



REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTADO DE POSGRADOS

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

"Evaluación de un Kit para la extracción de ADN de muestras de heces de niños y niñas en edad escolar del Proyecto GUAGUA: Análisis de la Calidad del ADN Mediante Espectrofotometría de Microvolumen"

AUTOR:

Ing. Renata Alejandra Alvarado Barba

DIRECTOR:

ND. Tannia Valeria Carpio Arias Ph.D.

Milagro, 2024

Derechos de Autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Renata Alejandra Alvarado Barba**, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de **Magíster en Biotecnología**, como aporte a la Línea de Investigación: **Área:** Salud y bienestar, **Líneas:** Factores de riesgo, **Sublíneas:** Riesgos de conducta individuales y sociales (desnutrición materna e infantil; riesgos alimentarios; consumo de alcohol, tabaco y sustancias psicotrópicas; actividad física y deporte; abuso sexual e intimidación infantil; violencia intradomiliaria) de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 23 de enero de 2025

Ing. Renata Alejandra Alvarado Barba
C.I.: 0604030718

Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Tannia Valeria Carpio Arias**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Renata Alejandra Alvarado Barba**, cuyo tema es "**Evaluación de un Kit para la extracción de ADN de muestras de heces de niños y niñas en edad escolar del Proyecto GUAGUA: Análisis de la Calidad del ADN Mediante Espectrofotometría de Microvolumen**", que aporta a la Línea de Investigación **Área:** Salud y bienestar, **Líneas:** Factores de riesgo, **Sublíneas:** Riesgos de conducta individuales y sociales (desnutrición materna e infantil; riesgos alimentarios; consumo de alcohol, tabaco y sustancias psicotrópicas; actividad física y deporte; abuso sexual e intimidación infantil; violencia intradomiliaria), previo a la obtención del Grado **Magíster en Biotecnología**. Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informe de Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, 23 de enero de 2025

ND. Tannia Valeria Carpio Arias PhD.
C.I.: 0603368887

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ALVARADO BARBA RENATA ALEJANDRA**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "EVALUACIÓN DE UN KIT PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE MUESTRAS DE HECES DE NIÑOS Y NIÑAS EN EDAD ESCOLAR DEL PROYECTO GUAGUA: ANÁLISIS DE LA CALIDAD DEL ADN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE MICROVOLUMEN", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	55.00
SUSTENTACIÓN	38.33
PROMEDIO	93.33
EQUIVALENTE	Muy Bueno



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO**

Mgs. **BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY**
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**MARÍA FERNANDA
GARCÉS MONCAYO**

Msc **GARCÉS MONCAYO MARÍA FERNANDA**
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**RAFAEL SELEYMAN
LAZO SULCA**

Msc Bio V **LAZO SULCA RAFAEL SELEYMAN**
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a mi madre Marlene, cuyo amor y sacrificio incondicional me han guiado en cada paso de mi vida. A mi hermano, Pablito, por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí, y a mi hermana, Antonella, por su energía y entusiasmo que me han inspirado. Gracias por ser mi fortaleza y mi motivación siempre.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi madre, Marlene, por su apoyo incondicional, amor y dedicación, este logro no habría sido posible.

A mi hermano, Pablito, gracias por estar siempre a mi lado, por su alegría y apoyo en los momentos difíciles, siempre encontrando la manera de hacerme sonreír. A mi hermana, Antonella, quiero agradecerle por ser una fuente constante de inspiración. Tu valentía al enfrentar desafíos me ha enseñado a ser más fuerte y resiliente.

A todos ustedes, les debo este éxito y cada paso de este viaje. Estoy eternamente agradecido por tenerlos en mi vida.

Agradezco profundamente a mi tutora de tesis, Valeria, por su guía invaluable, paciencia y por compartir su vasto conocimiento. Su apoyo me ha permitido crecer académica y profesionalmente.

Finalmente, agradezco a Dios, quien ha estado presente en cada paso de este viaje, ha sido mi fortaleza para enfrentar los retos, gracias por su infinita bondad y por recordarme que nunca estoy sola.

Resumen

La presente tesis tiene como objetivo principal evaluar la eficacia del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep para la extracción de ADN a partir de muestras de heces de niños y niñas en edad escolar, dentro del contexto del Proyecto GUAGUA. Este proyecto busca comprender mejor la microbiota intestinal de la población infantil y su relación con diversas condiciones de salud. Para lograr este objetivo, se utilizaron muestras fecales de niños en edad escolar y se siguió un protocolo detallado para la extracción de ADN utilizando el kit mencionado.

El proceso comenzó con la descripción del protocolo de extracción, que detallaba cada paso desde la recolección de las muestras hasta la obtención del ADN. Posteriormente, se midió la concentración y pureza del ADN obtenido mediante la espectrofotometría de microvolumen con el dispositivo Nanodrop, una técnica que permite evaluar la calidad del ADN de manera precisa. Los resultados obtenidos indicaron que el kit Quick-DNA es efectivo para la extracción de ADN fecal, proporcionando rendimientos adecuados y una calidad de ADN que cumple con los estándares necesarios para la amplificación y análisis genético. Sin embargo, se observó una variabilidad en la calidad del ADN dependiendo de la naturaleza de las muestras fecales, lo que sugiere que es necesario un manejo cuidadoso y la aplicación de criterios de inclusión específicos para garantizar resultados óptimos.

Además, esta tesis identifica y discute varios desafíos y limitaciones asociados con el proceso de extracción y análisis del ADN fecal. Entre estos, se destacan la necesidad de controlar posibles contaminantes y asegurar una correcta manipulación de las muestras para evitar la degradación del ADN. A pesar de estos desafíos, los resultados subrayan la viabilidad del uso de ADN extraído de heces en estudios

genéticos y microbiológicos, destacando su potencial en investigaciones sobre el microbioma y su impacto en la salud infantil.

En conclusión, esta investigación encontró demuestrando que el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep es una herramienta efectiva para la extracción de ADN a partir de muestras fecales de niños en edad escolar. Los resultados obtenidos no solo validan la utilización del kit en estudios futuros, sino que también proporcionan una base sólida para el desarrollo de protocolos estandarizados que pueden ser aplicados en una amplia variedad de investigaciones genéticas y de salud pública. Esto tiene importantes implicaciones para la comprensión del microbioma intestinal y su influencia en diversas condiciones de salud, contribuyendo al mejoramiento de las estrategias de prevención y tratamiento en la población infantil.

Palabras clave: Kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep, extracción de ADN, muestras fecales, niños en edad escolar, espectrofotometría de microvolumen, microbiota intestinal

Abstract

This thesis primarily aims to evaluate the effectiveness of the Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep kit for DNA extraction from fecal samples of school-aged children, within the framework of the GUAGUA Project. The project seeks to better understand the intestinal microbiota of the pediatric population and its relationship with various health conditions. Fecal samples were collected from school-aged children, and a detailed protocol for DNA extraction using the kit was followed.

The process began with describing the extraction protocol, detailing each step from sample collection to DNA acquisition. Subsequently, the concentration and purity of the extracted DNA were measured using microvolume spectrophotometry with the Nanodrop device, a technique that allows for precise evaluation of DNA quality. The results indicated that the Quick-DNA kit is effective for fecal DNA extraction, providing adequate yields and DNA quality that meet the necessary standards for genetic amplification and analysis. However, variability in DNA quality was observed depending on the nature of the fecal samples, suggesting the need for careful handling and specific inclusion criteria to ensure optimal results.

Furthermore, this thesis identifies and discusses several challenges and limitations associated with the DNA extraction and analysis process. These include the need to control potential contaminants and ensure proper handling of samples to prevent DNA degradation. Despite these challenges, the results highlight the feasibility of using DNA extracted from feces in genetic and microbiological studies, underscoring its potential in research on the microbiome and its impact on child health.

In conclusion, this research found that the Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep kit is an effective tool for DNA extraction from fecal samples from school-aged children.

The results obtained not only validate the use of the kit in future studies, but also provide a solid basis for the development of standardized protocols that can be applied in a wide variety of genetic and public health research. This has important implications for the understanding of the gut microbiome and its influence on various health conditions, contributing to the improvement of prevention and treatment strategies in the child population.

Keywords: Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit, DNA extraction, fecal samples, school-aged children, microvolume spectrophotometry, intestinal microbiota.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Esquema del proceso implementado	21
--	----

Lista de Tablas

Tabla 1. Valores de concentración de ADN y pureza de las muestras de estudio ...	24
Tabla 2. Volúmenes de tampón de elusión y concentración de ADN de las muestras de estudio.....	26

Índice / Sumario

Derechos de Autor	II
Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación.....	III
Certificación de Defensa	IV
Dedicatoria	V
Agradecimientos.....	VI
Resumen	VII
Abstract.....	IX
Lista de Gráficos.....	XI
Lista de Tablas	XII
Índice / Sumario.....	XIII
Introducción.....	1
CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Delimitación del problema	4
1.3. Formulación del problema	4
1.4. Preguntas de investigación	5
1.5. Objetivos	5
1.5.1 Objetivo general	5
1.5.2 Objetivos específicos	5
1.6. Hipótesis	5
1.7. Justificación	6
1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)	7
CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial	9
2.1. Antecedentes Referenciales	9
2.2. Marco Conceptual	10

2.3. Marco Teórico.....	12
CAPÍTULO III: Diseño Metodológico.....	17
3.1. Tipo y diseño de investigación	17
3.2. La población y la muestra	18
Población	18
Muestra	18
3.3. Los métodos y las técnicas	18
3.4. Procesamiento estadístico de la información	23
CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados	24
4.1. Análisis e Interpretación de Resultados	24
CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones.....	28
5.1. Discusión	28
5.2. Conclusiones.....	29
5.3. Recomendaciones.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	35

Introducción

La microbiota intestinal humana es un ecosistema con una gran comunidad de microorganismos que están en constante contacto con el sistema digestivo. Dentro de la microbiota intestinal tenemos bacterias que son las más abundantes, pero también encontramos hongos, virus o arqueas (Angebault, et. al., 2018)

En los laboratorios a identificación de microorganismos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante el aislamiento del microorganismo que se desea estudiar para la observación de sus características como su morfología, comportamiento bioquímico y metabolismo. No obstante, esta metodología presenta varias limitaciones, una de ellas es el tiempo para obtener resultados o la dificultad que presentan algunos microorganismos para ser cultivados; es por eso los métodos de identificación de microorganismos por medio de técnicas moleculares son altamente viable, proporcionan rapidez para la obtención de resultados. (Cuan & Cárdenas, 2018)

La extracción de ADN es un tema de interés actual en cuanto al estudio del papel de la microbiota intestinal en la salud y es un proceso fundamental en diversas áreas de biología, medicina y microbiología. El aislamiento y la purificación del ADN genómico bacteriano a partir del contenido de la mucosa y la luz intestinal es importante para garantizar un alto rendimiento y calidad de los ácidos nucleicos aislados y una representación equilibrada de las consorcios microbianos. En los últimos años se han desarrollado y distribuido varios kits de extracción de ADN patentados buscando una manera de reemplazar a los métodos originales que toman más tiempo. Existen investigaciones que evidencian que los kits de extracción de ADN muestran diferentes resultados en términos de: cantidad y calidad del ADN extraído, inhibidores de

reacciones de PCR e influencias en la composición de la comunidad bacteriana. (Gerasimidis et al., 2016)

Los métodos de extracción tradicionales son más explorados en comparación con los enfoques de secuenciación modernos que aún no se han explorado ampliamente. Es por ello la importancia de realizar un estudio para verificar la eficacia de un kit de extracción identificando valores en el rendimiento y la calidad del ADN aislado, así como la composición de la microbiota determinada a través de espectrofotometría de micro volumen a través de la tecnología NanoDrop.

La tecnología Nanodrop es un innovador sistema de retención de muestras que utiliza la tensión superficial para sujetar y medir muestras de micro volúmenes entre dos pedestales ópticos sin el uso de cubetas o capilares. El espectrofotómetro NanoDrop 2000c utiliza esta tecnología para medir de forma rápida y sencilla gotas de proteínas, ADN, ARN y otras biomoléculas de entre 0,5 y 2 μ L. Esta capacidad se ha convertido en cada vez en un aspecto más relevante a medida que las técnicas moleculares evolucionan constantemente con el objetivo de utilizar medidas más reducidas de material para el análisis (Desjardins y Conklin, 2010). La cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas y la evaluación de la pureza, funciones básicas de los espectrofotómetros NanoDrop, son indispensables para muchas aplicaciones posteriores, en particular RT-qPCR y control de calidad (Thermo Fisher Scientific, 2006).

Con esta evaluación se espera proporcionar información que se pueda utilizar para verificar la eficacia de los diferentes kit de extracción estableciendo un protocolo adecuado y eficaz que sirva para futuras investigaciones biomédicas sobre microbiota intestinal y el impacto en la salud infantil.

CAPÍTULO I: El Problema de la Investigación

1.1. Planteamiento del problema

La evaluación de la calidad del ADN obtenido del análisis de muestras fecales a través de diferentes kits de extracción es importante para la investigación de la microbiota intestinal y la influencia en la salud infantil. Los análisis de ADN fecal durante su proceso presentan algunos problemas determinados incluyendo la destrucción y contaminación del material genético afectando la cantidad y calidad de ADN que se obtiene; por lo cual es importante establecer el protocolo más adecuado de acuerdo con los kits específicos que se utilicen en estos procesos.

La espectrofotometría de micro volumen ha demostrado ser una técnica eficiente para medir la concentración y evaluar la calidad del ADN, por lo cual este método es el adecuado para este estudio. No obstante, la efectividad de los kits de extracción de ADN para muestras fecales no ha sido investigados suficientemente y es así como este estudio evaluará un kit específico donde se demostrará su utilidad y ayudará a desarrollar un protocolo que cumpla con parámetros en los cuales los valores de calidad y cantidad de ADN sean los más adecuados.

La estandarización de metodologías y la heterogeneidad de la calidad de ADN extraído pueden limitar la utilidad de los estudios genéticos y epidemiológicos. Por esta razón es importante estandarizar protocolos que garanticen la calidad del ADN extraído y facilitar el análisis de la microbiota intestinal con el fin de mantener una información actualizada en cuanto a estudios de salud y bienestar en población infantil.

1.2. Delimitación del problema

Este estudio se basa en la evaluación de un kit de extracción de ADN de muestras fecales de niños y niñas en edad escolar del Proyecto GUAGUA, las delimitaciones son: población de niños y niñas comprendidos entre 6 y 12 años, tipo de muestra, kit de extracción y método de evaluación a través de espectrofotometría de micro volumen.

El estudio se realizó en un periodo de seis meses, considerando factores específicos y limitaciones geográficas donde se lleva a cabo el Proyecto GUAGUA que tiene como objetivo determinar las características de la microbiota intestinal que están relacionadas con infección parasitaria y desnutrición a través de secuenciación genética de la microbiota y análisis molecular y microscópico de muestras de heces, así como evaluación del estado nutricional y de habilidades cognitivas y sociales de niños y niñas en edad escolar de la Sierra, Amazonía, Costa y Región Insular ecuatoriana. Mientras que en este trabajo de titulación se analizarán factores biológicos y ambientales relevante para la extracción de ADN; estas delimitaciones permitieron un enfoque claro y específico en el eficacia del kit de extracción junto con el análisis de la calidad de ADN obtenido.

1.3. Formulación del problema

La eficacia de un kit específico para la extracción de ADN de muestras fecales de niños y niñas en edad escolar es crucial para garantizar la calidad y pureza del ADN, evaluada mediante espectrofotometría de micro volumen, lo cual contribuirá a tener una mayor comprensión de la configuración de la microbiota intestinal de las niñas y

niños del proyecto GUAGUA, y la vinculación que existe entre la conformación de este conjunto de microorganismos y la salud integral de los niños.

1.4. Preguntas de investigación

¿Cuál es el nivel de eficacia del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep para la extracción de ADN a partir de muestras de heces de niños en edad escolar para determinar las características del ADN obtenido mediante espectrofotometría Nanodrop?

1.5. Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep para la extracción de ADN a partir de muestras de heces de niños en edad escolar con el fin de y analizar la calidad del ADN obtenido mediante espectrofotometría Nanodrop.

1.5.2 Objetivos específicos

- Mejorar el protocolo de extracción utilizando el kit Quick-DNA.
- Identificar las características del ADN obtenido mediante espectrofotometría Nanodrop.
- Validar la eficacia del proceso de extracción utilizando el kit Quick-DNA, identificando sus limitaciones.

1.6. Hipótesis

El kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep es efectivo para la obtención de ADN de muestras fecales de niños en edad escolar, brindando alta calidad de ADN, con una concentración y pureza elevada, a través de la evaluación por espectrofotometría

Nanodrop. Se estima que cumplir con el procedimiento de extracción propuesto, contribuya a disminuir la contaminación de las muestras fecales obtenidas, contribuyendo a una mayor eficacia de los resultados logrados.

1.7. Justificación

La relación entre la microbiota intestinal y la salud infantil, ha sido de gran interés en los últimos años, investigadores de diversos campos del conocimiento han encontrado interesantes hallazgos que llevan a replantear la importancia otorgada hasta el momento a esta temática.

Los microorganismos que habitan en el intestino conforman un ecosistema bacteriano y presentan diversidad de géneros y especies cuyas formas de coexistencia pueden afectar en gran medida la diversidad de funciones corporales, enfermedades gastrointestinales y a nivel de distintos sistemas junto al desequilibrio producido por los procesos infecciosos agudos tanto a nivel del tracto digestivo, como del sistema nervioso, entre muchos otros procesos se ha empezado a comprender a partir de los resultados de distintas investigaciones (Castañeda Guillot, 2018).

Además, se ha determinado que existe una estrecha relación entre la microbiota intestinal y el funcionamiento del sistema nervioso, de acuerdo con los hallazgos presentados en investigaciones sobre Autismo y Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH); la microbiota intestinal y su microbioma (genoma de la microbiota) son elementos fundamentales para el equilibrio de la salud porque actúan como reguladores clave de distintas funciones del organismo, entre la que se incluye la relación del eje microbiota-intestino-cerebro caracterizado por sus acciones en el desarrollo y fisiología cerebral. Así mismo, la disbiosis que ocurre en la microbiota

produce modificaciones cuantitativas y cualitativas, que pueden afectar en su composición y diversidad, con alteraciones en la producción de neuro receptores, en la concentración de metabolitos y hormonas. Es por eso que los expertos han evaluado la viabilidad de dicha afectación como uno de los posibles factores patogénicos que intervienen como causa de enfermedades neuropsiquiátricas (Castañeda Guillot, 2020).

Se estableció el uso del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep debido a que proporciona posibilidades de optimizar los procesos de extracción de ADN, lo cual permite obtener muestras de alta calidad, con una baja proporción de contaminantes, lo cual lo convierte en una excelente opción para lograr los objetivos de investigación con relación al hallazgo de aspectos relevantes de la desnutrición infantil a partir del análisis de la microbiota intestinal.

Por otra parte, la espectrofotometría Nanodrop, se constituye en una técnica que permite la cuantificación de la pureza del ADN de forma rápida y con un alto grado de precisión, lo cual favorece el establecimiento de estándares para el análisis de muestras genéticas en la población infantil, con lo cual se incrementan los niveles de confiabilidad y validez de las investigaciones en microbiota, de forma particular en el grupo de niños que conforma la muestra del presente estudio (Gutt, et. al., 2023).

1.8. Declaración de las variables (Operacionalización)

Se operacionalizó las variables del estudio mediante el método de extracción de ADN, utilizando el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep como variable independiente. La calidad del ADN extraído, como variable dependiente, se midió a través de la concentración (ng/ μ L) y pureza (relación A260/A280 y A260/A230) obtenidas con

espectrofotometría Nanodrop, así como el rendimiento total y la posible contaminación del ADN. Se consideró la población de niños y niñas en edad escolar (6 a 12 años) y se documentó los desafíos y limitaciones encontradas durante el proceso de extracción.

CAPÍTULO II: Marco Teórico Referencial

2.1. Antecedentes Referenciales

Son diversos los estudios que a nivel internacional analizan la relación existente entre la microbiota intestinal y salud infantil, para la presente investigación se mencionarán el de Castañeda-Guillot (2018), que aborda la comprensión de la relación de estas dos variables, en la cual se describe la definición de microbiota intestinal, su importancia para el funcionamiento adecuado de diversos sistemas corporales y el impacto que tienen en la salud de los niños, los desequilibrios que puedan surgir en los ecosistemas intestinales.

Posteriormente este mismo autor, que se ha especializado en el estudio de esta temática, presenta dos años después un investigación titulada Microbiota intestinal y trastornos del comportamiento mental, en la cual, analiza y establece la relación que existe entre la microbiota intestinal, y algunas condiciones neurobiológicas que afectan los procesos cognitivos y comportamentales de los estudiantes (Castañeda-Guillot, 2020).

También es importante mencionar como antecedente internacional el estudio que llevaron a cabo Camacho-Cruz, et. al., 2021, en el cual, abordan la comprensión de la microbiota intestinal en la especialidad de pediatría explicando la influencia de la microbiota intestinal en el equilibrio sistémico del cuerpo de los niños, la importancia de la adecuada nutrición y su influencia en los procesos de inflamación y desarrollo de diversas enfermedades.

La microbiota intestinal analizada en niños identifica correlaciones entre la composición microbiana, la dieta y la salud (Castañeda Guillot, 2018). Al tomar en

cuenta esta correlación es importante destacar la relevancia en cuanto al almacenamiento adecuado y uso de métodos de extracción confiables y de alta calidad evitando contaminación o degradación del ADN. (Angebault, et. al., 2018)

El proyecto GUAGUA que se enfoca en el estudio de la salud pediátrica y diferentes factores de influencia para el diagnósticos de desnutrición infantil, ha comenzado a investigar la relación de la microbiota intestinal y la desnutrición infantil mediante métodos de extracción de ADN con un kit específico el cual ha brindado resultados de calidad y cantidad de ADN adecuados para realizar una buena secuenciación genética y así poder ir optimizando y mejorando las técnicas de extracción para futuras investigaciones.

Estos antecedentes resaltan la necesidad de investigaciones adicionales que validen y optimicen los métodos de extracción de ADN en contextos de microbiota intestinal infantil, justificando así la realización del presente estudio.

2.2. Marco Conceptual

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos vivos habitantes en el tubo digestivo. Muchas investigaciones internacionales realizan estudios que permiten descifrar el genoma de la microbiota, varias técnicas actuales de estudio de la microbiota se han aproximado al conocimiento de un número importante de bacterias que no son cultivables, y de la relación entre los microorganismos que nos habitan y nuestra homeostasis. Es indispensable la microbiota intestinal y su correcto funcionamiento para un adecuado crecimiento corporal, el desarrollo de la inmunidad y la nutrición. Las alteraciones en la microbiota podrían explicar parte de algunas enfermedades como el asma y la obesidad. La disbiosis puede estar relacionadas con

condiciones como obesidad, diabetes, enfermedades autoinmunitarias y trastornos del comportamiento en la infancia (Icaza-Chávez, 2013).

Las características de la microbiota intestinal se ven afectadas por varios factores, como la dieta, la exposición a antibióticos, el entorno y las condiciones de salud subyacentes. En el estudio de (Álvarez-Calatayud et al., 2018) se ha demostrado que la dieta rica en fibra y fermentados puede favorecer la diversidad microbiana, mientras que el uso frecuente de antibióticos tiende a reducirla drásticamente especialmente en los niños donde la microbiota se encuentra en desarrollo y es altamente susceptible a cambios externos, por lo tanto, el análisis de la microbiota en niños puede proporcionar información valiosa sobre su salud y desarrollo a largo plazo.

La extracción de ADN de muestras fecales es muy importante en el análisis microbiológico, permite la determinación de microorganismos del intestino (Alarcón Cavero et al., 2016). Al realizar este proceso se debe tener mucha precaución ya que se necesita conseguir buena cantidad y calidad sin arrastrar sustancias que puedan inhibir las subsiguientes reacciones de PCR por lo que es necesario considerar que en una misma muestra pueden existir varios microambientes con diferente composición de su microbiota y que se debe realizar una homogenización mecánica la extracción. (Alarcón Cavero et al., 2016)

El kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep™ está diseñado para el aislamiento rápido y sencillo de ADN con calidad de PCR, libre de inhibidores, de una variedad de heces y del suelo. El kit se puede utilizar para aislar con éxito ADN de bacterias, hongos, algas, protozoos, Grampositivos y Gramnegativos, difíciles de lisar, que habitan en muestras fecales y de suelo. El procedimiento es sencillo y se puede completar en tan solo 15 minutos: se añaden muestras fecales (≤ 150 mg cada una) o

muestras de suelo (≤ 250 mg cada una) directamente a un tubo de lisis ZR BashingBead™ (0,1 y 0,5 mm) y rápidamente y lisado eficientemente mediante batido de perlas sin el uso de desnaturalizantes orgánicos o proteinasas. Luego se utiliza la tecnología Zymo-Spin™ para aislar el ADN, que posteriormente se filtra para eliminar los ácidos húmicos/polifenoles que inhiben la PCR. El ADN es ideal para aplicaciones posteriores de base molecular que incluyen PCR, matrices, genotipado (Zymo Research, 2024).

La espectrofotometría Nanodrop es una herramienta clave en este contexto, permitiendo medir tanto la concentración ($\text{ng}/\mu\text{L}$) como la pureza del ADN a través de la relación A_{260}/A_{280} . La pureza del ADN es un factor determinante en la calidad de los resultados obtenidos en estudios de microbiota, ya que un ADN contaminado o degradado puede llevar a interpretaciones erróneas y conclusiones inapropiadas (Thermo Fisher Scientific, 2006).

Al integrar un método de extracción eficaz y técnicas analíticas precisas, este estudio no solo busca mejorar la calidad del ADN extraído, sino también contribuir a una mejor comprensión de la microbiota intestinal en niños, lo que puede tener importantes implicaciones para la salud pública y la investigación biomédica.

2.3. Marco Teórico

Microbiota Intestinal

La microbiota intestinal humana está compuesta por billones de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal. Este ecosistema microbiano desempeña un papel crucial en la salud, participando en la digestión de nutrientes, la síntesis de vitaminas, y la protección contra patógenos. La diversidad y composición de la microbiota

pueden verse afectadas por múltiples factores, incluyendo la dieta, el uso de medicamentos, el entorno y la genética (del Campo-Moreno et al., 2018). Durante la infancia, la microbiota está en continuo desarrollo y es susceptible a alteraciones que pueden tener repercusiones en la salud a largo plazo, como el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias, obesidad y trastornos del comportamiento (Icaza-Chávez, 2013).

Factores que afectan la microbiota intestinal y sus consecuencias

Existen factores externos como la carga microbiana del ambiente, hábitos y tipos de alimentos que se consumen habitualmente, composición de la micro flora materna, estrés, consumo de agua clorada, siendo estos factores de alteraciones menores comparadas con las producidas por el consumo regular de medicamentos como antiinflamatorios, laxantes, antiácidos, administración de antibiótico que impactan al equilibrio de la microbiota intestinal reduciendo severamente las poblaciones dominantes y favoreciendo la emergencia de patógenos oportunistas. Entre los factores inherentes están la carga genética, fisiología del huésped y nutrición endógena. (Salinas de Reigosa, 2013)

Los factores mencionados anteriormente pueden conducir al fenómeno de disbiosis que consiste en las alteraciones cualitativas o cuantitativas de la microbiota del estómago, el intestino delgado o el colon, produciendo un sobre crecimiento o una reducción de la microbiota. Para la regulación de la microbiota intestinal existen agentes bioterapéuticos como son los prebióticos, probióticos y simbióticos, los cuales se consideran como herramientas útiles para mantener el equilibrio armonioso de la microbiota a través del manejo de la dieta del individuo (Salinas de Reigosa, 2013).

Desarrollo de la Microbiota en la Infancia

El proceso de colonización de la microbiota comienza al nacer y continúa durante los primeros años de vida. Factores como el tipo de parto (vaginal o cesárea), la alimentación (lactancia materna vs. fórmula), y la exposición a antibióticos influyen en la composición microbiana inicial. La lactancia materna, por ejemplo, promueve una microbiota más diversa y saludable, lo que puede proteger contra diversas patologías en la infancia (Valeix et al., 2020).

Extracción de ADN de Muestras Fecales

El análisis de microbiota intestinal se hace a partir de una muestra de heces de la que se analiza el ADN microbiano. Mediante una sola secuenciación directa del ADN extraído de la muestra, podemos identificar más de 35 000 organismos y clasificarlos taxonómicamente, de esta manera se determinan aquellos factores que perjudican o benefician a nuestro intestino (Monforte, 2024).

La extracción de ADN inicia con la aplicación de técnicas moleculares y la obtención de datos confiables y reproducibles; todo esto depende en gran parte de la forma de extracción y purificación del ADN que sea integro y puro. El estudio de la variación genética entre poblaciones para explicar patrones evolutivos se basa en marcadores moleculares que se obtiene de técnicas como PCR y secuenciación. Esto ha permitido el estudio de la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas en la microbiota intestinal (Ramos, 2024).

La extracción es un proceso que consiste en el aislamiento y purificación de moléculas de ADN, con el tiempo se han diseñado protocolos con el fin de obtener cantidad y

calidad de ADN adecuada, garantizando la eliminación de inhibidores que dificulten el tratamiento de la molécula (Ramos, 2024).

Métodos de Extracción de ADN

Un paso fundamental dentro de la técnica moleculares es la elección del método de extracción más adecuado, depende mucho del microorganismo en el que se realizará la investigación, el tipo de muestra disponible y su estado de conservación. Sin depender del método que se seleccione es recomendable encontrar el equilibrio entre pureza y rendimiento de acuerdo con la aplicación que se dará posteriormente (Ramos, 2024).

El kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep™ tiene un protocolo de procesamiento rápido y sencillo de una variedad de heces y del suelo para el aislamiento de ADN con calidad de PCR libre de inhibidores. Este kit sirve para extraer el ADN de varios microorganismos como: bacterias, hongos, algas, protozoos, Grampositivos y Gramnegativos, difíciles de lisar, que habitan en muestras fecales y de suelo (Zymo Research, 2024).

Evaluación de la Calidad del ADN

Determinar la calidad del ADN extraído es de fundamental importancia, para la precisión de los análisis microbiológicos, ya que, si las muestras obtenidas sufren algún tipo de degradación o se contaminan con otro tipo de materiales, los resultados de su examinación no se corresponderán de manera eficaz con las verdaderas condiciones de la microbiota analizada.

El empleo de la espectrofotometría Nanodrop, permite obtener resultados más eficientes en el proceso de análisis muestral, a través de la cuantificación de la pureza

de los tejidos de ADN extraídos, mediante el empleo de la medición de longitudes de onda emitidos por los mismos.

Implicaciones en salud y ambiente de la microbiota

La microbiota y nuestras células desde el nacimiento tienen una relación simbiótica que se adaptan a los cambios y evolucionan con el tiempo. Al tener una capacidad metabólica enorme se ha considerado a la microbiota como un “órgano” imprescindible para la vida que influye en la salud y la enfermedad. Cada individuo tiene características particulares en su composición intestinal todo depende de su base genética, dieta e interacción con el ambiente. Cotidianamente estamos expuestos a factores que influyen en el funcionamiento de nuestro cuerpo, pero el nivel de cambios no está solo definido por la naturaleza y la duración de la alteración sino también por la capacidad de estabilidad y composición de cada microbiota siendo así que es única en cada persona. Por ejemplo, al identificar desequilibrios en la microbiota puede darnos una guía para estrategias de intervención en la dieta o uso de prebióticos para restaurar la salud intestinal (del Campo-Moreno et al., 2018).

CAPÍTULO III: Diseño Metodológico

3.1. Tipo y diseño de investigación

La investigación propuesta es de tipo cuantitativa y se enmarca en un diseño experimental, ya que se centra en medir y analizar la calidad del ADN extraído de muestras fecales de niños en edad escolar mediante el uso del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep. Este enfoque permite obtener datos numéricos que facilitan la comparación y el análisis estadístico. La investigación comenzó con la selección de muestras representativas, asegurando que reflejen la diversidad de la población infantil. Las muestras de heces se recolectaron siguiendo un protocolo estandarizado para minimizar la contaminación y garantizar la calidad del ADN.

Luego de la extracción se evaluó la calidad de ADN mediante espectrofotometría de micro volumen usando un equipo llamado Nanodrop, midiendo parámetros como: la concentración (A260) y las relaciones de pureza (A260/A280 y A260/A230); los cuales nos indican la limpieza e integridad del ADN extraído. Una vez obtenidos los datos se realizó un análisis estadístico que incluye comparaciones entre las muestras y la consistencia de resultados con los valores óptimos recomendados por el fabricante del kit.

Este diseño experimental se ajusta para evaluar la eficacia del método de extracción y si es aplicable el otro estudio de microbiota intestinal, además se obtuvieron hallazgos de posibles limitaciones de extracción y así realizar el protocolo más adecuado para futuras investigaciones.

3.2. La población y la muestra

Población

En el presente estudio la población abordada está conformada por niñas y niños del Proyecto GUAGUA, del Ecuador, pertenecientes a diferentes estratos socioeconómicos.

Muestra

La muestra seleccionada fue de 343 de niños y niñas, en edades comprendidas entre 6 y 12 años, pertenecientes a diferentes estratos socioeconómicos, el procedimiento de selección de aplicado fue el muestreo de conveniencia.

3.3. Los métodos y las técnicas

Métodos de Recolección de Muestras

Una vez seleccionada la muestra poblacional, se procedió a la extracción de muestras fecales de los niños y niñas. Previo a este procedimiento de recolección se entregó un consentimiento informado a los padres o representantes de los niños, el cual fue aceptado y firmado. Luego se socializó y entregó un protocolo con instrucciones claras para recolectar las muestras en casa y una vez recogidas se etiquetaron y almacenaron adecuadamente minimizando el riesgo de contaminación asegurando su calidad y cantidad. Posterior a esto se realizaron los procedimientos de laboratorio que permitieron el almacenamiento de las muestras que fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con la finalidad de poder preservarlas en condiciones adecuadas, para continuar siendo analizadas en estudios posteriores (Sánchez-Romero et al., 2019).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research), que está diseñado específicamente para muestras fecales.

Protocolo de extracción de ADN:

1. Agregue ≤ 150 mg de muestra fecal o ≤ 250 mg de muestra a un Tubo De Lisis ZR Bashingbead. Agregue 750 μ l de tampón BashinBead al tubo 1.
2. Asegúrelo en un batidor de perlas equipado con un conjunto de soporte para tubos de 2ml y procese usando condiciones de batido optimizadas (velocidad y tiempo).
3. Centrifugue el tubo de lisis ZR BashingBead en una microcentrífuga a $\geq 10\,000$ x g durante 1 minuto.
4. Transfiera hasta 400 μ l de sobrenadante a un filtro Zymo-Spin III-F en un tubo de recolección y centrifugue a 8 000 x g durante 1 minuto.
5. Agregue 1 200 μ l de solución tampón de lisis genómica al filtrado en el tubo de recolección del paso 4, mezcle bien.
6. Transfiera 800 μ l de la mezcla del paso 5 a una columna Zymo-Spin II-CR4 en un tubo de recolección y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
7. Deseche el flujo del tubo de recolección y *repita el paso 6*.
8. Agregue 200 μ l de tampón de prelavado de ADN a la columna Zymo-Spin II-CR en un tubo de recolección nuevo y centrifugue a 10 000 x g durante 1 minuto.
9. Agregue 500 μ L de tampón de lavado de ADN a la columna Zymo-Spin II-CR y centrifugar a 10 000 x 1 m.

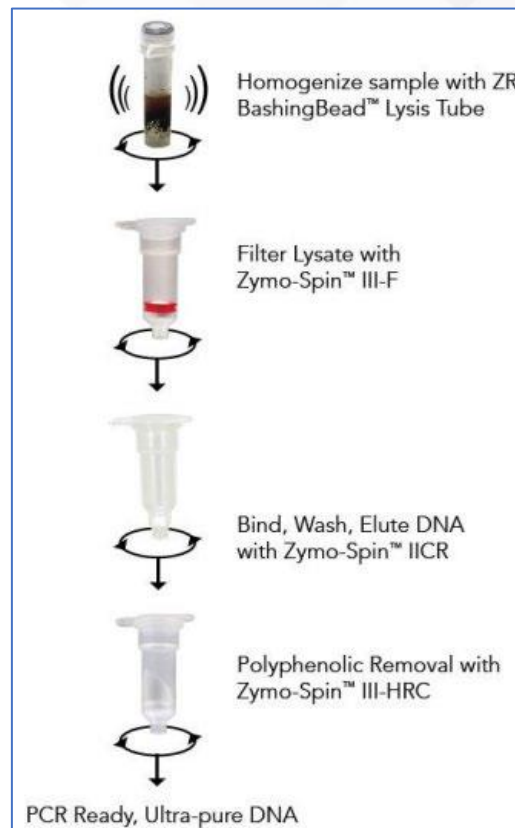
Se sugiere volver a centrifugar, luego de revisar si aún existe líquido de la muestra en los filtros.

10. Transfiera la columna Zymo-Spin II-CR a un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y agregue 100 μ l (50 μ l mínimo) de tampón de elución de ADN directamente a la matriz de la columna. Centrifugar a 10 000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.

Sin embargo, en el laboratorio donde se realizó la extracción por sugerencia de los investigadores se tomó la decisión de utilizar 30 y 50 μ l debido a las bajas concentraciones y no lo indicado en el protocolo original, obteniendo resultados favorables descritos en el análisis estadístico de las muestras, además para mejorar el rendimiento (yield) se debe calentar el agua de elución a 55° C.

11. Coloque el filtro Zymo-Spin III-HCR en un tubo de recolección limpio y agregue 600 μ l de solución preparatoria centrifugar a 8 000 x g durante 3 minutos.
12. Transfiera el ADN eluido a un filtro Zymo Spin™ III HRC preparado en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml y centrifugue a exactamente 16.000 x g durante 3 minutos.

Gráfico 1. Esquema del proceso implementado



Tomado de: (Zymo Research, 2024)

Evaluación de la Calidad del ADN

Una vez culminado el proceso de extracción, se llevará a cabo la evaluación de la calidad del ADN, implementando el espectrofotómetro Nanodrop, que permite realizar mediciones de la concentración y pureza del ADN por medio de la expresión métrica de varias características físicas:

- **Concentración (A260):** es una medida que expresa la cantidad de ADN que puede llegar a estar presente en la muestra extraída, cuyos valores ideales se expresan en medidas comprendidas entre 50 y 200 ng/μL (Banco Nacional de ADN, 2024).

- **Pureza (A260/A280 y A260/A230):** que refleja la pureza del ADN y del ARN, a través de la medición de ácidos nucleicos y proteínas, cuya expresión A260/A280 recomendada se encuentra comprendida entre los valores 1.8 y 2.1. Mientras que la relación 260/230 se espera que puedan encontrarse en el intervalo de 2.0 y 2.2, valores inferiores a los expresados para cada una de estas medidas podría indicar presencia de agentes contaminantes en las muestras extraídas (Banco Nacional de ADN, 2024).

Análisis de Datos

Los datos obtenidos a partir de las mediciones de concentración y pureza del ADN se analizaron utilizando el software estadístico JAMOVI, versión 2.3 (Jamovi, 2022; R Core Team, 2021). Se llevó a cabo lo siguiente:

- **Comparación de Resultados:** Se analizaron las concentraciones y relaciones de pureza de ADN entre las diferentes muestras procesadas para identificar patrones y variaciones.
- **Evaluación de la Eficacia del Kit:** Se compararon los resultados con los valores ideales recomendados por el fabricante del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research), lo que permitió determinar la eficacia del protocolo y rendimiento del ADN.
- **Pruebas Estadísticas:** Se utilizaron pruebas estadísticas descriptivas para evaluar la significancia de las diferencias observadas y la prueba T de grupos para evaluar la cantidad de volumen del tampón de elusión a agregar descrito en el protocolo original de kit en relación con el volumen de tampón de elusión que se agregó como sugerencia en el uso de otros kit en el laboratorio donde

se realizaron los análisis de las muestras; facilitando la validación de la hipótesis planteada sobre la efectividad del kit y la calidad del ADN extraído.

3.4. Procesamiento estadístico de la información

Los datos recolectados de las mediciones de concentración y pureza del ADN se registraron en una base de datos estructurada, utilizando el software estadístico JAMOVI. Cada entrada incluyó:

- Identificación de la muestra (código único).
- Concentración de ADN (A260).
- Relaciones de pureza (A260/A280 y A260/A230).
- Grupos de muestras según volúmenes de tampón de elusión agregado para obtener el volumen final de ADN.
- Notas sobre cualquier anomalía observada durante la extracción o medición.

Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los datos numéricos de la evaluación realizada, se procedió a aplicar cálculos estadísticos que permitieron tener un panorama general de la eficiencia en el rendimiento del kit implementado, a través de la obtención de la media, mediana y moda (Ochoa y Yunkor, 2019). Por otra parte, se analizó la consistencia y variabilidad de estos a través del cálculo de la dispersión.

Análisis Comparativo

Para llevar a cabo el análisis comparativo de los resultados se analizaron los datos obtenidos de los niveles concentración del ADN extraído entre diferentes volúmenes de muestras, a través de la aplicación de procedimientos como la prueba T test y la distribución normal.

CAPÍTULO IV: Análisis e Interpretación de Resultados

4.1. Análisis e Interpretación de Resultados

Tabla 1. Valores de concentración de ADN y pureza de las muestras de estudio

	Estadística descriptiva		
	Concentración ADN A260	Relación A260/A280	Relación A260/A230
N	343	343	343
Media	51.4	1.83	0.920
Mediana	35.1	1.87	0.760
Desviación estándar	39.6	0.132	0.515
Mínimo	12.1	1.22	0.120
Máximo	247	2.33	2.33

Resultados para Concentración de ADN A260

El promedio de concentración de ADN esta dado por la media que es 51.4 ng/μL lo que nos indica que la cantidad de ADN está dentro de los valores ideales comprendidas entre 50 y 200 ng/μL (Banco Nacional de ADN, 2024). El valor mínimo es de 12.1 ng/μL que indica que existe una muestra con una concentración muy baja de ADN la cual se podría analizar cómo se dio su proceso de extracción y si existió algún factor o cantidad de muestra baja que altere su concentración final, el valor máximo de concentración es de 247 ng/μL lo que nos indica que hay muestras con calidad de ADN significativas indicando una extracción eficiente. La desviación estándar es 39.6 lo que nos indica alta variabilidad en las concentraciones de ADN, reflejando los valores anteriores de mínimo y máximo siendo muy bajos o altos respecto a la media, **Tabla 1.**

Resultados de Pureza (A260/A280)

El valor de la media de la relación de absorbancia del ADN es de 1.83 por lo que se considera un valor óptimo de ADN puro comprendido entre los valores recomendados de 1.8 y 2.1 (Banco Nacional de ADN, 2024), por lo que nos indica que las muestras tienen buena calidad. El valor mínimo es de 1.22 que es inferior a los límites recomendados, lo que sugiere una revisión del proceso de extracción, el valor máximo es de 2.33 que es una pureza relativamente alta y es un buen indicador de que la muestra está libre de contaminantes. La desviación estándar es 0.13 indicando una baja variabilidad por lo tanto se considera que las purzas son muy constantes lo cual es positivo, **Tabla 1**.

Resultados (A260/A230)

El valor promedio reflejado en la media es 0.92 siendo inferior a los valores ideales comprendidos entre 2.0 y 2.2 (Banco Nacional de ADN, 2024), indicando una posible contaminación de fenoles, compuestos de guanidina u otros compuestos en las muestras de ADN lo que sugiere revisar el protocolo para que no afecte en futuros análisis, el valor mínimo es de 0.12 que es muy bajo indicando que una de las muestras tuvo una contaminación alta, el valor máximo es de 2.33 indicando que al menos una muestra tiene una pureza alta. La desviación estándar es de 0.52 siendo un valor alto, sugiriendo una considerable variabilidad entre muestras y que existe un foco de contaminación dentro del proceso de extracción, **Tabla 1**.

Tabla 2. Volúmenes de tampón de elusión y concentración de ADN de las muestras de estudio

Prueba T para Muestras Independientes

		Estadístico	gl	p
Concentración ADN A260	T de Student	-1.38 ^a	341	0.167

Nota. $H_a \mu_a \neq \mu_b$

^a La prueba de Levene significativa ($p < 0.05$) sugiere que las varianzas no son iguales

Descriptivas de Grupo

	Grupo	N	Media	Mediana	DE	EE
Concentración ADN A260	a	185	48.7	34.2	34.9	2.56
	b	158	54.6	37.6	44.4	3.53

Para comprobar la hipótesis de este estudio se realizó una prueba T para muestras independientes con la variable de agrupación de volúmenes de tampón de elusión de 30 μ L y 50 μ L utilizados en el proceso de extracción ADN y se calcularon las medias de la concentración de ADN medido, **Tabla 2**. Se observó que en volumen de 30 μ L tenemos una media de concentración 48.7 mientras que en el grupo con volumen de 50 μ L tenemos una media de concentración 54.6 es decir se encuentra una mayor concentración en un volumen mayor. Sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ya que el valor de la prueba T para muestras independientes fue 0.167 es decir mayor a 0.05; concluyendo que no hay una relación entre el volumen de tampón de elusión utilizado en la extracción de ADN y la

concentración final de ADN medido, por lo tanto se acepta la hipótesis de que se pueden utilizar volúmenes menores de tampón de elución establecidos en el protocolo de extracción de ADN del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep para obtener concentraciones óptimas de ADN.

CAPÍTULO V: Conclusiones, Discusión y Recomendaciones

5.1. Discusión

Realizar la evaluación del kit de extracción del ADN en muestras fecales aplicado a los niños y niñas en edad escolar que pertenecen al proyecto Guagua, ha permitido identificar la viabilidad de las muestras obtenidas. De manera general toda la investigación realizada ha contribuido a tener una mayor comprensión los procesos de extracción de este material celular y su importancia para las investigaciones genéticas.

El kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research), indica tener una eficiencia significativa en la extracción de ADN, tiene un alto rendimiento que cumple con los estándares y criterios necesarios para futuros análisis; a pesar de haber adecuado el protocolo original en el paso número 10 en cuanto al volumen de aplicación del tampón de elusión debido a las bajas concentraciones de las muestra y la mejora del rendimiento al ser calentado antes de su uso nos indica que es un método adecuado para ser aplicado en la extracción de muestras fecales las cuales por su naturaleza presentan complejidad en su matriz biológica.

En general los resultados de espectrofotometría de volumen utilizando el equipo Nanodrop indicaron que la cantidad y calidad de ADN era alta con relaciones A260/A280 que apuntaban a una pureza adecuada, lo cual resulta de gran importancia para validar la fiabilidad de posteriores análisis, como los de secuenciación y amplificación por PCR, entre otros.

Por otra parte, se pudo observar que las características del ADN, presentaban variaciones entre una muestra y otra, lo cual puede atribuirse a factores como el tipo de alimentos que consumen los niños y niñas, el tiempo de almacenamiento de las

muestras o el manejo de las mismas, con lo cual se puede determinar que es de fundamental importancia establecer protocolos claros y específicos para el proceso de recolección y procesamiento de las muestras a fin de que la extracción y análisis pueda ser lo más eficiente posible.

Para el estudio de la microbiota intestinal el uso de ADN de heces ayuda significativamente en el estudio del microbioma, la capacidad de obtener este tipo de material genético permite realizar investigaciones en genética y epidemiología que son temas relativamente nuevos en cuanto a la evolución del ser humano y no implican mayor riesgos o exposición de los niños a procedimientos invasivos.

Conforme avanza el tema de investigación con el uso del ADN fecal es esencial que se desarrollen técnicas de extracción y análisis óptimas con protocolos estandarizados que garanticen resultados de calidad. Además de incentivar a que exista una colaboración multidisciplinaria para la comprensión del microbioma en interacción con la alimentación y el ambiente en el que el ser humano se desarrolla.

Este trabajo de investigación no solo valida la efectividad del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research), sino que nos ayuda a tener un mejor enfoque sistemático en el manejo de las muestras para maximizar la cantidad y calidad de ADN que contribuyan para futuros análisis e investigaciones de relevancia.

5.2. Conclusiones

Se mejoró el protocolo original del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research) que fue utilizado para la extracción de ADN de muestras fecales; realizando sugerencias como repetir el centrifugado, calentamiento del tampón de elusión para mejorar su rendimiento y variabilidad en el volumen del mismo sugerido en el protocolo; lo que demostró que el Kit tiene una alta efectividad con rendimientos

apropiados, concentraciones altas y buena calidad de ADN que ayudarán para análisis posteriores. Se sugiere tener un protocolo estandarizado en el cual la toma de la muestra, su almacenamiento y manejo posterior de la misma sea cuidadoso y que durante el proceso de extracción no exista contaminación externa ya que se observó variabilidad en la calidad del ADN.

Los resultados obtenidos del análisis de espectrofotometría de micro volumen a través del equipo Nanodrop indicó que el ADN que se extrajo se encuentra en su mayoría dentro de los rangos óptimos de concentración y sus valores de pureza alcanzan los intervalos ideales recomendados; cumpliendo con los estándares necesarios para análisis y amplificación genética.

Al tener una viabilidad alta en los resultados de extracción de ADN con el uso del kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research) nos indica ser eficaz para muestras fecales; por lo cual permite que las investigaciones sobre la microbiota intestinal tengan resultados relevantes en cuanto al estudio del genoma humano y su relación con la desnutrición infantil. Este proceso de extracción no tiene limitaciones relevantes únicamente se identificó que pocas de las muestras eran muy líquidas y necesitaban ser centrifugadas antes de empezar el protocolo de extracción.

5.3. Recomendaciones

- Estandarizar los protocolos para la recolección y manejo de muestras para mejorar la calidad del ADN obtenido en los procesos de extracción.
- Fomentar estudios que correlacionen el uso de diferentes kits de extracción de ADN para mejorar sus protocolos y asegurar investigaciones de relevancia en temas sobre la microbiota intestinal.

- Incentivar a que se realicen más estudios que exploren la correlación de la calidad del ADN y factores como dieta y ambiente de desarrollo en condiciones de salud para profundizar los posibles factores de la desnutrición infantil.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón Cavero, T., D'Auria, G., Delgado Palacio, S., del Campo Moreno, R., & Ferrer Martínez, M. (2016). *Procedimientos en Microbiología Clínica* (E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno, Eds.). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). www.seimc.org
- Álvarez-Calatayud, G., Guarner, F., Requena, T., & Marcos, A. (2018). Diet and microbiota. Impact on health. *Nutricion Hospitalaria*, 35(Ext6), 11–15. <https://doi.org/10.20960/NH.2280>
- Angebault, C., Ghozlane, A., Volant, S., Botterel, F., D'Enfert, C., & Bougnoux, M. E. (2018). Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201174>
- Banco Nacional de ADN. (2024). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. www.bancoadn.org
- Camacho, J., et. al. (2021). Microbiota intestinal en pediatría . *Revista Repertorio de Medicina y Cirugía*, 30(2), 109-117.
- Castañeda Guillot, C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil Intestinal microbiota and child health. In *Revista Cubana de Pediatría* (Vol. 90, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
- Castañeda Guillot, C. (2020). Microbiota intestinal y trastornos del comportamiento mental. *Revista Cubana de Pediatría*. <https://orcid.org/0000-0001-9925-5211>
- Cuan, A. G., & Cárdenas, A. M. (2018). Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. *Biociencias*, 13, 17–23. <https://doi.org/10.18041/2390>
- del Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D'Auria, G., Delgado-Palacio, S., & Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 36, Issue 4, pp. 241–245). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>

- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Gerasimidis, K., Bertz, M., Quince, C., Brunner, K., Bruce, A., Combet, E., Calus, S., Loman, N., & Ijaz, U. Z. (2016). The effect of DNA extraction methodology on gut microbiota research applications. *BMC Research Notes*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2171-7>
- Guillot, C. C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil Intestinal. In *Revista Cubana de Pediatría* (Vol. 90, Issue 1). <http://scielo.sld.cu>
- Gutt, S., et. al. (2023). Estudio Metagenómico de la microbiota intestinal en pacientes con obesidad mórbida sometidos a cirugía bariátrica. *Actualización en Nutrición*(24), 230-239.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Gut microbiota in health and disease. In *Revista de Gastroenterología de México* (Vol. 78, Issue 4, pp. 240–248). Asociación Mexicana de Gastroenterología. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2013.04.004>
- Jamovi. (2022). *The Jamovi Project* (2.3). <https://www.jamovi.org>
- Monforte, I. L. (2024). *Para qué sirve un análisis de microbiota*. Quironsalud.Com. <https://www.quironsalud.com/blogs/es/adentrare-genes/sirve-analisis-microbiota>
- Ochoa, J., y Yunkor, Y. (2019). El estudio descriptivo en la investigación científica. *Acta jurídica peruana*, 2(2), 1-19.
- R Core Team. (2021). *R: A Language and environment for statistical computing*. R packages retrieved from MRAN snapshot 2022-01-01. <https://cran.r-project.org>
- Ramos, S. (2024). *Extracción y purificación de ADN; Introducción e importancia de la extracción del ADN*. Analitek.Com. <https://blog.analitek.com/extraccion-y-purificacion-de-adn-introduccion-e-importancia-de-la-extraccion-del-adn-0-0-1>
- Salinas de Reigosa, B. (2013). Factores que afectan la microbiota intestinal: De la dieta y los medicamentos a las producidas por el consumo. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 123–135. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382013000200002#:~:text=Factores%20que%20afectan%20la%20microbiota,las%20producidas%20por%20el%20consumo

Sánchez-Romero, M. I., García-Lechuz Moya, J. M., González López, J. J., & Orta Mira, N. (2019). Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 37, Issue 2, pp. 127–134). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.12.002>

Thermo Fisher Scientific. (2006). *NanoDrop Applications*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop/applications.html>

Valeix, N., Costa, D., Basmacıyan, L., Valot, S., Vincent, A., Razakandrainibe, R., Robert-Gangneux, F., Nourrisson, C., Pereira, B., Fréalle, E., Poirier, P., Favennec, L., & Dalle, F. (2020). Multicenter comparative study of six cryptosporidium parvum dna extraction protocols including mechanical pretreatment from stool samples. *Microorganisms*, 8(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091450>

Zymo Research. (2024). *Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit*.

ANEXOS

Anexo 1. Muestras de heces fecales tomadas en el proyecto GUAGUA.



Anexo 2. kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (Zymo Research) usado para el procesamiento de muestras.



Anexo 3. Autorización para el ingreso y uso de laboratorio del Instituto de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
INSTITUTO DE BIOMEDICINA**

Oficio No.015 – 2024-INBIOMED-AG
Quito DM, 06 de mayo 2024

Sr. Dr.
William CEVALLOS PhD.
DIRECTOR
INBIOMED
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
QUITO-ECUADOR

Sr. Director,

Por medio del presente comunico a Usted que en colaboración con Docentes/Investigadores de las Facultad de Ciencias de la Salud de la ESPOCH estamos realizando un estudio sobre “Microbiota intestinal en niños con parasitosis intestinal”. En dicho contexto, las profesionales: Ing. Renata Alejandra Alvarado Barba con cédula de ciudadanía número 0604030718 y Dra. Cristina Gabriela Ríos Romero con cédula de ciudadanía número 0604088708, visitarán el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación en Biomedicina (INBIOMED) los días 22 y 23 de mayo del año en curso, con el objetivo de realizar prácticas con muestras de heces para extracción de ADN para estudios de metagenómica bajo la supervisión de la Ing. MSc. Yosselin Vicuña-INBIOMED y análisis coproparasitarios por método de concentración de Ritchie bajo la supervisión de Lcda. Sandra Vivero-INBIOMED. Cabe indicar que todos los reactivos son provistos por el personal de la ESPOCH.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines pertinentes.

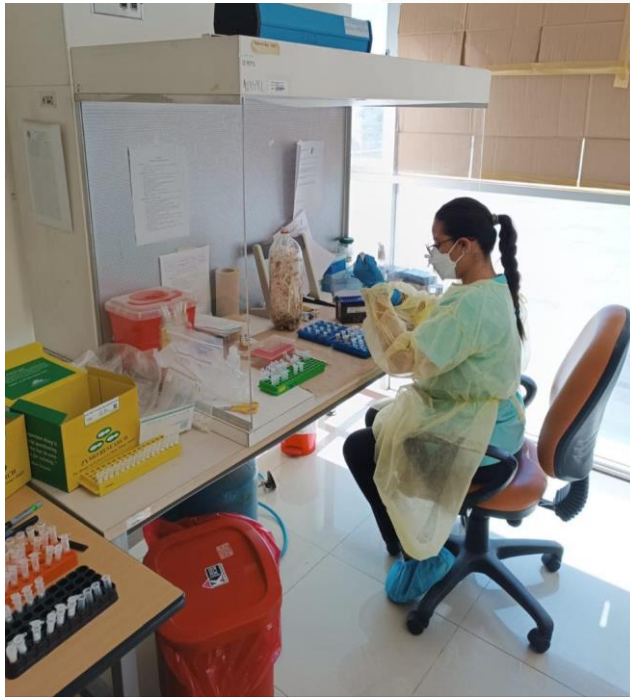
Cordialmente



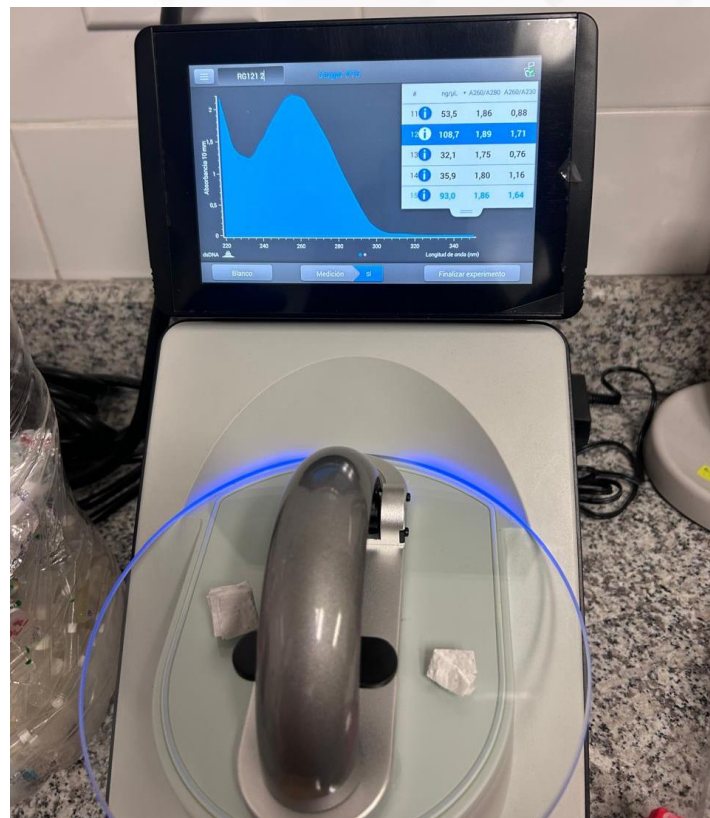
Prof. Ángel Guevara E. MSc. PhD
DOCENTE AGREGADO 3
CARRERA DE MEDICINA
INVESTIGADOR INSTITUTO DE BIOMEDICINA-UCE
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR (UCE)
ESPECIALISTA EN BIOLOGÍA MOLECULAR
MSP LIBRO 1 FOLIO 01 NÚMERO 2
QUITO-ECUADOR
agguevara @uce.edu.ec

cc: Archivo. Dra. Cristina Gabriela Ríos Romero, ESPOCH, Ing. Renata Alvarado, ESPOCH, Lcda. Sandra VIVERO, Coordinadora-INBIOMED-UCE. Ing. Yosselin VICUÑA, Investigadora Asistente-INBIOMED-UCE.

Anexo 4. Proceso de extracción de ADN de las muestras de heces fecales.



Anexo 5. Nanodrop, equipo de espectrofotetría de micro volumen usado en el estudio.



Anexo 6. Proceso de medición de concentraciones, pureza y calidad de las muestras de ADN extraídas.





Anexo 7. Muestra de ADN etiquetadas y codificadas para ser almacenadas.





Anexo 8. Base de datos en JAMOVÍ de los resultados obtenidas del análisis de espectrofotometría por micro volumen a través del Nanodrop.

	Concentr...	Relacion ...	Relacion ...	Volumenes	E
1	16.30	1.42	0.35	50	b
2	21.20	1.44	0.26	50	b
3	20.80	1.81	0.65	50	b
4	56.10	1.90	2.04	50	b
5	20.80	1.67	0.43	50	b
6	34.20	1.79	1.01	50	b
7	34.30	1.64	0.54	50	b
8	31.60	1.34	0.16	50	b
9	17.20	1.22	0.34	50	b
10	22.10	1.74	1.14	50	b
11	23.20	1.84	0.39	50	b
12	52.40	1.66	0.42	50	b
13	23.80	1.87	1.43	50	b
14	61.60	1.91	1.90	50	b
15	31.80	1.83	0.84	50	b
16	12.10	1.83	0.57	50	b
17	26.60	1.39	0.29	50	b
18	13.50	1.49	0.19	50	b
19	39.70	1.72	0.59	50	b
20	26.60	1.91	0.65	50	b
21	23.80	1.77	1.27	50	b
22	131.30	1.89	1.45	50	b
23	27.80	1.42	0.46	50	b
24	13.90	1.76	1.15	50	b
25	20.80	1.84	0.37	50	b
26	71.20	1.90	0.55	50	b
27	27.90	1.56	0.52	50	b
28	27.30	1.83	0.77	50	b
107	44.20	1.72	0.53	50	b
108	124.60	1.83	0.91	50	b
109	144.00	1.87	1.34	50	b
110	54.70	1.87	1.19	50	b
111	46.60	1.81	1.37	50	b
112	143.60	1.88	1.99	50	b
113	32.10	1.73	1.04	50	b
114	146.80	1.92	1.68	50	b
115	35.90	1.80	1.16	50	b
116	65.10	1.89	1.16	50	b
117	121.90	1.88	0.85	50	b
118	212.50	1.90	1.78	50	b
119	25.90	1.97	0.22	50	b
120	60.10	1.91	1.02	50	b
121	93.00	1.86	1.64	50	b
122	18.10	1.85	0.34	50	b
123	59.90	1.92	1.43	50	b
124	40.80	1.83	0.66	50	b
125	21.10	1.90	0.52	50	b
126	42.90	1.83	0.96	50	b
127	223.70	1.90	2.02	50	b
128	92.90	1.86	1.20	50	b
129	57.50	1.88	1.47	50	b
130	40.50	1.88	1.43	50	b
131	36.60	1.86	0.70	30	a
132	69.00	1.90	1.83	50	b
133	36.80	1.73	0.46	30	a
134	70.60	1.89	1.61	30	a

	Concentr...	Relacion ...	Relacion ...	Volumenes	E
256	148.90	1.90	1.92	30	a
257	27.20	1.97	0.22	30	a
258	34.10	2.04	0.71	30	a
259	27.50	1.82	0.54	30	a
260	64.20	1.93	1.75	30	a
261	36.30	1.79	0.79	30	a
262	21.70	1.78	0.48	30	a
263	35.30	1.85	0.22	30	a
264	19.20	1.75	0.38	30	a
265	78.70	1.82	1.20	30	a
266	72.30	1.89	1.33	30	a
267	97.70	1.90	1.18	30	a
268	14.80	1.89	0.34	30	a
269	33.70	1.84	0.82	30	a
270	33.66	1.84	0.82	30	a
271	75.77	1.89	1.43	30	a
272	98.57	1.90	1.60	30	a
273	55.02	1.86	1.08	30	a
274	33.65	1.83	0.92	30	a
275	63.21	1.89	1.60	30	a
276	106.63	1.85	1.59	30	a
277	73.06	1.97	1.12	30	a
278	21.24	1.83	0.46	30	a
279	30.01	1.81	0.43	30	a
280	47.71	1.90	0.65	30	a
281	73.02	1.83	1.10	30	a
282	143.07	1.89	1.68	30	a
283	44.60	1.91	0.28	30	a

	Concentr...	Relacion ...	Relacion ...	Volumenes	E
316	168.50	1.89	1.60	30	a
317	27.60	1.96	0.61	30	a
318	18.30	1.97	0.41	30	a
319	31.50	1.72	0.38	30	a
320	28.10	1.73	0.30	30	a
321	29.80	1.78	0.38	30	a
322	59.60	1.82	1.02	30	a
323	33.50	1.82	0.71	30	a
324	33.40	1.87	0.60	30	a
325	31.90	1.95	0.45	30	a
326	167.30	1.90	1.74	30	a
327	119.70	1.88	1.73	30	a
328	113.40	1.85	1.21	30	a
329	176.60	1.87	1.67	30	a
330	53.00	1.79	0.63	30	a
331	24.10	1.58	0.42	30	a
332	211.10	1.91	1.62	30	a
333	151.50	1.89	0.68	30	a
334	93.90	1.90	1.19	30	a
335	34.40	1.92	0.52	30	a
336	29.60	1.75	0.43	30	a
337	26.20	1.94	0.47	30	a
338	19.40	1.98	0.53	30	a
339	19.40	1.93	0.33	30	a
340	52.95	1.69	0.12	30	a
341	44.10	1.83	0.72	30	a
342	44.60	1.90	0.73	30	a
343	100.90	1.87	1.51	30	a