Revista Ciencia Veterinaria y Biotecnología
Rev Cien Vet Bio 2026; 3 (1): 124-141

Available online at
https//revcienvetbio.buap.mx

Reevaluación del uso de proteinasa K durante la extracción de ADN de *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) de ambientes hipersalinos en Puebla, México.

Roberto Alcázar-Reyes[1,3], Jarehtsy Ortiz-García[1,3], Kevin Sebastian Rivera-Carrillo[3], Néstor Méndez-Palacios[1,2], Netzi Naidi Méndez-Palacios[2], Fátima Matamoros-González[2], Arnulfo Villanueva-Castillo[1,6], Ruby Sandy Moreno-Mejía[1], María Guadalupe Tenorio-Arvide[4,5], Juan Ricardo Cruz-Aviña[1,3,5]*.

[1]Licenciatura en Fauna Silvestre, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, Puebla, México.
[2]Laboratorio de Genética y Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, Puebla, México.
[3]Laboratorio de Medicina de la Conservación de Fauna Nativa "Gustavo Casas Andreu", Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Tecamachalco, Puebla, México.
[4]Centro de Investigación en Ciencias Agrícolas (CICA-ICUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio 6301, Jardines de San Manuel, CP 72570 Puebla, Puebla, México.
[5]Cuerpo Académico: Geoquímica, Geomática y Prospectiva Ambiental (BUAP CA 384).
[6]Cuerpo Académico de Enfermedades Emergentes, Bioinformática y Dinámica Molecular BUAP-CA-274, Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología.
*Autor de correspondencia: juan.cruzavina@correo.buap.mx
Recibido 17-07-2026; Formulario revisado 25-09-2026; Aceptado 12-10-2026

RESUMEN

La extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN) constituye una etapa crítica en estudios de genética, biología molecular y conservación; sin embargo, su eficiencia puede verse limitada por las características biológicas y ambientales de los organismos estudiados. *Artemia franciscana*, un crustáceo halófilo ampliamente utilizado en acuicultura y estudios ecológicos, puede representar un reto para los protocolos convencionales de extracción de ADN. En este estudio se evaluó el efecto de la incorporación de proteinasa K durante la extracción de ADN de *A. franciscana* procedente de una población natural de las salineras de Zapotitlán Salinas, Puebla, México; en comparación con un grupo control de origen comercial. Se compararon dos metodologías de extracción: un protocolo estándar que incorporó proteinasa K y un protocolo modificado por precipitación salina en ausencia de dicha enzima, con cuatro extracciones independientes por grupo. Las concentraciones obtenidas mediante el protocolo con proteinasa K fueron de 275.16 ± 38.15 ng/µL en las muestras silvestres y 144.85 ± 18.42 ng/µL en las comerciales, mientras que el protocolo sin proteinasa K presentó concentraciones de 27.84 ± 4.92 ng/µL y 6.25 ± 1.08 ng/µL, respectivamente. Aunque el protocolo con proteinasa K produjo concentraciones espectrofotométricas superiores, el análisis mediante electroforesis en gel de agarosa mostró una menor integridad aparente del ADN, caracterizada por patrones de fragmentación, mientras que el protocolo sin proteinasa K produjo bandas de mayor peso molecular y apariencia más definida. Estos resultados evidencian que una mayor concentración espectrofotométrica de ADN no necesariamente corresponde con una mayor integridad

molecular. Bajo las condiciones experimentales evaluadas, el protocolo modificado sin proteinasa K permitió obtener ADN en menor concentración, pero con mayor integridad aparente y capacidad de amplificación mediante PCR, lo que sugiere su utilidad para estudios moleculares de *A. franciscana* procedente de ambientes salinos naturales.

Palabras clave: *Artemia franciscana*; ambientes hipersalinos, extracción de ADN, rendimiento molecular.

ABSTRACT

Deoxyribonucleic acid (DNA) extraction is a critical step in genetic, molecular biology, and conservation studies; however, its efficiency may be limited by the biological and environmental characteristics of the organisms under study. *Artemia franciscana*, a halophilic crustacean widely used in aquaculture and ecological studies, may pose a challenge to conventional DNA extraction protocols. This study evaluated the effect of incorporating proteinase K during DNA extraction from *A. franciscana* collected from a natural population in the saltworks of Zapotitlán Salinas, Puebla, Mexico, compared with a control group of commercial origin. Two extraction methodologies were compared: a standard protocol incorporating proteinase K and a modified protocol based on salt precipitation without the use of this enzyme, with four independent extractions per group. Concentrations obtained using the proteinase K protocol were 275.16 ± 38.15 ng/µL in wild samples and 144.85 ± 18.42 ng/µL in commercial samples, whereas the protocol without proteinase K yielded concentrations of 27.84 ± 4.92 ng/µL and 6.25 ± 1.08 ng/µL, respectively. Although the proteinase K protocol produced higher spectrophotometric DNA concentrations, agarose gel electrophoresis revealed lower apparent DNA integrity, characterized by fragmentation patterns, whereas the protocol without proteinase K produced higher-molecular-weight bands with a more defined appearance. These results demonstrate that a higher spectrophotometric DNA concentration does not necessarily correspond to greater molecular integrity. Under the experimental conditions evaluated, the modified protocol without proteinase K yielded DNA at a lower concentration but with greater apparent integrity and PCR amplification capacity, suggesting its usefulness for molecular studies of *A. franciscana* from natural saline environments.

Key words: *Artemia franciscana*; hypersaline environments; DNA extraction protocols; molecular yield.

INTRODUCCIÓN

La obtención de ADN genómico de calidad constituye un paso fundamental para numerosos análisis de biología molecular, debido a que el rendimiento, la pureza y la integridad del material genético pueden condicionar la confiabilidad de procedimientos posteriores, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación y los análisis genéticos y filogenéticos. En consecuencia, la selección y optimización del método de extracción debe considerar no solo la cantidad de ADN recuperado, sino también la eliminación de proteínas, sales y otros compuestos capaces de interferir con las aplicaciones posteriores (Tan & Yiap, 2009; Schrader et al., 2012). Los métodos de extracción disponibles incluyen procedimientos basados en soluciones, precipitación y sistemas de purificación mediante columnas, cuya eficiencia puede variar de acuerdo con las características de la muestra biológica y de la matriz en la que se encuentra el organismo (Tan & Yiap, 2009).

Entre los componentes empleados habitualmente durante la extracción de ADN se encuentra la proteinasa K, una serina proteasa con amplia actividad sobre proteínas nativas y desnaturalizadas. Su capacidad proteolítica y su funcionamiento en condiciones compatibles con diversos procedimientos de lisis han favorecido su incorporación en protocolos destinados a la obtención de ADN genómico, particularmente en combinación con detergentes y etapas posteriores de purificación (Ebeling et al., 1974; Green & Sambrook, 2017). Sin embargo, la incorporación de un componente en un protocolo de extracción no garantiza que su presencia produzca el mismo resultado en todas las matrices biológicas. La composición química de la muestra, la concentración de sales, los residuos de reactivos utilizados durante la lisis y otros compuestos asociados con el material biológico pueden afectar tanto la recuperación del ADN como su pureza y desempeño en reacciones enzimáticas posteriores (Schrader et al., 2012).

Esta consideración resulta particularmente relevante en organismos adaptados a ambientes hipersalinos. *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) es un anostráceo halófilo ampliamente reconocido por su capacidad para sobrevivir bajo condiciones de elevada salinidad y variaciones osmóticas pronunciadas. Esta especie presenta mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares asociados con la regulación iónica y la respuesta al estrés osmótico, características que le permiten ocupar ambientes en los que la disponibilidad de agua y las concentraciones de sales representan importantes restricciones fisiológicas (Gajardo & Beardmore, 2012; Hand & Menze, 2015). Estudios transcriptómicos y genómicos han demostrado que la exposición a condiciones hipersalinas modifica la expresión de genes relacionados con transporte iónico, respuesta al estrés, reparación celular y homeostasis, confirmando la estrecha relación entre la biología de *A. franciscana* y las condiciones fisicoquímicas extremas de su hábitat (Evans et al., 2018; Hu et al., 2021). Estas características hacen de *Artemia* spp. un organismo de interés para estudios ecológicos, fisiológicos, evolutivos y moleculares.

La naturaleza hipersalina de los ambientes donde se desarrollan las poblaciones de *Artemia* spp. también representa un desafío metodológico para la obtención de ácidos nucleicos. La presencia de concentraciones elevadas de sales y otros componentes de la matriz puede dificultar las etapas de lisis, separación y purificación, además de introducir sustancias potencialmente inhibitorias para aplicaciones posteriores como la PCR. Se ha documentado que diferentes sales, detergentes y compuestos presentes en las muestras o incorporados durante la extracción pueden interferir con las reacciones de amplificación cuando permanecen en el extracto a concentraciones suficientes (Schrader et al., 2012). De manera consistente, estudios realizados con organismos provenientes de ambientes hipersalinos han señalado la necesidad de optimizar las estrategias de extracción para obtener ADN de calidad, debido a la presencia de componentes de la matriz que pueden dificultar su recuperación y purificación (Bhardwaj et al., 2019). Por ello, los protocolos desarrollados para tejidos biológicos convencionales no necesariamente proporcionan resultados equivalentes cuando se aplican a organismos adaptados a condiciones ambientales extremas.

En *Artemia* spp., los estudios moleculares han utilizado diferentes estrategias para la obtención de ADN genómico. Por ejemplo, poblaciones de *A. franciscana* procedentes de diferentes salinas han sido caracterizadas mediante marcadores moleculares utilizando protocolos que incluyen proteinasa K, detergentes y extracción orgánica, demostrando que es posible recuperar ADN adecuado para análisis de variación genética (p. ej., estudios poblacionales en salinas del sureste de India). Asimismo, en la obtención del genoma de *A. franciscana* se empleó una modificación de un protocolo CTAB para tejido de crustáceos, seguida de etapas de purificación con solventes orgánicos, lo que permitió obtener ADN destinado a secuenciación genómica (Hu et al., 2021). Estos antecedentes muestran que *Artemia* puede ser estudiada mediante herramientas moleculares, pero también evidencian que la obtención de ADN para análisis genómicos requiere procedimientos de extracción y purificación cuidadosamente adaptados al organismo y a las condiciones experimentales.

A pesar del creciente uso de herramientas moleculares para estudiar *Artemia* spp., existe información limitada sobre cómo la modificación de componentes específicos de los protocolos convencionales afecta simultáneamente el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN obtenido de ejemplares procedentes directamente de ambientes hipersalinos naturales. En particular, la contribución específica de la proteinasa K dentro de protocolos destinados a ejemplares de *A. franciscana* provenientes de ambientes hipersalinos mexicanos no ha sido evaluada experimentalmente de manera específica. Esta cuestión resulta relevante porque la proteinasa K se incorpora habitualmente como componente de los protocolos de extracción, pero su utilidad debe valorarse en función de la matriz biológica y de las condiciones particulares bajo las cuales se realiza la extracción.

Durante la implementación preliminar de un protocolo comercial de extracción de ADN en ejemplares de *A. franciscana*

recolectados en las salineras artesanales de Las Salinas Grandes, Zapotitlán Salinas, Puebla, México, se realizaron cinco extracciones independientes como evaluación exploratoria. En estas muestras se observó de manera recurrente un patrón de degradación del ADN, lo que motivó la revisión de los diferentes componentes del procedimiento y planteó la necesidad de evaluar experimentalmente la contribución de la proteinasa K bajo las condiciones específicas de extracción utilizadas. Estas observaciones preliminares no fueron consideradas como parte de la replicación experimental del estudio, sino como antecedentes que permitieron establecer la pregunta de investigación.

En este contexto, se planteó como hipótesis que la modificación del protocolo de extracción mediante la eliminación de la proteinasa K produciría diferencias en los parámetros de calidad del ADN obtenido de *A. franciscana* bajo las condiciones experimentales evaluadas. El objetivo del presente estudio fue comparar, bajo condiciones experimentales estandarizadas, un protocolo convencional de extracción de ADN con proteinasa K y una modificación del mismo protocolo sin esta enzima, utilizando ejemplares de *A. franciscana* procedentes de un ambiente hipersalino natural de Puebla, México. Se evaluaron el rendimiento, la pureza y la integridad del ADN obtenido, con el propósito de determinar si la inclusión de proteinasa K modifica estos parámetros bajo las condiciones de extracción evaluadas.

METODOLOGÍA

Sitio de estudio.

Las muestras de *Artemia franciscana* fueron recolectadas con ayuda de los lugareños en las salineras artesanales conocidas como: (Las Salinas Grandes), pozos El Chato, El Hondo, El Chillón, Las Ánimas y El Matón), ejido San Antonio Texcala, localizadas en el municipio de Zapotitlán Salinas, al sureste del estado de Puebla, México **(Figura 1)**.

Esta localidad se caracteriza por presentar un clima árido a semiárido, precipitación anual reducida y una elevada evaporación, condiciones que favorecen la formación de cuerpos de agua hipersalinos utilizados tradicionalmente para la producción artesanal de sal de mina (Arias Toledo et al., 2000).

La zona de salineras (Las Salinas Grandes) constituye uno de los principales sistemas salineros de la región y están conformadas por un conjunto de estanques alimentados por manantiales salinos de origen subterráneo (Cruz-Aviña et al., 2026).

La elevada concentración de sales disueltas genera un ambiente altamente

selectivo donde prosperan organismos halófilos especializados, entre ellos poblaciones naturales de *Artemia franciscana*, las cuales representan un recurso biológico de interés para estudios ecológicos, fisiológicos y moleculares (Van Stappen, 1996; Dey et al., 2023; Cruz-Aviña et al., 2026).

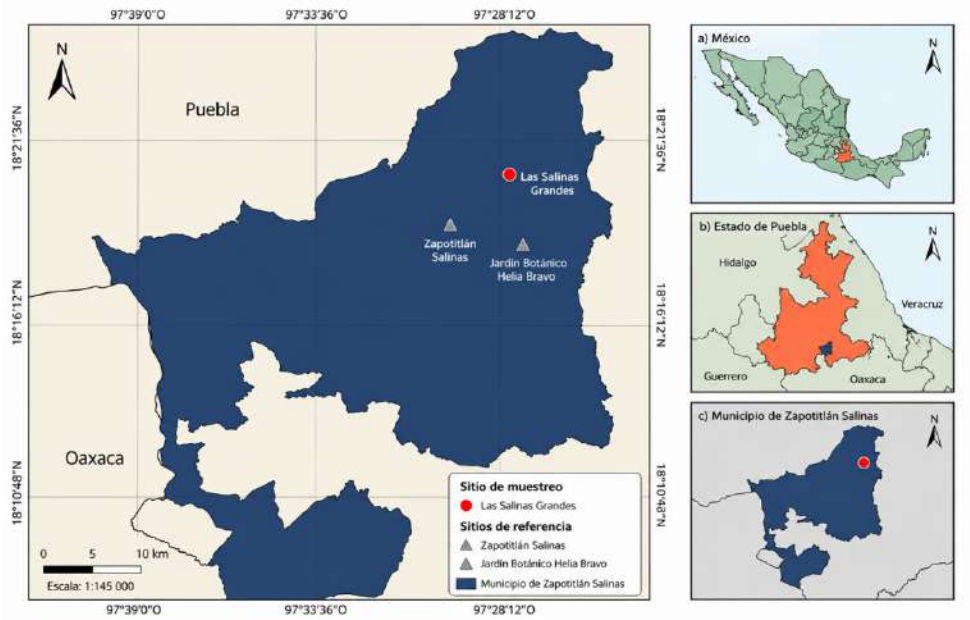


Figura 1. Localización del sitio de estudio en las salineras (Las Salinas Grandes), municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla, México. Propia, 2026.



Figura 2. Vista panorámica de las (Las Salinas Grandes) de Zapotitlán. Se observa el sistema de evaporación solar por gradiente en pozas de origen prehispánico, dispuestas en terrazas sobre el lecho del río Zapotitlán (Salado). La alta radiación solar y la topografía semiárida, caracterizada por bosques de cactos columnares visible al fondo, facilitan la precipitación secuencial de sales. Propia, 2025.

Obtención de muestras biológicas. -

Las muestras biológicas de *Artemia franciscana* fueron recolectadas por los lugareños durante el mes de mayo de 2025 en las salineras artesanales (Las Salinas Grandes), ubicadas en el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla, México, (**Figura 2**).

Se obtuvieron aproximadamente 100 g de biomasa en peso húmedo, integrada por organismos vivos de diferentes estadios de desarrollo (adultos, juveniles, nauplios) presentes en los estanques hipersalinos. La colecta se realizó mediante arrastres superficiales utilizando una red de plancton de 120 µm de apertura de malla y 30 cm de diámetro de boca, procurando minimizar el estrés y el daño mecánico de los organismos durante su manipulación (Figura 3 y 4).

Medición de parámetros fisicoquímicos del agua en las salineras.

En cada evento de muestreo, se midieron *in situ* las características fisicoquímicas del agua. La temperatura del agua (°C) se determinó utilizando un termómetro de mercurio Fisher Scientific® (Waltham, MA, EE. UU.; 0–50 °C). La salinidad (‰) se midió con un refractómetro ATAGO® Master-S/Mill Alpha (Tokio, Japón; 0–300 ‰). El pH del agua se midió mediante un medidor de pH portátil Hanna Instruments® (Woonsocket, RI, EE. UU.), calibrado previamente con soluciones amortiguadoras estándar (pH 4,01, 7,01 y 10,01). El oxígeno disuelto (OD, mg L^{-1}) se determinó utilizando un medidor de oxígeno portátil YSI® modelo 55 (Yellow Springs, OH, EE. UU.). Siempre que fue posible, también se midieron la conductividad eléctrica (µS cm^{-1}) y los sólidos disueltos totales (SDT, mg L^{-1}) utilizando un medidor multiparamétrico Hanna Instruments® (Woonsocket, RI, EE. UU.). Cuando la salinidad superaba el rango de medición del refractómetro (>300 ‰), las muestras de salmuera se diluían (1:1, v/v) con agua destilada. Posteriormente, se medía la salinidad con el mismo instrumento y se corregía el valor final según el factor de dilución. Los datos de precipitación (mm) se obtuvieron de los registros oficiales de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) de México, correspondientes a la estación meteorológica más cercana al área de estudio.

Después de la colecta, los ejemplares fueron mantenidos temporalmente bajo condiciones de refrigeración (≤4 °C) durante su traslado y hasta su ingreso al laboratorio. El procesamiento inicial se realizó dentro de las primeras 24 h posteriores a la colecta. Posteriormente, los ejemplares fueron preservados en etanol absoluto (99.9%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) y almacenados a −80 °C en un ultracongelador Revco® (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) hasta su procesamiento para los análisis moleculares. Por lo tanto, la refrigeración a ≤4 °C correspondió únicamente a la conservación temporal previa al procesamiento, mientras que la preservación en etanol absoluto y el almacenamiento a −80 °C correspondieron a la etapa de conservación posterior de las muestras.

Revista Ciencia Veterinaria y Biotecnología
Rev Cien Vet Bio 2026; 3 (1): 124-141

Available online at
https//revcienvetbio.buap.mx



Figura 4. Figura 3. Fotografía in situ de Artemia franciscana (Crustácea: Anostraca) en una pileta de concentración de sal. Se observan múltiples individuos adultos. Las artemias regulan la comunidad microbiana de las salinas al consumir microalgas y bacterias, lo que reduce la viscosidad de la salmuera e incrementa la pureza y calidad de la sal precipitada. Propia 2025.



Figura 3. Figura 4. Registro fotográfico in situ de Artemia franciscana (Crustácea: Anostraca) en una pileta de evaporación salina de (Las Salinas Grandes), Zapotitlán Salinas, Puebla. La imagen muestra organismos adultos durante el proceso reproductivo, evidenciando la cópula entre un macho y una hembra. Propia, 2025.



Figura 5. Artemia franciscana, material biológico de comparación (control positivo) obtenido a partir de quistes comerciales incubados en laboratorio. Propia, 2025.}

Como material biológico de comparación positiva se emplearon ejemplares de *Artemia franciscana* obtenidos a partir de quistes comerciales (Biomarine, INC.-Aquafauna®) incubados bajo condiciones controladas de laboratorio. La eclosión se realizó en recipientes con agua preparada mediante sal marina sintética (Instant Ocean®), manteniendo una salinidad de (30–35 g L^{-1}), la cual fue verificada y ajustada mediante un densímetro (Instant Ocean®). Durante todo el periodo de incubación se mantuvo una temperatura de (18–20 °C), un pH entre (7.0 y 7.5),

Aireación continua mediante difusores de aire para mantener los quistes en suspensión y garantizar una adecuada oxigenación, así como un fotoperiodo de (12 h luz: 12 h oscuridad), siguiendo las condiciones recomendadas para la eclosión y desarrollo inicial de la especie (Lavens & Sorgeloos, 2000; Van Stappen, 1996, Lavens & Sorgeloos, 1996, **Figura 5**).

Los nauplios y organismos juveniles obtenidos fueron sometidos al mismo procedimiento de extracción de ADN aplicado a las muestras silvestres, con el propósito de comparar el desempeño de ambos protocolos de extracción bajo condiciones experimentales equivalentes. La inclusión de este grupo control permitió descartar que la degradación del ADN observada estuviera asociada exclusivamente a factores ambientales presentes en las poblaciones naturales, facilitando la evaluación del efecto del

protocolo de extracción sobre organismos de diferente procedencia.

Con fines de corroboración morfológica, tanto los ejemplares silvestres como los organismos obtenidos a partir de quistes comerciales fueron examinados mediante microscopía óptica y documentados fotográficamente.

Posteriormente, los especímenes fueron trasladados al Laboratorio de Medicina de la Conservación de Especies Nativas "Gustavo Casas Andreu" y al Laboratorio de Genética y Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (FMVZ-BUAP). Los organismos preservados fueron conservados a (−80 °C) hasta el aislamiento de ADN genómico. Antes de la extracción, los tejidos fueron descongelados bajo condiciones controladas y mantenidos temporalmente a (4 °C) para su procesamiento.

Extracción de ADN genómico.

Se evaluaron dos protocolos para la extracción de ADN genómico a partir de muestras de *Artemia franciscana*. El primer procedimiento correspondió a un método comercial basado en columnas de sílica utilizando el kit FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. De manera resumida, se utilizaron 25 mg de biomasa húmeda, la cual fue sometida a una etapa inicial de lisis mediante la adición de 200 µL de buffer FATG1 y 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL). La digestión enzimática se realizó mediante incubación a 60 °C durante 2 h. Posteriormente, el ADN fue purificado mediante columnas de sílica mediante las etapas de unión, lavado y elución establecidas por el fabricante.

Extracción de ADN genómico mediante precipitación salina (Protocolo modificado sin Proteinasa K).

Como alternativa experimental para preservar la integridad estructural del ADN, se implementó un protocolo optimizado de precipitación salina (salting-out) sin digestión enzimática. Para cada extracción, se pesaron 25 mg de biomasa húmeda de A. franciscana (estandarizado por masa para homogeneizar las diferencias entre estadios del desarrollo). Previo a la lisis, la biomasa se sometió a dos lavados consecutivos con 1.0 mL de agua destilada estéril, acoplados a centrifugación a 8 000 × g durante 2 min a 4 °C, descartando el sobrenadante con la finalidad de eliminar el exceso de sales y osmolitos del medio hipersalino.

El botón celular resultante se resuspendió en 400 µL de tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 2 mM, NaCl 400 mM y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2.0 % (p/v). La suspensión se homogeneizó mediante agitación en vórtex durante 15 s y se incubó en baño seco a 60 °C durante 45 min, invirtiendo los tubos manualmente cada 10 min.

Una vez completada la lisis, se adicionaron 150 µL de una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl 6.0 M) para desproteinizar la muestra mediante precipitación salina. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 20 s y se incubó en hielo a 4 °C durante 10 min. Posteriormente, se

centrifugó a 12 000 × g durante 10 min a 4 °C para precipitar las proteínas y los detritos celulares.

Se recuperaron cuidadosamente 450 µL del sobrenadante (fase acuosa superior) mediante pipeteo con puntas de corte ancho, con el propósito de minimizar la cizalladura del ADN y evitar la aspiración de la pastilla proteica inferior. El sobrenadante se trasvasó a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. La precipitación del ADN se indujo mediante la adición de isopropanol absoluto frío, almacenado a −20 °C, en proporción 1:1 (v/v) (450 µL). La muestra se mezcló mediante inversión suave de 10 a 12 veces y se incubó a −20 °C durante 30 min.

La muestra se centrifugó a 12 000 × g durante 12 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó por decantación, procurando no desprender el botón de ADN visible. La pastilla se lavó con 500 µL de etanol al 70 % (v/v) frío y se centrifugó a 10 000 × g durante 5 min a 4 °C. El etanol residual se eliminó mediante secado al aire en campana de flujo laminar durante 15 min. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) y se dejó hidratar a 4 °C durante toda la noche antes de su cuantificación y almacenamiento a −20 °C.

El ADN fue recuperado mediante precipitación con isopropanol frío en proporción 1:1 (v/v), seguido de un lavado con etanol al 70% y resuspensión final en 50 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0).

La calidad e integridad del ADN extraído fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, considerando la presencia de bandas de alto peso molecular como indicador de integridad genómica. La estimación del tamaño relativo de los fragmentos de ADN se realizó utilizando un marcador molecular de 1 kb DNA Ladder.

Evaluación de la calidad, integridad y viabilidad funcional del ADN.

La calidad e integridad del ADN genómico obtenido mediante ambos protocolos de extracción fueron evaluadas comparativamente mediante análisis espectrofotométrico, electroforesis en gel de agarosa y capacidad de amplificación molecular.

La concentración de ADN y los índices de pureza se determinaron mediante espectrofotometría de microvolúmenes utilizando un NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™), considerando las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 como indicadores de pureza proteica y presencia potencial de contaminantes orgánicos o sales residuales, respectivamente.

La integridad del ADN genómico fue evaluada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0% (p/v) teñido con Bromuro de Etidio, utilizando un marcador molecular 1 kb DNA Ladder. Los perfiles electroforéticos fueron visualizados mediante un sistema de documentación de imágenes UVP GelDoc-It®. La integridad del ADN fue determinada con base en la presencia de bandas compactas de alto peso molecular

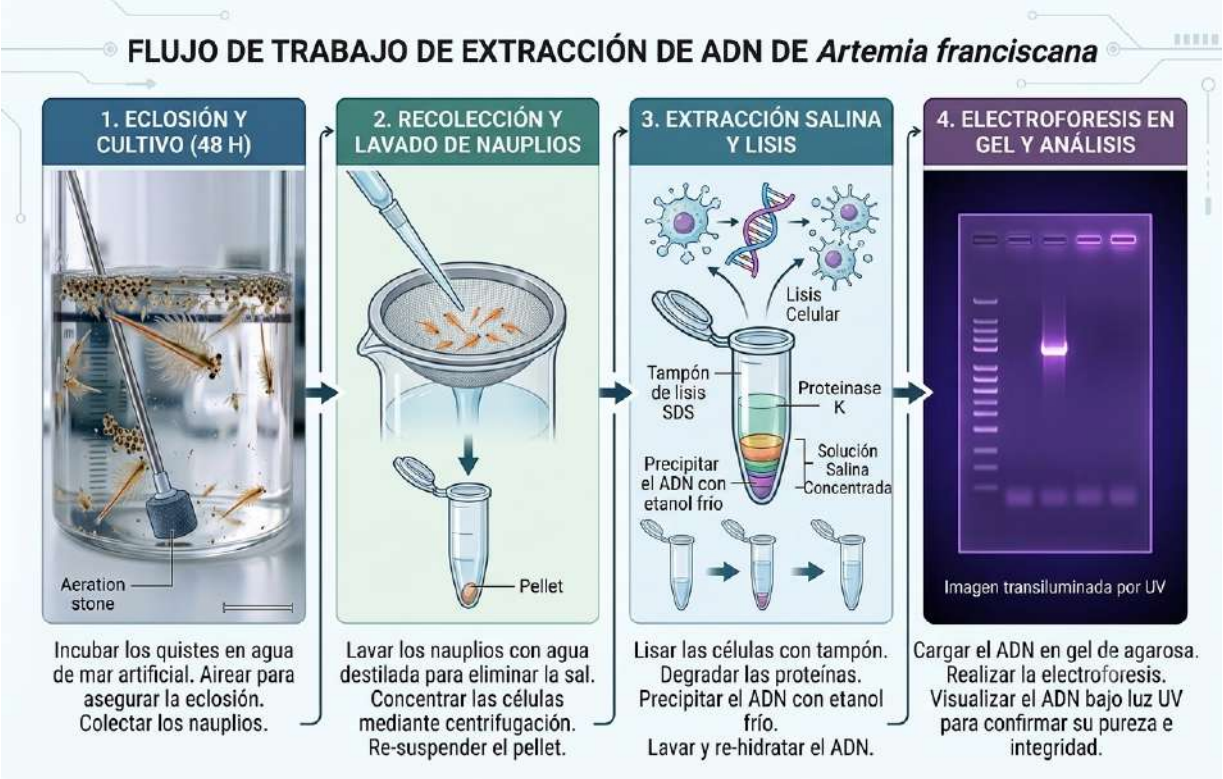


Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de Artemia franciscana empleada como grupo de comparación comercial. (1) Incubación y eclosión de quistes bajo condiciones controladas de laboratorio; (2) recolección, filtrado y lavado con agua destilada estéril de los nauplios para la eliminación de sales residuales del medio; (3) lisis celular e implementación del protocolo alternativo de extracción de ADN mediante precipitación salina (salting-out); y (4) evaluación de calidad mediante cuantificación espectrofotométrica y visualización electroforética en gel de agarosa al 1.0% (p/v) teñido Bromuro de Etidio bajo iluminación ultravioleta en un fotodocumentador UVP GelDoc-It®.

y la ausencia de patrones extensos de degradación o arrastre electroforético (*smear*), considerados indicadores de fragmentación del material genético, (**Figura 6**).

Para determinar la viabilidad funcional del ADN obtenido mediante el protocolo modificado sin proteinasa K, se realizó un ensayo de amplificación molecular por

PCR dirigido al gen mitocondrial Citocromo c oxidasa subunidad I (COI), como indicador de la capacidad del ADN extraído para actuar como molde en reacciones enzimáticas posteriores. Se utilizaron los cebadores universales LCO1490 (5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′) y HCO2198 (5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′) (Folmer et al., 1994).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL, utilizando aproximadamente 30 ng de ADN genómico como molde por reacción, obtenido mediante ambos protocolos de

extracción. La mezcla de reacción estuvo constituida por buffer de PCR 1×, $MgCl_2$ a una concentración final de 1.5 mM, dNTPs a 0.2 mM cada uno, 0.4 µM de cada cebador (LCO1490 y HCO2198) y 1.0 U de Taq DNA polimerasa.

El programa de amplificación consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento a 48 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Finalmente, se realizó una etapa de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los productos amplificados fueron mantenidos a 4 °C hasta su análisis electroforético posterior.

Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v). La eficiencia de ambos protocolos de extracción fue comparada cualitativamente considerando la presencia de un amplicón único, definido y de aproximadamente 658 pb, correspondiente al fragmento esperado de la región mitocondrial COI.

Análisis estadístico

Los valores de concentración de ADN (ng/µL) fueron expresados como media ± desviación estándar (DE). La distribución de los datos fue evaluada mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Debido a que se compararon cuatro tratamientos experimentales (proteinasa K comercial, proteinasa K silvestre, sin proteinasa K comercial y sin proteinasa K silvestre), las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía seguido de prueba post hoc de Tukey cuando se cumplieron los supuestos paramétricos. En caso contrario, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Diseño experimental y replicación biológica:

El diseño experimental consistió en un arreglo factorial 2 x 2, considerando dos factores: origen de la muestra (silvestre vs. comercial) y método de extracción (con proteinasa K vs. sin proteinasa K), generando cuatro tratamientos independientes. Para cada uno de los cuatro grupos evaluados, se procesaron n = 4 extracciones biológicas independientes (N = 16 extracciones en total). Cada dato reportado en la cuantificación espectrofotométrica (**Tabla I**) corresponde a una muestra/extracto biológico independiente y no a lecturas técnicas repetidas sobre una misma preparación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En bioquímica de halófilos, se ha documentado ampliamente que las proteasas no halófilas (como la proteinasa K mesófila convencional) sufren cambios de conformación estructural y desnaturalización atípica cuando se colocan en presencia de las elevadas concentraciones iónicas (Na^+, Mg^{2+}, Cl^-) retenidas en los tejidos de organismos salinos. Por ejemplo Gao et al. (2019) y Mevarech et al. (2000) señalan que las proteasas convencionales pierden su selectividad y estabilidad catalítica funcional en medios de elevada salinidad,

a menos que sean proteasas halófilas especializadas (*salt-tolerant proteases*). En su lugar, el uso de proteasas convencionales en lisados salinos promueve una digestión proteica incompleta o alterada que deja nucleasas endógenas parcialmente activas, traduciéndose en patrones electroforéticos de degradación (*smear*).

En organismos extremófilos adaptados a salineras, la presencia de osmolitos y sales acumuladas en los tejidos altera la hidratación de la doble hélice del ADN durante el proceso de extracción *in vitro*. Esto lo ha reportado Schrader et al. (2012) y Tan & Yiap (2009) revisan cómo la presencia de sales y compuestos residuales inhibe las enzimas en reacciones posteriores e induce un empaquetamiento anómalo de las moléculas de ADN, lo que causa roturas por cizallamiento (*shearing*) durante la centrifugación si las sales no se lavan adecuadamente antes de la lisis. En este sentido, las primeras extracciones de ADN genómico realizadas mediante el protocolo comercial (Favorgen®), que incluye una etapa de digestión con proteinasa K, produjeron patrones electroforéticos caracterizados por la presencia de un barrido continuo (*DNA smear*), indicativo de fragmentación del material genético. Este patrón fue observado tanto en ejemplares silvestres de *Artemia franciscana* provenientes de las salineras de Zapotitlán Salinas como en organismos obtenidos a partir de quistes comerciales incubados bajo condiciones controladas, lo que indica que la degradación observada no estuvo asociada exclusivamente con las condiciones ambientales de origen de las muestras.

Con el objetivo de evaluar la influencia de la proteinasa K sobre la conservación del ADN, se implementó un protocolo alternativo basado en precipitación salina (*salting-out*), eliminando la etapa de digestión enzimática. Los métodos basados en precipitación salina constituyen una alternativa ampliamente utilizada para la obtención de ADN genómico debido a su bajo costo, simplicidad y capacidad para recuperar moléculas de mayor tamaño cuando se reducen los factores asociados a fragmentación durante la manipulación (Miller et al., 1988; Aljanabi & Martínez, 1997).

Rendimiento, calidad e integridad del ADN.

La evaluación comparativa de los protocolos mostró diferencias importantes tanto en la cantidad de ADN recuperado como en su integridad molecular. La cuantificación espectrofotométrica indicó que el protocolo convencional basado en digestión con proteinasa K produjo las mayores concentraciones de ADN. En los ejemplares silvestres se obtuvo una concentración de 275.16 ± 38.15 ng/µL, mientras que en los organismos de origen comercial se registró 144.85 ± 18.42 ng/µL. En contraste, el protocolo modificado de precipitación salina (*salting-out*) sin proteinasa K produjo concentraciones considerablemente menores, de 27.84 ± 4.92 ng/µL en ejemplares silvestres y 6.25 ± 1.08 ng/µL en organismos comerciales (Tabla I). Estos valores corresponden a cuatro extracciones independientes por grupo.

A pesar del mayor rendimiento espectrofotométrico obtenido mediante el protocolo con proteinasa K, la concentración de ADN no constituyó por sí misma un indicador de mayor calidad molecular. La evaluación de la calidad del ADN requiere considerar conjuntamente su concentración, pureza e integridad, debido a que diversos compuestos presentes en los extractos pueden contribuir a la absorbancia registrada a 260 nm y, por tanto, sobreestimar el contenido aparente de ácidos nucleicos (Thermo Fisher Scientific, 2026a). La electroforesis en gel de agarosa mostró que las muestras obtenidas mediante el protocolo convencional presentaron patrones de degradación caracterizados por un *smear*, mientras que las muestras procesadas mediante precipitación salina sin proteinasa K mostraron bandas más compactas y definidas de alto peso molecular, tanto en ejemplares comerciales como silvestres (Figuras 7 y 8). Por lo tanto, los resultados indican una diferencia entre rendimiento cuantitativo **e** integridad estructural del ADN.

En términos de pureza espectrofotométrica, las relaciones A260/A280 y A260/A230 constituyen indicadores complementarios de posibles contaminantes asociados al proceso de extracción. Para ADN, una relación A260/A280 cercana a 1.8 se considera generalmente compatible con una preparación de adecuada pureza, mientras que valores de A260/A230 próximos a 2.0–2.2 constituyen un intervalo de referencia para preparaciones con baja contribución de contaminantes que absorben alrededor de 230 nm (Thermo Fisher Scientific, 2026a, 2026b). La relación A260/A280 se utiliza principalmente como indicador de posibles contaminaciones asociadas con proteínas y otros compuestos, mientras que A260/A230 puede proporcionar información sobre la presencia de sales, carbohidratos, fenol, guanidina y otros componentes derivados del procedimiento de extracción (Thermo Fisher Scientific, 2026a).

La consideración de estos índices resulta particularmente pertinente para *A. franciscana* procedente de ambientes hipersalinos, debido a la posibilidad de arrastre de sales y otros solutos asociados al medio. Los contaminantes que absorben en la región de 230 nm pueden disminuir la relación A260/A230 y, dependiendo de su naturaleza y concentración, interferir con la estimación espectrofotométrica de la concentración de ADN y con aplicaciones moleculares posteriores (Thermo Fisher Scientific, 2026a). En el presente estudio, este posible efecto fue considerado durante la optimización del protocolo modificado mediante la incorporación de dos lavados consecutivos con agua destilada estéril antes de la lisis, específicamente para disminuir el exceso de sales y osmolitos provenientes del medio hipersalino.

No obstante, debido a que los valores individuales de A260/A280 y A260/A230 no fueron incorporados a la base de datos utilizada para el análisis cuantitativo final, estos índices no se presentan como valores experimentales ni se estiman retrospectivamente a partir de las concentraciones obtenidas. Esta decisión evita introducir valores reconstruidos que no proceden directamente de las mediciones originales. En consecuencia, la comparación cuantitativa entre

tratamientos se sustenta en la concentración de ADN, mientras que la calidad molecular de los extractos se valoró de manera complementaria mediante la integridad electroforética y la capacidad de amplificación por PCR**.**

La diferencia observada entre concentración e integridad es relevante, particularmente porque el protocolo con proteinasa K produjo una mayor recuperación espectrofotométrica de ADN, pero presentó simultáneamente mayor evidencia de fragmentación. En contraste, la precipitación salina sin proteinasa K permitió recuperar cantidades menores de ADN, pero con un patrón electroforético compatible con una mejor conservación del ADN genómico. La evaluación mediante electroforesis constituye precisamente un complemento importante de la cuantificación espectrofotométrica, ya que en ADN genómico la presencia de fragmentos de alto peso molecular proporciona información sobre su integridad que no puede obtenerse únicamente a partir de la absorbancia (Thermo Fisher Scientific, 2026c).

Esta consideración es particularmente importante en el tratamiento comercial sin proteinasa K, que presentó la concentración promedio más baja (6.25 ± 1.08 ng/µL). En concentraciones próximas al límite inferior de detección de los espectrofotómetros de microvolumen, el ruido instrumental puede modificar la forma del espectro y afectar la confiabilidad de las relaciones de pureza. Thermo Fisher Scientific señala que, cuando la concentración de la muestra se aproxima al límite inferior de detección del instrumento, las contribuciones del ruido pueden afectar el espectro y las relaciones A260/A280 y A260/A230 pueden dejar de calcularse con precisión (Thermo Fisher Scientific, 2026d). Por ello, en este grupo resulta especialmente importante no interpretar la concentración espectrofotométrica de manera aislada y considerar conjuntamente la evidencia obtenida mediante electroforesis y PCR.

La amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI proporcionó una evaluación funcional adicional del ADN obtenido. Mientras que las muestras procesadas con el protocolo convencional presentaron evidencia de fragmentación en gel, el protocolo modificado sin proteinasa K permitió recuperar ADN con suficiente integridad para su utilización como molde en la amplificación molecular. En conjunto, estos resultados sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la omisión de la proteinasa K y la incorporación de una etapa previa de eliminación de sales favorecieron la conservación del ADN genómico, aun cuando el rendimiento espectrofotométrico fue menor.

Por tanto, los resultados respaldan la necesidad de evaluar los protocolos de extracción de ADN mediante un enfoque multidimensional que considere simultáneamente cantidad, pureza, integridad y funcionalidad molecular, particularmente en organismos provenientes de ambientes hipersalinos. En *A. franciscana*, la elección del protocolo no debería basarse exclusivamente en la concentración obtenida, sino también en la conservación estructural del ADN y su capacidad para ser utilizado en aplicaciones moleculares posteriores.

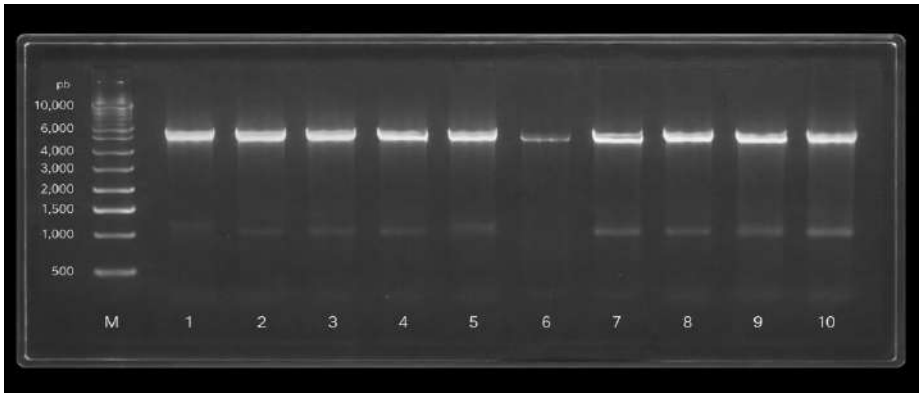


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de *Artemia franciscana* comercial mediante el protocolo modificado sin proteinasa K. Se observan bandas definidas de ADN de alto peso molecular, lo que indica una mejor preservación de la integridad del material genético en comparación con el protocolo convencional. M: marcador de peso molecular (DNA Ladder); carriles 1–5: muestras analizadas. Propia, 2025

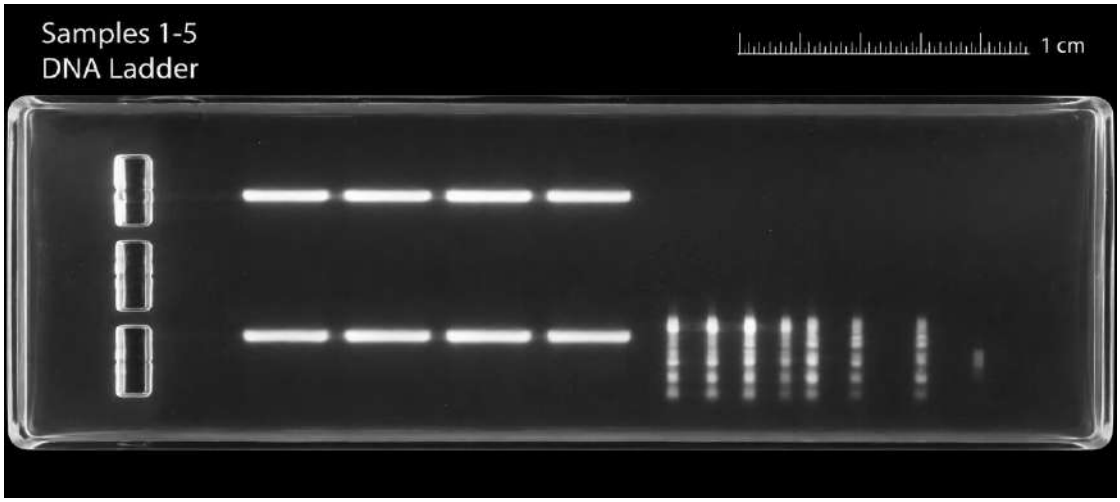


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de ejemplares silvestres de Artemia franciscana mediante el protocolo modificado sin proteinasa K. Se observan bandas definidas de ADN de alto peso molecular, indicativas de una adecuada conservación de la integridad del ADN. M: marcador de peso molecular (DNA Ladder); carriles 1–10: muestras independientes. Propia, 2025.

Tabla 1. Tabla I. Rendimiento y concentración de ADN genómico obtenido mediante protocolos de extracción con y sin proteinasa K en ejemplares silvestres y comerciales de Artemia franciscana. Los valores representan la media ± desviación estándar (DE) de cuatro extracciones independientes (n = 4).

Protocolo	n	ADN (ng/µL)
Proteinasa K comercial	4	144.85 ± 18.42
Proteinasa K silvestre	4	275.16 ± 38.15
Sin proteinasa K silvestre	4	27.84 ± 4.92
Sin proteinasa K comercial	4	6.25 ± 1.08

Bajo estas condiciones fue posible recuperar ADN genómico con patrones electroforéticos caracterizados por bandas definidas de alto peso molecular en ejemplares comerciales y silvestres de *A. franciscana* **(Figuras 7 y 8)**. En contraste, las muestras obtenidas mediante el protocolo convencional con proteinasa K mostraron patrones de degradación tipo *smear*. Estos resultados evidencian que, bajo las condiciones evaluadas, la eliminación de la proteinasa K favoreció la conservación de la integridad estructural del ADN.

La cuantificación espectrofotométrica mostró que tanto el origen de las muestras como la inclusión de proteinasa K influyeron en el rendimiento de ADN. El protocolo con proteinasa K produjo las mayores concentraciones, alcanzando 275.16 ± 38.15 ng/µL en ejemplares silvestres y 144.85 ± 18.42 ng/µL en organismos comerciales. Por el contrario, la exclusión de la digestión enzimática

redujo considerablemente el rendimiento, obteniéndose 27.84 ± 4.92 ng/µL **y** 6.25 ± 1.08 ng/µL, respectivamente (**Tabla I**).

Aunque el protocolo con proteinasa K permitió recuperar una mayor cantidad total de ADN, la evaluación electroforética mostró una menor calidad estructural del material obtenido. Esta diferencia evidencia que la concentración espectrofotométrica por sí sola no representa necesariamente un indicador

suficiente de calidad molecular, ya que valores elevados de ADN pueden estar asociados con fragmentación o presencia de moléculas parcialmente degradadas. En este sentido, la integridad del ADN constituye un criterio fundamental para aplicaciones posteriores como PCR, secuenciación y análisis filogenéticos (Tan & Yiap, 2009; Schrader et al., 2012).

La proteinasa K es una de las enzimas más empleadas en protocolos de extracción de ADN debido a su capacidad para degradar proteínas estructurales, histonas y nucleasas asociadas al material genético, favoreciendo la liberación del ADN y reduciendo procesos degradativos en numerosos organismos (Ebeling et al., 1974; Green & Sambrook, 2017). Sin

embargo, los protocolos de extracción no presentan una eficiencia universal, ya que su desempeño depende de la composición bioquímica de los tejidos, la organización celular y las características particulares de cada grupo taxonómico (Sambrook & Russell, 2001).

En el presente estudio, la aplicación del protocolo con proteinasa K produjo consistentemente patrones de degradación en *A. franciscana*, mientras que su omisión permitió recuperar ADN con mayor integridad aparente. Una posible explicación podría estar relacionada con las características particulares de la organización molecular del ADN en este crustáceo. En células eucariotas, el ADN se encuentra asociado con histonas y proteínas no histónicas que participan en la formación y estabilidad de la cromatina, regulando su compactación y accesibilidad (Felsenfeld & Groudine, 2003; Misteli, 2007). La interacción entre ADN y proteínas cromatínicas determina propiedades físicas del genoma, incluyendo su estabilidad frente a factores ambientales y procesos enzimáticos (Kornberg, 1974; Luger et al., 1997).

Bajo esta perspectiva, la digestión extensa de proteínas asociadas al ADN durante el tratamiento con proteinasa K podría modificar las interacciones que contribuyen a mantener la estabilidad física del complejo cromatina-ADN, favoreciendo procesos posteriores de fragmentación durante la manipulación mecánica o etapas subsecuentes de purificación. No obstante, esta interpretación debe considerarse como una hipótesis mecanística y no como una relación causal demostrada, debido a que el presente estudio no evaluó directamente la organización de la cromatina ni la actividad de nucleasas endógenas. Por ello, no se descartan otros factores asociados al procedimiento, como efectos derivados del tiempo y temperatura de incubación, actividad nucleasa residual o interacciones entre componentes celulares y reactivos empleados durante la extracción.

La respuesta de *Artemia farnciscana* a ambientes hipersalinos implica la presencia de mecanismos celulares especializados relacionados con la protección de macromoléculas, regulación osmótica y tolerancia al estrés oxidativo. Entre estos mecanismos se incluyen proteínas de choque térmico, proteínas LEA, acumulación de trehalosa y sistemas antioxidantes que contribuyen a mantener la estabilidad celular bajo condiciones ambientales extremas (Clegg, 1997; Clegg & Jackson, 1998; MacRae, 2016; Gajardo & Beardmore, 2012). Estas adaptaciones podrían influir indirectamente en la estabilidad del material genético y explicar la respuesta diferencial observada durante los procesos de extracción.

Los resultados obtenidos también indican que la evaluación de protocolos moleculares en organismos extremófilos debe considerar tanto el rendimiento como la integridad del ADN recuperado. En organismos no modelo, donde las características celulares pueden diferir significativamente de aquellas utilizadas para desarrollar protocolos comerciales, las modificaciones metodológicas específicas pueden mejorar la calidad del material genético obtenido (Tan & Yiap, 2009; Schrader et al., 2012).

Estos resultados muestran que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, la eliminación de la proteinasa K se asoció con un patrón electroforético compatible con una menor fragmentación aparente del ADN, aunque con una reducción sustancial de la concentración espectrofotométrica obtenida.

Finalmente, las poblaciones de *Artemia franciscana* presentes en las salineras artesanales de Zapotitlán Salinas representan un recurso genético poco explorado en México y con potencial para estudios de diversidad genética, adaptación molecular y biotecnología. La disponibilidad de protocolos optimizados para recuperar ADN íntegro permitirá ampliar las posibilidades de investigación molecular en esta especie y en otros organismos adaptados a ambientes extremos.

Análisis estadístico

Los valores de concentración de ADN (ng/µL) se expresaron mediante estadísticos descriptivos y se utilizaron para la comparación entre los cuatro tratamientos experimentales. Debido a que los valores individuales de las relaciones A260/A280 y A260/A230 no fueron incorporados de manera sistemática a la base de datos final, estos índices no fueron sometidos a análisis estadístico inferencial. La integridad del ADN se evaluó de manera cualitativa mediante electroforesis en gel de agarosa, mientras que la funcionalidad molecular se valoró mediante la amplificación por PCR del gen COI.

Para identificar las diferencias significativas entre pares de tratamientos, se aplicó la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Dunn con ajuste de Bonferroni. El éxito de la amplificación por PCR se evaluó de manera cualitativa y descriptiva. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando R versión 4.4.1 (R Core Team, 2024), estableciendo un nivel de significancia de $p < 0.05$.

La amplificación del fragmento del gen mitocondrial COI proporcionó una evaluación funcional complementaria de los extractos obtenidos. Aunque la electroforesis convencional mostró diferencias en los patrones de migración entre tratamientos, la interpretación de estos patrones se limitó a una evaluación cualitativa del estado estructural aparente del ADN. En contraste, la amplificación mediante PCR permitió demostrar que los extractos obtenidos mediante el protocolo modificado sin proteinasa K conservaron capacidad funcional como molde para amplificación molecular. El uso de COI como marcador molecular ha sido previamente documentado para la caracterización genética de *Artemia franciscana*, incluyendo la amplificación y secuenciación de fragmentos de este gen (Muñoz et al., 2008; Eimanifar et al., 2014).

En conjunto, la combinación de la evaluación electroforética y la amplificación por PCR proporciona evidencia complementaria sobre la calidad de los extractos. Sin embargo, debido a que no se realizó una cuantificación específica de la integridad mediante densitometría, Bioanalyzer o electroforesis en campo pulsado, los patrones observados en gel no se interpretan como una medida cuantitativa

de integridad genómica. En consecuencia, los resultados se expresan como una diferencia cualitativa en el patrón electroforético y una diferencia funcional en la capacidad de amplificación, evitando equiparar directamente una mayor intensidad o definición de las bandas con una mayor integridad molecular.

Esta distinción resulta relevante porque la integridad del ADN puede afectar el desempeño de aplicaciones moleculares posteriores, mientras que la cantidad y la integridad constituyen atributos diferentes de la calidad del ADN (Malentacchi et al., 2015). Asimismo, la amplificabilidad puede utilizarse como una medida funcional complementaria de la calidad del ADN, particularmente cuando se evalúa su utilidad para aplicaciones basadas en PCR (Brisco et al., 2010).

Por tanto, bajo las condiciones experimentales evaluadas, los resultados sugieren que el protocolo de precipitación salina sin proteinasa K produjo menores concentraciones espectrofotométricas de ADN, pero extractos con un patrón electroforético compatible con una menor fragmentación y capacidad demostrable de amplificación mediante PCR-COI. Estos resultados no permiten establecer una medida cuantitativa de integridad genómica, pero sí respaldan la utilidad funcional del ADN obtenido mediante el protocolo modificado para aplicaciones moleculares basadas en PCR.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que, bajo las condiciones experimentales evaluadas en *Artemia franciscana* procedente de ambientes hipersalinos de Zapotitlán Salinas, Puebla, la inclusión de proteinasa K durante la extracción de ADN estuvo asociada con un mayor rendimiento de ADN, pero con un patrón electroforético que sugiere una menor integridad estructural aparente en comparación con los extractos obtenidos mediante el protocolo modificado sin esta enzima. En contraste, la omisión de proteinasa K produjo concentraciones de ADN considerablemente menores, pero bandas electroforéticas más definidas, compatibles con una mayor conservación aparente del ADN de alto peso molecular.

Estos resultados evidencian que la concentración de ADN por sí sola no constituye un indicador suficiente de la calidad del extracto, particularmente cuando las muestras proceden de organismos asociados con ambientes de elevada salinidad. Por ello, la evaluación de los extractos debe considerar conjuntamente el rendimiento, los índices de pureza espectrofotométrica (A260/A280 y A260/A230), la integridad electroforética y, cuando sea pertinente, su desempeño en aplicaciones posteriores de biología molecular. La amplificación mediante PCR utilizada en este estudio constituye un indicador funcional complementario de la utilidad del ADN obtenido, pero no permite por sí misma establecer el mecanismo responsable de las diferencias observadas.

En las condiciones evaluadas, el protocolo modificado de precipitación salina sin proteinasa K representa una alternativa sencilla y de bajo costo para la obtención de ADN de *A. franciscana*, especialmente cuando la prioridad experimental es conservar la integridad aparente del ADN y no maximizar exclusivamente su

concentración. Sin embargo, los resultados deben interpretarse dentro de los límites del material biológico, procedencia y condiciones experimentales consideradas en este estudio, por lo que no deben extrapolarse directamente a otras poblaciones de *A. franciscana*, especies de *Artemia* u otros organismos sin validación adicional.

Finalmente, las diferencias observadas entre los protocolos justifican estudios posteriores orientados a determinar los factores bioquímicos y estructurales que podrían contribuir a los patrones de fragmentación observados. En particular, será necesario evaluar experimentalmente el efecto de variables como la composición iónica de las muestras, las condiciones de lisis, la actividad de nucleasas y las características del tejido antes de atribuir los resultados a un mecanismo molecular específico. En conjunto, este trabajo aporta evidencia experimental para reconsiderar el uso rutinario de proteinasa K en la extracción de ADN de *A. franciscana* procedente de ambientes hipersalinos y proporciona una base metodológica para optimizar procedimientos de extracción destinados a estudios posteriores de genética y biología molecular.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Laboratorio de Genética y al Laboratorio de Medicina de la Conservación de Especies Nativas “Gustavo Casas Andreu” por el apoyo técnico brindado. Asimismo, agradecen a la comunidad local (Las Salinas Grandes) por las facilidades y colaboración durante el desarrollo de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

De conformidad con la normativa de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la Ley General de Vida Silvestre en México, la obtención de *A. franciscana* no requirió de un permiso de colecta científica o especial. Las muestras fueron donadas y recolectadas directamente por los salineros artesanales del ejido San Antonio Texcala en Zapotitlán Salinas, Puebla, a partir de sus pozas de producción, tratándose de un recurso de libre aprovechamiento e insumo acuícola (alimento vivo) no listado en la norma NOM-059-SEMARNAT-2010.

REFERENCIAS

Aljanabi, S. M., & Martínez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research, 25*(22), 4692–4693. https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692

Arias-Toledo, A. A., Casas, A., & Lira, R. (2000). *Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología, Red para el Desarrollo Sostenible A. C.

Brisco, M. J., Latham, S., Bartley, P. A., & Morley, A. A. (2010). Incorporation of measurement of DNA integrity into qPCR assays.

BioTechniques, 49(6), 893–897. https://doi.org/10.2144/000113567.

Clegg, J. S. (1997). Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia. *Biological Bulletin, 193*(1), 139–143. https://doi.org/10.2307/1542734

Clegg, J. S., & Jackson, S. A. (1998). The metabolic status of quiescent and developing *Artemia* embryos. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology, 5*, 1–14.

Cruz-Aviña, J. R., Gómez-Carreto, G., Tenorio-Arvide, M. G., Álvarez-González, C. A., Cabrera, R., & Díaz-Larrea, J. (2026). First record of *Artemia franciscana* (Crustacea: Anostraca) in a hypersaline system of Zapotitlán Salinas, Puebla, Mexico. *Brazilian Journal of Science*, *6*(1), 11-26.

Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *European Journal of Biochemistry, 47*(1), 91–97. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x

Eimanifar, A., Winkler, A., & Schneider, D. (2014). Origin and genetic diversity of diploid parthenogenetic *Artemia* in Eurasia. *PLoS ONE, 9*(1), e84734

Favorgen Biotech Corp. (2023 o la versión correspondiente). *FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit User Manual*. Pingtung, Taiwan: Favorgen Biotech Corp.

Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature, 421*, 448–453. https://doi.org/10.1038/nature01411

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3*(5), 294–299.

Gajardo, G. M., & Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: Adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology, 3*, Article 185. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00185

Gao, X., Lu, Y., & Li, X. (2019). Microbial-derived salt-tolerant proteases and their applications in high-salt environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(12), 4683–4695. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09825-7

Green, M. R., & Sambrook, J. (2017). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science, 184*(4139), 868–871. https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (2000). The history, present status and prospects of the availability of *Artemia* cysts for aquaculture. *Aquaculture*, *181*(3–4), 397–403. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00239-3

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (Eds.). (1996). *Manual on the production and use*

of live food for aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature, 389*, 251–260. https://doi.org/10.1038/38444

MacRae, T. H. (2016). Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. *Cell Stress and Chaperones, 21*, 9–18. https://doi.org/10.1007/s12192-015-0639-9

Malentacchi, F., et al. (2015). Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: The SPIDIA experience. *Clinical Chimica Acta, 440*, 205–210. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.12.004

Mevarech, M., Frolow, F., & Gloss, L. M. (2000). Halophilic enzymes: Proteins with a taste for salt. *Biophysical Chemistry*, *86*(2–3), 155–164. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00126-7

Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research, 16*(3), 1215. https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215

Misteli, T. (2007). Beyond the sequence: Cellular organization of genome function. *Cell, 128*(4), 787–800. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.028.

Muñoz, J., Gómez, A., Green, A. J., Figuerola, J., Amat, F., & Rico, C. (2008). Phylogeography and genetic structure of *Artemia franciscana* in its native American range. *Molecular Ecology, 17*, 2006–2019.

R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing* (Version 4.4.1). R Foundation for Statistical Computing. https://www.R-project.org/

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seethala, R., Liti, G., & Louis, E. J. (2008). A high-throughput protocol for quantifying nucleic acids in *Artemia*. *Journal of Shellfish Research*, *27*(2), 4

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors—Occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology, 113*(5), 1014–1026. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009*, Article 574398. https://doi.org/10.1155/2009/574398

Thermo Fisher Scientific. (2026a). *DNA and RNA purity ratios: A260/A280 and A260/A230 explained*. Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific. (2026b). *DNA reference guide*. Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific. (2026c). *Genomic DNA purification support—Getting started*. Thermo Fisher Scientific.

Thermo Fisher Scientific. (2026d). *NanoDrop 2000 spectrophotometer FAQs*. Thermo Fisher Scientific.

Van Stappen, G. (1996). Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In P. Lavens & P. Sorgeloos (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (pp. 79–106). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Copyright: © 2026 Arnulfo Villanueva-Castillo. This is an open-access article published under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited. Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist. Please cite this article as: Roberto Alcázar-Reyes, Jarehtsy Ortiz-García, Kevin Sebastian Rivera-Carrillo, Néstor Méndez-Palacios1, Netzi Naidi Méndez-Palacios, Fátima Matamoros-González, Arnulfo Villanueva-Castillo, Ruby Sandy Moreno-Mejía, María Guadalupe Tenorio-Arvide, Juan Ricardo Cruz-Aviña. REEVALUACIÓN DEL USO DE PROTEINASA K DURANTE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE ARTEMIA FRANCISCANA (KELLOGG, 1906) DE AMBIENTES HIPERSALINOS EN PUEBLA, MÉXICO. Revista Ciencia Veterinaria y Biotecnología. Rev Cien Vet Bio 2026; 3 (1): 124-141.