



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN, CALIDAD E
INTEGRIDAD DEL ADN EXTRAÍDO DE SANGRE Y PLUMAS
DEL SURI (*Rhea pennata*)

TESIS

PRESENTADA POR:

KIARLA MIRELLA CRUZ YUCRA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2024



NOMBRE DEL TRABAJO

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN,
CALIDAD E INTEGRIDAD DEL ADN EXTRAÍDO DE SANGRE Y PLUMAS DEL SURI RH**

AUTOR

KIARLA MIRELLA CRUZ YUCRA

RECUENTO DE PALABRAS

12530 Words

RECUENTO DE CARACTERES

63209 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

71 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

20.9MB

FECHA DE ENTREGA

Jan 25, 2024 9:42 AM EST

FECHA DEL INFORME

Jan 25, 2024 9:47 AM EST

● **4% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos:

- 3% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 0% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)


Francisco Balley Rodríguez Huancsa
Médico Veterinario y Zootecnista
CMVP 7717


Dr. Pedro Ubaldo Coila Añasco
CMVP-2642



DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía en el transcurso de mi vida; a mi papá Oscar y mi abuelita Aurelia, quienes desde el cielo protegen y guían mis pasos en todo momento.

A mi amada madre Felicitas Yucra Muñoz y mi mami Miluska Cruz Yucra que siempre me apoyaron en mi formación espiritual, personal y profesional. Por su amor, apoyo, comprensión, consejos y enseñanzas incondicionales a lo largo de mi vida. Espero que se puedan sentir orgullosas de mí.

A mi Mami Caren, papi Erick y Kahel mi familia querida por brindarme mucho amor y estimularme para lograr mis metas.

A mis mascotas que me acompañaron en la infancia Flaco, Underdog, Dulcepoli, Isys, Machin y Huesito.

A Doggui que me acompañó en mi vida universitaria viviendo en Puno, Deybith, Fede, Olaf, Luna, Pauline y Gordelio quienes me acompañaron en esta última etapa y a pesar de las horas de trabajo, me brindaron calidez con su amor.

Kiarla Mirella Cruz Yucra



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor de tesis Mg. Francisco Halley Rodriguez Huanca, por haberme brindado sus conocimientos, apoyo constante, tiempo y agradecer su paciencia en la elaboración de esta tesis.

De la Misma forma agradezco al Dr. José Luis Vilca Ticona, sin su apoyo y asesoría no hubiera sido posible la realización de este trabajo de investigación.

Al Biólogo Angel Francisco Solis Gózar, laboratorista de Biología Molecular por su orientación, paciencia y apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación. De la misma manera a las personas que me apoyaron absolutamente durante la ejecución de mi proyecto de investigación

A mi alma mater la Universidad Nacional del Altiplano y a mi gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A cada uno de mis queridos docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por compartir sus conocimientos y sabiduría, a los laboratoristas por su apoyo incondicional y estimulación en la realización de las prácticas de los diferentes cursos, por supuesto a los administrativos de mi Facultad por su amabilidad y motivación.

Agradezco al Dr. Oscar Carreón Panca por darme la seguridad, confianza y el apoyo para continuar con mis objetivos y haberme guiado como estudiante.

A la memoria de mis queridos docentes: Dr. Felipe Amachi, Dr. Hugo Cotacallapa, Dr. José Málaga, Dr. Jesús Quispe, Mg. Sc. Simón Foraquita y al Dr. Julio Málaga por sus enseñanzas que permanecerán por siempre en mi ser.

A los distinguidos miembros del jurado: Dr. Luis Vicente Olivera Marocho, M.Sc. Rolando Daniel Rojas Espinoza, Dr. Edwin Ormachea Valdez, por la orientación, sus sabios consejos y el apoyo brindado.

A mis amigos: Gabriela, Daniela, Grecia, Litz y Paola con las que viví momentos alegres, tristes durante la carrera y siempre me brindaron su amistad sincera sin esperar nada a cambio.

A Gustavo por su compañía, comprensión y confianza.

Kiarla Mirella Cruz Yucra



ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE GENERAL	
INDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
ACRÓNIMOS	
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	
1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	16
1.1.1. Objetivo general	16
1.1.2. Objetivos específicos	16
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1. SURI (<i>RHEA PENNATA</i>)	17
2.2. EXTRACCIÓN DE ADN	20
2.3. PERFIL DEL ADN	21
2.3.1. Concentración del ADN	21
2.3.2. Calidad del ADN	22
2.3.3. Integridad del ADN	22
2.4. ANTECEDENTES.....	23



2.4.1. Extracción de ADN en <i>Rhea</i>	23
2.4.2. Análisis de ADN extraído en <i>Rhea</i>	26

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO	29
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	29
3.2.1. Tamaño de muestra	29
3.2.2. Materiales y equipos utilizados	30
3.3. METODOLOGÍA	31
3.3.1. Muestreo de sangre y pluma de suri.....	31
3.3.2. Extracción de ADN en pluma	31
3.3.3. Extracción de ADN en sangre.....	34
3.3.4. Concentración del ADN	36
3.3.5. Calidad del ADN.....	36
3.3.6. Integridad del ADN.....	37
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE <i>RHEA PENNATA</i>.....	39
4.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE <i>RHEA PENNATA</i>	42
4.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE <i>RHEA PENNATA</i>	44
V. CONCLUSIONES.....	47



VI. RECOMENDACIONES	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	57

Área: Sistemas de producción animal

Tema: Evaluación del ADN extraído de sangre y plumas del Suri (*Rhea pennata*).

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 29 de enero del 2024



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Animales muestreados de acuerdo al grupo de estudio	30
Tabla 2 Componentes de la solución de digestión	32
Tabla 3 Estadística descriptiva de la concentración en pluma y sangre	41
Tabla 4 Estadística descriptiva de la calidad en pluma y sangre	44
Tabla 5 Estadística descriptiva de la integridad en pluma y sangre	46



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Rhea pennata</i> en Mazocruz, Puno, Perú.....	19
Figura 2 Pie izquierdo de un polluelo <i>Casuaris</i>	19
Figura 3 Concentración del ADN en pluma y sangre	41
Figura 4 Calidad del ADN en pluma y sangre	43
Figura 5 Integridad del ADN en pluma y sangre	46
Figura 6 Extracción de plumas en <i>Rhea pennata</i>	57
Figura 7 Procesamiento de muestra de pluma	58
Figura 8 Procesamiento de las muestras de sangre	58
Figura 9 Uso del kit de extracción de ADN en plumas	59
Figura 10 Uso del kit de extracción del ADN en sangre	60
Figura 11 Evaluación de la concentración y la calidad del ADN extraído por medio del espectrofotómetro	60
Figura 12 Preparación de geles de agarosa para la evaluación de la integridad por electroforesis horizontal	61
Figura 13 Aplicado de muestra de ADN extraído en suri en gel de agarosa	61
Figura 14 Electroforesis horizontal con muestras de ADN extraídos de suri	62
Figura 15 Integridad del ADN extraído en suri	62



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1 Álbum fotográfico	57
ANEXO 2 Resultados en el transiluminador de la integridad en muestras de ADN extraídos en suri	62
ANEXO 3 Data obtenida	63
ANEXO 4 Análisis estadístico	66
ANEXO 5 Declaración jurada de autenticidad de tesis	70
ANEXO 6 Autorización para el depósito de tesis en el repositorio institucional	71



ACRÓNIMOS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
PEBLT:	Proyecto Especial Binacional Lago Titicaca
SERFOR:	Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre
CITES:	Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres
MMA:	Ministerio de medio ambiente de Chile
UV:	Ultravioleta
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético



RESUMEN

Es relevante, determinar el tejido óptimo para la extracción de ADN en *Rhea pennata*. Por ello, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la concentración, calidad e integridad de ADN de Suri "*Rhea pennata*" extraído de sangre y plumas. Se evaluó 56 suris divididos en 2 grupos de 28 individuos cada uno para la extracción de ADN en pluma y sangre, respectivamente. La determinación de la concentración y calidad fue por medio de espectrofotometría y la obtención de la integridad fue a través de geles de agarosa al 1% mediante electroforesis. Se determinó que la concentración de ADN extraído en plumas fue 45.25 $\mu\text{l/ml}$, siendo significativamente mayor respecto a la concentración de ADN extraído en sangre que fue 15.25 ($p < 0.05$), respecto a la calidad del ADN extraído en los dos tipos de muestra se reportó que la calidad de ADN extraído en plumas fue de 1.52, siendo significativamente mayor respecto a la calidad de ADN extraído en sangre 1.26 ($p < 0.05$), por último, en la integridad, se determinó que en pluma la integridad tuvo una media de 2.86 y fue significativamente mejor a la integridad del ADN extraído en sangre 2.25 ($p < 0.05$). El presente trabajo concluye que tanto a la concentración, calidad e integridad, el ADN extraído en plumas obtuvo mejores resultados respecto al ADN extraído en sangre, siendo las tres diferencias estadísticamente significativas.

Palabras clave: ADN, Concentración, Calidad, Integridad, Plumaz, *Rhea pennata*, Sangre.



ABSTRACT

Birds of the genus *Rhea* are endemic birds of South America with the characteristic of being flightless. It is also considered an endangered bird. This genus also has great genetic relevance due to the large number of highly relevant ribosomal genes, as well as the use of its genome for study in population genetics. DNA extraction is considered the fundamental test in molecular studies. Success in this test allows optimal performance of future analyses. In birds, the two tissues most used in DNA extraction are feathers and blood. Various studies have reported different results regarding which of these two tissues is indicated for DNA extraction. Therefore, it is relevant to determine the optimal tissue for DNA extraction in *Rhea pennata*. The objective of the present investigation was to evaluate the concentration, quality and integrity of Suri "*Rhea pennata*" DNA extracted from blood and feathers. It was determined that the concentration of DNA extracted in feathers was $43.28 \pm 3.83 \mu\text{l/ml}$, being significantly higher with respect to the concentration of DNA extracted in blood, which was $15.25 \pm 1.20 \mu\text{l/ml}$ ($p < 0.001$), with respect to the quality of the DNA. extracted in the two types of samples, it was reported that the quality of DNA extracted in feathers was 1.52 ± 0.05 , being significantly lower with respect to the quality of DNA extracted in blood 1.26 ± 0.06 ($p < 0.01$), finally, in the integrity, it was determined that in feather the integrity had a mean of 2.97 ± 0.20 and it was significantly better than the integrity of the DNA extracted in blood 2.25 ± 0.19 ($p < 0.05$). The present work concludes that both with respect to concentration, quality and integrity, the DNA extracted from feathers obtained better results compared to the DNA extracted from blood, the three differences being statistically significant.

Keywords: *Rhea pennata*, DNA, Feathers, Blood, Concentration, Quality, and Integrity



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El género *Rhea* es considerado un grupo importante de aves no voladoras endémica de Sudamérica. La especie *Rhea americana* posee una distribución geográfica en Bolivia, Uruguay, Argentina, Brasil y Paraguay hasta el paralelo 40 sur, el género *Rhea pennata* es encontrada en Chile, Perú, Bolivia y Argentina; posee una amplia distribución desde el nivel del mar hasta los 4000 m de altitud (Del Hoyo et al., 1992, Navarro et al., 1999).

Las poblaciones de *Rhea pennata* que se encuentran libremente en su hábitat han ido disminuyendo drásticamente debido a actividades humanas; como consecuencia, esta especie es considerada en peligro de extinción. Los principales motivos de esta situación es la pérdida del hábitat, especialmente por el aumento en la producción de ganado ovino, así como la recolección de sus huevos, la depredación por felinos tales como Puma, Cóndor, *Leopardus colocolo* (gato colocolo) y la caza ilegal (Bucher y Nores, 1988).

Los conocimientos a nivel genético sobre *Rhea pennata* son muy escasos y con poca relevancia en el objetivo de lograr mejorar los resultados obtenidos en el análisis molecular del Suri (Feld et al., 2011).

De esta manera, trabajos que determinen el tejido con mejores resultados en la extracción de ADN y que evalúe parámetros tales como la concentración, calidad e integridad del ADN extraído son de gran importancia. Por ello, la falta de conocimiento sobre el estado actual de las poblaciones silvestres de *R. pennata* dificulta la conservación de esta especie (Marinero et al., 2014).



Biogeográficamente el género *Rhea* posee una gran relevancia. La secuenciación de una región de 2.8-kb de ADN mitocondrial que contiene genes ribosomales altamente representativo en ratites reveló que los ñandúes se agrupan con las ratites vivas de Australasia, mientras que los avestruces son basales (Van Tuinen et al., 1998).

Sin embargo, Lee et al. (1997) reportan que el género *Rhea* es basal a diferencia de los avestruces. Adicionalmente Zelenitsky y Modesto (2003) por medio de árboles filogenéticos derivados de data molecular reconocen a *Rhea* como el ave ratite más basal viva.

Una de las posibles causas de las pocas cantidades de data secuenciada es la calidad del ADN extraído. El perfil del ADN es muy relevante, debido a que permite la aplicación de un gran número de técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa, la secuenciación, entre otros. Del mismo modo, tener una extracción de ADN eficiente conlleva a lograr almacenar el ADN por más tiempo (Oliveira et al., 2014).

Esta realidad de las aves ratites argumentan la importancia de obtener los mejores procedimientos al momento de evaluarlas molecularmente. Por ello, la extracción de ADN es el primer paso y más importante en dichos análisis. De este modo la presente investigación tuvo como objetivo general evaluar la concentración, calidad e integridad de ADN de Suri "*Rhea pennata*" extraído de sangre y plumas. De este modo determinar el mejor material biológico de extracción de ADN.



1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo general

- Determinar la concentración, calidad e integridad del ADN extraído de sangre y plumas de Suri "*Rhea pennata*".

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración del ADN extraído de sangre y plumas de Suri "*Rhea pennata*".
- Determinar la calidad de ADN extraído de sangre y plumas de Suri "*Rhea pennata*".
- Evaluar la integridad de ADN extraído de sangre y plumas del Suri "*Rhea pennata*".



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. SURI (*Rhea pennata*)

Rhea pennata es una especie de ave no voladora perteneciente a la familia *Rheidae* la cual es endémica de los Neotrópicos. Siendo el viajero francés Alcide Dessalines d'Orbigny (1802 –1857), quien obtuvo el crédito por el descubrimiento y denominación del ave (*Rhea pennata*) en 1834 (Steinheimer, 2004). Según Folch (1992) y Cajal (1988) la presente especie incluye tres subespecies con hábitat en diversos puntos de Sudamérica: i) *R. p. garleppi*, con presencia en el sur de Perú, el suroeste de Bolivia y el noroeste de Argentina; ii) *R. p. pennata*, presente en el sur de Chile y el centro-oeste y sur de Argentina; y iii) *R. p. tarapacensis*, con una distribución a través del norte de Chile.

La subespecie *R. p. garleppi* presente en el sur de Perú está presente en bajas densidades, a través de estudios poblacionales se determinaron severas fluctuaciones por medio del rango de distribución de la subespecie, la cual expone una fuerte tendencia a convertirse localmente extinto (Chebez, 2008).

CITES (2014) considera a *R. p. garleppi* en riesgo de extinción lo cual busca asegurar su conservación en largo plazo. Además, Hernandez (2011) expone que los principales factores que afectan a la subespecie de esta ave ratite son la caza y la recolección de huevos como recursos de subsistencia en la población local.

SERFOR (2015) cataloga a *Rhea pennata* en peligro crítico de extinción y respecto a los censos llevados a cabo, la población de Suri es de no más de cuatrocientos ejemplares, de los cuales un aproximado de cien ejemplares están presentes en Puno. En Sudamérica se ven realidades totalmente distintas respecto a densidades poblaciones del



Suri, como es el ejemplo de Chile, a través de los censos realizados por el (MMA, 2015), el país sureño posee una población de más de cinco mil ejemplares.

Respecto a su genética y evolución, Sales (2006) reporta que el tamaño del genoma mitocondrial del Suri es de 16,710 nucleótidos. Además, Haddrath y Baker (2001) proponen que especie divergió del avestruz hace aproximadamente 51 millones de años y del Emú hace 45 millones de años. Sin embargo, otros autores tales como Cooper et al. (2001) datan la divergencia entre los suris y los avestruces en 75 a 80 millones de años atrás. Asimismo, diversos primers que amplifican microsatélites desarrollados para avestruz (Kimwele et al., 1998) y Emú (Taylor et al., 1999) también amplifican en Suri.

La secuencia de aminoácidos de la hemoglobina en Rhea está altamente relacionada con la hemoglobina de los Tinamús. Por ello, Cooper et al. (2001) concluyen que la naturaleza de la divergencia basal de las aves ratites continúa poco clara y nada resuelta debido a las pequeñas cantidades de data secuenciada hasta el momento.

Fowler (1991), Cho et al. (1984), y Pycraft (1901) describen la anatomía de los Suris, la cual se caracteriza por una altura de 1.5 a 1.7 m y un peso aproximado de 25 Kg. Su cuerpo es similar al avestruz, pero el plumaje es de color gris con una coloración oscura en la cabeza, cuello y entre los hombros, y una zona blanca en el envés (Fig. 1). El “*pterylae alaris*” del suri se divide en 28 rémiges, 16 cubitales, 12 metacarpo-digitales, 7 metacarpianos, 1 digital delantero, 2 digitales medios y 2 digitales medios. Sus telióptidos, similar a los avestruces, carecen tanto de eje posterior como de glándula sebácea. Difiere de los avestruces en la posición de los escudos en las patas (Fig. 2). Finalmente, en el ala, el ápice de la álula se ha cornificado para formar un gancho.

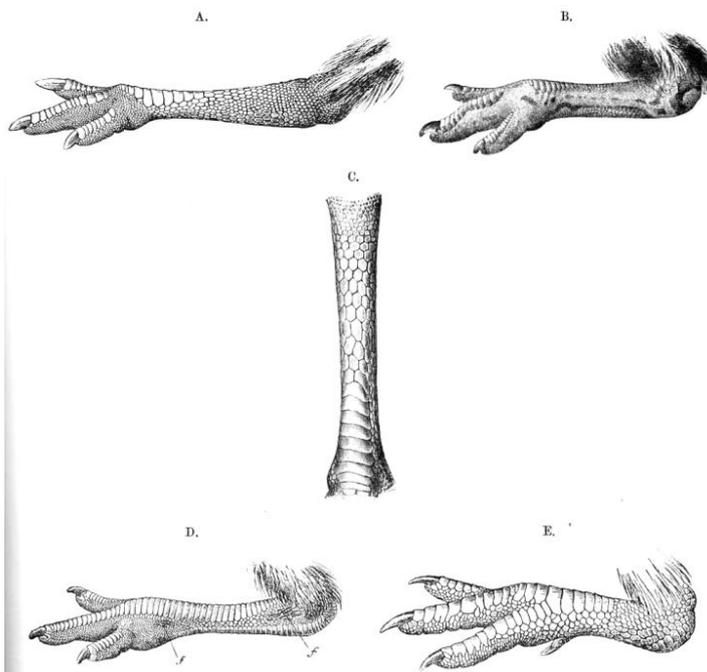
Figura 1

Rhea pennata en Mazocruz, Puno, Perú



Figura 2

Pie izquierdo de un polluelo *Casuarius*,



A. Pie izquierdo de un polluelo *Casuarius casuarius sclateri*, para mostrar la disposición de los escudos de la podoteca. B. Pie izquierdo, aspecto anterior, de *Casuarius loriae*, en comparación con A, para mostrar las grandes placas hexagonales que revisten la porción proximal del tarso-metatarso. C. Pie izquierdo de



un *Dromeus novae-hollandiae* recién nacido, para mostrar la disposición de los escudos de la podoteca, y la curiosa continuación del patrón de coloración del cuerpo hasta los dedos. D. Pie izquierdo de un embrión maduro de *Rhea americana*, para mostrar la disposición de los escudos. Nótese la presencia de plumas (f) en el tarso metatarso-temporal. E. Pie izquierdo de un embrión *Apteryx australis mantelli*, para mostrar la forma de los escudos de la podoteca. Obtenido de Pycraft (1901).

2.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Es un método tanto químico como físico que se utiliza para purificar el ADN a partir de una muestra. Específicamente se separa el ADN de las membranas celulares, proteínas y otros componentes de la célula, siendo Friedrich Miescher en 1869 quien aisló ADN por primera vez (Gupta, 2019).

Simon et al. (1991) y Gupta (2019) expresan que la extracción de ADN requiere la lisis de células y solubilizar el ADN, lo cual es seguido por métodos tanto enzimáticos como químicos que permiten eliminar macromoléculas, lípidos, ARN o proteínas. Entre las técnicas utilizadas incluye una extracción orgánica con métodos usando fenol y cloroformo, extracciones no-orgánicas a través de tratamientos con proteinasa K, y métodos de absorción en membranas de sílica gel.

Respecto a la extracción de ADN en muestras de pluma, Taberlet y Bouvet (1991), concluyen que solo una pluma es suficiente para la extracción de ADN en aves. Lo cual permite determinar polimorfismos en el genoma mitocondrial. Su trabajo se centra en determinar una técnica no destructiva que evite el uso de grandes cantidades de tejido. El procedimiento se basa en los trabajos de Kocher et al. (1989). Se usó una pluma la cual es cortada transversalmente a 2 mm de la base. Esta base es puesta dentro de un tubo Eppendorf para ser incubada con proteinasa K a 37 °C por 2 horas. Luego el ADN es extraído con un volumen similar de fenol/cloroformo.



La extracción de ADN en sangre de aves tiende a ser conveniente debido que los eritrocitos de las aves poseen núcleo. Sturkie (1976), reporta que el número de eritrocitos varia en un promedio en 3 millones de células por milímetro cúbico de sangre. Debido a la presencia de núcleo en los eritrocitos, se puede obtener a partir de pequeños volúmenes de sangre, suficiente cantidad de ADN para estudios de polimorfismos con una concentración promedio de 11 μg de ADN por μl de sangre (Venturini et al., 1986).

2.3. PERFIL DEL ADN

2.3.1. Concentración del ADN

La precisión al estimar la concentración de ADN es un factor crucial para lograr un uso eficiente del ADN en análisis de genotipos y secuenciación. Normalmente los métodos de cuantificación tienen en común que son técnicas indirectas que miden la concentración de ADN en una muestra. El método de espectrometría detecta el ADN y el ARN en una muestra a una absorbancia de 260 nm. Existen distintos equipos en esta técnica. Algunos con el uso de cubetas de 1 cm y otros que solo requieren micro volúmenes de ADN. En las cubetas, 1 cm de paso óptico equivale aproximadamente a una concentración de ADN de 50 ng/ μl para el ADN de doble cadena y 40 ng/ μl para ADN de una cadena y ARN (Sambrook et al., 2006).

Haque et al. (2003) compararon el método de cuantificación por espectrometría, con dos técnicas de cuantificación fluorométricas: ensayo PicoGreen y el ensayo de cuantificación genómica en tiempo real. En sus resultados reportaron que el método por espectrofotometría fue el más concordante respecto a los valores teóricos entre los tres métodos evaluados.



2.3.2. Calidad del ADN

La técnica más común para determinar la pureza del ADN extraído es por medio de la absorbancia. Lo cual, de la misma manera que la cuantificación de ADN requiere de un espectrofotómetro. Las lecturas de absorbancia son llevadas a cabo a 260 nm debido a que la concentración de ADN es estimada a dicha absorbancia por los nucleótidos (Glasel, 1995).

Sin embargo, el ADN no es la única molécula que absorbe la luz UV a 260 nm. El ARN también presenta una gran absorbancia a 260 nm, y los aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas absorben a 280 nm. Los dos últimos son considerados contaminantes si están presentes en una solución de ADN. Por ello, el cálculo de la calidad de ADN es la relación de la absorbancia a 260 nm dividido por la lectura a 280 nm. ADN de buena calidad debe tener una relación de 1.7 a 2.0. Una lectura de 1.6 no garantiza un ADN de calidad para alguna aplicación y valores menores a 1.6 significa que muchos contaminantes están presentes en la muestra (Promega, 2022).

2.3.3. Integridad del ADN

En adición de las técnicas antes mencionadas, solo unas pocas pueden determinar la integridad del ADN. Para esta evaluación se requiere de la técnica de electroforesis en geles de agarosa del ADN extraído. Además, previamente se necesita haber realizado las pruebas de concentración y calidad de ADN por espectrofotometría para determinar el peso exacto de ADN por pocillo en el gel.

Seeker et al. (2016) propone que la integridad puede observarse de manera correcta al correr 200 ng de ADN en geles de agarosa al 0.5 % a 100 mV, 200 mA por 45 minutos evaluando la integridad en una escala del 1 al 5. Esta técnica



permite distinguir entre el ADN intacto o fragmentado. El ADN intacto se observa como una banda compacta de alto peso molecular con un valor de 5. El ADN fragmentado resulta en un frotis en el gel con un valor de 1 (Swerdlow y Gesteland, 1990).

2.4. ANTECEDENTES

2.4.1. Extracción de ADN en *Rhea*

Existen diversos trabajos que han realizado la extracción de ADN en el género *Rhea*.

Primero, un importante trabajo realizado por Rossi-Fraire et al. (2006) exponen de manera precisa la extracción de ADN en *Rhea* y diversas recomendaciones. Los investigadores aislaron todo el ADN genómico del cálamo de las plumas. Emplearon diversos ensayos de extracción debido a que los métodos comunes con proteinasa K-fenólica presentan un ADN genómico con contaminantes de PCR cuando se usan plumas. Reportando que los resultados más óptimos se obtienen usando un método salino y no fenólico basado en Bruford et al. (1992), y repurificado cuando sea necesario utilizando la resina Chelex 100 utilizado también por Walsh et al. (1991). Adicionalmente, se evaluó una extracción alcalina rápida tal como lo realizado por Malagó et al. (2002), desarrollado para tipificar a gran escala el sexo de avestruces. En el género *Rhea*, el presente método de extracción tiende a tener buenos resultados con bulbos de plumas en desarrollo. Plumaviejas que carecen de cálamos amarillos resultan en extracciones alcalinas poco eficientes.

Abbona et al. (2019) realizaron la extracción de ADN ancestral en huesos de *Rhea* con fines de estudio en zooarqueología y biogeografía. Tanto la



extracción de ADN como la preparación de las librerías se llevaron a cabo en un laboratorio dedicado al estudio de ADN ancestral en el Palaeo-BARN, Escuela de Arqueología de Oxford. La extracción de ADN se fundamentó en el protocolo de extracción en hueso siguiendo los artículos Dabney et al. (2013) y Damgaard (2015). La superficie del hueso en el área de muestreo se eliminó con un bisturí. Se perforó y homogenizó la masa ósea cortical, se transfirieron 40 mg de polvo de hueso a los tubos Falcon. Las muestras se mezclaron con buffer de digestión que contenía 4,7 ml de EDTA 0,5 M, 50 μ l de proteinasa K recombinante y 250 μ l de laurilsarcosilo N al 10 % y se incubaron simultáneamente a 50 °C. Después de 30 minutos, se centrifugó la extracción A y se eliminó el sobrenadante (la predigestión). A continuación, se transfirió un tampón de digestión idéntico al polvo de hueso sedimentado sin digerir, la muestra se agitó y volvió a incubarse para una digestión completa de 24 horas. De manera similar, los sobrenadantes previos a la digestión se eliminaron para las extracciones B-E en puntos de tiempo: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas respectivamente y se agregó un nuevo buffer de digestión. No se eliminó ningún sobrenadante previo a la digestión para la extracción F. A las 24 horas se detuvieron todas las digestiones. A continuación, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos para la extracción de ADN. Se seleccionaron cinco huesos para este experimento inicial con el objetivo de optimizar el tiempo de predigestión, lo que arrojó un total de 30 extractos de ADN.

En adición, Bazán (2018), realizó la extracción de ADN genómico en *Rhea pennata* en plumas por medio del kit High Pure PCR Template, Roche en busca de marcadores microsatélites. Basándose en su totalidad con el manual de fábrica. Se adicionó 200 μ l de buffer de lisis y proteinasa K. Posterior a ello, se incubó la



muestra a 54 °C por 30 minutos. Se agregó 200 µl de buffer de unión e incubó por 40 minutos a 70 °C. Las muestras con sedimentos requirieron el centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos y separando el sobrenadante en tubos Eppendorf. Se añadió 200 µl de isopropanol frío a todas las muestras hasta notar la presencia de hilos blancos. Se vertió el contenido total en tubos con sus respectivas columnas y centrifugado a 6000 rpm por 2 minutos. La muestra se mezcló con 400 µl de buffer remoto. Se efectuó una siguiente centrifugación a 6000 rpm por 2 minutos y se sumó 400 µl de buffer de lavado y centrifugado a 8000 rpm por 2 minutos, se duplicó el último paso. Se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto para eliminar los remanentes del buffer. Para finalizar, se homogenizó con 70 µl de buffer de elución para obtener el ADN genómico de pluma de *Rhea pennata* y llevado a refrigeración a 4 °C.

Finalmente, Huynen et al. (2002) extrajeron ADN en *Rhea*; sin embargo, a diferencia de los autores anteriores usaron como muestra la sangre de estas aves. El ADN fue aislado de sangre por medio de digestión usando SDS/proteinasa K y la extracción la realizaron utilizando fenol y cloroformo. Los autores replicaron el protocolo del libro de Sambrook et al. (1989) que argumentan que la extracción con fenol es un método clásico y efectivo para la purificación de ácidos nucleicos. El fenol puro es un sólido cristalino a temperatura ambiente (punto de fusión 41 °C). Pero se licua cuando se satura con agua o con un tampón acuoso. Para realizar la extracción de fenol, el fenol licuado se mezcla con una muestra acuosa con agitación vigorosa. Las fases acuosa y fenólica se separan por centrifugación. Las proteínas y algunas otras impurezas se extraen en la fase o interfase fenólica, dejando los ácidos nucleicos en la fase acuosa. La extracción de fenol se puede aplicar a las muestras de varias especies biológicas y para diversos propósitos



experimentales. Algunas variantes del método también se utilizan ampliamente en los laboratorios modernos, como el método Trizol para el aislamiento de ARN, que es un derivado del método de ácido guanidinio tiocianato-fenol-cloroformo (AGPC).

2.4.2. Análisis de ADN extraído en *Rhea*

Luego de la extracción de ADN es necesario evaluar el éxito del proceso, de este modo se ha recopilado artículos que han llevado a cabo dicha evaluación, centrándonos en el material biológico del género *Rhea* y aves en general.

Roldan et al. (2009) llevaron a cabo un estudio de la estructura genética de *Rhea* en hábitats con diferentes grados de alteración antropogénica. La integridad del ADN obtenido del tejido embrionario y el cálamo de las plumas fue determinada por corridas con electroforesis en agarosa al 1% y una concentración de 0.5 X de buffer TBE. No especifican el tiempo de corrida, el voltaje, la concentración de ADN. No obstante, también realizaron la cuantificación de las muestras de ADN en un Biofotómetro Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Dicho equipo es un fotómetro tipo UV y que permite medir líquidos en cubetas. Adicionalmente, la data evaluada es colectada en longitudes de onda estandarizadas, el Biofotómetro Eppendorf está diseñado para ensayos de rutina en las áreas de biotecnología, biología molecular, bioquímica y citología tanto para investigación como para desarrollo.

Bello et al. (2001) proponen la extracción de ADN a partir de plumas de aves ratites. Usaron la técnica basada en Chelex, una técnica que la ciencia forense utiliza actualmente para purificar ADN a partir de muestras de sangre muy pequeñas. Determinaron concentraciones finales de ADN de 175 $\mu\text{g/ml}$. Además,



permite obtener ADN genómico desnaturalizado en cantidades mínimas y puede ser utilizado con muestras antiguas (Walsh et al., 1991). Por este motivo, tanto la integridad como la concentración de ADN pudieron ser evaluados con facilidad. La integridad se llevó a cabo en electroforesis en geles de agarosa utilizando un peso de 300 ng de ADN y la tinción del ADN por bromuro de etidio. El bromuro de etidio se une al ADN mediante la intercalación entre pares de bases, lo que hace que la hélice del ADN se desenrolle parcialmente. Las bandas de ácido desoxirribonucleico en geles teñidos con etidio son fluorescentes al exponerse a la luz ultravioleta (Hemmings y Hopkins, 2006). No obstante, el bromuro de etidio al poder unirse al ADN resulta altamente tóxico siendo mutagénico, por lo cual es recomendable usar distintas alternativas como GelRed™, Safe-Green™, entre otros. La concentración fue evaluada por medio de espectrofotometría UV.

Bauzat (2001) evaluó la variación genética en aves *Rhea*. Extrajo el ADN genómico de muestras de sangre. El ADN obtenido fue cuantificado por medio de un fluorómetro siendo un método rápido, específico y fácil para la medición de concentraciones de ADN en una amplia variedad de muestras. En este ensayo, el ADN reacciona específicamente con una sonda que produce una señal de fluorescencia estable ($Ex/Em = 492/528$ nm) (Downs y Wilfinger, 1983). La integridad fue evaluada por geles de agarosa al 1%. Las muestras de ADN que no estuvieron degradadas fueron diluidas a una concentración de 30 ng/ μ l para análisis de PCR posteriores.

Morinha et al. (2013) evaluaron la técnica HRM para determinar el sexo con precisión en aves. Por ello, realizaron extracción de ADN genómico en diversos tejidos, tales como el cálamo de las plumas, en sangre, y células epiteliales de la cavidad oral. La integridad del ADN genómico fue confirmada en



electroforesis en geles de agarosa a una concentración del 1 %. Tanto la pureza como la concentración de los ADNs extraídos fueron medidos mediante el espectrofotómetro Nano-Drop ND-200 (Thermo Scientific) el cual mide muestras de 0,5 a 2 μ l con alta precisión y reproducibilidad.



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

La toma de muestras de sangre y pluma de *Rhea pennata* se realizó en las instalaciones del centro de conservación del Proyecto Binacional Lago Titicaca (PEBLT), ubicado en el Distrito de Mazocruz, Provincia de El Collao, Departamento de Puno situado a 16° 44'40" latitud sur y los 69° 42'50" longitud oeste de Greenwich, a 4500 m.s.n.m. (Almirón, 2023).

El análisis molecular de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular – Megalaboratorios de la UNA Puno.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Tamaño de muestra

Para el presente estudio se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, debido a que el PEBLT tiene una política de trabajo rigurosa respecto al estudio de animales en peligro de extinción. Por lo tanto, se evaluó 56 Suris divididos en 2 grupos de 28 individuos cada uno. El primer grupo para la extracción de ADN en pluma y el segundo grupo para la extracción de ADN en sangre. (Tabla 1). Para el análisis de extracción en sangre fue a través de muestreo aleatorio. A cada elemento de la población de Suris se le fue asignado un número y respecto a ello fueron elegidos al azar.

En este sentido, la metodología utilizada para la obtención de muestras fue de forma no probabilística en base a la selección del personal técnico del PEBLT.



Tabla 1

Suris muestreados de acuerdo al grupo de estudio

Grupo de estudio	N° individuos
Extracción ADN pluma	28
Extracción ADN sangre	28
Total	56

3.2.2. Materiales y equipos utilizados

- Tubos EDTA para extracción de sangre total.
- Laminas cubre objeto.
- Bisturís.
- Bolsas Ziploc.
- Kit de extracción de ADN para pluma: Wizard SV Genomic DNA Purification System.
- Kit de extracción de ADN para sangre: innuPREP Blood DNA Mini Kit.
- Cámara de flujo laminar, marca JSR, modelo JSCB 1200SL.
- Bloque de calor baño seco.
- Microcentrífuga Bio-Rad, modelo 16K a 14,000 RPM.
- Vortex Bio-Rad, modelo BR-2000.
- Balanza analítica.
- Papel aluminio.
- Matraz.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Refrigeradora a -80 °C.



- Espectrofotómetro UV PCR Max, modelo Lambda.
- Micropipetas y tips de 1, 10, 100 y 1000 μ l.
- Cámara electroforética tipo vertical y fuente de poder Bio-Rad para electroforesis horizontal.
- Agarosa, código CSL-AG500.
- Buffer Tris Acetato EDTA 50X.
- Buffer de carga, código SafeGreen.
- Marcador de ADN, marca Applied Biological Materials Inc.
- Transiluminador marca Life Technologies, E-gel Imager.
- Computadora.
- Cuaderno.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Muestreo de sangre y pluma de suri

Se tomó la muestra de sangre de 28 Suris a través de la vena radial obtenidas en tubos que contenían anticoagulante EDTA, estas fueron conservadas en refrigeración a -20 °C. Respecto a la toma de muestra en plumas, se obtuvo 5 plumas por ejemplar de los 28 suris las cuales fueron almacenadas en bolsas ziploc con cierre y conservadas en refrigeración a -20 °C, hasta el momento de la extracción de ADN. El cálculo del tamaño de muestra fue usando un método no probabilístico.

3.3.2. Extracción de ADN en pluma

Se realizó utilizando un kit de extracción Wizard SV Genomic DNA Purification System. Primero, por medio de una lámina cubre objeto y un bisturí

se cortó en pequeños pedazos el ombligo inferior de las plumas presentes en el cálamo.

Respecto a la preparación de la Solución Proteinasa K se resuspendió la proteinasa K (adquirida por separado) con agua libre de nucleasas hasta una concentración de 20 mg/ml. Se dispuso la proteinasa K en volúmenes de trabajo determinados por el número promedio de preparaciones realizadas a la vez. Luego de ello se conservó a -20°C evitando múltiples ciclos de congelación y descongelación, ya que esto resulta en una disminución de la actividad (Van Emburgh et al., 2016).

La preparación de la Solución de Digestión por cada muestra de tejido, se combinó los siguientes reactivos (Tabla 2) en un tubo y se guardó en hielo hasta su uso.

Tabla 2

Componentes de la solución de digestión

Solución de Digestión	Volumen por muestra	Volumen por N muestras
Solución lisis del núcleo	200 μl	(N + 1) x 200 μl
0.5M EDTA (pH 8.0)	50 μl	(N + 1) x 50 μl
Proteinasa K, 20 mg/ml	20 μl	(N + 1) x 20 μl
Solución RNasa A	5 μl	(N + 1) x 5 μl
Volumen Total	275 μl	(N + 1) x 275 μl



La Solución de lavado de columna se le agregó etanol al 95 % a la botella de solución de lavado de columna como se indica en la etiqueta de la botella. Se etiquetó la botella para indicar que se ha agregado etanol. Se selló con cuidado la solución de lavado de columna y se guardó a temperatura ambiente.

Preparación del ombligo inferior del cálamo de la pluma y el lisado del tejido tuvo como proceder: Se cortó entre 0,5 y 1,2 cm del ombligo inferior del cálamo de las 05 plumas por individuo. Un recorte del ombligo inferior de 1,2 cm tiene un peso aproximado de 20 mg. La muestra se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se agregaron 275 μ l de la solución de digestión preparada a cada tubo de muestra. Asegurando de que la muestra esté completamente cubierta con la mezcla maestra de solución de digestión. Si los recortes de los ombligos inferiores no están cubiertos por la mezcla maestra de solución de digestión, se cortó el tejido en trozos más pequeños. Se incubó los tubos de muestras durante la noche (16 a 18 horas) en un bloque térmico o baño seco a 55 °C. Se agregó 250 μ l de Wizard® SV Lysis Buffer a cada muestra. Se procedió al lisado de tejido inmediatamente después de agregar el Buffer de lisis Wizard® SV (el lisado debe permanecer tibio). Los lisados que no se pudieron procesar de manera inmediata, fueron congelados a -80 °C. Para volver a utilizar los lisados que han sido congelados, se procedieron a calentarlos a 55 °C durante una hora antes de continuar con la purificación.

Para la purificación del ADN genómico del lisado por medio de una microcentrífuga: se transfirió todo el lisado de la muestra del tubo de la microcentrífuga de 1,5 ml a una minicolumna de ensamblaje Wizard® SV. Se colocó la minicolumna Wizard® SV que contiene el lisado de muestra en una microcentrífuga la cual se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 minutos para unir el



ADN genómico a la minicolumna Wizard®. Si quedó parte de lisado en la columna después del centrifugado inicial, se centrifugó de nuevo durante 1 minuto a 13 000 rpm. Se retiró la minicolumna Wizard® SV del ensamblaje de la minicolumna desechado el líquido en el tubo de recolección. Se volvió a colocar la minicolumna Wizard® SV en el tubo de recolección. Se agregó 650 µl de solución de lavado de columna a cada ensamblaje de minicolumna Wizard® SV. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el líquido del tubo de recogida y se volvió a colocar la minicolumna Wizard® SV en el tubo de recogida vacío. Se repitió los pasos de lavado tres veces para un total de cuatro lavados de la minicolumna Wizard® SV. Después del último lavado, se vació el tubo de recolección y se volvió a armar el ensamblaje de la minicolumna Wizard® SV. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 minutos para secar la matriz de unión. Se retiró la minicolumna Wizard® SV y se colocando un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetado para la elución (no incluido). Se agregó 250 µl de agua libre de nucleasas a temperatura ambiente a la minicolumna Wizard® SV. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. De manera opcional para mejorar el rendimiento de ADN, se calentó el agua a 65 °C antes de agregarla a la columna para la elución. Se colocó el conjunto de minicolumna/tubo de elución Wizard® SV en la centrífuga y se centrifugó durante 1 minuto a 13 000 rpm. El volumen total de elución fue de aproximadamente 250 µl. Se retiró la minicolumna Wizard® SV y se desechó. Se tapó el tubo de elución que contiene el ADN genómico purificado y se guardó a -80 °C.

3.3.3. Extracción de ADN en sangre

Se llevó a cabo mediante el Kit de extracción de ADN para sangre: innuPREP Blood DNA Mini Kit.



Para el aislamiento del ADN de 1.0 ml de toda la muestra de sangre. Primero se transfirió 1.0 ml de toda la sangre en un tubo de reacción de 2.0 ml. Se agregó 1 ml de Solución de Lisis A, se agitó mediante vortex brevemente y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se centrifugó a 3,000 rpm por 3 minutos. Se removió y descartó el sobrenadante cuidadosamente. No se debe descartar el pellet.

Luego de ello se agregó la Solución de Lisis B, se homogenizó mediante vortex por 10 segundos. Se centrifugó a 2,000 rpm durante 2 minutos. Nuevamente, se removió el sobrenadante con mucho cuidado.

Se agregó 200 μ l de agua bidestilada con la muestra de células, se resuspendió dicho pellet con la micropipeta o en su defecto usando el vortex vigorosamente. Se transfirió la muestra resuspendida en un tubo de lisis PLP. Se agitó por vortex por 5 segundos y se incubó en un tubo de lisis PLP a 70 °C por 20 minutos. Después de la lisis se agregó 75 μ l de buffer de precipitación, se homogenizó vigorosamente con vortex por 10 segundos. Se agregó 500 μ l de 70 % de etanol a una muestra, se homogenizó por vortex o resuspendiendo con una micropipeta muchas veces.

Luego se aplicó la muestra en el filtro ensamblado en el Tubo Receptor. Se cerró la tapa del filtro y se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm. Se descartó el tubo receptor con el filtrado y se colocó el filtro en un nuevo tubo receptor de 2.0 ml. Se abrió la tapa del filtro y se agregó 750 μ l solución de lavado MS, se cerró la tapa y se centrifugó a 10,000 rpm en 1 minuto. Se descartó el tubo receptor con el filtrado y se colocó el filtro en un nuevo tubo receptor de 2.0 ml.



Se centrifugó a máxima velocidad por 2 minutos para remover todas las trazas de etanol. Se descartó el tubo receptor de 2.0 ml. Se colocó el filtro en un tubo de elución de 1.5 ml. Se abrió con cuidado la tapa del filtro y se agregó 200 µl de Buffer de Elución. Se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 8.000 rpm por 1 minuto. Repetir el paso de elución una vez más con 200 µl de buffer de elución. El ADN se almacenó a -80 °C para su posterior evaluación.

3.3.4. Concentración del ADN

Se llevó a cabo a través de un espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max) utilizando por lectura 1 µl de muestra de ADN. La muestra se blanqueó con los buffers de elución del kit Wizard SV Genomic DNA Purification System y el kit innuPREP Blood DNA Mini para las muestras de ADN extraídos de pluma y sangre respectivamente. Los resultados se obtuvieron con la unidad de concentración de µg/ml.

3.3.5. Calidad del ADN

De igual manera se procedió por el espectrofotómetro de microvolúmenes UV/Vis (Lambda – PCR max). Se blanqueó la muestra con los buffers de elución del kit Wizard SV Genomic DNA Purification System y el kit innuPREP Blood DNA Mini para las muestras de ADN extraídos de pluma y sangre respectivamente. Y se utilizó 1.5 µl de muestra de ADN. Se evaluó la razón entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm siguiendo la fórmula:

$$Calidad\ ADN = \frac{Absorbancia\ 260\ nm}{Absorbancia\ 280\ nm}$$



Los resultados alrededor a 1.8 indican ADN de buena calidad, mientras que los valores más bajos indican contaminación por proteínas debido a que las proteínas poseen un pico de absorción a 280 nm debido a los aminoácidos aromáticos. Los valores más altos indican contaminación por ARN (Santella, 2006).

3.3.6. Integridad del ADN

La integridad de ADN extraído se determinó por medio de electroforesis de geles de agarosa a concentración del 1%. Se utilizará 0.5 g de agarosa en 49 ml de agua destilada y 1 ml de buffer TAE (Tris Acetatos EDTA) a concentración 50x. Se calentó la solución hasta el punto de ebullición y se vertió en la cámara electroforética tipo horizontal equipada con el peine y bloques respectivos. Se dejó enfriar por 30 minutos. Seguido de ello, se llenará la cámara electroforética con un buffer de corrida TAE a concentración 1x. Finalmente, se cargará 20 ng de ADN extraído tanto de las 28 muestras de pluma y las 28 muestras de sangre. Las muestras se corrieron en el gel a 100V por 25 minutos para luego de ello ser evaluada las bandas a través del transiluminador marca Life Technologies, E-gel Imager para determinar la integridad del ADN.

La integridad se evaluó según las rúbricas de Seeker et al. (2016). Evaluando las bandas del 1 al 5. Las bandas catalogadas con 1 son las que el ADN ha migrado rápidamente por el gel y no hay bandas visibles. Las bandas número 2 son en la que se encuentra banda de ADN, pero ligeramente visible. Bandas número 3 estas bandas son visibles y al nivel del peso molecular de la muestra de ADN, pero con ciertos frotis o manchas. Muestras número 4 las bandas son claras y al mismo nivel, pequeños frotis o manchas, pero casi imperceptibles. Muestras



catalogadas con 5 tuvo bandas limpias, sin ninguna mancha o frotis y todas las bandas en el mismo nivel.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Antes de realizar el análisis estadístico se realizó la prueba de normalidad Prueba D'Agostino y Pearson para comprobar este supuesto. Posterior a la comprobación de la normalidad se realizó en análisis estadístico y la generación de las gráficas utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.2. Los datos fueron evaluados utilizando la prueba t de medias independientes la cual determina la diferencia significativa entre 2 medias.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE *Rhea pennata*

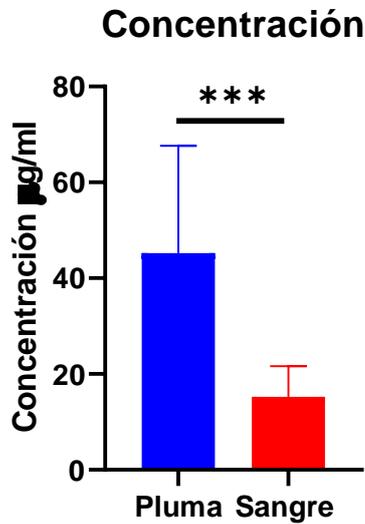
En la Fig. 3 se observa la gráfica de barras de la media y la desviación estándar de cada variable respecto a la concentración de ADN determinando así que la concentración de ADN extraído en plumas fue 45.25 $\mu\text{g/ml}$, siendo significativamente mayor respecto a la concentración de ADN extraído en sangre que fue 15.25 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.001$). Respecto a estos resultados Cooper (1994) reportó que las muestras de ADN de *Rhea* extraído de tejidos duros como huesos, plumas, entre otros tuvieron considerablemente una mayor concentración que las muestras extraídas en tejidos suaves tales como músculos, grasas y sangre. Del mismo modo Harvey et al. (2006) en un trabajo similar a la presente investigación evaluaron la concentración del ADN extraído en plumas arrancadas y lo compararon con muestras de ADN extraído en sangre en aves llamadas carboneros de cabeza negra (*Poecile atricapilla*). Del mismo modo realizó la prueba t para determinar la existencia significativa y las gráficas fueron representadas con las medias como ± 1 Desviación Estándar; no obstante, distinto a los resultados obtenidos en la presente investigación y por Cooper (1995), Harvey et al. (2006) determinaron que la concentración de ADN extraído en sangre fue sin dudas mayor a la concentración de ADN extraído en plumas, lo cual es una ventaja para pruebas moleculares futuras. Los resultados de concentración que obtuvieron de ADN extraído en sangre fueron $30.95 \pm 18.79 \mu\text{g/ml}$, $N=19$ y en pluma fueron $1.16 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$, $N=19$) estos datos son diferentes significativamente ($t = 6.91$, $p < 0.0001$). Dichos resultados difieren con nuestros hallazgos; no obstante, posee 19 individuos por cada variable un número poblacional por



cada variable de 19 a comparación de los 28 individuos muestreados en la variable ADN extraído de pluma y 28 individuos muestreados en la variable extraída de sangre. Adicionalmente, Bello et al. (2001) realizaron un protocolo preciso para extraer ADN en plumas de diversas aves, logrando obtener ADN genómico de gran calidad con concentraciones finales de 175 $\mu\text{g/ml}$, dicho valor es comparable a lo obtenido en la presente investigación ya que varias muestras tenían valores cercanos a 150 $\mu\text{g/ml}$. Tomando muestras de ADN extraído en plumas de aves, Mc Donald & Griffith (2011) reportan que las plumas ofrecen una menor concentración de ADN en comparación con muestras obtenidas en sangre o tejido debido a que las células rojas de las aves poseen núcleo; a pesar de diferir con nuestros resultados, puede ser debido a que los kits que utilizaron no fueron estandarizados para tejido altamente queratinizados, por otro lado, nuestra investigación priorizó un procesamiento eficaz de la muestras con tiempos de incubación de 16 a 18 horas. La refrigeración de las muestras es un parámetro muy importante en la concentración de ADN extraído en plumas, Gonzáles et al. (2023), reportaron que la concentración de ADN almacenado bajo congelación por dos meses fue de 264.2 $\mu\text{g/ml}$, por cuatro meses de 294.8 $\mu\text{g/ml}$ y por seis meses de 242.5 $\mu\text{g/ml}$, se observa que son valores similares sin una variación significativa ($p = 0.86$); no obstante, los valores obtenidos en muestras sin congelación por dos meses fue de 47.6 $\mu\text{g/ml}$, por cuatro meses de 59.4 $\mu\text{g/ml}$ y por seis meses de 45.9 $\mu\text{g/ml}$ con una menor concentración y diferencia significativa ($p < 0.001$). Esto se corrobora con la presente investigación, debido a que las muestras de pluma utilizadas siempre estuvieron en congelación hasta su procesamiento.

Figura 1

Concentración de ADN en pluma y sangre



Los resultados obtenidos en la concentración de ADN en pluma tuvieron una media de 45.25 µg/ml y en sangre de 15.25 µg/ml.

Tabla 3

Estadística descriptiva de la concentración en pluma y sangre del Suri

	Pluma (µg/ml)	Sangre (µg/ml)
Valor Mínimo	23.00	4.000
Valor Máximo	92.00	30.00
Rango entre mínimo y máximo	69.00	26.00
Media de la concentración	45.25	15.25
Desviación estándar	22.37	6.357
Error estándar de la media	4.227	1.201



Nota: El rango entre el valor máximo y mínimo obtenido en la concentración de ADN extraído de pluma fue de 69 $\mu\text{g/ml}$ y en sangre fue de 26 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, la desviación estándar fue de 22.37 y de 6.357 en pluma y sangre, respectivamente.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE *Rhea pennata*

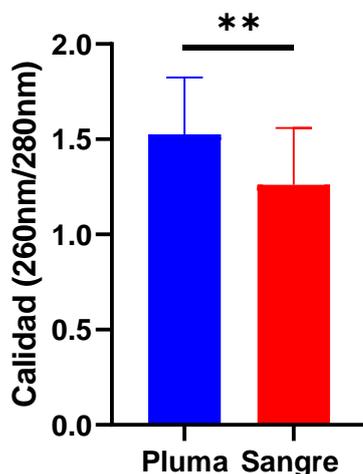
Los resultados de la calidad del ADN extraído en los dos tipos de muestra determinaron que la calidad de ADN extraído en plumas fue de 1.52, siendo significativamente menor respecto a la calidad de ADN extraído en sangre 1.26 ($p < 0.05$). Según Ahmed et al. (2009) rangos de 1.5 a 1.8 son óptimos para PCR, lo cual denota que, en la presente investigación, las muestras de ADN extraídas en plumas son óptimas para futuros análisis; no obstante, el ADN extraído en sangre, no cumplen con la calidad necesaria. Diversos autores reportan (Ellegren, 1991; Robinson y Matthee, 1999; Payne y Sorenson, 2002) en aves ratites mejores resultados en calidad del ADN extraído en plumas, especialmente en el cálamo. Este se debe principalmente a las células metabólicamente activas que están presentes en el contorno de la punta basal del cálamo en el folículo, además, a las células que todavía no se encuentran queratinizadas y que se encuentran presentes dentro de la punta basal. De este modo, numerosos estudios reportan sobre la recuperación de ADN con una alta calidad a partir de plumas frescas. Adicionalmente, respecto a ADN extraído de sangre, Horváth et al., (2005) ha reportado la extracción de ADN en coágulos de sangre presentes en el eje hueco del cálamo de plumas águilas imperiales españolas, este ADN presenta una menor calidad de ADN respecto a plumas, aun así, ha sido viable el análisis de microsatélites. Adicionalmente, Vili et al. (2013) exponen que en plumas tanto el tiempo de almacenamiento y el diámetro del cálamo no tienen efecto significativo en el éxito de las extracciones. En adición, Mc

Donald & Griffith, (2011) determinaron que la calidad de ADN extraído en plumas posee una menor calidad a lo obtenido en sangre, esto debido a que existe una proporción reducida de ADN en relación con otros posibles inhibidores de la extracción de ADN, ejemplo de ellos son las proteínas como la melanina y la queratina, que pueden dificultar la extracción y amplificación, nosotros obtuvimos contrariamente una mayor calidad en plumas debido a que el kit usaba proteasas y RNAsas, enzimas que permiten la degradación de proteínas y ARN, que son los que generan una menor calidad en el ADN extraído.

Tanto la gráfica de barras respecto a las medias de los resultados de la extracción de ADN en pluma y sangre, la significancia y desviación estándar se muestran en la Fig. 4.

Figura 2

Calidad del ADN en Pluma y sangre



Los resultados obtenidos en la calidad de ADN en pluma tuvieron una media de 1.52 y en sangre de 1.26.

Tabla 4*Estadística descriptiva de la calidad en pluma y sangre del Suri*

	Pluma (260nm/280nm)	Sangre (260nm/280nm)
Valor Mínimo	1.000	0.7000
Valor Máximo	2.000	1.800
Rango entre mínimo y máximo	1.000	1.100
Media de la calidad	1.525	1.261
Desviación estándar	0.2989	0.2986
Error estándar de la media	0.05649	0.05642

Nota: El rango entre el valor máximo y mínimo obtenido en la calidad de ADN extraído de pluma fue de 1.000 y en sangre fue de 1.100. Por ello, la desviación estándar fue de 0.2989 y de 0.2986 en pluma y sangre, respectivamente.

4.3. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE ADN EXTRAÍDO EN PLUMAS Y SANGRE DE *Rhea pennata*

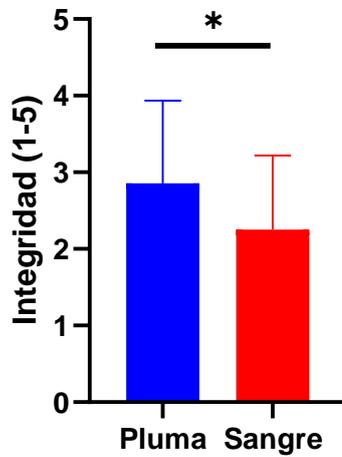
La integridad de ADN (Fig. 5.) de las muestras de ADN extraído de pluma y sangre la cual tuvo una valoración del 1 al 5; se determinó que en pluma la integridad tuvo una media de 2.86 y fue significativamente mejor a la integridad del ADN extraído en sangre 2.25 ($p < 0.05$). Correlativo a estos resultados Bello et al. (2001), evaluaron la integridad del ADN en plumas de diversas aves. Los investigadores evaluaron el ADN extraído en plumas de 800 aves, pertenecientes a 120 especies, evaluaron la integridad por medio de electroforesis y determinaron que el ADN extraído en plumas tuvo mejor integridad en comparación del ADN extraído en sangre. Argumentando también la dificultad que conlleva extraer muestras de sangre, en especial con aves grandes, tales como el Suri. Del mismo modo, Kärkkäinen et al. (2020), realizaron una correlación en los tamaños de telómeros en sangre y plumas en el ave papamoscas cerrojillo (*Ficedula*



hypoleuca), en dicho estudio evaluaron la integridad del ADN extraído tanto en pluma como en sangre por medio de geles de electroforesis al 0.8%, los geles revelaron que el ADN en plumas presentaba moderados signos de degradación a comparación a ello, las muestras de sangre debían ser bien preservadas para mantener resultados similares, dichos hallazgos resultan similares a los encontrados en la presente investigación. Morinha et al. (2013) utilizaron diversas muestras biológicas (plumas arrancadas, tejido muscular, elementos formados de la sangre y células epiteliales de la cavidad bucal) para la determinación del sexo en aves. El estudio reportó que hubo una gran degradación del ADN extraído en sangre, donde los geles de agarosa al 1% no muestran alguna banda; por otro lado, en el ADN extraído en plumas presentan bandas marcadas lo cual denota una alta integridad. Vili et al. (2013) realizaron electroforesis en agarosa el 2% para obtener la integridad de ADN extraído en plumas de alta y baja calidad, en ello determinaron que la integridad del ADN en plumas de alta calidad poseía significativamente una menor fragmentación de ADN respecto a las plumas de baja calidad ($p = 0.002$). Además, los productos de PCR utilizando el ADN de plumas de alta calidad se veían más definidos. En la presente investigación se utilizó también plumas de alta calidad, por ello, los valores de integridad son mejores en pluma que en sangre. Por último, respecto a la integridad de ADN extraído en plumas mudadas, arrancadas y en sangre. Karaceylan & Tabur (2018) reportaron que las plumas mudadas no produjeron ADN; sin embargo, se pudo extraer ADN de plumas arrancadas y en sangre. Las plumas en sangre tuvieron bandas más fuertes y por ello una mejor integridad de ADN en geles de agarosa al 3%. La presente investigación no utilizó plumas mudadas y respecto a las plumas arrancadas se corrobora que si poseen una integridad relevante en el ADN extraído.

Figura 3

Integridad del ADN en pluma y sangre



Los resultados obtenidos en la integridad de ADN en pluma tuvieron una media de 2.857 y en sangre de 2.25.

Tabla 5

Estadística descriptiva de la integridad en pluma y sangre del Suri

	Pluma (1-5)	Sangre (1-5)
Valor Mínimo	1.000	1.000
Valor Máximo	5.000	5.000
Rango entre mínimo y máximo	4.000	4.000
Media de la integridad	2.857	2.250
Desviación estándar	1.079	0.9670
Error estándar de la media	0.2039	0.1828

Nota: El rango entre el valor máximo y mínimo obtenido en la integridad del ADN extraído de pluma fue de 4.000 y en sangre fue de 4.000. Adicionalmente, la desviación estándar fue de 1.079 y de 0.9670 en pluma y sangre, respectivamente.



V. CONCLUSIONES

- La pluma es el material biológico más importante para la extracción de ADN puesto que permitirá obtener mayor cantidad de ADN en comparación a las muestras de sangre ($p < 0.05$), además de ser la menos invasiva.
- Respecto a la calidad del ADN, hubo diferencia entre las muestras de pluma y sangre ($p < 0.05$) siendo las plumas las de menor contaminación tanto por proteínas como por ARN.
- Por último, los resultados en la integridad en el ADN extraído de plumas fueron superiores ($p < 0.05$) en comparación al ADN extraído en sangre. Por ello, las muestras de ADN extraído de plumas poseen genomas íntegros de una alta integridad.



VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar el ADN extraído en plumas como en sangre por medio de PCR. Al evaluar la calidad del ADN amplificado para diversos primers, permitirá corroborar los resultados antes obtenidos porque se evaluará la calidad de las bandas amplificadas lo cual es importante en la reacción en cadena de la polimerasa.
- Se recomienda utilizar otros kits de extracción de ADN de distintas empresas como Invitrogen, Promega, Analytikjena, entre otros, lo cual permitirá reforzar los resultados obtenidos previamente.
- Comparar el ADN extraído en plumas y en sangre en otras especies de aves, especialmente, aves de relevancia en la región de Puno, tales como el tikicho (*Gallinula chloropus*), la choka (*Fulica ardesiaca*), zambullidor pimpollo (*Rollandia rolland*) y los patos silvestres (*Anas versicolor*, *Anas geórgica*, *Oxyura ferruginea* y *Anas flavirostris*).



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbona, C. C., Lebrasseur, O., Johnson, J., Giardina, M., Neme, G., & Wolverton, S. (2019). Analysis of ancient DNA from South American rhea bones: Implications for zooarchaeology and biogeography. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 25, 624-631.
- Ahmed, I., Islam, M., Arshad, W., Mannan, A., Ahmad, W., & Mirza, B. (2009). High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. *Journal of applied genetics*, 50, 105-107.
- Almirón Achata, A. (2023). El sistema integrado de gestión administrativa y su influencia en el control de bienes patrimoniales en el proyecto Especial Binacional Lago Titicaca, 2022.
- Bazán Sernaqué, P. D. M., & Esquén Bayona, D. A. (2019). Análisis de la variabilidad genética de la población de Suri (*Pterocnemia pennata*) de tres centros de rescate de Puno y Lambayeque mediante marcadores microsatélites.
- Bello, N., Francino, O., & Sánchez, A. (2001). Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary diagnostic investigation*, 13(2), 162-164.
- Bruford, M. W., Hanotte, O., Brookfield, J. F. Y., & Burke, T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach.*, 225-269.
- Bucher, E. H., & Nores, M. (1988). Present status of birds in steppes and savannas of northern and central Argentina. *ICBP Technical Publication*, 7, 71-79.
- Cajal, J. L. (1988). The Lesser Rhea in the Argentine Puna region: present situation. *Biological Conservation*, 45(2), 81-91.
- Casal, J., & Mateu, E. (2003). Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev*, 1(1), 3-7.



- Chebez, J. C. (2008). *Los que se van. Fauna argentina amenazada*. Albatros, Buenos Aires, Argentina.
- Cho, P., Brown, R., & Anderson, M. (1984). Comparative gross anatomy of ratites. *Zoo Biology*, 3(2), 133-144.
- CITES (2014) Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora.. Acceso 30 de octubre del 2022.
- Cooper, A. (1994). DNA from museum specimens. *Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens*, 149-165.
- Cooper, A., Lalueza-Fox, C., Anderson, S., Rambaut, A., Austin, J., & Ward, R. (2001). Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature*, 409(6821), 704-707.
- Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M. T., Weihmann, A., Nickel, B., ... & Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15758-15763.
- Damgaard, P. B., Margaryan, A., Schroeder, H., Orlando, L., Willerslev, E., & Allentoft, M. E. (2015). Improving access to endogenous DNA in ancient bones and teeth. *Scientific reports*, 5(1), 1-12.
- Del Hoyo, J., Del Hoyo, J., Elliott, A., & Sargatal, J. (1992). *Handbook of the birds of the world* (Vol. 1, No. 8). Barcelona: Lynx edicions.
- Downs, T. R., & Wilfinger, W. W. (1983). Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. *Analytical biochemistry*, 131(2), 538-547.
- Ellegren, H. (1991). DNA typing of museum birds. *Nature*, 354(6349), 113-113.



- Feld, A., Silvestro, C. A., Huguet, M. J., Miquel, M. C., Sarasqueta, D. V., & Iglesias, G. M. (2011). Revisión Bibliográfica Conocimientos actuales sobre la genética del ñandú (*Rhea americana*) y el choique (*Rhea pennata*). *Revista Argentina de Producción Animal*, 31(1), 79-90.
- Folch, A. (1992). Order Struthioniformes. *Handbook of the birds of the world*, 1, 75-110.
- Fowler, M. E. (1991). Comparative clinical anatomy of ratites. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 204-227.
- Glasel, J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, 18(1), 62-63.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of cytology*, 36(2).
- Haddrath, O., & Baker, A. J. (2001). Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1470), 939-945.
- Haque, K. A., Pfeiffer, R. M., Beerman, M. B., Struewing, J. P., Chanock, S. J., & Bergen, A. W. (2003). Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC biotechnology*, 3(1), 1-10.
- Harvey, M. G., Bonter, D. N., Stenzler, L. M., & Lovette, I. J. (2006). A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology*, 77(2), 136-140.
- Hemmings, H. C., & Hopkins, P. M. (2006). *Foundations of anesthesia: basic sciences for clinical practice*. Elsevier Health Sciences.
- Hernandez J.H. (2011). Percepción por parte de los pobladores en la zona de influencia de la reserva de Biósfera San Guillermo (San Juan) acerca de aspectos



- relacionados con la fauna silvestres y su manejo. Tesina de grado. Universidad Nacional de San Juan. San Juan, Argentina.
- Horváth, M. B., Martínez-Cruz, B., Negro, J. J., Kalmár, L., & Godoy, J. A. (2005). An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of avian biology*, 36(1), 84-88.
- Huynen, L., Millar, C. D., & Lambert, D. M. (2002). A DNA test to sex ratite birds. *Molecular ecology*, 11(4), 851-856.
- Karaceylan, I. B., & Tabur, M. A. (2018). Comparing different molecular sampling methods from birds via molecular sexing. *feb-fresenius environmental bulletin*, 12, 703.
- Kärkkäinen, T., Bize, P., & Stier, A. (2020). Correlation in telomere lengths between feathers and blood cells in pied flycatchers. *Journal of avian biology*, 51(4)..
- Kimwele, C. N., Graves, J. A., Burke, T., & Hanotte, O. (1998). Development of microsatellite markers for parentage typing of chicks in the ostrich *Struthio camelus*.
- Lee, K., Feinstein, J., Cracraft, J., & Mindell, D. P. (1997). The phylogeny of ratite birds: resolving conflicts between molecular and morphological data sets. *Avian molecular evolution and systematics*, 173-211.
- Malagó, W., Franco, H. M., Matheucci, E., Medaglia, A., & Henrique-Silva, F. (2002). Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC biotechnology*, 2(1), 1-4.
- Marinero, N. V., Cortez, R. O., Navarro, J. L., & Martella, M. B. (2014). Density and abundance of *Rhea pennata garleppi* (Struthioniformes: Rheidae) in the Puna ecoregion of Argentina. *Revista chilena de historia natural*, 87, 1-5.



- McDonald, P. G., & Griffith, S. C. (2011). To pluck or not to pluck: the hidden ethical and scientific costs of relying on feathers as a primary source of DNA. *Journal of Avian Biology*, 42(3), 197-203.
- MMA (2015). Plan nacional de conservación del Suri (*Pterocnemia pennata tarapacensis*, Chubb, 1913). Ministerio de Medio Ambiente de Chile.
- Morinha, F., Travassos, P., Seixas, F., Santos, N., Sargo, R., Sousa, L., ... & Bastos, E. (2013). High-resolution melting analysis for bird sexing: a successful approach to molecular sex identification using different biological samples. *Molecular ecology resources*, 13(3), 473-483.
- Navarro, J. L., Cardón, R., Manero, A., & Clarke, R. (1999). Estimación de la abundancia poblacional de choique en vida silvestre. Informe a la Dirección de Fauna y Flora Silvestres, Secretaría de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Argentina.
- Oliveira, C. F. D., Paim, T. G. D. S., Reiter, K. C., Rieger, A., & D'azevedo, P. A. (2014). Evaluation of four different DNA extraction methods in coagulase-negative Staphylococci clinical isolates. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56, 29-33.
- Payne, R. B., & Sorenson, M. D. (2002). Museum collections as sources of genetic data. *Bonner Zoologische Beiträge*, 51, 97-104.
- Promega (2022). How do I determine the concentration, yield and purity of a DNA sample? Visitado 21 noviembre 2022. <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/how-do-i-determine-the-concentration-yield-and-purity-of-a-dna-sample/>
- Pycraft, W. P. (1900). On the morphology and phylogeny of the Palæognathæ (*Ratitæ* and *Crypturi*) and Neognathæ (*Carinatae*). *The Transactions of the Zoological Society of London*, 15(5), 149-290.



- Robinson, T. J., & Matthee, C. A. (1999, August). Molecular genetic relationships of the extinct ostrich, *Struthio camelus syriacus*: consequences for ostrich introductions into Saudi Arabia. In *Animal Conservation forum* (Vol. 2, No. 3, pp. 165-171). Cambridge University Press.
- Rossi Fraire, H. J., & Martella, M. B. (2006). DNA test to sex the lesser rhea (*Rhea pennata pennata*). *British Poultry Science*, 47(3), 375-377.
- Sales, J. (2006). The rhea, a ratite native to South America. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 17(4), 105-124.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Sambrook, J. (2006). *The condensed protocols: from molecular cloning: a laboratory manual* (No. Sirsi) i9780879697723). Cold Spring Harbor, NY: Cold spring harbor laboratory press.
- Santella, R. M. (2006). Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15(9), 1585-1587.
- Seeker, L. A., Holland, R., Underwood, S., Fairlie, J., Psifidi, A., Ilska, J. J., ... & Nussey, D. H. (2016). Method specific calibration corrects for DNA extraction method effects on relative telomere length measurements by quantitative PCR. *PloS one*, 11(10), e0164046.
- SERFOR (2015). *Plan nacional para la conservación del suri (Rhea pennata)*. Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. Lima, Perú.
- Steinheimer, F. D. (2004). Charles Darwin's bird collection and ornithological knowledge during the voyage of HMS "Beagle", 1831–1836. *Journal of ornithology*, 145(4), 300-320.
- Sturkie, P. D. (1976). Heart and circulation: anatomy, hemodynamics, blood pressure, blood flow, and body fluids. In *Avian physiology* (pp. 76-101). Springer, Berlin, Heidelberg.



- Swerdlow, H., & Gesteland, R. (1990). Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic acids research*, 18(6), 1415-1419.
- Taberlet, P., & Bouvet, J. (1991). A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The auk*, 108(4), 959-960.
- Taylor, E. L., Vercoe, P., Cockrem, J., Groth, D., Wetherall, J. D., & Martin, G. B. (1999). Isolation and characterization of microsatellite loci in the emu, *Dromaius novaehollandiae*, and cross-species amplification within Ratitae. *Molecular Ecology*, 8(11), 1963-1964.
- Van Emburgh, B. O., Arena, S., Siravegna, G., Lazzari, L., Crisafulli, G., Corti, G., ... & Bardelli, A. (2016). Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nature communications*, 7(1), 13665.
- Van Tuinen, M., Sibley, C. G., & Hedges, S. B. (1998). Phylogeny and biogeography of ratite birds inferred from DNA sequences of the mitochondrial ribosomal genes. *Molecular Biology and Evolution*, 15(4), 370-376.
- Venturini, G., D'Ambrogi, R., & Capanna, E. (1986). Size and structure of the bird genome--I. DNA content of 48 species of Neognathae. *Comparative Biochemistry and physiology. B, Comparative Biochemistry*, 85(1), 61-65.
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, S., Horváth, M., Kalmár, L., & Szabó, K. (2013). Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *Journal of Ornithology*, 154, 587-595.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.



Walsh, P. S., Metzger, D. A., & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*, 10(4), 506-513.

Zelenitsky, D. K., & Modesto, S. P. (2003). New information on the eggshell of ratites (Aves) and its phylogenetic implications. *Canadian Journal of Zoology*, 81(6), 962-970.

ANEXOS

ANEXO 1: Álbum fotográfico

Figura 6

Extracción de plumas de Rhea Pennata



Se observa la obtención de plumas en *Rhea pennata* para tener un cálamo conservado.

Figura 7

Procesamiento de muestra de pluma



Se realizó la reducción de tejido a dimensiones de 1 mm.

Figura 8

Procesamiento de las muestras de sangre



Visualizamos las muestras de sangre en alícuotas de 1 ml de cada muestra de sangre.

Figura 9

Uso del kit de extracción de ADN en plumas



Se observa las muestras que se procesaron de acuerdo al protocolo del kit de extracción Wizard SV Genomic DNA.

Figura 10

Uso del kit de extracción del ADN en sangre



Observamos la ejecución del protocolo del kit de extracción innuPREP Blood DNA Mini Kit.

Figura 11

Evaluación de la concentración y la calidad del ADN extraído por medio del espectrofotómetro



Se utilizó el espectrofotómetro PCR Lax Lambda, el cual se manejó con 1 μ l de ADN.

Figura 12

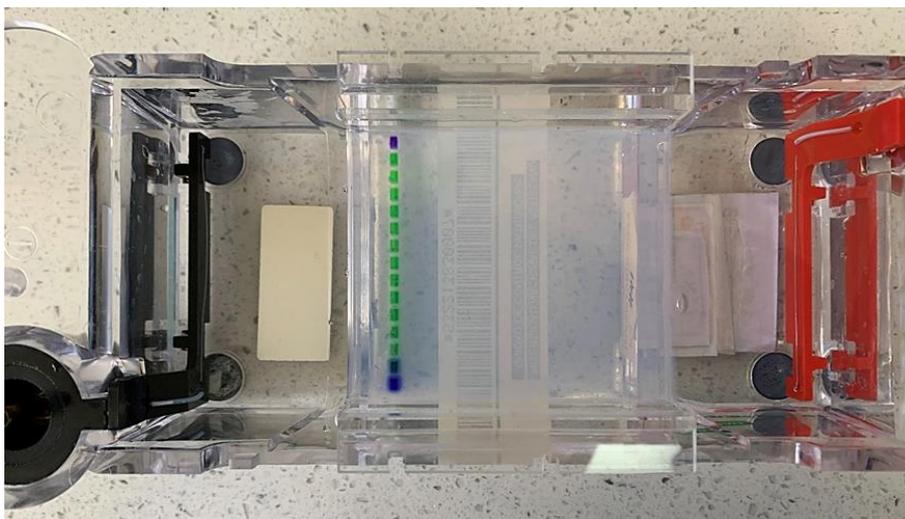
Preparación de geles de agarosa para la evaluación de la integridad por electroforesis horizontal



Se realizó el pesaje de 0.5 g de agarosa para obtener un gel a concentración del 1%.

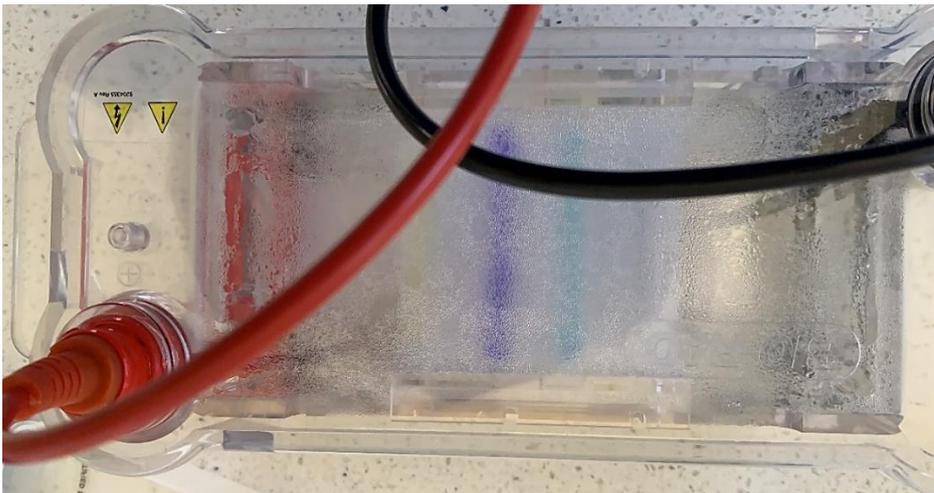
Figura 13

Aplicado de muestra de ADN extraído en suri en gel de agarosa



Se cargó 10 μ l de muestra en cada pocillo con su respectivo control positivo H₂O y control negativo muestra de ADN de otra ave.

Figura 14

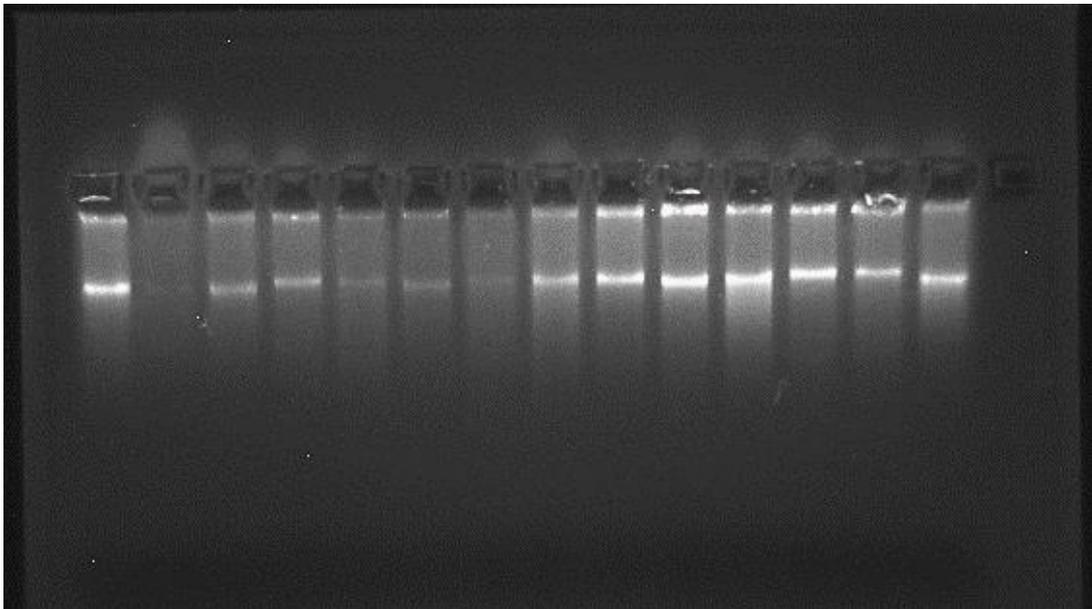


Se visualiza la electroforesis horizontal con muestras de ADN extraídos de suri, se realizó la corrida a 100 voltios por 30 minutos.

ANEXO 2: Resultados de la integridad en muestras de ADN extraídos en Suri

Figura 15

Integridad del ADN extraído en Suri



Podemos observar la foto obtenida del transiluminador E-Gel Imager donde nos muestra la banda de ADN.



ANEXO 3: Data Obtenida

Data de la concentración

Pluma ($\mu\text{g/ml}$)	Sangre ($\mu\text{g/ml}$)
46	25
90	15
92	16
25	8
43	12
27	20
43	14
27	11
31	8
29	11
77	15
76	18
35	28
29	23
38	15
23	13
55	6
24	16
23	13
48	19
56	6
77	12
83	14
46	19
25	20
24	16
50	30
25	4



Data de la calidad

Pluma (260nm/280nm)	Sangre (260nm/280nm)
1.8	1.6
1.6	1.5
1.4	1.4
1.3	1.3
1.2	1.2
1	1.6
1.8	1.1
2	1.1
1.9	0.8
1.6	1
1.9	0.7
1.4	0.8
1.2	1
1	1.1
1.4	0.9
1.3	0.9
1.8	1.5
2	1.3
1.8	1.5
1.3	1.4
1.7	1.1
1.5	1.8
1.9	1.4
1.5	1.6
1.1	1.5
1.5	1.4
1.3	1.7
1.5	1.1



Data de la integridad

Pluma	Sangre
2	2
4	2
2	2
4	2
1	3
2	3
3	3
2	3
3	5
3	2
4	3
2	3
3	2
3	3
4	3
4	2
5	1
3	1
3	3
3	2
1	1
2	3
3	3
5	2
1	1
3	1
3	1
2	1



ANEXO 4: Análisis estadístico

Análisis de estadística descriptiva de la concentración

	Pluma	Sangre
Número de valores	28	28
Mínimo	23.00	4.000
Máximo	92.00	30.00
Rango	69.00	26.00
Media	45.25	15.25
Desviación estándar	22.37	6.357
Error estándar de la media	4.227	1.201

Análisis de estadística descriptiva de la calidad

	Pluma	Sangre
Número de valores	28	28
Mínimo	1.000	0.7000
Máximo	2.000	1.800
Rango	1.000	1.100
Media	1.525	1.261
Desviación estándar	0.2989	0.2986
Error estándar de la media	0.05649	0.05642

Análisis de estadística descriptiva de la integridad

	Pluma	Sangre
Número de valores	28	28
Mínimo	1.000	1.000
Máximo	5.000	5.000
Rango	4.000	4.000
Media	2.857	2.250
Desviación estándar	1.079	0.9670
Error estándar de la media	0.2039	0.1828



Análisis de normalidad de la concentración

	Pluma	Sangre
Prueba de distribución normal		
Prueba de D'Agostino y Pearson		
K2	4.185	1.399
Valor P	0.1234	0.4968
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa=0,05)?	Si	Si
Resumen del valor P	ns	ns
Número de valores	28	28

Análisis de normalidad de la calidad

	Pluma	Sangre
Prueba de distribución normal		
Prueba de D'Agostino y Pearson		
K2	2.842	2.420
Valor P	0.2415	0.2982
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa=0,05)?	Si	Si
Resumen del valor P	ns	ns
Número de valores	28	28

Análisis de normalidad de la integridad

	Pluma	Sangre
Prueba de distribución normal		
Prueba de D'Agostino y Pearson		
K2	0.1000	2.483
Valor P	0.9512	0.2889
¿Pasó la prueba de normalidad (alfa=0,05)?	Yes	Yes
Resumen del valor P	ns	ns
Número de valores	28	28



Análisis de la prueba t para la concentración

Tabla analizada	Concentración
Columna B	Sangre
vs.	vs.
Columna A	Pluma
Prueba t	
valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	Si
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=6.827, df=54
¿Qué tan grande es la diferencia?	
Media de la columna A	45.25
Media de la columna B	15.25
Diferencia entre medias (B - A) ± SEM	-30.00 ± 4.394
intervalo de confianza del 95%	-38.81 to -21.19
R al cuadrado (eta al cuadrado)	0.4633
Prueba F para comparar varianzas	
F, DFn, Dfd	12.38, 27, 27
valor P	<0.0001
Resumen del valor P	****
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	Si
Datos analizados	
Tamaño de la muestra, columna A	28
Tamaño de la muestra, columna B	28

Análisis de la prueba t para la calidad

Table analizada	Calidad
Columna B	Sangre
vs.	vs.
Columna A	Pluma
Prueba t	
valor P	0.0017
Resumen del valor P	**
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	Si
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=3.310, df=54
¿Qué tan grande es la diferencia?	
Media de la columna A	1.525
Media de la columna B	1.261
Diferencia entre medias (B - A) ± SEM	-0.2643 ± 0.07984
intervalo de confianza del 95%	-0.4244 to -0.1042



R al cuadrado (eta al cuadrado)	0.1687
Prueba F para comparar varianzas	
F, DFn, Dfd	1.002, 27, 27
valor P	0.9951
Resumen del valor P	ns
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	No
<hr/>	
Datos analizados	
<hr/>	
Tamaño de la muestra, columna A	28
Tamaño de la muestra, columna B	28
<hr/>	

Análisis de la prueba t para la integridad

Tabla analizada	Integridad
Columna B	Sangre
vs.	vs.
Columna A	Pluma
Prueba t	
valor P	0.0308
Resumen del valor P	*
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	Si
¿Valor P de una o dos colas?	Dos colas
t, df	t=2.217, df=54
¿Qué tan grande es la diferencia?	
Media de la columna A	2.857
Media de la columna B	2.250
Diferencia entre medias (B - A) ± SEM	-0.6071 ± 0.2738
intervalo de confianza del 95%	-1.156 to -0.05819
R al cuadrado (eta al cuadrado)	0.08345
Prueba F para comparar varianzas	
F, DFn, Dfd	1.245, 27, 27
valor P	0.5735
Resumen del valor P	ns
¿Significativamente diferente (P < 0,05)?	No
<hr/>	
Datos analizados	
<hr/>	
Tamaño de la muestra, columna A	28
Tamaño de la muestra, columna B	28
<hr/>	



ANEXO 5: Declaración jurada de autenticidad de tesis



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo KIARLA MIRELLA CRUZ YUCRA
identificado con DNI 70549812 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:
" EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACION, CALIDAD E INTEGRIDAD DEL ADN
EXTRAÍDO DE SANGRE Y PLUMAS DEL SURI "RHEA PENNATA" "

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 22 de Enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella



ANEXO 6: Autorización para el depósito en el repositorio institucional



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo KIARLA MIRELLA CRUZ YUCRA
identificado con DNI 70549812 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

" EVALUACION DE LA CONCENTRACION, CALIDAD E INTEGRIDAD
DEL ADN EXTRAÍDO DE SANGRE Y PLUMAS DEL SURÍ
« RHEA PENNATA »"

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 22 de Enero del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella