comparación de los valores de concentración de ADN obtenidos por otros autores aplicando los protocolos de extracción en muestras de distinta procedencia y tejidos.

Todos los valores de pureza de las muestras en las investigaciones comparadas corresponden a valores óptimos según la escala establecida anteriormente (Thermo Scientific, 2011) (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020), siendo estas: 1.71 (6.43% de diferencia) y 1.8 (14.44%) por medio de GS y GSC, respectivamente según (Ríos-Sánchez, y otros, 2016); de 1.97 (16.75%) y 1.79 (8.38%) por el protocolo de NaCl según (Rodríguez, 2017) y (Escalante, 2020), respectivamente (Figura 17).

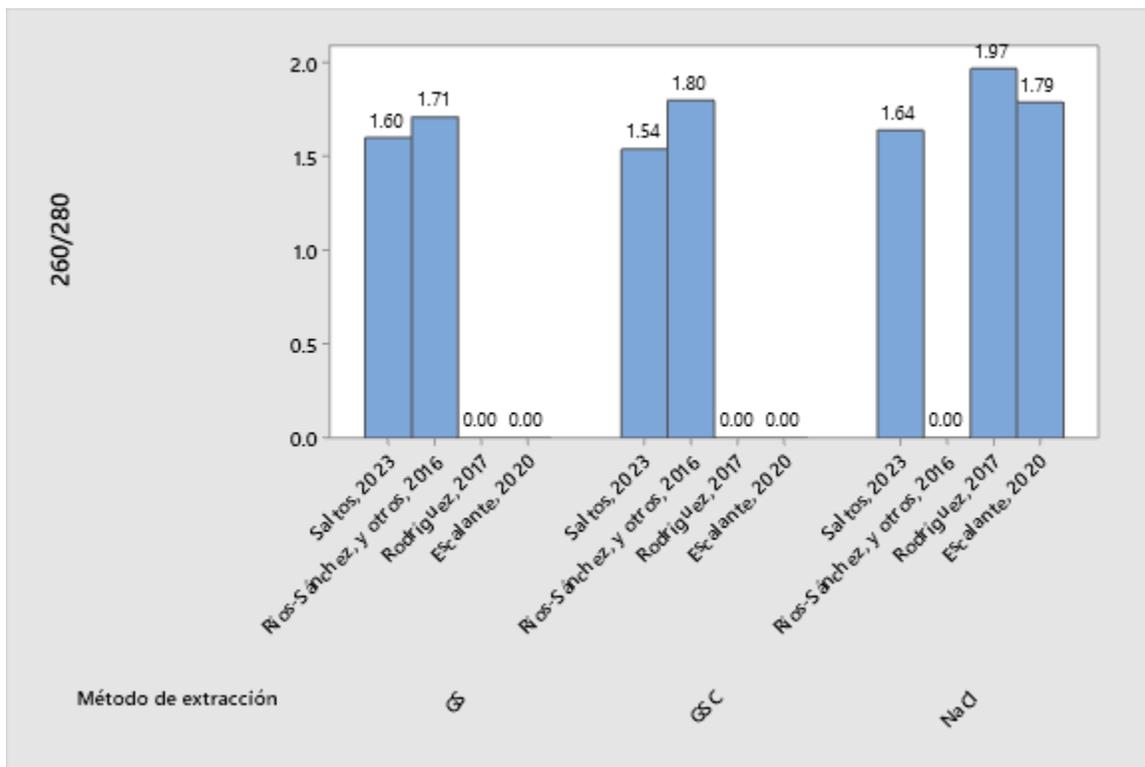


Figura 17: Comparación de los valores de pureza de ADN obtenidos por otros autores aplicando los protocolos de extracción en muestras de distinta procedencia y tejidos.

Como es de notarse, el método con menos variación con respecto a los valores de concentración y pureza de ADN según otros autores corresponde a GS (Ríos-Sánchez, y otros, 2016) y el de mayor variación el de NaCl con (Rodríguez, 2017). La razón de estas diferencias con otros autores puede ser debido a varios factores: (1) las muestras utilizadas por ellos eran frescas, mientras que las del presente estudio se encontraban en distintos estados de descomposición, lo cual influye en la calidad y cantidad de ADN; (2) la modificación de los protocolos evitaría que los reactivos cumplan con sus funciones específicas pues podrían haber reaccionado unos con otros indebidamente al agregar o quitar sustancias; (3) los métodos de preservación utilizados por los otros autores influirían en la variación de estos datos; y (4) el tipo de muestra utilizado podría contener diferentes concentraciones de ADN.

9.5.2. Métodos de preservación.

Los resultados indican que las muestras preservadas con ET40 (N=43) tuvieron mayor concentración de ADN con $97.51 \pm 57.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, seguido de ARNLT (N=96) con $93.90 \pm 83.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y ET96 (N=90) con $79.48 \pm 76.72 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Véase la Figura. Como el valor $p=0.314$, hace que estas diferencias no fueran estadísticamente significativas ($p<0.05$). La pureza del ADN definida por el parámetro 260/280 tuvieron resultados sin significancia estadística con un valor de $p=0.228$. Los valores fueron de 1.63 ± 0.21 para ARNLT, 1.58 ± 0.27 con ET40 y 1.57 ± 0.27 en las muestras preservadas con ET96 (Figura 18). Según la escala indicada para valorar estos criterios, sólo las muestras preservadas con ARNLT poseyeron un nivel aceptable de pureza, mientras que los otros dos (ET40 y ET96) podrían considerarse como contaminadas por reactivos de extracción.

El método de preservación de muestras de carne de tortuga marina colectadas en campo más ampliamente utilizado para análisis genéticos es con etanol absoluto al 96% (Madduppa, y otros, 2019) (Pertwi, Sembiring, Cahyani, & Al Malik, 2020) (Valdez, y otros, 2018). Otros autores coinciden en preservar las muestras en buffer de lisis (100 mM Tris-HCL, 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS; pH 8.0) (Encalada, Eckert, & Bowen, 1994) (Nishizawa, Joseph, & Yee Kuen, 2018) o congeladas directamente (Krestoff, y otros, 2021). En el presente estudio se reporta por primera vez el uso de la solución de ARN Later (ARNLT) y Etanol al 40% (ET40) en análisis genéticos de tortugas marinas.

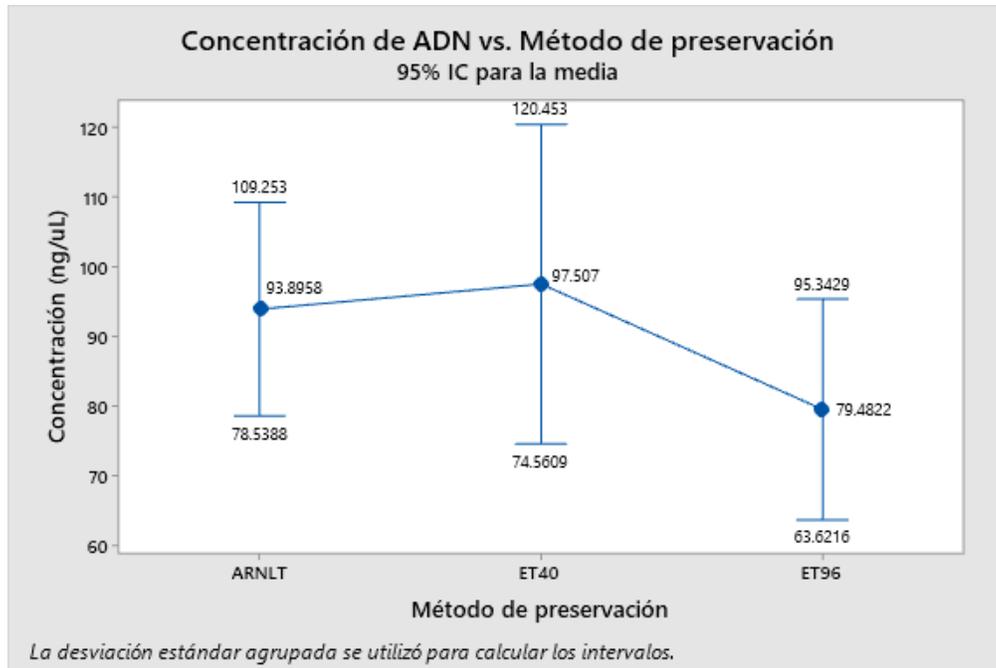


Figura 18: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los métodos de preservación aplicados.

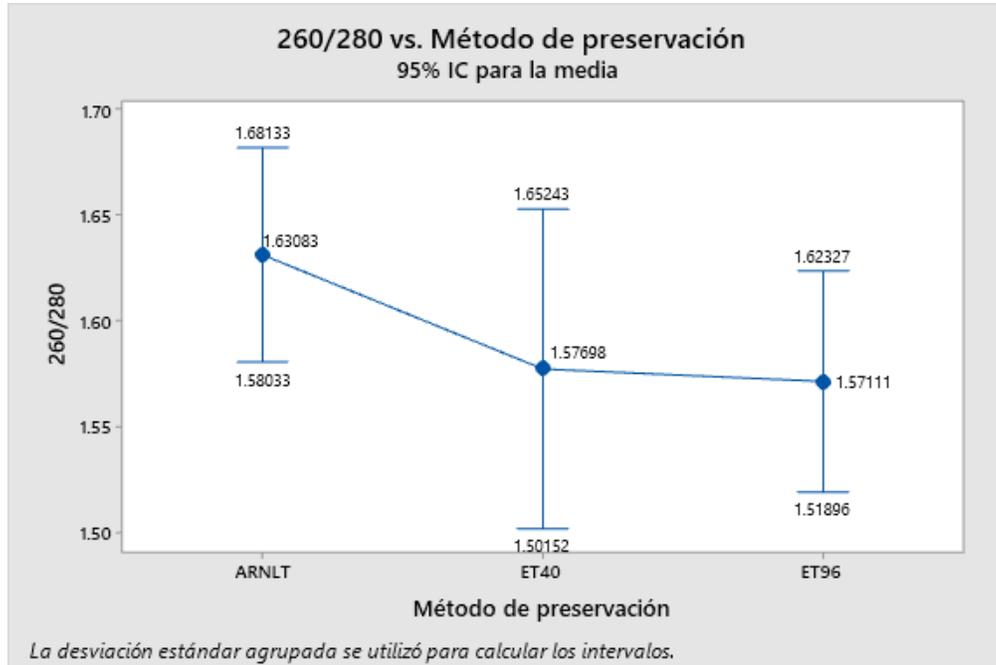


Figura 19: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los métodos de preservación aplicados.

9.5.3. Tipos de tejido.

El tipo de tejido influyó mucho en la obtención de los datos. Algunas muestras con estado de descomposición 4 reflejaron mejores valores en calidad y cantidad de ADN que unas muestras frescas. Aquellas en estado de descomposición 4 fueron tomadas de ligamentos, estructuras más duras que el tejido muscular y que posiblemente preservarían de mejor manera el ADN, dado que resistentes más a los factores de descomposición como la luz solar, humedad, salinidad, y la acción de organismos descomponedores.

En algunos casos fue evidente la presencia de sangre (en pequeña cantidad) en estas muestras. Las muestras con ligamento (N=71) fueron las de mayores valores de concentración de ADN, siendo de $94.04 \pm 89.9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y los de músculo (N=158) con $86.60 \pm 69.73 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Figura 20). Sin embargo, el tipo de tejido no tuvo significancia estadística pues presentaron un valor $p=0.497$. En cuanto a los valores referentes a la pureza de los mismos, en la relación 260/280, las muestras de tejido muscular reflejaron un valor casi idéntico, pero ligeramente mayor a las de ligamento, siendo de 1.598 ± 0.25 y 1.594 ± 0.25 , respectivamente (Figura 21). Estos resultados tampoco fueron estadísticamente significativos pues $p=0.908$.

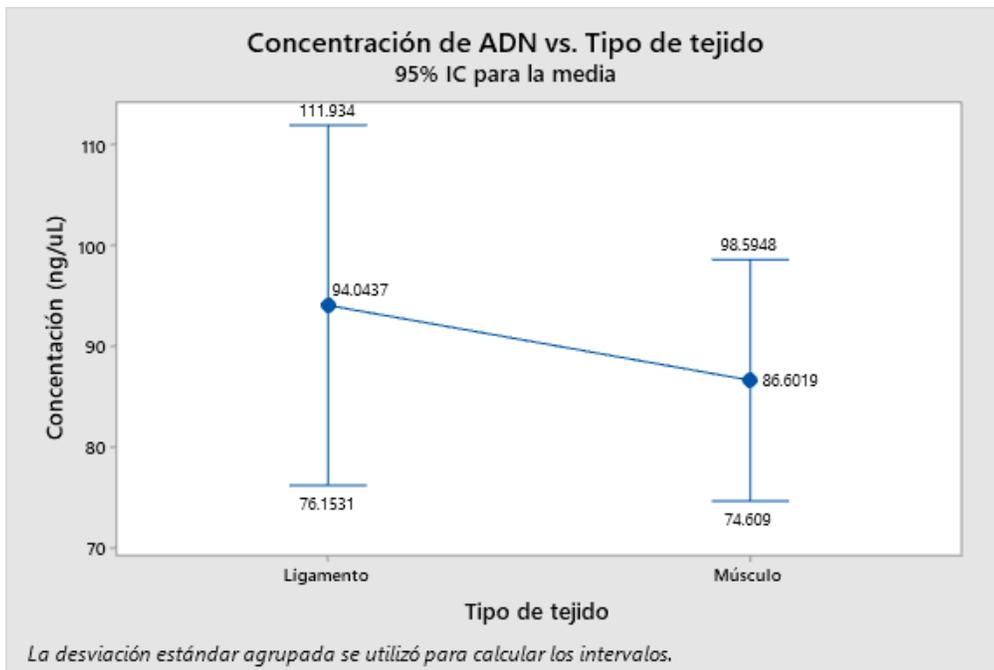


Figura 20: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según el tipo de tejido.

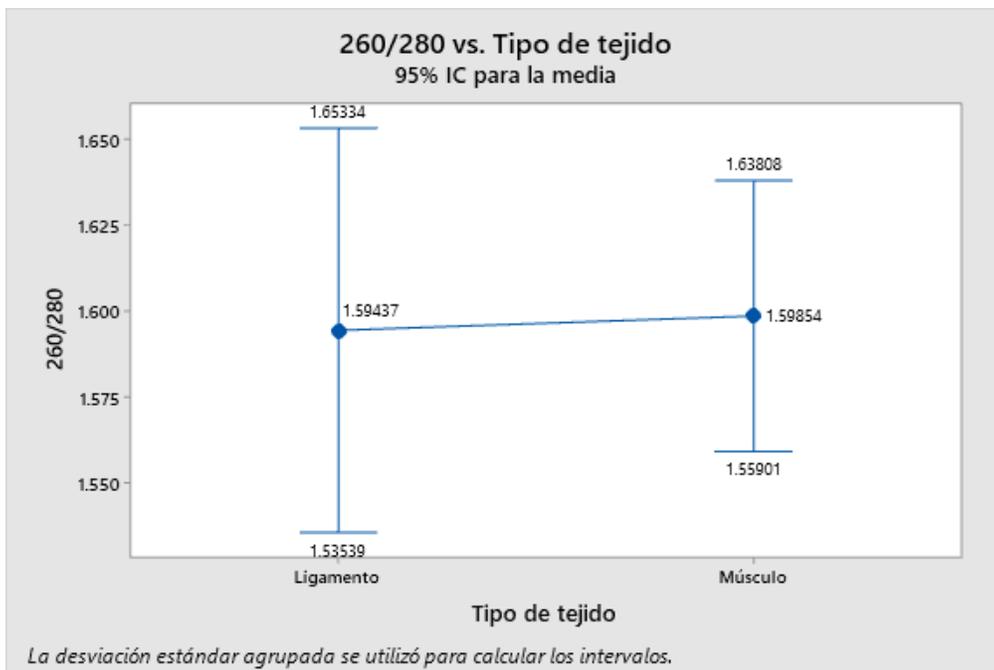


Figura 21: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según el tipo de tejido.

9.5.4. Estado de descomposición.

Las investigaciones forenses y de conservación modernas dependen en gran medida de las muestras de ADN para la identificación de individuos y/o poblaciones de especies. Sin embargo, estas investigaciones a menudo se ven obstaculizadas por la degradación del ADN y las cantidades insuficientes de material genético, lo que está influenciado por el tiempo, el tipo de tejido y el medio ambiente (Krestoff, y otros, 2021).

Se presentan los resultados de concentración y pureza de ADN, por primera vez evaluados en tejidos blandos de tortugas marinas en estado de descomposición con la finalidad de realizar análisis genéticos. Para el tratamiento de los datos con ANOVA se consideraron las mismas variables estudiadas en los casos anteriores como son concentración de ADN y A260/280. De los cuales se obtuvo que, tal como debería esperarse, las muestras más frescas mostraban mejor calidad y cantidad de ADN. Los valores de concentración de ADN para los estados de descomposición fueron de: 1 (N=39) con $145.1 \pm 87.4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; 2 (N=82) con $95.24 \pm 85.06 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; 3 (N=87) con $63.23 \pm 47.36 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; y 4 (N=21) con $66.2 \pm 58.1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Figura 22). Los resultados fueron estadísticamente significativos pues $p=0.00$.

Los valores en los estados de descomposición 3 y 4 no siguen con la relación inversamente proporcional con la concentración de ADN, lo cual pudo deberse a que todas las muestras en estado 4 de descomposición fueron obtenidas de ligamentos, con los cuales, como ya se probó anteriormente poseen valores más altos de concentración. Los resultados de la relación 260/280 fueron de 1.77 ± 0.25 para los de estado de descomposición 1; 1.63 ± 0.20 para los de estado 2; 1.54 ± 0.24 para los del tercer estado de descomposición y 1.32 ± 0.21 para el último estado de descomposición. Véase la Figura 23.

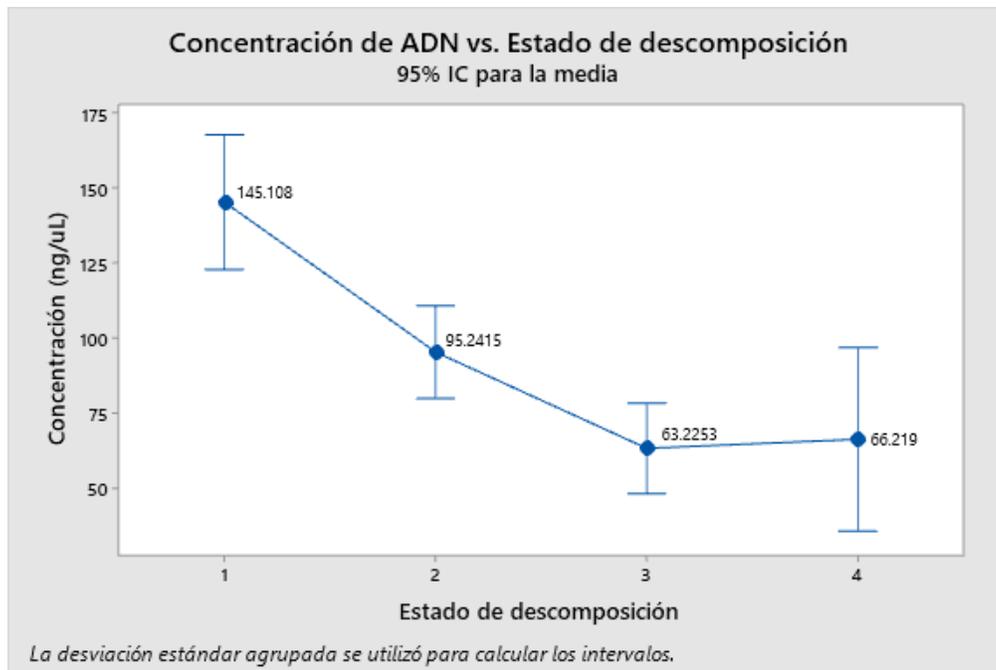


Figura 22: Comparación de las medias en las concentraciones de ADN según los estados de descomposición de las muestras.

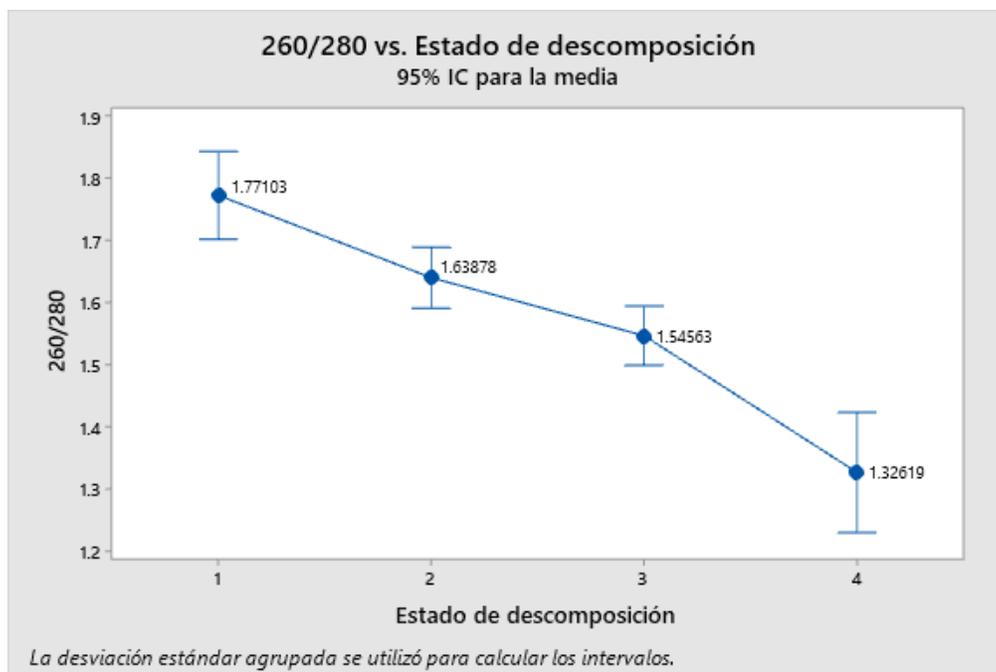


Figura 23: Comparación de las medias en la relación 260/280 (pureza) de ADN según los estados de descomposición.

Los resultados fueron estadísticamente significativos con $p=0.00$. Así se determinó que sólo las muestras en estado de descomposición 1 y 2 tuvieron una pureza aceptable (casi llegando a la pureza óptima en el estado 1), mientras que el resto se consideraron contaminados con reactivos de extracción. La ecuación de regresión para la tendencia lineal fue: **Concentración de ADN= 162.6 - 30.80 Estado de descomposición.**

De esta manera, se puso en evidencia de que sí es posible extraer ADN en muestras de tortugas marinas varadas y en descomposición para realizar análisis genéticos como identificación de las especies *post-mortem* usando tejidos blandos como músculos y ligamentos. Esto es respaldado con la única investigación disponible relacionada con el análisis genético de los restos mortales de tortugas marinas en estado de descomposición realizada por (Krestoff, y otros, 2021).

Ellos realizaron un experimento de degradación de tejidos óseos de *L. kempii* en ambientes dinámicos terrestres y marinos durante 3 años para evaluar las concentraciones de ADN y conocer si las muestras fueron útiles para la secuenciación e identificación de una región del ADN mitocondrial. Los investigadores determinaron que los valores obtenidos fueron consistentes y robustos antes de los 664 días de descomposición, pero pudo obtenerse ADN hasta después de 1 152 días de exposición. También concluyeron que, si se lograra que la cantidad de ADN extraída de las muestras sea suficiente, podría realizarse secuencias genéticas de alta calidad sin importar el tiempo de descomposición de las muestras.

Según (Krestoff, y otros, 2021) los tejidos expuestos a ambientes terrestres tuvieron mayor cantidad de ADN ($26.37 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ en promedio) que los expuestos en ambientes marinos ($2.96 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ en promedio) incluso si estos tuvieron sólo 60 días de exposición. Pero hubo una excepción a esta hipótesis, pues la única muestra que dio resultados positivos en la secuenciación fue una de las sumergidas luego de 1 152 días.

Esto respalda una situación similar sucedida en el presente estudio, en el que algunas muestras en estado 4 de descomposición tuvieron mayor cantidad de ADN, y pureza. (Krestoff, y otros, 2021) tuvieron y una concentración promedio de $14.66 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de todas las muestras óseas, siendo el intervalo de sus valores desde $1.58 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ hasta $46.27 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ mientras que en el presente estudio se registró una media de $88.91 \pm 76.41 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

9.6. Costos y peligrosidad de reactivos.

Previo a la realización de este estudio, se seleccionaron los protocolos y preservantes considerando principalmente los costos y un bajo nivel de contaminación, tomando así en cuenta los criterios de economicidad y accesibilidad. Los protocolos utilizados fueron relativamente baratos a los que usan resina Chelex y kits de extracción de ADN, los cuales pueden costar hasta USD 450. Los costos fueron de USD 1.00 por muestra mediante el protocolo de NaCl, USD 0.13 para poder hacer los métodos de GS y GSC, los cuales compartieron el mismo valor. El primero fue relativamente más caro por la presencia de Proteinasa K. Asimismo, el valor de los preservantes por mL fue de USD 4.62 para ARNLT, USD 0.05 para ET40 y 0.01 usando ET96. La suma de los protocolos de extracción y de los preservantes se muestra en la Figura 24, resultando en que las muestras más caras fueron las preservadas en ARNLT y extraídos mediante NaCl con USD 2.39 por muestra y las más baratas con ET96 y usando GS con USD 0.13/muestra.

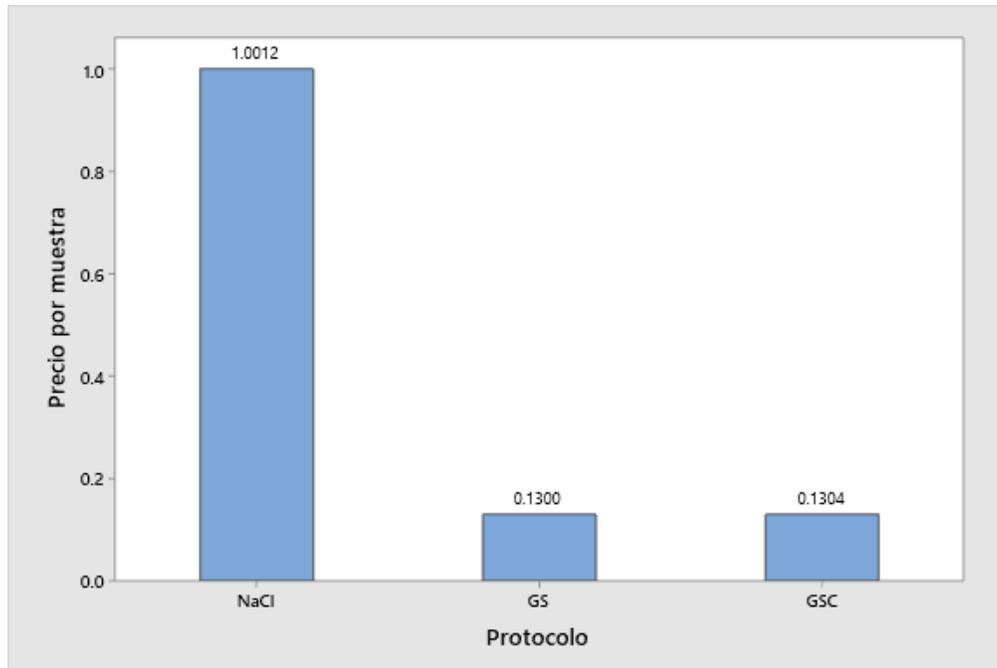


Figura 24: Precio por muestra de los protocolos de extracción de ADN.

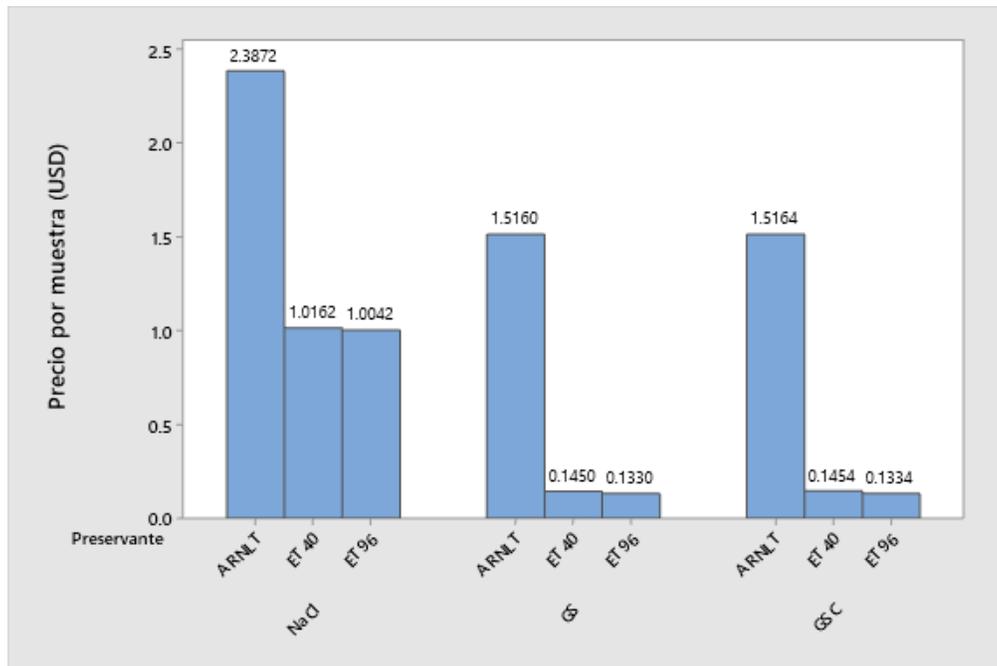


Figura 25: Precio por muestra de los métodos de preservación y de extracción, en conjunto.

9.6.1. Peligrosidad de reactivos.

Las indicaciones de peligro de los reactivos SDS, Proteinasa K y Etanol se muestran en la Tabla 5 y en Anexos se muestran las descripciones de los mismos con sus consejos de prudencia según (MSDS, 2023). Se determinó que, siendo NaCl el protocolo que usa estos tres reactivos es relativamente más peligroso para la salud pero igualmente contaminante para el medio ambiente que GS y GSC. Mientras que el primero tiene 9 indicaciones de peligro, los otros dos tienen 6.

Tabla 5: Indicaciones de peligrosidad de los reactivos con algún grado de peligrosidad según (MSDS, 2023).

Reactivo	Protocolo			Indicación de peligro (MSDS, 2023)
	NaCl	GS	GSC	
SDS	Sí	Sí	Sí	H302
				H315
				H318
				H412
Proteinasa K	Sí	No	No	H315
				H317
				H319
				H334
Etanol	Sí	Sí	Sí	H225
				H319
Total de indicaciones	9	6	6	9

9.7. Viabilidad de los protocolos utilizados.

En este apartado se ofrecerá una recopilación de los criterios evaluados anteriormente para definir el mejor protocolo en términos de efectividad en los análisis genéticos, sencillez en su aplicación, economicidad y contaminación o peligrosidad. Cabe recalcar que el tiempo que demoraban en procesarse todas las muestras en los protocolos era relativamente igual, y esto sucede porque las fases de extracción eran básicamente las mismas, por lo que este criterio no se tomó en cuenta.

Los criterios evaluados fueron: ausencia de eventos de contaminación, cantidad de curvas de ADN fidedignas seleccionadas cualitativamente, concentración y pureza de ADN, economicidad y peligrosidad. Se obtuvo como resultado que el método de extracción que cumple de mejor manera con estos criterios fue el de Gradiente de Sales (GS) seguido del método de sal común (NaCl) y finalmente el de Gradiente de Sacarosa (GSC). Asimismo, en cuanto a los preservantes, el mejor resultó ser ARN Later seguido de etanol al 40% y por último etanol al 96%. Estos resultados brindan un enfoque diferente sobre el uso de etanol al 96% en su mayoría usado para la preservación de carne de tortuga marina. El promedio entre ARNLT de 1.5 con el de ET40 de 1.8 no es tan distante, por lo que los beneficios de economicidad del ET40 ofrecen una buena alternativa para el estudio genético. Véase la Tabla 6.

Tabla 6: Posición de los métodos de extracción (arriba) y preservación (abajo), siendo 1 el valor más conveniente y 3 el método menos conveniente según los criterios.

Protocolo	Ausencia de eventos de contaminación	Cantidad de curvas fidedignas	Concentración de ADN	Pureza de ADN	Economicidad	Peligrosidad	Promedio
GS	2	1	1	2	1	1	1.3
GSC	3	3	2	3	2	1	2.3
NaCl	1	2	3	1	3	2	2.0

Preservante	Ausencia de eventos de contaminación	Cantidad de curvas fidedignas	Concentración de ADN	Pureza de ADN	Economicidad	Peligrosidad	Promedio
ARNLT	1	1	2	1	3	1	1.5
ET40	2	2	1	2	2	2	1.8
ET96	3	3	3	3	1	2	2.5

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

10.1. Conclusiones.

Luego de haber comparado “tres protocolos de extracción de ADN en carne de tortuga marina mediante el análisis y cuantificación del ácido nucleico para la obtención de un método sencillo, económico, reproducible y no contaminante”; se concluye que, el protocolo por gradiente de sales (GS, 55% de modificación) resultó ser el más conveniente según los criterios evaluados, seguido del método de NaCl (sin modificaciones) y como peor opción el de GSC (61% modificado). El método de extracción química (usando sales y agentes quelantes) por el protocolo GS, a pesar de tener una probabilidad promedio de contaminación de sus muestras del 26.78% (Probit, 95% de confianza), fue el protocolo con mejores resultados en concentración de ADN ($120 \pm 73.85 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, ANOVA, $p=0.000$) y con una pureza 260:280 aceptable de 1.60 ± 0.23 (ANOVA, $p=0.043$).

El método de NaCl basado en extracción mixta (química y enzimática) fue el segundo con los mejores resultados, pues fue el que menos reflejó eventos de contaminación con una probabilidad del 6.17%. Sin embargo, la concentración de ADN de este método fue muy bajo con $49.60 \pm 70.83 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y una pureza 260:280 de 1.64 ± 0.25 , siendo esta última la mejor registrada entre los tres protocolos evaluados.

Es probable que el método menos conveniente para la extracción de ADN en muestras de tortuga marina sea el de GSC. Este método tuvo el segundo valor promedio más alto en concentración ($101.91 \pm 64.92 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) que puede explicarse por la gran probabilidad de eventos de contaminación (37.97%), lo cual a su vez se fue reflejado en sus bajos valores de pureza con una media de 1.54 ± 0.27 .

El protocolo de GS fue 87.15% y 0.3% más barato (USD 0.13/muestra) que el NaCl (USD 1.00/muestra) y GSC (USD 0.13/muestra), respectivamente. Asimismo, los métodos de GS y GSC fueron 33.33% menos contaminantes y peligrosos para el medio ambiente y el operador comparando con el método de NaCl.

Otros resultados de este estudio cumplen con el objetivo de “*evaluar la calidad y cantidad de ADN según la procedencia de la muestra valorando sus estados de descomposición y el tipo de tejido*”. Se obtuvo una relación inversamente proporcional entre el estado de descomposición y la concentración y calidad de ADN con valor $p=0.000$, mostrando que las diferencias fueron estadísticamente significativas. Lo que hace de este estudio el primero en extraer ADN en muestras de tortugas marinas varadas en diferentes estados de descomposición.

Las diferencias entre los tejidos evaluados fueron poco significativas con $p=0.497$ para concentración y de $p=0.908$ en valores de pureza; siendo los valores de concentración de ADN obtenido en ligamentos un poco más altos ($94.04 \pm 89.9 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) que los obtenidos de músculos ($86.60 \pm 69.73 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); y de pureza casi idénticos 1.594 ± 0.25 y 1.598 ± 0.25 , respectivamente. Por lo que se concluye que, estadísticamente, usar ligamentos o músculos no debería influir en los resultados. Sin embargo, es necesario destacar que las muestras de ligamentos fueron obtenidas, en su mayoría, en los especímenes más descompuestos. Por lo que resultaría más conveniente procurar obtener las muestras de ligamentos al realizarse la colecta de muestras en el campo.

En el objetivo cuya finalidad fue “*evaluar dos métodos de preservación de muestras mediante el análisis de la pureza, calidad y cantidad de ácidos nucleicos para el desarrollo de una técnica estandarizada con carne de tortuga marina*”, se tomaron en cuenta los preservantes la solución de ARN Later (ARNLT), Etanol al 40% (ET40) y Etanol al 96% (ET96).

Los dos primeros corresponden al primer registro del uso de estos para la preservación de ADN en muestras de tortugas marinas. Los resultados no fueron estadísticamente significativos para concentración y pureza de ADN con $p=0.314$ y 0.228 , respectivamente. El preservante con mayores valores de concentración de ADN fue ET40 con $97.51 \pm 57.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ seguido de ARNLT con $93.90 \pm 83.14 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y finalmente ET96 con $79.48 \pm 76.72 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los valores de pureza fueron más altos en ARNLT con 1.63 ± 0.21 , ET40 con 1.58 ± 0.27 y nuevamente ET96 con el valor más bajo de 1.57 ± 0.27 . Los valores por mL fueron de USD 4.62 para ARNLT, USD 0.05 para ET40 y 0.01 usando ET96. Por lo que, en base a los criterios anteriores, la mejor opción en términos de efectividad para los análisis genéticos y economicidad, sería el preservante ET40, el cual podría aplicarse en muestras de carne de tortuga marina.

10.2. Recomendaciones.

Para la aplicación de estudios similares, se recomienda suma discreción en la colección de muestras especialmente en vertebrados marinos en estado de descomposición. Recordando que son una fuente activa de contaminación, se recomienda el uso del equipo adecuado como guantes, y mascarilla facial en el campo; así como el permanente uso de éstos junto con el mandil dentro del laboratorio. En la extracción del ADN se recomienda seguir los protocolos al pie de la letra, sin omisión de pasos o errores que podrían resultar en valores de baja credibilidad. Por lo que se recomienda ser metódicos, cuidadosos, asepticos y estratégicos. Los equipos utilizados en espectrofotometría deberían ser manipulados con mucho cuidado.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alaeddini, R., Walsh, S., & Abbas, A. (2010). Molecular studies of time- and environment-dependent effects on bone DNA survival. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 211-220. doi:10.1080/00450611003758264
- Ali, S. (13 de Enero de 2019). *Genomic DNA Extraction – Principle, Steps and Functions of Reagents*. Obtenido de HowBiotech: <https://howbiotech.com/genomic-dna-extraction-principle-steps-and-functions-of-reagents/>
- Aljanabi, S., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 4692-4693. Obtenido de <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
- Al-Kandari, N., Singh, J., & Sangar, V. (2016). Time-dependent effects of temperature and humidity on quantity of DNA in samples of human saliva, blood and semen in Kuwait. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2852-2873. doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.7(7).2852-73
- Arenas, M., Pereira, F., Oliveira, M., Pinto, N., Lopes, A., Gomes, V., . . . Amorim, A. (2017). Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair. *PLOS Genetics*. doi:10.1371/journal.pgen.1006960
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *Programa de Control de calidad de muestras de ADN y ARN*. Salamanca: Universidad de Salamanca. Obtenido de <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>

- Bjorndal, K., & Jackson, J. (2003). Roles of Sea Turtles in Marine Ecosystems: Reconstructing the Past. En P. Lutz, J. Musick, & J. Wyneken, *The Biology of Sea Turtles* (págs. 259-273). CRC Press.
- Borde, Y., Tonnany, M., & Champod, C. (2008). A study on the effects of immersion in river water and seawater on blood, saliva, and sperm placed on objects mimicking crime scene exhibits. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 149-163.
- Chauhan, T. (25 de Diciembre de 2018). *Lysis Buffer For DNA Extraction: Importance, Recipe and Preparation*. Obtenido de Genetic Education : <https://geneticeducation.co.in/lysis-buffer-for-dna-extraction/>
- Chavarría, I., Melara, M., Liles, M., & Castro-Menjivar, J. (2020). Determinación de la proporción sexual de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*) inmaduras, mediante la detección de testosterona por medio de la prueba de ELISA. *Agrociencia*, 73-80.
- CIT. (2021). *Informes Anuales*. Obtenido de Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas: <http://www.iacseaturtle.org/informes.htm>
- CITES. (21 de mayo de 2023). *Apéndices*. Obtenido de CITES: <https://cites.org/esp/app/appendices.php>
- Coello, D., & Herrera, M. (2011). *Línea base de conocimiento sobre el estado actual de las tortugas marinas en el Ecuador*. Instituto Nacional de Pesca. Guayaquil: Consultoría Elaborada para la Comisión Permanente del Pacífico Sur.

- Cullis, P., Elsy, D., Fan, S., & Symons, M. (1993). Marked effect of buffers on yield of single-and double-strand breaks in DNA irradiated at room temperature and at 77 K. *International Journal of Radiation Biology*, 161-165.
- Dalton, D., & Kotze, A. (2011). DNA barcoding as a tool for species identification in three forensic wildlife cases in South Africa. *Forensic Science International*, 51-54. doi:10.1016/j.forsciint.2010.12.017
- Daly, A., Steen, V., Fairbrother, K., & Idle, J. (1996). CYP2D6 multiallelism. *Methods in Enzymology*, 199-210. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)72024-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)72024-4)
- Darquea, J., & Alfaro-Sigueto, J. (2018). Captura incidental de tortugas marinas en pesquerías artesanales en Ecuador: evaluación y mitigación. *Simposio de Tortugas Marinas de Ecuador*.
- Dethmers, K., Jensen, M., Fitzsimmons, N., & Broderick, D. (2010). Migration of green turtles (*Chelonia mydas*) from Australasian feeding grounds inferred from genetic analyses. *Marine and Freshwater Research*, 1376-1387. doi:10.1071/MF10084
- Dissing, J., Sondervang, A., & Lund, S. (2010). Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 392-396. doi:10.1016/j.jflm.2010.08.001
- Encalada, S., Eckert, S., & Bowen, B. (1994). Forensic Applications of Mitochondrial DNA Markers: Origin of a Confiscated Green Turtle. *Marine Turtle Newsletter*, págs. 1-3. Obtenido de <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn66/mtn66p1.shtml?nocount>

- Escalante, K. (2020). *Efecto de la temperatura en la amplificación del Gen 18S ARNr de dos microalgas a través de la reacción en cadena de la polimerasa PCR*. La Libertad: UPSE. Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5245>
- Frippiat, C., Gastaldi, A., & van Grunderbeeck, S. (2017). Persistence of immersed blood and hair DNA: a preliminary study based on casework. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 1-8. doi:10.1016/j.jflm.2017.07.009
- García, R., Lagares, A., Yunez, O., Manjarrez, N., & Onofri, O. (2008). Utilización de resina Chelex en la extracción de ADN de varios tipos de tejidos de la tortuga marina *Caretta caretta*, para la amplificación de marcadores moleculares. *Las Ciencias Básicas e Ingeniería*, 343-354. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Ruth-Garcia-Garcia/publication/304627517_Utilizacion_de_resina_Chelex_en_la_extraccion_de_ADN_de_varios_tipos_de_tejidos_de_la_tortuga_marina_Caretta_caretta_para_la_amplificacion_de_marcadores_moleculares/links/57755e
- Hall, A., Sims, L., & Ballantyne, J. (2014). Assessment of DNA damage induced by terrestrial UV irradiation of dried bloodstains: forensic implications. *Forensic Science*, 24-32. Obtenido de 10.1016/j.fsigen.2013.06.010
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. En O.-M. Boldura, C. Balta, & N. Awwad, *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.92206.
- Helmus, J., Zorell, S., Bajanowski, T., & Poetsh, M. (2018). Persistence of DNA on clothes after exposure to water for different time periods-a study on bathtub, pond, and river. *International Journal of Legal Medicine*, 99-106. doi:10.1007/s00414-017-1695-2

- Hurtado, M. (1982). The Ban on the Exportation of Turtle Skin from Ecuador. *Marine Turtle Newsletter*, págs. 1-4. Obtenido de <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn20/mtn20p1b.shtml>
- Hurtado, M. (1987). Las tortugas marinas y la pesca artesanal . En S. d. Pesqueros, & I. N. Pesca, *La pesca artesanal en el Ecuador* (págs. 34-37). Guayaquil: Subsecretaría de Recursos Pesqueros.
- IUCN. (2023). *The IUCN* . Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species: <https://www.iucnredlist.org/es>
- Jadhav , K., Ranjani, R., & Senthil, N. (2015). Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol. *Bioinfolet*, 543-548.
- Johnson, R., Wilson-Wide, L., & Linacre, A. (2014). Current and future directions of DNA in wildlife forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 1-11. doi:10.1016/j.fsigen.2013.12.007
- Komoroske, L., Jensen, M., Stewart, K., Shamblin, B., & Dutton, P. (2017). Advances in the Application of Genetics in Marine Turtle Biology and Conservation. *Frontiers in Marine Science*, 4-156. doi:<https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00156>
- Krestoff, E., Creecy, J., Lord, W., Haynie, M., Coyer, J., & Sampson, K. (2021). Mitochondrial DNA Evaluation and Species Identification of Kemp's Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys kempii*) Bones After a 3-Year Exposure to Submerged Marine and Terrestrial Environments. *Frontiers*. doi:10.3389/fmars.2021.646455

- Lahiri, D., & Nurnberger, I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Research*, 5444. Obtenido de <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5444>
- MAAE, WildAid, & GIZ. (2020). *Plan de Acción para la Conservación de las Tortugas Marinas 2021 - 2030*. Guayaquil: Proyecto Conservación de Tortugas Marinas en la Costa.
- MAAE, WildAid, & GIZ. (2020). *Plan de Acción para la Conservación de las Tortugas Marinas en Ecuador 2020 - 2030*. Guayaquil: Ministerio del Ambiente y Agua de Ecuador, WildAid Inc., Cooperación Técnica Alemana – GIZ.
- Madduppa, H. H., Bahri, S., Subhan, B., Anggraini, N. P., Ohoiulun, H., Abhillah, T., . . . Sangasji, I. (2019). DNA barcoding of sea turtles (Dermochelyidae and Cheloniidae) and its protocol using different tissues quality: implication to conservation managers. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* . Indonesia: IOP Publishing.
- Maniatis , T., Fritsch, E., & Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Meixner, E., Kallapurackal, V., Kratzer, A., Voegeli, P., Thali, M., & Bolliger, S. (2020). Persistence and detection of touch DNA and blood stain DNA on pig skin exposed to water. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 243-251. doi:10.1007/s12024-020-00234-3
- Menéndez, G. (2015). *Identificación de las causas de muerte y varamientos de tortugas marinas (Chelonioidea) en la playa de La Diablica-Salinas, entre los meses de octubre de 2014 a marzo de 2015*. La Libertad: UPSE. Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/2144/1/UPSE-TBM-2015-020.pdf>

- Michiels , A., Van den Ende , W., Tucker , M., Van Riet , L., & Van Laere, A. (2003). Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*, 85-89.
- Minitab LLC. (2023). *¿Qué es ANOVA?* Obtenido de Soporte de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/>
- Minitab LLC. (2023). *¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?* Obtenido de Soporte de Minitab 21: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>
- Minitab,LLC. (2023). *Revisión general de Análisis probit.* Obtenido de Soporte de Minitab: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/statistical-modeling/reliability/how-to/probit-analysis/before-you-start/overview/>
- MSDS. (2023). *Consejos de prudencia.* Obtenido de MSDS Europe: <https://www.msds-europe.com/es/prudencia-p/>
- MSDS. (2023). *Indicaciones de peligro.* Obtenido de MSDS Europe: <https://www.msds-europe.com/es/indicaciones-de-peligro-h/>
- Nishizawa, H., Joseph, J., & Yee Kuen, C. (2018). Comparison of the rookery connectivity and migratory connectivity: insight into movement and colonization of the green turtle (*Chelonia mydas*) in Pacific–Southeast Asia. *Marine Biology*. doi:10.1007/s00227-018-3328-9

- Perry, W., Bass, W., Riggsby, W., & Sirotkin, K. (1988). The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *Journal of Forensic Sciences*, 144-153.
- Pertiwi, P., Sembiring, A., Cahyani, D., & Al Malik, M. (Agosto de 2020). Forensic genetic case study: Species identification and traceability of sea turtle caught in illegal trade in Bali, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 4276-4283. doi:10.13057/biodiv/d210945
- Poppi, L., & Marchiori, E. (2013). *Standard Protocol for Post-mortem Examination on sea turtles*. Padua: University of Padua.
- Promega. (2023). *DNA Purification*. Obtenido de Promega: <https://www.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/#:~:text=There%20are%20five%20basic%20steps,to%20a%20purification%20matrix%2C%204>
- Reséndiz, E., & Lara, M. (2017). Análisis de los cambios post mortem de tortugas marinas del Pacífico de Baja California Sur, con técnicas forenses. *Bio Ciencias*, 22. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.04.04.06>
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O., Martínez, A., . . . Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 56-65. doi:10.15174/au.2016.1078
- Rodríguez, J. (2017). *Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul Cardisoma crassum, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-*

Ecuador, 2016. La Libertad: UPSE. Obtenido de <http://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/4265>

Rueda-Almonacid, J. V., Mittermeier, R., Rodríguez-Mahecha, J., & Mast, R. (2007). *Tortugas Marinas de América*. Colombia: Conservación Internacional Series de Bolsillo.

Sambrook, & Russel. (2001). *Molecular cloning*. Cold spring Harbor Laboratory Press.

Schwartz, T., Schwartz, E., Mieszerski, L., McNally, L., & Koblinsky, I. (1991). Characterization of deoxyribonucleic acid (DNA) obtained from teeth subjected to various environmental-conditions. *Journal of Forensic Sciences*, 979-990.

Shepherd, L., & McLay, T. (2011). Two micro-scale protocols for the isolation of DNA from polysaccharide-rich plant tissue. *Journal of Plant Research*, 311-314.

Solórzano, I. (2015). *Conservación de tortugas marinas; reducción de las amenazas al habitat de anidación dentro del Refugio de Vida Silvestre y Marino Costera Pacoche y su zona de influencia*. Galápagos: Convención Interamericana para la Protección y Conservación de las Tortugas Marinas Ecuador. Obtenido de <http://www.iacseaturtle.org/docs/informes-anales/2015/Informe%20Anual%202015%20Ecuador.pdf>

Staats, A., Gravendeel, H.-J., Scholtens, I., Peelen, T., Prins, T., & Kook, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 4615-4630. doi:10.1007/s00216-016-9595-8

Suárez, F. (2015). *Evaluación de los varamientos de tortugas marinas en las playas de la parroquia Manglaralto, (San Pedro-Olón) Provincia de Santa Elena, durante los meses de*

- Febrero 2014 a mayo de 2015. La Libertad: UPSE. Obtenido de <http://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/2729>
- Thermo Scientific. (2011). *Assessment of Nucleic Acid Purity* . Wilmington: T042-TECHNICAL BULLETIN.
- Tutiven, J. (2020). *Evaluación de casos de varamientos de tortugas marinas en el Centro de Rehabilitación de Fauna Marina del Parque Nacional Machalilla, Ecuador, 2014-2019*. La Libertad: UPSE. Obtenido de <https://repositorio.upse.edu.ec/handle/46000/5619>
- Valadez, C., Silva, F., & Hernández, S. (2000). *Proporción sexual en crías de la tortuga marina L. olivacea producida en corral de incubación en la playa de anidación La Gloria, Jalisco, México*. Maracaibo: Universidad de Zulia.
- Valdés, J., & Cháves, J. (2015). *Filogeografía de las Poblaciones de Tortuga Verde (Chelonia mydas) del Ecuador* . Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Valdez, C., Guzmán, M., Valdés, A., Forougbakhch, R., Alvarado, M., & Rocha, A. (Diciembre de 2018). Estructura y diversidad de la vegetación en un matorral espinoso prístino de Tamaulipas, México. *Revista de Biología Tropical*.
- Vargas, S., Santos, F., & F de Araujo, F. (2009). DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). *Genetics and Molecular Biology*, 608-612.
- Vergara, M. (2020). *Efectos de la pesca incidental en la población de tortugas marinas en la costa de Ecuador*. Jipijapa: Universidad Estatal del Sur de Manabí. Obtenido de <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2642>

- Wallace, B., Tiwari, M., & Girondot, M. (2013). *Dermochelys coriacea* (Southwest Indian Ocean subpopulation). The IUCN Red List of Threatened Species 2013. Obtenido de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-2.RLTS.T46967863A46967866.en>
- Walsh, P., Metzger, D., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biological Techniques*, 506-513.
- Work, T. (2000). *Manual de Necropsia de Tortugas Marinas para Biólogos en Refugios o Áreas Remotas*. Hawaii: U.S. Geological Survey .
- Wyneken, J. (2004). *La Anatomía de las Tortugas Marinas*. U.S. Department of Commerce. Miami: NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470.

Anexo 3: Resumen de las cantidades y concentraciones de los reactivos utilizados.

Fase de extracción	Reactivo	Cloruro de Sodio					Gradiente de sales					Gradiente de sacarosa				
		Concentración	Cantidad (µl)	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Concentración	Cantidad (µl)	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Concentración	Cantidad (µl)	Temperatura (°C)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
Lisis celular	Tris-HCl	0.05 M	300				0.01 M	300				0.01 M	300			
	EDTA	0.1 M	300				0.002 M	300				0.0015 M	300			
	KCl						0.01 M	300								
	MgCl2						0.01 M	300				0.005 M	300			
	Sacarosa											0.32 M	300			
	SDS	10 %	70				10 %	40				10 %	40			
	Proteinasa K	20 mg/mL	20													
Incubación				55					55					65		30
Desnaturalización de proteínas	NaCl	5 M	200				3 M	150				5 M	200			
Centrifugación					10000	5				12000	5				10000	5
Extracción de sobrenadante			800					500					500			
Precipitación	Etanol	100 %	800				100 %	1000				100 %	1000			
Purificación	Acetato de sodio	3 M	80				3 M	50				3 M	50			
Congelación				-20		Toda la noche			-20		Toda la noche			-20		Toda la noche
Centrifugación					10000	5				10000	5				10000	5
Lavado	Etanol	70 %	800				70 %	1000				70 %	1000			
Centrifugación						12000	5				10000	5			10000	5
Resuspensión	Agua ultrapura		50					50					50			
Incubación									65					65		15

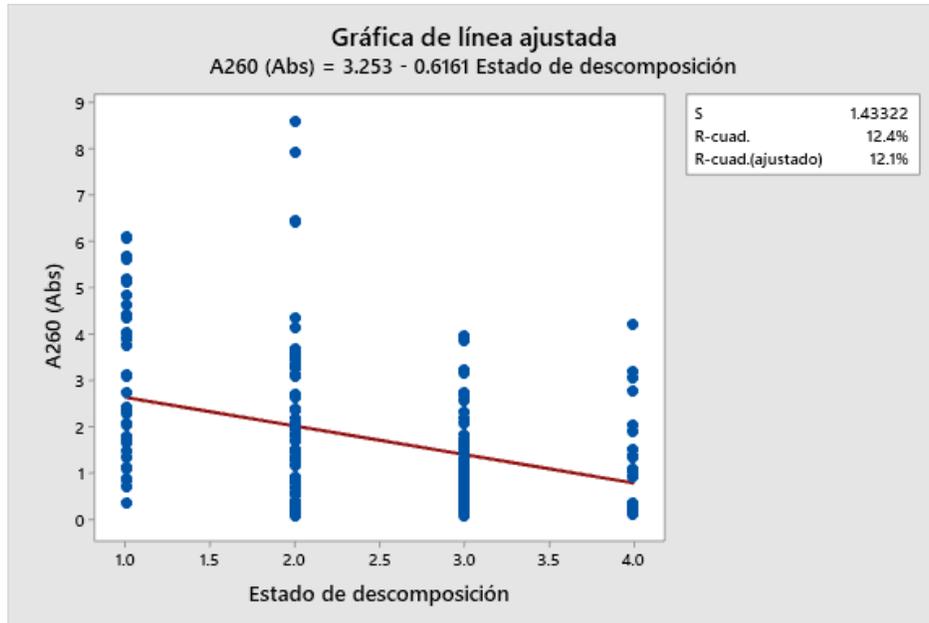
Anexo 4: Selección de las mejores muestras de cada uno de los 18 especímenes.

#	Código	Estado de descomposición	Tipo de tejido	Método de extracción	Método de preservación	Concentración de ADN	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
90	AC18051XLT2	3	Ligamento	NaCl	ARNLT	429.6 ng/µl	8.592	4.98	1.73	1.19
144	OL25051XLT2	2	Músculo	NaCl	ARNLT	119.9 ng/µl	2.399	1.465	1.64	0.69
244	MB17051YLAT6	2	Músculo	GS	ARNLT	127.3 ng/µl	2.546	1.513	1.68	0.48
248	MB17052YET6	3	Ligamento	GS	ET96	199.1 ng/µl	3.982	2.258	1.76	1.3
261	AC21051YLT6	3	Músculo	GS	ARNLT	85.1 ng/µl	1.702	0.981	1.73	0.43
268	MV23051YLT6	4	Ligamento	GS	ARNLT	66 ng/µl	1.32	1.047	1.26	0.28
275	AC24051YLT5	4	Ligamento	GS	ARNLT	159 ng/µl	3.18	2.118	1.5	0.62
285	AC24052YLT6	4	Ligamento	GS	ARNLT	101.3 ng/µl	2.027	1.586	1.28	0.32
290	AC24053YLT5	2	Ligamento	GS	ARNLT	321.3 ng/µl	6.426	3.2	2.01	0.98
308	OL25052YLT6	2	Músculo	GS	ARNLT	72.5 ng/µl	1.449	0.943	1.54	0.28
316	OL25053YLT6	3	Músculo	GS	ARNLT	115.9 ng/µl	2.319	1.521	1.52	0.29
322	OL25054YLT5	3	Músculo	GS	ARNLT	63.1 ng/µl	1.261	0.806	1.56	0.26
337	CU25051YET6	3	Músculo	GS	ET96	137.2 ng/µl	2.744	1.959	1.4	0.32
347	SR28051YLT5	1	Músculo	GS	ARNLT	256.4 ng/µl	5.129	2.455	2.09	0.77
357	BA31051YLT6	1	Músculo	GS	ARNLT	202 ng/µl	4.04	2.115	1.91	0.62
379	AC18052YLT5	2	Músculo	GS	ARNLT	156.8 ng/µl	3.135	1.791	1.75	0.55
463	CH24051ZET403	2	Músculo	GSC	ET40	172.3 ng/µl	3.447	2.117	1.63	0.45
525	SA04061ZET3	3	Músculo	GSC	ET96	192.5 ng/µl	3.85	2.215	1.74	0.66

Anexo 5: Tabla de metadatos con los criterios usados para la identificación de las especies.

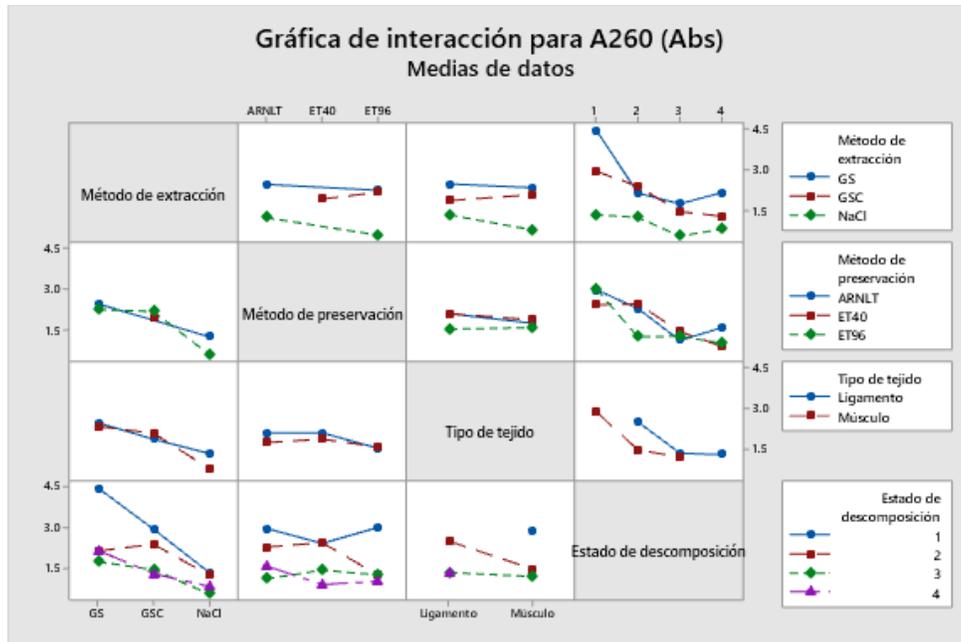
Número	Código	Ubicación		Cantón	Playa	Estación	Medidas				Número de escamas				Edad	Sexo	Especie	Muerte incidental u objetivo				Estado de descomposición	Muestra tomada de	Tipo de tejido
		Lat	Long				LC (cm)	AC (cm)	LR (cm)	AR (cm)	Centrales	Laterales	Ventrales	Oculares				Presencia	Causa	Ectoparásitos	Evidencia			
1	MB17051	2°13'58.85"S	80°57'47.22"W	Salinas	Mar Bravo	E3	82	80	80	63	5	4	4	2	Adulta	Macho	CM	Sí	Colisión	No	Caparazón roto	3	Bíceps: Aleta	Músculo
2	MB17052	2°15'9.23"S	80°56'36.88"W		Mar Bravo	E3	69	67	64	55	5	4	4	2	Adulta	Hembra	CM	No	ND	No	ND	3	Hombro	Ligamento
3	AC18051	2°18'35.11"S	80°53'59.02"W		Anconito	E2	46	45	44	40	5	4	4	ND	Juvenil	ND	CM	No	ND	No	ND	2	Cloaca	Ligamento
4	AC18052	2°18'10.89"S	80°54'18.70"W		Anconito	E2	68	67	66	58	ND	4	ND	2	Adulta	Macho	CM	Sí	Colisión	Sí	Caparazón roto	2	Bíceps: Aleta	Músculo
5	AC21051	2°17'53.78"S	80°54'33.66"W		Anconito	E2	62	60	61	50	ND	ND	4	2	Adulta	Hembra	CM	No	ND	No	ND	3	Bíceps: Aleta	Músculo
6	MV23051	2°3.168"S	80°44.112"W		Santa Elena	Monteverde	E7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	Bíceps: Aleta	Ligamento
7	AC24051	2°17'49.01"S	80°54'37.39"W	Salinas	Anconito	E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	No	ND	Tejido conectivo interno del caparazón seco	4		Ligamento
8	AC24052	2°17'53.32"S	80°54'34.02"W		Anconito	E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	No	ND	Tejido conectivo interno seco y recubrimiento óseo (ligamentos)	4		Ligamento
9	AC24053	2°18'10.48"S	80°54'19.11"W		Anconito	E2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Sí	Colisión	No	Caparazón destrozado, restos separados	2	Tejido conectivo interno	Ligamento
10	CH24051	2°24'19.12"S	80°41'33.99"W	Santa Elena	Chanduy	E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Adulta	Hembra	CM	Sí	Colisión	No	Caparazón destrozado, restos separados, sin cabeza, sin aleta superior izquierda	2	Bíceps: Aleta	Músculo	
11	OL25051	1°47'33.67"S	80°45'40.30"W		Olón	E9	68	66	56	44	ND	ND	4	ND	Adulta	Hembra	CM	Sí	Colisión	No	Cráneo roto, parte superior del caparazón roto	2	Bíceps: Aleta	Músculo
12	OL25052	1°47'34.96"S	80°45'40.42"W		Olón	E9	57	53	55	39	5	4	4	2	Juvenil	Hembra	CM	Sí	Anzuelo	No	Hilo de náilon que recorría todo su tracto digestivo desde la boca hasta la cloaca. Anzuelo atrapado en su interior.	2	Bíceps: Aleta	Músculo
13	OL25053	1°46'32.44"S	80°45'55.99"W		Olón	E9	68	ND	65	ND	ND	ND	ND	ND	Adulta	Hembra	CM	Sí	Colisión	No	Miada del caparazón roto	3	Bíceps: Aleta	Músculo
14	OL25054	1°46'19.42"S	80°45'59.05"W		Olón	E9	63	71	57	50	7	7	4	4	Adulta	Hembra	LO	No	ND	No	ND	3	Bíceps: Aleta	Músculo
15	CU25051	1°45'46.90"S	80°46'7.81"W		Curia	E9	73	70	67	56	ND	ND	ND	ND	Adulta	Hembra	CM	No	ND	Sí	ND	3	Bíceps: Aleta	Músculo
16	SR28051	ND	ND	Salinas	Santa Rosa	E4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Sí	Faenamiento	ND	La muestra fue obtenida por medio de una familia que acostumbra el consumo de la tortuga	1	Pectoral	Músculo	
17	BA31051	2°12'07.99"S	80°52'21.54"W	Santa Elena	Ballenita	E6	59	58	53	42	5	4	4	2	Juvenil	Hembra	CM	Sí	Colisión	Sí	Presentaba la parte frontal de la cabeza (nariz, boca) sangrante, parte del caparazón evidenciaba golpes o la acción de cuchillos	1	Bíceps: Aleta	Músculo
18	SA04061	1°53'4.95"S	80°44'4.31"W		San Antonio	E8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Juvenil	Hembra	ND	Sí	Colisión	No	La tortuga estaba sin cabeza ni extremidades. El caparazón estaba roto en la parte inferior	3	Hombro	Músculo

Anexo 6: Línea de regresión para el criterio de estados de descomposición.

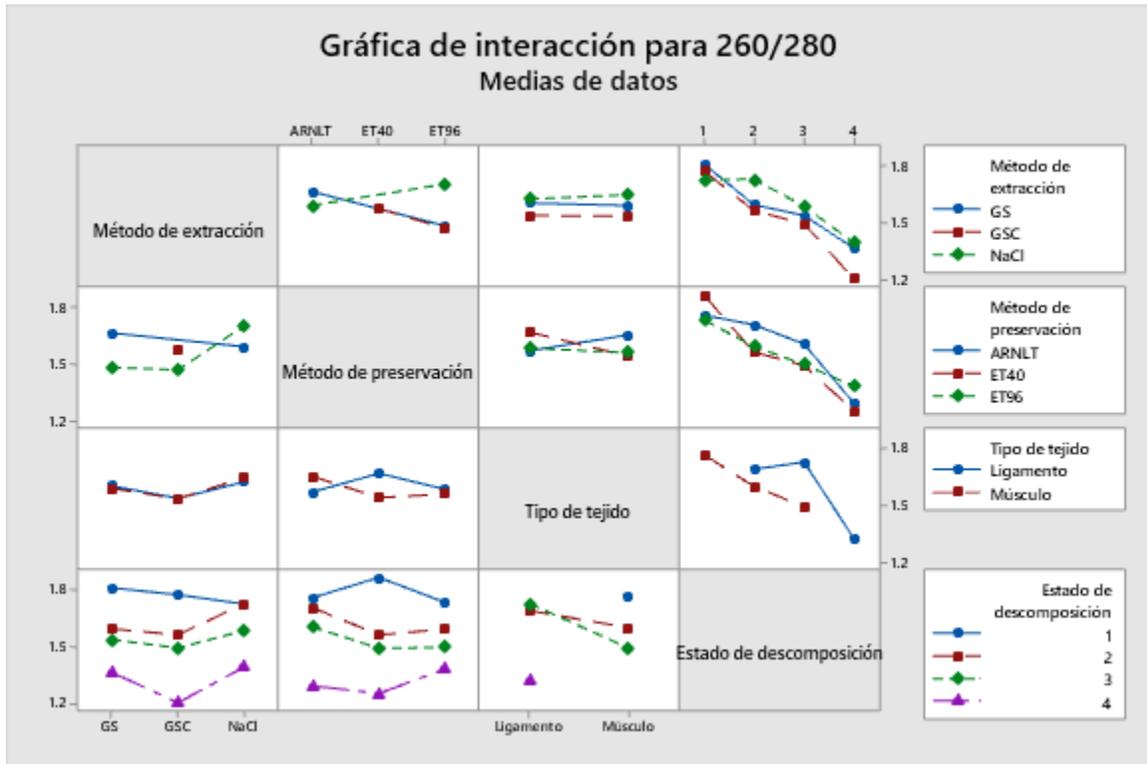


Gráfica de interacciones.

Anexo 7: Gráfica de interacciones de concentración de ADN para todos los criterios.



Anexo 8: Gráfica de interacciones para la pureza en todos los criterios analizados.



Evidencia fotográfica.

Código de espécimen	Dorso	Plastrón	Evidencia de pesca incidental
MB17051	 A photograph showing the dorsal view of a turtle specimen MB17051. The turtle is lying on a sandy surface, and its carapace is visible, showing a dark, mottled pattern with some lighter patches.	 A photograph showing the ventral view of the same turtle specimen MB17051. The plastron is visible, showing a similar dark, mottled pattern to the carapace.	
MB17052		 A photograph showing the ventral view of a turtle specimen MB17052. The turtle is lying on a sandy surface, and its plastron is visible, showing a dark, mottled pattern.	

<p>AC18051</p>			
<p>AC18052</p>			
<p>AC21051</p>			

<p>MV23051</p>			
<p>AC24051</p>			
<p>AC24052</p>			

AC24053



CH24051



OL25051



OL25052



OL25053



<p>OL25054</p>			
<p>CU25051</p>			
<p>SR28051</p>			

<p>BA31051</p>			
<p>SA04061</p>			

Anexo 9: Identificación del espécimen y toma de muestra.



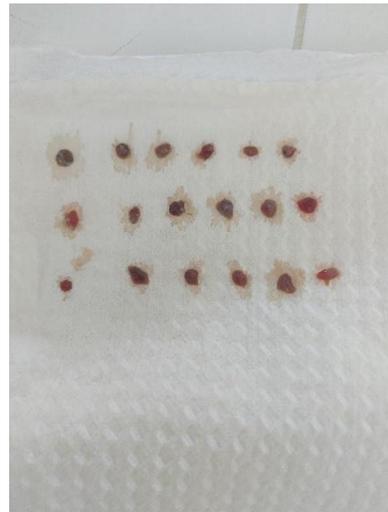
Anexo 10: Zona de corte y extracción de muestra en bícep.



Anexo 11: Muestras secándose luego de haber sido lavadas con agua destilada.



Anexo 12: Corte de 50 mg de 24 réplicas de cada muestra.



Anexo 13: Total de muestras por procesar.



Anexo 14: Ejemplo de pellet de ADN extraído.

