



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

ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) COMO
BASE MOLECULAR PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN
Dunaliella spp.

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título de

BIÓLOGO

AUTOR:

REYES PRADO LAURA STEFANÍA

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

**ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) COMO
BASE MOLECULAR PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN
*Dunaliella spp.***

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título de

BIÓLOGO

AUTOR:

REYES PRADO LAURA STEFANÍA

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, “Análisis de la calidad del ADN complementario (ADNc) como base molecular para estudios de expresión génica en *Dunaliella spp.*”, elaborado por Reyes Prado Laura Stefanía, 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 Bióloga, 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

C.I.0201234044

III

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**Análisis de la calidad del ADN complementario (ADNc) como base molecular para estudios de expresión génica en *Dunaliella spp.***”, elaborado por Reyes Prado Laura Stefanía, 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



Acui. José Melena Cevallos Ph.D.

DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0913432613

DEDICATORIA

A mi querida madre Luisa Prado Preciado, mi inspiración y pilar cuyo amor, infinita paciencia, apoyo inquebrantable y aliento constante han sido fundamentales en mi desarrollo profesional. Su sacrificio y dedicación me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia. Mi hermana Gabriela Prado Preciado, quien me brindó su apoyo incondicional, su aura positiva, continuo ánimo y respaldo siempre. Mi abuela Petra Aroca, mi prima Leakedia Caicedo y a mi sobrino Elvis Quinde, quienes con su cariño y motivación me impulsaron a superarme día a día. Mi mejor amiga Edith Suárez, mi confidente, tu presencia a pesar de la distancia ha sido un regalo invaluable en cada etapa de mi vida. Mis maestros y mentores, cuyas enseñanzas y guía han sido importantes en mi desarrollo académico y personal. Mis amigos por estar a mi lado compartiendo alegrías y dificultades, por hacer de este camino una experiencia inolvidable.

Les dedico este logro a todos como muestra de mi agradecimiento por haber participado activamente en mi proceso educativo.

AGRADECIMIENTO

Extiendo mi más sincero y profundo agradecimiento:

A las autoridades y personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por su guía, apoyo y disposición al desarrollar el trabajo de integración curricular, esencialmente al Decano, Blgo. Richard Duque Marín, M.Sc. y al director de la Carrera de Biología, Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.

Agradezco a la Blga. Janeth Galarza Tipán, PhD., tutora del presente estudio, mi mentora, su palabras de motivación e invaluable tiempo dedicado, además de su orientación científica fueron clave en cada etapa de esta investigación. Sus valiosos consejos, sabiduría, paciencia y compromiso han impactado positivamente mi vida profesional, atesoraré siempre sus enseñanzas.

Además, me gustaría agradecer al director del CEB-UPSE, Blgo. Javier Soto, PhD y a la Blga. Sara Ríos, por su colaboración y por haber facilitado el ingreso a las instalaciones de los laboratorios.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Reyes Prado Laura Stefanía** como requisito parcial para la obtención del grado de Bióloga de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

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



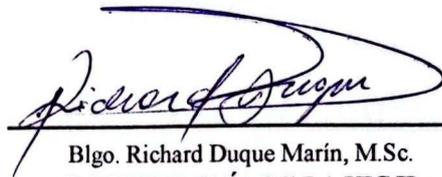
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ac. José Melena Cevallos, Ph.D.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



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



Blgo. Richard Duque Marín, M.Sc.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Paseual Roca Silvestre, Mgtr.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Manifiesto que la responsabilidad por las ideas, contenido y resultados plasmados en este Trabajo de Integración Curricular pertenecen exclusivamente a la autora, el patrimonio intelectual del mismo le corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.



Laura Stefania Reyes Prado

C.I: 2450717034

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	XX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVO GENERAL.....	9
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
6. HIPÓTESIS.....	9
7. MARCO TEÓRICO.....	10
7.1. Importancia del ARNm en Estudios Moleculares	10
7.2. Fundamento de la Extracción de ARN.....	12
7.3. Métodos Convencionales de Extracción de ARN	14
7.3.1. Método de Guanidina – Tiocianato – Fenol – Cloroformo.....	14
7.3.2. Método de CTAB.....	14
7.3.3. Método de SDS	15
7.3.4. Método utilizando TRIzol (reactivo TRI).....	15
7.4. Métodos de Extracción y Purificación Utilizando Kits Comerciales.....	16
7.4.1. PureLink® RNA Mini Kit	16
7.4.2. GeneJET™ RNA Purification Kit	17
7.5. Métodos de Cuantificación del ARN	17
7.5.1. Método de espectrofotometría UV	17
7.5.2. Método de Fluorescencia	18

7.5.3.	Método de Gel de electroforesis	18
7.6.	Síntesis de ADN complementario (ADNc) a Partir del ARNm	19
7.6.1.	Enzima transcriptasa inversa.....	19
7.6.2.	Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	19
7.6.3.	Purificación y amplificación del ADNc	20
7.6.4.	La microalga <i>Dunaliella spp.</i> , como modelo para estudios de expresión génica	21
8.	MARCO METODOLÓGICO.....	25
8.1.	Obtención de la Muestra.....	25
8.2.	Preparación del material y condiciones de laboratorio.....	25
8.3.	Lavado de la muestra.....	26
8.4.	Pruebas de extracción de ARN.....	26
8.4.1.	Protocolo a partir de Columna de sílice (Invitrogen™ 12183018A)	27
8.4.2.	Protocolo a partir de Columna de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732)	29
8.5.	Cuantificación y evaluación del ARN extraído.....	30
8.6.	Protocolo de retro-transcripción ARN-ADNc (<i>Applied Biosystems™</i> <i>4368814</i>)	31
8.6.1.	Preparación del Master mix de transcripción inversa	31
8.6.2.	Preparaciones de las reacciones de transcripción inversa	32
8.7.	Análisis estadísticos.....	33
9.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	34
9.1.	Análisis del ARN extraído por condición de la muestra y por cada protocolo aplicado	34

9.1.1.	Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo I. Columna de sílice (Invitrogen™ 12183018A)	34
9.1.2.	Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo II. Columna de sílice modificado (Invitrogen™ 12183018A).....	36
9.1.3.	Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo III. Columna de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732).....	37
9.1.4.	Análisis de extracción de ARN en muestras congeladas entre protocolos	39
9.1.5.	Análisis de extracción de ARN en muestras directas entre protocolos.	40
9.2.	Análisis Espectrofotométrico del ARN Total.....	44
9.3.	Análisis Multivariado de la Extracción de ARN	45
9.4.	Análisis de la síntesis de ADNc	46
9.4.1.	Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo I de extracción de ARN	46
9.4.2.	Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo II de extracción de ARN	49
9.4.3.	Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo III de extracción de ARN	51
9.5.	Evaluación del ADNc por protocolo de ARN	53
9.6.	Análisis multivariado de la síntesis de ADNc	56
9.7.	Análisis del rendimiento del ADNc	57
10.	DISCUSIONES.....	60
11.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
11.1.	Conclusiones.....	67

11.2.	Recomendaciones	68
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	69
13.	ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. ARNm en eucariotas.....	11
Figura 2. Esquema del proceso general de extracción de ARN.....	13
Figura 3. Esquema de la comparación entre RT-PCR, qPCR y RT-qPCR.....	21
Figura 4. Ruta metabólica de la producción de carotenoides en <i>Dunaliella</i>	23
Figura 5. Concentración en ng/μL de ARN por condición de muestra en Protocolo I.	35
Figura 6. Relación A260/280 de ARN por condición de muestra en Protocolo I.....	35
Figura 7. Concentración (ng/μL) de ARN por condición de la muestra en Protocolo II.	36
Figura 8. Relación A260/280 de ARN por condición de la muestra en Protocolo II.	37
Figura 9. Concentración (ng/μL) de ARN por condición de la muestra en Protocolo III.....	38
Figura 10. Relación A260/280 de ARN por condición de la muestra en Protocolo III.....	38
Figura 11. Análisis de la concentración (ng/μL) de ARN para muestras congeladas entre los protocolos de extracción.....	39
Figura 12. Análisis de la relación A260/280 de ARN para muestras congeladas entre los protocolos de extracción.....	40
Figura 13. Análisis de la concentración (ng/μL) de ARN para muestras directas entre los protocolos de extracción.....	41
Figura 14. Análisis de la relación A260/280 de ARN para muestras directas entre los protocolos de extracción.	41
Figura 15. Comparación de las mejores espectros por condición de muestra de los protocolos de ARN analizadas en Nanodrop	45
Figura 16. Comparación de la concentración en μg/μL de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo I de extracción de ARN	48

Figura 17. Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo I de extracción de ARN.	48
Figura 18. Comparación de la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo II de extracción de ARN.	50
Figura 19. Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo II de extracción de ARN.	50
Figura 20. Comparación de la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo III de extracción de ARN.....	52
Figura 21. Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo 3 de extracción de ARN.....	52
Figura 22. Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNc por protocolo de extracción de ARN	54
Figura 23. Relación A260/280 de ADNc por protocolo de extracción de ARN.	55
Figura 24. Comparación de los rendimientos de ADNc utilizando los cuatro protocolos de síntesis de ADNc.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de los componentes por reacción en μL , con y sin inhibidor de RNasas.....	32
Tabla 2. Programa de transcripción inversa.....	33
Tabla 3. Valores del promedio y desviación estándar de la concentración y calidad del ARN (relación A260/280) en muestras congeladas y directas por cada protocolo de extracción.....	42
Tabla 4. Comparación de métodos de extracción de ARN (M.C. = Muestra Congelada; M.D. = Muestra Directa).....	43
Tabla 5. Análisis multivariado de la extracción de ARN.....	46
Tabla 6. Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo I de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).	47
Tabla 7. Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo II de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).	49
Tabla 8. Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo III de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).....	51
Tabla 9. Comparación de la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y calidad del ADNc entre los protocolos de ARN (μ = media y Me = Mediana)	54
Tabla 10. Análisis multivariado de la síntesis de ADNc.....	56
Tabla 11. Rendimientos de ADNc mediante variación en la Transcriptasa inversa y adición de Inhibidor de RNasas.	58
Tabla 12. Rendimientos de ADNc por protocolo de ARN obtenidos a partir de protocolos de síntesis de ADNc..	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema del Protocolo II de extracción de ARN estandarizado (Invitrogen™ 12183018A).....	82
Anexo 2. Esquema del Protocolo de síntesis de ADNc estandarizado (Applied Biosystems™ 4368814).....	83
Anexo 3. Base de datos de la cuantificación de ARN extraído de muestras congeladas y directas.	84
Anexo 4. Base de datos de la cuantificación de ADNc por protocolo de ARN.	85
Anexo 5. Base de datos del rendimiento en ng ADNc por ng ARN.....	88
Anexo 6. Muestra de <i>Dunaliella spp.</i> congelada.....	88
Anexo 7. Cultivos de <i>Dunaliella spp.</i>	88
Anexo 8. Práctica de extracción de ARN.	89
Anexo 9. Procesamiento de muestras de ARN.	89
Anexo 10. Práctica de Síntesis de ADNc.....	89
Anexo 11. Muestras procesadas para ADNc.	90
Anexo 12. Separación de fases luego de la lisis celular en procedimiento de extracción de ARN.....	90

ABREVIATURAS

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARNr: ARN ribosomal

PI: Protocolo de extracción de ARN 1

PII: Protocolo de extracción de ARN 2

PIII: Protocolo de extracción de ARN 3

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

RT: Retrotranscriptasa o Transcriptasa inversa

RT 1 con inhibidor: 1 μ L de Transcriptasa inversa con inhibidor de RNasas

RT 1 sin inhibidor: 1 μ L de Transcriptasa inversa sin inhibidor de RNasas

RT 1.5 con inhibidor: 1.5 μ L de Transcriptasa inversa con inhibidor de RNasas

RT 1.5 sin inhibidor: 1.5 μ L de Transcriptasa inversa sin inhibidor de RNasas

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa

qRT-PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa

dNTP: Trifosfato de desoxirribonucleótido

rpm: Revoluciones por minuto

GLOSARIO

ARNm: Comprende de 1 a 5% del ARN total, juegan el rol de transferir la información desde el ADN hasta los ribosomas, donde son traducidos a proteínas. Hebras monocatenarias de secuencia complementaria al ADN molde, varían respecto al tamaño de cada gen.

ARNt: Corresponde un aproximado del 15% del ARN de una célula, es un adaptador de aminoácidos durante la síntesis de proteínas, cada ARNt es específico, por lo tanto, reconocido un solo aminoácidos. La mayor parte de nucleótidos se encuentran apareados formando brazos u horquillas, poseen estructura secundaria denominada hoja de trébol.

ARNr: Constituye la mayor parte del ARN total, aproximadamente un 80% y forma el núcleo estructural y funcional de los ribosomas donde se realiza la síntesis proteica, son monocatenarios, pero se pliegan formando dominios estructurales autónomos.

Ribonucleasa RNasa: Son enzimas que hidrolizan o catalizan la rotura de cadenas del ácido ribonucleico.

Transcripción: Proceso en el cual la información cifrada en forma de secuencia de cuatro bases (A,T,C,G) en una cadena de ADN se plasma en una información escrita en lenguaje (A,U,C,G) en forma de cadena de ARN. Químicamente, es un proceso de síntesis de ARN a partir de cuatro ribonucleósidos trifosfatos (ATP, GTP, CTP, UTP) y d ADN que actúa como molde.

Cap 5': Protege al transcrito de la degradación.

Cola poliA: Aseguran la estabilidad del ARNm interviniendo en la exportación del ARNm al citoplasma, sirven de señal de reconocimiento al ribosoma.

Expresión génica: Proceso mediante el cual la información codificada en un gen es traducida en una proteína.

Transcriptómica: Estudio de todas las moléculas de ARN en una célula. Se basa en el análisis de los perfiles de expresión génica.

RESUMEN

La extracción de ARN y síntesis de ADNc son la base de la mayoría de análisis moleculares que implican expresión génica. Tanto la cantidad como la calidad del ARN garantizan una mayor precisión en los análisis posteriores, así mismo, la reacción de transcripción inversa es considerada un enfoque más rentable por su alta sensibilidad, sin embargo, el aislamiento de ARN intacto es un desafío por su susceptibilidad a la hidrólisis y degradación enzimática por medio de ribonucleasas. El presente estudio, tiene como objetivo principal analizar la calidad de ADN complementario (ADNc) obtenido desde el ARN total a través de la enzima transcriptasa inversa para estudios de expresión génica en *Dunaliella spp.*, se realizó en el laboratorio de molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, donde se compararon tres protocolos de ARN en dos condiciones de muestra (Muestra directa del cultivo; Muestra congelada) y cuatro protocolos para la síntesis de ADNc a partir de variaciones en la transcriptasa inversa (RT) e inhibidor de RNasas. Los resultados demostraron que el protocolo III a partir de columna de sílice con proteinasa K (*Thermo Scientific™ K0732*) fue más eficiente tanto para muestras congeladas como directas obteniendo altas concentraciones (Congelada = 734.2 ng/ μ L y Directa = 505.43 ng/ μ L) y purezas óptimas en A260/280 de (Congelada ~ 2 y Directa ~2). Para la síntesis de ADNc el método estandarizado se basó en agregar 1 μ L de RT y 1 μ L de inhibidor de RNasas por cada 8 μ L de ARN total (RT 1 con inhibidor), que presentó mayor rendimiento de ADNc (4.32 ng de ADNc/ ng de ARN), mientras que el protocolo con mejores índices de pureza de ADNc fue RT 1.5 sin inhibidor (~ 1.7 – 179). Se concluye que, en cualquier combinación entre método de ARN y protocolo de ADNc, las cantidades de ADNc sintetizadas son suficientes para estudios de expresión génica.

Palabras claves: ARN, Síntesis de ADNc, RT, Inhibidor de RNasas, Expresión génica.

ABSTRACT

RNA extraction and cDNA synthesis are the basis for most molecular analyses involving gene expression. Both the quantity and quality of RNA ensure greater accuracy in downstream analyses; likewise, the reverse transcription reaction is considered a more cost-effective approach because of its high sensitivity; however, isolation of intact RNA is challenging because of its susceptibility to hydrolysis and enzymatic degradation by ribonucleases. In the present study, the main objective was to analyze the quality of complementary DNA (cDNA) obtained from total RNA through reverse transcriptase enzyme for gene expression studies in *Dunaliella spp.*, it was carried out in the molecular laboratory of the Biotechnology Center of the Peninsula State University of Santa Elena, where three RNA protocols were compared in two sample conditions (direct sample from culture; frozen sample) and four protocols for cDNA synthesis from variations in reverse transcriptase (RT) and RNase inhibitor. The results showed that protocol III from silica column with proteinase K (Thermo Scientific™ K0732) was more efficient for both frozen and direct samples obtaining high concentrations (Frozen = 734.2 ng/ μ L and Direct = 505.43 ng/ μ L) and optimal purities at A260/280 of (Frozen \sim 2 and Direct \sim 2). For cDNA synthesis the standardized method was based on adding 1 μ L of RT and 1 μ L of RNase inhibitor per 8 μ L of total RNA (RT 1 with inhibitor), which presented higher cDNA yield (4.32 ng cDNA/ ng RNA), while the protocol with better cDNA purity rates was RT 1.5 without inhibitor (\sim 1.7 - 179). It is concluded that, in any combination of RNA method and cDNA protocol, the amounts of cDNA synthesized are sufficient for gene expression studies.

Keywords: RNA, cDNA synthesis, RT, RNase inhibitor, Gene expression.

1. INTRODUCCIÓN

La retrotranscripción o transcripción inversa es el primer paso de la mayoría de los análisis de la expresión génica que implica la síntesis de ADN a partir de una plantilla de ARN mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa (Minshall y Git, 2020; Mo, Wan y Zhang, 2016). Las investigaciones referentes al ARN han impulsado una comprensión más amplia y avanzada en cuanto a procesos bioquímicos de la salud, enfermedades, así mismo aportan a la ingeniería genética de algas para mejorar rasgos, en cuanto a un enfoque factible en el metabolismo de lípidos y desarrollo de herramientas genéticas avanzadas. La cuantificación y caracterización del ARN depende de la transcripción inversa (RT) (Verwilt, Mestdagh y Vandesomepele, 2023; Shi et al., 2022).

La importancia de la reacción de RT radica en el producto de ADNc, el cual debe reflejar la expresión genética de acuerdo a la cantidad de muestra de ARN inicial (Bustin & Nolan, 2017). La síntesis de ADNc como base molecular para la expresión génica conduce a uno de los pasos clave que es la RT-PCR o qRT-PCR, un enfoque de alta sensibilidad y rendimiento en términos de número de muestras, resultando más rentable. Se usa generalmente en los campos de investigación de ciencias biológicas para identificar y cuantificar transcripciones específicas (Sanders et al., 2014; Cholet, Ijaz y Smith, 2020).

Con el transcurso de los años, la transcriptómica unicelular se ha transformado en una tecnología revolucionaria que contribuye a la investigación científica (Zucha et

al., 2020), aunque se sabe que la RT es conocida como fuente de variabilidad, se ha prestado poca atención a aquello, por lo que, varios autores evalúan la capacidad de la transcriptasa inversa para realizar cambios de plantilla durante la síntesis de ADNc mediante reacción in vitro (Potapov et al., 2018; Bustin et al., 2015; Luo y Taylor, 1990). En previos trabajos relacionados al tema, se mostraron perfiles a nivel transcriptómica en respuesta al estrés hipersalino de *Dunaliella salina*, que indicó mejoras en procesos biológicos como fotosíntesis, fijación de carbono, procesamiento de proteínas, entre otros (He et al., 2020), así mismo, citando el estudio de Ganjali, Shahriari y Ahmadzadeh (2019), quienes analizaron las expresiones de genes asociados al estrés salino de *D. salina*, realizando la qRT-PCR.

Uno de los pasos cruciales para posteriores estudios moleculares es establecer un método de extracción de ARN total que cumpla con los criterios de pureza y concentración (Martínez-López, Leshner y Jiménez-García, 2013). Los enfoques de extracción de ARN citando a Kanani et al. (2019) implican tres pasos críticos: solubilización (alteración de células en solución), desproteinización (eliminación de proteínas) y recuperación de ARN libre de contaminantes.

Los métodos para el aislamiento y purificación de ácidos nucleicos se dividen en dos categorías: 1.1) métodos basados en soluciones y 1.2) protocolos basados en columnas (Tan & Yiap, 2009). En este estudio se utilizó el método por columnas a partir de kits comerciales modificados cuyas soluciones de extracción contienen

isotiocianato de guanidina, estos métodos se han utilizado con éxito para aislar ARN especialmente de tejidos en varias plantas (Carpinetti et al., 2021).

Después de la extracción del ARN el siguiente paso es la transcripción inversa, proceso de síntesis del ADNc a partir del ARN resultando en un ADN de cadena simple (ssDNA) (Kuang et al., 2018). Toda reacción de RT requiere al menos de cuatro componentes, los cuales son el ARN molde, cebadores oligonucleotídicos, enzima transcriptasa inversa y un tampón de RT (Verwilt, Mestdagh y Vandesompele, 2023; Sayed, Omar y Fathy, 2023).

El ADN genómico enfrenta desafíos al amplificar genes específicos mediante PCR, debido a la presencia de intrones que aumenta la probabilidad de errores en la expresión de un gen en particular (Ray, 2014). Sin embargo, el aislamiento de ARN intacto es un desafío dado que es susceptible a la hidrólisis, al igual que sensible a la degradación enzimática de ribonucleasas como RNasas que se encuentran dispersas naturalmente en los laboratorios (Carpinetti et al., 2021; Johnson et al., 2012). El ARN de baja calidad conduce a datos poco fiables durante los estudios de expresión génica (Kanani et al., 2019).

Para analizar la expresión génica es necesario e implica una buena extracción y purificación del ARN (Moebes et al., 2022). La calidad y la cantidad de ARN son factores importantes para garantizar la precisión de los análisis de expresión génica y otras aplicaciones posteriores en el ARN (Hidayat y Prasetyo, 2021). El conocimiento de funcionamiento de genes y expresión en las diversas especies, da apertura a una

nueva era de la transcriptómica y biotecnología en el territorio ecuatoriano (Chiluisa et al., 2017), así mismo, el análisis de la calidad de ADNc cubre un vacío en la investigación científica en los repositorios a nivel nacional.

Conociendo la importancia de utilizar el ADNc como base molecular, este trabajo tiene como finalidad analizar la calidad de ADN complementario (ADNc) obtenido desde el ARN total a través de la enzima transcriptasa inversa para estudios de expresión génica en *Dunaliella spp.*

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como preámbulo, la falta de instrucción sobre la obtención de ADN complementario (ADNc) limita la comprensión de la expresión génica en un organismo. En todas las células de un organismo pluricelular, el ADN genómico es igual, sin embargo, la expresión génica es diferencial, es decir, no todos los genes se pueden expresar al mismo tiempo, cantidad y en cada una de las células. A menudo, la amplificación de genes del ADN mediante PCR enfrenta desafíos debido a la presencia de intrones, lo que ralentiza el proceso y aumenta la probabilidad de errores en la expresión. Dado aquello, se acude al aislamiento de ARN, no obstante, la molécula de ARN no puede amplificarse directamente durante los siguientes pasos de la PCR, por lo que, debe convertirse estrictamente en ADNc.

La obtención de ADNc se considera una alternativa más efectiva para evaluar la expresión génica y realizar análisis moleculares, aunque la extracción de ARN de alta pureza es un reto, dada su rápida degradabilidad y baja estabilidad química ante la presencia de ribonucleasas. Al extraer ARN, uno de las principales complicaciones en los protocolos es la contaminación por ADN, lo cual resulta imposible diferenciar químicamente a nivel estructural del ADNc mediante la enzima utilizada en la amplificación por PCR, lo cual produce resultados falsos positivos, por tal motivo, el estandarizar un protocolo de ARN a partir de modificaciones como las rpm (revoluciones por minuto) y cantidades de reactivos es fundamental para la transcripción inversa.

Uno de los principales obstáculos al estudiar la expresión génica en *Dunaliella* radica en la escasa disponibilidad de secuencias de ADNc o transcritos completos. A nivel nacional, la información sobre la utilización del ADNc en expresión génica en microalgas, como *Dunaliella spp.*, es prácticamente inexistente en los repositorios. Sin embargo, la información científica internacional demuestra varios estudios donde se realizó expresión génica utilizando secuencias de ADNc para el análisis de genes específicos en bacterias, virus y hongos, así mismo, en organismos superiores.

3. JUSTIFICACIÓN

Desde una perspectiva actual, la investigación en genómica y expresión génica ha adquirido un carácter fundamental para la comprensión de los procesos biológicos en diversos organismos, incluyendo microorganismos unicelulares. Las secuencias de ADNc desempeñan un papel esencial en los estudios de transcriptómica al permitir la identificación de genes activos, la cuantificación de sus niveles de expresión y la comprensión detallada de las vías metabólicas y respuestas biológicas de un organismo.

El ADNc al ser sintetizado del ARN mensajero (ARNm) evita la intronización. Dentro de la célula, el pre-ARN ya pasó por el proceso post-transcripcional de maduración llamado splicing, es decir, ausencia de regiones no codificantes, por tal motivo, no será necesario eliminar intrones en estudios posteriores.

Para un análisis exacto y fiable de la expresión génica se requiere realizar una óptima extracción de ARN purificado y de alta calidad. Dada su alta degradabilidad y poca estabilidad, el proceso de extracción debe ser realizado con material y equipos esterilizados libres de RNasas, además de mantenerlo siempre en hielo para que se conserve a baja temperatura. Los contaminantes que comúnmente son cantidades incorrectas de reactivos utilizados en la extracción son controlados con modificaciones en los protocolos de los kits comerciales, por lo que, optimizar el protocolo puede demostrar una calidad y pureza de ARN significativamente mejor.

Con respecto a lo anterior, esta investigación contribuye a la comunidad universitaria al aportar conocimiento sobre la capacidad de transformación de la enzima transcriptasa inversa, para ver su correcto funcionamiento y conseguir un ADNc de alta calidad como base molecular para amplificación de genes dependiendo de la concentración y pureza. Presenta un impacto significativo al avanzar en la comprensión de la expresión génica como base molecular en *Dunaliella spp.*, lo que permitirá la identificación de genes clave, revelando su potencial biotecnológico para la producción de compuestos valiosos e incluso biorremediación.

Además, el estudio del análisis de la calidad de ADNc cubre un vacío en la investigación científica en los repositorios de universidades del Ecuador, convirtiéndose en un recurso de interés para la comunidad científica y, en particular, en la Península de Santa Elena, donde la falta de estudios específicos relacionados al ADNc es crítica, debido a su gran potencial como herramienta molecular para expresión génica.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar la calidad de ADN complementario (ADNc) obtenido desde el ARN total a través de la enzima transcriptasa inversa para estudios de expresión génica en *Dunaliella spp.*

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo de extracción de ARN total como base molecular de la expresión génica en *Dunaliella spp.*
- Estandarizar un protocolo de retrotranscripción ARN-ADNc a través de la transcriptasa inversa.
- Evaluar la calidad y cantidad de ADNc resultante de la retrotranscripción ARN-ADNc determinando su eficacia para expresión génica.

6. HIPÓTESIS

H₁: La cantidad y calidad del ADNc dependerá de la concentración y pureza del ARN total.

7. MARCO TEÓRICO

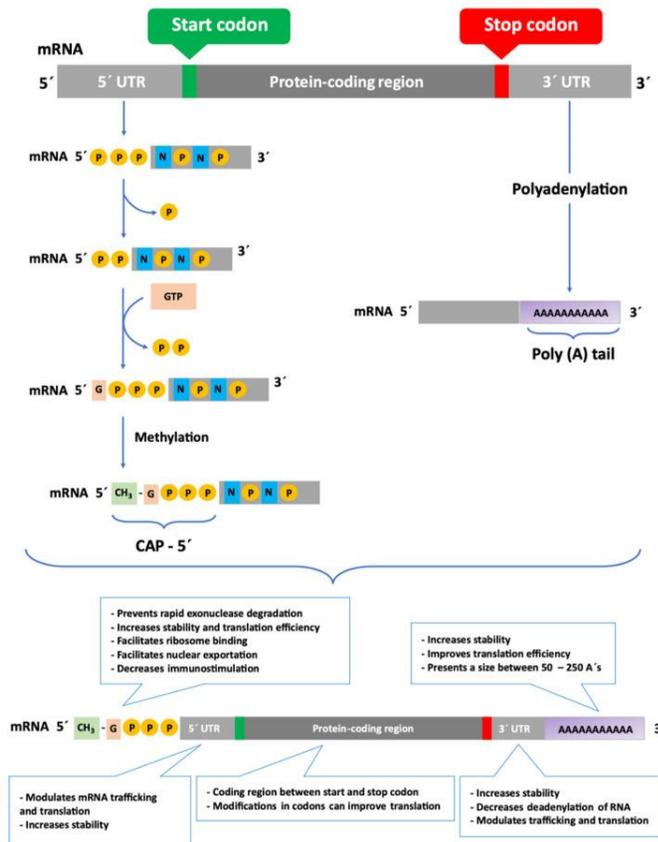
7.1.Importancia del ARNm en Estudios Moleculares

El ARN mensajero (ARNm) se considera dentro de los tipos de ARN, el único codificante en organismos, por lo que, es una plantilla que se encarga de transportar información genética y conducir la biosíntesis de proteínas (Zheng et al., 2021). Da paso a la traducción eficaz de la secuencia genética de ADN para producir proteínas por parte de los ribosomas en el citoplasma de la célula, cabe recalcar que dentro de la estructura del ARNm, su extremo 5', exhibe una región 5' UTR cuya secuencia de nucleótidos no codifica aminoácidos, consta de un resto 7-metilguanosina (m7G) además de un resto trifosfato hasta encontrarse con el primer nucleótido (m7GpppN), el segundo se denomina Tapa 5' o Cap-5' encargada de proteger al ARN de la escisión de la exonucleasa, también se encarga de regular el empalme del pre-ARNm, da comienzo a la traducción del ARNm y la exportación nuclear del ARNm al citoplasma. El ARNm cuenta con una región de secuencias de nucleótidos no codificantes alojados en el extremo 3' (3'UTR), esta modificación de la 3'UTR forma una "cola" poliadenilada (Poli A) dentro de un proceso denominado poliadenilación, la conocida cola poli (A) determina la vida útil del ARNm promoviendo la inhibición de la deadenilación por nucleasas, aportándole una mayor estabilidad al transcrito (Figura 1), resaltando que las UTR contienen secuencias reguladoras que se asocian con la estabilidad del ARNm para una correcta y eficiente traducción del mismo, se involucran en el reconocimiento del ARNm por los ribosomas para la modificación

postranscripcional del ARNm (Gote et al., 2023; Baptista et al., 2021; Chatterjee y Pal, 2009).

Figura 1

ARNm en eucariotas.



Nota: Se muestran sus regiones como 5'UTR, región codificantes de proteínas y 3' UTR. Se observa el proceso de poliadenilación e introducción de la Cap en el extremo 5'. Representado por P: grupo fosfato; N:nucleótido; CH₃: grupo metilo; A:adenina; G:guanina; UTR: región sin traducir (Baptista et al., 2021).

En la actualidad, la transcriptómica es de suma importancia para comprender la regulación genética de diversos procesos aplicados con mayor frecuencia en los ámbitos alimenticios y de salud, implica el uso de tecnologías de alto rendimiento, como microarrays, secuencias de ARN y RT-PCR. Dentro de la industria alimenticia,

la transcriptómica juega un papel fundamental en seguridad alimentaria, mejora nutricional, análisis microbiano, procesamiento e incluso conservación de alimentos (Choudhary et al., 2024). Dentro del ámbito farmacéutico y de salud, se han desarrollado tecnologías de ARNm, que se refiere a la transferencia de un ARNm que codifica un antígeno o proteína terapéutica de interés dentro del citoplasma, aquel mensaje genético cuando se traduce funciona para estimular una respuesta inmune o modificar el curso de una enfermedad. En contraste a la terapia con ADN, el ARNm no requiere entrada nuclear, debido a que, la expresión génica se genera de forma directa en el citoplasma (Youssef et al., 2023). El ARNm posee un alto rendimiento de transcripción in vitro y presenta potencial para una producción rápida, barata y a gran escala, actualmente se conocen dos tipos de ARNm utilizados en investigaciones fármacos, el ARNm no replicante y el ARNm autoamplificado que provienen de fuentes virales (Yang et al., 2022).

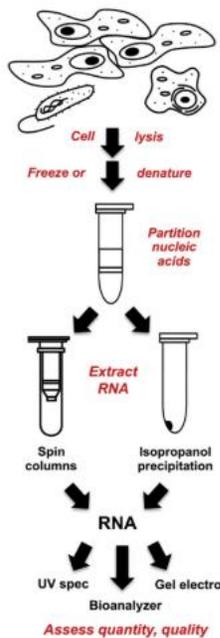
7.2.Fundamento de la Extracción de ARN

La molécula del ARN se considera inestable dada su corta vida que presenta una vez extraído de la muestra de estudio, la extracción de ARN se fundamenta en una técnica correcta dentro del laboratorio esencialmente libre de ARNasa (Tan et al., 2009). El aislamiento de ARN se basa comúnmente de 5 pasos: 1) Lisis y homogenización celular, se necesita una lisis celular eficiente para que se liberen los ácidos nucleicos; 2) Apagado o enfriamiento de los procesos bioquímicos, cuando se

realiza el primer paso, el ARN queda liberado y propenso a actividades enzimática de su entorno que pueden afectar la integridad del ácido nucleico, por tal motivo, los disolvente que solubilizan el contenido celular (Ejemplo: fenolcloroformo) o agente caotrópicos, en la mayoría de los procesos el paso 1 y 2 se unifican; 3) Separación del ácido nucleico, la separación de las fases dentro del tubo se logra a partir de la centrifugación donde se separan 3 fases: la fase acuosa, fase orgánica e interfase; 4) Recuperación del ARN, el ARN se encuentra en la fase acuosa donde se puede extraer de diversos métodos que se detallan en los siguientes apartados; 5), evaluación de la calidad del ARN (Cai et al., 2015).

Figura 2

Esquema del proceso general de extracción de ARN.



Nota: (Cai et al., 2015).

7.3. Métodos Convencionales de Extracción de ARN

7.3.1. Método de Guanidina – Tiocianato – Fenol – Cloroformo

El isotiocianato de guanidina en la extracción de ARN era un método muy laborioso, por tal motivo, fue desarrollada una técnica de un solo paso, dado que el homogeneizado se extrae con fenol/cloroformo a pH reducido, el agente caotrópico tiocianato de guanidina cumple la función de degradar proteínas. El principio de esta técnica se basa en que el ARN se separe del ADN después de la extracción mediante una solución ácida que contiene tiocianato de guanidina, acetato de sodio, fenol y cloroformo, recalando que el pH influye en la separación de fases, el ARN se encontrará en condiciones ácidas en la fase acuosa superior de la mezcla, el ADN y proteínas en la interfase o fase orgánica inferior, para el paso de recuperación del ARN total se utiliza isopropanol por precipitación (Tan et al., 2009).

7.3.2. Método de CTAB

El método Bromuro de cetil trimetilamonio es utilizado frecuentemente para aislar ácidos nucleicos, en especial de plantas que contienen polisacáridos, el tampón de extracción CTAB está compuesto por CTAB, polivinilpirrolidona (PVP), cloruro de sodio y β -mercaptoetanol donde cada uno desempeña una función (Kiss et al., 2024). El CTAB al ser un tensioactivo catiónico, se encarga de solubilizar las paredes celulares, donde interactúa con ácidos nucleicos aniónicos reduciendo el rendimiento de ADN, se destaca que altas concentraciones de cloruro de sodio anticipan la

formación de complejos de CTAB-ácido nucleico, por último, se agrega cloruro de litio para precipitar el ARN eficientemente (Liyanage et al, 2021).

7.3.3. Método de SDS

Es posible purificar ARN mediante solubilización en dodecil sulfato sódico (SDS), dicho químico es un detergente iónico que se encarga de disolver las membranas de las células, por consiguiente, irrumpe la interacción proteína – ácido nucleico e inactiva RNasas. Los ácidos nucleicos se van a precipitar en la fase acuosa salina, al contrario de las proteínas que se separan en la interfaz orgánica/acuosa (Rio et al., 2010).

7.3.4. Método utilizando TRIzol (reactivo TRI)

Es un método de solubilización y extracción de ARN mediante el reactivo TRI desarrollado particularmente para desproteinizar el ARN. Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que en conjunto solubilizan el material biológico y lo liberan de la contaminación por proteínas, luego se le adiciona cloroformo para lograr separar las fases donde la proteína se desplaza a la fase orgánica, el ADN se encuentra en la interfaz y el ARN se precipita en la fase acuosa. La extracción a partir de este reactivo es considerada un protocolo eficaz para aislar otros tipos de ARN, sin embargo, se recalca que el TRIzol es muy costoso y el ARN puede ser complicado de resuspender (Rio et al., 2010).

7.4. Métodos de Extracción y Purificación Utilizando Kits Comerciales

La extracción de ácidos nucleicos mediante fase sólida se encuentra en la mayoría de kits de extracción comerciales, permite una eficiente y rápida purificación en contraste con los métodos convencionales. Una de las ventajas que ofrece es que evita problemas asociados a la extracción líquido-líquido obteniendo una posible separación incompleta de fases. Comúnmente para la purificación en fase sólida se utiliza una columna de centrifugación. Las matrices de sílice y partículas de vidrio son usadas como soporte sólido para la purificación de ARN (Tan y Yiap, 2009). La purificación con matrices a base de sílice permite una extracción en menos tiempo y más eficaz del ARN en presencia de iones caotrópicos que desnaturalizan de inmediato las RNAsas. Estas sustancias caotrópicas ayudan al lisado de células de varios organismos que presentan paredes celulares difíciles de romper (Mutiu y Brandl, 2005).

Los sistemas de aislamiento de ARN que están basados en columnas de sílice y partículas paramagnéticas no necesitan de disolvente orgánicos tóxicos, por lo que, resultan ser eficaces, sencillos y de bajo costo produciendo altas cantidades de ARN (Tavares et al., 2011).

7.4.1. *PureLink® RNA Mini Kit*

Es un método fiable y sencillo para aislar ARN total de alta pureza a partir de diferentes fuentes como células, tejidos de animales, vegetales, sangre, bacterias, etc. El protocolo consiste en lisar y homogeneizar las muestras con la ayuda del reactivo isotiocianato de guanidina siendo una sal caotrópica que protege al ARN de

ribonucleasas. Luego se procesa mediante un Spin que consta de una membrana transparente de sílice en la que se une el ARN (Thermo Fisher Scientific, 2012).

7.4.2. *GeneJET™ RNA Purification Kit*

Sistema sencillo y eficiente para lograr purificar ARN total de células de mamíferos, tejidos, sangre, bacterias, levaduras, etc. El kit cuenta con una tecnología de membrana basada en sílice que se encuentra en forma de columna de centrifugación, de esta forma, elimina el uso de reactivos tóxicos como fenol cloroformo, entre otros. Se realiza la lisis mediante el tampón de lisis que está compuesto de tiocianato de guanidina cuya función es proteger el ARN de RNAsas endógenas (Thermo Fisher Scientific, 2015).

7.5. Métodos de Cuantificación del ARN

7.5.1. *Método de espectrofotometría UV*

Una forma de determinar la concentración de ácidos nucleicos es midiendo la absorbancia ultravioleta (UV) a la longitud de onda de 260 nm, aquellas absorbancia ayudan a cuantificar la concentración del ácido nucleico a partir del coeficiente de extinción del ARN. Este método de cuantificación es simple, directo y no requiere de grandes volúmenes de muestras para medir, sin embargo, una de sus complicaciones es que puede no ser específica. Los componentes de la matriz que absorben las ondas de absorbancia pueden llevar a errores e imprecisiones en cuanto a la concentración del ácido nucleico (Alvine et al., 2023). A pesar de que las lecturas de absorbancia no

logran discriminar entre ADN y ARN, la relación de A260/280 nm pueden ser un indicativo del ácido nucleico predominante. Las proteínas son absorbidas por la onda 280nm, y otros contaminantes como sustancias fenólicas que se absorben a 230 nm (Gallagher, 2011).

7.5.2. Método de Fluorescencia

El método por fluorescencia hace uso de un fluorómetro junto a un colorante fluorescente de unión a ARN que específicamente se une al ARN monocatenario, la intensidad de la fluorescencia va a depender de la cantidad de colorante de unión, es decir, se calcula comparándola con una curva estándar que es generada mediante una solución de referencia de concentración de ARN, la cuantificación de ácidos nucleicos a menudo se realiza mediante el dispositivo fluorómetro Qubit que está basado en la intensidad de fluorescencia de la unión de un tinte fluorométrico como por ejemplo el PicoGreen al ácido nucleico (Schipor et al., 2016; Nakayama et al., 2016).

7.5.3. Método de Gel de electroforesis

Es posible confirmar la integridad del ARN mediante electroforesis en gel, además de que permite visualizar ARNr 18S y 28S. Es difícil la cuantificación de ARN en gel desnaturizante que requiere formaldehído, una sustancia tóxica por inhalación clasificado como cancerígeno, por tal motivo, se ha convertido en uno de los métodos de cuantificación menos frecuentes (Peirson y Butler, 2007).

7.6. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a Partir del ARNm

7.6.1. *Enzima transcriptasa inversa*

La transcriptasa inversa es una enzima que usa ARN como plantilla para sintetizar ADN. Se descubrió en las décadas de los 70s y desde ahí hasta la fecha se llevan a cabo en prácticas comunes de laboratorio. Las RT sirven para resolver variadas tareas cuando el ARN es motivo de preocupación, puede ayudar a la detección o clonación de patógenos hasta el análisis del transcriptoma unicelular (Escarban y Filipenko, 2021). Entre las propiedades que presentan las RT esta su actividad catalítica (incluyendo temperaturas elevadas), alta fidelidad y afinidad entre el cebador y la plantilla de ARN. Estas enzimas pueden provenir del virus de la leucemia murina u otros virus como el de la mieloblastosis aviar o VIH-1, al igual que de intrones bacterianos del grupo II, todas aquellas son eficiente, sin embargo, las RT clásicas virales han sido mejoradas a partir de ingeniería de proteínas (Martín-Alonso, Frutos-Beltrán y Menéndez Arias, 2020).

7.6.2. *Síntesis de ADN complementario (ADNc)*

El principio de la transcripción inversa es “transformar” el ARN en ADNc mensurable (Minshall y Git, 2020). Por tal motivo, para retrovirus y retrotransposones LTR, el fundamento de la transcripción inversa es convertir una copia de ARN monocatenario del genoma en un ADN bicatenario, luego de este proceso, la copia de ADN está flanqueada por duplicaciones más largas llamadas LTR. Existen los llamados retrovirus que se diferencian de los demás virus de ARN, dada su capacidad de

transcribir su ARN genómico en manera inversa para generar una molécula de ADN de doble cadena flanqueado por dos repeticiones terminales largas (LTR), cuando se descubrió la ADN polimerasa retroviral también se caracterizó la actividad de RNase H que está estrechamente asociada a la RT y se afirmó que era relevante en el proceso de transcripción inversa viral (Hughes, 2015; Mougel, Houzet y Darlix, 2009).

7.6.3. Purificación y amplificación del ADNc

La razón fundamental de utilizar el ADNc en vez del ARN para técnicas de amplificación, se basa en que el ARN presenta 2 grupos hidroxilos en su ribosa, por lo que, está propenso a degradarse. Cabe recalcar que luego de la síntesis de ADNc para purificarlo se debe seguir estrictamente dos pasos que son: la eliminación de ARN y desoxirribonucleicos no incorporados, el primero se elimina mediante un tratamiento con RNasa-H, para el segundo se ha demostrado que utilizan protocolos basados en absorción de sílice o cromatográfica (Trujillo-Esquivel et al., 2016).

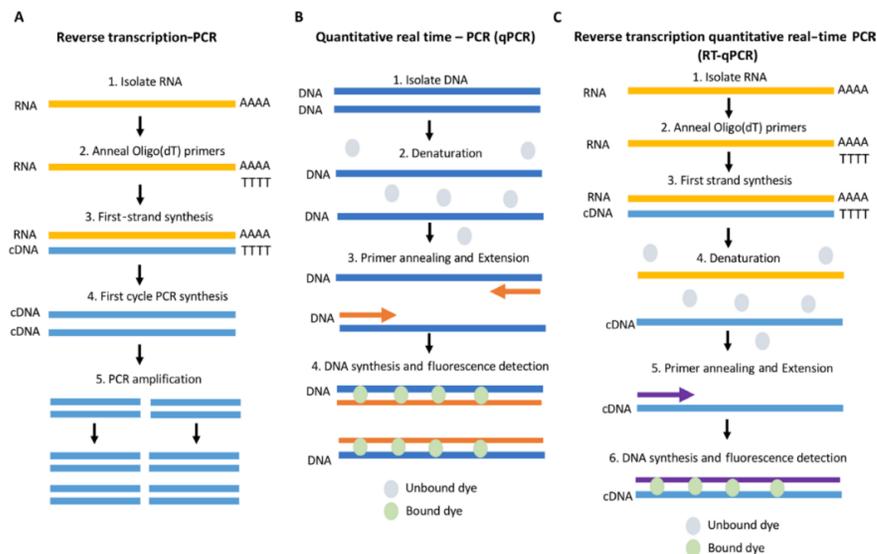
Se genera ADNc a partir de la plantilla de ARN utilizando la RT, mediante cebadores oligo(dT) que se hibridaran con la cola poliA presente en el ARN, también a partir de hexámeros aleatorios que se hibridan en múltiples puntos a lo largo del transcripto del ARN, sin embargo, se prefiere usar una mezcla de los dos cebadores, debido a que, permitirán especialmente la amplificación del ARNm (Figura 3) (Adams, 2020).

Por consiguiente, la Reacción en cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Inversa (RT-qPCR) se considera el método más sensible para cuantificar

el ARNm, debido a que, da paso a las transcripciones raras y se pueden observar y analizar las variaciones en la expresión génica (Ho-Pun-Cheung et al., 2009). La RT-qPCR ayuda a determinar los cambios en la expresión génica tras el uso de tratamientos como de sistemas modelo con inhibidores, estimulantes, además de pequeños ARN de interferencia o modelos knockout, entre otros (Adams, 2020).

Figura 3

Esquema de la comparación entre RT-PCR, qPCR y RT-qPCR.



Nota: A) Proceso de RT-PCR donde a partir del ARN aislado se genera el ADNc mediante la RT, luego se realiza la PCR para amplificar el gen de interés; C) Procedimiento RT-qPCR (Adams, 2020).

7.6.4. *La microalga Dunaliella spp., como modelo para estudios de expresión génica*

La bioprospección de microalgas guía a la exploración de microalgas nativas y por consiguiente a evaluar su potencial biotecnológico en producción económica de

lípidos como biocombustibles e incluso su impacto en la industria alimentaria (Khosravinia et al., 2023).

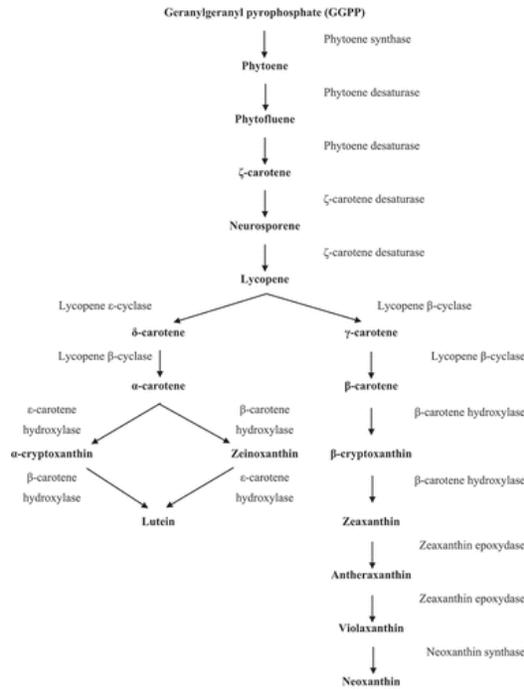
7.6.4.1. Biología y fisiología

Las células de la *Dunaliella* halófitas son biflageladas de forma ovoides, esféricas, piriformes, fusiformes o elipsoidales, miden entre 5 y 25 μm de largo y de ancho un rango de 3-13 μm . Carece de pared celular polisacáridica rígida, por lo que, solo se encuentra limitada por una membrana delgada y elástica aportándole la cualidad de adaptarse morfológicamente mejor, considerando las variación de la presión osmótica del entorno externo, en su composición tienen un único cloroplasto central de aspecto de copa con un piranoide central que está rodeado por granos de almidón (Colusse, et al., 2020; Barbosa et al., 2023).

Entre las propiedades que se resaltan en *Dunaliella* es su capacidad de acumular masivamente carotenoides (Figura 4), proteínas, lípidos y esencialmente grasas insaturadas, además de vitaminas y minerales. Dadas sus cualidades morfológicas y fisiológicas, así como la producción de metabolitos depende de la etapa de crecimiento, región y condiciones de cultivo, al iguales que otras condiciones como luz y temperatura (Araj-Shirvani et al., 2024).

Figura 4

Ruta metabólica de la producción de carotenoides en Dunaliella



Nota: (Barbosa et al., 2023).

7.6.4.2. Patrones de expresión génica en microalgas

Mediante tres orgánulos presentes en las microalgas, tales como el núcleo, mitocondrias y cloroplasto, pueden someterse a ingeniería genética para producir comercialmente biomasa y metabolitos. El enfoque alternativo es la ingeniería transcripcional (TE), el cual regula una amplia gama de genes que están implicados en las rutas metabólicas simultáneas, al igual que los TF que controlan la expresión del gen diana específico a partir de la unión de secuencias de ADN específicas con

elementos cis del gen diana, en conjunto con la intervención del ARN polimerasa cuya finalidad es permitir o no la transcripción (Grama, Liu y Li, 2022).

7.6.4.3. Estudios relevantes de expresión génica en *Dunaliella*

En un estudio cuyo propósito es revelar el mecanismo de síntesis de β -caroteno mediante la genómica y transcriptómica en *Dunaliella salina*, presentaron la secuencia del genoma de alta calidad (FACHB435) que exhibe un tamaño de género de 742 Mb. Lograron predecir un total de 30.752 genes codificadores de proteínas. Continuamente, señalaron los genes regulados positivamente en la ruta metabólica de carotenos que incluyen los siguientes: *DsCrtB*, *DsPDS*, *DsZ-ISO*, *DsZDS*, *DsCRTISO*, *DsLUT5*, *DsCrtL-B* y *DsCCD8*, mientras que los regulados negativamente fueron *DsCrtF* y *DsLUT1* (Chen et al., 2024). Dentro de otra investigación, realizaron la expresión de *DsGATA1* en *D. salina* con respecto a la exposición a luz roja, el análisis de estos datos indicó que este gen actúa como regulador global en la síntesis de carotenoides, e incluso reveló el mejoramiento de la acumulación de carotenoides bajo luz roja (Song et al., 2024).

En microalgas, la zeaxantina es un pigmento que trabaja en el mecanismo de fotoprotección. La expresión de ARNm de *DtZEP* (patrón de expresión de zeaxantina epoxidasa) en *D. tertiolecta* responde rápidamente a la irradiación de luz y al estrés hiperosmótico (Kim, Kang y Jin, 2019).

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1. Obtención de la Muestra

Este trabajo se desarrolló con una cepa de microalga *Dunaliella spp.*, aislada desde la Península de Santa Elena registrada con el código PM018, perteneciente al proyecto INCYT-PNF-2017M3112 y CUP: 91870000.0000.384095, con el permiso del ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

La experimentación se realizó en muestras congeladas a una temperatura de -20°C cosechadas en su fase exponencial a una concentración de 50×10^5 células/ml al igual que en muestras directas de cultivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en este trabajo desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Facultad Ciencias del Mar en la UPSE.

8.2. Preparación del material y condiciones de laboratorio

Se prepararon todas las soluciones de extracción de ARN utilizando agua destilada tratada con DEPC (dietilpirocarbonato) al 0,1%, es decir, en una relación 1:1000 (1 ml de DEPC en 1000 ml de agua destilada), la solución se agitó durante 30 minutos y se procedió a esterilizar en autoclave. Los materiales tanto de plástico y vidrio exclusivamente utilizados para ARN, se trataron previamente con DEPC, así mismo, todos los equipos y materiales se limpiaron con alcohol industrial al 99,7% y luego con DEPC (Ribaudó et al., 2001; Vennapusa et al., 2020).

8.3.Lavado de la muestra

En un tubo Eppendorf libre de RNasa de 1.5 ml se colocó la biomasa húmeda, para eliminar el medio de cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, siguiendo la metodología aplicada por Maurer et al. (2023) el pellet se resuspendió en 700 μ L de PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline) agitando con fuerte vortex hasta que quede homogéneo, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos.

8.4.Pruebas de extracción de ARN

La columna giratoria de extracción de ARN, es un equipo innovador que posee una matriz a base de sílice de doble capa que da paso al uso de tampones encontrados actualmente en los kits comerciales, por lo tanto, la extracción en fase sólida como el método basado en columna de centrifugación va a permitir que el ARN se adhiera a la matriz y de esta forma limita problemas asociados a los métodos convencionales “líquido-líquido”, dado que la molécula de ARN es químicamente inestable y propensa a degradarse por acción de las enzimas RNasas, los procesos convencionales conllevarían más tiempo y químicos que podrían perjudicar la concentración y calidad del ARN (Burgstedt, 2021).

Para la estandarización del protocolo de extracción de ARN total se compararon dos protocolos: Protocolo a base de columna de sílice (Invitrogen™ 12183018A) y Protocolo a base de columna de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732). Los materiales y equipos utilizados para la extracción de ARN son cartuchos giratorios

o de centrifugado, tubos de recolección, tubos de recuperación (tubos eppendorf), balanza digital BOECO Germany, Micropipetas Thermo Scientific (2-20 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L), centrifuga Spectrafuge 16M. Labnet Internacional y LP Vortex Mixer.

8.4.1. Protocolo a partir de Columna de sílice (Invitrogen™ 12183018A)

8.4.1.1. Preparación del tampón y alícuotas

- Se agregó 60 ml de etanol industrial (99,7%) al Tampón de Lavado II.
- Para cada extracción se separa una alícuota de agua libre de RNAsas en un tubo estéril y se incuba durante 30 minutos a una temperatura de 50°C.
- El Tampón de lisis que contiene Tiocianato de guanidina se preparó con 1% de 2-mercaptoetanol, es decir, se añadió 10 μ L de 2-mercaptoetanol por cada 1 ml de Tampón de lisis.

8.4.1.2. Lisis y homogeneización

El proceso inició con 100 mg de biomasa depositada en un tubo Eppendorf libre de RNasa previamente lavada con PBS. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se añadió 300 μ L de Tampón de lisis que contiene Tiocianato de guanidina con 2-mercaptoetanol a la muestra, agitando fuertemente en vortex hasta que se disperse y las células queden totalmente lisadas, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min.

8.4.1.3. Unión, lavado y purificación

El sobrenadante se trasladó a un nuevo tubo Eppendorf libre de RNasa. Se añadió un volumen de etanol al 70% equivalente al volumen de sobrenadante extraído. Las soluciones se mezclaron mediante pipeteo hasta dispersar cualquier precipitado. Luego, se transfirió hasta 700 μ L de la solución al cartucho de centrifugación con el tubo de recogida, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min, el flujo fue descartado y el cartucho de centrifugado se reinsertó en el mismo tubo de recogida. Este proceso se repitió hasta procesar toda la muestra. Para el lavado del ARN, se añade 700 μ L del tampón de lavado I con Tiocianato de guanidina al cartucho de centrifugado, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min desechando el flujo del tubo de recolección. Se realizaron 2 lavados de 500 μ L con el tampón de lavado II que contiene etanol, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min descartando el flujo. Continuamente, se centrifugó el cartucho a 12000 rpm durante 1 min para secar la membrana con el ARN adjunto. El cartucho de centrifugado se insertó en un tubo Eppendorf de recuperación. Posteriormente, se añadió 60 μ L de agua libre de RNasa (incubada a 50°C durante 30 minutos) al centro del cartucho de centrifugado y se deja en incubación durante 1 min a temperatura ambiente. Por último, se procede a centrifugar a 12000 rpm durante 2 min para eluir el ARN de la membrana hacia el tubo de recuperación. La muestra de ARN se almacenó a -20°C.

8.4.2. Protocolo a partir de Columna de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732)

8.4.2.1. Preparación del tampón y alícuotas

- Se añadió 10 ml de etanol industrial (99,5%) al Tampón de Lavado I y al Tampón de Lavado 2 se le agregaron 39 ml de etanol industrial (99,5%).
- Antes de cada extracción, se separó una alícuota de agua libre de RNasas en un tubo estéril y se dejó en incubación durante 40 minutos a 50°C.
- Por cada 1 ml de Tampón de lisis con Tiocianato de guanidina se le agregó 20 µL de 2-mercaptoetanol.
- Se preparó la cantidad requerida de solución de proteinasa K, diluyendo 10 µL de la enzima en 590 µL de tampón TE (Tris HCl 10mM, pH 8, EDTA 1mM).

8.4.2.2. Lisis y homogeneización

Se inició el proceso con una muestra de 100 mg de biomasa concentrada almacenada en un tubo Eppendorf libre de RNasas, previamente lavada con PBS. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se agregaron 300 µL de tampón de lisis que contiene Tiocianato de guanidina con 2-mercaptoetanol mezclando a partir de pipeteo y luego vortex hasta que las células queden homogenizadas. Se añadió 600 µL de proteinasa K diluida (10 µL de la proteinasa K diluida en 590 µL de tampón TE Tris HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM), la muestra fue agitada a alta velocidad hasta que el sedimento celular haya quedado disperso y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 10 min, luego, se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm.

8.4.2.3. Unión, lavado y purificación

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf libre de RNAsas añadiendo 450 μL de etanol al 99,5%, las soluciones se mezclaron mediante pipeteo. Luego, se trasladó hasta 700 μL de la solución a la columna de purificación de ARN (cartucho de centrifugado) insertada en un tubo de recolección, se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm desechando el flujo del tubo de recolección. Este proceso se repitió hasta procesar toda la muestra. Para el lavado del ARN, se agregan 700 μL de tampón de lavado I con etanol al 99,5% a la columna de purificación de ARN, se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm descartando el flujo. Se realizaron 2 lavados con el tampón de lavado II, el primero de 600 μL y el segundo de 250 μL de tampón, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min desechando el flujo del tubo de recolección en cada lavado. Para secar la membrana con ARN adjunto, la columna de purificación se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min. Posteriormente, se reinsertó la columna a un tubo de recuperación estéril libre de RNAsas. Finalmente, para la elución del ARN se añadió 50 μL de agua libre de nucleasas a la membrana con ARN adherido y se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm. La muestra de ARN se almacenó bajo congelación a -20°C .

8.5. Cuantificación y evaluación del ARN extraído

La calidad y cantidad de las muestras de ARN extraídas fue determinada en el espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Para comenzar la lectura del ARN se limpiaron las superficies ópticas tanto superior como inferior del

espectrofotómetro con agua destilada utilizando un paño de laboratorio limpio y sin residuos sólidos. A partir del software Nanodrop para calibrar se utiliza un volumen de 2 μL de agua ultrapura Milli-Q realizando el blanco hasta que indique cantidad 0.00 ng/ μL . Se procede a limpiar y colocar 2 μL de muestra de ARN en el pedestal óptico inferior y cerrar el brazo de palanca para que se pueda realizar la medición. El programa indicará la concentración y los índices de pureza (Desjardins y Conklin, 2010). Una relación de absorbancia 260/280 nm superior a 1.8 indica una óptima pureza del ARN libre de contaminación por proteínas, así mismo, los requisitos típicos para el ARN por debajo de 1.8 son considerados pureza aceptable (Sasi et al., 2023; Pagani, et al., 2023; García-Bardón y Thal, 2016).

8.6. Protocolo de retro-transcripción ARN-ADNc (*Applied Biosystems*TM 4368814)

8.6.1. Preparación del Master mix de transcripción inversa

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, los componentes del protocolo se descongelaron en hielo, así mismo, se preparó el Master mix sobre hielo. Con referencia a la Tabla 1, se calculó el volumen de los componentes requeridos para preparar la cantidad necesaria de reacciones.

Tabla 1

Volumen de los componentes por reacción en μL , con y sin inhibidor de RNasas.

Componente	Volumen/Reacción (μL)	
	Con inhibidor de RNasas	Sin inhibidor de RNasa
10X RT Buffer	2.0	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8	0.8
10X RT Primers aleatorios	2.0	2.0
MultiScribe™		
Transcriptasa inversa (50 U/ μL)	1.0	1.0
Inhibidor de RNasas	1.0	-
Agua libre de nucleasas	3.2	4.2
Total por reacción	10.0	10.0

Nota: (Thermo Fisher Scientific, 2018).

8.6.2. Preparaciones de las reacciones de transcripción inversa

Se agregó a cada microtubo la cantidad requerida del Master mix donde se adicionaron 8 μL de muestra de ARN por reacción. Las soluciones se mezclaron dos veces con mucho cuidado mediante pipeteo. Luego, se centrifugó brevemente en el MYSPIN 6 de Thermo Scientific para eliminar burbujas dentro del microtubo. Las muestras listas se mantuvieron en refrigeración hasta el proceso de retrotranscripción. La transcripción inversa se realizó en un termociclador, siguiendo el programa detallado en la Tabla 2.

Tabla 2

Programa de transcripción inversa.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	31	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

Nota: (Thermo Fisher Scientific, 2018).

8.7. Análisis estadísticos

La base de datos fue recolectada en MS Excel y analizada estadísticamente en Rstudio requieres R 3.6.0. Tanto para ARN como ADNc se evaluaron diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05. En el caso de la concentración, los protocolos de extracción de ARN aprobaron los supuestos de normalidad de Shapiro-Wilk, por lo que, se utilizó T Student de Welch, ANOVA de Welch y pruebas de comparaciones múltiples (post hoc) de Hochberg. En los demás análisis que no cumplieron los supuestos de normalidad se utilizó Mann-Whitney-Wilcoxon, Kruskal Wallis y comparaciones múltiples por Prueba Wilcoxon pareada y Dunn. Así mismo, se utilizó un análisis multivariado MANOVA para datos paramétricos y PERMANOVA para datos no paramétricos.

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

9.1. Análisis del ARN extraído por condición de la muestra y por cada protocolo aplicado

Se compararon tres protocolos de extracción de ARN, el éxito de cada método depende directamente de la concentración y pureza del ARN obtenido. En este trabajo se procesaron las muestras por triplicado de acuerdo a la condición.

9.1.1. Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo I. Columna de sílice (*Invitrogen™ 12183018A*)

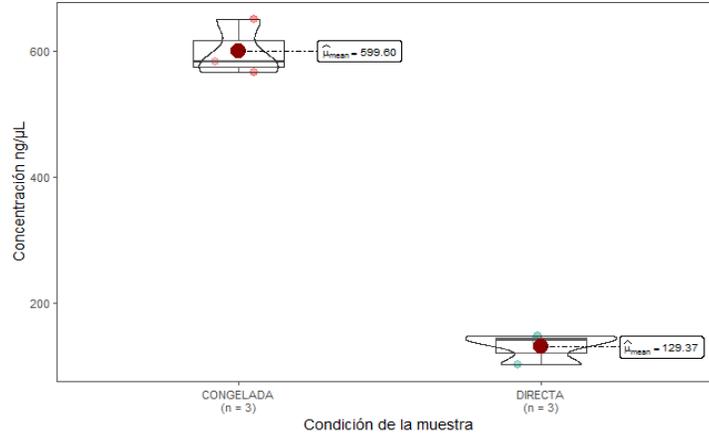
El producto de extracción de ARN aplicando la técnica de columna de sílice del Protocolo I en muestras congeladas alcanzó un promedio de 599.6 ± 44.47 ng/ μ L, mientras que, en las muestras directas fue de 129.37 ± 24.49 ng/ μ L, la condición de muestra detectó diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 3), siendo la muestra congelada más eficiente en concentración para la extracción de ARN (Figura 5).

Las muestras congeladas obtuvieron un promedio de 2.05 ± 0.03 , en cambio, en las muestras directas fue de 1.8 ± 0.34 (Tabla 3), a pesar de que ambos valores están dentro del rango óptimo de pureza en la relación A260/280, las muestras directas presentaron mayor contaminación por proteínas u otros residuos químicos, sin embargo, se demuestra que las diferencias por condición de muestra son estadísticamente no significativas a partir de las medianas ($p > 0.05$) (Figura 6).

Figura 5

Concentración en ng/μL de ARN por condición de muestra en Protocolo I.

Protocolo 1. Concentración ng/μL de ARN por condición de la muestra
 $t_{\text{Welch}}(3.11) = 16.04, p = 4.28e-04, \hat{g}_{\text{Hedges}} = 9.62, \text{CI}_{95\%} [2.55, 16.94], n_{\text{obs}} = 6$

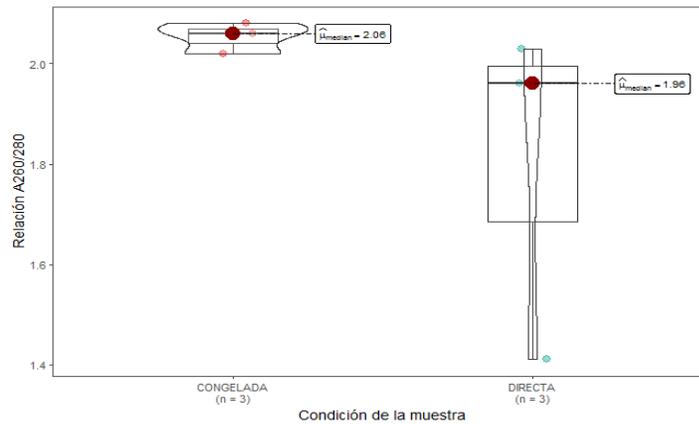


Nota: Se utilizó un análisis T Student Welch y prueba de T Student de una cola. Boxplot-violin generado mediante el software R.

Figura 6

Relación A260/280 de ARN por condición de muestra en Protocolo I.

Protocolo 1. Relación A260/280 de ARN por condición de la muestra
 $W_{\text{Mann-Whitney}} = 8.00, p = 0.19, \hat{r}_{\text{biserial}}^{\text{rank}} = 0.78, \text{CI}_{95\%} [0.04, 0.97], n_{\text{obs}} = 6$



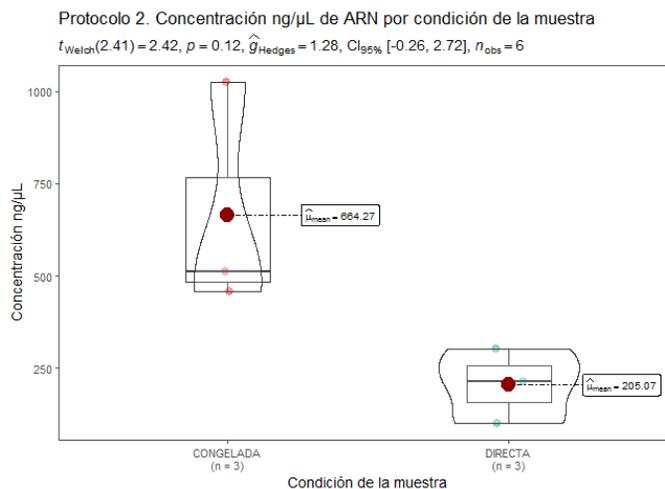
Nota: Se utilizó la prueba no paramétrica Mann-Whitney-Wilcoxon, y con el rango biserial = 0.78 se afirmó el dominio completo de la muestra congelada. Boxplot-violin generado mediante el software R.

9.1.2. Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo II. Columna de sílice modificado (Invitrogen™ 12183018A)

En el protocolo II modificado aplicando la técnica de columna de sílice (Tabla 5), la media para muestra congelada fue de 664.27 ± 312.71 ng/μL, y para muestra directa fue de 205.07 ± 100.52 ng/μL, siendo la muestra congelada más eficiente en concentración, a pesar de que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Figura 7). Para el caso de la relación A260/280, las muestras directas alcanzaron una media de 2.01 ± 0.08 , mientras que, en muestras congeladas fue de 2 ± 0.03 (Tabla 3), estos valores revelan que el ARN obtuvo una alta pureza para ambas condiciones de muestra. Con el argumento anterior, en la Figura 8, se demuestra que las diferencias son estadísticamente no significativas comparando las medianas.

Figura 7

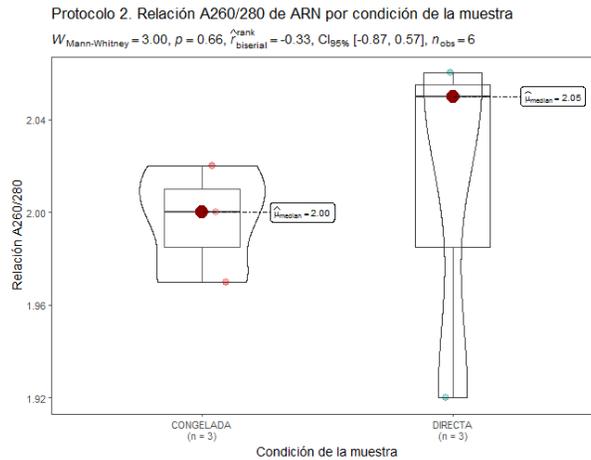
Concentración (ng/μL) de ARN por condición de la muestra en Protocolo II.



Nota: Se utilizó la prueba paramétrica de T Student Welch en un Boxplot-violin generado mediante el software R.

Figura 8

Relación A260/280 de ARN por condición de la muestra en Protocolo II.



Nota: Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon, el rango biserial = -0.33 se determina el dominio completo de la muestra directa con respecto a la muestra congelada. Boxplot-violin generado mediante el software R.

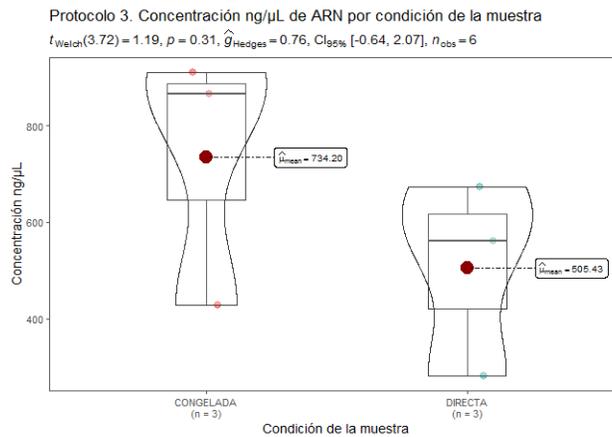
9.1.3. Análisis de extracción de ARN utilizando el Protocolo III. Columna de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732)

En el protocolo III a partir de columnas de sílice con la adición de Proteinasa K, el promedio de las concentraciones obtenidas fue mayor para las muestras congeladas con 734.2 ± 266.01 ng/ μ L, mientras que, las muestras directas alcanzaron una media de 505.43 ± 201.2 ng/ μ L (Tabla 3), por lo que, las diferencias son estadísticamente no significativas por condición de muestra ($p > 0.05$) (Figura 9). En la relación A260/280, la media para muestras congeladas fue de 2.06 ± 0.03 y en muestras directas se obtuvo una media de 2.04 ± 0.01 (Tabla 3), ambos valores demuestran un ARN de alta pureza. Por tal motivo, la Figura 10 indica que no existen

diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) por condición de muestra a partir de las medianas.

Figura 9

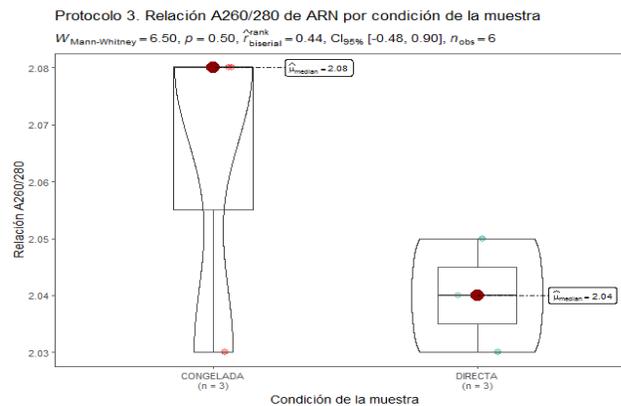
Concentración (ng/μL) de ARN por condición de la muestra en Protocolo III.



Nota: Se aplicó la prueba paramétrica de T Student Welch en un gráfico Boxplot-violin generado mediante el software R.

Figura 10

Relación A260/280 de ARN por condición de la muestra en Protocolo III.



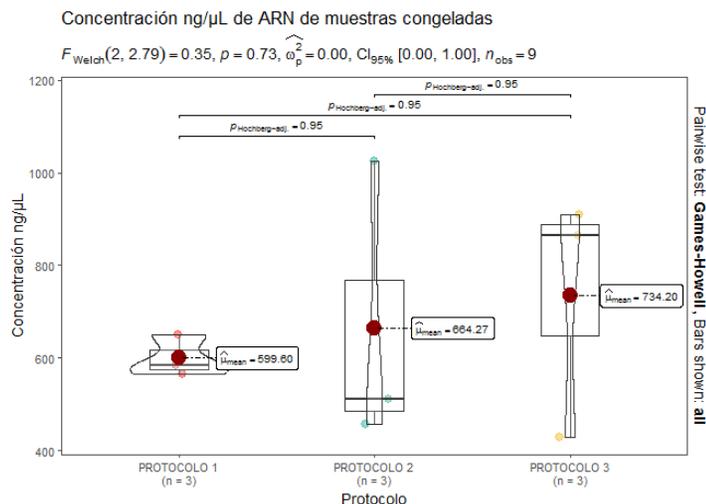
Nota: Se realizó el análisis no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon, el rango biserial = 0.44 afirma la predominancia de la muestra congelada con respecto a la directa. Boxplot-violin generado mediante el software R.

9.1.4. Análisis de extracción de ARN en muestras congeladas entre protocolos

En aplicación del análisis de la varianza, los protocolos mostraron diferencias no significativas para la variable concentración ($p > 0.05$) (Figura 11). El Protocolo III, resultó ser el método más eficiente en la extracción de ARN para muestras congeladas, mientras que, el Protocolo I fue el método con menor concentración de ARN obtenida. Así mismo, en la relación A260/280, mediante la prueba no paramétrica, las diferencias resultaron ser estadísticamente no significativas entre los protocolos comparando sus medianas ($p > 0.05$), sin embargo, el Protocolo III y el Protocolo II presentaron los mejores índices de pureza, siendo el Protocolo I, el método con los valores menos estables en pureza de ARN (Figura 12) (Tabla 3).

Figura 11

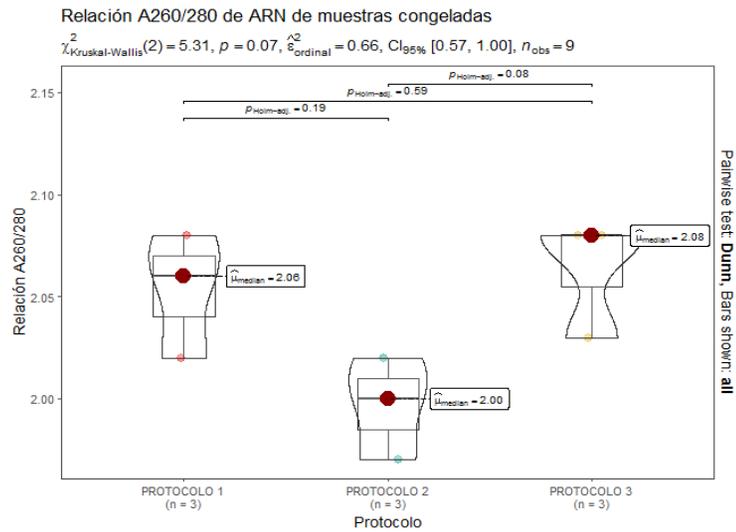
Análisis de la concentración (ng/μL) de ARN para muestras congeladas entre los protocolos de extracción.



Nota: Se utilizó la prueba paramétrica de análisis de varianzas Welch a partir de un gráfico Boxplot-violin generado mediante el software R

.Figura 12

Análisis de la relación A260/280 de ARN para muestras congeladas entre los protocolos de extracción.



Nota: Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Boxplot-violin generado mediante el software R.

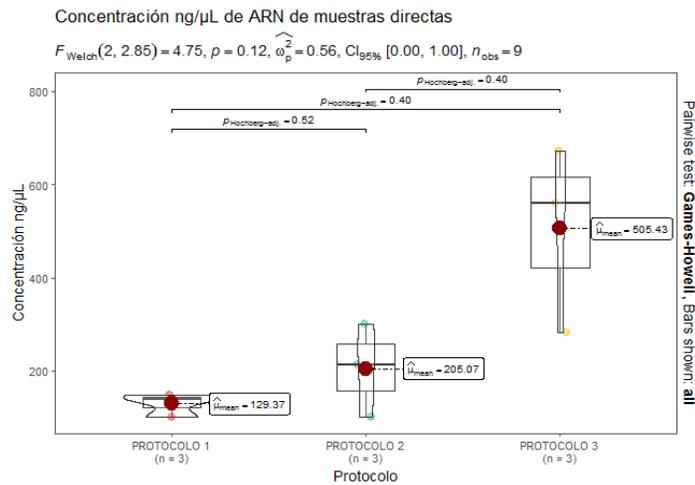
9.1.5. Análisis de extracción de ARN en muestras directas entre protocolos

El método más eficiente en la extracción de ARN de muestras directas fue el Protocolo III, seguido del Protocolo II, y, por último, el Protocolo I resultando ser el método de menor concentración de ARN, mediante la prueba estadística se determinaron diferencias no significativas entre los protocolos ($p > 0.05$) (Figura 13). En la relación A260/280, el Protocolo III y el Protocolo II obtuvieron una pureza óptima de ARN, mientras que, el método con posible contaminación por proteínas u otros residuos químicos fue el Protocolo I, no obstante, con el ($p > 0.05$) las diferencias entre los protocolos de extracción para muestra directa demostraron ser

estadísticamente no significativas mediante la comparación de los valores de las medianas. (Figura 14) (Tabla 3).

Figura 13

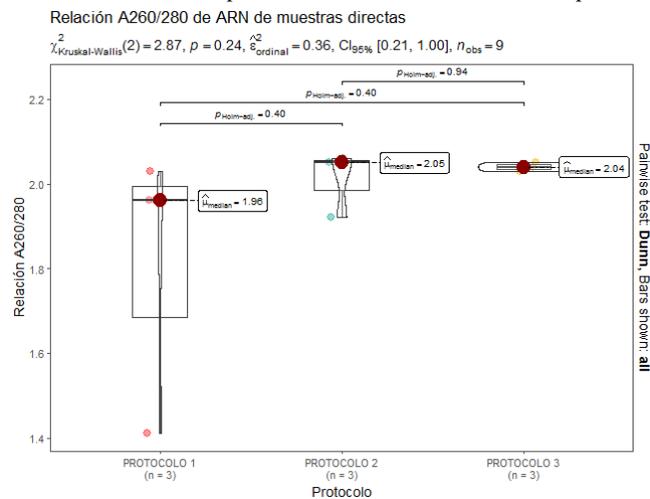
Análisis de la concentración (ng/μL) de ARN para muestras directas entre los protocolos de extracción.



Nota: Se aplicó la prueba paramétrica análisis de varianzas Welch a partir de un Boxplot-violin generado mediante el software R.

Figura 14

Análisis de la relación A260/280 de ARN para muestras directas entre los protocolos de extracción.



Nota: Se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Boxplot-violin generado mediante el software R.

Tabla 3

Valores del promedio y desviación estándar de la concentración y calidad del ARN (relación A260/280) en muestras congeladas y directas por cada protocolo de extracción.

	Concentración (ng/μL)		
	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III
Congelada	599.6 ± 44.47	664.27 ± 312.71	734.2 ± 266.01
Directa	129.37 ± 24.49	205.07 ± 100.52	505.43 ± 201.2
	Relación A260/280		
	Protocolo I	Protocolo II	Protocolo III
Congelada	2.05 ± 0.03	2 ± 0.03	2.06 ± 0.03
Directa	1.8 ± 0.34	2.01 ± 0.08	2.04 ± 0.01

Tabla 4

Comparación de métodos de extracción de ARN (M.C. = Muestra Congelada; M.D. = Muestra Directa).

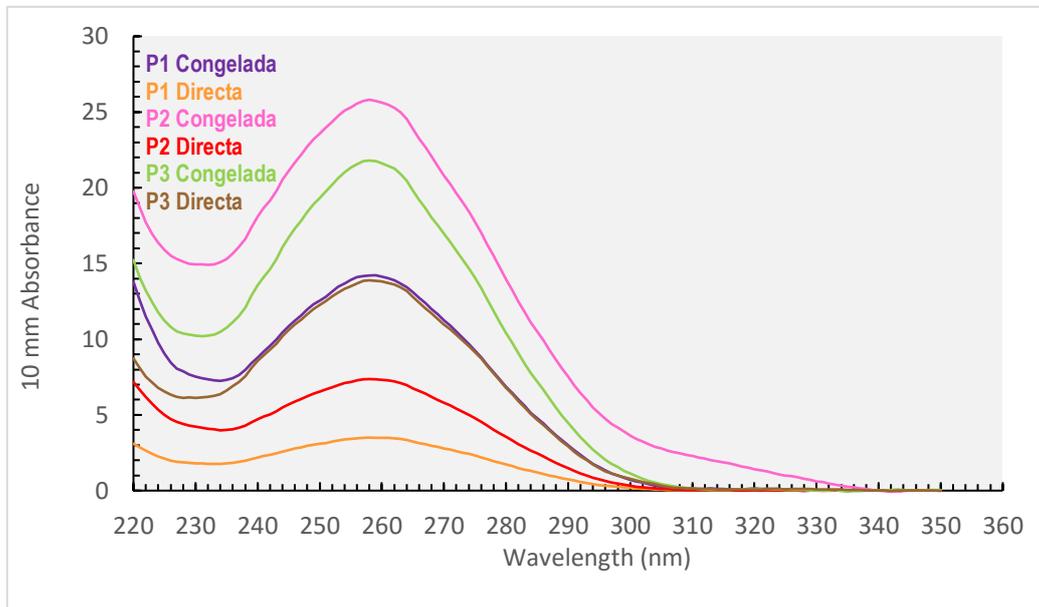
Método	Tiempo por muestra	Cantidad de muestra	Velocidad máxima de centrifugado requerida	Lisis	Cantidad de elución de ARN	Eficiencia		Ventajas	Desventajas
						M.C.	M.D.		
Protocolo I. Columnas de sílice (Invitrogen™ 12183018A)	Menos de 1 hora	100 mg	12000 rpm	300 µL de Tampón de lisis	60 µL	Alta concentración y pureza óptima	Baja concentración y pureza aceptable	Protocolo más rápido con pocos pasos. Se utiliza menos cantidad de Tampón de lisis.	Se obtiene menos cantidad de elución del ARN.
Protocolo II. Columnas de sílice Modificado (Invitrogen™ 12183018A)	Menos de 1 hora	100 mg	8000 rpm	700 µL de Tampón de lisis	100 µL	Alta concentración y pureza óptima	Baja concentración y pureza óptima	Se obtiene mayor cantidad de la elución del ARN.	Se utiliza más cantidad de reactivos
Protocolo III. Columnas de sílice con proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732)	1 hora	100 mg	12000 rpm	300 µL Tampón de lisis + 600 µL de proteínas a K diluida	50 µL	Alta concentración y pureza óptima	Alta concentración y pureza óptima	Se utiliza proteinasa K, enzima que mejora la lisis y degrada proteínas.	La elución del ARN es menor en comparación con los demás protocolos.

9.2. Análisis Espectrofotométrico del ARN Total

En la cuantificación de ARN se consideran tres longitudes de onda fundamentales que son 260 nm, 280 nm y 230 nm, donde de acuerdo a la Figura 15 se obtuvieron mejores espectros en réplicas de la condición de muestra congelada del Protocolo II y Protocolo III, se puede apreciar un buen pico en 260 nm lo que indica la presencia de ARN, mientras que, en cuestión a la pureza, la relación 260/280 es indicativo de contaminación por proteína, los espectros de color rosado y verde correspondientes a (P2 congelada y P3 Congelada), presentaron índices óptimos de calidad (2.00), cabe recalcar que esta proporción en ARN es más alta que en ADN, dado que el ácido ribonucleico contiene bases de uracilo, por lo tanto, este índice ayuda a detectar el ácido nucleico predominante en cuanto a concentración en la onda de absorbancia 260 nm. En contraste, se observaron curvas que no presentaron la depresión esperada en la onda de absorbancia 230 nm, esto es indicativo comúnmente de alta contaminación orgánica residual, mediante la relación 260/230, se manifiesta cuantitativamente la impureza de las muestras directas reflejando contaminación por compuestos como, por ejemplo, tiocianato de guanidina (utilizado en la lisis de los métodos de extracción).

Figura 15

Comparación de las mejores espectros por condición de muestra de los protocolos de ARN analizadas en Nanodrop.



Nota: De lado izquierdo se observan los códigos por colores que presentan cada una.

9.3. Análisis Multivariado de la Extracción de ARN

A partir del análisis multivariado de varianzas (MANOVA), para la variable concentración, la relación Protocolo – Concentración ($p > 0.05$), la relación Condición – Concentración ($p < 0.05$) y la interacción “Protocolo: Condición” – Concentración ($p > 0.05$), demuestran que los protocolos son estadísticamente iguales, es decir, el protocolo no influye en las diferencias de las concentraciones, siendo la condición de la muestra el factor que presentó un mayor impacto en la concentración de ARN. No existe una relación de interacción entre el “Protocolo: Condición” con respecto a la concentración, siendo la condición de la muestra el factor decisivo. Para el caso de la relación A260/280, los Protocolos, la Condición

de la muestra y la interacción “Protocolo: Condición” no tuvieron un impacto significativo en la pureza del ARN ($p > 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5

Análisis multivariado de la extracción de ARN. Se presentan los P-valores obtenidos por cada relación e interacción de variables (ns, no significativo; 0.05; 0.01**; 0.001***).*

Relación e interacción	Concentración	A260/280
Protocolo	ns	ns
Condición	0.00111 **	ns
Protocolo: Condición	ns	ns

9.4. Análisis de la síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADN complementario se utilizaron como base molecular los tres protocolos estandarizados de extracción de ARN y cuatro variaciones del protocolo de ADNc a partir de la enzima Transcriptasa Inversa e inhibidor de RNasas, donde la variación fue esencialmente en la cantidad de microlitros de transcriptasa inversa (50U/ μ L) (RT = Retrotranscriptasa) y la adición de inhibidor de RNasas, los protocolos quedaron compuestos de la siguiente manera: RT 1 con inhibidor, RT 1 sin inhibidor, RT 1.5 con inhibidor y RT 1.5 sin inhibidor. Se compararon los datos recolectados por condición de muestra de cada método de ARN para los protocolos de ADNc.

9.4.1. Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo I de extracción de ARN

Para todos los protocolos de ADNc en cuestión a la concentración, se demostraron que las diferencias por condición de muestra son estadísticamente no

significativas ($p > 0.05$) de acuerdo a sus medianas (Figura 16). En los protocolos RT 1 con inhibidor, RT 1.5 con inhibidor y RT 1.5 sin inhibidor, el promedio de la concentración en las muestras directas fue superior con respecto a las muestras congeladas, mientras que, en RT 1 sin inhibidor, las muestras congeladas alcanzaron un promedio mayor que las muestras directas de cultivo (Tabla 6).

Para la relación A260/280, en RT 1 con inhibidor, la muestra directa del cultivo al igual que la congelada obtuvieron el mismo promedio de pureza. Para RT 1 sin inhibidor, las muestras congeladas presentaron índices más altos de calidad. En RT 1.5 con inhibidor y RT 1.5 sin inhibidor, las muestras directas presentaron valores más estables en pureza, sin embargo, en cada uno de los protocolos de ADNc se demostraron diferencias no significativas por condición de muestra ($p > 0.05$) en relación a la mediana (Figura 17). Cabe recalcar que en la mayoría de protocolos de ADNc se presentó contaminación proteica (Tabla 6).

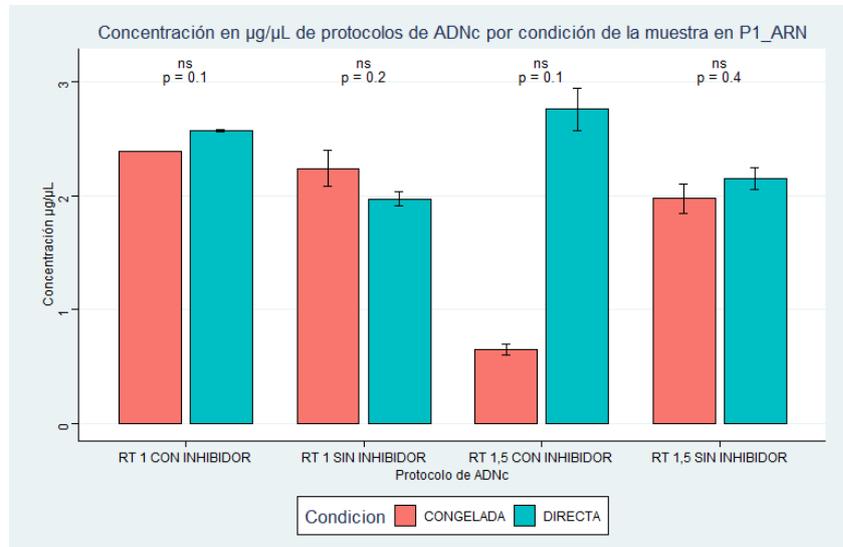
Tabla 6

Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo I de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).

Protocolo de ADNc	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				Relación A260/280			
	Directa		Congelada		Directa		Congelada	
	μ	Me	μ	Me	μ	Me	μ	Me
RT 1 con inhibidor	2.57	2.57	2.39	2.39	1.74	1.74	1.74	1.74
RT 1 sin inhibidor	1.97	1.91	2.24	2.35	1.77	1.76	1.78	1.78
RT 1.5 con inhibidor	2.76	2.63	0.65	0.69	1.80	1.80	1.78	1.80
RT 1.5 sin inhibidor	2.15	2.06	1.97	1.86	1.83	1.83	1.82	1.82

Figura 16

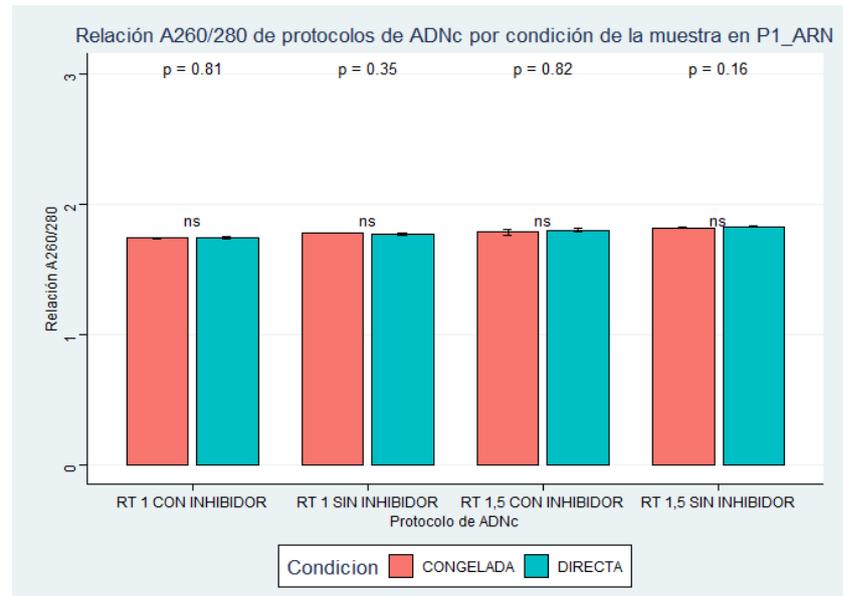
Comparación de la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo I de extracción de ARN.



Nota: Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Figura 17

Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo I de extracción de ARN.



Nota: Se implementó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

9.4.2. *Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo II de extracción de ARN*

En todos los protocolos de ADNc se observaron diferencias no significativas por condición de muestra en la concentración ($p > 0.05$) mediante sus medianas (Figura 18). Así mismo, las muestras directas alcanzaron valores más altos de concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de ADNc en cada uno de los protocolos (Tabla 7).

La relación A260/280 representada en la Figura 19, demuestra diferencias no significativas entre la condición de muestra para todos los protocolos de ADNc ($p > 0.05$) comparando las medianas. Para ambas condiciones de muestras los mejores protocolos en cuestión a la pureza del ADNc fueron RT 1 sin inhibidor y RT 1.5 sin inhibidor, sin embargo, en RT 1.5 sin inhibidor se presentaron índices más altos de pureza con respecto a los demás (Tabla 7).

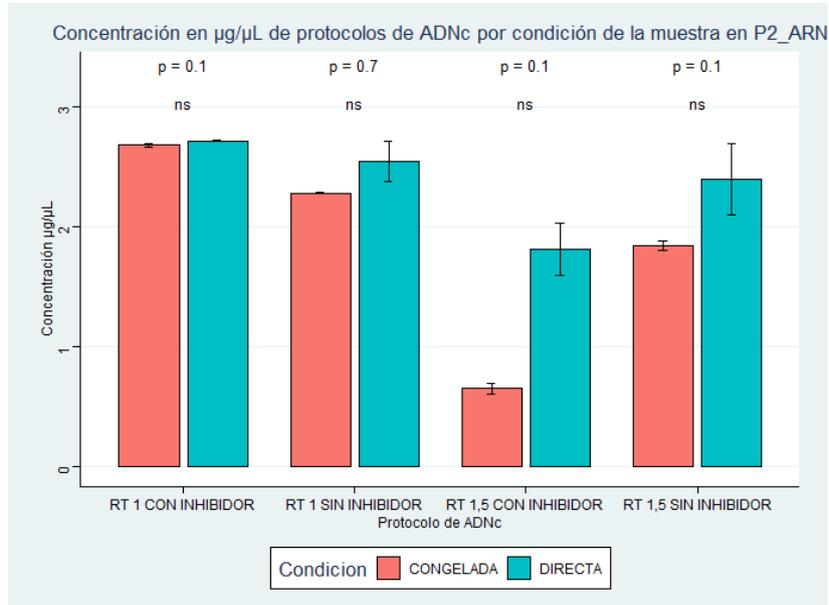
Tabla 7

Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo II de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).

Protocolo de ADNc	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				Relación A260/280			
	Directa		Congelada		Directa		Congelada	
	μ	Me	μ	Me	μ	Me	μ	Me
RT 1 con inhibidor	2.72	2.73	2.68	2.69	1.73	1.74	1.74	1.75
RT 1 sin inhibidor	2.55	2.69	2.29	2.29	1.78	1.78	1.79	1.79
RT 1.5 con inhibidor	1.81	1.66	0.65	0.62	1.62	1.77	1.75	1.74
RT 1.5 sin inhibidor	2.40	2.11	1.84	1.83	1.83	1.83	1.81	1.81

Figura 18

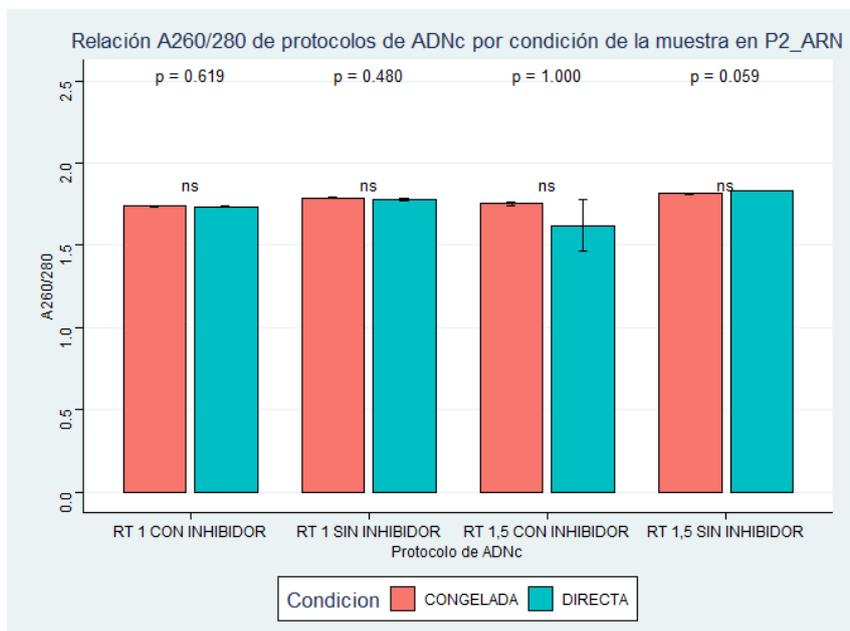
Comparación de la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo II de extracción de ARN.



Nota: Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Figura 19

Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo II de extracción de ARN.



Nota: Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

9.4.3. Análisis del ADNc por condición de muestra en Protocolo III de extracción de ARN

Al evaluar la concentración en ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de los protocolos de ADNc se demostraron diferencias no significativas por condición de muestra ($p > 0.05$) en relación a sus medianas. En RT 1 con inhibidor, la muestra congelada presentó alta cantidad de ADNc valor parecido al de la muestra directa, en cambio, para los demás protocolos de ADNc las muestras directas alcanzaron promedios más altos de concentración (Tabla 8) (Figura 20).

Para la relación A260/280, en la Figura 21 se observan diferencias no significativas entre la condición de muestra por cada protocolo de ADNc ($p > 0.05$) a partir de sus medianas. En todos los protocolos, las muestras congeladas presentaron mejor calidad de ADNc en contraste con las muestras directas, siendo las muestras directas las que presentaron posible contaminación por proteínas u otros residuos químicos (Tabla 8).

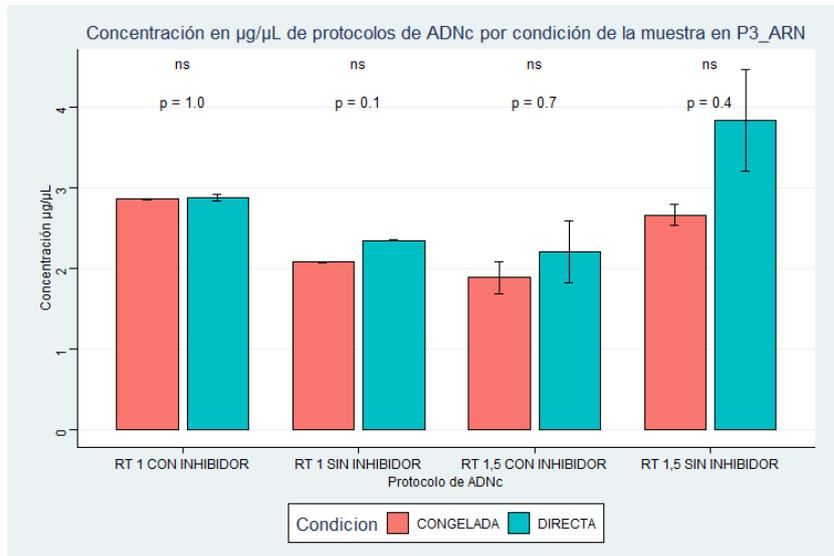
Tabla 8

Comparación de la concentración y calidad del ADNc por condición de muestra en Protocolo III de extracción de ARN (μ = media y Me = Mediana).

Protocolo de ADNc	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)				Relación A260/280			
	Directa		Congelada		Directa		Congelada	
	μ	Me	μ	Me	μ	Me	μ	Me
RT 1 con inhibidor	2.87	2.85	2.85	2.84	1.75	1.75	1.76	1.76
RT 1 sin inhibidor	2.34	2.34	2.07	2.08	1.79	1.79	1.84	1.84
RT 1.5 con inhibidor	2.21	2.38	1.88	1.98	1.77	1.79	1.86	1.86
RT 1.5 sin inhibidor	3.83	4.43	2.66	2.73	1.75	1.70	1.83	1.83

Figura 20

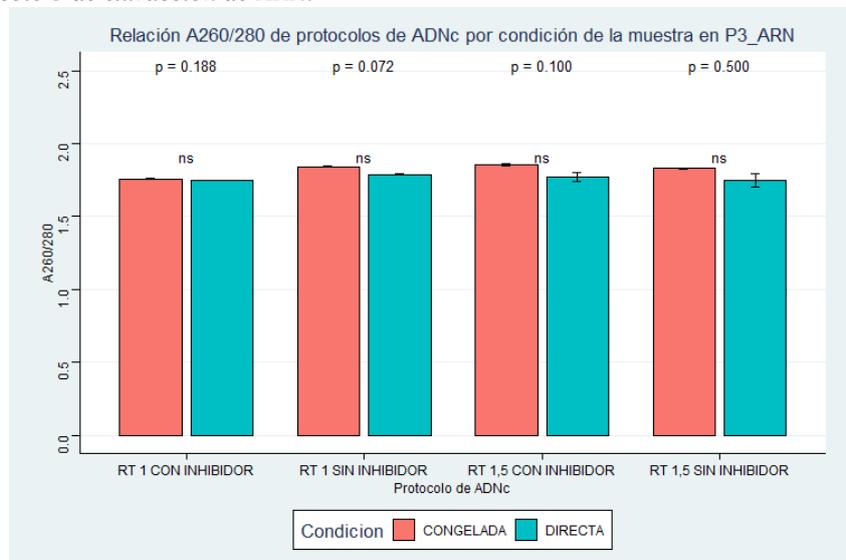
Comparación de la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo III de extracción de ARN.



Nota: Se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Figura 21

Comparación de la relación A260/280 de protocolos de ADNc por condición de la muestra en Protocolo 3 de extracción de ARN.



Nota: Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

9.5. Evaluación del ADNc por protocolo de ARN

En el protocolo RT 1 con inhibidor, se detectaron diferencias significativas en la concentración del ADNc entre los protocolos de ARN ($p < 0.05$) a partir de sus medianas, siendo el Protocolo III, el método más efectivo con una alta concentración de $2.86 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNc, seguido del PII y el PI. En RT 1 sin inhibidor, se demostraron diferencias no significativas entre los protocolos de ARN ($p > 0.05$) en relación a sus medianas, el PII resultó ser el protocolo de mayor concentración con una media de $2.42 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y el menos efectivo fue el PI. Para RT 1.5 con inhibidor, el PIII alcanzó una media de $2.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, siendo el método más eficiente como base molecular para la síntesis de ADNc, mientras que, el PII fue el protocolo con menor concentración. Por último, en RT 1.5 sin inhibidor, a partir de las medianas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la comparación del PI-PII y PI-PIII, donde el PIII fue el protocolo de alta concentración con un promedio de $3.24 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, siendo el PI el protocolo menos apto para la síntesis de ADNc (Tabla 10) (Figura 22).

En la relación A260/280 del ADNc, en RT 1 con inhibidor, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los protocolos de ARN en relación a la mediana del PI-PIII y PII-PIII, donde el Protocolo III resultó ser el método de menor probabilidad de contaminación por proteínas con un promedio de 1.75, así mismo, para RT 1 sin inhibidor, el PIII presentó una pureza aceptable con una media de 1.82 en comparación con los demás protocolos que obtuvieron valores inferiores, a partir de las medianas se afirman diferencias estadísticamente significativas entre la comparación PI-PIII ($p < 0.05$). En RT 1.5 con inhibidor al igual que en RT 1.5

sin inhibidor, se detectaron diferencias no significativas entre los protocolos de ARN ($p > 0.05$) comparando las medianas, sin embargo, en el primero se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre PII-PIII, es decir, el análisis estadístico fue más sensible para la comparación de dichos protocolos, el PIII presentó un ADNc de pureza aceptable con una media de 1.80, y en el segundo caso, todos los protocolos de ARN fueron capaces de producir un ADNc “suficientemente puro” (Tabla 9) (Figura 23).

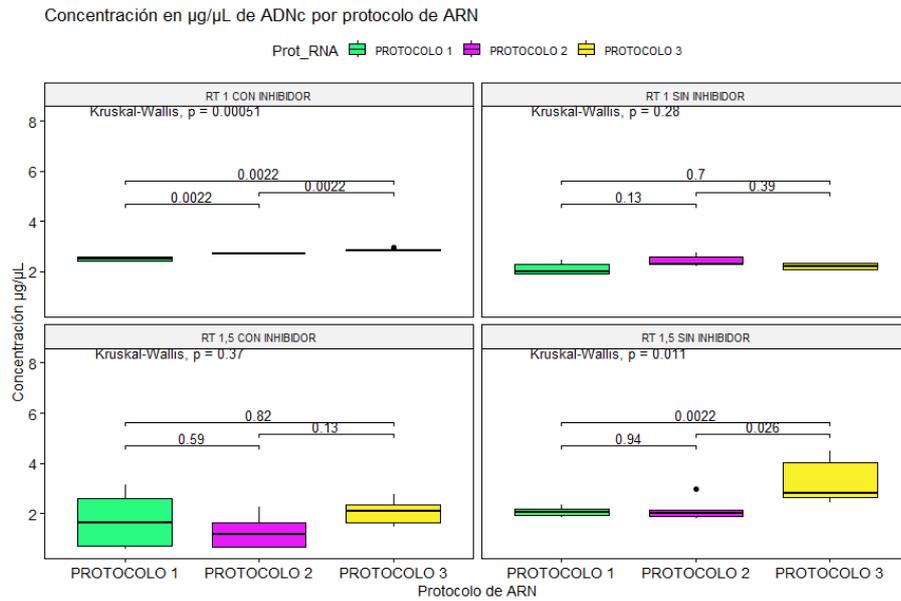
Tabla 9

Comparación de la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y calidad del ADNc entre los protocolos de ARN (μ = media y Me = Mediana)

Protocolo de ADNc/Protocolo de ARN	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$					
	PI		PII		PIII	
	μ	Me	μ	Me	μ	Me
RT 1 con inhibidor	2.48	2.48	2.70	2.71	2.86	2.85
RT 1 sin inhibidor	2.11	2.00	2.42	2.29	2.21	2.21
RT 1.5 con inhibidor	1.70	1.61	1.23	1.14	2.04	2.57
RT 1.5 sin inhibidor	2.06	2.05	2.12	2.01	3.24	2.78
Protocolo de ADNc/Protocolo de ARN	Relación A260/280					
	PI		PII		PIII	
	μ	Me	μ	Me	μ	Me
RT 1 con inhibidor	1.74	1.74	1.74	1.74	1.75	1.75
RT 1 sin inhibidor	1.77	1.78	1.78	1.79	1.82	1.82
RT 1.5 con inhibidor	1.79	1.80	1.69	1.76	1.80	1.82
RT 1.5 sin inhibidor	1.82	1.82	1.82	1.83	1.79	1.83

Figura 22

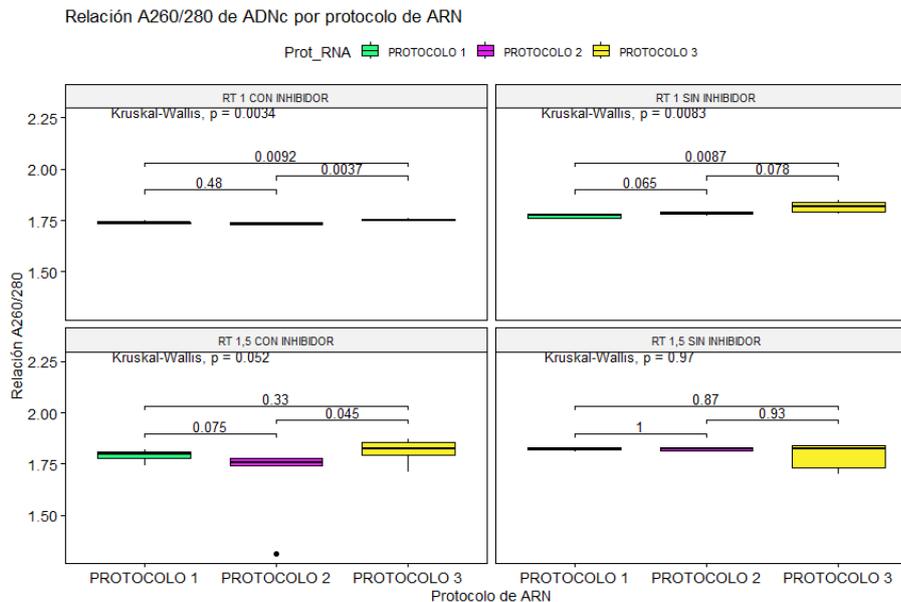
Concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ADNc por protocolo de extracción de ARN.



Nota: Los valores de “p” se obtuvieron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los tres protocolos de ARN en cada protocolo de ADNc, y una prueba post hoc de Wilcoxon.

Figura 23

Relación A260/280 de ADNc por protocolo de extracción de ARN.



Nota: Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar los tres protocolos de ARN en cada protocolo de ADNc, y una prueba post hoc de Wilcoxon pareada para comparar la relación entre los protocolos de extracción.

9.6. Análisis multivariado de la síntesis de ADNc

Mediante el análisis multivariado de la varianza para datos no paramétricos (PERMANOVA), la relación de la variable concentración con Protocolos de ADNc, Protocolos de ARN y Condición de muestra, detectó diferencias significativas ($p < 0.05$), es decir, que la concentración obtenida del ADNc dependió de los protocolos tanto de ARN como ADNc y de la condición de la muestra. Así mismo, la relación de la concentración con la interacción “Protocolo ADNc: Protocolo ARN”, interacción “Protocolo ADNc: Condición de muestra” e interacción “Protocolo de ADNc: Protocolo de ARN: Condición de la muestra”, resultaron en diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) afirmando que dichas interacciones influyen en la concentración del ADNc resultante, es decir, la concentración del ADNc está influenciada por la cantidad de Transcriptasa inversa y adición de Inhibidor de RNasas que se encuentra en interacción con los protocolos de ARN (PI, PII, PIII) mismos que están determinados por la condición de la muestra (Congelada o Directa). En la relación A260/280 la relación con el Protocolo de ADNc, Condición de muestra y la interacción “Protocolo ADNc: Protocolo ARN” resultó en diferencias significativas ($p < 0.05$), se entiende que estas relaciones de interacción influyen en la relación A260/280 que es determinante de la pureza del ADNc (Tabla 10).

Tabla 10

Análisis multivariado de la síntesis de ADNc. Se presentan los p-valores obtenidos por cada relación e interacción de variables (ns, no significativo; 0.05; 0.01**; 0.001***).*

Relación e interacción	Concentración	A260/280
-------------------------------	----------------------	-----------------

Protocolos de ADNc	1.04e-11	0.0069**
Protocolos de ARN	1.58e-06	ns
Condición de la muestra	4.35e-08	0.0445*
Protocolo ADNc: Protocolo de ARN	3.59e-05	0.0445*
Protocolo ADNc: Condición de muestra	5.36e-06	ns
Protocolo de ADNc: Protocolo de ARN: Condición de la muestra	0.0027**	ns

9.7. Análisis del rendimiento del ADNc

Se obtuvo el rendimiento de ADNc mediante la división de (ng de ADNc / ng de ARN) de acuerdo al protocolo de ADNc utilizado con respecto a la variabilidad de la cantidad de enzima Transcriptasa inversa (50U/ μ L) y a la adición del inhibidor de RNasas. En particular, el Protocolo RT 1 con inhibidor produjo grandes cantidades de ADNc (4.32), seguido de RT 1 sin inhibidor (3.61), parecido a RT 1.5 sin inhibidor (3.47), siendo RT 1.5 con inhibidor el protocolo que produjo menor rendimiento de ADNc (1.63) (Tabla 11). Se demostró que existen diferencias significativas comparando todos los protocolos de ADNc mediante sus medianas ($p < 0.05$). Sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre los protocolos RT 1 con inhibidor y RT 1 sin inhibidor, así mismo, entre RT 1 con inhibidor y RT 1.5 sin inhibidor, y, por último, RT 1 sin inhibidor con RT 1.5 sin inhibidor, demostraron ser estadísticamente distintos ($p > 0.05$) (Figura 23). Se

realizó la combinación de los tres protocolos de extracción de ARN y los cuatro protocolos de síntesis de ADNc, los resultados se muestran en la tabla 12, donde el valor más alto de rendimiento provino de una combinación del protocolo RT 1 con inhibidor con el Protocolo II de ARN (4.58 ± 1.74).

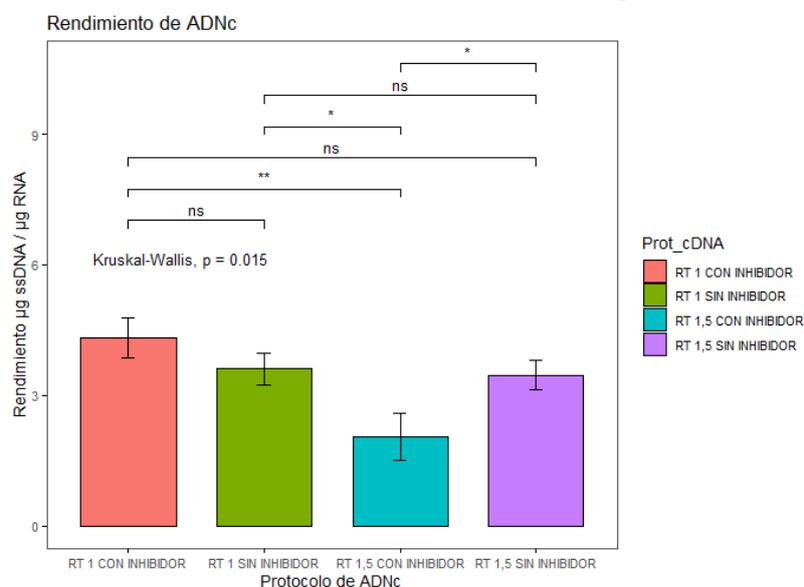
Tabla 11

Rendimientos de ADNc mediante variación en la Transcriptasa inversa y adición de Inhibidor de RNasas. Los datos se muestran como μ = media y Me = mediana

Método de extracción de ARN	Rendimiento de ADNc (ng ADNc/ng ARN)	
	μ	Me
RT 1 con inhibidor	4.32	4.097
RT 1 sin inhibidor	3.61	3.75
RT 1,5 con inhibidor	2.05	1.23
RT 1,5 sin inhibidor	3.47	3.296

Figura 24

Comparación de los rendimientos de ADNc utilizando los cuatro protocolos de síntesis de ADNc.



Nota: Se aplicó la prueba paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) y la prueba post hoc de Wilcoxon pareada ($p < 0.05$) para evaluar las diferencias entre los protocolos de extracción.

Tabla 12

Rendimientos de ADNc por protocolo de ARN obtenidos a partir de protocolos de síntesis de ADNc.

Los datos se muestran como media \pm DE.

Rendimiento de ADNc (ng ADNc/ng ARN)			
Método de extracción de ARN	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
RT 1 con inhibidor	4.00 \pm 0.29	4.58 \pm 1.74	4.38 \pm 2.03
RT 1 sin inhibidor	3.75 \pm 0.29	3.89 \pm 1.47	3.18 \pm 1.46
RT 1,5 con inhibidor	1.09 \pm 0.14	1.08 \pm 0.33	2.723 \pm 0.686
RT 1,5 sin inhibidor	3.31 \pm 0.51	3.12 \pm 1.12	3.97 1.44

10. DISCUSIONES

Comparación de métodos de extracción de ARN

Los métodos de extracción de ARN pueden presentar altos riesgos de contaminación, al igual que degradación del ácido nucleico, por lo tanto, a partir de la información científica es recomendable trabajar en laboratorio con estrictas condiciones de asepsia. Considerando aquellas sugerencias, en este estudio se compararon 3 protocolos empleando columnas giratorias de sílice, así lo afirma Yang et al. (2017) quienes implementaron los métodos de extracción de ARN basados en columnas giratorias de sílice comprobando su eficacia en la eliminación de proteínas, polisacáridos y compuestos polifenólicos, utilizaron exitosamente el ARN de alta calidad mediante este método para la amplificación por RT-PCR. Cabe recalcar, que el protocolo II es una modificación del método de columnas de sílice (Invitrogen™ 12183018A) (Anexo 1), cuyas variaciones son parecidas a las de Hidayat y Prasetyo (2021) quienes cambiaron el tiempo de lisis y homogenización de la muestra en vortex, además de utilizar 8000 rpm en vez de 12000 rpm en todo el protocolo, adquiriendo resultados positivos al extraer ARN total de un modelo de estudio. Así mismo, los protocolos difieren en el volumen de reactivo, especialmente el tampón de lisis con Tiocianato de Guanidina, considerado un factor fundamental durante la homogenización de la muestra, en este estudio el PI utilizó 300 μ L, mientras que, en el PII se agregaron 700 μ L, dados los valores de concentración (Tabla 3) estos cambios influyeron en la eficiencia de extracción de ARN (De Wever et al., 2020). A pesar de haber aplicado volúmenes diferentes, los resultados fueron 599.6 ± 44.47 ng/ μ L del PI y 664.27 ± 312.71 ng/ μ L de ARN del

PII, cuyos valores de las muestras congeladas son más altos que los reportados por Sze-Wan et al. (2017) quienes utilizando el método de columnas de sílice (Invitrogen™ 12183018A) en muestras congeladas de microalgas verdes obteniendo una baja concentración de ARN total (5.5 ± 3.0 ng/ μ L) y con índice altos de contaminación por proteínas (1.36 ± 0.11). En contraste, Lopez et al. (2017) adicionó el reactivo Trizol para alcanzar mejor concentración de ARN en la microalga *Chlorella* (248.33 ± 18 ng/ μ L) con una calidad en la relación A260/280 ~ 2 .

El protocolo de extracción de ARN más eficaz fue el PIII a partir de columnas de sílice con Proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732), no obstante, la información sobre la aplicación de este método en microalgas es limitada a evaluación de propiedades antioxidantes, anticancerígenas y productividad lipídica a través de la expresión génica (Gomaa, 2018; El-fayoumy et al., 2021; Gumbi, Kumar y Olaniran, 2022), es decir, no cuantifican el ARN. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio (Concentración = 734.2 ± 266.01 ng/ μ L y A260/280 = 2.06 ± 0.03) mediante el PIII son valores altos en comparación con estudios realizados por Žiarovská et al. (2018) quienes alcanzaron un promedio de (Concentración = 340 ± 71 ng/ μ L y A260/280 = 2.00 ± 0.22) en tejidos vegetales, en contraste con Rashid et al. (2017) cuyos valores fueron nulos. Igualmente, los investigadores França, Bento y Cerca (2012) no lograron extraer una cantidad mayor a 80 ng/ μ L de concentración y una relación de absorbancia A260/280 >1.8 en bacterias.

Las diferencias de concentración y calidad del ARN entre los protocolos están directamente influenciadas por la lisis celular, Lever et al. (2015) mencionaron que la lisis se puede lograr mecánicamente mediante trituración, congelación o batiendo perlas, en relación a los valores obtenidos por condición de muestra (Tabla 3), las muestras congeladas en todos los protocolos alcanzaron cantidades de concentración superiores e índices óptimos de pureza, en contraste con las muestras tomadas directamente del cultivo, es decir, al estar congeladas a bajas temperaturas, la lisis celular resultó ser más sencilla, parecido al estudio realizado por Mundt, Heinrich y Hanelt (2019) quienes utilizaron nitrógeno líquido para congelar las microalgas apenas cosechadas obteniendo altos rendimientos de ARN. De acuerdo con (Lever et al., 2015), la lisis puede darse químicamente mediante detergentes que solubilizan componentes lipídicos de membrana o agente caotrópicos que perforan las membranas. De manera similar, informaron Siles, Eastmond y Kurup (2020) sobre el uso de 2-mercaptoetanol como agente reductor que desnaturaliza las ribonucleasas liberadas en el momento de la homogenización, lo cual evita utilizar proteinasa K. Este hecho lo evidencian Johnson et al. (2012), quienes al agregar 1-2% de 2-mercaptoetanol al tampón de extracción, obtuvieron una buena concentración de ARN. En comparación con el estudio anteriormente mencionado, el Protocolo III (Thermo Scientific™ K0732) utilizó 2% de 2-mercaptoetanol por 1 ml de tampón de lisis adquiriendo cantidades de ARN superiores y en conjunto con la lisis enzimática a partir de la proteinasa K.

Está documentado que la proteinasa K generalmente se utiliza en los pasos iniciales de la extracción de ARN esencialmente en la homogenización celular para

facilitar la digestión de la muestra, debido a que, ayuda a la inactivación de nucleasas que pueden degradar el ácido nucleico, liberando el ARN de complejos “ARN-Proteína” de esa forma disminuye la contaminación proteica (Ñique et al., 2021). En el estudio de Biskup et al. (2022) demostraron que la adición de proteinasa K aumenta el rendimiento de ARN considerablemente. Con respecto a lo anterior, el Protocolo III es el método de extracción de ARN más efectivo tanto para muestras congeladas como directas, debido a su lisis de triple acción (mecánica, química y enzimática).

Por consiguiente, mediante el análisis espectrofotométrico (Figura 15), los mejores espectros de ARN fueron de las muestras congeladas, cuyo pico en onda de absorbancia 260 nm indicaba alta concentración de ARN, sin embargo, Green y Sambrook (2020) indican que A260 nm no discrimina entre ARN y ADN, mientras que, Poovakka et al. (2018) afirman que un pico parabólico con una absorción máxima de 260 nm indica aislamiento puro de ácido nucleico. A partir de la relación A260/280 se determinó la presencia de contaminación proteica que en la mayoría de muestras indiferentemente por condición tuvieron la depresión en 280 nm del espectro ≥ 2 , es decir, el ARN predominó.

Obtención de ADNc a través de la transcriptasa inversa e inhibidor de RNasas

En base al ARN obtenido a partir de los 3 protocolos de extracción se realizó la síntesis de ADNc mediante retrotranscripción del ARN a partir de variaciones de la transcriptasa inversa e inhibidor de RNasas. Estudios previos de obtención de

ADNc por retrotranscripción del ARN mediado por transcriptasa inversa han tenido como finalidad evaluar la expresión génica de un gen de interés en microalgas (Nelnikov et al., 2022; Marrero et al., 2021; Thiriet-Rupert et al., 2018). De acuerdo con Schwaber, Andersen y Nielsen (2019) las mediciones transcriptómicas invariablemente incluyen un paso de transcripción inversa (RT) donde se utiliza las plantillas de ARN para generar transcripciones de ADNc y poder cuantificarlos, las técnicas no miden de manera directa el número de transcritos de ARN, por tal motivo, los resultados dependen de lo eficaz que sea el proceso de conversión de ARNm (ARN mensajero) en ADNc.

En el presente estudio, la cuantificación de ADNc (ssDNA) mediante espectrofotometría resultó en cantidades elevadas de concentración, pero bajos índices de pureza. Es importante mencionar que en esta investigación se limitó a evaluar el ADNc de cadena simple, dado que puede ser considerada una manera rápida en menor tiempo y dinero, para asegurar la obtención de ADNc sin necesidad de realizar una PCR para aquello. No obstante, Palikša, Alzbutas y Skirgaila (2018) dentro de su experimentación agregaron 2 μL de Transcriptasa Inversa (100U/ μL) a 20 μL de la mezcla de reacción final y analizaron el ADNc mediante PCR obteniendo un buen producto de amplificación, en contraste con los valores resultantes (Tabla 9) la variación en la cantidad de μL de la enzima (50U/ μL) no tuvo mayor impacto en la concentración de ADNc, sin embargo, la concentración en (U/ μL) de la transcriptasa inversa puede estar influyendo en la concentración final del ADNc y por ende en el producto de amplificación. Otra variación realizada en el protocolo de transcripción inversa fue la adición de Inhibidor de RNasa.

Haddad et al. (2007) indicaron que existe una producción significativa de síntesis de ADNc sin considerar el inhibidor de RNasa dado que las reacciones de RT que utilizan esta enzima pueden no ser suficientemente estrictas para demostrar la expresión de una cadena de ARN específica, en semejanza con este argumento, en la Tabla 9 se observaron datos variables con respecto a la presencia y ausencia del inhibidor en las reacciones RT correlacionadas a la concentración del ADNc, teniendo en cuenta que la eliminación del ARN de la mezcla de reacción de RT puede llegar a ser fundamental para cuantificar el ADNc mediante RiboGreen (Libus y Štorchová, 2006) u otro método de fluorometría.

Se sintetizaron de 1.23 a 4.32 ng/ μ L de ADNc por cada ng de ARN utilizando distintos protocolos de síntesis de ADNc, el protocolo RT 1 con inhibidor presentó el mejor rendimiento (Tabla 11) siendo el método más efectivo para sintetizar mayor cantidad de ADNc (Anexo 2), estos valores son menores en comparación con el estudio realizado por Spath et al. (2021) quienes obtuvieron rendimientos de hasta 1059,25 ng/ μ L. Así mismo, Torrejon et al. (2023) sintetizaron de 8 a 35 ng de ADNc por 10 ng de ARN resaltando que dentro de este estudio utilizaron el PIII a partir de columnas de sílice con Proteinasa K (Thermo Scientific™ K0732) como método de extracción de ARN, sin embargo, Currier et al. (2012) logró obtener 12 μ g de ADNc a partir de 10 ng de ARNm. Existe una correlación de la expresión génica con el comportamiento celular a nivel unicelular, pero aquello no se logra debido a la pequeña cantidad de ARNm lábil que se encuentra en una sola célula que va de 1-5% de 1-50pg de ARN total, es decir, 0.01-2.5pg de ARNm por célula (Boon et al., 2011). El rendimiento obtenido en este

estudio pudo verse afectado por la menor proporción de ARNm frente a otros tipos de ARN como ribosómico o de transferencia, aun cuando, todas las combinaciones entre los métodos de extracción de ARN y síntesis de ADNc alcanzaron cantidades significativas de concentración de ADNc.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

11.1. Conclusiones

- El protocolo III a partir de columna de sílice con proteinasa K (*Thermo Scientific™ K0732*) demostró ser el más eficiente tanto para muestras directas como congeladas, la extracción de ARN total alcanzó una alta concentración para ambas condiciones de muestra (Congelada = 734.2 ng/ μ L y Directa = 505.43 ng/ μ L), así mismo, se extrajo ARN de pureza óptima de acuerdo a la relación de absorbancia A260/280 (Congelada \sim 2 y Directa \sim 2).
- El protocolo estandarizado para síntesis de ADNc de alta calidad consistió en agregar 1 μ L de transcriptasa inversa y 1 μ L de inhibidor de RNasas por cada 8 μ L de ARN total.
- La síntesis de ADNc evidenció bajo índice de calidad en la relación de absorbancia A260/280 en la mayoría de muestras \sim 1.7 – 1.79, sobresaliendo el protocolo RT 1.5 sin inhibidor donde se obtuvo muestras de pureza óptima, que oscilaban entre 1.82 – 1.83. Con respecto al rendimiento del ADNc, se alcanzó una síntesis de 1.23 – 4.32 ng de ADNc por cada ng de ARN total. Así también, el método de retrotranscripción de ARN más eficaz con un rendimiento de 4.32 ng de ADNc/ ng de ARN fue el RT 1 con inhibidor. Sin embargo, en cualquier combinación implementada del

método de extracción y el protocolo de síntesis de ADNc, las cantidades de ADNc obtenidas son suficientes para estudios de expresión génica.

11.2. Recomendaciones

- Mantener condiciones de asepsia, eliminando especialmente las ribonucleasas ayuda a extraer mayor concentración de ARN, al igual que medir con exactitud los reactivos para no obstruir en la pureza del ácido nucleico.
- Conseguir una transcriptasa inversa (RT) con mayor concentración en (U/ μ L) puede beneficiar la eficiencia de transcripción de la enzima.
- Luego de sintetizar el ADNc de cadena simple (ssDNA) es recomendable continuar con el proceso para la expresión génica mediante la RT-PCR o qRT-PCR, analizando algún gen de interés.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist/Biochemist*, 42(3), 48–53. <https://doi.org/10.1042/bio20200034>
- Alvine, T., Unsinn, N., Long, J. J., & Ferraiolo, J. (2023). Validation of mRNA concentration determination by slope spectroscopy technology: a matrixed approach. *Cell & Gene Therapy Insights*, 9(5), 611–624. <https://doi.org/10.18609/cgti.2023.084>
- Araj-Shirvani, M., Masoud Honarvar, Mahshid Jahadi, & Mizani, M. (2024). Biochemical profile of *Dunaliella* isolates from different regions of Iran with a focus on pharmaceutical and nutraceutical potential applications. *Food Science & Nutrition*. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4137>
- Baptista, B., Carapito, R., Laroui, N., Pichon, C., & Sousa, F. (2021). mRNA, a Revolution in Biomedicine. *Pharmaceutics*, 13(12), 2090. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122090>
- 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>
- Biskup, E., Lone Schejbel, Nogueira, D., & Estrid Høgdall. (2022). Test of an Improved DNA and RNA Purification Protocol—Importance of Proteinase K and Co-Purified Small RNAs. *Separations*, 9(11), 324–324. <https://doi.org/10.3390/separations9110324>
- Boon, W. C., Petkovic-Duran, K., Zhu, Y., Manasseh, R., Horne, M. K., Aumann, T. D. (2011). Increasing cDNA Yields from Single-cell Quantities of mRNA in Standard Laboratory Reverse Transcriptase Reactions using Acoustic Microstreaming. *J. Vis. Exp.* (53), e3144, doi:10.3791/3144
- Burgstedt, C. (2021). Understanding the New Technologies for RNA Isolation/Extraction. *Genetic Engineering & Biotechnology News*.

<https://www.genengnews.com/topics/omics/understanding-the-new-technologies-for-rna-isolation-extraction/>

- Bustin, S., & Nolan, T. (2017). Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *European journal of clinical investigation*, 47(10), 756–774. <https://doi.org/10.1111/eci.12801>
- Bustin, S., Dhillon, H. S., Kirvell, S., Greenwood, C., Parker, M., Shipley, G. L., & Nolan, T. (2015). Variability of the reverse transcription step: practical implications. *Clinical chemistry*, 61(1), 202–212. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230615>
- Cai, W. M., Chionh, Y. H., Hia, F., Gu, C., Kellner, S., McBee, M. E., ... Dedon, P. C. (2015). A Platform for Discovery and Quantification of Modified Ribonucleosides in RNA. *RNA Modification*, 29–71. doi: 10.1016/bs.mie.2015.03.004
- Carpinetti, P. A., Fiorese, V. S., Ignez da Cruz, T., de Almeida, F. A. N., Canal, D., Ferreira, A., & Ferreira, M. F. D. S. (2021). Efficient method for isolation of high-quality RNA from *Psidium guajava* L. tissues. *PloS one*, 16(7), e0255245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255245>
- Chatterjee, S., & Pal, J. K. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the cell*, 101(5), 251–262. <https://doi.org/10.1042/BC20080104>
- Chiluisa-Utreras, V., Vaca, I., Chicaiza, J., Peñaherrera, S., & Acurio, R. D. (2017). Isolation and quantification of three genes involved in the expression of anthocyanins in *Rubus glaucus* Benth by RT-qPCR. *MOJ Food Process Technol*, 5(3), 314–316. DOI: 10.15406/mojfpt.2017.05.00129
- Cholet, F., Ijaz, U. Z., & Smith, C. J. (2020). Reverse transcriptase enzyme and priming strategy affect quantification and diversity of environmental

transcripts. *Environmental Microbiology*, 22(6), 2383-2402.
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.15017>

Choudhary, A., Sood, M., Dogra Bandral, J., & Gupta, N. (2024). Impact of Transcriptomics on Food Quality: A Comprehensive Approach. *Chemical Science Review and Letters*, 13(49), 28–35.
<https://doi.org/10.37273/chesci.cs205502091>

Colusse, G. A., Mendes, C. R. B., Duarte, M. E. R., Carvalho, J. C. de, & Nosedá, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27, e00508. doi: 10.1016/j.btre. 2020.e00508

Currier, R. B., Calvete, J. J., Sanz, L., Harrison, R. A., Rowley, P. D., & Wagstaff, S. C. (2012). Unusual Stability of Messenger RNA in Snake Venom Reveals Gene Expression Dynamics of Venom Replenishment. *PloS One*, 7(8), e41888–e41888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041888>

De Wever, J., Tulkens, D., Verwaeren, J., Everaert, H., Rottiers, H., Dewettinck, K., ... & Messens, K. (2020). A combined RNA preservation and extraction protocol for gene expression studies in cacao beans. *Frontiers in Plant Science*, 11, 992. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00992>

Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (45), 2565. <https://doi.org/10.3791/2565>

El-fayoumy, E. A., Sanaa M. M. Shanab, Gaballa, H. S., Tantawy, M. A., & Shalaby, E. A. (2021). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and different fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1). [https://doi.org/10.1186/s12906-020-03194-](https://doi.org/10.1186/s12906-020-03194-x)

x

- França, A., Bento, J. C., & Cerca, N. (2012). Variability of RNA Quality Extracted from Biofilms of Foodborne Pathogens Using Different Kits Impacts mRNA Quantification by qPCR. *Current Microbiology*, 65(1), 54–59. doi:10.1007/s00284-012-0124-5
- Gallagher, S. R. (2011). Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy. *Current Protocols in Neuroscience*. doi:10.1002/0471142301.nsa01ks56
- Ganjali, S., Shahriari, F., & Ahmadzadeh, H. (2019). Gene Expression Analysis in *Dunaliella salina* Under Salt Stress. *Plant, Algae, and Environment*, 3(1), 287-300. doi: 10.29252/JPR.3.1.287
- Garcia-Bardon A, Thal SC (2016) Normalization with Corresponding Naïve Tissue Minimizes Bias Caused by Commercial Reverse Transcription Kits on Quantitative Real-Time PCR Results. *PLoS ONE* 11(11): e0167209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167209>
- Gomaa, M. (2018). Ethyl Methane Sulfonate Effect on Total Lipids of *Chlorella vulgaris* isolated from Nile River Egypt. *Annals of Agricultural Science, Moshtohor*, 56(3), 669-674. doi: 10.21608/assjm.2018.49792
- Gote, V., Bolla, P. K., Kommineni, N., Butreddy, A., Nukala, P. K., Palakurthi, S. S., & Khan, W. (2023). A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2700. <https://doi.org/10.3390/ijms24032700>
- Gramma, S. B., Liu, Z., & Li, J. (2022). Emerging Trends in Genetic Engineering of Microalgae for Commercial Applications. *Marine Drugs*, 20(5), 285–285. <https://doi.org/10.3390/md20050285>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Synthesis of Single-Stranded RNA Probes by In Vitro Transcription. *Cold Spring Harbor protocols*, 2020(1), 100628. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100628>

- Gumbi, S. T., Kumar, A., & Olaniran, A. O. (2022). Lipid Productivity and Biosynthesis Gene Response of Indigenous Microalgae *Chlorella* sp. T4 Strain for Biodiesel Production Under Different Nitrogen and Phosphorus Load. *BioEnergy Research/BioEnergy Research*, *15*(4), 2090–2101. <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10419-z>
- Haddad, F., Qin, A. X., Giger, J. M., Guo, H., & Baldwin, K. M. (2007). Potential pitfalls in the accuracy of analysis of natural sense-antisense RNA pairs by reverse transcription-PCR. *BMC Biotechnology*, *7*(1), 21–21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-21>
- He, Q., Lin, Y., Tan, H., Zhou, Y., Wen, Y., Gan, J., Li, R., & Zhang, Q. (2020). Transcriptomic profiles of *Dunaliella salina* in response to hypersaline stress. *BMC genomics*, *21*(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6507-2>
- Hidayat, M. T., & Prasetyo, E. N. (2021). Modified Spin Column-Based RNA Extraction Methods of *Staphylococcus aureus* using PureLink® RNA Mini Kit and Basic Laboratory Instrument. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, *3*(2), 73-80. <https://doi.org/10.33086/ijmlst.v3i2.1863>
- Hughes S. H. (2015). Reverse Transcription of Retroviruses and LTR Retrotransposons. *Microbiology spectrum*, *3*(2), MDNA3–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0027-2014>
- Johnson, M. T., Carpenter, E. J., Tian, Z., Bruskiwich, R., Burris, J. N., Carrigan, C. T., Chase, M. W., Clarke, N. D., Covshoff, S., Depamphilis, C. W., Edger, P. P., Goh, F., Graham, S., Greiner, S., Hibberd, J. M., Jordon-Thaden, I., Kutchan, T. M., Leebens-Mack, J., Melkonian, M., Miles, N., Wong, G. K. (2012). Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS one*, *7*(11), e50226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050226>

- Kanani, P., Shukla, Y. M., Modi, A. R., N. Subhash, & Kumar, S. (2019). Standardization of an efficient protocol for isolation of RNA from *Cuminum cyminum*. *Journal of King Saud University. Science/Mağallā' Ğāmi'at Al-Malik Sa'ūd. Al-'Ulūm*, 31(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.12.008>
- Khosravinia, S., Saeid Malekzadeh-Shafaroudi, Bagheri, A., Assieh Behdad, & Nasrin Moshtaghi. (2023). Bioprospecting of Ten Microalgae Species Isolated from Saline Water Lake for Evaluation of the Biodiesel Production. *BioEnergy Research/BioEnergy Research*, 17, 1090-1103. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10707-2>
- Kim, M., Kang, Y., & Jin, E. (2019). Gene Expression Analysis of Zeaxanthin Epoxidase from the Marine Microalga *Dunaliella tertiolecta* in Response to Light/Dark Cycle and Salinity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1453–1459. <https://doi.org/10.4014/jmb.1904.04053>
- Kiss, T., Karácsony, Z., Gomba-Tóth, A., Szabadi, K. L., Spitzmüller, Z., Hegyi-Kaló, J., Cels, T., Otto, M., Golen, R., Hegyi, Á. I., Geml, J., & Váczy, K. Z. (2024). A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono-and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. *Plant Methods*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01198-z>
- Kuang, J., Yan, X., Genders, A. J., Granata, C., & Bishop, D. J. (2018). An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PloS one*, 13(5), e0196438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196438>
- Lever, M. A., Torti, A., Eickenbusch, P., Michaud, A. B., Šantl-Temkiv, T., & Bo Barker Jørgensen. (2015). A modular method for the extraction of DNA and RNA, and the separation of DNA pools from diverse environmental sample types. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00476>

- Libus, J., & Štorchová, H. (2006). Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *BioTechniques*, *41*(2), 156–164. doi:10.2144/000112232
- Liyanage, N. M. N., Chandrasekara, B. C. H. W. M., & Bandaranayake, P. C. G. (2021). A CTAB protocol for obtaining high-quality total RNA from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Biotech*, *11*(4), 201. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02756-1>
- Lopez, B. R., Hernandez, J.-P., Bashan, Y., & de-Bashan, L. E. (2017). Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *Journal of Microbiological Methods*, *135*, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.02.005>
- López, C. (2011). *Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular*. Editorial Universidad Nacional de Colombia. ISBN:978-958-761-031-4
- Luo, G. X., & Taylor, J. (1990). Template switching by reverse transcriptase during DNA synthesis. *Journal of virology*, *64*(9), 4321-4328. <https://doi.org/10.1128/jvi.64.9.4321-4328.1990>
- Marrero, M., Monroig, Ó., Betancor, M., Herrera, M., Pérez, J. A., Garrido, D., Galindo, A., Inmaculada Giráldez, & Covadonga Rodríguez. (2021). Influence of Dietary Lipids and Environmental Salinity on the n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Biosynthesis Capacity of the Marine Teleost *Solea senegalensis*. *Marine Drugs*, *19*(5), 254–254. <https://doi.org/10.3390/md19050254>
- Martín-Alonso, S., Frutos-Beltrán, E., & Menéndez-Arias, L. (2020). Reverse Transcriptase: From Transcriptomics to Genome Editing. *Trends in Biotechnology*. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.06.008
- Martínez-López, A. A., Leshner, J. M., & Jiménez-García, M. E. (2013). Comparación de tres métodos para la extracción de ARN total a partir de

hojas de cacao. *Biotecnología Vegetal*, 13(2).
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/100/82>

Maurer, M., Klassert, T. E., Löffler, B., Slevogt, H., & Tuchscher, L. (2023). Extraction of High-Quality RNA from *S. aureus* Internalized by Endothelial Cells. *Microorganisms*, 11(4), 1020.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11041020>

Melnikov, N., Kamari, Y., Kandel-Kfir, M., Barshack, I., Ben-Amotz, A., Harats, D., Shaish, A., & Harari, A. (2022). β -Carotene from the Alga *Dunaliella bardawil* Decreases Gene Expression of Adipose Tissue Macrophage Recruitment Markers and Plasma Lipid Concentrations in Mice Fed a High-Fat Diet. *Marine drugs*, 20(7), 433. <https://doi.org/10.3390/md20070433>

Minshall, N., & Git, A. (2020). Enzyme-and gene-specific biases in reverse transcription of RNA raise concerns for evaluating gene expression. *Scientific Reports*, 10(1), 8151. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65005-0>

Mo, Y., Wan, R., & Zhang, Q. (2012). Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 926, 99–112. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_7

Moebes, M., Kuhlmann, H., Demidov, D., & Lermontova, I. (2022). Optimization of quantitative reverse transcription PCR method for analysis of weakly expressed genes in crops based on rapeseed. *Frontiers in plant science*, 13, 954976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.954976>

Mougel, M., Houzet, L., & Darlix, J.-L. (2009). When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology*, 6(1), 24. doi:10.1186/1742-4690-6-24

Mundt, F., Heinrich, S., & Dieter Hanelt. (2018). RNA isolation from taxonomically diverse photosynthetic protists. *Limnology and*

- Oceanography*, *Methods*, *17*(3), 190–199.
<https://doi.org/10.1002/lom3.10299>
- Mutiu, A. I., & Brandl, C. J. (2005). RNA isolation from yeast using silica matrices. *Journal of biomolecular techniques*. *JBT*, *16*(4), 316–317.
- Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PloS one*, *11*(3), e0150528.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150528>
- Ñique AM, Coronado-Marquina F, Mendez Rico JA, García Mendoza MP, Rojas-Serrano N, et al. (2021) A faster and less costly alternative for RNA extraction of SARS-CoV-2 using proteinase k treatment followed by thermal shock. *PloS one* *16*(3): e0248885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248885>
- Oscorbin, I. P., & Filipenko, M. L. (2021). M-MuLV reverse transcriptase: Selected properties and improved mutants. *Computational and structural biotechnology journal*, *19*, 6315–6327.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.11.030>
- Pagani, S., Maglio, M., Sicuro, L., Fini, M., Giavaresi, G., & Brogini, S. (2023). RNA Extraction from Cartilage: Issues, Methods, Tips. *International journal of molecular sciences*, *24*(3), 2120.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032120>
- Palikša, S., Alzbutas, G., & Skirgaila, R. (2018). Decreased Km to dNTPs is an essential M-MuLV reverse transcriptase adoption required to perform efficient cDNA synthesis in One-Step RT-PCR assay. *Protein Engineering, Design & Selection*, *31*(3), 79–89. <https://doi.org/10.1093/protein/gzy003>
- Poovakka, S. K., Ramadas, D., Ramadas, G., & VG, D. R. (2018). Quality affecting factors of RNA—its assessment and influence on PCR Reactions. *Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences* Vol, 5, 6. ISSN: 2347-7520

- Potapov, V., Fu, X., Dai, N., Corrêa Jr, I. R., Tanner, N. A., & Ong, J. L. (2018). Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity. *Nucleic Acids Research*, 46(11), 5753-5763. <https://doi.org/10.1093/nar/gky341>
- Rashid, A., Baldwin, T., Gines, M., Bregitzer, P., & Kathy Esvelt Klos. (2016). A High-Throughput RNA Extraction for Sprouted Single-Seed Barley (*Hordeum vulgare* L.) Rich in Polysaccharides. *Plants*, 6(4), 1–1. <https://doi.org/10.3390/plants6010001>
- Ray, S. (2014). The Cell: A Molecular Approach. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 87(4), 603-604. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4257047/>
- Ribaudo, R., Gilman, M., Kingston, R. E., Choczynski, P., & Sacchi, N. (2001). Preparation of RNA from Tissues and Cells. *Current Protocols in Immunology*. doi:10.1002/0471142735.im1011s04
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA by SDS Solubilization and Phenol Extraction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb. prot5438–pdb. prot5438. doi:10.1101/pdb.prot5438
- Sanders, R., Mason, D. J., Foy, C. A., & Huggett, J. F. (2014). Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(26), 6471–6483. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7857-x>
- Sasi, S., Krishnan, S., Kodackattumannil, P., Shamisi, A. A., Aldarmaki, M., Lekshmi, G. & Amiri, K. M. (2023). DNA-free high-quality RNA extraction from 39 difficult-to-extract plant species (representing seasonal tissues and tissue types) of 32 families, and its validation for downstream molecular applications. *Plant Methods*, 19(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01063-5>

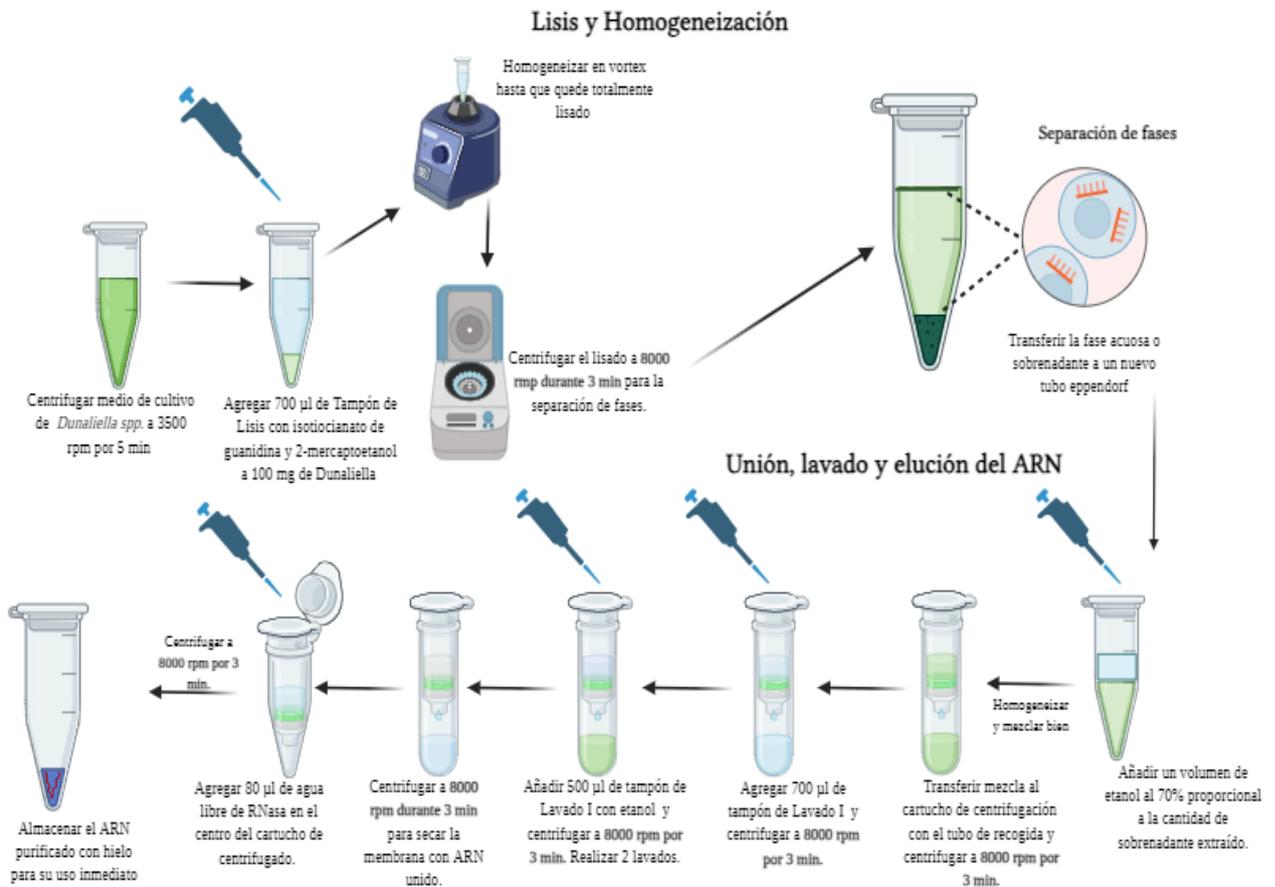
- Sayed, M., Omar, R., & Fathy, W. A. (2023). Role of Silver Nanoparticles Synthetized by Marine Red Algae, *Acanthophora spicifera*, Against Saprolegniosis in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 13(8), 1618-1625. Retrieved from <https://www.advetresearch.com/index.php/AVR/article/view/1488>
- 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>
- Shi, M., Yu, L., Shi, J., & Liu, J. (2022). A conserved MYB transcription factor is involved in regulating lipid metabolic pathways for oil biosynthesis in green algae. *New Phytologist*, 235(2), 576-594. <https://doi.org/10.1111/nph.18119>
- Siles, L., Eastmond, P., & Kurup, S. (2020). Big data from small tissues: extraction of high-quality RNA for RNA-sequencing from different oilseed Brassica seed tissues during seed development. *Plant methods*, 16, 80. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00626-0>
- Song, Y., Lan, Y., Li, K., Qiao, D., Cao, Y., & Xu, H. (2024). Regulation of a novel DsGATA1 from *Dunaliella salina* on the synthesis of carotenoids under red light. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12894-6>
- Spath, J., Rodríguez, V., Guzmán, C., & Guzmán, C. (2022). Comparación del rendimiento usando iniciador genérico y específico en diferentes órganos de murciélagos para obtener ADN. *Rev Avances en Salud*; 2021. (5) 2:8-14. <https://doi.org/10.21897/25394622.2965>
- Sze-Wan Poong, Lim, P., Jeannette W.-S. Lai, & Phang, S. (2017). Optimization of high-quality total RNA isolation from the microalga, *Chlorella* sp. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) for next-generation

- sequencing. *Phycological Research*, 65(2), 146–150.
<https://doi.org/10.1111/pre.12165>
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1–10. doi:10.1155/2009/574398
- Tavares, L., Alves, P. M., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2011). Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC Research Notes*, 4(1), 3. doi:10.1186/1756-0500-4-3
- Thermo Fisher Scientific. (2012). *PureLink RNA Mini Kit*.
<https://laboshop.ae/public/storage/products/August2021/HwatFRxkWR89V3s39zxO.pdf>
- Thermo Fisher Scientific. (2015). *GeneJet RNA Purification Kit*.
https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012664_GeneJET_RNA_Purification_UG.pdf?_ga=2.258371402.1986537387.1717812511-892167640.1708330161
- Thermo Fisher Scientific. (2018). *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.
https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf?_ga=2.50140452.345292927.1718152778-892167640.1708330161
- Thiriet-Rupert, S., Carrier, G., Trottier, C., Eveillard, D., Schoefs, B., Bougaran, G. & Saint-Jean, B. (2018). Identification of transcription factors involved in the phenotype of a domesticated oleaginous microalgae strain of *Tisochrysis lutea*. *Algal research*, 30, 59-72.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.12.011>
- Torrejón, D., Cárdenas, J., Juárez, D., Espinoza, J., Proleón, A., Andrés Agurto-Arteaga, Lazo, F., Leguía, M., Urra, F. A., Sánchez, E. F., Chávez-Olortegui, C., Vivas-Ruiz, D. E., & Yarlequé, A. (2023). Comparison of Four Methods of RNA Extraction and cDNA Synthesis from The Venom of

- Peruvian Snakes of the Genus *Bothrops* of Clinical Importance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 11161–11161. <https://doi.org/10.3390/ijms241311161>
- Vennapusa, A. R., Somayanda, I. M., Doherty, C. J., & Jagadish, S. V. K. (2020). A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Scientific reports*, 10(1), 16887. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73958-5>
- Verwilt, J., Mestdagh, P., & Vandesompele, J. (2023). Artifacts and biases of the reverse transcription reaction in RNA sequencing. *RNA (New York, N.Y.)*, 29(7), 889–897. <https://doi.org/10.1261/rna.079623.123>
- Yang, F., Wang, G., Xu, W., & Hong, N. (2017). A rapid silica spin column-based method of RNA extraction from fruit trees for RT-PCR detection of viruses. *Journal of virological methods*, 247, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.05.020>
- Yang, L., Tang, L., Zhang, M., & Liu, C. (2022). Recent advances in the molecular design and delivery technology of mRNA for vaccination against infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 13, 896958. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.896958>
- Zheng, Y., Luo, Y., Chen, X., Li, H., Huang, B., Zhou, B., ... Geng, W. (2021). The role of mRNA in the development, diagnosis, treatment and prognosis of neural tumors. *Molecular Cancer*, 20(1). doi:10.1186/s12943-021-01341-7
- Žiarovská, J., Kysel, M., Zelenáková, L., & Cusimamani, E. F. (2018). Effect of Different Reverse Transcription Approaches In Pru P 3 Transcripts Semiquantitative Amplification. *Potravinárstvo*, 12(1). doi: <https://doi.org/10.5219/891>
- Zucha, D., Androvic, P., Kubista, M., & Valihrač, L. (2020). Performance comparison of reverse transcriptases for single-cell studies. *Clinical Chemistry*, 66(1), 217-228. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.307835>

13. ANEXOS

Anexo 1. Esquema del Protocolo II de extracción de ARN estandarizado (*Invitrogen™ 12183018A*).



Protocolo II modificado a partir de columnas de sílice

Created in **BioRender.com** **bio**

Anexo 2. Esquema del Protocolo de síntesis de ADNc estandarizado (*Applied Biosystems*TM 4368814).



Protocolo RT 1 con Inhibidor

Anexo 3. Base de datos de la cuantificación de ARN extraído de muestras congeladas y directas.

Sample ID	Protocolo	Condición	Concentración ng/ul	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
P1DD1	PROTOCOLO 1	DIRECTA	101,4	2,536	1,296	1,96	1,64
P1DD2	PROTOCOLO 1	DIRECTA	147	3,674	2,614	1,41	0,68
P1DD3	PROTOCOLO 1	DIRECTA	139,7	3,492	1,724	2,03	1,94
P1DC1	PROTOCOLO 1	CONGELADA	583,4	14,584	7,018	2,08	1,87
P1DC2	PROTOCOLO 1	CONGELADA	649,9	16,247	8,054	2,02	1,45
P1DC3	PROTOCOLO 1	CONGELADA	565,5	14,145	6,866	2,06	1,88
P2DD1	PROTOCOLO 2	DIRECTA	301,1	7,528	3,654	2,06	1,57
P2DD2	PROTOCOLO 2	DIRECTA	213,5	5,338	2,607	2,05	1,77
P2DD3	PROTOCOLO 2	DIRECTA	100,6	2,515	1,312	1,92	1,44
P2DC1	PROTOCOLO 2	CONGELADA	511,4	12,786	6,321	2,02	2,19
P2DC2	PROTOCOLO 2	CONGELADA	457,4	11,435	5,801	1,97	1,97
P2DC3	PROTOCOLO 2	CONGELADA	1024	25,623	13,956	2	2,14
P3DD1	PROTOCOLO 3	DIRECTA	560,6	14,014	6,897	2,03	2,03
P3DD2	PROTOCOLO 3	DIRECTA	673,3	16,832	8,201	2,05	2,07
P3DD3	PROTOCOLO 3	DIRECTA	282,4	7,06	3,455	2,04	1,99
P3DC1	PROTOCOLO 3	CONGELADA	428,1	10,702	5,283	2,03	1,99
P3DC2	PROTOCOLO 3	CONGELADA	865,1	21,629	10,411	2,08	2,11
P3DC3	PROTOCOLO 3	CONGELADA	909,4	22,735	10,911	2,08	1,89

Anexo 4. Base de datos de la cuantificación de ADNc por protocolo de ARN.

Sample ID	Protocolo cDNA	Protocolo ARN	Condición de M	Concentración ug/ μ L	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
PC1P1DD1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,5582	77,522	44,343	1,75	2,03
PC1P1DD2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,5809	78,209	45,124	1,73	1,95
PC1P1DD3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,5695	77,865	44,733	1,74	1,99
PC1P1DC1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,39	72,425	41,177	1,73	1,94
PC1P1DC2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,3924	72,498	41,666	1,74	1,97
PC1P1DC3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,3912	72,461	41,421	1,74	1,95
PC1P2DD1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,7264	82,618	47,757	1,73	2,02
PC1P2DD2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,7107	82,141	47,49	1,73	2
PC1P2DD3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,7161	82,308	47,367	1,74	2,02
PC1P2DC1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,6591	80,579	46,272	1,74	2
PC1P2DC2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,7082	82,068	47,151	1,74	1,99
PC1P2DC3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,6837	81,323	46,712	1,73	2
PC1P3DD1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,8266	85,655	48,92	1,75	2,03
PC1P3DD2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,8475	86,287	49,25	1,75	2,02
PC1P3DD3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,9471	89,306	51,008	1,75	2,02
PC1P3DC1	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,8756	87,139	49,816	1,75	2,02
PC1P3DC2	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,8426	86,14	48,993	1,76	2,02
PC1P3DC3	RT 1 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,8395	86,045	48,905	1,76	2,03
PC2P1DD1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	1,9109	57,906	32,814	1,76	2,2
PC2P1DD2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	1,9112	57,916	32,962	1,76	2,2
PC2P1DD3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,0926	63,412	35,533	1,78	2,33
PC2P1DC1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,3528	71,298	40,131	1,78	2,28
PC2P1DC2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,4393	73,919	41,412	1,78	2,29

PC2P1DC3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	1,9255	58,348	32,936	1,77	2,11
PC2P2DD1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,211	67,001	37,466	1,79	2,29
PC2P2DD2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,6871	81,427	45,818	1,78	2,31
PC2P2DD3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,7446	83,169	46,959	1,77	2,29
PC2P2DC1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,2797	69,081	38,49	1,79	2,29
PC2P2DC2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,2906	69,413	38,704	1,79	2,28
PC2P2DC3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	2,2852	69,247	38,59	1,78	2,29
PC2P3DD1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,3475	71,136	39,691	1,79	2,14
PC2P3DD2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,3407	70,93	39,835	1,78	2,13
PC2P3DD3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,3414	70,953	39,611	1,79	2,18
PC2P3DC1	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,0782	62,977	34,273	1,84	2,16
PC2P3DC2	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,0583	62,372	33,937	1,84	2,16
PC2P3DC3	RT 1 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,084	63,152	34,206	1,85	2,16
PC3P1DD1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,6257	79,567	43,738	1,82	2,29
PC3P1DD2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	3,1286	94,806	53,626	1,8	2,23
PC3P1DD3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,5192	76,341	43,124	1,77	1,83
PC3P1DC1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	0,55803	16,95	9,849	1,74	1,41
PC3P1DC2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	0,6937	21,022	11,702	1,8	1,43
PC3P1DC3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	0,6969	21,119	11,685	1,81	1,46
PC3P2DD1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,2443	68,01	38,191	1,78	1,96
PC3P2DD2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	1,6574	50,223	38,337	1,31	0,8
PC3P2DD3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	1,5414	46,708	26,336	1,77	1,87
PC3P2DC1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	0,5945	18,016	10,371	1,74	1,44
PC3P2DC2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	0,6219	18,846	10,802	1,74	1,5
PC3P2DC3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	0,7428	22,509	12,65	1,78	1,59
PC3P3DD1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	1,4739	44,662	26,146	1,71	1,38
PC3P3DD2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,3764	72,012	40,122	1,79	1,95

PC3P3DD3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,7694	83,922	46,321	1,81	2,16
PC3P3DC1	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	1,5043	45,585	24,504	1,86	2,28
PC3P3DC2	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	1,9840	60,121	32,743	1,84	2,19
PC3P3DC3	RT 1,5 CON INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,1483	65,101	34,834	1,87	2,27
PC4P1DD1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,0558	62,298	34,124	1,83	2,32
PC3P1DD2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,3334	70,708	38,949	1,82	2,31
PC3P1DD3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	DIRECTA	2,051	62,156	33,911	1,83	2,33
PC4P1DC1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	2,2313	55,783	30,824	1,81	2,16
PC4P1DC2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	1,8236	55,262	30,352	1,82	2,23
PC4P1DC3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 1	CONGELADA	1,8622	56,431	31,002	1,82	2,22
PC4P2DD1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,1109	63,965	34,863	1,83	2,3
PC4P2DD2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,096	63,514	34,68	1,83	2,33
PC4P2DD3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	DIRECTA	2,9889	90,574	49,568	1,83	2,29
PC4P2DC1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	1,784	54,062	29,819	1,81	2,21
PC4P2DC2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	1,8331	55,549	30,524	1,82	2,23
PC4P2DC3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 2	CONGELADA	1,917	58,091	32,105	1,81	2,13
PC4P3DD1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	4,4799	135,753	79,756	1,7	2,12
PC4P3DD2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	4,4288	134,206	79,131	1,7	2,11
PC4P3DD3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	DIRECTA	2,5799	78,179	42,603	1,84	2,33
PC4P3DC1	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,4112	73,066	40,257	1,82	2,26
PC4P3DC2	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,7348	82,872	45,007	1,84	2,26
PC4P3DC3	RT 1,5 SIN INHIBIDOR	PROTOCOLO 3	CONGELADA	2,8291	86,731	46,877	1,83	2,22

Anexo 5. Base de datos del rendimiento en ng ADNc por ng ARN.

	Rendimiento de ADNc (ng ADNc/ng ARN)		
	PROTOCOLO 1	PROTOCOLO 2	PROTOCOLO 3
RT 1 CON INHIBIDOR	4,097	5,200	6,717
	3,681	5,921	3,286
	4,232	2,618	3,122
RT 1 SIN INHIBIDOR	4,033	4,458	4,854
	3,753	5,008	2,379
	3,463	2,230	2,292
RT 1,5 CON INHIBIDOR	0,957	1,162	3,514
	1,067	1,360	2,293
	1,233	0,725	2,362
RT 1,5 SIN INHIBIDOR	3,825	3,488	5,632
	2,806	4,008	3,161
	3,296	1,870	3,111

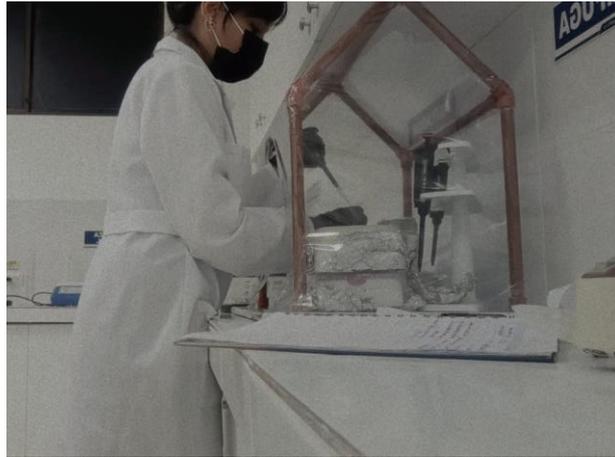
Anexo 6. Muestra de *Dunaliella* spp. congelada.



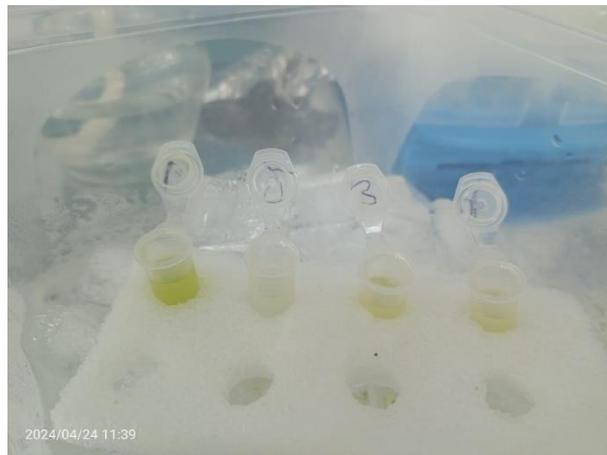
Anexo 7. Cultivos de *Dunaliella* spp.



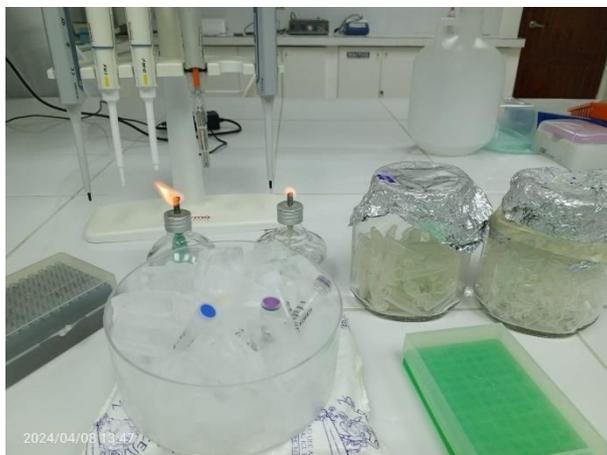
Anexo 8. Práctica de extracción de ARN.



Anexo 9. Procesamiento de muestras de ARN.



Anexo 10. Práctica de Síntesis de ADNc.



Anexo 11. Muestras procesadas para ADNc.



Anexo 12. Separación de fases luego de la lisis celular en procedimiento de extracción de ARN.

