



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

**“DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN ADAM2
EN ALPACAS”**

Tesis para optar el título de:
MÉDICO VETERINARIO y ZOOTECNISTA

Presentado por:
Silvana Caridad Moscol Fernández
(<https://orcid.org/0000-0003-4127-9936>)

Asesor:
Shirley Sujey Evangelista Vargas
(<https://orcid.org/0000-0001-6105-1889>)

Lima – Perú

2020

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 01 de octubre del 2020.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Miembro: Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
Miembro: Mg. JORGE LUIS VIVELA VELARDE

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN ADAM2 EN ALPACAS”

Presentada por la bachiller:

SILVANA CARIDAD MOSCOL FERNÁNDEZ

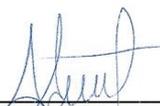
Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario y Zootecnista**

Asesorada por: **Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de los estudiantes de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen de manera unánime (----) por mayoría simple (x) calificar a:

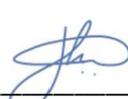
Tesis: SILVANA CARIDAD MOSCOL FERNÁNDEZ			Nota (en letras): Dieciocho
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.


Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Presidente


Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS
Asesora


Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
Miembro 1


Mg. JORGE LUIS VIVELA VELARDE
Miembro 2

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN ADAM2 EN ALPACAS

DESIGN AND VALIDATION OF PRIMERS FOR THE ADAM2 GENE IN ALPACA

Silvana Moscol-Fernández¹; Shirley Evangelista-Vargas^{1,2}

RESUMEN

La alpaca es un animal de importancia socioeconómica para los ganaderos de la zona altoandina del Perú. Actualmente, se buscan métodos para la selección temprana de machos reproductores, para esto sería interesante identificar genes relacionados con la fertilidad espermática. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue diseñar primers para el gen ADAM2 en alpacas mediante el programa bioinformático Primer3 y validarlos usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional.

Se diseñaron 32 pares de primers, de estos se seleccionaron y se mandaron a sintetizar dos pares, denominados ADAM2-A21 y ADAM2-A22 con 328 y 497 pares de bases (pb) respectivamente. Usando PCR convencional se amplificó los fragmentos de ADN, los amplicones obtenidos se corrieron en electroforesis horizontal, usando gel agarosa al 1.2%, y las bandas obtenidas se visualizaron utilizando un fotodocumentador; los productos obtenidos a través de PCR coincidieron en tamaño de pares de bases con los primers diseñados *in silico*. Se concluyó que es posible el diseño de primers para el gen ADAM2 en alpacas mediante programas bioinformáticos y su validación usando la técnica de PCR.

Palabras clave: Diseño de primers, ADAM2, alpacas

ABSTRACT

The alpaca is an animal of socioeconomic importance for farmers in the high Andean area of Peru. Currently, methods are sought for early selection of breeding males, for this, it could be interesting to identify genes related to sperm fertility. Therefore, the objective of this work was to design primers for the ADAM2 gene in alpacas using the Primer3 bioinformatic program and validate them using the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

32 pairs of primers were designed, two pairs of these were selected and ordered to be synthesized, called ADAM2-A21 and ADAM2-A22 with 328 and 497 base pairs (bp) respectively. The DNA fragments were amplified using conventional PCR, the obtained amplicons were run in horizontal electrophoresis, using 1.2% agarose gel, and the bands obtained were visualized using a photodocumenter; the products obtained through the PCR coincided in size of base pairs with the primers designed in silico. It was concluded that it is possible to design primers for the ADAM2 gene in alpacas through bioinformatic programs and its validation using the PCR technique.

Key words: Primer design, ADAM2, alpacas

¹ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

² Email: sevangelista@cientifica.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La alpaca es un camélido sudamericano doméstico que sirve como fuente de ingreso económico para las familias altoandinas del país, como fuente productiva de fibra y carne, ya que está adaptado para sobrevivir alimentándose a base de las pasturas naturales de baja calidad nutricional que crecen en estas zonas (Fernández-Baca, 2005). Por décadas se ha buscado realizar proyectos de selección y mejora genética en esta especie; sin embargo, la selección de los reproductores que han participado en este tipo de programas se ha realizado tomando en cuenta características fenotípicas y de forma muy superficial, tomando en cuenta las características reproductivas (García, 2005). Este tipo de selección generalizada en el país, considera machos reproductores a partir de los 3 años de edad, considerándose este parámetro uno de los principales factores que ocasiona el retraso en el proceso de selección y un aumento en el intervalo generacional. En la actualidad, en otras especies de producción como los bovinos, se realiza la selección de reproductores empleando marcadores moleculares (Singh *et al.*, 2014), utilizar esta metodología permitiría la selección temprana de machos reproductores, enfocada en la predicción de parámetros espermáticos ideales para una adecuada fecundación.

Como parte de la evaluación de los genes implicados en la fertilidad espermática, se ha identificado, como uno de los más importantes, al gen ADAM2 (Wyckoff *et al.*, 2000). Este gen, conocido como Fertilin beta o PH-30, pertenece a la familia A Desintegrin And Metalloprotease (ADAM), cuyos miembros codifican proteínas transmembrana ubicadas en distintos tipos celulares de una gran cantidad de tejidos en mamíferos (Day *et al.*, 2003; Seals *et al.*, 2003; Cho, 2012), en los que cumplen funciones de miogénesis, espermatogénesis, fertilidad, adhesión en células somáticas, entre otros (Primakoff *et al.*, 2000). Este gen ha sido estudiado en muchas especies como: humanos, roedores, lagomorfos, bovinos, porcinos, entre otros (Perry *et al.*, 1995; Burkin *et al.*, 1996; Hardy *et al.*, 1996; Waters *et al.*, 1997; Day *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2016; Giebeler *et al.*, 2016). Además, se ha determinado en ratones, que la ausencia total o parcial del gen produce individuos sanos, pero infértiles, específicamente en la delección del exón 14 (Cho *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 2007).

Según la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), el gen ADAM2 (ID: 102529822) se ubica en el cromosoma 26 entre el nucleótido 11199114 y el 11268514 del genoma de la alpaca. Este gen expresa una proteína denominada de la misma manera, cuya función principal es mantener la estabilidad estructural de otras proteínas de la misma familia al formar dímeros con estas (Nishimura *et al.*, 2007). Mediante estudios en monos, se ha determinado que el precursor de la proteína ADAM2 (100 kDa) se encuentra en las células germinales del testículo, este pasa por un proceso de proteólisis durante la maduración espermática que se realiza en el epidídimo, durante este proceso pierde el prodominio y el dominio metaloproteasa llegando a su maduración (47 kDa), donde deja expuesto el dominio desintegrina en el extremo N-terminal (Kim *et al.*, 2010).

La proteína ADAM2 forma complejos diméricos con los siguientes miembros de su familia: ADAM1, ADAM3, ADAM4, ADAM5 y ADAM6. Gracias a estudios en ratones *knockout* para el gen ADAM2, se determinó que la ausencia de la proteína no permite la formación del complejo ADAM1b-ADAM2 y esto genera espermatozoides incapaces de migrar del útero al oviducto (Cho, 2012; Muro *et al.*, 2011). Okabe *et al.* (2014) postula que al formarse el heterodímero ADAM1a-ADAM2 permite la presencia del ADAM3 en la superficie del espermatozoide, y este último al formar un dímero con la proteína ADAM2 tiene funciones importantes en la reproducción como la agregación espermática y la unión del espermatozoide-ovocito (Choi *et al.*, 2016). La fecundación se da por la unión de la desintegrina espermática, perteneciente a la proteína ADAM2 en su forma madura, a la integrina ($\alpha 6\beta 1$) del ovocito (Giebeler *et al.*, 2016).

Debido a la importancia del gen sobre la fertilidad en otras especies, sería relevante estudiarlo en alpacas; sin embargo, en la base de datos del NCBI solo se encontró la secuencia incompleta del gen con aproximadamente 69401 pares de bases (pb) sumado a esto, no se proporciona información suficiente para identificar la secuencia de los primers empleados. Por lo tanto, el objetivo del trabajo es diseñar primers para el gen ADAM2 en alpacas y validarlos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional o, conocida por sus siglas en inglés, PCR convencional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recuperó las secuencias del gen (ID: 102529822) y la variante 1 de ARNm (Código de acceso: XM_031691545.1) de ADAM2 en alpacas de la base de datos de la NCBI; las cuales fueron alineadas utilizando el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Luego se diseñaron primers *in silico* mediante el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizando como molde la secuencia del gen ADAM2 en alpacas. De los 69401 pb que presenta la secuencia, se emplearon un aproximado de 27000 pb, debido a que se evitaron las zonas no identificadas.

De las zonas seleccionadas, se tomaron fragmentos de aproximadamente 10 – 20 kb, los cuales fueron ingresados al programa para generar primers que fueron seleccionados según los criterios mencionados en el Cuadro 1. Además, se evaluó la formación de subproductos (horquillas y dímeros) *in silico* mediante el programa OligoAnalyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Se alinearon los primers diseñados con las secuencias trabajadas al inicio, de esta manera fue posible determinar la ubicación de estos con respecto a la secuencia del gen y en que exón o intrón se encontraban.

Se emplearon un total de 20 muestras de tejido testicular procedente de 10 individuos. Para ello, se obtuvieron testículos del Camal Municipal de Huancavelica, a los cuales se les retiró la túnica vaginal visceral, y lavó con suero fisiológico al 0.9%. Cada par de testículos, de un mismo individuo, fueron colocados en una bolsa plástica y conservados en cajas refrigeradas a 5 °C para su transporte inmediato a Lima. Cada par de testículos, de un mismo individuo, fueron colocados en una bolsa plástica y conservados en cajas refrigeradas a 5 °C para su transporte inmediato a Lima (Banda *et al.*, 2010).

En el laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular de la Universidad Científica del Sur (Villa El Salvador, Lima) se realizó la extracción ADN, Utilizando para ello el kit comercial innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG). Mediante este kit se obtiene ADN generando la lisis de la membrana celular y nuclear para liberar el contenido, posteriormente es necesario realizar dos pasos de lavado para disminuir los contaminantes (ARN, proteínas, etc.) y en el último paso se disminuyó a la mitad el volumen de elución a diferencia de lo indicado por el manual.

Para fines de este trabajo se consideró como validación que el tamaño de los amplicones coincidiera con el tamaño en pares de bases obtenidos en el programa Primer3. El ADN extraído se mezcló con el reactivo innuMIX Standard PCR MasterMix (Analytik Jena AG) para preparar la PCR convencional. La técnica se realizó en un termociclador Thermal Cycler 0.2ml x 64 PCR-300 (mcr), aplicando el siguiente protocolo: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por dos minutos, 40 ciclos de 95°C de 40 segundos, 58°C de 40 segundos, 72°C de 40 segundos y finalmente, elongación final 72°C de 10 minutos.

Los productos obtenidos de la amplificación se corrieron en gel agarosa al 1.2% mediante la técnica de electroforesis horizontal. Se utilizó una cámara de electroforesis horizontal de 10 x 10 (ENDURO) y buffer de corrida TAE 1X (Clever Scientific). Para la visualización de los fragmentos amplificados se utilizó buffer de tinción SafeView Classic (abm) y se utilizó el marcador de peso molecular comercial de 1kb (Ladder Express de Analytik Jena). Las condiciones de corrida de electroforesis fueron de 40 minutos a 90 voltios y, finalmente los geles fueron fotografiados por un fotodocumentador (ENDURO).

Cuadro 1. Criterios para el diseño de primers

Criterio	Descripción
Tamaño	Tamaño ideal: 20-25 nucleótidos de longitud Generalmente: 18-30 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Debe ser una G o una C
Temperatura melting (Tm)	50-65 °C
Contenido %GC	40-60%
Auto-complementariedad	Debe ser evitada para minimizar la formación de estructuras secundarias y los dímeros de primer
Similaridad	Debe tener 100% de apareamiento con el molde

Fuente: Orozco-Ugarriza (2016)

RESULTADOS

En la base de datos de la NCBI se identificó que la secuencia de ADN del gen ADAM2 descrita en alpacas presenta aproximadamente 69401 pb y 24 exones. Mediante el alineamiento de las secuencias del gen ADAM2 y ARNm fue posible determinar la ubicación de los exones dentro de la secuencia del gen. Cumpliendo los criterios establecidos en el Cuadro 1, se seleccionaron 32 posibles pares de primers (Cuadro 2) de los diseñados mediante el programa Primer 3, todos estos eran candidatos válidos para ser sintetizados. Se empleó un muestreo no probabilístico aleatorio para seleccionar dos pares de primers, el 32 y 28 a los cuales se les denominó ADAM2-A21 y ADAM2-A22 respectivamente. Estos fueron sometidos a una evaluación de horquillas y dímeros como se observa en el Cuadro 3, para determinar la calidad de los productos. Finalmente estos fueron alineados con las secuencias anteriormente mencionadas y se determinó que el primer forward de ADAM2-A21 está ubicado entre los nucleótidos 62886 y 62906 tomando parte del exón e intrón 19 de la secuencia de ADAM2 en alpaca, y el primer reverse entre el 63194 y 63214 encontrándose en el intrón 19; de la misma manera se trabajó en los primers del ADAM2-A22, el forward se ubica entre los nucleótidos 55866 y 55886, y el reverse entre el 56343 y el 56363, ambos se encuentran en el intrón 15 (Figura 1-4).

En la Figura 5 se observa los amplicones obtenidos para el par de primers ADAM2-A21. La Figura 6 corresponde a los amplicones del par de primers ADAM2-A22. En ambos, el tamaño de los amplicones coincide con el tamaño de producto obtenido en el software Primer3, de 328 y 497 pb para ADAM2-A21 y ADAM2-A22 respectivamente. El orden de los carriles está

distribuido de igual forma en los dos geles, siendo la siguiente: Carril M: marcador de peso molecular, Carril 1 y Carril 2: amplicones de la muestra N° 1 de ADN, Carril 3 y Carril 4: amplicones de la muestra N° 2 de ADN, Carril 5 y Carril 6: amplicones de la muestra N° 3 de ADN, Carril 7: amplicón de la muestra N° 4 de ADN y, Carril 8: blanco o control negativo (-); los carriles 2, 4 y 6 se corrieron con el fin de demostrar la repetibilidad de la prueba.

Cuadro 2. Secuencias y características de los primers diseñados mediante el programa Primer3 para el gen ADAM2 en el genoma de la alpaca

#	Primer	Secuencia (5' A 3')	Longitud	Tm (°C)	%GC	Ubicación	Tamaño de amplicón (pares de bases-pb)
1	Forward	TGCGTAAAAGACCCCAAAG	20	60.10	45	Intrón 1	306
	Reverse	CAAAGGCAGGGTTGAAGAA	20	60.22	45	Intrón 1	
2	Forward	CTGAGTTGAAGCCTCCGTCT	20	59.60	55	Exón 2	460
	Reverse	GTCCAAGAACAGTGGGAAA	20	59.94	50	Intrón 2	
3	Forward	GCAGTCAGAAGGTCCAAAGG	20	59.84	55	Intrón 2	308
	Reverse	TTGCACACGTAGCCTTTCAG	20	60.05	50	Intrón 2	
4	Forward	TGGAGGAGTTGAATCACAGG	20	58.64	50	Exón 3	327
	Reverse	CAAATATTGCCCCCTGAGTG	20	60.32	50	Intrón 3	
5	Forward	TTGCTGGCTGTTCATTTGTC	20	59.85	45	Intrón 4	376
	Reverse	CTTTTCCCAGATCCATCAGC	20	59.63	50	Intrón 4	
6	Forward	CCAGGAGAGGCTCTGAGCTA	20	59.84	60	Intrón 4	344
	Reverse	GGGCATGGTCCTACAAAGAG	20	59.55	55	Intrón 4	
7	Forward	GTTCCAGAACATCCCAGGAA	20	59.90	50	Exón 5	409
	Reverse	CTGTTGTGCAAGAGGTTTCA	20	57.44	45	Intrón 5	
8	Forward	AGCCAAACCAAAAATGATCG	20	59.94	40	Intrón 5	367
	Reverse	GTCTGGGTAATCCCCGAAGT	20	60.19	55	Intrón 5	
9	Forward	ACGTAACCCTCCTTCCTGCT	20	60.13	55	Intrón 5	433
	Reverse	CCATCTGGCAGTTTCACCTT	20	60.11	50	Intrón 5	
10	Forward	TTTTCTCACCAGGCAAAACC	20	60.09	45	Intrón 5	313
	Reverse	AGAGGATGGAAAGGTGCTGA	20	59.80	50	Intrón 5	
11	Forward	TAAGGTGGGCAGTACCTTGG	20	59.99	55	Intrón 5	405
	Reverse	GCCACCCAAGAAAACAAGAA	20	60.09	45	Intrón 5	
12	Forward	GGAAGTTGGCCACTGTCACT	20	60.16	55	Intrón 5	342
	Reverse	CAACTTTGCAGGACGTCAGA	20	60.02	50	Intrón 5	
13	Forward	GCAAAACCTATCCAGCGTGT	20	60.14	50	Intrón 5	484
	Reverse	GTCTGCCAATGAGACTGCAA	20	59.99	50	Intrón 5	
14	Forward	CAGTTGATTCCCTTCCCTCA	20	60.04	50	Intrón 5	343
	Reverse	TCCAAAATTGTCCCGAGAAG	20	60.04	45	Intrón 5	
15	Forward	TTCTGTGGCGATCATTAGCA	20	60.37	45	Exón 6	338
	Reverse	GCCTTAGGTGGTGAAGTTGG	20	59.59	55	Intrón 6	

16	Forward	CCATGGCTGTATCTGTGGTG	20	59.98	55	Intrón 7	473
	Reverse	GGTGGGCAGGGATTAGATTT	20	60.15	50	Intrón 7	
17	Forward	CCCAACCTCAAAGGTGAAGA	20	60.08	50	Intrón 7	483
	Reverse	GGAGCAATAAGGTGGGAAAA	20	59.02	45	Intrón 7	
18	Forward	TGAAATCCCACCCCTCTAAA	20	59.36	45	Intrón 7	412
	Reverse	TGAGTGACGTCTGCAAGTGG	20	61.09	55	Exón 8	
19	Forward	GGTGCATTCCCTCTCTATCG	20	59.65	55	Intrón 8	374
	Reverse	GAGGAAACCTTCCAAATGC	20	60.81	50	Intrón 8	
20	Forward	GTGCAACCTTTCAAGGGAAG	20	59.71	50	Exón 11	333
	Reverse	GCTGTCTGATGCAAGTTCA	20	59.99	50	Intrón 11	
21	Forward	TTAGGGAGGGAGGGTAGTGG	20	60.31	60	Intrón 11	387
	Reverse	TGGTCGCTGTCAAATTACCA	20	60.11	45	Intrón 11	
22	Forward	GAGCCCCTTGACATAATCCA	20	59.89	50	Intrón 11	339
	Reverse	TGTCCATGCAGGACTGAAAA	20	60.24	45	Intrón 11	
23	Forward	TGATGAACCCAGAAGCAGTG	20	59.83	50	Exón 12	306
	Reverse	TCAAGTCAAGCATCGGATTG	20	59.80	45	Intrón 12	
24	Forward	TCACTCTGTTGAACGGCAAA	20	60.43	45	Intrón 12	346
	Reverse	AAACGTGGCTGGTTTTGAAG	20	60.15	45	Exón 13	
25	Forward	CTTGAGGGGACTGAATGGAA	20	60.04	50	Intrón 13	371
	Reverse	GGGGAAGGCTGGAGAGATAG	20	60.17	60	Intrón 13	
26	Forward	TCTGCTTGCCAACATTGAAG	20	59.99	45	Intrón 13	374
	Reverse	AGGCAGGTCGACACATCTCT	20	59.87	55	Exón 15	
27	Forward	TCAGAGTGGGTGTTGGGTAGA	20	60.55	52.38	Intrón 15	300
	Reverse	AATTCTATCTGCCAGCGTCAA	20	59.86	42.86	Intrón 15	
28	Forward	TCAGCTGAGATCCTGATGGA	20	59.45	50	Intrón 15	497
	Reverse	CACGCAAGACCACTTCAATG	20	60.30	50	Intrón 15	
29	Forward	GATGCAGCACCCAGAGAAAT	20	60.23	50	Intrón 15	433
	Reverse	ACGCCAAGTTTCTCTCCTGA	20	59.99	50	Intrón 15	
30	Forward	CTCTGAAGCTGCTCGGAAAC	20	60.28	55	Intrón 15	356
	Reverse	AGGCAGTGATCATCCAGGTC	20	60.08	55	Intrón 15	
31	Forward	GCCTGCATTACCCCTTTTAT	20	59.05	45	Intrón 15	431
	Reverse	GAACAAGGGATGGGAAAACA	20	59.77	45	Intrón 15	
32	Forward	GAGGCGGTGTACCTGGTAAG	20	59.62	60	Exón 19	328
	Reverse	GTTCTCCGACTGGCTGTCAT	20	60.27	55	Intrón 19	

Cuadro 3. Resultado de subproductos de PCR *in silico* formados por los pares de primers ADAM2-A21 y ADAM2-A22 obtenidos del programa OligoAnalyzer Tool

Secuencias	Horquillas	Nº de homodímeros	Nº de heterodímeros
ADAM2-A21	Forward	1 (-0.61/ 34.8° C)	17
		2 (-0.43/ 30.7° C)	
	Reverse	1 (-1.69/ 41.7° C)	10
ADAM2-A22	Forward	1 (-0.99/ 38.9° C)	19
		2 (-0.49/ 31° C)	
		3 (-0.24/ 28° C)	
		4 (-0.17/ 26.5° C)	
	Reverse	1 (-0.05/ 25.9° C)	9
	2 (0.21/ 21.7° C)		

ARNm	----ATATGTAATAATAAAAAAGAACTGTCACCTGTAACCCTATGTATTTACCTCCAGTTTG	2240
GEN	TCAGATATGTAATAATAAAAAAGAACTGTCACCTGTAACCCTATGTATTTACCTCCAGTTTG	62820
A21For	-----	0
ARNm	CCAAAATGAATCACCAGGATGGACTGGTGGGAGTGTGCGACAGTGGTAACTTTCCACCCCTC	2300
GEN	CCAAAATGAATCACCAGGATGGACTGGTGGGAGTGTGCGACAGTGGTAACTTTCCACCCCTC	62880
A21For	-----	0
ARNm	AGGAGGAGGCGGTGTACCT-----	2319
GEN	AGGAGGAGGCGGTGTACCTGGTAAGCATTGATAACAAACCAAAAACATAATTGAAACAAC	62940
A21For	----- GAGGCGGTGTACCTGGTAAG ----- *****	20
ARNm	-----	2319
GEN	ATTTTAATATATCAAACCTAATAAATAATTATCTACCAATTTATATTTAGATTATGTTTC	63000
A21For	-----	20

Figura 1. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de ADN y ARNm del gen ADAM2 obtenidas del GenBank con el primer forward ADAM2-A21.

ARNm	-----	2319
GEN	AATATCAATAGATAAACCATATATGGCTATTTAATTGTGTTTTATTTCCAGAGACTAATA	63060
A21Rev	-----	0
ARNm	-----	2319
GEN	TGTTGTAACATATGAAACACATATTATAAATAAGATATGTCAACAAGGGCCAGGCAGGA	63120
A21Rev	-----	0
ARNm	-----	2319
GEN	AAACAGAAGTCACTGTAGTCTTTCATACAGAAGGAGGTCAGTATAAGGCGTGGGGTAACA	63180
A21Rev	-----	0
ARNm	-----	2319
GEN	CGTAATGGTAGAGATGACAGCCAGTCGGAGAACAGCGAGGCAACCCAGAGGACAGAGCAC	63240
A21Rev	-----ATGACAGCCAGTCGGAGAAC-----	20

Figura 2. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de ADN y ARNm del gen ADAM2 obtenidas del GenBank con el primer reverse ADAM2-A21.

ARNm	-----	1814
GEN	ATGTGGAGGCCCTTGAGTCTTCAATTTTGTGACTATAGTCATAAAAGATCCTCCAACCTT	55740
A22For	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	TGGCCTTTTTTTTTGTCCAATGGCCTGCTTCCCTAGCTAAGCTTATAACTTTGACCTGTCA	55800
A22For	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	CACCTAGCTAGGTTTGTAAATGACTTTGGGGACAGTATCTTCAGTTCACACTGTCTCTAG	55860
A22For	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	TGCTTTCAGCTGAGATCCTGATGGATTCACTGGGGTTCCTCTTAGGTTGTATCACTTTCC	55920
A22For	-----TCAGCTGAGATCCTGATGGA-----	20

Figura 3. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de ADN y ARNm del gen ADAM2 obtenidas del GenBank con el primer forward ADAM2-A22.

ARNm	-----	1814
GEN	AAAAGACATTTATACAAAAACACTGTTGACCGATAAATCATATTATTTGTTTCAAAAAAG	56220
A22Rev	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	TTTCTTATATACTTATATATTTCTAGACTTACTAGAAAAAGTAGAAGATAAATTACATAC	56280
A22Rev	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	TGCAGTTAATCCTAAAAATAGGTTTAGAGAGTGGATGAGAGTACTTTCAACTTTAAAATAT	56340
A22Rev	-----	0
ARNm	-----	1814
GEN	TTCATTGAAGTGGTCTTGCGTGATTTTAAACTGGAAGTTTTTGTTCAGTTTTTTATTA	56400
A22Rev	--CATTGAAGTGGTCTTGCGTG-----	20

Figura 4. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de ADN y ARNm del gen ADAM2 obtenidas del GenBank con el primer reverse ADAM2-A22.

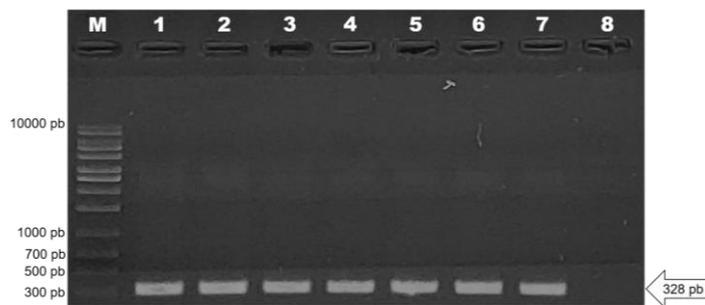


Figura 5. Amplificación del gen ADAM2-A21. Carril M: marcador de peso molecular de 1 kb; Carril 1-7: amplicones de muestras de alpaca y Carril 8: Control negativo (-). Tamaño de amplicón 328 pb.

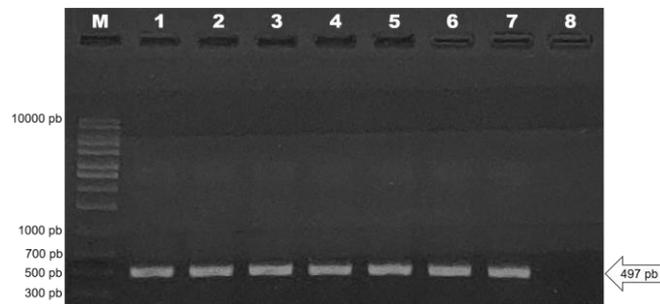


Figura 6. Amplificación del gen ADAM2-A22. Carril M: marcador de peso molecular de 1 kb; Carril 1-7: amplicones de muestras de alpaca y Carril 8: Control negativo (-). Tamaño de amplicón 497 pb.

DISCUSIÓN

El gen ADAM2 expresa una proteína denominada de la misma manera, que en su forma madura se encuentra en la superficie de la cabeza de espermatozoides epididimales. Esta proteína cumple la función de mantener la estabilidad estructural de algunos miembros de su familia formando dímeros con ellos y así cumplir un rol importante en la fecundación. Debido a la importancia que representa la expresión de esta proteína en otras especies, se considera necesario su estudio en alpacas, ya que hasta la actualidad no existe mucha información sobre el gen en esta especie, Florentini *et al.* (2011) realizan un estudio para la detección de transcritos del gen ADAM2 en alpacas, pero no mencionan secuencias de primers para este. Este gen, junto a otros, es considerado de gran importancia para la reproducción, por esto se considera que puede servir como marcador molecular (Bonet *et al.*, 2013).

A diferencia de otras investigaciones, en este trabajo se realizó el alineamiento entre las secuencias de ADN y ARNm de ADAM2 de alpaca (NCBI), esto con el fin de identificar las zonas codificantes y no codificantes del gen, para luego determinar cuál es la ubicación de los dos pares de primers seleccionados dentro del genoma de esta especie, de esta manera nos aseguramos de evitar las zonas donde se desconoce el orden de los nucleótidos.

El uso de programas bioinformáticos para el diseño de primers permite predecir el tamaño de estos, temperatura melting (T_m), porcentaje de GC, similitud, entre otras características (Dieffenbach *et al.*, 1993). Es por ello, que en diversas investigaciones realizadas en procariotas y eucariotas se emplea el diseño de primers *in silico* como punto de partida para el trabajo con secuencias genómicas nuevas (genomas bacterianos, genes eucariotas, etc.), lo cual permite disminuir la pérdida de recursos. En la presente investigación se realizó un procedimiento similar al descrito por Thornton y Basu (2010) para el diseño de primers; siendo la diferencia más resaltante que ellos emplearon una secuencia de ARNm y nosotros hemos utilizado la secuencia incompleta del gen ADAM2 en alpaca. Para el diseño de primers se usó el programa bioinformático Primer 3, el cual ha sido empleado en diversas investigaciones en especies procariotas y eucariotas debido a su practicidad, confiabilidad y obtención de secuencias de oligonucleótidos (Aris *et al.*, 2013; Serrano-Martínez *et al.*, 2016; De la Fuente *et al.*, 2018).

Se empleó la PCR convencional para la validación de primers por ser una técnica práctica, rápida y económica (Tamay de Dios *et al.*, 2013). Esta metodología se ha utilizado en diversas especies, teniendo como resultado amplicones que coinciden con el tamaño de los

productos obtenidos *in silico* (Pavia *et al.*, 2003; Padilla *et al.*, 2003; Zueter *et al.*, 2018). Existen diversas investigaciones aplicadas a camélidos sudamericanos que han empleado el PCR convencional como su metodología de validación, Arias y Huanca (2009) sexaron embriones de alpaca utilizando la técnica de PCR convencional para amplificar bandas del gen SRY, pero en este caso utilizaron la secuencia molde del gen en guanaco para el diseño de primers, a diferencia de la presente investigación dónde se utilizaron secuencias específicas de alpaca, lo cual genera resultados más confiables al tratarse de primers específicos para la especie, pero no en todos los casos es posible encontrar las secuencias necesarias para el objeto de estudio.

Al igual que Montes *et al.* (2009) que emplearon la técnica de PCR para obtener amplicones gen TLR2 en alpacas, considerando validados aquellos primers cuyos amplicones obtenidos empleando PCR convencional y visualizados en gel agarosa coinciden en tamaño de pares de bases con lo diseñado *in silico*. En este trabajo se validaron al comparar el tamaño de los amplicones obtenidos con los resultados del programa Primer 3, siendo el caso de ADAM2-A21 y ADAM2-A22 cuyos tamaños serían 328 y 597 pb respectivamente (Figuras 5 y 6).

Hasta la actualidad no existe mucha información sobre el gen ADAM2 en alpacas mientras que, en otras especies, como por ejemplo en porcinos y bovinos, ya es conocido como un candidato para el mejoramiento genético en el ámbito reproductivo (Bonet *et al.*, 2012; Mishra *et al.* 2013), es por esto importante continuar los estudios en este gen para que en un futuro sea utilizado como un marcador molecular.

CONCLUSIONES

Se puede concluir mediante este estudio que es posible el diseño y validación de primers para el gen ADAM2 en alpacas *in silico*, logrando ser validados empleando la técnica de PCR convencional. Los primers diseñados en este trabajo se pueden utilizar en un futuro para identificar marcadores moleculares para la selección temprana de machos reproductores de alpaca.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue cofinanciado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y la Universidad Científica del Sur, a través del proyecto <<Caracterización de marcadores moleculares en genes relacionados a espermatogénesis y

fertilidad espermática a partir de transcriptomas de testículo y epidídimo de alpaca>>, contrato N.º 118-2016-FONDECYT.

LITERATURA CITADA

1. Arias N, Huanca W. 2009. Un método para el sexaje por ADN de alpaca amplificando el gen SRY mediante PCR. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 20:203-207. doi: 10.15381/rivep.v20i2.607
2. Aris M, Sukenda, Harris E, Sukadi M, Yuhana M. 2013. Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design. *Budidaya Perairan* 1: 4-50. doi: 10.35800/bdp.1.3.2013.2733
3. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M et al. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, TES y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21: 145-153. doi: 10.15381/rivep.v21i2.129
4. Bonet S, Briz MD, Yeste M. 2012. A proper Assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also other focused on molecular markers of epididymal maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 47:52-64. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02033.x
5. Bonet S, Casas I, Holt W, Yeste M. 2013. *Boar reproduction: Fundamentals and new biotechnological trends*. 1a ed. Estados Unidos: Springer. p 40.
6. Burkin H, Burkin D, Davey P, Griffin D, Affara N. 1996. Mapping, sequence and expression analysis of the human fertilin beta gene (FTNB). *Genomics* 40: 190-192. doi: 10.1006/geno.1996.4531
7. Cho C, Bunch D, Faure J, Goulding E, Eddy E, Primakoff P, Myles D. 1998. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *SCIENCE* 281: 1857-1859. doi: 10.1126/science.281.5384.1857
8. Cho C. 2012. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. *Nature Reviews Urology* 9: 550-560. doi: 10.1038/nrurol.2012.167
9. Choi H, Jin S, Kwon JT, Jeong J, Kim J et al. 2016. Characterization of mammalian ADAM2 and its absence from human sperm. *PLoS ONE* 11: 1-21. doi: 10.1371/journal.pone.0158321
10. Day A, Quilter C, Sargent C, Mileham A. 2003. Chromosomal mapping, sequence and transcription analysis of the porcine fertilin beta gene (ADAM2). *Animal Genetics* 34: 375-378. doi: 10.1046/j.1365-2052.2003.01029.x

11. De la Fuente A, Romero D, Cárdenas O, Álvarez M. 2018. Diseño y evaluación de primers *in silico* del gen E1 del virus de chikunguya para Real-Time PCR (qPCR). Revista CON-CIENCIA 6: 107-124.
12. Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. 1993. General concepts for PCR primer design. Genome Research 3: S30-S37. doi: 10.1101/gr.3.3.s30
13. Fernández-Baca, S. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
14. Florentini E A, Vásquez J H, Valdivia M. 2011. Detección de la expresión de los genes Calmegin y Beta Fertilin en testículos de alpacas macho (*Lama pacos*). Spermova 1: 100-101.
15. García W. 2005. Manual del técnico alpaquero. Perú: Universidad Mayor de San Marcos. 105 p.
16. Giebler N, Zigrino P. 2016. A desintegrin and metalloprotease (ADAM): historical overview of their functions. Toxins 8: 1-14. doi: 10.3390/toxins8040122
17. Hardy C, Holland M. 1996. Cloning and expression of recombinant rabbit fertilin. Molecular Reproduction and Development 45: 107-116. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199610)45:2<107::AID-MRD1>3.0.CO;2-X
18. Kim E, Lee JW, Baek DC, Lee SR, Kim MS, Kim SH *et al.* 2010. Processing and subcellular localization of ADAM2 in the *Macaca fascicularis* testis and sperm. Animal reproduction science 117: 155-159. doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.04.002
19. Mishra C, Palai TK, Sarangi LN, Prusty BR, Maharana BR. 2013. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. Veterinary World 6: 905-910. doi: 10.14202/vetworld.2013.905-910
20. Montes A, Rodríguez J, Agapito J. 2009. Validación de la técnica de PCR para la amplificación de una secuencia de 118 pb del exón 2 perteneciente al gen TLR2 de alpaca (*Vicugna pacos*). Instituto Peruano de Energía Nuclear: 159-162.
21. Muro Y, Okabe M. 2011. Mechanisms of fertilization-A view from the study of gene-manipulated mice. Journal of Andrology 32: 218-225. doi: 10.2164/jandrol.110.010900
22. Nishimura H, Myles D, Primakoff P. 2007. Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm. The Journal of Biological Chemistry 282: 17900-17907. doi: 10.1074/jbc.M702268200
23. Okabe M. 2014. Mechanism of fertilization: A modern view. Experimental Animals 63: 357-365. doi: 10.1538/expanim.63.357
24. Orozco-Ugarriza M, Franco-Anaya P, Olivo-Martínez Y. 2016. Validación *in silico* de oligonucleótidos-primers para la detección específica de *Salmonella* spp. mediante

- reacción en cadena de la polimerasa. *Revista de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible* 1: 42-50.
25. Padilla C, Ventura G. 2003. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para el diagnóstico de la bartonelosis causada por *Bartonella bacilliformis*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 20: 5-8.
 26. Pavia P, Cuervo C, Montilla M, Nicholis S, Puerta C. 2003. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología* 7: 129-136.
 27. Perry A, Gichuhi P, Jones R, Hall L. 1995. Cloning and analysis of monkey fertilin reveals novel alpha subunit isoforms. *Biochemical Journal* 307: 843-8507. doi: 10.1042/bj3070843
 28. Primakoff P, Myles D. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends in Genetics* 16:83-87. doi: 10.1016/S0168-9525(99)01926-5
 29. Seals D, Courtneidge S. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes & Development* 17: 3-30. doi: 10.1101/gad.1039703.
 30. Serrano-Martínez E, Tantaleón M, Quispe M, Casas G, Londoño B. 2016. Desarrollo de un PCR para la identificación del parásito *Dawestrema* (Trematoda: Monogenea) en el pez *Arapaima gigas*. *Revista de Investigación Veterinaria del Perú* 27: 581-588. doi: 10.15381/rivep.v27i3.11989
 31. Singh U, Deb R, Rahman R, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Dhama K, Sharma A. 2014. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine* 6: 49-58. doi: 10.1016/j.bgm.2014.03.001
 32. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2:70-78.
 33. Thornton B, Basu C. 2011. Real-Time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 39: 145-154. doi: 10.1002/bmb.20461.
 34. Waters S, White J. 1997. Biochemical and molecular characterization of bovine fertilin alpha and beta (ADAM1 and ADAM2): a candidate sperm-egg binding/fusion complex. *Biology of Reproduction* 56: 1245-1254. doi: 10.1095/biolreprod56.5.1245
 35. Wyckoff G, Wang W, Wu C. 2000. Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man. *Nature* 403: 304-308. doi: 10.1038/35002070.
 36. Zueter A, Binti A. 2018. Development and validation of conventional PCR for the detection of the sctQ gene. *Jordan Journal of Biological Sciences* 11:435-439.