

Estandarización de un método de extracción de ADN para sexado en aves

Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario

Sara Castañeda Cano

Asesor

Luigi Mateo Arango Vásquez

Médico Veterinario

Magíster en Ciencias Básicas y Biomédicas U de A

Corporación Universitaria Unilasallista

Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria

Caldas – Antioquía

2021

### **Agradecimientos**

Se agradece a la bióloga del Laboratorio Mascolab por la colecta de muestras, al Doctor Danny Chinchilla, director Científico de Mascolab y al Doctor Mateo Arango por su acompañamiento durante el desarrollo del método.

“Cada vez que perdemos una especie rompemos una cadena de la vida que ha evolucionado durante 3.500 millones de años”.

**Jeffrey McNeely**

## Tabla de contenido

Agradecimientos .....	2
Resumen .....	9
Introducción .....	10
Objetivos.....	11
Objetivo general .....	11
Objetivos específicos .....	11
Marco teórico .....	12
Materiales y Métodos.....	16
Lugar de estudio .....	16
Determinación de la muestra.....	16
Tipo de muestra .....	16
Muestreo .....	17
Preparación de la muestra .....	17
Método de extracción.....	18
Estandarización del método .....	19
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Gen <i>chd</i> .....	22
Electroforesis en geles de Agarosa .....	25
Resultados.....	26
Discusión .....	27

Conclusiones .....	28
Referencias.....	29

### Lista de imágenes

<b>Imagen 1.</b> El círculo ilustra el cañón o cálamo de las plumas .....	16
<b>Imagen 2.</b> Ilustración de la colecta de muestras. ....	18
<b>Imagen 3.</b> Identificación correcta de muestras.....	18

### Lista de figuras

- Figura 1.** Reacciones destinadas a comprobar la funcionalidad del método.....24
- Figura 2.** Ejemplares hembras y machos pertenecientes a las especies *Agapornis fischeri*,  
*Agapornis personatus* y *Agapornis roseicollis*. .....26

### Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Concentraciones y cantidad de reactivo empleado en la preparación de 250mL de Buffer lisis tejidos. ....	13
<b>Tabla 2.</b> Especies de aves utilizadas en la estandarización del método.....	17
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación del material genético extraído. ....	21
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones y volúmenes de los componentes del master mix. ....	23



## Resumen

Estandarizar un método de extracción de ADN que permita la inclusión de muestras de fácil acceso y que disminuya los niveles de estrés en diferentes especies de aves, una pluma en reemplazo de una muestra de sangre, sumado a la existencia de un buffer lisis que otorgue ADN de buena calidad y cantidad se ha convertido en una herramienta potencial para la determinación del sexo en aves. El buffer lisis tejidos, una combinación de agentes reductores (DTT), sales no contaminantes (NaCl), quelantes (EDTA), amortiguadores (Tris-HCL), detergentes (Tritón X 100), e inhibidores de proteasas (PMSF), es establecido como reactivo base en la extracción de ADN proveniente del cálamo de plumas en crecimiento de 3 especies de aves. Las altas temperaturas, las perlas de vidrio, las nanopartículas y los buffers de lavado optimizan el proceso. Para el análisis y amplificación del ADN extraído y en contribución al sexado en aves por métodos moleculares se emplea la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el gen CHD y la electroforesis en geles de agarosa.

**Palabras claves:** Buffer lisis, sexado molecular, aves, cañón de plumas, gen CHD.

## Introducción

En la actualidad, han sido descritos diversos métodos de extracción que permiten la obtención de material genético en muestras de uso cotidiano con características deseadas, pero con limitaciones asociadas al tipo de muestra. Obtener ADN de una pluma puede representar un reto al momento del proceso de extracción en comparación con una muestra de sangre, su compleja estructura y abundante queratina precisan en la necesidad de establecer un método que permita obtener ADN de regiones como el cálamo de las plumas.

El buffer lisis tejidos se ha establecido como una alternativa que favorece el sexado molecular en aves por medio de toma de muestras que no representan un riesgo para la salud del animal, pero con un impacto positivo en la conservación de diferentes especies de aves.

Un cálamo grueso y proveniente de plumas en crecimiento en presencia de un buffer con capacidad de lisar tejidos y en exposición a altas temperaturas (95°C), deriva en la disponibilidad de ADN que requiere terminar de ser liberado a través del uso de perlas de vidrio y fuertes movimientos que generen la disrupción total del tejido. Un segundo buffer lisis, el Buffer lisis ADN es empleado para asegurar concentraciones óptimas de material genético y una vez lisado, ser limpiado por etanol puro. El anclaje es llevado a cabo por nanopartículas, que se encargan de capturarlo y mantenerlo unido al medio magnético durante las etapas de lavado.

El presente trabajo describe un método de extracción de ADN probado en el cálamo de las plumas de tres especies de aves y resalta su utilidad para el procesamiento de cualquier otra muestra de tejido.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estandarizar un método de extracción de material genético que otorgue ADN con características deseadas para el sexado molecular en aves.

### **Objetivos específicos**

Describir la funcionalidad de los diferentes componentes del buffer lisis tejidos.

Indicar los parámetros para seleccionar muestras adecuadas para el proceso de extracción.

Validar por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el gen CHD y geles de agarosa la utilidad del método de extracción.

### Marco teórico

En los procesos de extracción de ADN los parámetros esenciales descritos son la pureza, cantidad total de material genético extraído e integridad (Ríos-Sánchez, E., et al., 2016), juntos hacen que un método sea reproducible y de elección. Para lograrlo es necesario combinar una serie de agentes que creen el medio adecuado para su obtención y que a su vez evite la degradación.

El DTT o Ditiotreitól, es un agente reductor o desprotector de ADN con capacidad de generar roturas a nivel de los puentes de hidrógeno (Laboratoriumdiscounter, 2021), desorganizando dos a tres puentes de hidrógeno genera pérdida de la estabilidad y favorece la desnaturalización del ADN (Echeverri, N., et al., 2010).

El Cloruro de sodio (NaCl), es una sal común no contaminante que permite obtener ADN de buena calidad y cantidad (Lopera-Barrero, N., et al., 2008). Las altas concentraciones de NaCl se emplean para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afecten la pureza, las sales aumentan el poder iónico de la solución y ocasionan la precipitación del ADN (Mosquera-Velasco, R., 2005).

El EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético), es un agente quelante de iones metálicos como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  que se emplea para proteger el ADN de las enzimas nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad (Mosquera-Velasco, R.,).

El Tris – HCL es un amortiguador capaz de mantener el pH estable en una solución evitando la degradación del ADN en las células (Alejos-Velásquez, L., et al., s.f).

El Triton X -100 es un detergente no iónico usado para desnaturalizar membranas de células (Falcon, L., & Valera, A., s.f) y el PMSF (Fenilmetilsulfonilo fluoruro) un inhibidor de proteasas encargado de preservar proteínas celulares (Molina V, D., 2011).

El Buffer lisis tejidos preparado en el Laboratorio Mascolab, integra cada una de las características anteriores con la finalidad de establecer una solución capaz de aportar ADN íntegro y puro.

**Tabla 1.** Concentraciones y cantidad de reactivo empleado en la preparación de 250mL de Buffer lisis tejidos.

<b>Preparación Buffer lisis para obtener ADN de tejidos (250 mL)</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	150 mM	2,19 gr
PMSF	1 mM	1 mL
Triton X-100	1%	1 ul
Tris-HCL	50 mM	1,51 gr
DTT	200 mM	7,71 gr
EDTA	1 mM	0,5 mL

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction), permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

En la PCR se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos que flanquean la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos (dNTPs); cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) u otro cofactor necesario para que trabaje la polimerasa y una solución amortiguadora que mantenga el pH apropiado para que se lleve a cabo la síntesis.

Esta mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR). Tres etapas: 1) Desnaturalización inicial, 2) Anillamiento (ciclos sucesivos de desnaturalización, alineamiento y extensión del ADN) y 3) Extensión final del ADN, se repiten sucesivamente y en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes, dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado (Serrato Diaz, A., et al., 2014).

La prueba de sexaje molecular se basa en el análisis del gen cromosoma-helicase-región de unión al DNA (CHD), el cual hasta el momento ha sido uno de los pocos genes ligados tanto al cromosoma Z como al W. Este gen se encuentra muy conservado entre los diferentes órdenes evolutivos tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos y se ha demostrado que puede ser usado para la identificación del sexo en aves, con unas pocas excepciones como las *ratites* (Matta Camacho, N., et al., 2008).

En las aves, los genes ligados a los cromosomas sexuales son ZW. Los machos son homogaméticos (ZZ) y las hembras son heterogaméticas (ZW). Los productos de amplificación del fragmento del gen CHD representado por una banda única por electroforesis representan un

macho, ya que este es homogamético (ZZ) y los dos productos de amplificación provenientes de cada uno de estos cromosomas presentarán igual peso molecular; mientras que en las hembras se obtienen dos bandas de distinto tamaño correspondientes a los productos de las amplificaciones de los genes CHD-Z y CHD-W (Matta Camacho, N., et al., 2008).

## Materiales y Métodos

### Lugar de estudio

El proceso de recolección de muestras tuvo lugar en zona rural de Santa Elena, Antioquía, una finca con 16 ejemplares del género *Agapornis*. El procesamiento y análisis de las muestras y la estandarización del método se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Mascolab SAS Laboratorio de genética animal, sede Medellín.

### Determinación de la muestra

Las plumas ideales para extraer ADN son las plumas en crecimiento, estas presentan un cañón más oscuro, grueso y son de menor longitud, se encuentran en la zona ventral (a nivel de la cloaca) y en la zona del obispillo (parte superior a la cola).

### Tipo de muestra

Tres plumas en crecimiento con cañón presente y preferiblemente irrigado.

**Imagen 1.** El círculo ilustra el cañón o cálamo de las plumas





## Muestreo

La colecta de muestras es realizada por la Bióloga del Laboratorio Mascolab. Se incluyeron 16 ejemplares de 3 especies diferentes y se colectaron 3 plumas por cada ave.

**Tabla 2.** Especies de aves utilizadas en la estandarización del método.

<b>Especie</b>	<b>Animales sexados</b>
<i>Agapornis fischeri</i>	5
<i>Agapornis personatus</i>	5
<i>Agapornis roseicollis</i>	6
<b>Total</b>	<b>16</b>

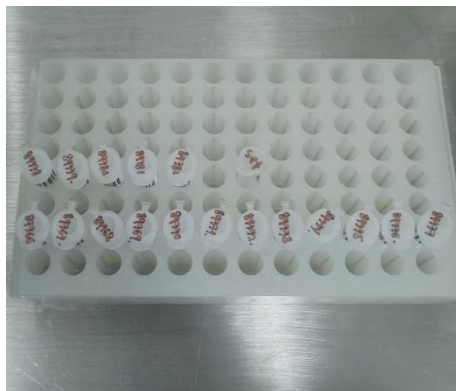
## Preparación de la muestra

Se asignaron códigos de identificación a cada una de las muestras y a sus respectivos viales y se realizaron cortes de aproximadamente 0.5 – 1 cm sobre el cañón de las plumas utilizando cuchillas diferentes por ave.

**Imagen 2.** Ilustración de la colecta de muestras.



**Imagen 3.** Identificación correcta de muestras.



### **Método de extracción**

Se estableció el Buffer lisis tejidos como reactivo principal en el proceso de extracción de ADN con base a su capacidad para generar rotura en puentes de hidrógeno y facilitar la obtención de concentraciones adecuadas de ADN.

***Estandarización del método***

En un vial de 2mL previamente identificado, adicionar 0.5 – 1 cm de cañón de la pluma a analizar, seguido de 300ul de buffer lisis tejidos. Colocar el vial en el bloque térmico (Thermo Scientific™) durante 10 minutos a 95° C (o durante toda la noche a 65° C).

Una vez transcurridos los 10 minutos agregar 3 perlas de vidrio de 3mm (Merck Millipore) y llevar los viales al disruptor/homogenizador de tejidos (TissueLyser LT - QIAGEN) y programarlo a máxima velocidad (45 oscilaciones / segundo) durante 5 minutos, adicionar 300ul de buffer lisis ADN (Mascolab) y colocarlo nuevamente en el disruptor/ homogenizador de tejidos empleando las mismas condiciones.

Sacar el sobrenadante en un nuevo vial de 1.5 mL, agregar 500ul de etanol al 99% (Merck), mezclar por inversión y adicionar 50ul de Nanopartículas al 8.86 mg/mL (Mascolab). Colocar el vial en el mezclador (SCIFINETECH) durante 4 minutos e introducir el vial en el rack magnético (Thermo Scientific™) y esperar 3 minutos permitiendo la unión del ADN a las nanopartículas y posterior anclaje al rack magnético.

Empleando puntas con filtro de 100ul - 1000ul (Sorenson™ Bioscience Inc) y una micropipeta de 100ul - 1000ul (Nichiryo Nichipet Premium) extraer la totalidad del fluido presente en cada vial en dirección contraria a la línea visible formada entre el ADN y las nanopartículas, evitando tocar las nanopartículas.

Sin sacar el vial del rack magnético adicionar 600ul de Buffer de lavado 4 (Mascolab), colocar en el mezclador por 2 minutos y luego en el rack magnético por 1 minuto y proceder a sacar el fluido presente en el vial.

Adicionar 600ul de Buffer de lavado 5 (Mascolab), colocar en el mezclador por 2 minutos y luego en el rack magnético por 1 minuto y proceder a sacar el fluido presente en el vial.

Adicionar 600ul de Buffer de lavado 6 (Mascolab), colocar en el mezclador por 2 minutos y luego en el rack magnético por 1 minuto y proceder a sacar el fluido presente en el vial.

Adicionar 700ul de Buffer de lavado 7 (Agua destilada y desionizada, idealmente tipo I), voltear el rack para un mejor lavado manteniendo los viales sujetos al rack magnético y dejar en reposo durante 2 minutos (sin sacar el vial del rack).

Extraer el fluido presente en el vial y eluir con 50ul de Buffer 8 (Buffer TE), llevar al bloque térmico durante 10 minutos a 65° C, centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos, colocar el vial en el rack magnético durante 1 minuto, pasar el ADN a un vial previamente identificado y proceder a cuantificar (Espectrofotómetro -Thermo Scientific™).

Se emplean dos cubetas nuevas, una destinada para la calibración inicial y otra para la cuantificación de las muestras, el valor del blanco fue establecido en 50ul y se empleó buffer 8 como blanco. Para la cuantificación de las muestras se realizó una dilución tomando 10ul de muestra en 40ul de Buffer 8 y multiplicando el valor obtenido por 5. Los valores son registrados siguiendo el orden de los códigos (Tabla 3.) y las muestras con fines de amplificación deben otorgar concentraciones iguales o mayores a 50 (ng/ul).

**Tabla 3.** Cuantificación del material genético extraído.

N.º	Código	Especie	Concentración material genético (ng/ul)	A260/280	A260/230
1	94560	<i>Agapornis fischeri</i>	85,4	1,65	_____
2	94561	<i>Agapornis fischeri</i>	62,1	1,63	_____
3	94562	<i>Agapornis fischeri</i>	78,3	1,62	_____
4	94563	<i>Agapornis fischeri</i>	84,9	1,61	_____
5	94564	<i>Agapornis fischeri</i>	76,6	1,61	_____
6	94565	<i>Agapornis personatus</i>	80,7	1,63	_____
7	94566	<i>Agapornis personatus</i>	75,5	1,61	_____
8	94567	<i>Agapornis personatus</i>	78,0	1,62	_____
9	94568	<i>Agapornis personatus</i>	73,6	1,59	_____
10	94569	<i>Agapornis personatus</i>	84,4	1,60	_____
11	94570	<i>Agapornis roseicollis</i>	77,4	1,62	_____
12	94571	<i>Agapornis roseicollis</i>	70,9	1,61	_____
13	94572	<i>Agapornis roseicollis</i>	69,3	1,56	_____
14	94573	<i>Agapornis roseicollis</i>	57,1	1,59	_____
15	94574	<i>Agapornis roseicollis</i>	74,5	1,61	_____
16	94575	<i>Agapornis roseicollis</i>	64,0	1,63	_____

### **PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y Gen *chd***

Se calculan inicialmente 4 reacciones para comprobar la funcionalidad del master mix y las condiciones empleadas en la PCR, destinadas a dos muestras previamente extraídas en sangre (*Agapornis*), un control positivo y un control negativo (Figura1.), por medio del programa: Cálculos para preparación de master mix PCR punto final para sexado en aves (Mascolab).

Los componentes utilizados fueron 11ul de Buffer de la Taq 10X (GDSBio), 6.6ul de DNTPs (GDSBio), 4.4ul de Primers (Macrogen), 51.59ul de Agua dd DEPC, 8.8ul de BSA como potenciador (Bovine Serum Albumin/ Sigma- Aldrich) y 3.96ul de MgCl<sub>2</sub> 25mM. El volumen de la Taq Polimerasa fue de 1.65ul y es calculado a través del programa. Se sirven en los viales 25ul correspondientes a 20ul de master mix y 5ul de la muestra extraída, 5ul para el control positivo y para el control negativo se emplean 5ul de agua dd DEPC. La Tabla 4 representa los volúmenes y concentraciones empleadas en el proceso de amplificación.

La síntesis del gen *chd* se realiza de acuerdo con el modelo propuesto por Griffiths *et al.* (1998), primers P2 (5'- TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') y P8 (5'- CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') (Macrogen).

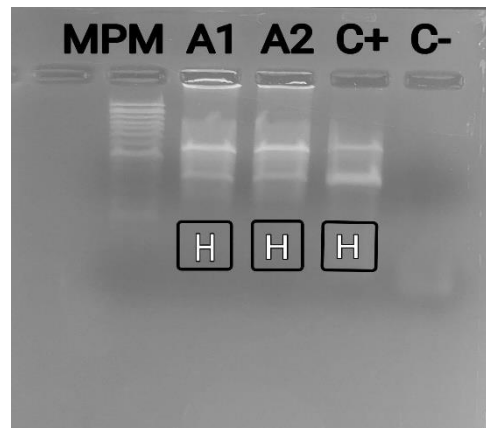
**Tabla 4.** Concentraciones y volúmenes de los componentes del master mix.

Concentración final	Volumen final de la Reacción (25uL)	4.4		
Buffer Taq (1x)	2,5	11	10	% Adicional
DNTPs (0,6mM) (Sin dUTP)	1,5	6.6000000000000000	4	Digite el número de reacciones a preparar
Taq pol (1,875U)	0,375	0	4.4	Valor Completo
DNA (<50ng/uL) ó <150ng	5	0	5	DNA
Primers (0.4uM)	1	4.4	0.375	Taq pol
Agua dd DEPC	11,725	51.59	19.624999999999996	Master Mix
Potenciador	2	8.8		
MgCl2	0,9	3.9600000000000000		
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>86.35</b>	<b>24.999999999999996</b>	<b>Volumen Final de Reacción</b>

Concentración final	Volumen final de la Reacción (25uL)	4.4		
Master Mix	19,62496	86.34982400000001	10	% Adicional
Taq-pol	0,375	1.6500000000000001	4	Digite el número de reacciones a preparar
DNA	5	0	4.4	Valor Completo
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>87.99982400000002</b>		Volumen (uL) Solución
			19.99996	Master Mix Completo
			5	DNA
			24.99996	Volumen Final de Reacción

Se programa el termociclador (Rotor- Gene Q / QIAGEN) partiendo de una desnaturalización inicial a 94° C durante 3 min; 37 ciclos sucesivos de desnaturalización a 94°C durante 30s, alineamiento con 7 ciclos iniciales con descenso en la temperatura (Inicia en 57° C y termina en 51° C durante 30s), seguidos de 30 ciclos a 50°C durante 30s, extensión o elongación a 72°C durante 60s, y una extensión final a 72°C durante 10min.

**Figura 1.** Visualización de las cuatro primeras reacciones destinadas a comprobar la funcionalidad del método. Se emplea como muestra ideal sangre de dos *Agapornis* representados como A1 y A2, un control positivo de sexo conocido y un control negativo. Ambos *Agapornis* y el control positivo representan muestras provenientes de hembras.



Se obtienen los resultados esperados y se procede a calcular 20 reacciones correspondientes a los ejemplares a sexar, controles positivos y negativos.



### **Electroforesis en geles de Agarosa**

Los productos de PCR amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2,5%. Utilizando los primers P2/P8 se determinó la presencia de dos fragmentos (dos bandas) de 300 a 400 pares de bases en ejemplares hembras y un fragmento (una sola banda) de 300 a 400 pares de bases en ejemplares machos (Liza R, J., et al., 2008). Se empleó TAE 1X como medio conductor en cámara horizontal de electroforesis (Thermo Scientific™) y se preparó inicialmente el marcador de peso molecular de 50pb (ExcelBand™) tomando 4ul de Buffer de carga+Syber Green 1000X DMSO (Invitrogen™), 5ul de TAE 1X y 3ul del marcador de peso, para las muestras, el control positivo y negativo, se empleó 4ul de Buffer de carga+Syber Green 1000X y 8ul de muestra amplificada.

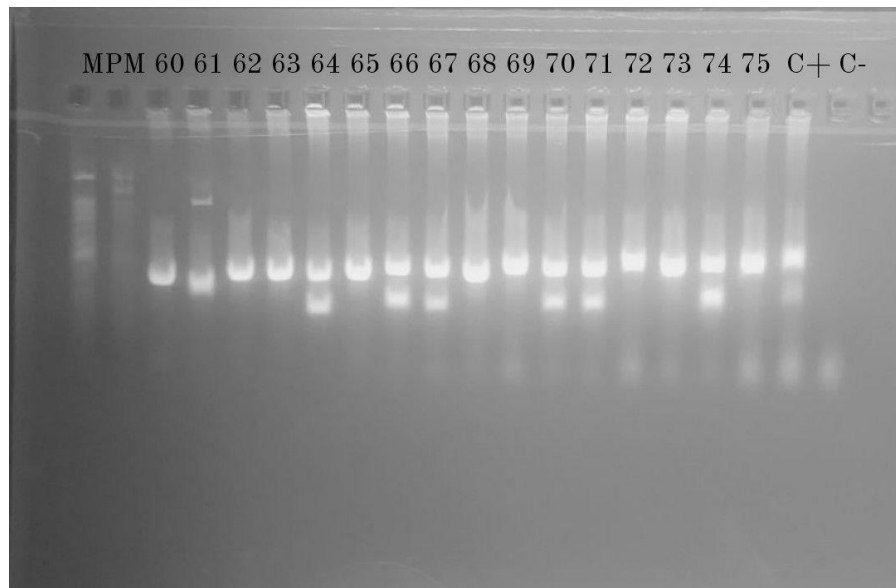
El voltaje y el tiempo fueron definidos en 60V durante una hora y se utilizó el transiluminador (Yooning) para visualizar las bandas presentes.

## Resultados

Se emiten 16 reportes con base al sexado en aves por métodos moleculares y al análisis del gen presente en los cromosomas CHD-Z y CHD-W. Las hembras presentan copias de diferentes tamaños (Pares de Bases) en ambos cromosomas y los machos presentan copias repetidas de igual tamaño (Pares de Bases) en ambos cromosomas (Mascolab, 2021).

La visualización de dos bandas en el gel de agarosa indica una hembra mientras una banda presente indica un macho. Los números en la parte superior representan los últimos dígitos de los códigos asignados a cada ave. A continuación, se ilustran los resultados obtenidos por métodos moleculares.

**Figura 2.** Ejemplares hembras y machos pertenecientes a las especies *Agapornis fischeri*, *Agapornis personatus* y *Agapornis roseicollis*.



## Discusión

Los volúmenes calculados para la preparación de los diferentes reactivos como el buffer lisis tejidos, el buffer lisis ADN, master mix y gel de agarosa son suficientes para garantizar que la totalidad de las muestras son procesadas empleando las mismas condiciones.

Las muestras son cuantificadas y otorgan valores mayores a 50ng/ul, siendo posible reportar el 100% de los ejemplares.

En la Figura 2 se evidencia un proceso de extracción y amplificación adecuados al permitir sexar la totalidad de las muestras (16/16), ejemplares hembras y machos pertenecientes a las especies *Agapornis fischeri*, *Agapornis personatus* y *Agapornis roseicollis* son visualizados gracias a la presencia de un cálamo irrigado.

El método de extracción debe optimizarse buscando que los valores de pureza sean superiores a 1.8 en todos los casos. El 81.25% de las muestras presentan purezas aceptables y el 18.75% de las muestras se encuentran contaminadas.

Las proporciones entre hembras y machos por especie para los ejemplares *Agapornis fischeri* fueron 4 hembras y 1 macho, para los ejemplares *Agapornis personatus* 3 hembras y 2 machos y para los ejemplares *Agapornis roseicollis* 3 hembras y 3 machos.

La resolución y definición de las bandas es mejorada al utilizar geles de poliacrilamida y no de agarosa, debido a que la poliacrilamida permite separar mejor las bandas de W y Z (Matta Camacho, N., et al., 2008).

## Conclusiones

Se logra estandarizar un método de extracción de ADN a partir del cálamo de plumas en crecimiento al obtener valores de concentración y pureza deseados en el 81.25% de las muestras. La colecta correcta de muestras garantiza el éxito de la amplificación y el establecimiento de parejas de ejemplares con fines de conservación.

El buffer lisis tejidos unido a nanopartículas pone a disposición un método útil, rápido y económico que permite la inclusión de muestras provenientes de diferentes tejidos como placenta, escroto, tejido corneal y cálamo de plumas.

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) como herramienta molecular, el gen CHD y la electroforesis en geles de agarosa permiten emitir reportes rápidos e inequívocos que contribuyen a disminuir el uso de técnicas invasivas en diferentes especies de aves.

El gen CHD encontrado en aves, por ser altamente conservado y estar ubicado en cromosomas sexuales es un blanco casi universal para la identificación del sexo en aves (Ellegren, 1996). Las especies *Agapornis fischeri*, *Agapornis personatus* y *Agapornis roseicollis* son sexadas a través de este gen.

### Referencias

- Alejos–Velásquez, L., Aragón-Martínez, M., & Cornejo–Romero, A. (s.f). Extracción y purificación de ADN.
- Echeverri, N., Ortiz, B., & Caminos., J. (2010). Análisis proteómico de cultivos primarios de tiroides. *Revista Colombiana de Química*, 39 (3), 343-358.
- Ellegren, H. (1996). First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc Biol Sci.* 263, 1635-1641.
- Falcon, L., & Valera, A. (2007). Las herramientas moleculares: Extracción de ácidos nucleicos. Quinta parte, Capítulo 16, 499-502.
- Griffiths, R., Duple, MC., & Orr, K. (1998). A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7, 1071-1075.
- Laboriodiscounter. (2021). 1,4- Ditiotretitol (DTT). Recuperado de <https://www.laboriodiscounter.nl/es/quimicos/a-z/d/14-ditiotretitol-dtt/>
- Liza R, J., Maturrano H, L., & Rosadio A, R. (2008). Determinación del sexo por ADN en cinco especies de guacamayos. *Rev Inv Vet Perú*; 19 (1), 31-36.
- Lopera-Barrero, Nelson M., Povh, Jayme A., Ribeiro, Ricardo P., Gomes, Patricia C., Jacometo, Carolina B., & Silva-Lopes, Tais da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria*, 35 (1), 77-86. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000100008>
- Matta Camacho, N., Ramírez Martín, N., Zúñiga Díaz, B., & Vera, V. (2008). Determinación de sexo en aves mediante herramientas moleculares. *Acta biol. Colomb.*, 14 (1), 29.

- Molina-V, Diana., Blanco-Labra, Alejandro., & Zamora-E, Humberto. (2011). Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*. *Revista Colombiana de Entomología*, 37 (2), 183-191. Retrieved October 18, 2021, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-04882011000200003&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200003&lng=en&tlng=es).
- Mosquera-Velasco, Reinaldo. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3 (1).
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4), 56-65. doi: 10.15174/au.2016.1078
- Serrato Diaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., & Sierra Palacios, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (pp. 53-73). Primera edición.