



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA
ELENA FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA
DE BIOLOGÍA

**“Evaluación del ADN complementario de
Dunaliella spp estresada y amplificación *In
Silico* del gen fitoeno sintasa *psy* como
evidencia de la expresión génica”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR
Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Autor:

Tigrero Beltrán Anthony Adan

Docente tutor:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA DE

BIOLOGÍA

“Evaluación del ADN complementario de *Dunaliella spp* estresada y amplificación *In Silico* del gen fitoeno sintasa *psy* como evidencia de la expresión génica”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:

BIÒLOGO

Autor:

Tigrero Beltrán Anthony Adan

Docente tutor:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.

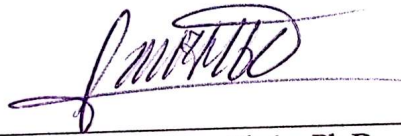
LA LIBERTAD – ECUADOR

2024

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “Evaluación del ADN complementario de *Dunaliella spp* estresada y amplificación *In Silico* del gen fitoeno sintasa *psy* como evidencia de la expresión génica”, elaborado por Tigrero Beltrán Anthony Adan estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente

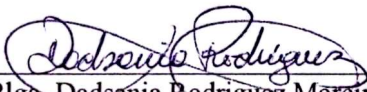


Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.
DOCENTE TUTOR

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “Evaluación del ADN complementario de *Dunaliella spp* estresada y amplificación *In Silico* del gen fitoeno sintasa *psy* como evidencia de la expresión génica”, elaborado por Tigrero Beltrán Anthony Adan estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente


Blga. Dadsania Rodriguez Moreira. M.Sc.
DOCENTE DE ÁREA

Dedicatoria

A mi familia, quienes iniciaron este viaje conmigo, y a mis amigos, que en el camino decidieron acompañarme.

Agradecimiento

A las autoridades y personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, a mis profesores y mentores, por compartir su vasto conocimiento y por guiarme con sabiduría y esmero. Su confianza en mí ha sido clave en mi trayectoria académica.

Especialmente, a mi tutora de tesis, la Bióloga Janeth Galarza Tipán, Ph.D., cuya orientación experta y paciencia han sido determinantes para la culminación exitosa de este proyecto. Su guía meticulosa y su compromiso con mi desarrollo académico han sido invaluable.

De igual manera, agradezco al Decano de la Facultad, Biólogo Richard Duque Marín, M.Sc., y al Ingeniero Jimmy Villón Moreno, M.Sc., Director de la Carrera de Biología por la disposición y respaldo brindados en la ejecución de este trabajo de investigación,

Y, especialmente, a todos aquellos que con su experiencia me dieron una visión diferente del mundo, gracias.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Anthony Adan Tigreiro Beltrán** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el 15 de julio de 2024



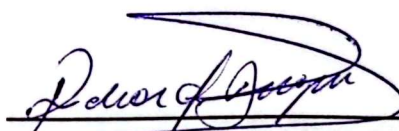
Ing. Jimmy Millón Moreno, M.Sc.
**DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Blga. Dadsania Rodríguez Moreira, M.Sc.
**PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph.D.
**DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



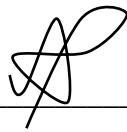
Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.
**DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Lcdo. Pascual Roca Silvestre, MS.c.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Declaración expresa

Yo, *Adan Anthony Tigreiro Beltrán*, 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.



Adan Anthony Tigreiro Beltrán

CI: 2450578378

Índice General

1. Introducción.....	1
2. Problemática	4
3. Justificación.....	6
4. Objetivos.....	8
5. Hipótesis	9
6. Marco Teórico.....	10
6.1. Transcripción y Traducción de la Información Genética	10
6.1.1. Procesos de Transcripción y Traducción.....	10
6.1.2. Técnicas Utilizadas para extraer ARN de las Células	11
6.1.3. Evaluación de Calidad de ARN.....	13
6.2. Síntesis de ADN Complementario (ADNc)	14
6.2.1. Factores que afectan la síntesis de ADN Complementario.....	14
6.2.2. Análisis bioinformático Secuencia ADNc: BLAST, alineamiento de secuencias	15
6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
6.3.1. Principios de la PCR.....	17
6.3.2. Proceso de Amplificación de un Gen de Interés Utilizando ADNc	18
6.4. Modelamientos <i>In Silico</i> para estudios biológicos moleculares.....	19
6.4.1. Diseño <i>In Silico</i> de Cebadores.....	19
6.4.2. Amplificación <i>In Silico</i> del Gen Fitoeno Sintasa (<i>psy</i>) de <i>Dunaliella sp.</i> ..	20
6.4.3. Electroforesis <i>In Silico</i>	21
6.5. <i>Dunaliella</i> una microalga caroteno-génica.....	22
6.5.1. Características Generales.....	22
6.5.2. Biosíntesis de los carotenoides en <i>Dunaliella sp.</i>	24
6.5.3. Estudios de expresión génica de <i>psy</i> en <i>Dunaliella spp.</i>	27
7. Metodología: Fase de laboratorio	29
7.1. Obtención de la muestra	29
7.2. Pretratamiento de la muestra	29

7.3. Elaboración del Buffer TE.....	29
7.4. Extracción de ARN total	30
7.4.1. Preparación de tampones y reactivos protocolo I	30
7.4.2. Protocolo I, columnas de sílice complementado con disrupción mecánica	30
7.4.3. Preparación de tampones y reactivos protocolo II.....	32
7.4.4. Protocolo II, columnas de sílice.....	32
7.4.5. Preparación de tampones y reactivos protocolo III	33
7.4.6. Protocolo III. Columnas de sílice complementado Proteinasa K	34
7.5. Protocolos basados en concentración de la Transcriptasa Inversa, ADNcI Y ADNcII.....	35
7.6. Análisis estadístico	36
8. Metodología: Fase bioinformática.....	37
8.1. Selección de secuencias.....	37
8.2. Alineamiento de secuencias y cadena consenso.....	37
8.3. Diseño de partidores específicos	38
8.4. Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa <i>In silico</i>	39
9. Análisis e interpretación de los resultados.....	40
9.1. Extracción de ARN total	41
9.2. Comparación de tres protocolos de extracción de ARN total basados en columna de sílice	42
9.2.1. Anova de una sola vía.....	43
9.2.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey (Tukey HSD).....	45
9.2.3. Prueba de Kruskal Wallis	47
9.2.4. Coeficiente de correlación de Spearman	50
9.3. Síntesis de ADN complementario	52
9.3.1. Comparación de protocolos para ADN complementario.....	53
9.4. Cuantificación de rendimiento del ADN complementario.....	57
10. Selección de secuencias	59
10.1. Alineamiento de secuencias y cadena consenso.....	61
10.2. Diseño de partidores específicos	65

10.3. Amplificación <i>In Silico</i> por PCR y electroforesis en gel de agarosa	66
11. Discusiones	73
12. Conclusiones	78
13. Recomendaciones.....	79
14. Bibliografía	80

Índice de figuras

Figura 1. Ruta de la carotenogénesis en <i>Dunaliella</i>	26
Figura 2. Diagrama de caja y bigotes (boxplot) resume la distribución de datos	46
Figura 3. Diagrama de caja y bigotes (boxplot) de la variable pureza por contaminación de proteínas	49
Figura 4. Correlación entre variable Concentración y Pureza A260/A280.	51
Figura 5. Gráfico Boxplot para variable concentración protocolos ADN complementario	54
Figura 6. Gráfico Boxplot para variable pureza protocolos ADN complementario ...	56
Figura 7. Secuencias con alineamientos significativos provenientes de la base de datos de nucleótidos del banco de genes del NCBI.	59
Figura 9. Descripción general de las secuencias de la base de datos alineadas con la secuencia de consulta MN732755.1.	63
Figura 10. Alineamiento doble entre secuencias seleccionadas AY601075.1 y MN732755.1	64
Figura 11. Cadena consenso.....	64
Figura 12. Amplificación <i>In Silico</i> en PrimerBlastI.	66
Figura 13. Amplificación <i>In Silico</i> en PrimerBlastII	67
Figura 14. Amplificación <i>In Silico</i> SnapGeneI.....	68
Figura 15. Amplificación <i>In Silico</i> SnapGeneII	68
Figura 16. Parámetros de diseño del juego de cebadores PM- <i>psy</i> F1 y PM- <i>psy</i> R1 por SnapGene	69
Figura 17. Parámetros de diseño del juego de cebadores PM- <i>psy</i> F2 y PM- <i>psy</i> R2 por SnapGene	70
Figura 18. Electroforesis <i>In Silico</i> realizada en SnapGene	71

Índice de tablas

Tabla 1. Mediciones de Protocolo I perlas, extracción de ARN total.....	42
Tabla 2. Mediciones Protocolo II sin perlas, extracción de ARN total.....	42
Tabla 3. Mediciones de Protocolo III, proteinasa k, extracción de ARN total	42
Tabla 4. Resultados Anova de una sola vía para comparación de la media concentración de los tres protocolos de extracción de ARN total	44
Tabla 5. Resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey (Tukey HSD)	45
Tabla 6. Resultados test de Kruskal Wallis para comparación de la media pureza A260/280 de los tres protocolos de extracción de ARN.....	47
Tabla 7. Resultados de la prueba de comparación múltiple método de Dunn	48
Tabla 8. Coeficiente de Correlación rs de Spearman, interpretaciones	50
Tabla 9. Resultados de la Prueba de correlación de Spearman.....	51
Tabla 10. Resultados estadística descriptiva concentración y pureza, protocolo ADNcI y ADNcII.....	52
Tabla 11. Resultados de concentración prueba Mann Whitney U unilateral, protocolos de ADN complementario	53
Tabla 12. Resultados de concentración prueba Mann Whitney U unilateral, protocolos de ADN complementario	55
Tabla 13. Rendimiento de ADN complementario protocolo I.....	57
Tabla 14. Rendimiento de ADN complementario protocolo II.....	58
Tabla 15. Secuencias con alineamientos significativos bajo criterios de selección preestablecidos a partir de la secuencia MN732755.1.	60
Tabla 16. Cebadores y parámetros de diseño.....	65

Índice de anexos

Anexos 1. Muestras de <i>Dunaliella</i> spp estresada en tubos eppendorf para centrifugar	89
Anexos 2. Temperaturas preestablecida para la síntesis de ADN complementario	90
Anexos 3. Columnas de centrifugación para la purificación del ARN total	91
Anexos 4. Tubos de microcentrífuga con MasterMix para la síntesis de ADN complementario	92

Glosario

ADN Complementario (ADNc): Molécula de ADN sintetizada a partir de una molécula de ARN mensajero mediante la enzima transcriptasa inversa.

ARN Mensajero (ARNm): Tipo de ARN que lleva la información genética desde el ADN hasta los ribosomas, donde se traduce en proteínas.

Transcriptasa Inversa: Enzima que cataliza la transcripción de ARN a ADNc.

Intrones: Secuencias no codificantes de un gen que se eliminan durante el procesamiento del ARN.

Exones: Secuencias codificantes de un gen que se unen durante el procesamiento del ARN.

Biblioteca de ADNc: Colección de secuencias de ADNc clonadas en vectores de expresión.

Clonación de Genes: Proceso de producir copias idénticas de un fragmento de ADN.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica para amplificar secuencias específicas de ADN.

Vector de Expresión: Plásmido o virus modificado que se utiliza para introducir y expresar ADNc en células huésped.

Secuenciación de ADN: Proceso de determinar el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN.

Hibridación de Ácidos Nucleicos: Proceso en el cual dos cadenas de ácidos nucleicos complementarios se aparean para formar una molécula de doble cadena.

Northern Blot: Técnica para detectar ARN específico en una muestra utilizando una sonda de ADN o ARN complementaria.

Microarreglos de ADN: Técnica que utiliza una matriz de sondas de ADN para medir la expresión de muchos genes simultáneamente.

Traducción: Proceso por el cual la secuencia de un ARNm se convierte en una secuencia de aminoácidos en una proteína.

Promotor: Región del ADN que inicia la transcripción de un gen.

Enzimas de Restricción: Proteínas que cortan el ADN en secuencias específicas.

Ligasa: Enzima que une fragmentos de ADN.

Electroforesis en Gel: Técnica para separar fragmentos de ADN según su tamaño.

Hibridación In Situ: Técnica para localizar secuencias específicas de ADN o ARN en células o tejidos utilizando sondas marcadas.

Transcripción Inversa: Proceso mediante el cual se sintetiza ADNc a partir de ARN mediante la enzima transcriptasa inversa.

Abreviaturas

ADNc: ADN complementario.

RT: Transcriptasa inversa (Reverse Transcriptase).

mRNA: ARN mensajero.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

qPCR: PCR cuantitativa (Quantitative PCR).

RT-PCR: PCR con transcriptasa inversa (Reverse Transcription PCR).

Oligo(dT): Oligonucleótido de timina.

Ribonucleasa H (RNasa H): Enzima que degrada el ARN en un híbrido ARN-ADN.

ds-cADN: ADN complementario de doble cadena

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

Resumen

Dunaliella (Chlorophyta) fue descrita por primera vez hace más de un siglo, sin embargo, los estudios moleculares sobre este género han ganado impulso solo en las últimas décadas. Estos estudios se centran en la identificación molecular y la producción de biocompuestos. *Dunaliella* prospera en condiciones extremas de alta irradiancia, temperatura y salinidad, y puede acumular carotenoides intracelulares, particularmente β -carotenos, bajo estrés. El gen *psy* cataliza la primera reacción en la biosíntesis de carotenoides, y su expresión indica mecanismos de respuesta al estrés. Esta investigación evalúa protocolos para la extracción de ARN y la síntesis de ADNc en *Dunaliella* estresada, enfatizando el papel del gen *psy*. Se probaron dos protocolos de síntesis de ADNc, sin diferencias significativas en la calidad, con rendimientos del 49.76% y 29.47% y se diseñaron partidores para el gen *psy*, mismos que cumplieron con los parámetros específicos para amplificación *In Silico*: 25 a 30 bases nitrogenadas cada cebador, presencia de C y G al inicio de las sus secuencias, temperatura de fusión (T_m) en rangos óptimos de 50-65°C y contenido de GC entre el 50-53%. Esta investigación se realizó en el Centro de Biotecnología UPSE.

Palabras clave: *Dunaliella*, gen *psy*, ARN, ADNc, carotenoides.

Abstract

Dunaliella (Chlorophyta) was first described over a century ago; however, molecular studies on this genus have gained momentum only in the past few decades. These studies focus on molecular identification and the production of biocompounds. Dunaliella thrives under extreme conditions of high irradiance, temperature, and salinity, and can accumulate intracellular carotenoids, particularly β -carotenes, under stress. The *psy* gene catalyzes the first reaction in carotenoid biosynthesis, and its expression indicates stress response mechanisms. This research evaluates protocols for RNA extraction and cDNA synthesis in stressed Dunaliella, emphasizing the role of the *psy* gene. Two cDNA synthesis protocols were evaluated, showing no significant differences in quality, with yields of 49.76% and 29.47%. and primers were designed for the *psy* gene, which complied with the specific parameters for *In Silico* amplification: 25 to 30 nitrogenous bases per primer, presence of C and G at the beginning of their sequences, melting temperature (T_m) in the optimal range of 50-65°C and GC content between 50-53%. This research was conducted at the UPSE Biotechnology Center.

Keywords: *Dunaliella*, *psy* gene, RNA, cDNA, carotenoids.

1. Introducción

Dunaliella (Chlorophyta), descrita hace más de un siglo, ha sido objeto de estudios moleculares en las últimas décadas, enfocados en su identificación y producción de biocompuestos (Oren, 2005, p. 1). Esta microalga prospera en condiciones extremas de alta irradiancia, temperatura, salinidad y escasez de nitrógeno. En estas condiciones, las células generan y almacenan carotenoides (>15% de peso seco, con 10% de β -carotenos), lo que generalmente las provee de una coloración naranja (Woyda-Ploszczyca & Rybak, 2021, p. 2-3).

El gen *psy* cataliza la primera reacción en la biosíntesis de carotenoides, produciendo pigmentos en respuesta al estrés, que actúan como fotoprotectores y antioxidantes (Zepeda, 2017, p. 6). PCR permite amplificar genes específicos a partir de ARN (ADNc), facilitando el estudio y análisis de expresión génica en células (Gangali et al., 2019, p. 289). Se necesitan modelos moleculares predictivos y protocolos específicos para la correcta síntesis de estas macromoléculas (Murray et al., 2007).

En los últimos 30 años, Dunaliella ha sido objeto de numerosos estudios moleculares, utilizando genes como 18S rDNA (Olmos et al., 2000).. Estos estudios incluyen la regulación de carotenoides bajo estrés lumínico y salino (Coesel et al., 2008) et al., 2008), y análisis de expresión génica bajo diferentes salinidades (Kim et al., 2010).. Aunque, se ha obtenido información valiosa, el conocimiento sobre la

interacción molecular en *Dunaliella* sigue siendo limitado, y la exploración continúa diversificándose (Li et al., 2020; Liang et al., 2023).

En Ecuador, si bien varias técnicas y herramientas moleculares se encuentran funcionando, el estudio de este microorganismo se ha encontrado menos de 3 investigaciones centradas en la biología molecular de este género, pero no enfocadas al estudio del transcriptoma (Coello, 2022; Tomalá, 2021).

La ausencia de protocolos comerciales para la extracción de ARN no considera las estructuras químicas diversas en microalgas, tampoco a organismos fuera de su estado basal. *Dunaliella spp* estresada presenta características morfológicas y de composición química diferentes ante condiciones ambientales adversas (Stirk et al., 2020) que sugieren variaciones en su matriz pericelular, misma que se ha evidenciado puede alcanzar hasta 20 veces el espesor de la membrana plasmática (Woyda-Ploszczyca & Rybak, 2021, p. 2) y alterarse en torno a una mayor edad del cultivo (Leonardi & Caceres, 1994, p. 642), lo que podría dificultar el proceso de disrupción celular en condiciones hipersalinas (Polle, Roth, et al., 2020, p. 3) o de alta irradiancia y disminución de nitrógeno como ocurre en paredes celulares de microalgas verdes (Solovchenko et al., 2019, p. 6). El ARN no posee la estabilidad que una estructura de ADN puede tener y este presenta información genética que abarca regiones de intrones no necesarios para el estudio de la expresión, sumado a esto distintos tipos de ARN conforman el ARN total, por lo que se dificulta el análisis único del transcriptoma (Pelley, 2012, p. 162) La detección de la expresión del gen *psy* (ADNc) y amplificación por PCR implica un

análisis previo a través del uso de herramientas o modelos bioinformáticos.

Adaptar una metodología para extraer y purificar ARN total de *Dunaliella spp.* estresada requiere métodos específicos de lisis y homogenización celular (Poong et al., 2017). Obtener el transcriptoma utilizando la retro transcriptasa específica para el ARN mensajero de otros tipos de ARN, servirá para estudios de expresión, y la síntesis de ADNc permitirá una mayor estabilidad y manipulación del transcrito. Desarrollar un protocolo de síntesis de ADNc del gen *psy* contribuirá a la investigación molecular de *Dunaliella spp.* en la región y el modelamiento *In Silico* de la amplificación del ADNc del gen *psy* optimizará recursos y tiempo.

El estudio de la expresión génica comenzó con el Northern Blot en 1977 y la hibridación *In Situ* en 1969, pero estas técnicas tenían limitaciones para diferenciar tamaños similares y detectar otros tipos de ARN. Hoy, se usan microarrays, RNAseq, qPCR y RT-PCR. Los microarrays estudian miles de genes a la vez, mientras, qPCR y RT-PCR son más sensibles, por otro lado, RNAseq, aunque costosa, proporciona secuencias completas de ARNm, identificando y cuantificando genes expresados (Zhu et al., 2020).

El objetivo de esta investigación es evaluar la síntesis ADNc de *Dunaliella spp.* estresada mediante la cantidad de enzima Transcriptasa Inversa RT y desarrollar la amplificación *In Silico* por PCR del gen *psy* para predecir el producto amplificado.

2. Problemática

La obtención de ARN de alta calidad es uno de los primeros pasos críticos para la síntesis de ADN complementario, en primera instancia los protocolos comerciales desarrollados para la extracción de ARN se basan en tipos de muestra que no consideran las estructuras específicas de la diversidad química de las microalgas y menos consideran a células que se encuentran expuestas a condiciones diferentes o extremas a su entorno natural. *Dunaliella spp* estresada posee varios cambios en su ultraestructura, se necesita el desarrollo intrínseco de metodologías que no las generalicen como parte de células en cultivo o inclusive como parte de células vegetales que poseen grandes diferencias con las células unicelulares de las microalgas como la ausencia de estructuras flageladas o una cubierta rígida adicional a la membrana o pared celular solo conocida en microalgas, también llamada exoesqueleto.

Dunaliella en su estado basal o de condiciones normales carece de una pared celular rígida de polisacárido, pero presenta membrana plasmática elástica rodeada por una matriz periférica de glicoproteínas, en condiciones de estrés por salinidad, alta irradiancia y disminución de nitrógeno se sugieren variaciones en su matriz pericelular, misma que se ha evidenciado puede alcanzar hasta 20 veces el espesor de la membrana plasmática y alterarse en torno a una mayor edad o fase del cultivo, esta cualidad podría dificultar el proceso de lisis celular por el que deben de pasar las células estresadas para

extraer su material intracelular que se está traduciendo a proteínas, es decir, dificulta extraer su ARNm.

La elaboración de ADN complementario (ADNc) del gen involucrado y posterior amplificación por PCR implica emplear antes del desarrollo *In Vitro* el uso de herramientas o modelos bioinformáticos de predicción que visualicen las posibles reacciones moleculares de la expresión del gen, además,

Los estudios sobre expresión del gen *psy* en *Dunaliella spp* bajo condiciones de estrés necesitan del gen transcrito, sin embargo, el ARN no posee la estabilidad que una estructura de ADN puede tener y el ADN genómico presenta información genética que abarca regiones de intrones no necesarios para el estudio del transcripto, sumado a esto distintos tipos de ARN conforman el ARN total, por lo que se dificulta el análisis único de la expresión.

En Ecuador, el estudio de expresión de genes en *Dunaliella spp* aún es prematuro, específicamente, las investigaciones para el transcripto del gen *psy*, las pocas investigaciones existentes han sido enfocadas al ADN genómico, limitando los conocimientos sobre el estudio de la transcriptómica para la cepa perteneciente a esta región, en el país tan solo se han reflejado en la búsqueda de repositorios menos de tres investigaciones relacionadas a la biología molecular en este género, pero enfocadas al ADN cromosomal del organismo.

3. Justificación

Adaptar una metodología para la extracción y purificación de ARN total junto a la síntesis de ADN complementario enfocado en el gen *psy* en *Dunaliella spp.* estresada es crucial debido a la falta de protocolos comerciales específicos para este género. Mejorar la eficiencia experimental y la reproducibilidad requiere ajustar metodologías de células vegetales a la diversidad química y metabólica únicas de las microalgas, tomando en cuenta estructuras como el exoesqueleto.

Las diferencias en *Dunaliella spp.* bajo estrés (altos niveles de irradiancia, salinidad y baja concentración de nitrógeno) afectan la extracción de ARN debido a modificaciones estructurales y químicas de la matriz pericelular de glicoproteínas. Adaptar el proceso de lisis celular con perlas metálicas, mayor tiempo de homogenización y lapsos de frío puede mejorar significativamente la disrupción celular y la preservación del ARN.

El modelamiento *In Silico* de la amplificación del ADNc en *Dunaliella spp.* estresada permite predecir reacciones moleculares del gen *psy*, optimizando recursos financieros y tiempo en el desarrollo in vitro al reducir el ensayo y error.

El gen *psy*, crucial en la biosíntesis de carotenoides, es un factor limitante en su

producción. Obtener el transcriptoma de *Dunaliella spp.* bajo estrés servirá para estudios de expresión y detección in vitro del gen *psy*. La síntesis de ADNc a partir de ARN permitirá un almacenamiento estable y manipulación, evitando la desnaturalización y aislando ARN mensajero de otros tipos de ARN.

Abordar la extracción de ARN en *Dunaliella spp.* estresada para estudios de amplificación y expresión del gen *psy* es fundamental para avanzar en el conocimiento molecular. Desarrollar un protocolo de síntesis de ADNc del gen fitoeno sintasa (*psy*) bajo condiciones de estrés contribuirá a la investigación molecular en este género, especialmente para cepas pertenecientes a Ecuador.

4. Objetivos

General

Evaluar la concentración del ADNc extraído de *Dunaliella spp.* estresada y su amplificación *In Silico* del gen fitoeno sintasa *psy* como evidencia de la expresión génica.

Específicos

Estandarizar un protocolo de obtención de ADNc en *Dunaliella spp.* estresada mediante la eficacia de la transcriptasa inversa RT.

Diseñar partidores para el gen *psy* de *Dunaliella spp.* que cumplan con los parámetros específicos de amplificación.

Demostrar la expresión del gen *psy* en *Dunaliella* estresada mediante amplificación *In Silico* por PCR.

5. Hipótesis

Nula H0

La alta concentración del ADNc extraído desde *Dunaliella spp* estresada no depende de la cantidad de enzima transcriptasa inversa RT empleada en la síntesis de este ácido nucleico.

6. Marco Teórico

6.1. Transcripción y Traducción de la Información Genética

6.1.1. Procesos de Transcripción y Traducción

La transcripción es el primer paso en la expresión génica, donde una secuencia de ADN se copia en una molécula de ARN mensajero (ARNm) por la enzima ARN polimerasa. Este proceso inicia cuando la ARN polimerasa se une a una secuencia promotora en el ADN, desenrollando la doble hélice y sintetizando el ARNm complementario a la hebra de ADN molde. La transcripción termina cuando la ARN polimerasa alcanza una secuencia de terminación, desencadenando la liberación del ARNm recién sintetizado. En células eucariotas, el ARNm primario transcrito se somete a modificaciones postranscripcionales, que incluyen la adición de una caperuza en el extremo 5', Poliadenilación en el extremo 3' y empalme de intrones para generar un ARNm maduro que puede ser traducido. Una vez sintetizado y procesado, el ARNm se transporta desde el núcleo al citoplasma en células eucariotas. Aquí, el ribosoma, compuesto de ARN ribosómico (ARNr) y proteínas ribosómicas, se ensambla sobre el ARNm para iniciar la traducción. (Raj, 2023)

La traducción comienza con el reconocimiento del codón de inicio (AUG) en el ARNm por el ARNt de metionina, estableciendo el marco de lectura. El ribosoma se desplaza a lo largo del ARNm, leyendo la secuencia de nucleótidos en grupos de tres (codones). Cada codón especifica un aminoácido particular, que es transportado al

ribosoma por el ARNt correspondiente. Los aminoácidos se unen mediante enlaces peptídicos, formando una cadena polipeptídica que se pliega en una estructura tridimensional funcional. La elongación de la cadena polipeptídica continúa hasta que el ribosoma alcanza un codón de terminación (UAA, UAG, UGA), lo que señala el final de la traducción. El ribosoma, la cadena polipeptídica recién sintetizada y el ARNm se disocian. La cadena polipeptídica puede sufrir modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, glucosilación y la formación de enlaces disulfuro, que son cruciales para la función y estabilidad de la proteína. Estos procesos de transcripción y traducción son fundamentales para la expresión de los genes y la producción de proteínas esenciales para las funciones celulares (Gerald Karp & Patsy Jenny, 2015).

6.1.2. Técnicas Utilizadas para extraer ARN de las Células

El método de Trizol es una técnica comúnmente utilizada para extraer ARN total de células y tejidos. Este método combina fenol y guanidina tiocianato para lisar células y desnaturalizar proteínas, permitiendo la separación de ARN, ADN y proteínas en fases diferentes. La adición de cloroformo facilita la separación de las fases acuosas y orgánicas, donde el ARN se encuentra en la fase acuosa superior. Posteriormente, el ARN se precipita con isopropanol, se lava con etanol para eliminar contaminantes y se

suspende en agua libre de ribonucleasas (ARNasas) para su almacenamiento o análisis (TFS, 2023)

Las columnas de sílice, como las empleadas en kits comerciales, son otra técnica eficiente para la extracción de ARN. Este método se basa en la adsorción selectiva de ARN a la sílice en presencia de condiciones de salinidad y alcohol. Las células lisadas se mezclan con un tampón de unión que contiene etanol y sales de alta concentración para facilitar la unión del ARN a la sílice. Después de lavados para eliminar contaminantes, el ARN se eluye con agua libre de ARNasas o con un tampón específico, proporcionando ARN de alta pureza listo para su uso en análisis moleculares (Santana et al., 2015)

El método de precipitación con cloruro de litio es preferido para ARN de alta calidad, especialmente para ARN mensajero (ARNm). En este proceso, el ARN se precipita selectivamente en presencia de altas concentraciones de cloruro de litio y etanol, mientras que el ADN y las proteínas permanecen en solución. Después de la precipitación, el ARN se recoge por centrifugación, se lava con etanol para eliminar contaminantes y se suspende en agua libre de ARNasas para su almacenamiento o análisis posterior (Santana et al., 2015).

6.1.3. Evaluación de Calidad de ARN

La calidad del ARN extraído se evalúa mediante varias técnicas para asegurar su idoneidad para aplicaciones posteriores. La electroforesis en gel de agarosa permite visualizar el ARN, indicando una alta integridad del ARN. Este método es especialmente útil para detectar la degradación del ARN, que se manifiesta como un ensanchamiento de las bandas o la aparición de un smear en el gel. La espectrofotometría mide la absorbancia del ARN a 260 nm, donde una relación A260/A280 cercana a 2.0 indica una buena pureza del ARN, con baja contaminación por proteínas y fenoles. La relación A260/A230 también se utiliza para evaluar la presencia de contaminantes como sales y compuestos orgánicos, donde valores superiores a 2.0 son deseables. Estas mediciones espectrofotométricas proporcionan una evaluación rápida y cuantitativa de la pureza del ARN, aunque no pueden detectar todos los tipos de contaminantes ni la fragmentación del ARN (Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN, 2020).

Además de estos métodos, sistemas de análisis de calidad del ARN, como el Bioanalyzer de Agilent, proporcionan un índice de integridad del ARN (RIN) que cuantifica la degradación del ARN en una escala de 1 a 10, siendo 10 el valor óptimo. El RIN se basa en la proporción de ARNr 28S y 18S y en la evaluación del perfil de electroforesis capilar del ARN. Estos sistemas ofrecen una evaluación más detallada y precisa de la calidad del ARN, lo que es crucial para experimentos sensibles como la

síntesis de ADNc y la secuenciación de ARN (RNA-Seq) (Genome Center Maastricht, 2018).

6.2. Síntesis de ADN Complementario (ADNc)

6.2.1. Factores que afectan la síntesis de ADN Complementario

La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero es una técnica fundamental en biología molecular. Sin embargo, presenta varios desafíos, como la calidad y pureza del ARN inicial, que puede afectar la eficiencia de la transcripción inversa. La presencia de inhibidores de la enzima transcriptasa inversa y la degradación del ARN son problemas comunes. Además, la elección de primers adecuados, como oligodT o random hexamers, es crucial para obtener una representación completa del ARNm. La estructura secundaria del ARN también puede interferir con la síntesis de ADNc, y el uso de condiciones de reacción optimizadas es esencial para minimizar estos efectos (Tomaszewski, 2022)

El uso de inhibidores de la ARNasas durante la extracción y manipulación del ARN es crítico para prevenir la degradación. Además, la selección de la transcriptasa inversa adecuada, como la SuperScript III o la M-MLV RT, puede mejorar la eficiencia y fidelidad de la síntesis de ADNc. La optimización de la temperatura de reacción y los tiempos de incubación también son factores importantes que pueden influir en la síntesis de ADNc. Por ejemplo, temperaturas más altas pueden ayudar a desenrollar

estructuras secundarias del ARN, interfiriendo con la transcriptasa inversa (Hastings, 2013). Además, de estos factores, la concentración de ARN y la proporción de enzimas en la mezcla de reacción pueden afectar significativamente el rendimiento de la síntesis de ADNc. Un equilibrio adecuado de estos componentes es crucial para maximizar la producción de ADNc y minimizar la formación de productos no deseados.

6.2.2. Análisis bioinformático Secuencia ADNc: BLAST, alineamiento de secuencias

El análisis bioinformático de secuencias de ADNc es crucial para la identificación y caracterización de genes. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta fundamental que permite comparar una secuencia de diversos tipos incluyendo ADNc con bases de datos de secuencias para identificar homologías y posibles funciones. Mediante BLAST, es posible encontrar genes similares en diferentes organismos, lo que proporciona información sobre la conservación y evolución de las secuencias. BLAST también permite la identificación de dominios funcionales y regiones conservadas que pueden ser esenciales para la función de la proteína (Wheeler & Bhagwat, 2007)

El alineamiento de secuencias, utilizando programas como Clustal Omega o MUSCLE, permite comparar múltiples secuencias para identificar regiones conservadas y divergentes. Estos alineamientos son esenciales para estudios filogenéticos, donde las relaciones evolutivas entre diferentes especies o genes pueden ser inferidas. Además, del alineamiento de secuencias se derivan datos sobre la conservación de aminoácidos y la estructura secundaria de las proteínas, lo que proporciona insights sobre su función biológica. Estas herramientas bioinformáticas son fundamentales para interpretar datos experimentales y para el diseño racional de experimentos futuros. (Wheeler & Bhagwat, 2007).

El análisis bioinformático de secuencias de ADNc también incluye la predicción de estructuras secundarias y sitios de unión para ligandos o proteínas asociadas. Herramientas como RNAfold o Mfold permiten prever la formación de horquillas, tallos y bucles en la molécula de ARN, lo cual es crucial para entender su estabilidad y función. Además, la identificación de sitios de unión para proteínas regulatorias o para pequeñas moléculas ayuda a comprender los mecanismos de regulación génica y los posibles puntos de intervención terapéutica (Unneberg & Tekniska, 2004).

El uso de estas herramientas bioinformáticas permite una caracterización detallada de las secuencias de ADNc y ARNm, desde su identificación inicial hasta la predicción de su estructura y función. Esta capacidad de análisis computacional es fundamental en la biología molecular moderna, donde la generación y el análisis de

grandes volúmenes de datos genómicos y transcriptómicas requieren herramientas avanzadas para extraer datos significativos y predictivos (Unneberg & Tekniska, 2004).

6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

6.3.1. Principios de la PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica fundamental en biología molecular que amplifica secuencias específicas de ADN. La PCR utiliza una enzima termoestable, como la Taq polimerasa, para amplificar selectivamente regiones de interés en el ADN mediante ciclos de desnaturalización, apareamiento de cebadores y extensión de ADN. En la desnaturalización, el ADN se calienta a alta temperatura para separar las hebras complementarias. Luego, los cebadores específicos de la secuencia objetivo se unen a las hebras de ADN a temperaturas más bajas durante la etapa de apareamiento. La Taq polimerasa utiliza nucleótidos libres para extender los cebadores y sintetizar nuevas cadenas de ADN (Valones et al., 2009).

Los ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión se repiten de 20 a 40 veces en un termociclador, generando millones de copias de la secuencia objetivo. La especificidad de la PCR depende de la exactitud con que los cebadores se aparean con la secuencia de ADN complementario, lo que permite la amplificación selectiva incluso en presencia de ADN no deseado. La eficiencia de la PCR está influenciada por factores como la temperatura de desnaturalización, la longitud y secuencia de los cebadores, la

concentración de reactivos y el tiempo de extensión, que deben optimizarse para cada aplicación específica (Thermo Fisher Scientific, 2024)

6.3.2. Proceso de Amplificación de un Gen de Interés Utilizando ADNc

Para amplificar un gen específico utilizando ADNc, los cebadores se diseñan en regiones conservadas del ARNm que flanquean la secuencia de interés. Estos cebadores pueden ser diseñados *In Silico* utilizando herramientas como Primer3, considerando parámetros como temperatura de fusión (T_m), contenido de GC y estructuras secundarias. Una vez diseñados, los cebadores se sintetizan y se utilizan en la PCR junto con el ADNc como molde, la Taq polimerasa y nucleótidos. El proceso comienza con la desnaturalización del ADNc a alta temperatura, separando las hebras complementarias y liberando el ARNm molde. A continuación, los cebadores se unen específicamente a las secuencias de ARNm complementario en la etapa de apareamiento. Durante la extensión, la Taq polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN complementario a partir del ARNm, generando copias del gen de interés. Los ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión se repiten, amplificando exponencialmente la cantidad de ADNc específico (Tung et al., 1989).

Este procedimiento permite generar y amplificar bibliotecas de ADNc y secuenciar genes y ARN de una sola célula sin necesidad de clonación. La RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa) es una técnica que

permite amplificar y detectar secuencias de ARN. En primer lugar, el ARN se extrae de la muestra y se convierte en ADN complementario (ADNc) utilizando la enzima transcriptasa reversa. Luego, este ADNc se amplifica mediante la PCR tradicional, que utiliza ciclos de calentamiento y enfriamiento para replicar el ADN. La RT-PCR es ampliamente utilizada en investigación y diagnóstico molecular porque permite cuantificar la expresión génica y detectar virus de ARN, entre otras aplicaciones (Instituto Nacional de Cáncer NCI, 2011).

6.4. Modelamientos *In Silico* para estudios biológicos moleculares

6.4.1. Diseño *In Silico* de Cebadores

El diseño *In Silico* de cebadores es una técnica en biología molecular para la amplificación específica de secuencias de ADN. Utilizando herramientas como Primer3, los diseños de cebadores deben estar relacionados a la región de interés en el ADN con parámetros óptimos de 25 a 30 bases nitrogenadas cada cebador. la presencia de C y G al inicio de las secuencias con sentido 5', temperatura de fusión (T_m) en rangos 50-65°C, el contenido de GC entre el 50-53% y ausencia de la posible presencia de estructuras secundarias (Harping, Complementarity y self-annealing). Este proceso es fundamental para la PCR y otras aplicaciones de amplificación de ADN, donde la especificidad y eficiencia de los cebadores son críticas para evitar la amplificación no específica y mejorar la sensibilidad del ensayo (Sambrook & David W, 2012).

La especificidad en el diseño *In Silico* de cebadores también puede considerar la introducción de mutaciones específicas, etiquetas para marcado, o la inclusión de sitios de restricción para facilitar procesos posteriores de clonación o manipulación genética. Herramientas avanzadas de diseño de cebadores pueden predecir la formación de estructuras secundarias como horquillas y dímeros de cebadores, que podrían interferir con la amplificación. El desarrollo *In Silico* requiere una secuencia de ADN molde que puede tomarse de cualquiera de las bases de datos de secuencias disponibles, por ejemplo, la base de datos RefSeq. La validación *In Silico* puede realizarse mediante la herramienta BLAST y el software Gene Runner, que comprueban su eficacia y especificidad (Kumar & Chordia, 2015).

6.4.2. Amplificación *In Silico* del Gen Fitoeno Sintasa (*psy*) de *Dunaliella spp.*

Investigaciones previas en *Dunaliella bardawil* han mostrado que la fitoeno sintasa (*psy*) es el primer punto de regulación en la carotenogénesis, existen interacciones entre los factores de estrés ambiental y las secuencias regulatorias de *psy* en *D. bardawil* (*Dbpsy*). Las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas y la estructura de la proteína correspondiente de *Dbpsy* fueron analizadas y predichas utilizando diversas herramientas bioinformáticas. Presentaron algunas pistas sobre los mecanismos de regulación de *Dbpsy* a nivel molecular según los resultados computacionales (Lao et al., 2011).

En estudios similares, se emplearon herramientas bioinformáticas para modelar virtualmente el gen *psy* de microalgas del género *Dunaliella*, conocidas por su capacidad en la producción de carotenoides. Se realizaron alineamientos de secuencias, amplificaciones simuladas del gen *psy* con cebadores específicos y universales, y se diseñaron patrones de restricción *In Silico*. Se identificaron mutaciones en las secuencias y se generaron cebadores que amplificaron fragmentos de diferentes tamaños. También se simuló la clonación del gen *psy* en el vector pCR2.1-TOPO, obteniendo el vector TOPO-PSY DUNALIELLA. Estos resultados subrayan cómo las herramientas bioinformáticas pueden facilitar la investigación molecular y el diseño de experimentos en biotecnología de microalgas (Coello, 2022)

El análisis computacional mostró varios posibles motivos en el promotor que pueden ser inducidos por UV-B y sal, además de elementos comunes como las cajas TATA, CCAAT y GATA. También se predijo y comparó la estructura de la proteína *psy*, encontrando que el extremo N-terminal en *D. bardawil* tiene baja homología, mientras que el extremo C-terminal conservado está relacionado con la actividad catalítica y el reconocimiento del sustrato. El análisis filogenético situó a *Dbpsy* en un grupo con otras algas. Estos hallazgos sugieren que el *gen psy* podría tener mecanismos de regulación similares entre algas en sus C-terminales, mientras que las diferencias en los N-terminales y los motivos inducibles en el promotor podrían explicar la variabilidad en la regulación entre *D. bardawil* y otras algas (Lao et al., 2011, p. 1)

6.4.3. Electroforesis *In Silico*

La electroforesis *In Silico* simula la separación de fragmentos de ADN en un gel de agarosa virtual. Utilizando software como GelAnalyzer o SnapGene, se pueden previsualizar el patrón de bandas esperado basado en las características físicas y químicas de los fragmentos de ADN. Esta simulación permite ajustar la concentración de agarosa, voltaje de corrida y tiempos de electroforesis para obtener una resolución óptima de los fragmentos amplificados. La visualización de bandas, la electroforesis *In Silico* puede ayudar en el diseño de estrategias de clonación y confirmación de productos de PCR. Simulando la digestión enzimática de los fragmentos de ADN, anticipa los fragmentos resultantes y optimiza la selección de vectores de clonación. Las herramientas virtuales son especialmente útiles para planificar experimentos de manera eficiente, minimizando el tiempo y los recursos necesarios para la evaluación experimental en el laboratorio (Docmatics, 2022).

6.5. Dunaliella una microalga caroteno-génica

6.5.1. Características Generales

Dunaliella es un género de microalgas unicelulares, generalmente esféricas o elipsoidales, con tamaños que varían entre 5 y 25 μm de longitud y 3 a 13 μm de ancho conocida por su capacidad para acumular grandes cantidades de carotenoides, especialmente β -caroteno, bajo condiciones de estrés ambiental, como alta salinidad e intensa irradiación. Esta adaptación se debe a sus adaptaciones flexibles y la capacidad

de regulaciones metabólicas, permitiéndole sobrevivir y prosperar en entornos extremadamente salinos. *Dunaliella* carece de pared celular rígida, lo que facilita la adaptación a variaciones de presión osmótica. (Barbosa et al., 2023).

Estas microalgas se encuentran comúnmente en ambientes marinos y en salinas, donde pueden formar floraciones densas que tiñen el agua de tonalidades rojo-anaranjadas debido a la alta concentración de β -caroteno. Este pigmento no solo actúa como protector antioxidante contra el estrés oxidativo y la radiación UV, sino que también tiene aplicaciones comerciales significativas en industrias alimentarias, cosméticas y farmacéuticas, las microalgas verdes del género *Dunaliella* son importantes en biotecnología e industria debido a su adaptabilidad a la salinidad alta, rápido crecimiento y capacidad para producir β -caroteno, lípidos, glicerol, vitaminas y proteínas. *Dunaliella salina* destaca por acumular hasta un 25% de su peso en lípidos y ser una fuente eficiente de β -caroteno (Preetha et al., 2012).

González & Gómez, 2009 describe: “El género *Dunaliella* comprendido en 28 especies reconocidas separadas en 2 subgéneros (*Pascheria* y *Dunaliella*) dividiéndose el subgénero *Dunaliella* en 4 secciones: *Tertiolectae*, *Dunaliella*, *Virids* y *Peirceinae*. Todas las especies pertenecientes al subgénero *Pascheria* se encontraron en agua dulce y existen algunos argumentos citológicos y moleculares que sugieren que sus taxones no pertenecen en absoluto al género *Dunaliella*”.

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Dunaliellaceae

Género: Dunaliella

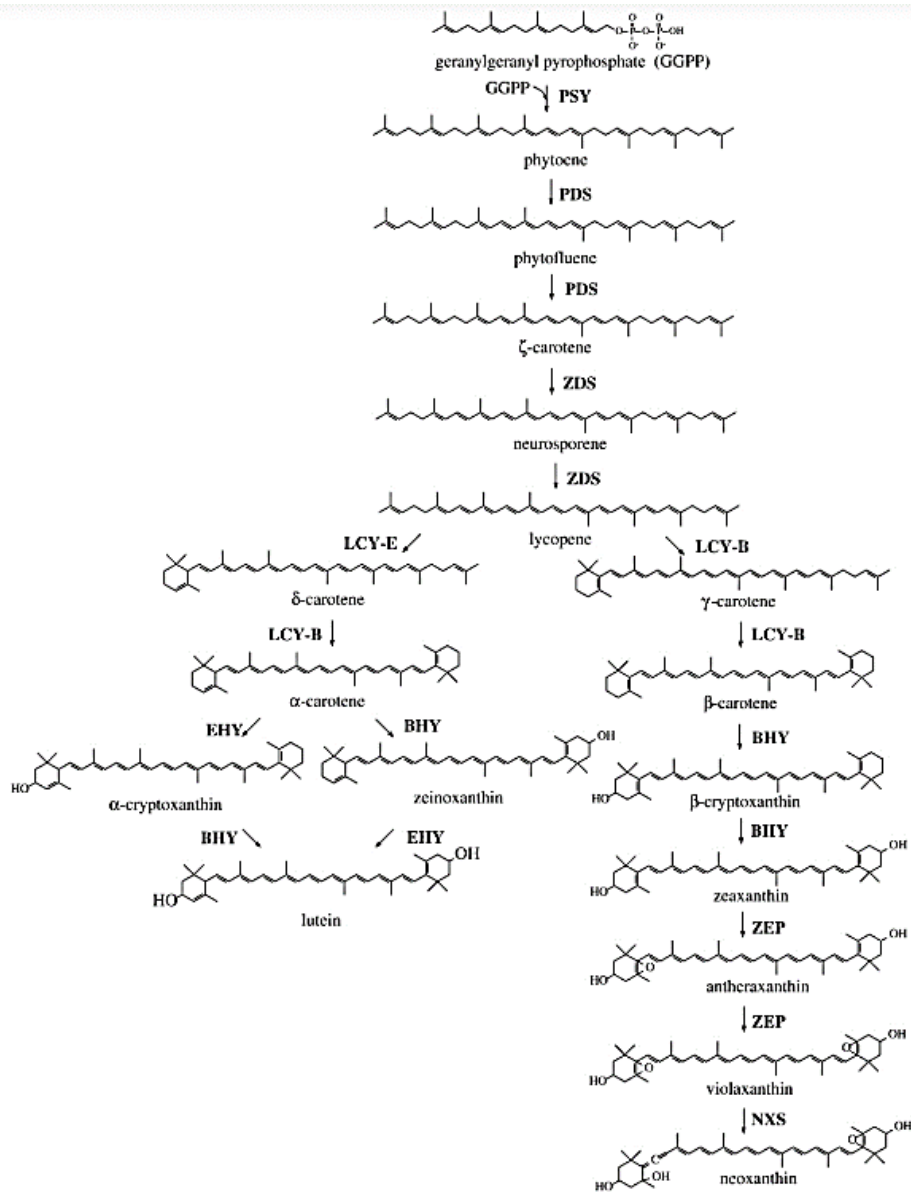
6.5.2. Biosíntesis de los carotenoides en *Dunaliella* spp.

La biosíntesis de carotenoides en *Dunaliella* se debe a la ruta metabólica de carotenoides (figura) , esta comienza con la síntesis de isoprenoides a través de la vía del mevalonato en el citosol. Estos isoprenoides son los precursores esenciales para la biosíntesis de carotenoides. La enzima fitoeno sintasa (*psy*) cataliza la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato para formar fitoeno, el cual es el primer carotenoide en la ruta. Posteriormente, el fitoeno puede convertirse en otros carotenoides como fitoferrol y licopeno mediante la acción de enzimas como fitoeno desaturasa y licopeno ciclasa, la conversión de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) en fitoeno mediante la acción de la enzima fitoeno sintasa (*psy*), es el paso limitante en la ruta biosintética de carotenoides, que luego continúa con la desaturación y ciclización

para formar β -caroteno y otros carotenoides. Estos compuestos desempeñan roles fundamentales en la protección antioxidante de la célula contra especies reactivas de oxígeno y en la captación de energía luminosa durante la fotosíntesis. (Ye et al., 2008).

La biosíntesis de carotenoides en *Dunaliella* está regulada por factores ambientales como la intensidad lumínica, salinidad y disponibilidad de nutrientes. Bajo condiciones de estrés, como alta salinidad y radiación solar intensa, la expresión de genes clave como *psy* se incrementa, facilitando la acumulación de carotenoides como mecanismo de defensa. Esta capacidad adaptativa ha despertado interés en aplicaciones biotecnológicas para la producción sostenible de pigmentos naturales y compuestos de alto valor agregado (Sandmann, 2001).

Figura 1. Ruta hipotética de la carotenogénesis en *Dunaliella*. Las enzimas para las conversiones relativas aparecen en negrita. *psy*: fitoeno sintasa; *pds*: fitoeno desaturasa; *zds*: ζ-caroteno desaturasa; *lyc-e*: licopeno ε-ciclasa; *lyc-b*: licopeno β-ciclasa; *eyh*: ε-caroteno hidroxilasa; *byh*: β-caroteno hidroxilasa; *zep*: zeaxantina epoxidasa; *nxs*: neoxantina sintasa (Sandmann, 2001).



6.5.3. Estudios de expresión génica de *psy* en *Dunaliella spp.*

Los estudios de expresión del gen *psy* en *Dunaliella*, han abordado mecanismos para comprender las interacciones y regulaciones moleculares en la biosíntesis de carotenoides bajo diferentes condiciones ambientales. Utilizando técnicas como PCR cuantitativa (qPCR), RT-PCR. Extracción de ácidos nucleicos y estudios de acumulación de carotenoides y de niveles de expresión génica. Estos estudios han demostrado que la expresión de *psy* está fuertemente correlacionada con la acumulación de β -caroteno, proporcionando insights sobre la regulación genética de la síntesis de carotenoides en microalgas (Ye et al., 2008)

Metodologías como qPCR, técnicas como la hibridación in situ y el análisis de proteínas mediante Western blot permiten estudiar la localización subcelular y la abundancia de la enzima *psy* en diferentes condiciones de cultivo. Estos enfoques complementarios proporcionan una visión integral de cómo *Dunaliella* adapta su metabolismo para optimizar la producción de carotenoides bajo estrés ambiental. La manipulación genética de genes como *psy* abre nuevas oportunidades para mejorar la producción de β -caroteno y otros metabolitos de interés biotecnológico (Martins-Gomes & Silva, 2018)

En el estudio de Zamani & Moradshahi, 2016 por ejemplo, utilizando PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), se investigó el efecto de nanopartículas de PbS en microalgas, de *Dunaliella salina*. Las nanopartículas de PbS, tanto sin recubrimiento como recubiertas con goma arábiga (GA), fueron evaluadas bajo diferentes

intensidades de luz. Se observó que una intensidad lumínica más alta incrementó significativamente la transcripción del *gen pds* después de 12 horas, pero estos niveles regresaron al control después de 48 horas. Por otro lado, las nanopartículas de PbS sin recubrimiento mostraron un efecto más inhibitorio en los niveles de ARNm de Pds en comparación con las recubiertas con GA. indican que existe un potencial para la manipulación genética de Pds con el fin de mejorar la producción de carotenoides en *Dunaliella salina* bajo condiciones controladas.

7. Metodología: Fase de laboratorio

7.1. Obtención de la muestra

El organismo utilizado en este estudio es la microalga *Dunaliella spp* estresada, aislada desde la Península de Santa Elena registrada con el código PM018, perteneciente al proyecto CUP: 91870000.0000.384095, que tiene el permiso del ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

7.2. Pretratamiento de la muestra

Se realizó un tratamiento previo al aislamiento de ARN total de *Dunaliella spp*, para ello se colocó 50 mg de biomasa seca en un tubo eppendorf de 1,5 ml y se homogenizó con 500 µl de PBS (Phosphate-Buffered-Saline) para el lavado celular (Lichtenauer et al., 2009), posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos, por último, se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet.

7.3. Elaboración del Buffer TE

Se prepararon 100 ml de tampón TE, para ello se añadió a un recipiente estéril, 1ml de 1M Tris pH 8, 200µl -0,5M EDTA pH8 y 99ml agua ultrapura.

7.4. Extracción de ARN total

La obtención del ARN total de *Dunaliella spp*, se realizó a partir de tres protocolos desarrollados en base a la técnica de extracción por columnas de sílice (Genome Center Maastricht, 2018), enfocados principalmente a la disrupción celular y homogenizado.

7.4.1. Preparación de tampones y reactivos protocolo I

Por cada 1ml de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina se le añadió 10 μ L de β -mercaptoetanol (b-ME).

Incubar a 50 °C el agua libre de ARNasas (100 μ L por muestra).

Se añadió al tampón de lavado II (Tris, sales, DEPC) 100 ml de etanol al 99, 5 % (Jue et al., 2020).

7.4.2. Protocolo I, columnas de sílice complementado con disrupción mecánica

El protocolo se llevó a cabo en frío (≤ 10 °C) para una mayor acción de los tampones y preservación de los componentes intracelulares de la muestra (Burden, 2008). La disrupción celular y homogenización se realizó en cada tubo eppendorf de 1, 5 ml con pellet de 50 mg de biomasa seca de *Dunaliella* estresada, previamente lavada con PBS para eliminar componentes no celulares (Wangen et al., 2018), se agregó 700 μ L de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina y 10 μ L de β -mercaptoetanol (b-ME),

se agregaron perlas metálicas para complementar la disrupción celular de forma mecánica (Nunes et al., 2024). Se procedió a homogenizar en vórtex a velocidad de 320 rpm durante 10 minutos, luego se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos y se vertió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml para ser mezclado con etanol 70% previamente en congelación (≤ 10 °C) y homogenizó durante 1 minuto (27), se transfirió un máximo de 700 μ L de sobrenadante a tubos de cartucho con columna de sílice y tubo de recolección. Se homogenizó 1 minuto en vórtex a 320 rpm y se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante restante se continuó procesando a iguales magnitudes, se desechó flujo y agregó 700 μ L de tampón de lavado I para centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos, posterior se desechó flujo y añadió 500 μ L de tampón de lavado II a 8000 rpm 3 minutos. Nuevamente, se eliminó el flujo del tubo de recolección y se secó la columna centrifugando a 8000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se agregó en el centro del tubo de centrifugado 100 μ L de agua libre de ARNasas incubada con anterioridad a 50 °C para la elución del ARN de la columna de sílice, se repite este pasó 3 veces tomando el volumen del flujo (TFS, 2012).

7.4.3. Preparación de tampones y reactivos protocolo II

Por cada 1ml de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina se le añadió 10 μ L de β -mercaptoetanol (b-ME).

Incubar a 50 °C el agua libre de ARNasas (100 μ L por muestra).

Se añadió al tampón de lavado II (Tris, sales, DEPC) 100 ml de etanol al 99, 5 % (Jue et al., 2020).

7.4.4. Protocolo II, columnas de sílice

El protocolo se llevó a cabo en frío (≤ 10 °C) para una mayor acción de los tampones y preservación de los componentes intracelulares de la muestra (Burden, 2008). La disrupción celular y homogenización se realizó en cada tubo eppendorf de 1, 5 ml con pellet de 50 mg de biomasa seca de *Dunaliella* estresada, previamente lavada con PBS para eliminar componentes no celulares (Wangen et al., 2018), se agregó 700 μ L de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina y 10 μ L de β -mercaptoetanol (b-ME) (22), se agregaron perlas metálicas para complementar la disrupción celular de forma mecánica (25). Se procedió a homogenizar en vórtex a velocidad de 320 rpm durante 10 minutos, luego se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos y se vertió el sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 ml para ser mezclado con etanol 70% previamente en congelación (≤ 10 °C) y homogenizó durante 1 minuto (27), se transfirió un máximo de 700 μ L de sobrenadante a tubos de cartucho con columna de sílice y tubo de recolección. Se homogenizó 1 minuto en vórtex a 320 rpm y se

centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante restante se continuó procesando a iguales magnitudes, se desechó flujo y agregó 700 μL de tampón de lavado I para centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos, posterior se desechó flujo y añadió 500 μL de tampón de lavado II a 8000 rpm 3 minutos. Nuevamente, se eliminó el flujo del tubo de recolección y se secó la columna centrifugando a 8000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se agregó en el centro del tubo de centrifugado 100 μL de agua libre de ARNasas incubada con anterioridad a 50 °C para la elución del ARN de la columna de sílice, se repite este pasó 3 veces tomando el volumen del flujo (TFS, 2012).

7.4.5. Preparación de tampones y reactivos protocolo III

Por cada 1ml de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina se le añadió 20 μL de β -mercaptoetanol (b-ME)

Incubar a 50 °C 100 μL de agua libre de ARNasas por cada reacción durante la extracción de ARN total (23)

Se añadió al tampón de lavado II contenido en 150 ml (Tris, sales, DEPC) 150 ml de etanol al 99, 5 % (TFS, 2006).

Se añadió 600 μL de proteinasa K (10 μL de la proteinasa K diluida en 590 μL de tampón TE) (IST, 2022).

7.4.6. Protocolo III. Columnas de sílice complementado Proteinasa K

El protocolo se llevó a cabo en frío ($\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) para una mayor acción de los tampones y preservación de los componentes intracelulares de la muestra (Burden, 2008). La disrupción celular y homogenización se realizó en cada tubo eppendorf de 1,5 ml con pellet de 50 mg de biomasa seca de *Dunaliella* estresada, previamente lavada con PBS para eliminar componentes no celulares (24), se agregó 300 μL de tampón de lisis Tiocianato de Guanidina y 20 μL de β -mercaptoetanol (b-ME) (TFS, 2006), se añadió 600 μL de proteinasa K diluida en tampón TE y se homogenizó en vórtex durante 1 minuto a velocidad de 320 rpm, se procedió a incubar a temperatura de 15-25°C 10 min, pasado aquello se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se vertió el sobrenadante un tubo eppendorf de 1,5 ml para ser mezclado con etanol al 99.5% previamente en congelación ($\leq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$), se homogenizó durante 1 minuto en vórtex a 320 rpm, y luego se transfirió un máximo de 700 μL de sobrenadante a tubos de cartucho con columna de sílice y tubo de recolección, se homogenizó en torno a 1 minuto en vórtex a 320 rpm y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante restante se continuó procesando a iguales magnitudes, se desechó flujo y agregó 700 μL de tampón de lavado I para centrifugar a 12000 rpm durante 1 minutos, posterior se desechó flujo y añadió 600 μL de tampón de lavado II a 12000 rpm en torno 1 minuto en centrifuga. Nuevamente, se eliminó el flujo del tubo de recolección, se añadieron 200 μL más de tampón de lavado II y desecho flujo. Finalmente, se secó la columna centrifugando a 12000 rpm durante 1 minutos. y añadió en el centro del

tubo de centrifugado 100 μ L de agua libre de ARNasas incubada con anterioridad a 50 $^{\circ}$ C para la elución del ARN de la columna de sílice, sin eluciones (Thermo Fisher Scientific, 2006).

7.5. Protocolos basados en concentración de la Transcriptasa Inversa, ADNcI Y ADNcII

En la reacción de transcripción inversa, se consideró en la preparación del Máster Mix la pérdida de reactivos debido el traslado de sustancias, por ello, se decidió preparar tubos eppendorf de 1.5 ml, la cantidad equivalente a 4 reacciones, dado las 12 extracciones de ARN totales de los tres protocolos, se usaron 4 tubos eppendorf con un volumen total de 10 μ L por reacción sin incluir la muestra de ARNtotal de 10 μ L, para las 4 reacciones se llegó a un volumen de 40 μ L que sumaron 8 μ L de Tampón RT, 3.2 μ L de Mezcla de dNTPs (100 mM), 8 μ L de Primers Ramdon, 4 μ L de Inhibidor de ARNasas y para el primer protocolo ADNcI 12.8 μ L de agua libre de nucleasas o agua ultrapura, se homogenizó en vórtex durante 30 segundos a 320 rpm, posterior se agregó 1 μ L de enzima Transcriptasa Inversa (50 U/ μ L), mientras que el segundo protocolo ADNcII utilizó 13.6 μ L de agua libre de nucleasas o agua ultrapura y posterior se homogenizó por 30 segundos a 320 rpm en vórtex. Luego se añadió 3.2 μ L de la enzima RT, después se realizó un ligero pipeteo para mezclar el Máster Mix, finalmente se añadieron 10 μ L de ARN total separadas por muestras en tubos de

microcentrífuga de 200 μ m. Para realizar la síntesis de ADNc se siguieron estos pasos y configuraciones del termociclador. La tapa o Lid a temperatura de 85 °C, 1. 25 °C durante 10 minutos, 2. 37°C por 120 minutos, 3. 85 °C 5 minutos y 4 °C (tiempo de libre elección). Las muestras fueron guardadas, en hielo o a -20°C para conservarla (FST, 2018).

7.6. Cuantificación de ARN y ADNc

La metodología utilizada para la cuantificación de ARN y ADNc se realizó mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000, el Nanodrop fue calibrado utilizando una solución de referencia, agua libre de nucleasas o buffer de elución. Luego, se colocaron 1-2 μ l de muestra de ARN o ADNc en el pedestal del Nanodrop, y se midió el cociente de absorbancia a 260/280 nm como indicador de la pureza del ARN o ADNc, con un valor entre 1.8 y 2.0 considerado como indicativo de una muestra relativamente pura (Lebuhn et al., 2016).

7.7. Análisis estadístico

Se recopilaron y analizaron los datos de los protocolos en base a pruebas de normalidad y Homocedasticidad, mismas que fueron procesadas en el editor de códigos Visual Code utilizando bibliotecas de datos en Python. Los softwares bioinformáticos utilizados para el alineamiento y comparación de secuencias fueron BioEdit,

SnapGene, PrimerBlast y el programa para diseño de cebadores OligoCalculator. Las secuencias escogidas proceden del repositorio disponible en el Banco de Datos Genéticos de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NCBI).

8. Metodología: Fase bioinformática

8.1. Selección de secuencias

La selección de secuencias se realizó a partir del Banco de Genes perteneciente a El Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), se utilizó la base de datos “nucleótidos” en la selección de búsqueda solicitando secuencias con los términos “*Dunaliella psy*”, se consideraron y descargaron en formato FASTA varias secuencias las cuales se discriminaron de acuerdo al tema de estudio, es decir, aquellas nombradas con ARNm o ADNc pertenecientes al gen *psy* del género *Dunaliella*, también que cumplieren prioritariamente con una Cobertura e Identidad $\geq 80\%$ y se mantuviesen en el rango de 1000 a 2000 bases nitrogenadas (pb).

8.2. Alineamiento de secuencias y cadena consenso

Se realizó un primer alineamiento múltiple a partir de una primera secuencia preseleccionada (secuencia consulta) con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) perteneciente a la NCBI y la base de datos de nucleótidos (nt) para analizar Cobertura e identidad, número de bases nitrogenadas y tipo de secuencia

respecto a todas las secuencias de GenBank, bajo el término “*Dunaliella psy*”. Un alineamiento múltiple posterior con las secuencias seleccionadas se realizó en el software para la edición y el análisis de secuencias genéticas y proteína BioEdit utilizando ClustalW, primero se importó las secuencias en formato FASTA, se accedió al menú "Alignment", donde fue elegida la opción "ClustalW Alignment", finalmente se ejecutó el alineamiento haciendo clic en "Run" u "OK". este proceso permitió comparar y analizar las similitudes entre las secuencias seleccionadas, regiones de variación, regiones conservadas y gaps, permitiendo escoger las secuencias específicas para la creación de la cadena consenso y el posterior diseño de cebadores (Wheeler & Bhagwat, 2007).

8.3. Diseño de partidores específicos

La cadena consenso fue analizada para determinar regiones conservadas considerando aquellas con sentido 5'-3' para el cebador "forward" debido a que debe unirse a la hebra de ADN en la dirección hacia adelante, es decir, en el extremo 5' hacia el extremo 3', posterior, el cebador "reverse" se diseña para unirse a la hebra de ADN en la dirección opuesta, es decir, en el extremo 3' hacia el extremo 5', se utilizó la calculadora de oligonucleótidos “Oligo Calc (Olonucleotide Properties Calculator)” y se obtuvo su cadena complementaria inversa, que se lee en la dirección opuesta de 5'-3', también se examinó que ambos cebadores cumplieren con 25 a 30 bases

nitrogenadas cada cebador. la presencia de C y G al inicio de sus secuencias con sentido 5' y se determinaron parámetros importantes del diseño de partidores (31) como la temperatura de fusión (T_m) en rangos 50-65°C , el contenido de GC entre el 50-53%, la posible presencia de estructuras secundarias (Harping, Complementarity y self-annealing) (Sambrook & David W, 2012).

8.4. Amplificación por PCR y electroforesis en gel de agarosa *In Silico*

Los cebadores diseñados se validaron para asegurar su eficacia y especificidad en la amplificación de la región objetivo. Los parámetros de diseño, como el número de pb, la temperatura de fusión y la especificidad, son críticos para asegurar el éxito de la PCR y la obtención de resultados precisos, para ello se utilizó el software de biología molecular SnapGene que permitió principalmente el análisis de secuencias de los cebadores específicos y el ADN objetivo (ADN complementario), la simulación de la PCR y Electroforesis y la visualización de sus estructuras moleculares. (Kumar & Chordia, 2015).

9. Análisis e interpretación de los resultados

Se realizó una prueba de normalidad para determinar si los grupos de datos presentaban una distribución normal o anormal utilizando la prueba estadística de Shapiro-Wilk que concluyó una distribución anormal para los grupos de protocolos de extracción de ARN respecto a la variable pureza A260/A280 y una distribución normal para concentración. La prueba de homocedasticidad Levene para los grupos de análisis inferenciales, respecto a los valores de concentración los protocolos de ARN total, no se rechazó la hipótesis nula (p valor $>$ Alpha), por lo que no hay evidencia de existir diferencia entre las varianzas, por otro lado, la variable pureza A260/A280 rechaza la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas; es decir, las varianzas de pureza no son homogéneas entre los grupos. El grupo protocolo I de ADNc presento una distribución anormal de datos de concentración en comparación con el grupo de protocolo II que presento una distribución de normalidad. Los datos pertenecientes a la diferencia de varianzas de concentración de ADNc no rechazan la hipótesis nula y concluyen que no existe diferencia suficiente entre las varianzas, respecto a la pureza de ambos grupos I y II, se concluyó que no poseen diferencia de varianzas, pero el grupo II posee una distribución anormal, para la comparación de estos dos grupos debido a la anormalidad de los datos, se usara la prueba de Mann-Whitney U alternativa no paramétrica robusta ante violaciones de la normalidad y la homocedasticidad.

9.1. Extracción de ARN total

Se obtuvieron resultados de ARN total en los tres protocolos de extracción evaluados, cada grupo conformado por 4 réplicas, de acuerdo con el análisis descriptivo en el protocolo ARNtotalPLI con perlas (tabla 1), la media de concentración fue de 929.44 ng/ μ l, indicando una alta variabilidad. La pureza A260/A280 fue de 2.07, sugiriendo alta pureza y poca variabilidad en las muestras. El índice de pureza A260/A230 fue de 0.60.

En ARNtotalPLII sin perlas (tabla 2), la media de concentración fue de 737.63 ng/ μ l, mostrando moderada variabilidad. La pureza A260/A280 fue también de 2.07, indicando alta consistencia. El índice de pureza A260/A230 fue de 1.13. En el protocolo ARNtotalGG con proteinasa K (tabla 3), la media de concentración fue de 211.44 ng/ μ l, mostrando moderada variabilidad. La pureza A260/A280 fue de 1.867, indicando consistencia moderada. El índice de pureza A260/A230 fue de 1.30.

Tabla 2. Mediciones de Protocolo I perlas, extracción de ARN total

<i>Estadística</i>	Concentración (ng/μl)	Índice pureza A260/A280
<i>Media</i>	929.44	2.070000
<i>Mediana</i>	1006.80	2.070000
<i>Desviación estándar</i>	280.20	0.014142
<i>Rango</i>	761.45	0.040000

Tabla 1. Mediciones Protocolo II sin perlas, extracción de ARN total

<i>Estadística</i>	Concentración (ng/μl)	Índice pureza A260/A280
<i>Media</i>	737.63	2.070000
<i>Mediana</i>	776.47	2.070000
<i>Desviación estándar</i>	115.81	0.015811
<i>Rango</i>	291.00	0.040000

Tabla 3. Mediciones de Protocolo III, proteinasa k, extracción de ARN total

<i>Estadística</i>	Concentración (ng/μl)	Índice pureza A260/A280
<i>Media</i>	211.44	1.867500
<i>Mediana</i>	226.46	1.865000
<i>Desviación estándar</i>	51.91	0.043229
<i>Rango</i>	124.76	0.100000

9.2. Comparación de tres protocolos de extracción de ARN total basados en columna de sílice

Dado al análisis de normalidad y la homocedasticidad antes mencionada, se optó por realizar la prueba estadística para comparación de variable dependiente concentración Anova de una sola vía y Kruskall Wallis para comparación de variable dependiente Pureza A260/280, también se adicionó por una prueba de Correlación de Spearman para la correlación entre ambas variables dependientes.

Los análisis realizados incluyen un nivel de significancia utilizando pruebas de comparación múltiple de típicos de probabilidad de Error Tipo I, para ambos casos el nivel de significancia de 0.05 indica que hay un 5% de probabilidad de cometer un error tipo I, que es rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es verdadera., en otras palabras, establece que hay un 95% de confianza en que los resultados obtenidos no son debidos al azar.

9.2.1. Anova de una sola vía

El análisis Anova para la variable concentración entre los tres protocolos de extracción de ARN total presentó la hipótesis nula (H0) que establece que no hay diferencias significativas entre las medias de los grupos. La hipótesis alternativa (H1) establece que al menos una de las medias de los grupos es diferente. El análisis de

varianza (ANOVA) se utilizó para examinar si hay diferencias significativas en la concentración de ARN entre los grupos ARNtotalPLI, ARNtotalPLII y ARNtotalGG. Los resultados describen que hay una diferencia significativa entre las medias de los tres grupos, el valor F de 13.145461 resultó mayor que su valor crítico de 4.25, este se obtuvo como la razón entre la variabilidad entre los grupos y la variabilidad dentro de los grupos, este valor alto indica una gran variabilidad entre las medias de los grupos comparada con la variabilidad dentro de los grupos o de cada muestra. El valor p de 0.002136, mucho menor que 0.05, sugiere que las diferencias observadas entre las medias de los grupos son muy improbables que se deban al azar, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula que establece que todas las medias de los grupos son iguales, concluyendo que al menos uno de los grupos de ARN total tiene una media significativamente diferente de los otros grupos (tabla 4).

Tabla 4. Resultados Anova de una sola vía para comparación de la media concentración de los tres protocolos de extracción de ARN total

<i>Fuente de Variación</i>	F	Valor p	H0
<i>Protocolos</i>	13.145461	0.002136	Rechazar

9.2.2. Prueba de comparación múltiple de Tukey (Tukey HSD)

Las pruebas post-hoc de Tukey HSD compara las medias de concentración entre los diferentes grupos (protocolos). Si el valor p es menor que el nivel de significancia (0.05), se rechaza la hipótesis nula y concluye que hay diferencias significativas (HI) entre al menos un par de grupos, en este caso existen diferencias significativas en las concentraciones de ARN entre ARNtotalGG y los otros dos grupos (ARNtotalPLI y ARNtotalPLII), sin embargo, no hay una diferencia significativa entre ARNtotalPLI y ARNtotalPLII, el grupo ARNtotalGG es significativamente diferente de ARNtotalPLI (diferencia de medias de 718.0, $p=0.0020$) y de ARNtotalPLII (diferencia de medias de 526.2, $p=0.0137$). No hay una diferencia significativa entre ARNtotalPLI y ARNtotalPLII (diferencia de medias de -191.8, $p=0.4185$) (tabla 5).

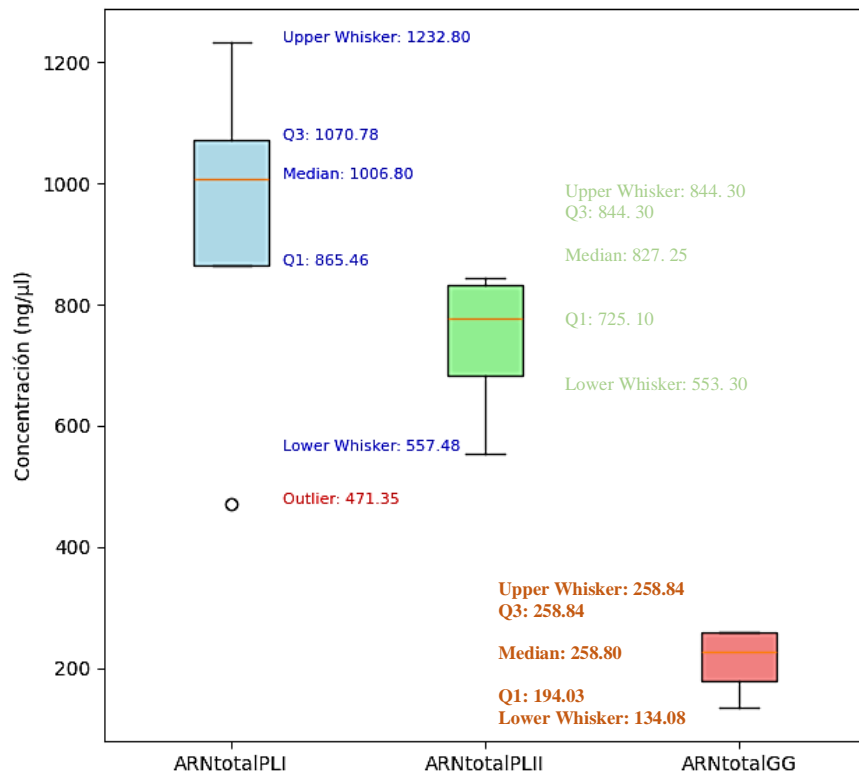
Tabla 5. Resultados de la prueba de comparación múltiple de Tukey (Tukey HSD)

<i>Grupo 1</i>	Grupo 2	Diferencia de Medias	Valor p Ajustado	Límite Inferior	Límite Superior	Rechazo H0
<i>ARNtotalGG</i>	ARNtotalPLI	718.0	0.0020	313.1475	1122.8525	Verdadero
<i>ARNtotalGG</i>	ARNtotalPLII	526.2	0.0137	121.3475	931.0525	Verdadero
<i>ARNtotalPLI</i>	ARNtotalPLII	191.8	0.4185	596.6525	213.0525	Falso

Los boxplots muestran que la mediana de ARNtotalGG es significativamente más baja que las de ARNtotalPLI y ARNtotalPLII, indicando concentraciones generalmente más bajas. ARNtotalPLI tiene un outlier mínimo de 471.35 y una

mediana de 1232.80, sugiriendo una posible asimetría con valores concentrados en el extremo superior. ARNtotalPLII presenta una mediana de 827.85 y no tiene outliers, indicando una distribución uniforme. ARNtotalGG, sin outliers, tiene una mediana de 258.80, mostrando una distribución estrecha y simétrica (figura 2)

Figura 2. El diagrama de caja y bigotes (boxplot) resume la distribución de datos mediante cuartiles. La caja central abarca el 50% central de los datos (IQR), con el borde inferior marcando el primer cuartil (Q1) y el borde superior el tercer cuartil (Q3). La línea dentro de la caja indica la mediana (Q2). Se muestra la tendencia central, la dispersión y la asimetría de los datos.



9.2.3. Prueba de Kruskal Wallis

El análisis de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en los niveles de pureza entre los grupos examinados, con un estadístico de prueba $H=7.4991$, superando el valor crítico de la distribución de Chi cuadrado (5.991). Esto indica que H está en la zona de rechazo para un nivel de significancia $\alpha=0.05$, lo que significa que hay diferencias significativas en los niveles de pureza entre los grupos. El valor de p obtenido fue 0.0235, menor que 0.05, lo cual confirma el rechazo de la hipótesis nula y establece que existen diferencias significativas entre los grupos en términos de la variable pureza. (tabla 6).

Tabla 6. Resultados test de Kruskal Wallis para comparación de la media pureza A260/280 de los tres protocolos de extracción de ARN

<i>Fuente de variación</i>	Estadístico de prueba (H)	Valor p	Hipótesis nula rechazada
<i>Protocolos</i>	7.4991	0.0235	Sí

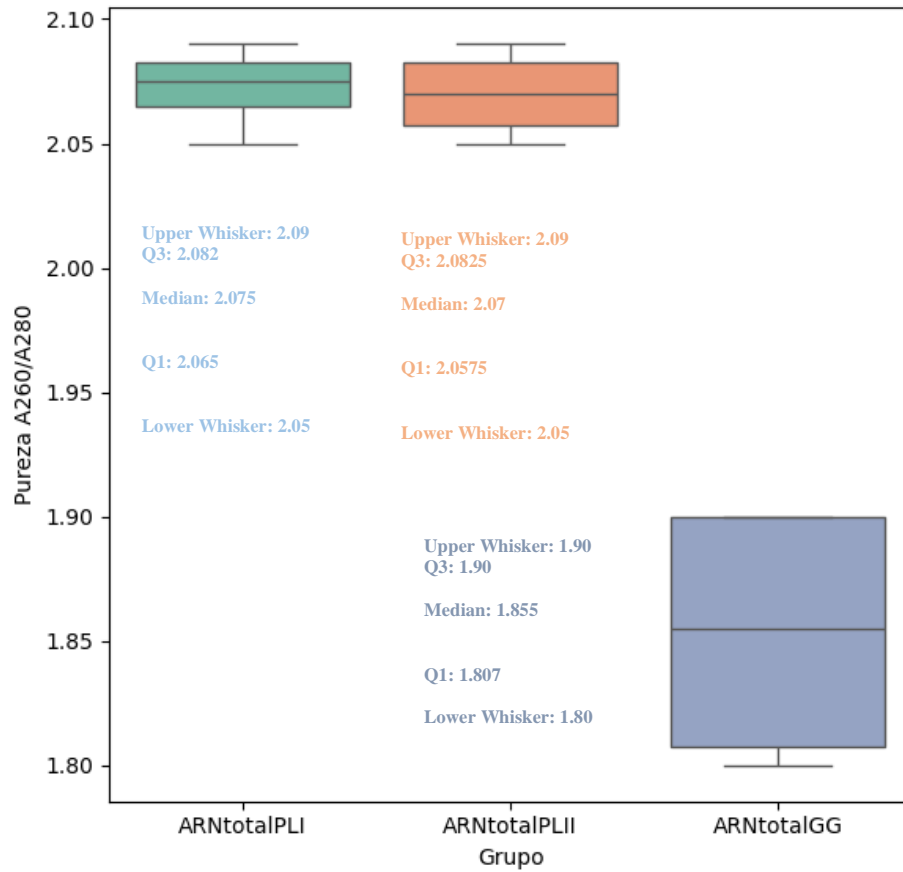
Posterior al rechazo de la hipótesis nula, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples utilizando el método de Dunn para ajustar los valores. Los resultados revelaron diferencias de pureza entre los diferentes grupos (protocolos). Si el valor p es menor que el nivel de significancia (0.05), se rechaza la hipótesis nula y concluye que hay diferencias significativas (HI) entre al menos un par de grupos, en este caso existen diferencias significativas en las concentraciones de ARN entre ARNtotalGG y los otros dos grupos (ARNtotalPLI y ARNtotalPLII), sin embargo, no hay una diferencia significativa entre ARNtotalPLI y ARNtotalPLII (tabla 7).

Tabla 7. Resultados de la prueba de comparación múltiple método de Dunn

Grupo 1	Grupo 2	Valor p	Rechazo H0
<i>ARNtotalGG</i>	ARNtotalPLI	0.015	Verdadero
<i>ARNtotalGG</i>	ARNtotalPLII	0.020	Verdadero
<i>ARNtotalPLI</i>	ARNtotalPLII	0.92	Falso

Los boxplots muestran que la mediana de ARNtotalGG es considerablemente más baja que las de ARNtotalPLI y ARNtotalPLII, indicando concentraciones más bajas en general para ARNtotalGG. No se observaron outliers en ninguno de los grupos. En ARNtotalPLI, la mediana fue de 2.0725, con el 50% central de los datos entre aproximadamente 2.0650 y 2.0825. En ARNtotalPLII, la mediana fue de 2.070, con el 50% central de los datos entre aproximadamente 2.0575 y 2.0825, mostrando una distribución similar, pero con una mediana ligeramente menor que ARNtotalPLI. En resumen, ARNtotalGG exhibe las concentraciones más bajas, seguido por ARNtotalPLII y luego ARNtotalPLI. (figura 3).

Figura 3. Diagrama de caja y bigotes (boxplot) de la variable pureza por contaminación de proteínas, resume la tendencia central, la dispersión y la asimetría de los datos



9.2.4. Coeficiente de correlación de Spearman

El análisis de correlación de Spearman utiliza el coeficiente de correlación r_s (tabla 8), que varía entre -1 y 1, $r_s=1$ indica una correlación positiva perfecta, donde el aumento en una variable se relaciona proporcionalmente con el aumento en la otra variable, y viceversa para $r_s=-1$, que indica una correlación negativa perfecta. Cuando $r_s=0$, no hay correlación lineal entre las variables. Es importante destacar que esta prueba no implica causalidad, solo correlación, y ayuda a evaluar qué protocolo funcionó mejor. En este caso, el coeficiente de Spearman fue de 0.83, indicando una correlación positiva muy fuerte entre la concentración y la pureza del ARN. El valor p obtenido fue significativamente menor que 0.05 (tabla 9), lo que confirma que la correlación observada es estadísticamente significativa y respalda la hipótesis alternativa (figura 4).

Tabla 8. Coeficiente de Correlación r_s de Spearman, interpretaciones

<i>Valor r_s</i>	Fuerza de la correlación	Dirección
$0.0 < 0.1$	No hay correlación	La dirección varía entre valores negativos o positivos ($r = -1, 0, 1$), esta última tendrá una dirección positiva cuando ambas variables aumentan o disminuyen $r > 0$, por otro lado, habrá una correlación negativa si una de las variables crece y la otro disminuye o viceversa $r < 0$.
$0.1 < 0.3$	Poca correlación	
$0.3 < 0.5$	Correlación media	
$0.5 < 0.7$	Correlación alta	
$0.7 < 1$	Correlación muy alta	

Nota. Fuente: Kuckartz et al., 2013, p. 213

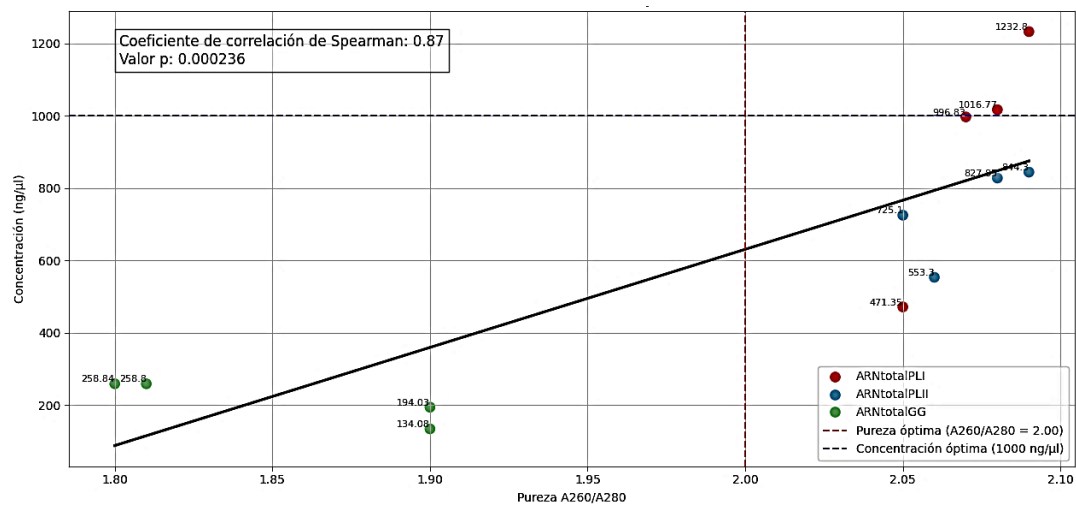
Hipótesis nula (H0): No hay una correlación significativa entre la concentración de ARN y la pureza de ARN.

Hipótesis alternativa (H1): Existe una correlación significativa entre la concentración de ARN y la pureza de ARN.

Tabla 9. Resultados de la Prueba de correlación de Spearman

<i>Métrica</i>	Valor
<i>Coefficiente de Spearman (rs)</i>	0.87
<i>Valor p</i>	0.000236

Figura 4. Correlación entre variable Concentración y Pureza A260/A280.



9.3. Síntesis de ADN complementario

En el análisis comparativo entre los grupos ADNcI y ADNcII, se observa que ADNcII presenta una concentración promedio más alta de 2060.82 ng/μl con una desviación estándar menor de 345.05, mientras que ADNcI tiene una concentración promedio de 1774.72 ng/μl con una desviación estándar de 724.50, lo que indica una mayor variabilidad en sus valores. Las concentraciones de ADNcII se encuentran más concentradas en valores altos, evidenciado por una mediana de 1910.01 ng/μl comparada con 1777.87 ng/μl en ADNcI. En cuanto a la pureza, ambos grupos muestran valores similares, con ADNcI promediando 1.8048 y ADNcII ligeramente menor con 1.7972, y presentando variabilidades de 0.0605 y 0.0255 respectivamente. (tabla 10).

Tabla 10. Resultados estadística descriptiva concentración y pureza, protocolo ADNcI y ADNcII

<i>Métrica</i>	ADNcI - Concentración	ADNcI - Pureza	ADNcII - Concentración	ADNcII - Pureza
<i>Muestras</i>	12	12	12	12
<i>Media</i>	1774.72	1.8048	2060.82	1.7972
<i>Desviación estándar</i>	724.50	0.0605	345.05	0.0255
<i>Mínimo</i>	374.27	1.740	1656.10	1.747
<i>25% Percentil</i>	1577.05	1.7735	1807.45	1.7885
<i>Mediana</i>	1777.87	1.7900	1910.01	1.8015
<i>75% Percentil</i>	2263.73	1.8100	2416.80	1.8125
<i>Máximo</i>	2937.07	1.940	2562.67	1.833

9.3.1. Comparación de protocolos para ADN complementario

La prueba Mann Whitney U unilateral, de hipótesis nula que establece “no hay diferencia significativa en las concentraciones entre ADNcI y ADNcII” e hipótesis alternativa “la concentración de ADNcI es significativamente menor que la de ADNcII”, reflejó la significancia estadística U de 52.0 comparándolo con el valor crítico de la tabla con contraste unilateral de 29, concluye que no se rechaza la hipótesis nula, es decir, que no hay suficiente evidencia para afirmar que la concentración de ADNcI es significativamente menor que la de ADNcII (tabla 11).

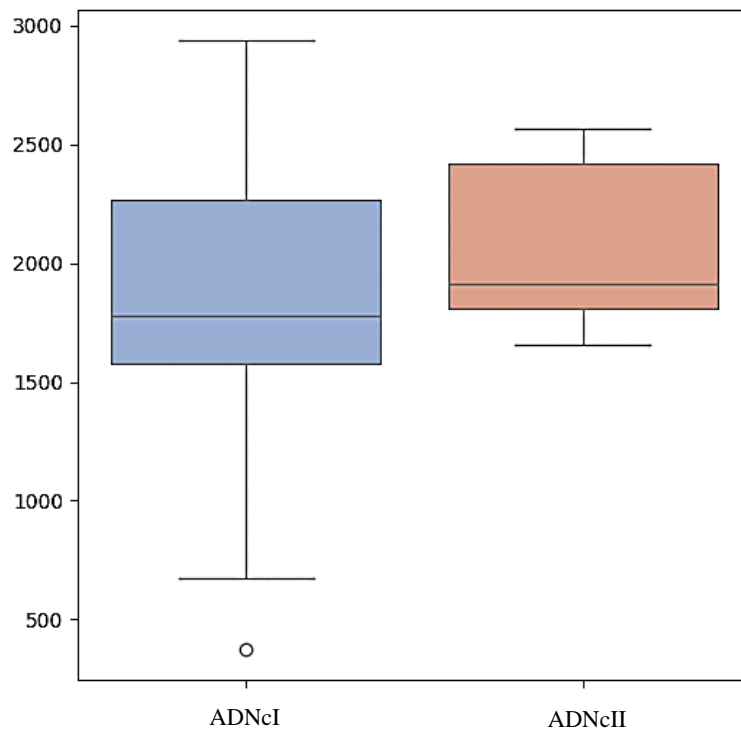
Tabla 11. Resultados de concentración prueba Mann Whitney U unilateral, protocolos de ADN complementario

<i>Estadística U</i>	p-valor	Valor Crítico U	Hipótesis Nula
52.0	0.129911	29	No se rechaza

En el grupo ADNcI, la concentración presenta una dispersión amplia con una mediana de 1777.87 ng/μl y un rango intercuartil (IQR) de 686.68 ng/μl (1577.05 - 2263.73). Se observan valores extremos fuera de los whiskers que van desde 547.05 hasta 2937.07 ng/μl, siendo el valor mínimo de 374.27 ng/μl considerado atípico al estar por debajo del lower whisker. Por otro lado, ADNcII muestra una menor variabilidad con una mediana más alta de 1910.01 ng/μl y un IQR de 609.35 ng/μl (1807.45 - 2416.80). Los valores extremos se encuentran dentro de los whiskers que

van desde 1656.10 hasta 2562.67 ng/ μ l, indicando una dispersión menos marcada de valores extremos, sin identificarse valores atípicos claros en ADNcII. (figura 5).

Figura 5. Gráfico Boxplot para variable concentración protocolos ADN complementario



La prueba Mann-Whitney U respecto a la variable dependiente pureza de ADNcI y ADNcII, reflejó una estadística U calculada de 38.0, y el p-valor es 0.213047, lo cual es mayor que el nivel de significancia $\alpha=0.05$ y el valor crítico de U es 29, dado que $38.0 > 29$, no se rechaza la hipótesis nula. Esto indica que no hay

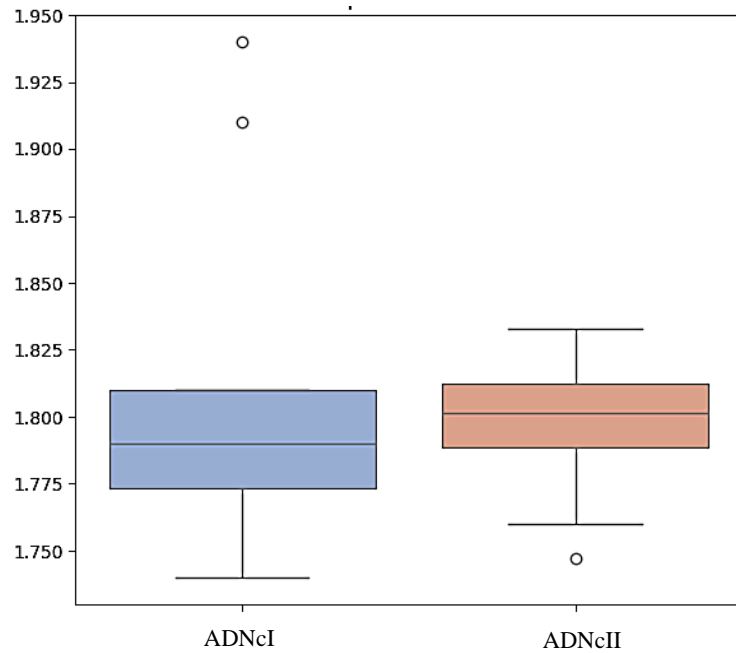
suficiente evidencia para afirmar que la pureza de ADNcI es significativamente menor que la de ADNcII (tabla 12).

Tabla 12. Resultados de concentración prueba Mann Whitney U unilateral, protocolos de ADN complementario

<i>Estadística U</i>	p-valor	Valor Crítico U	Hipótesis Nula
38.0	0.213047	29	No se rechaza

En el grupo ADNcI, la mediana de pureza es 1.790, con un rango intercuartil (IQR) de 0.0365 (1.7735 - 1.8100). Los valores extremos están entre 1.740 y 1.940, incluyendo un valor mínimo de 1.740 considerado atípico por estar por debajo del lower whisker. En ADNcII, la mediana es ligeramente mayor, 1.8015, con un IQR de 0.024 (1.7885 - 1.8125). Los valores extremos están entre 1.747 y 1.833, sin identificar claros valores atípicos fuera de este rango. (figura 6).

Figura 6. Gráfico Boxplot para variable pureza protocolos ADN complementario



Debido a los resultados de la prueba estadística, se concluye que no hay diferencias significativas para ambas variables en los grupos protocolos, por lo que una prueba post hoc no se considera necesaria.

9.4. Cuantificación de rendimiento del ADN complementario

El rendimiento es una medida de cuán efectivamente se ha realizado la síntesis del ADNc a partir de la muestra de ARN, para ello se aplicó (TFS, 2018). Se calculó una media de rendimiento de 49.76% (tabla 16), y 29.47% (tabla 13), respectivamente.

$$\%yield = \frac{Template\ ng}{cDNA\ ng} \times 100$$

Tabla 13. Rendimiento de ADN complementario protocolo I

<i>Muestra</i>	ARN template (µg)	ADNcI (µg)	% Yield
1	0.99683	2.25140	44.28
2	1.23280	2.54547	48.43
3	1.01677	2.93707	34.62
4	0.47135	0.37427	125.94
5	0.82790	0.67085	123.41
6	0.72510	1.74497	41.55
7	0.55330	1.46763	37.70
8	0.84430	1.89523	44.55
9	0.19400	1.68480	11.51
10	0.25880	1.81077	14.29
11	0.13410	2.30070	5.83
12	0.25880	1.61353	16.04

Tabla 14. Rendimiento de ADN complementario protocolo II

<i>Muestra</i>	ARN template (µg)	ADNcII (µg)	% Yield
1	0.99683	2.41420	41.29
2	1.23280	2.42460	50.85
3	1.01677	2.56267	39.68
4	0.47135	2.48793	18.95
5	0.82790	1.97357	41.95
6	0.72510	1.66373	43.58
7	0.55330	2.28153	24.25
8	0.84430	1.81077	46.63
9	0.19400	1.65610	11.71
10	0.25880	1.81077	14.29
11	0.13410	1.79750	7.46
12	0.25880	1.84645	14.02

10. Selección de secuencias

Después de realizar la búsqueda en el Banco de Genes del NCBI con los términos "Dunaliella psy", se ejecutó un alineamiento múltiple con las secuencias disponibles en la base de datos nucleótidos a partir de la secuencia consulta MN732755.1, donde se obtuvieron 36 secuencias con alineamiento significativos (figura 7).

Figura 7. Secuencias con alineamientos significativos provenientes de la base de datos de nucleótidos del banco de genes del NCBI a partir de la secuencia MN732755.1 (NCBI, 2024).

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 36 sequences selected									
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella salina isolate PSY carotene synthesis related protein mRNA, complete cds	Dunaliella salina	2410	2410	100%	0.0	100.00%	1305	MN732755.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella bardawil strain B47 phytoene synthase mRNA, complete cds	Dunaliella salina	2338	2338	97%	0.0	99.76%	1275	EU328287.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella bardawil phytoene synthase mRNA, complete cds	Dunaliella salina	1194	1194	78%	0.0	87.58%	1278	U81900.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella primolecta genome assembly, chromosome_1	Dunaliella primolecta	1033	2447	100%	0.0	100.00%	19719606	OJ611751.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella bardawil strain B47 phytoene synthase gene, complete cds	Dunaliella salina	1022	2374	97%	0.0	99.82%	3300	EU328288.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella parva strain FACHB-815 phytoene synthase mRNA, complete cds	Dunaliella parva	894	894	81%	0.0	81.97%	1611	KY069272.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella salina phytoene synthase mRNA, complete cds	Dunaliella salina	894	894	81%	0.0	81.97%	1260	AY601075.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella salina phytoene synthase (PSY) mRNA, partial cds	Dunaliella salina	497	497	31%	3e-135	88.22%	416	JQ762451.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella bardawil strain UTEX2538 phytoene synthase (PSY1A) gene, complete cds	Dunaliella salina	387	387	24%	7e-102	88.64%	3028	DQ057342.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Micromonas commoda phytoene synthase (PSY1), partial mRNA	Micromonas commoda	268	268	63%	2e-66	72.93%	1059	XM_002508472.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Micromonas sp. RCC299 chromosome_10, complete sequence	Micromonas commoda	268	268	63%	2e-66	72.93%	1160640	CP001576.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Chlorella variabilis hypothetical protein (PSY) mRNA, complete cds	Chlorella variabilis	239	239	63%	2e-57	72.61%	1152	XM_005843836.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Dunaliella salina phytoene synthase gene, complete cds	Dunaliella salina	180	180	11%	1e-39	88.51%	2983	AY547325.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Brachypodium distachyon phytoene synthase 2, chloroplastic-like (LOC10083179)...	Brachypodium distachyon	150	150	39%	9e-31	72.49%	1733	XM_003579062.4	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Lolium rigidum phytoene synthase 2, chloroplastic-like (LOC124652761), mRNA	Lolium rigidum	134	134	39%	9e-26	71.86%	1447	XM_047191802.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Lolium rigidum phytoene synthase 2, chloroplastic-like (LOC124655923), mRNA	Lolium rigidum	128	128	39%	4e-24	71.73%	1437	XM_047194750.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Lolium perenne phytoene synthase 2, chloroplastic-like (LOC127298489), mR...	Lolium perenne	122	122	39%	2e-22	71.54%	1553	XM_051328338.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium hybridum ecotype IB4493 chromosome Bhd4 sequence	Brachypodium hybridum	67.6	67.6	4%	1e-05	88.89%	51488874	CP145501.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Cyanobium usitatum str. Tous isolate KAC_108 genome assembly, chromosome_1	Cyanobium usitatum str. Tous	67.6	67.6	3%	1e-05	91.67%	2656680	OY986431.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis annotation	Digitaria exilis	62.1	62.1	4%	4e-04	85.96%	42379666	LR792824.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis genome assembly, chromosome_3A	Digitaria exilis	62.1	62.1	4%	4e-04	85.96%	42379666	LR761609.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium distachyon ecotype Bq21 chromosome 4 genomic sequence	Brachypodium distachyon	62.1	62.1	4%	4e-04	87.04%	49626907	CP145531.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis genome assembly, chromosome_3A	Digitaria exilis	62.1	62.1	4%	4e-04	85.96%	42379666	LR994608.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Setaria viridis cultivar ME034v chromosome 3	Setaria viridis	58.4	58.4	5%	0.006	82.35%	49814079	CP050797.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis annotation	Digitaria exilis	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	41484145	LR792825.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis genome assembly, chromosome_3B	Digitaria exilis	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	41484145	LR761610.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sorghum bicolor subsp. drummondii cultivar S722 chromosome 8	Sorghum bicolor subsp. dr...	56.5	56.5	4%	0.021	85.19%	64104312	CP152400.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Panicum miliaceum cultivar AJ8 chromosome 3A	Panicum miliaceum	56.5	56.5	4%	0.021	82.81%	43337656	CP142754.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Panicum miliaceum cultivar AJ8 chromosome 3B	Panicum miliaceum	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	57374001	CP142753.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium stacei ecotype Bst99 chromosome 10 genomic sequence	Brachypodium stacei	56.5	56.5	4%	0.021	85.19%	20904866	CP145527.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Paspalum notatum var. saurau isolate R1 chromosome 08	Paspalum notatum var. sau...	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	48768754	CP144752.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sorghum bicolor cultivar Huandiaoou chromosome 8	Sorghum bicolor	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	65754093	CP137842.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Sorghum bicolor cultivar Hongyingzi chromosome 8	Sorghum bicolor	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	65908407	CP137832.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Avena sativa genome assembly, chromosome_22	Avena sativa	56.5	56.5	2%	0.021	100.00%	58832055	OV702300.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum aestivum uncharacterized LOC123161231 (LOC123161231), ncRNA	Triticum aestivum	56.5	56.5	4%	0.021	85.19%	2493	XR_006480619.1	
<input checked="" type="checkbox"/> Digitaria exilis genome assembly, chromosome_3B	Digitaria exilis	56.5	56.5	4%	0.021	84.21%	41484145	LR994609.1	

Bajo los criterios preestablecidos de selección de secuencias fueron identificadas cuatro secuencias (tabla 15), se visualizan Nombre Científico, es el nombre oficial del organismo del cual proviene la secuencia. La Cobertura de Consulta es el porcentaje de la secuencia de consulta que está alineado con la secuencia objetivo en la base de datos, indicando cuánta parte de la consulta se alinea con la secuencia encontrada. El % de Identidad muestra el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en la alineación que son idénticos entre la consulta y la secuencia encontrada, reflejando la similitud entre las secuencias. El % de cobertura se refiere al número total de bases nitrogenadas de la secuencia en la base de datos. Finalmente, el Acceso es el identificador único (número de acceso) asignado a la secuencia en la base de datos, utilizado para referenciar la secuencia específica en dicha base de datos.

Tabla 15. Secuencias con alineamientos significativos bajo criterios de selección preestablecidos a partir de la secuencia MN732755.1 (NCBI, 2024).

<i>Descripción</i>	Nombre Científico	Cobertura de Consulta	% de Identidad	Longitud de Acceso	Acceso
<i>Dunaliella salina</i> aislado <i>psy</i> proteína relacionada con la síntesis de caroteno, ARNm completo	Dunaliella salina	100%	100.00%	1305	MN732755.1
<i>Dunaliella bardawil</i> cepa 847 sintasa de fitoeno, ARNm completo	Dunaliella salina	97%	99.76%	1275	EU328287.1
<i>Dunaliella parva</i> cepa FACHB-815 sintasa de fitoeno, ARNm completo	Dunaliella parva	81%	81.97%	1611	KY069272.1

<i>Dunaliella salina</i> <i>sintasa de fitoeno,</i> <i>ARNm completo</i>		Dunaliella salina	81%	81.97%	1260	AY601075.1
--	--	----------------------	-----	--------	------	------------

Las secuencias escogidas que fueron identificadas como ARNm de *Dunaliella*, presentaron una Cobertura e Identidad $\geq 80\%$ y su número de bases nitrogenadas estaba dentro del rango de 1000 a 2000. Todas con descripción de secuencia codificante completa (cds).

10.1. Alineamiento de secuencias y cadena consenso

El alineamiento múltiple Blast (figura 8) permitió comparar y analizar las similitudes entre las secuencias seleccionadas, dado que se buscaban que las regiones de variación no fueran amplias y se mantuviesen las regiones conservadas junto a la disminución de gaps, las secuencias específicas para la creación de la cadena consenso y el posterior diseño de cebadores se basó en dos secuencias de las cuatro preseleccionadas anteriormente, siendo estas MN732755.1 y AY601075.1 (figura 9).

Figura 8. Alineamiento múltiple Blast

[Descargar](#) ▾ [GenBank](#) [Gráficos](#)

ARNm de fitoeno sintasa de Dunaliella salina, cds completos
 ID de secuencia: [AY601075.1](#) Longitud: 1260 Número de coincidencias: 1

Rango 1: 188 a 1249 [gráficos](#) [GenBank](#) ▼ [Próximo partido](#) ▲ [Partido anterior](#)

Puntaje	Esperar	Identities	Brechas	Hebra
894 bits(484)	0.0	873/1065(82%)	9/1065(0%)	Mas, mas

```

Consulta 239 TGCATT gcagcagcagcagcagcaacaactgcagcagcagcag---caacagcaac TAT 295
          |||
Sbjct 188 TGCCCTGCAGCAGCAGCTGCAGCAGCAAGCCAGCAGCAGCAGGCCAGCAGCAGCTGT 247
          |||

Consulta 296 CGGAAAGCAGGTGGAGGAG-CAGGCGATGCTGCAGTGCATAAAGACCGCTCA-GTCAGT 353
          |||
Sbjct 248 CCGCAAGGACGTGGAGCAGGA-GCGATGAGGCGGTGCATACGGACAGC-CACCTCCGT 305
          |||

Consulta 354 GCCCCCTCACCAGGACTCCTCAATCTCGCGGCTGCAGTGGCAGGGCAGCAGC-TTGG 412
          |||
Sbjct 306 GCCCCCTCGTCCGGCGTGTGGACCCAGGCGGCTGCGCTGGAGGGGC-GGAGCGTGG 364
          |||

Consulta 413 AAGCAGCGTACGAGCGATGTGGGGCGGTGTGCAGCGAGTACGCCAAGACCTTCTACCTCG 472
          |||
Sbjct 365 AGGCAGCGTACGAGCGGTGTGGCGGTTGCAAGGAGTACGCCAAGACCTTCTACCTGG 424
          |||

Consulta 473 GACTCAGCTCATGACACCAGTGCAGGCCAGGTGCATTCTGGCCATCTATGTGGTGGCC 532
          |||
Sbjct 425 GCAGCAGCTCATGACCCCGTCCAGGACGCTGCATTCTGGCCATCTACGTGGTGGCA 484
          |||

Consulta 533 GCCGCACAGATGAGCCTGGTGGATGGCCCAATGCATCAAAGATCACGCCTCAGGCCCTAG 592
          |||
Sbjct 485 GGCGCACGGATGAGTGGTGGATGGCCCTAATGCCTCAAAGATCACACCACAGGCCCTGG 544
          |||

Consulta 593 ACAGATGGGAGGAGCGCCTTGAAGCATGTTCCAAGGCAAGCCCTATGATGTCTGGAGC 652
          |||
Sbjct 545 ACCGGTGGGAGGAGCGGCTAAACGGCGTCTTCCAAGGCAAGCCCTTACGACGTCTGGAGC 604
          |||

Consulta 653 CGGCGCTCACAGACACCATCTCCAAATTCCTTGGAGTGTGCAACCCTCAGAGACATGA 712
          |||
Sbjct 605 CAGCGCTGACAGACACCATCTCCAAGTTCCTTGGAGTGCAGCCATTCGTGACATGA 664
          |||

Consulta 713 TCGAGGGCATGCGAATGGACCTTCAAGTCCGCGTATCACACCTTTGATGAGTGTACG 772
          |||
Sbjct 665 TTGAGGGCATGCGCATGGACCTGTTCAAGTACGCTACAGAGCTTGAAGAGCTGTATG 724
          |||

Consulta 773 AGTACTGTATCTGTGTGGCGGACAGTGGGGCTGATGACCATGCCAGTGTGGGGATTG 832
          |||
Sbjct 725 AGTACTGTATCTGGTAGCGGGACTGTGGCCTGATGACCGTGCCTGTGATGGGCATCG 784
          |||

Consulta 833 ATCCAACTACAAGGGTCCAATTGACAAGGTCTACAAGGCCCTTGCCTGGGTACGG 892
          |||
Sbjct 785 ACCCAACTACAAGGGCCCTTGGACAAGGTGTACGGGCTGCGTCCGCTGGGCACCG 844
          |||

Consulta 893 CAAACCAGCTACCAACATTCTGCGAGATGTGGGAGAGGACATCAGAGAGCGTGACCGTA 952
          |||
Sbjct 845 CCAACCAGCTGACAAACATTCTGAGAGAGTAGGAGGAGGACATTGGGAACGGGACCGCA 904
          |||

Consulta 953 TCTACTTGCCCTGGATGAGCTCAAGCAGTTCGGCATCTCCGAAGAGGAGTTAAAGCAG 1012
          |||
Sbjct 905 TCTACTGCCCCTGGATGAGCTACGGAGTTTGGCATCTCGGAAGATGAGGTGCGGGCAG 964
          |||

Consulta 1013 GTATCCAAGCCATCGCAAGGCAAGGTGGATGAGCGGTGGCGAGCGTTATGAAGTTCC 1072
          |||
Sbjct 965 GCATCCACAAGCCCTACAAGGCAAGGTGACGACGAGGTGGCGCATGTTATGAAGTTCC 1024
          |||

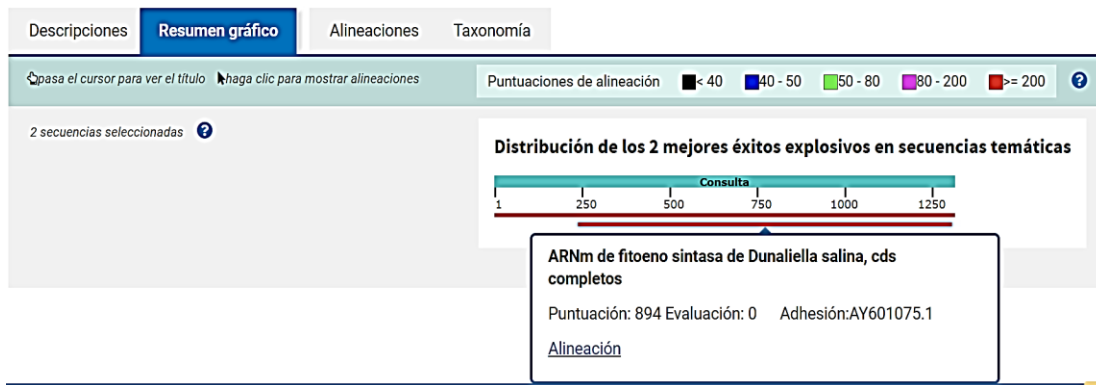
Consulta 1073 AGATCAAGGCGTGCAGAGAGTACTTCCAGGAAGCAGAGGATGGGGTAGACTACTTGGACG 1132
          |||
Sbjct 1025 AGATACAGCGGGCGGGAGTACTTCCAGGAGGCTGAGGATGGTGTGACTACTTGGAGC 1084
          |||

Consulta 1133 TGAAGGCGCGGTGGCCAGTGTGGTGCAGCGTGTATCTTTACCGCCAAATCTGGATGTCA 1192
          |||
Sbjct 1085 TGAAGGCGCGGTGGCCGTGTGGTGTGCGCTCATCTTGTACGCCAGATCTTGTATGTCA 1144
          |||

Consulta 1193 TTGAGAAGAATGACTACGACAACCTTCCATGGCGGCATACGTGCCTAAGTCAAAGAAGT 1252
          |||
SBJCT 1145 TTGAGAAGAAGCTACGACAACCTTCCATGCGTGCATGTGTCCAAGTCAAAGAAGC 1204
          |||

Consulta 1253 TTGCATCGTTGCCGATGGCCTTGTTCGGGCTTGGTGCCCAAGA 1297
          |||
Sbjct 1205 TGGCCTCCCTGCCCTGGCCTTGTGCGTGCATGATGCCCAAGA 1249
          |||
  
```

Figura 8. El gráfico es una descripción general de las secuencias de la base de datos alineadas con la secuencia de consulta MN732755.1. Estas son barras horizontales representadas coloreadas codificadas por puntuación y que muestran el alcance de la alineación en la secuencia de consulta, se muestra una puntuación de alineación mayor o igual a 200, específicamente 894, es decir que es una puntuación alta en bits, lo que sugiere una alineación de muy alta calidad, generalmente acompañada de un E-value muy bajo (0.0 en este caso que indica que es extremadamente improbable que la alineación haya ocurrido por azar) (NCBI, 2024).



El alineamiento doble en BioEdit utilizando la opción "ClustalW Alignment" demostró regiones altamente conservadas (figura 10) y permitió el diseño de la cadena consenso (figura 11).

Figura 9. Alineamiento doble entre secuencias seleccionadas AY601075.1 y MN732755.1, se observan regiones conservadas coloreados de rojo para Timinas, negro en Guaninas, verde para Adeninas y azul Citosinas, mismas que formarán la proporción Identidad de AY601075.1 respecto a MN732755.1 del 81.97% junto a los demás nucleótidos idénticos en ambas secuencias.

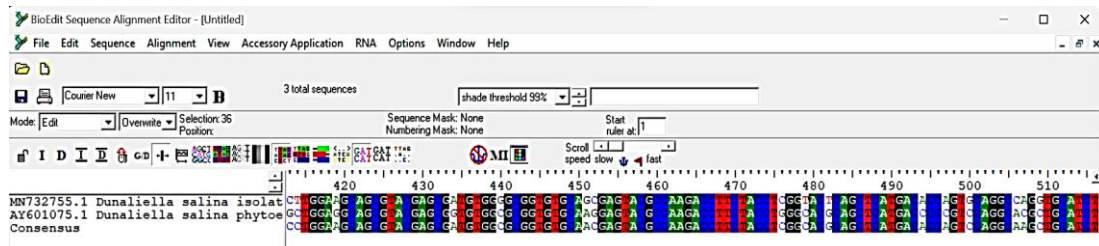


Figura 10. Cadena consenso, los gaps que presentó la secuencia fueron reemplazados con los nucleótidos de la secuencia MN732755.1, visualizados en naranja.

```

5'ATGACGCTGTCAATGTTGGACGCGCGAAGGATGGCACAGCGAACACCAACCACCTCCGCCGCTCGC
CCAGCATCACAGAAGCCCCAGCACCCACAAGCAAGCGCAGCCCGAGCCCCAACAGCAGCAAAACAGC
GCACCAAGAAGGGCAGTCCCAGACCACAAGGCCAGAAGGAACCCGACAGCAGCCGTGCAAGCGAACT
GCAACGCTCGCCATGCCAACCCCAACCACGGCCAGAACATGCGACTGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAA
CCCCAGCAGCAGCAGCGCCCAACAGCAACTATCCGGAAAGCAGTGGAGCAGCAAGCGATGCAGCAGT
GCATAAAGACAGCCAACTCAGTGCCTCCCTCCACCGGACTCCTCAACCCAGCGGCTGCGATGGAAG
GGCAGAACCCTGGAAGCAGCGTACGAGCGATGTGGCGCGGTGTGCAACGAGTACGCCAAGACTTCT
ACCTCGGCACGCAGCTCATGACACCAGTCCAGGCAAGCTGCATCTGGGCCATCTACGTGTGGTGCAGC
CGCACAGATGAGCTGGTGGATGGCCCAATGCATCAAAGATCACACCACAGGCCCTAGACAGATGGGA
GGAGCGCCTAAAAGCATCTTCAAGGCAAGCCCTACGACGTGCTGGACGCAAGCGTACAGACACCA
TCTCCAAATTCCTCTGGAGGTGCAACCATTAGAGACATGATCGAGGGCATGCCAATGGACCTTCA
AGTACGGTACCACACCTTTGACGAGCTGTACGAGTACTGCTATCGGGTAGCCGGCACAGTGGCCTG
ATGACCATGCCAGTCATGGGCATCGACCCCAACTACAAGGGCCCAATGGACAAGGTCTACAAGGCCGC
CCTCGCGCTGGGCACCGCAAACCCAGCTCACAAACATTTCTGAGAGACGTAGGAGAGGACATCAGAGAAC
GGGACCGCATCTACTGCCCTGGATGAGCTAAAGCAGTTCGGCATCTCGAAGAGGAGGTAAAAGCA
GGATCCACAAGCCATCACAAGGCAAGGTCGACGAGCGGTGGCGAACGTTTCAATGAAGTTCCAGATAA
AGCGGGCGCGAGAGTACTTCCAGGAAGCAGAGGATGGGGTAGACTACTTGGACGTGAAGGCCGCGGT
GGCCAGTGTGGTCAGCGCTCATCTGTACCGCCAAATCCTGGATGTCATTGAGAAGAACGACTACGAC
AATCTCTCCATGCGCGCATACGTGCCCCAAGTCAAAGAAGCTGCATCCCTGCCATGGCCTTGTCCGG
GCCATGATGCCAAGAACAACAATAG3'

```

10.2. Diseño de partidores específicos

Se determinaron 4 regiones conservadas bajo las características de diseño de cebadores, para el primer juego de cebadores se escogió como forward y reverse las regiones a partir del nucleótido 448 al nucleótido 1260 de la cadena consenso, PM-*psyF1*: 5-GCAACGAGTACGCCAAGACCTTCTA -3 y PM-*psyR1*: 5-GGTCGAAGAACTGAACCCGTGCATA-3, respectivamente, por otro lado, un segundo juego de cebadores fue establecido desde el nucleótido 659 al 1065, PM-*psyF2*: 5- GCGCTCACAGACACCATCTCCAAATT -3 y PM-*psyR2*: 5-GCGGGCGAAATAGACCTTGAAGTACT-3, para el forward y reverse, respectivamente (tabla 16).

Tabla 16. Cebadores y parámetros de diseño

<i>Código</i>	Número de bases	Secuencia 5'-3'	Temperatura de hibridación (°C)	% C y G	Har ping	Complementarity	Self-annealing
<i>PM-psyF1</i>	29	GCAACGAGTACGCCAAGACCTTCTA	60, 19	52	No	No	No
<i>PM-psyR1</i>	28	CCAGCTTCTTTGACTTGGGCACGTAT	60.08	50	No	No	No
<i>PM-psyF2</i>	26	GCGCTCACAGACACCATCTCCAAATT	60, 76	50	No	No	No
<i>PM-psyR2</i>	26	CGCCCGCTTTATCTGGAACTTCATGA	61, 48	50	No	No	No

10.3. Amplificación *In Silico* por PCR y electroforesis en gel de agarosa

La amplificación *In Silico* en Primer Blast, demostró un producto (amplicón) de 813 pares de bases (pb) de acuerdo con el primer juego de cebadores PM-*psy*F1 y PM-*psy*R1 (figura 12), mientras que el segundo juego de cebadores PM-*psy*F2 y PM-*psy*R2 resulto con un producto de (figura 13).

Figura 11. Amplificación *In Silico* en PrimerBlast tomando como molde la cadena consenso y cebadores PM-*psy*F1 y PM-*psy*R1, Dunaliella expresión del gen *psy*.

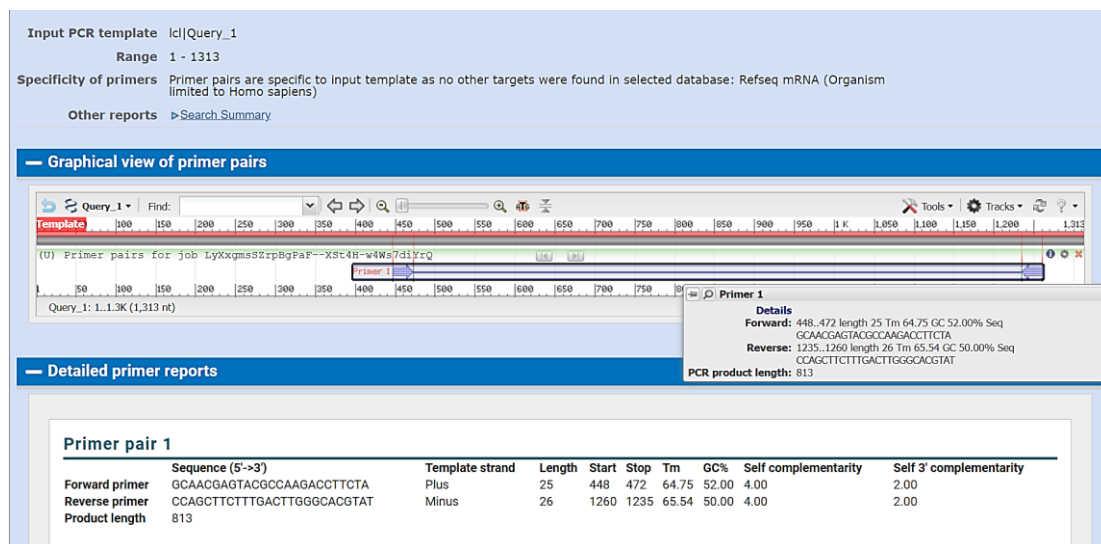
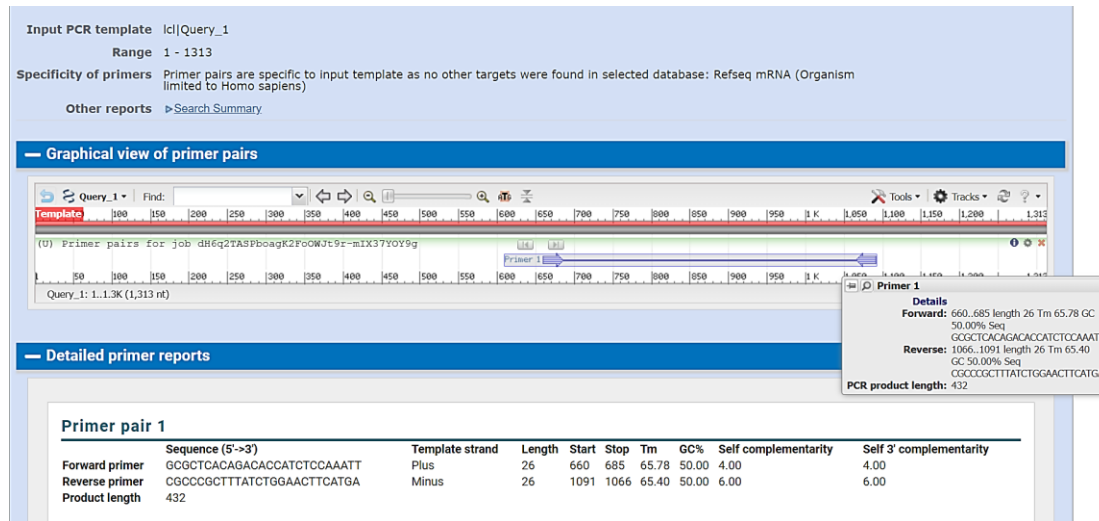


Figura 12. Amplificación *In Silico* en PrimerBlast tomando como molde la cadena consenso y cebadores PM-psyF2 y PM-psyR2, Dunaliella expresión del gen *psy*.

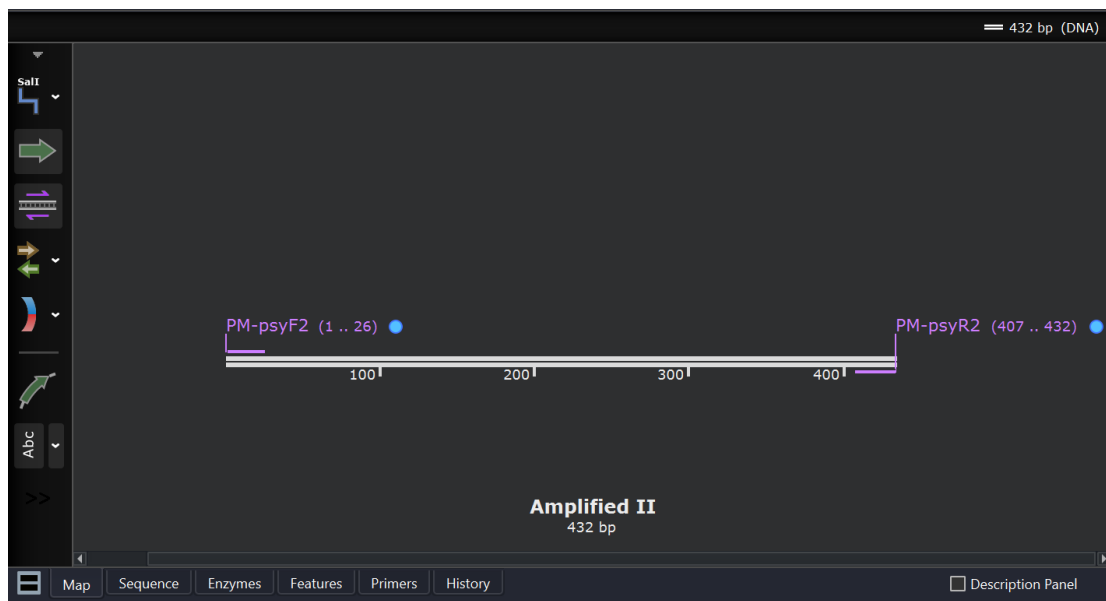


La amplificación *In Silico* realizada en SnapGene secundó el proceso de amplificación realizado en PrimerBlast, de forma tal que para el primer juego de cebadores PM-psyF1 y PM-psyR1 se obtuvo un amplicón de 813 pb (figura 14), mientras que el segundo juego de cebadores PM-psyF2 y PM-psyR2 resultó con un producto de 432 pb (figura 15).

Figura 13. Amplificación *In Silico* SnapGene tomando como molde la cadena consenso y cebadores PM-psyF1 y PM-psyR1, Dunalieilla expresión del gen *psy*.

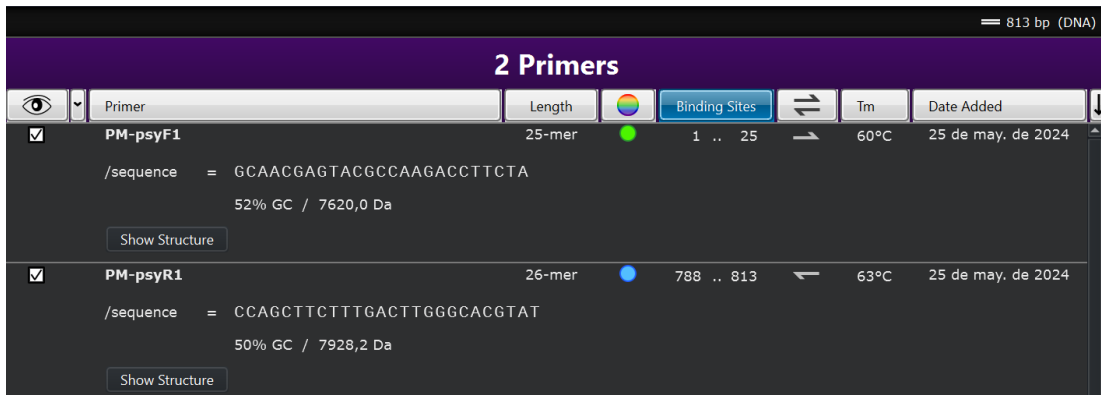


Figura 14. Amplificación *In Silico* SnapGene tomando como molde la cadena consenso y cebadores PM-psyF2 y PM-psyR2, Dunalieilla expresión del gen *psy*.



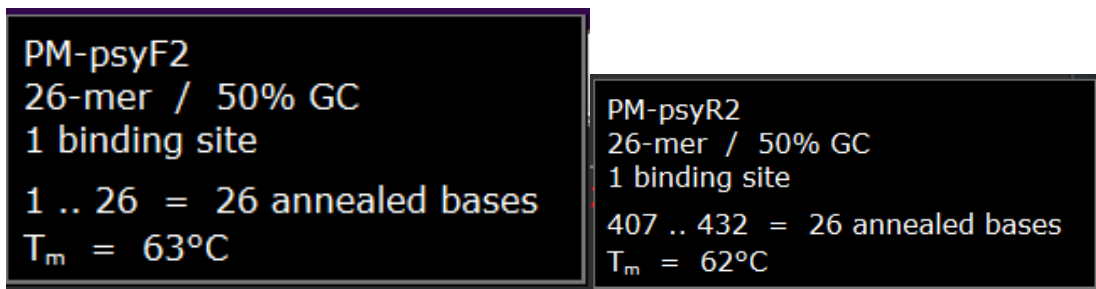
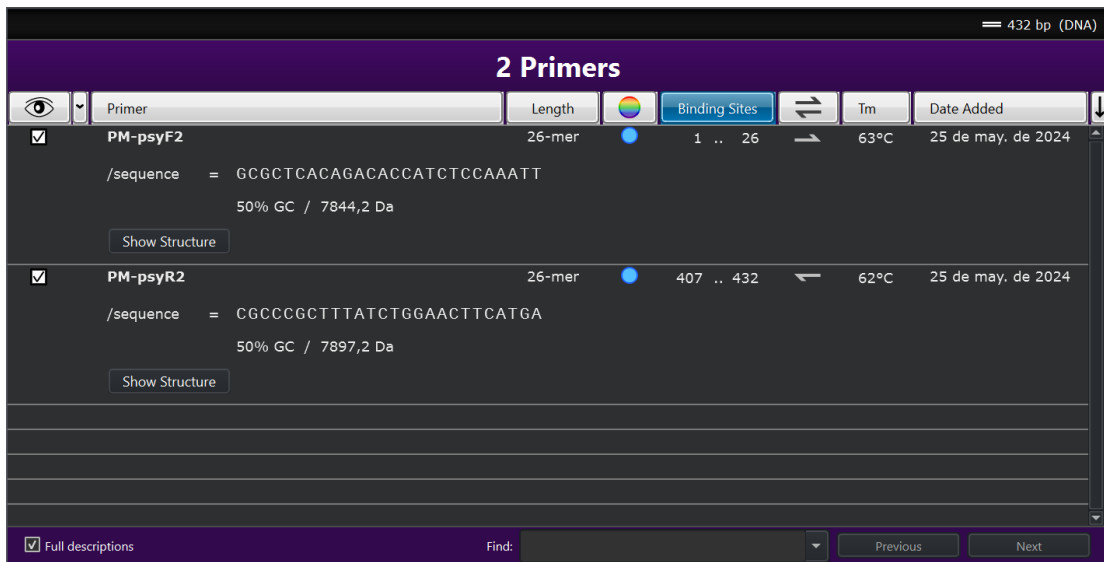
Un informe sobre los parámetros de los cebadores fue obtenido, en el cual se reflejan las características de diseño de cebadores buscadas y similares a los parámetros analizados por OligoCalculator (figura 16-17).

Figura 15. Parámetros de diseño del juego de cebadores PM-*psy*F1 y PM-*psy*R1 por SnapGene, en el informe se incluye el número de bases hibridadas y el sentido de las secuencias molde de *Dunaliella* expresión del gen *psy*.



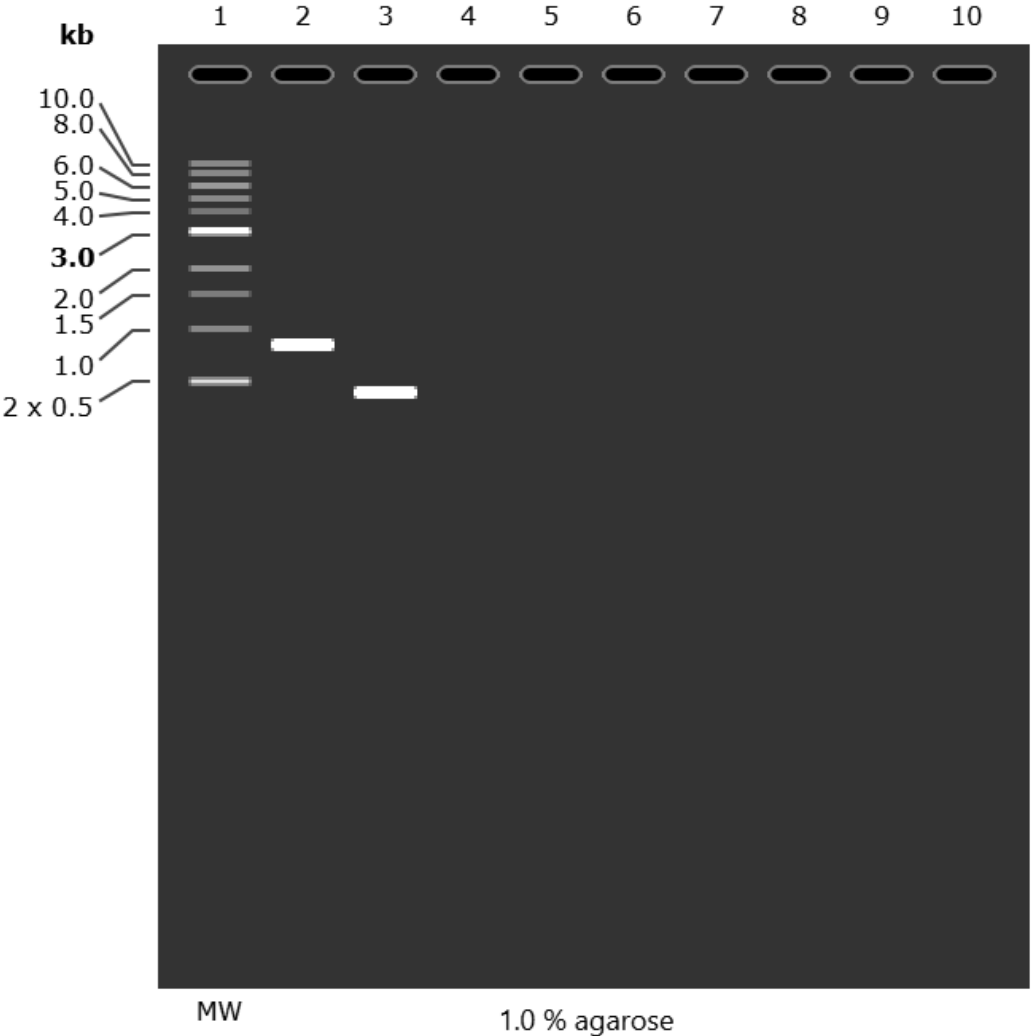
PM-psyF1 25-mer / 52% GC 1 binding site 1 .. 25 = 25 annealed bases T _m = 60°C	PM-psyR1 26-mer / 50% GC 1 binding site 788 .. 813 = 26 annealed bases T _m = 63°C
--	---

Figura 16. Parámetros de diseño del juego de cebadores PM-*psy*F2 y PM-*psy*R2 por SnapGene, en el informe se incluye el número de bases hibridadas y el sentido de las secuencias molde de *Dunaliella* expresión del gen *psy*.



La electroforesis *In Silico* realizada en SnapGene permitió visualizar la integridad del producto amplificado pertenecientes a cada juego de cebadores, el marcador de peso molecular muestra que los estándares de referencia para estimar el tamaño de los amplicones corresponden a su número de pares de bases, por último, se observa que ambos muestran intensidad sobre las bandas (figura 18).

Figura 17. Electroforesis *In Silico* realizada en SnapGene de dos amplicones correspondientes a dos juegos de cebadores, la primera banda pertenece a la amplificación utilizando los primers PM-*psy*F1 y PM-*psy*R1 de producto 813 pb, mientras la segunda pertenece a PM-*psy*F2 y PM-*psy*R2 de producto 432 pb, también fueron ajustadas varias preferencias respecto al gel, como la concentración de agarosa al 1%, el tamaño de los marcadores de peso molecular (MW) a 1kb y el tipo de buffer electrolítico para la migración del producto fue TAE (Tris-Acetato-EDTA).



Se acepta la H0: En esta experimentación la alta concentración del ADNc extraído desde *Dunaliella spp* estresada no dependió de la cantidad de enzima transcriptasa inversa RT empleada en la síntesis de este ácido nucleico.

11. Discusiones

El desarrollo de los tres protocolos de extracción de ARN total ARNtotalPLI, ARNtotalPLII y ARNtotalGG basados en métodos de columna de sílice y modificaciones enfocadas en el proceso de homogenizado y disrupción celular, obtuvieron como media de concentración 0.92944 µg, 0.73763 µg y 0.21144 µg, respectivamente. En este contexto, el primer protocolo presenta una media de concentración ligeramente más elevada que el segundo, justamente, este aumento de concentración se presenta en el protocolo modificado con el uso de perlas metálicas. Está descrito que el uso de perlas facilita el rompimiento de la pared celular de las microalgas, así lo describe Phwan et al., 2018, p. 85. Basados en estas afirmaciones, en esta investigación se utilizó perlas de metal de 1mm para romper la matriz pericelular de muestras estresadas de *Dunaliella spp*, misma que presenta variaciones en su espesor debido a la presencia de glicoproteínas. A pesar de haber aplicado una homogenización optimizada con lisis mecánica los datos estadísticos no se encontró una diferencia significativa entre los dos primeros grupos ARNtotalPLI y, ARNtotalPLI. Sin embargo, Fawley & Fawley, 2004, p. 223-225 comentan sobre este mismo tema, describiendo el éxito que suelen tener los métodos de homogenización basados en uso de perlas en estructuras membranosas y de pared celular rígidas en microalgas. Así mismo, Simonelli et al., 2009, p. 1465-1474 añaden que los métodos

de extracción de ácidos nucleicos pueden verse afectados debido a altos niveles de polifenoles y polisacáridos que poseen estos organismos. Mientras, Tear et al., 2013, p. 1-7 refuerzan añadiendo que este tipo de compuestos tienen presencia en estructuras celulares, membranas o paredes recalcitrantes dificultando los procesos de lisis celular. Por otro lado, Li et al., 2020 obtuvo valores de hasta 1.5 μg en sus muestras de ARN total extraídos en *Dunaliella salina*, cercanos a valores de muestras obtenidas en el protocolo ARNtotalPLI de 1.2328 μg y 1.0167 μg . Sin embargo, las condiciones de la muestra se encontraban bajo diferentes parámetros de estrés con un enfoque de rangos de ondas de luz específicos de luz roja (660 nm) y azul (450 nm), que de acuerdo con el estudio influyó en el crecimiento y estructura celular, el contenido total de carotenoides y los transcriptomas. Por otro lado, Poong et al., 2017 recalca que las concentraciones de ARNtotal obtenidas en la microalga *Chrorella sp* en estado basal, utilizando el mismo método columna de sílice y homogenización con sal cao trópica (Tiocianato de Guanidina para evitar nucleasas y el uso de β -mercaptoetanol b-ME), no fueron considerados óptimas. En dicha investigación, aunque se realizó un acondicionamiento con lisis física de nitrógeno líquido acompañado de macerado y un protocolo modificado aumentando Trizol, se obtuvieron concentraciones medias deficientes de 5.5 y 16.1 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. De forma que, refuerza lo descrito por Nunes et al., 2024 sobre la especificidad de los protocolos y la diversidad química de las microalgas.

El tercer protocolo ARNtotalGG presentó una diferencia significativa respecto a los anteriores grupos, con una media de concentración de 211.44 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$. Por lo

que, los valores obtenidos se le atribuyen a la utilización de los parámetros propuestos por TFS, 2006 durante el proceso de homogenización y ruptura celular, que disminuyeron la eficiencia de este. En primera instancia, se redujo el volumen de tampón de lisis a $300 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ en comparación con los anteriores grupos que usaron $700 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, pero en concordancia, con lo mencionado por IST (2022) se agregó un paso de incubación de 10 minutos y se adicionó el uso enzimático de proteinasa K para la degradación de compuesto pericelulares, este autor comenta que la suplementación de la enzima es extraordinariamente eficaz contra las proteínas nativas, especialmente adecuada para modificar proteínas y/o glicoproteínas en las superficies celulares, además. inactiva rápidamente las ARNasas. Sin embargo, los valores obtenidos en estos protocolos *Dunaliella spp* estresada muestran resultados que distan bastante de los otros dos grupos.

En contraste, los valores de Índice de pureza A260/A280 de los dos protocolos ARNtotalPLI y ARNtotalPLII se encuentran en la media óptima de 2.07 preestablecida por TFS, 2016, p. 25. En cambio, el tercer protocolo ARNtotalGG presenta una media de pureza que se aleja de este índice. Aunque, Gallagher & Desjardins, 2006 comentan que estos valores también son aceptables y de calidad, indicando ausencia de contaminación por proteínas.

Los protocolos ADNcI (1 μl RT) y ADNcII (0.8 μl RT), centrados en la eficiencia de Transcriptasa inversa RT, mostraron una concentración promedio de

1774.72 ng μL^{-1} y 2060.82 ng μL^{-1} y una media de rendimiento de 49.76% y 29.47%, respectivamente, concluyendo estadísticamente que no existe una diferencia significativa entre ambos grupos. Por su parte, TFS, 2018 menciona que el rendimiento de la primera cadena de ADNc será por lo general de entre el 30% y el 40%, por lo que se podría acoger los valores obtenidos como generalmente positivos. No obstante, Schwaber et al., 2019 discute que actualmente se han encontrado problemas al tratar de evidenciar la optimización de la eficiencia de la RT con parámetros modificados que incluyen, la elección de la enzima RT, concentración de ARN objetivo, concentración de ARN de fondo y calidad del ARN (concentración y pureza). Por otro lado, Lindén et al., 2012 añade que la enzima puede tener cierta afinidad a determinados genes en específico, argumentando que genes de referencia medidos (Actb y Sdha) demostraron mucha más variabilidad en la eficiencia que otros, y no se correlacionaban con la eficiencia general de la transcripción en cada reacción.

Estas características aumentan más la complejidad de interacción de la enzima. Por consiguiente, se recalca lo propuesto por dichos autores, que comentan que la cantidad de ARN total no es completamente proporcional a la cantidad del ADN complementario, puede ser un factor a tomar en cuenta, pero el rendimiento solo es un primer acercamiento o aproximación a la eficiencia de RT, la concentración final de ADN complementario e interpretación de los mismos está sujeto a la multifactorialidad de la experimentación, incluyendo parámetros que involucran la temperatura óptima de hibridación durante el uso del termociclador, la pérdida de material durante el

proceso, degradación del ARN por ARNasas, condiciones subóptimas del experimento, la capacidad de los dNTPs, la capacidad que RT posee para reaccionar y a la cantidad de secuencias de ARN mensajero disponibles.

El juego de cebadores PM-psyF1 y PM-psyR1 utilizados en la ejecución de la amplificación *In Silico* en PrimerBlast obtuvo un producto superior de 813 pb, el producto amplificado correspondiente a PM-psyF2 y PM-psyR2, fue menor de 432 pb. Por consiguiente, se acoge lo mencionado por Sambrook & David W, 2012 que menciona que el éxito de la amplificación está en gran parte relacionado al cumplir con los parámetros preestablecidos para el diseño de cebadores. El producto amplificado visualizado en electroforesis *In Silico* demostró la presencia de bandas intensas que representan alta concentración de material genético o integridad, estas se encuentran situadas en los niveles del marcador molecular con el número de pares de bases correspondiente. Secundando, los modelos de amplificación presentado en SnapGene, que también sugieren un modelo de amplificación por PCR exitosa usando ambos juegos de cebadores.

12. Conclusiones

Se evaluaron dos protocolos de obtención de ADNc en *Dunaliella spp* estresada mediante la eficacia de la transcriptasa inversa, ADNcI (1 µL RT) Y ADNcII (0.8 µl RT), En esta experimentación no se hallaron diferencias significativas en la calidad (concentración y pureza A260/A280) del ADNc obtenido, el rendimiento fue del 49.76% y 29.47%, respectivamente.

Se diseñaron partidores para el gen *psy* de *Dunaliella spp*; PM-*psy*F1 y PM-*psy*R1; PM-*psy*F2 y PM-*psy*R2, para amplificar el ADNc *In Silico*, los mismos que cumplieron con los parámetros específicos de amplificación: 25 a 30 bases nitrogenadas cada cebador. la presencia de C y G al inicio de las sus secuencias, con una temperatura de fusión (Tm) en rangos 50-65°C , un contenido de GC entre el 50-53%, y se evitó la posible presencia de estructuras secundarias (Harping, Complementarity y self-annealing).

Se demostró la expresión del gen *psy* en *Dunaliella* mediante amplificación *In Silico* por PCR, obteniendo un producto de 813 pb y 432 pb.

13.Recomendaciones

En esta investigación la evaluación de RT se encuentra enfocada a la concentración de esta durante la síntesis de ADN complementario, sin embargo, es necesario profundizar en los diversos factores que se relacionan a la interacción de la enzima, pues existen diversos factores que podrían afectar su eficacia.

Se recomiendo realizar estudios de expresión génica del gen *psy* en el laboratorio para corroborar lo obtenido *In Silico*.

14. Bibliografía

- Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99–120. <https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2222318>
- Burden, D. W. (2008). *Guide to the Homogenization of Biological Samples*. 7. <https://opsdiagnostics.com/notes/ranpri/Homogenization%20Guide%20ver.1.pdf>
- Coello, I. (2022). *Modelamiento in silico, un mecanismo de predicción para el estudio molecular del gen carotenogénico psy de Dunaliella sp.* <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/8127/1/UPSE-TBM-2022-0005.pdf>
- Coesel, S. N., Baumgartner, A. C., Teles, L. M., Ramos, A. A., Henriques, N. M., Cancela, L., & Varela, J. C. S. (2008). Nutrient Limitation is the Main Regulatory Factor for Carotenoid Accumulation and for *psy* and *Pds* Steady State Transcript Levels in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) Exposed to High Light and Salt Stress. *Marine Biotechnology*, 10(5), 602. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9100-2>
- Departamento de control de calidad del Banco Nacional de ADN. (2020). *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*. https://cit.ligecancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-%20QC%20PF%20Saint-
- Docmatics. (2022). *Create an Agarose Gel*. <https://support.snapgene.com/hc/en-us/articles/10384180657684-Create-an-Agarose-Gel>

- Fawley, M. W., & Fawley, K. P. (2004). A SIMPLE AND RAPID TECHNIQUE FOR THE ISOLATION OF DNA FROM MICROALGAE ¹. *Journal of Phycology*, 40(1), 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2004.03-081.x>
- Fisher Scientific Thermo. (2018). *High Capacity ADNc Reverse Transcription Kit*. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf
- Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2006). Quantitation of <scp>DNA</scp> and <scp>RNA</scp> with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Molecular Biology*, 76(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03ds76>
- Gangali, S., Shahriari, F., & Ahmadzadeh, H. (2019). *Gene Expression Analysis in Dunaliella salina Under Salt Stress*. 288–300.
- Genome Center Maastricht. (2018). *Quality assessment of total RNA*. <http://biomedicalgenomics.org/index.html>
- Gerald Karp, G. C., & Patsy Jenny, P. (2015). *Biología celular y molecular*.
- González, M., & Gómez, P. (2009). *Taxonomía y filogenia del género Dunaliella*.
- Hastings, P. J. (2013). Complementary DNA. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (p. 110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00304-1>
- Instituto Nacional de Cáncer NCI. (2011). *Diccionario de cáncer. RT-PCR*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/rt-pcr>
- IST Innuscreen GmbH. (2022). *Proteinase K (6 mg / 30 mg)*. <https://innuscreen.ist->

ag.com/products/proteinase-k-6-mg-30-mg

- Jue, E., Witters, D., & Ismagilov, R. F. (2020). Two-phase wash to solve the ubiquitous contaminant-carryover problem in commercial nucleic-acid extraction kits. *Scientific Reports*, *10*(1), 1940. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58586-3>
- Kim, M., Park, S., Polle, J. E. W., & Jin, E. (2010). Gene expression profiling of *Dunaliella* sp. acclimated to different salinities. *Phycological Research*, *58*(1), 17–28. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2009.00554.x>
- Kuckartz, U., Rädiker, S., Ebert, T., & Schehl, J. (2013). *Statistik*. VS Verlag für Sozialwissenschaften. <https://doi.org/10.1007/978-3-531-19890-3>
- Kumar, A., & Chordia, N. (2015). *In Silico PCR Primer Designing and Validation* (pp. 143–151). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_10
- Lao, Y.-M., Xiao, L., Ye, Z., Jiang, J.-G., & Zhou, S.-S. (2011). In silico analysis of phytoene synthase and its promoter reveals hints for regulation mechanisms of carotenogenesis in *Dunaliella bardawil*. *Bioinformatics*, *27*(16), 2201–2208. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr371>
- Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W., Schlüter, A., Liebl, W., & Klocke, M. (2016). DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering*, *3*(1), 7. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3010007>
- Leonardi, P., & Caceres, E. (1994). *Comparative analysis of the fine structure of young and adult individuals of Dunaliella salina (polyblepharidaceae, chlorophyceae)*

with emphasis on the flagellar apparatus. 642–653.

- Li, Y., Cai, X., Gu, W., & Wang, G. (2020a). Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* under red and blue light. *Journal of Oceanology and Limnology*, *38*(1), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9064-2>
- Li, Y., Cai, X., Gu, W., & Wang, G. (2020b). Transcriptome analysis of carotenoid biosynthesis in *Dunaliella salina* under red and blue light. *Journal of Oceanology and Limnology*, *38*(1), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9064-2>
- Liang, M., Xie, S., Chen, H., & Jiang, J. (2023). DbMADS regulates carotenoid metabolism by repressing two carotenogenic genes in the green alga *Dunaliella* sp. FACHB-847. *Journal of Cellular Physiology*, *238*(6), 1324–1335. <https://doi.org/10.1002/jcp.31017>
- Lichtenauer, M., Nickl, S., Hoetzenecker, K., Mangold, A., Moser, B., Zimmermann, M., Hacker, S., Niederpold, T., Mitterbauer, A., & Ankersmit, H. J. (2009). Phosphate Buffered Saline Containing Calcium and Magnesium Elicits Increased Secretion of Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Laboratory Medicine*, *40*(5), 290–293. <https://doi.org/10.1309/LMBMG5A7NOVQBXWD>
- Lindén, J., Ranta, J., & Pohjanvirta, R. (2012). Bayesian modeling of reproducibility and robustness of RNA reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, *428*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.06.010>
- Martins-Gomes, C., & Silva, A. M. (2018). *Western Blot Methodologies for Analysis of In Vitro Protein Expression Induced by Teratogenic Agents* (pp. 191–203).

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7883-0_9

Murray, D., Doran, P., MacMathuna, P., & Moss, A. C. (2007). In silico gene expression analysis - An overview. In *Molecular Cancer* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-50>

Nunes, A. L. F., Lima, V. S., Miranda Júnior, J. R., Resende, M. E. T., Silva, C. A. S. da, Martins, M. A., & Coimbra, J. S. dos R. (2024). Cell disruption of microalgae: advances and perspectives. *Ciência Rural*, 54(5). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220330>

Olmos, J., Paniagua, J., & Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Letters in Applied Microbiology*, 30(1), 80–84. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00672.x>

Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>

Pelley, J. W. (2012). Recombinant DNA and Biotechnology. In *Elsevier's Integrated Review Biochemistry* (pp. 161–169). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-07446-9.00018-0>

Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W.-H., Ling, T. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2018). Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. *Energy Conversion and Management*, 173, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.054>

Polle, J. E. W., Roth, R., Ben-Amotz, A., & Goodenough, U. (2020). Ultrastructure of the green alga *Dunaliella salina* strain CCAP19/18 (Chlorophyta) as investigated

- by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Algal Research*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101953>
- Poong, S., Lim, P., Lai, J. W. -S., & Phang, S. (2017). Optimization of high quality total RNA isolation from the microalga, *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) for next-generation sequencing. *Physiological Research*, 65(2), 146–150. <https://doi.org/10.1111/pre.12165>
- Preetha, K., John, L., Subin, C. S., & Vijayan, K. K. (2012). Phenotypic and genetic characterization of *Dunaliella* (Chlorophyta) from Indian salinas and their diversity. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-27>
- Raj, A. (2023). *Protein synthesis and Transcription and Translation*. [https://doi.org/10.37532/oabr.2023.6\(2\).20-22](https://doi.org/10.37532/oabr.2023.6(2).20-22)
- Recurso NCBI. (2024). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. Sequences Producing Significant Alignments. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Sambrook, J., & David W, R. (2012). *Molecular-cloning-a-laboratory-manual-by-joseph-sambrook-david-w-russel* (Tercera edición).
- Sandmann, G. (2001). Carotenoid Biosynthesis and Biotechnological Application. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 4–12. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2170>
- Santana, H., Díaz, C., Amor, A., & Suárez, Y. (2015). Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*, 31.
- Schwaber, J., Andersen, S., & Nielsen, L. (2019). Shedding light: The importance of

- reverse transcription efficiency standards in data interpretation. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17, 100077.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.12.002>
- Simonelli, P., Troedsson, C., Nejstgaard, J. C., Zech, K., Larsen, J. B., & Frischer, M. E. (2009). Evaluation of DNA extraction and handling procedures for PCR-based copepod feeding studies. *Journal of Plankton Research*, 31(12), 1465–1474.
<https://doi.org/10.1093/plankt/fbp087>
- Solovchenko, A., Baulina, O., Ptushenko, O., & Gorelova, O. (2019). Ultrastructural patterns of photoacclimation and photodamage to photosynthetic algae cell under environmental stress. *Physiologia Plantarum*, 166(1), 251–263.
<https://doi.org/10.1111/ppl.12912>
- Stirk, W. A., Bálint, P., Vambe, M., Lovász, C., Molnár, Z., van Staden, J., & Ördög, V. (2020). Effect of cell disruption methods on the extraction of bioactive metabolites from microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*, 307, 35–43.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.10.012>
- Tear, C. J. Y., Lim, C., Wu, J., & Zhao, H. (2013). Accumulated lipids rather than the rigid cell walls impede the extraction of genetic materials for effective colony PCRs in *Chlorella vulgaris*. *Microbial Cell Factories*, 12(1), 106.
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-106>
- Thermo Fisher Scientific. (2006). *Kit de purificación de ARN GeneJET*.
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *PureLink® RNA Mini Kit*.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_rna_mini_kit_man.

pdf

Thermo Fisher Scientific. (2018). *cDNA Synthesis System*.

Thermo Fisher Scientific. (2023). *The RNA isolation, The basics*.

<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/general-articles/the-basics-rna-isolation.html>

Thermo Fisher Scientific. (2024). *PCR Basics*.

<https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

Thermo Fisher Scientific. (2016). *NanoDrop One User Guide* (Vol. 1).

Tomalá, D. (2021). *Mapeo de restricción del gen 18S-ARNr: Una alternativa rápida en la identificación molecular de Dunaliella sp.*

Tomaszewski, C. (2022, September). *An Overview of Complementary DNA Synthesis*.

<https://visikol.com/blog/2022/09/13/an-overview-of-complementary-dna-synthesis/>

Tung, J., Daugherty, B., O'Neill, L., & Law, S. (1989). *PCR amplification of specific sequences from a cDNA library*.

Unneberg, P., & Tekniska, högskolan. (2004). *Computational approaches for in-depth analysis of cDNA sequence tags*. Tekniska högsk.

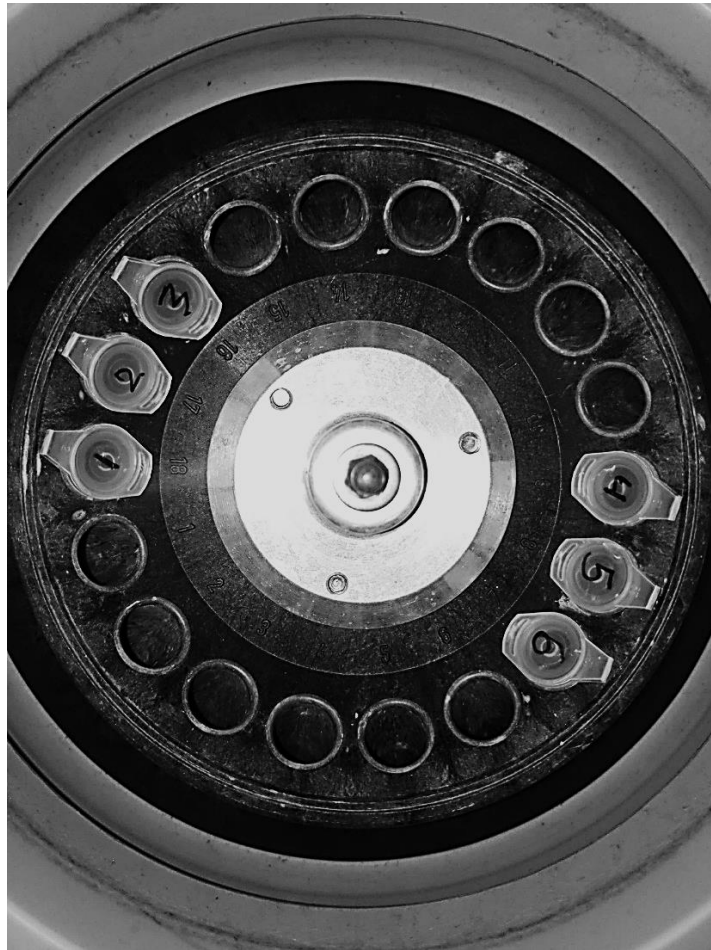
Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., Souza, P. R. E. de, Carvalho, A. de A. T., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*,

40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>

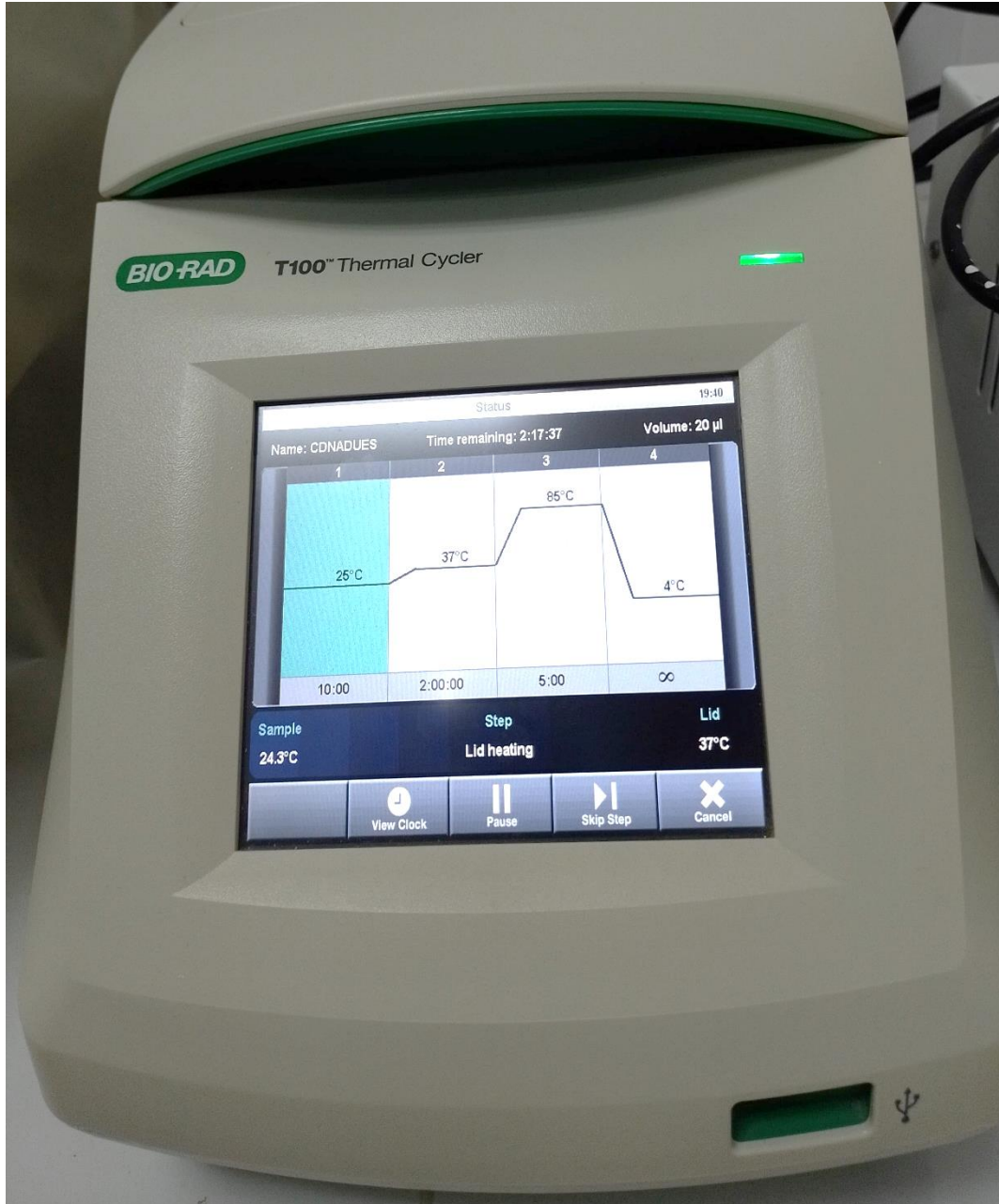
- Wangen, R., Aasebø, E., Trentani, A., Døskeland, S.-O., Bruserud, Ø., Selheim, F., & Hernandez-Valladares, M. (2018). Preservation Method and Phosphate Buffered Saline Washing Affect the Acute Myeloid Leukemia Proteome. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 296. <https://doi.org/10.3390/ijms19010296>
- Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). *BLAST QuickStart*. Humana Press.
- Woyda-Ploszczyca, A. M., & Rybak, A. S. (2021). How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102474>
- Ye, Z.-W., Jiang, J.-G., & Wu, G.-H. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26(4), 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>
- Zamani, H., & Moradshahi, A. (2016). Transcript levels of phytoene desaturase gene in *Dunaliella salina* Teod. as affected by PbS nanoparticles and light intensity. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3), 193–199.
- Zepeda, G. (2017). *Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la microalga Dunaliella sp. en diferentes condiciones de cultivo*.
- Zhu, H., Zhang, H., Xu, Y., Laššáková, S., Korabečná, M., & Neuzil, P. (2020). PCR past, present and future. In *BioTechniques* (Vol. 69, Issue 4, pp. 317–325). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0057>

15. Anexos

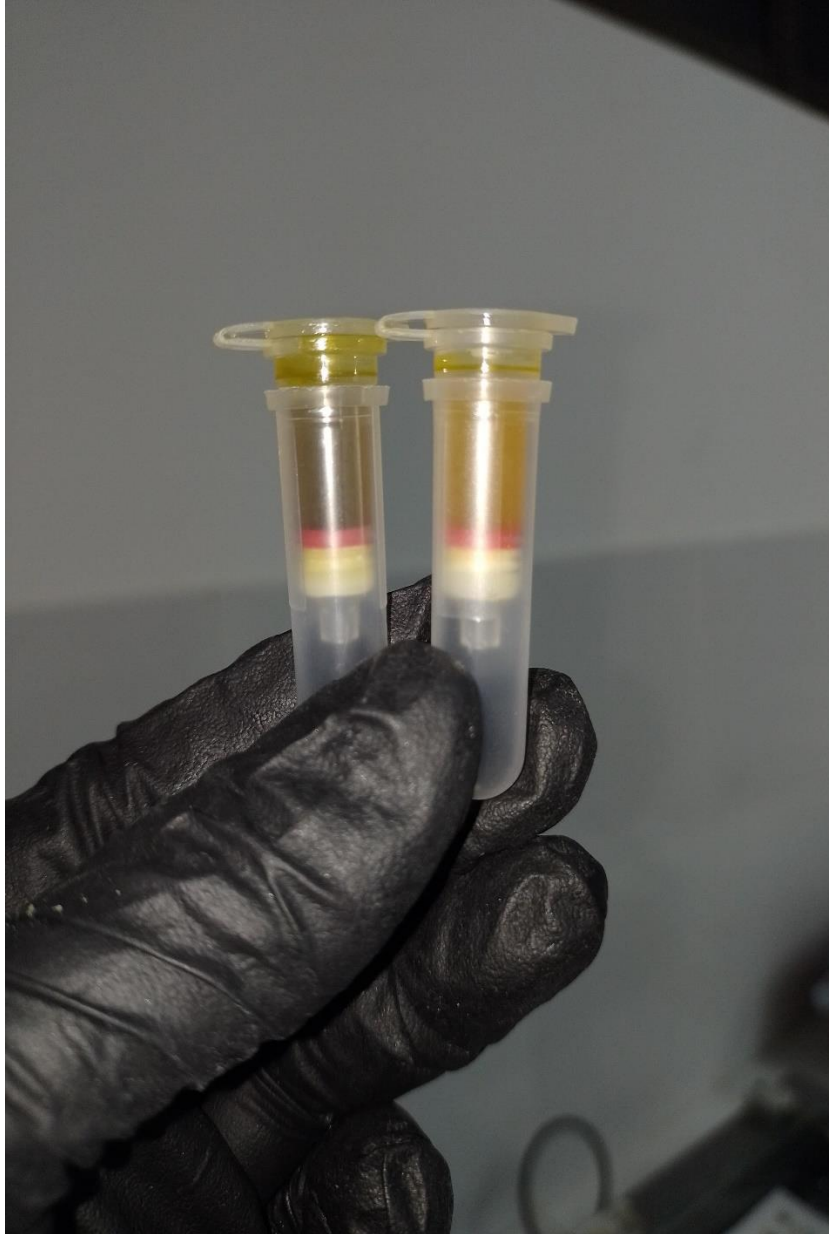
Anexos 1. Muestras de *Dunaliella spp* estresada en tubos eppendorf para centrifugar



Anexos 2. Temperaturas preestablecidas para la síntesis de ADN complementario



Anexos 3. Columnas de centrifugación para la purificación del ARN total



Anexos 4. Tubos de microcentrífuga con MasterMix para la síntesis de ADN complementario

