



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS ASOCIADOS A LA ADAPTACIÓN
A ALTURA EN CUYES (*Cavia porcellus* L.)**

Línea de investigación:

Genética y biología molecular

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Milla Salinas, Denia Lizbet

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Iannacone Oliver, José Alberto
Bohorquez Meza, Isabel Doris
Riveros Ramirez, Maribel Denise

Lima - Perú

2024



IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS ASOCIADOS A LA ADAPTACIÓN A ALTURA EN CUYES (*Cavia porcellus* L.)

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

15%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
3	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
4	docplayer.es Fuente de Internet	1%
5	www.avocadosource.com Fuente de Internet	1%
6	www.eumed.net Fuente de Internet	1%
7	dokumen.site Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1%
9	es.wikipedia.org Fuente de Internet	



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS GENÉTICAS ASOCIADOS A LA ADAPTACIÓN A
ALTURA EN CUYES (*Cavia porcellus* L.)

Línea de investigación:

Genética y Biología Molecular

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Milla Salinas, Denia Lizbet

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Iannacone Oliver, José Alberto
Bohorquez Meza, Isabel Doris
Riveros Ramirez, Maribel Denise

Lima-Perú

2024

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre Denia que ha sido el pilar durante mi etapa académica y formación, ya que, siempre me animó a ser mejor, darme confianza en todo momento y que rendirme no era opción, porque siempre me incentivaste a alcanzar mis metas y a mi padre Celestino que con sus consejos, valores y principios me enseñó la humildad. A mis hermanos por su apoyo moral y sobre todo por su buen humor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor MSc. Ramsés Salas y por ser mi guía en este camino para el desarrollo de la tesis y sus enseñanzas en toda la carrera de pregrado.

A la MSc. Isabel Bohorquez en la etapa de pregrado, siempre con esas ganas de empujarme a dar lo mejor.

Agradezco también de manera sincera al Blgo. Erick Huaina, por su apoyo en mi formación académica y al desarrollo de la parte experimental de tesis, siempre tuve en cuenta tus palabras que todo es “forma y función”, eso me ayudó a entender los fundamentos de la biología y también por tus consejos el cual debo mi constancia y perseverancia para la redacción de la tesis y el logro con éxito del mismo.

Al Vicerrectorado de Investigación “VRIN” de la Universidad Nacional Federico Villarreal por el financiamiento para la culminación favorable del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Descripción y formulación del problema.....	10
1.2. Antecedentes	11
1.3. Objetivos	18
1.3.1. Objetivo general.....	18
1.3.2. Objetivos específicos	18
1.4. Justificación	18
1.5. Hipótesis	19
II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	20
2.1.1. Descripción de genes en roedores, bovinos y aves	20
2.1.2. Descripción de la especie.....	22
2.1.3. Descripción zoológica.....	23
2.1.4. Distribución y dispersión actual.....	23
2.1.5. Factores medio ambientales que afectan la producción en cuyes.....	24
A. Temperatura	24
B. Altitud.....	24
2.1.6. Efecto de la altitud en la producción de cuyes.....	25
III. MÉTODO	26

3.1. Tipo de investigación.....	26
3.2. Ámbito temporal y espacial	26
3.3. Variables	26
3.3.1. Variable dependiente	26
3.3.2. Variables independientes	26
3.4. Población y muestra.....	26
3.5. Instrumentos.....	27
3.6. Procedimientos.....	27
3.6.1. Procedimiento Bioinformático y PCR	27
A. Selección de genes de interés.....	27
B. Diseño de primers in silico y análisis.....	28
C. Condiciones de la PCR para cada gen.....	29
3.6.2. Procedimiento experimental	30
A. Extracción de ADN a partir de DNAzol	30
B. Extracción de ADN a partir de un kit.....	31
C. Extracción de ADN a partir de un kit con papel filtro	32
D. Calidad y cuantificación de ADN	32
3.6.3. Procedimiento y Análisis molecular.	34
A. Enriquecimiento de muestras para PCR.....	34
B. Electroforesis.....	34
C. Análisis molecular.....	35
3.6.4. Secuenciamiento	36
3.7. Análisis de Datos	36

3.8. Consideraciones Éticas	37
IV. RESULTADOS	38
4.1. Cuantificación de ADN.....	38
4.2. Análisis de visualización de los fragmentos de ADN.....	41
4.3. Análisis de secuenciamiento	50
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES.....	61
VIII. REFERENCIAS	62
IX. ANEXOS	71
Anexo A. Abreviaturas	71
Anexo B. Procedimiento de toma de muestra.....	73
Anexo C. Cuantificación de muestras por espectrofotometría y fluorometría	77
Anexo D. Estandarización y condiciones de PCR.....	79

RESUMEN

Objetivo: Identificación de secuencias genéticas asociados a la adaptación a altura en cuyes (*Cavia porcellus* L.). **Método:** Se analizaron un total de 20 cuyes, de los cuales 10 provenían de costa y las otras de sierra (Huaraz) a una altitud por encima de los 3000 msnm. La obtención de la muestra de sangre se realizó durante los meses de junio 2019 a marzo del 2020 y posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN, el análisis bioinformático, análisis molecular realizado con PCR convencional y el análisis de Secuenciamiento. Se eliminaron 8 secuencias de calidad deficiente evaluadas mediante análisis bioinformático. **Resultados:** Se demostró mediante análisis molecular, que los amplicones de la región *Epas1* se ubicaron en 173 pb para muestras de costa y sierra. Además, el análisis de similitud de la secuencia de esta región mostró una homología en *Cavia porcellus* con un porcentaje de identidad de 97.76%. Por otro lado, los amplicones de la región *Hif1a* presentaron bandas de 1418 pb, mientras que los de la región *Hmox1* no se ubicaron dentro del rango y aquellos de *Bcl6* no mostraron bandas. Finalmente, el análisis comparativo mediante alineamiento reveló que las secuencias de sierra presentaron un mayor número de eventos de inserción y deleción a diferencia de costa. **Conclusiones:** Se evidenció variaciones en las secuencias nucleotídicas de los productos amplificados que podrían estar asociadas a la adaptación de cuyes a la altura.

Palabras clave: *Epas1*, adaptación a la altura, *Cavia porcellus* L.

ABSTRACT

Objective: Identification of genetic sequences associated with adaptation to altitude in guinea pigs (*Cavia porcellus* L.). **Method:** A total of 20 guinea pigs were analyzed, of which 10 came from the coast and the others from the mountains (Huaraz) at an altitude above 3000 masl. The blood sample was obtained during the months of June 2019 to March 2020 and subsequently DNA extraction, bioinformatic analysis, molecular analysis performed with conventional PCR and Sequencing analysis were carried out. 8 sequences of poor quality evaluated by bioinformatic analysis were eliminated. **Results:** It was demonstrated by molecular analysis that the amplicons of the *Epas1* region were located at 173 bp for samples from the coast and mountains. In addition, sequence similarity analysis of this region showed homology in *Cavia porcellus* with an identity percentage of 97.76%. On the other hand, the amplicons of the *Hif1a* region presented bands of 1418 bp, while those of the *Hmox1* region were not located within the range and those of *Bcl6* did not show bands. Finally, the comparative analysis by alignment revealed that mountain sequences presented a greater number of insertion and deletion events as opposed to coast sequences. **Conclusions:** Variations in the nucleotide sequences of the amplified products that could be associated with the adaptation of guinea pigs to altitude were evidenced.

Keywords: *Epas1*, adaptation to altitude, *Cavia porcellus* L.

I. INTRODUCCIÓN

La familia Caviidae, en la cual está incluido el cuy (*Cavia porcellus* L.) o también llamado cobayo, tiene una gran importancia desde épocas remotas, ya que es una fuente de proteína muy consumida por la mayoría de las personas en el Perú y otros países (Flores et al., 2017).

Cabe recalcar que los cuyes en la sierra son criados en ciertas condiciones ambientales, lo cual resulta finalmente en la adaptación de la especie y de otros animales; sin embargo, al estar expuestos a estas variaciones climáticas repentinas podrían sufrir cambios fisiológicos desencadenándose, de esta manera, ciertas enfermedades pulmonares y respiratorias inducidos por la hipoxia donde, a su vez, intervienen genes que podrían estar asociados a las mismas enfermedades que se mencionan (Gonzales et al., 2021). Así mismo, se conoce hoy en día los genes que intervienen o que están relacionados al mal de altura o a la condición de hipoxia como el gen *Epas1* (Endothelial PAS Domain Protein 1) en el cual se han encontrado mutaciones a nivel del exón 12 de este gen.

En estos tiempos, los marcadores moleculares han facilitado numerosas aplicaciones relevantes y aportes en la tecnología animal, ahora existen varias herramientas que nos permiten identificar diferencias genéticas entre las poblaciones, tales como el uso de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para observar presencia y ausencia del gen de interés. Hasta el momento, no se han realizado estudios genéticos extensos en cobayos o cuyes domésticos de América del Sur (Avilés, 2016).

1.1. Descripción y formulación del Problema

El cuy (*Cavia porcellus* L.) es un animal que se ha criado y consumido en toda la región andina mucho antes de la llegada de los españoles a América (Morales, 1994; Defrance, 2006), siendo importante por valor proteico y su bajo contenido en grasa (Mantilla, 2012). En la actualidad, se estima una población estable a partir de 35 millones de cuyes domesticados en países andinos, siendo la población de Perú y Ecuador mayor a la de Bolivia y Colombia (Avilés et al., 2014).

La crianza de cuy se realiza frecuentemente en climas templados, puede adaptarse a climas fríos y puede ubicarse en zonas de costa y sierra hasta altitudes de 4500 msnm, presenta un rango de tolerancia de 10 a 44 °C, y los rendimientos óptimos se logran con temperaturas que oscilan entre 18 a 22 °C, y con una humedad relativa de 45 a 70 % (Caycedo, 2000). Las temperaturas extremadamente bajas vienen a ser una causa de mortalidad, principalmente en crías recién nacidas y las temperaturas superiores a 30 °C pueden afectar aspectos productivos, a pesar que los cuyes son considerados una especie rústica y son más tolerantes al frío que al calor, son susceptibles a enfermedades respiratorias (Morales, 1995).

La altitud afecta los rendimientos productivos y reproductivos del cuy, obteniéndose una pérdida de peso, provocando un alto porcentaje de mortandad (Caycedo, 2000). El cuy se ve afectado a mayor altitud por su bajo peso en relación a la producción de carne, originando cuadros de hipoxia y enfermedades respiratorias que podrían asociarse a la crianza a elevadas altitudes del nivel del mar (López, 2016).

Shao et al. (2015) indica que los animales de crianza como cuyes, aves y bovinos presentan capacidad para adaptarse a altitudes (mayores a los 3000 m.s.n.m) y sobrevivir en condiciones de poco oxígeno, características asociadas a una base genética. Según Newman et al. (2011) la

resistencia o sensibilidad a grandes altitudes, parece estar relacionada a polimorfismos genéticos, es decir, a variaciones en la secuencia nucleotídica de diferentes genes.

Por lo expuesto, la identificación de secuencias genéticas asociados a la adaptación a altura en cuyes, presenta un valor diagnóstico, ya que estos genes están presentes tanto en cuyes adaptados a la altura como en aquellos que no lo están; sin embargo, existen variaciones genéticas en estas regiones de interés que conllevan al desarrollo de enfermedades relacionadas con problemas respiratorios y otros males propios de la altura en animales no adaptados. Así mismo, resulta una aplicación directa sobre la crianza y la producción, por ende, incrementa el acceso a una valiosa fuente nutricional (INS, 2009).

Finalmente, este proyecto pretende responder a la pregunta: ¿Qué secuencias genéticas pueden estar asociados a la adaptación a la altura en cuyes (*Cavia porcellus* L.)?

1.2. Antecedentes

El estudio realizado por Chizu et al. (2016) analizaron un total de once cuyes machos como parte de su investigación sobre el asma, considerándose que, de estos once cuyes solo siete se utilizaron como modelos de asma y los cuatro restantes como controles. Además, la finalidad es analizar los cambios en los sonidos pulmonares durante la progresión del asma en cuyes revelándose una diferencia en el grado del sonido inspiratorio, así como, la relación entre el grosor de la pared de las vías respiratorias y el área total de las vías en bronquiolos terminales, siendo superior en los modelos de asma que en los controles, concluyéndose que el grado de sonido pulmonar se relaciona con el grosor de la pared de la vía área periférica y el grado de sonido inspiratorio se vincula con los cambios morfológicos en las vías respiratorias.

Según (Shao et al., 2015), la población que se tomó como referencia en este estudio fue un roedor pequeño (*Myospalax baileyi* conocido como zokor o pika) que habita en la meseta de Qinghai (Tíbet) a altitudes entre los 2000 a 4200 msnm. El objetivo principal de este estudio es estudiar las adaptaciones genéticas del zokor de meseta en madrigueras de gran altura. Así mismo, en los resultados obtenidos se encontró dos genes significativamente relacionados a la respuesta a hipoxia (EPAS1 y AJUBA) y presentan posiciones muy conservadas en alineaciones de secuencias de diversas especies. Por ello se concluyó que el zokor de la meseta puede adaptarse a muchos cambios que se relacionan con la altura y requiere de una mayor investigación, ya que el estudio es escaso sobre el mecanismo que tienen estos genes al ser expresados.

Lechner y Banchemo (1982) en su estudio tienen la finalidad de evaluar el desarrollo pulmonar avanzado en cuyes recién nacidos (*Cavia porcellus*), donde observaron una correlación significativa entre la hipertrofia crónica bronquial y la adaptación a altura en cuy; así mismo, se indicó que los bronquios y bronquiolos presentan una capa muscular más gruesa, en comparación con otros mamíferos. Esto a su vez podría estar asociado a su adaptación en las diferentes altitudes debido a las presiones ambientales adicionales que experimentan, y también estas características físicas y fisiológicas cambian a medida que los cuyes envejecen mostrando concordancia respecto a su edad.

Ravikumar et al. (2015) analizaron tres grupos de cuyes (*Cavia porcellus*) durante un período de siete años desde 1999 hasta el 2006 en diferentes altitudes, teniendo como objetivo principal evaluar la adaptación estructural persistente en los pulmones de cuyes criados a gran altura, el cual los autores buscaron comprender la relación entre la adaptación pulmonar y la altitud en cuyes a 3800 m.s.n.m s, considerando que varios genes podrían expresarse en un estado de hipoxia debido a los cambios de nucleótidos. Así mismo, observaron una diferencia en el volumen

alveolar en un lapso mayor de exposición a elevadas altitudes, o sea que, si los cuyes se crían a una altitud elevada por mucho tiempo, podrían estar más vulnerables a padecer alguna enfermedad relacionada a mal de altura o presentar una hipoxia severa.

Wu et al. (2015) mencionan que los especímenes utilizados fueron mamíferos bóvidos de tres razas de yak que vivían en diferentes altitudes en la meseta Tibetana de Qinghai en el condado de Yadong (4500 m de altitud), en Luqu (3500 m de altitud) y el condado de Tianzhu (2700 m de altitud), donde el estudio pretende examinar los efectos del gen EPAS1 (gen de la proteína 1 del dominio PAS endotelial) en los parámetros hematológicos en yak, y además en este estudio se detectó la expresión de ARNm de EPAS1 en los ocho tejidos (corazón, hígado, pulmón, bazo, páncreas, riñón, músculos y ovario). Las expresiones de EPAS1 en pulmón y páncreas fueron extremadamente más altas que en otros tejidos examinados. Se identificaron y genotiparon tres nuevos polimorfismos de nucleótido único (SNP) en las tres razas de yak. Se concluye que este estudio contribuyó a entender la función biológica del gen EPAS1 de yak en respuesta a la hipoxia e indican que EPAS1 podría aportar en la adaptación a la hipoxia del yak.

Dong et al. (2014) consideraron un total de 217 cerdos para este estudio de diferentes poblaciones de la región Autónoma del Tíbet de China entre 2000 y 3000 msnm de altitud. El objetivo es estudiar la variación genética del gen EPAS1 en cerdos tibetanos y tres razas de cerdos de baja altitud en China. Así mismo, indicaron que los cuadros clínicos estaban relacionados con la hipoxia en zonas ubicadas por encima de los 3000 msnm, identificándose un mayor número de polimorfismos en el exón 12. Este estudio concluye que la variación genética de EPAS1 es diferente con respecto a las poblaciones de cerdos tibetanos analizados y que estas variaciones genéticas como SNP1, SNP7, SNP10, SNP11 y el haplotipo H1 pueden estar relacionados con la adaptación a gran altitud de los cerdos tibetanos.

Según Quispe (2011) el propósito del estudio es determinar las adaptaciones hematológicas de los camélidos sudamericanos que viven en zonas de elevadas altitudes, a su vez la hipoxia como factor estresante también ha desencadenado la modificación de adaptaciones morfológicas y fisiológicas (hematológicas y circulatorias) en animales de crianza como los camélidos (*Lama glama* y *Vicugna paco*) para enfrentar la menor concentración de oxígeno, la aclimatación a elevadas altitudes implica el incremento de la concentración de la hemoglobina, lo que conlleva a mejorar la capacidad de transporte de oxígeno. Finalmente, en esta investigación los camélidos evolucionaron con respecto a las adaptaciones fisiológicas vinculadas al suministro de oxígeno en las células tisulares, presentando mejores mecanismos de captación de oxígeno a nivel pulmonar, lo cual permite que la hipoxia en zonas altoandinas no afecte de manera desfavorable a los camélidos.

Gou et al. (2014) en este estudio se estimó a 60 perros de seis razas que viven en diferentes altitudes, donde consideraron una altitud alta (mayor a 3000 m), media (entre 2000 a 3000 m) y baja (menor a 2000 m) en la meseta de Ancient Tea Horse Road y teniéndose como propósito el análisis de la secuenciación del genoma completo de seis razas de perro de altitudes continuas revelan la adaptación a hipoxia a gran altitud. Se infiere en este estudio que se hallaron cuatro nuevas mutaciones distintas específicamente para perros de gran altitud en EPAS1, siendo una de ellas origen en un sitio específico y conservado en el dominio PAS. La prueba de asociación entre los genotipos EPAS1 y los fenotipos relacionados con la sangre en perros de gran altitud revela que la mutación homocigota se asocia con una menor resistencia al flujo sanguíneo, lo que puede ayudar a mejorar la aptitud hemorreológica. Finalmente, se señala la evolución paralela de humanos y perros en la adaptación a la hipoxia a gran altura.

Appenzeller et al. (2006) evaluaron la hipoxia crónica en un total de veinte pacientes andinos con residencia en Cerro de Pasco a una altitud mayor a los 4000 msnm, resultando que diez pacientes no presentaban el mal de montaña crónico y los otros sí lo presentaban, lo que evidencia una mayor significancia en la expresión génica asociada al gen HMOX1, mostrando una disminución de su expresión cuando los pacientes se encontraban en un estado de normoxia o estado fisiológico normal. Así mismo, estos autores refieren que los factores genéticos podrían ayudar al desarrollo de la enfermedad relacionada al mal de montaña crónico. Además, en la extracción del ARN a partir de glóbulos blancos es necesaria para la evaluación de la expresión génica del gen HMOX1, el tamaño de la muestra era demasiado pequeño para realizar las comparaciones con pacientes de otros lugares de mayores altitudes. Por tal razón, los controles utilizados para esta evaluación fueron de diez pacientes normales de Pueblo Colorado (EE. UU), ya que en Pasco los pacientes presentan mucha variación en su origen étnico.

Li et al. (2019) se analizaron a 401 pacientes chinos Han con infarto de miocardio y 409 controles, así mismo la finalidad de este estudio es encontrar una asociación de polimorfismos funcionales en genes expresados en células endoteliales y células musculares lisas con el infarto de miocardio; de los resultados obtenidos no mostraron ninguna asociación entre los tres SNP polimorfismos que se relacionen con el riesgo de infarto de miocardio en pacientes chinos y finalmente concluyeron que la variación genética de PECAM1 rs1867624 y HIF1A rs2057482 puede mediar los niveles de lípidos en pacientes con infarto de miocardio.

Gladek et al. (2017) realizaron un estudio de una revisión gráfica de 97 estudios de asociación en humanos, siendo el propósito de este estudio era encontrar los polimorfismos del gen HIF1A y enfermedades humanas, en el cual se ha comprobado que los cambios en la secuencia de nucleótidos o la expresión de HIF1A (factor 1 inducible por hipoxia, subunidad alfa) están

asociados con el desarrollo de varias enfermedades. En los resultados obtenidos en esta revisión se identificaron un total de 34 SNP (polimorfismo de nucleótido simple), de los cuales solo 16 SNP mostraron una asociación significativa de 40 fenotipos diferentes y que además que estas podrían estar relacionados a la adaptación a gran altitud ubicados a nivel del exón 12 e intrón 13.

Cao et al. (2017) realizaron un estudio en 83 trabajadores de construcción que padecían la enfermedad de edema pulmonar a gran altitud en la ciudad de Yushu en Qinghai, china (3800 m.s.n.m) y se comparó con otros 145 pacientes que se encontraban sanos. El objetivo de este estudio fue relacionar el polimorfismo de microsatélites en el promotor del gen Hemo oxigenasa-1 (HMOX1) y el edema pulmonar de gran altitud (HAPE) en chinos Han. Los resultados obtenidos mostraron que los pacientes con HAPE tienen un nivel de leucocitos, un ritmo cardíaco y una presión arterial pulmonar más elevados; sin embargo, presentan un nivel de hemoglobina y una saturación de oxígeno arterial más bajas que las personas sanas sin HAPE. El número de repeticiones (GT)_n en el promotor del gen HMOX1 mostró una distribución bimodal. A pesar de ello, no existe una diferencia significativa en la frecuencia de genotipos y alelos entre pacientes con HAPE y sujetos sanos sin HAPE. El análisis de la prueba de chi-cuadrado revela que la frecuencia del genotipo de las repeticiones (GT)_n no está asociada con HAPE. Finalmente, los autores concluyeron que el polimorfismo identificado a nivel del promotor del gen HMOX1 no estaba asociado con el edema pulmonar a gran altitud en chinos.

Guo et al. (2017) recolectaron muestras de sangre periférica de 589 pacientes con CAD (enfermedad de arterias coronarias) y 860 controles sanos, y se obtuvieron 12 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). El objetivo es la correlación entre polimorfismos genéticos dentro de la vía de señalización MAPK1/HIF-1/HO-1 y el riesgo o pronóstico de enfermedad arterial coronaria perimenopáusia; teniéndose como resultado que el gen HIF-1 indicaron correlaciones notables

entre los SNP combinados de rs1087314 y rs2057482 y el riesgo de CAD perimenopáusica (OR: 1,24, IC del 95 %: 1,01-1,53, $P < 0,05$; y OR: 0,71, IC del 95 %: 0,55- 0,91, $P < 0,05$, respectivamente). Finalmente, se concluyó que las mutaciones genéticas dentro de MAPK1 (rs6928, rs9340, rs11913721), HIF-1 (rs1087314, rs2057482) y HO-1 (rs2071746) podrían alterar la susceptibilidad a la EAC perimenopáusica en esta población china.

En cuyes se presentan diferentes estímulos a lo largo del tiempo que generan estrés y las respuestas podrían variar desde alteraciones en su aspecto fisiológico hasta el reproductivo, siendo que estos lleguen a presentar un menor tamaño y en algunos casos pueden generarse cambios al nivel genético (Prosser y Brown, 1961).

Los antecedentes se indicarán en humanos también, ya que el reporte en animales es bajo sobre todo en animales menores como cuyes y ganados vacunos o incluso en otros estudios relacionados a la altura o sobre variaciones genéticas, por ello el objetivo de realizar este estudio en cuyes es de importancia económica y nutricional.

Por último, en la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, a la fecha no se han reportado estudios que contribuyan a la identificación de secuencias genéticas asociados a la adaptación a la altura en cuyes, por lo cual sería el primero en este tema.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Identificar secuencias genéticas asociados a la adaptación a altura en cuyes (*Cavia porcellus* L.).

1.3.2. Objetivos específicos

- Diseñar primers o cebadores específicos para identificar secuencias genéticas asociados a la adaptación a altura.

- Identificar variaciones en la movilidad electroforética de algunos productos de amplificación que permitan asociarlos con posibles fragmentos genéticos relacionados a la adaptación a altura en cuyes.

- Identificar variaciones en la secuencia de nucleótidos de los amplificados que posiblemente estén asociados a la adaptación a altura en cuyes.

1.4. Justificación

La identificación de variaciones en la secuencia nucleotídica de genes asociados a la adaptación a altura, permitirá diseñar programas de mejoramiento genético para adaptar más variedades de cuyes a alturas muy por encima de los 3000 metros sobre el nivel del mar. Este aporte contribuirá al mejoramiento genético, conllevando una mayor producción de carne y comercialización que satisfagan la creciente demanda, generándose mayores ingresos económicos y de desarrollo en el Perú (Zaldívar y Chauca, 1991).

1.5. Hipótesis

No se aplica debido a que es un estudio de corte descriptivo.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

Las únicas razas de cuy que se adaptaron a las características climatológicas de la Sierra (Pulgar, 1952 y Cabrera, 1953) resultan: peruano mejorado, Inti y Andina, ya que estas razas son resistentes a los cambios de clima y su capacidad de adaptación es alta (López, 2016).

2.1.1. Descripción de genes en roedores, bovinos y aves

Para la descripción de cada uno de los genes nos apoyaremos en la base de datos del Uniprot según Chen et al. (2012). A continuación, se hace referencia de los genes que influyen o participan dentro de los procesos de hipoxia a diferentes altitudes (ver Anexo A):

A. EPAS1. Conocida como proteína del dominio endotelial PAS o también conocido como factor inducible de la hipoxia 2 alpha (HIF-2A) es una proteína que en los seres humanos está codificada por el gen EPAS1, el cual es un tipo de factor inducible en situaciones de hipoxia, es decir, un grupo de factores de transcripción involucrados en la respuesta del organismo al nivel de oxígeno presente en el ambiente. Las vías y los mecanismos de regulación de la expresión de HIF-2A es muy similar a HIF-1A tanto durante la normoxia como en respuesta a la hipoxia. Aunque HIF-1 y HIF-2 tienen la capacidad de unirse y activar transcripcionalmente muchos de los mismos genes, estos presentan diferencias en sus respuestas a la hipoxia. Una de estas diferencias y tal vez la más importante es que HIF-2A promueve la transcripción del gen que codifica la eritropoyetina, esto fue evidenciado durante un caso de hipoxia en un modelo animal (Tissot y Gassmann, 2011).

B. HMOX1. Es la enzima que participa directamente en el catabolismo o degradación del grupo hemo; sus productos son monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina. En una reacción posterior, la biliverdina reductasa produce bilirrubina a partir de biliverdina. En un inicio fue considerada como proteína de choque térmico. La mayor actividad de HMOX1 se encuentra en el bazo, aunque se ha detectado en otros tejidos como el cerebro (Orozco y Pedraza, 2010). Se le atribuyen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas, no sólo por su actividad propiamente, sino por los productos que ella es capaz de generar. Su expresión se incrementa considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citocinas y una gran variedad de estímulos. (Sánchez et al., 2005).

C. HIF1A. El gen del Factor inducible por hipoxia o HIF-1 es un factor de transcripción que funciona como un regulador eficiente de la homeostasis de oxígeno (Mazorra et al., 2021). El rol fundamental de este factor en la homeostasis del oxígeno se centra en facilitar este suministro a los tejidos en situaciones de hipoxia, como en la aclimatación a la hipoxia hipobárica o en la respuesta molecular hipoxemia/inflamación que prevalecen durante la sepsis. El HIF-1 está distribuido en casi todos los tejidos del cuerpo. Con la normoxia se degrada en la proteasoma previa hidroxilación; sin embargo, en situaciones de hipoxia crece exponencialmente. Su presencia activa numerosos genes que ejercen una acción citoprotectora, facilitando un mayor aporte de oxígeno a los tejidos y una mejor utilización (Avellanas, 2017).

D. BCL6. Es conocido como linfoma de células B 6 (BCL6) funciona como un represor transcripcional específico de secuencia y como regulador negativo de muchas proteínas de señalización. La expresión del gen BCL6 es esencial para la organización y funcionamiento óptimo de centros germinales, lo que a su vez es crítico para la producción de anticuerpos de alta afinidad y la respuesta inmunitaria efectiva del organismo. (Basso y Dalla-Favera, 2010). La

función normal de BCL6 en la formación de centros germinales y la respuesta inmunitaria, así como la desregulación presenta un impacto significativo en la salud y la capacidad de respuesta del sistema inmunológico en los animales (Iglesias, 2017). Por otro lado, menciona Goyal et al. (2013) que, en especies como ovejas, así mismo en humanos la regulación del flujo sanguíneo cerebral puede verse afectada por la exposición a elevadas altitudes, lo que puede influir en la adaptación a condiciones de hipoxia. Esto produce cambios en la expresión genética de vías de señalización en las arterias carótidas ovinas. Dentro de los genes regulados negativamente incluyen al BCL6 donde ubicaron sitios comunes de unión para áreas represoras de la transcripción.

2.1.2. Descripción de la especie

El cuy o cobayo (*Cavia porcellus* L.) es un mamífero roedor originario de la zona andina del Perú, Ecuador, Colombia y Bolivia. Este es un animal productor de carne, se le conoce también como curí. Contiene un alto valor biológico, siendo de una alternativa por sus diversos beneficios. Contribuye en dar seguridad alimentaria a la población rural de escasos recursos. Por su capacidad de adaptación a diversas condiciones se puede encontrar a este animal desde la costa hasta los 4,500 m.s.n.m y tanto en zonas frías como cálidas (Chauca, 1997). El cuy es considerado en el Perú como una especie animal de interés social por ser fuente alternativa de proteína animal (INIA, 2011).

La población de cuyes en Latinoamérica se estima en 35 millones, siendo el Perú el primer productor con 22 millones de cuyes que habitan mayormente en zonas pobres del país. Se producen 17,000 toneladas de carne al año, destinados principalmente al autoconsumo (INIA, 2011).

2.1.3. Descripción zoológica

Según Moreno (1989), se coloca al cuy en la siguiente clasificación zoológica:

Orden: Rodentia

Suborden: Hystricomorpha

Familia: Caviidae

Género: *Cavia*

Especie: *Cavia porcellus* Linnaeus

2.1.4. Distribución y dispersión actual

El hábitat del cuy es muy extenso, se han detectado numerosos grupos en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Noroeste de Argentina, y Norte de Chile, distribuido por el eje de la cordillera andina. Probablemente el área que ocupa Perú y Bolivia fue el hábitat nuclear de los cuyes del género *Cavia* (Cabrera, 1953). Este roedor vive debajo de los 4500 m.s.n.m. hasta la costa y la selva alta. El hábitat del cuy silvestre según la información zoológica, es aún amplio. Ha sido registrado desde el Caribe y las Antillas en Centro América hasta el Sur del Brasil, Uruguay y Paraguay en Sudamérica (Pulgar, 1952).

2.1.5. Factores medio ambientales que afectan la producción en cuyes

Un adecuado equilibrio de los factores medioambientales, como son la temperatura y humedad relativa, permiten un óptimo estado de las instalaciones, sin embargo, los estudios realizados sobre estos factores son escasos, razón por la cual el productor no utiliza técnicas

adecuadas que permitan dar un manejo eficiente a su explotación afectándose los rendimientos en peso, el consumo de alimento, la natalidad y aumentando la mortalidad (Romero, 2014).

A. Temperatura. El clima es uno de los factores naturales más importantes del medio ambiente que afecta al individuo. El animal debe mantenerse en un ambiente cuya temperatura le permita vivir sin estar expuesto al frío y al calor excesivo. En un estudio sobre diferenciación reproductiva, productiva y molecular de cuyes nativos (Mantilla, 2012), observó una mayor resistencia a temperaturas bajas y enfermedades respiratorias como neumonía y otras como coccidiosis. Se sabe también que no todos los animales responden de igual manera a un mismo medio térmico; las razas locales son generalmente más resistentes o están mejor equipadas para la termólisis (Chemineau, 1992). Findlay (1968) menciona que la temperatura, humedad, movimientos del aire, lluvia y radiación solar tienen efecto sobre el ganado y que la temperatura excesiva sobre 18 °C a 21 °C afectan la homeotermia y la producción de los animales en zonas templadas; el tipo y color de pelo tienen efectos sobre la respuesta al calor, evaporización y respiración de los animales y aquellos que presentan mayor producción son los más afectados por el medio ambiente.

B. Altitud. Mantilla (2012) menciona que el mal de altura es una patología en cuyes es provocada por la baja temperatura y la menor presión de oxígeno (hipoxia) que existe en las zonas elevadas del Perú. Presentándose una hipertensión arterial pulmonar, hipertrofia e insuficiencia cardíaca derecha y en el caso de los pollos ascitis. El síndrome ascítico es una de las principales causas de mortalidad en aves de producción de carne, siendo la hipoxia el factor desencadenante a la que se suma la respuesta del organismo mediante la liberación de diversas sustancias que conducen al cuadro patológico, tales como endotelina 1 (ET-1), óxido nítrico (ON),

prostaglandinas y diversas citoquinas inflamatorias. Las variaciones en la producción del óxido nítrico afectan de forma directa la proliferación de la musculatura lisa de las arteriolas pulmonares y produce como mecanismo compensatorio una hipertrofia cardíaca derecha (Vásquez, 2012).

2.1.6. Efecto de la altitud en la producción de cuyes

Según Burga (1969), existe superioridad en cuanto a la ganancia de peso en los cuyes nacidos y criados en la costa, que los nacidos y criados en la sierra. Por otro lado, Cueva (1989) al evaluar el efecto de la hipoxia de altura sobre el cuy mejorado, observó que la conversión alimenticia se elevó con un índice de 5 a 20.8 durante la primera semana de exposición a la altura, este valor, disminuyó paulatinamente para alcanzar a las siete semanas una conversión alimenticia de 6.8 no presentándose ningún caso de mal de altura.

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

De tipo descriptivo, línea de investigación principal: Genética y Biología Molecular.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El trabajo de investigación se inició con la obtención de la muestra durante los meses de junio 2019 a marzo del 2020 y en la actualidad se llevó a cabo la extracción de ADN, el análisis molecular y bioinformático en el Laboratorio de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal hasta el mes de julio del 2023.

3.3. Variables

3.3.1. *Variable dependiente*

Adaptación a altura de cuyes.

3.3.2. *Variables independientes*

Secuencias genéticas cuyas variaciones se van a evaluar durante el análisis tanto para cuyes de la costa y sierra.

3.4. Población y muestra

Cuyes de cuarta generación de (i) líneas mejoradas en el INIA y totalmente adaptados a la Costa, y (ii) cuyes mantenidos por cuarta generación en altitudes por encima de los 3000 m.s.n.m en las comunidades altoandinas en la ciudad de Huaraz, Ancash. Se consiguieron 10 ejemplares de ambas poblaciones (5 machos y 5 hembras), para la costa y sierra respectivamente. A continuación, se procedió a obtener la muestra de sangre a fin de extraer ADN para realizar el análisis electroforético (ver Anexo B). De un total de 20 individuos tanto para costa y sierra, se

consideró usar este tamaño muestral para el trabajo de investigación, ya que, este es de tipo descriptivo y no se ha considerado realizar una correlación o evaluar otros parámetros dentro del estudio.

3.5. Instrumentos

- Computadora: permite diseñar los primers, analizar el tamaño de los fragmentos amplificados y luego diferenciarlos en animales adaptados o no a la altura.
- Termociclador: para realizar un amplificado de las secuencias genéticas escogidas para el presente trabajo.
- Cámara electroforética: permite separar fragmentos de ADN según su tamaño o pesos moleculares.
- Secuenciador MinIon Mk1C: permite obtener la secuencia de nucleótidos de genes individuales y de fragmentos genéticos o genomas pequeños, como de plásmidos o virus.

3.6. Procedimientos

3.6.1. Procedimiento bioinformático y PCR

A. Selección de genes de interés. Para el análisis de los genes se utilizaron los programas bioinformáticos como el NCBI (Base de datos de búsqueda de información del Centro Nacional de Biotecnología), donde se realizó la búsqueda y selección de genes (Goad, 1982). Para el análisis de homologías de las secuencias seleccionadas se usó el programa ClustalW server, donde se realizó la lectura de las secuencias y selección de secuencias homólogas en genomas de animales de crianza (*Cavia porcellus* L.) (Higgins y Agudo, 1988). Se utilizó la calculadora NEB Tm (servidor New England BioLabs) (Comb, 1974). Luego se evaluaron los primers de interés en base a las reglas básicas de un diseño, entre ellas se consideró: El % de GC (porcentaje de guaninas y citosinas) entre 50 a 60 %, temperatura de fusión: de no más de 5°C uno del otro, el número de

nucleótidos: no deben diferir de cinco nucleótidos uno del otro, la temperatura de anillamiento (Ta) entre 60 a 65 °C. Finalmente, para la calidad de los primers se usó la herramienta Primer-Blast de la base de datos del NCBI (Goad, 1982).

B. Diseño de primers in silico y análisis. Para la amplificación de las secuencias genéticas se diseñaron primers o cebadores para los genes *Epas 1*, *Hmox 1*, *Bcl6* e *Hif1a* (Tabla 1).

Tabla 1

Composición y características de los primers o cebadores para las secuencias genéticas de Epas 1, Hmox 1, Bcl6 e Hif1a.

Genes	Primer/T°	Secuencia de primers	Concentración	%GC	T°fusión
Epas1	Primer		500 nM		
	Primer 1	F: CCTTCCTCCTGGACAAATACC	21nt	52%	Tm:
	Primer 2	R: CCACTGTGTGTTGGATCTGC	20nt	55%	65°C
	Ta		66°C		Tm:66°C
Hmox1	Primer		500 nM		
	Primer 1	F: CACCAAGGAGGTGCACAC	18nt	61%	Tm:
	Primer 2	R: CTGCTTGAACCTTGGTGGC	18nt	56%	66°C
	Ta		65°C		Tm:64°C
Bcl6	Primer		500 nM		
	Primer 1	F: GACAGCTGTATCCAGTTCACC	21nt	52%	Tm:
	Primer 2	R:	23nt	48%	65°C
	Ta	GCAGATTACACTTCTCGCAATGG	66°C		Tm:66°C
Hif1a	Primer		500 nM		
	Primer 1	F: CCACAGCTGACCAGTTACG	19nt	58%	Tm:
	Primer 2	R: CGTACATCAAGGGGATGGC	19nt	58%	66°C
	Ta		67°C		Tm:66°C

Nota. F) Forward, R) Reverse, nM) nanomoles, nt) nucleótidos, Tm) temperatura de fusión, %GC)

Porcentaje de guaninas y citosinas, Ta) Temperatura de anillamiento. Fuente de elaboración propia.

En la Tabla 2, mencionamos los resultados que se obtuvieron en el PCR in silico, con un tamaño de productos amplificados en un rango de 173 a 1978 pb (pares de bases) en la especie *Cavia porcellus* L. para cuatro genes.

Tabla 2

Tamaño del producto amplificado en el PCR in silico durante el diseño de los primers.

Genes	Especie <i>Cavia porcellus</i> L. Tamaño de producto (pb)
Epas1	173
Hmox1	481
Bcl6	1978
Hif1a	1418

Nota. Elaboración propia.

C. Condiciones de la PCR para cada gen. La amplificación de la secuencia del gen Hmox 1 se realizó con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, hibridación a 65°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para el gen Epas 1 se usó una temperatura de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, hibridación a 66°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos y el gen Bcl 6 al igual que el Epas 1 se usó las mismas condiciones y rangos para su amplificación, finalmente el gen Hif1a presentó una temperatura de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, hibridación a 67°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos, con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para preparar el Mix y realizar la PCR se tuvo en cuenta un volumen final de reacción de 25 µL (12,7 µL de agua grado Biología Molecular, 2,5 µL

de Buffer 10X, 1,5 μ L de sulfato de magnesio, 0,3 μ L de Taq polimerasa, 1 μ L de DNTPs, 2 μ L de cada tipo de primer y finalmente 3 μ L del molde de DNA (ver Anexo D).

3.6.2. Procedimiento Experimental

La muestra de sangre se obtuvo en las zonas de beneficio de criaderos de cuyes en las ciudades de Lima y Huaraz, obteniéndose 1 ml de sangre en tubos eppendorf con reactivo DNAzol y en posteriores colectas se obtuvo un total de 5 ml de sangre para tubos de ensayo con anticoagulante ACD (Ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa). Luego se procedió a colocar 100 μ L de sangre en filtros de papel (marca Whatman con un diámetro de 15cm) para su análisis y/o procesamiento (ver Anexo B). Por tanto, los procedimientos se realizaron en el transcurso de las horas, siendo almacenadas a una temperatura de 4 °C mediante cadena de frío y evitando movimientos bruscos durante el transporte de las muestras (INS, 2009).

A. Extracción de ADN a partir de DNAzol. Para la extracción del ADN nos basamos en el método planteado por Cox (1968) o mencionado en el protocolo del reactivo DNAzol ya estandarizado. Se tomaron 0.5 mL de etanol al 100 % y 1 mL de DNAzol; seguidamente se agitó unos segundos y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó todo el sobrenadante a otro tubo, dejando en el precipitado el DNA. Para ello se agregó 0.8 mL a 1 mL de etanol al 75 % (se agitó por inversión de tres a seis veces), dejando en reposo entre 30-60 segundos. Luego se procedió a retirar el sobrenadante y se repitió 3 veces todo el procedimiento. Luego se secó al aire evitando alguna contaminación en la muestra entre 5 a 15 segundos. Finalmente se agregó hidróxido de sodio 8 mM a 0.2 a 0.3 μ g/ μ L, siendo un total de 0.0032 gramos agregados en el tubo eppendorf. Finalmente, se almacenó a 4°C hasta su procesamiento y análisis.

B. Extracción de ADN a partir de un Kit. Se utilizó el protocolo de extracción Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Primero se colocó 100 uL de la sangre de cada cuy en baño maría o bloque de calor a 55° C, y con una pipeta Pasteur se extrajo la capa leucocitaria de la zona intermedia del tubo. Se colocó en un microtubo estéril 200 uL de la capa extraída y se agregó 20 uL de Proteinasa K y 20 uL de ARNasa, se mezcló bien y se incubó a T° ambiente durante 2 minutos para luego agregar a la mezcla anterior 200 uL Buffer de Lisis. Se mezcló bien con un vórtex hasta obtener una solución homogénea, nuevamente se incubó durante 10 minutos a 55°C para promover la acción enzimática. Se agregó 200 uL de alcohol Etanol Absoluto de 100% al lisado y se mezcló bien durante 5 a 10 segundos hasta obtener una solución homogénea. Se colocó aproximadamente 640 uL del lisado preparado en un tubo de centrifugado conteniendo la columna de extracción (Pure Link Spin Column). Se colocó todo en un tubo colector (Pure Link Collection Tube) y se centrifugó a 10000 g durante 1 minuto a 20° C. Se descartó el tubo colector usado y luego se adicionó al tubo de centrifugado 500 uL del Buffer de lavado 1 preparado con alcohol etanol. Seguidamente se colocó el tubo en un tubo colector limpio y se centrifugó nuevamente el tubo a 10000 g durante 1min a 20° C. Se agregó 500 uL del Buffer de lavado 2 preparado con etanol y se centrifugó a 20000 g durante 3 min a 20° C. Se colocó la columna de extracción en un microtubo estéril de 1,5 ml previamente rotulado descartándose el tubo colector usado. Seguidamente se le adicionó a la columna 100 uL del Buffer de Elución (dependiendo el nivel de concentración deseado). Se incubó a T° ambiente durante 1 minuto, seguidamente se centrifugó el microtubo conteniendo la columna de extracción a 20000 g durante 1 minuto a T° ambiente. Se removió y descartó la columna de extracción y se almacenó el DNA purificado en Buffer de elución a -20°C.

C. Extracción de ADN a partir de un Kit con papel filtro. Se utilizó el protocolo de extracción Qiamp DNA Mini Kit, Qiagen (2016). Primero se cortó el papel filtro en tamaños de 6x6 mm y se distribuyeron en tubos eppendorf, luego se procedió a colocar el buffer ATL (180 ul) y se incubó 10 minutos, seguidamente se realizó un spin a todas las muestras. Una vez separada la sangre se agregó 25 ul de proteinasa K y se dejó incubar a 56°C overnight, ya que las muestras estimaban varios meses desde su colecta. Luego se sacaron las muestras del baño maría y se añadió 200 ul de buffer AL (vortexear por 15 segundos), se incubó a 70°C por 10 minutos, se centrifugó y seguidamente se procedió a colocar etanol al 100%, se realizó un vortex y un spin, luego se pasó el sobrenadante a las columnas con filtro y se centrifugó a 6000xg (8000 rpm) por un minuto. Seguidamente se añadió 500 ul del primer buffer de lavado (AW1) a la columna spin y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Finalmente se realizó el segundo lavado agregándose 500 ul de buffer (AW2) y se centrifugó a 14,000 rpm por tres minutos y se descartó el tubo colector para proseguir con la columna spin y colocarlo en un eppendorf, luego se añadió 200 ul de buffer de Elución (AE) dejando incubar por un minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 8000 rpm por un minuto y se conservó a -20°C.

D. Calidad y cuantificación de ADN. Para la cuantificación y calidad del ADN extraído se usó dos tipos de cuantificadores (ver Anexo C):

D1. Cuantificación por espectrofotómetro. El ADN extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Hercuvan (ND-2800) para validar que la concentración de ADN sea óptima antes de llevar a cabo el procedimiento de la PCR convencional. Además, se evaluó la pureza de las muestras usando como indicadores la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260nm y 280nm. Para el proceso de cuantificación se pipeteó 1ul de muestra y se colocó directamente sobre la superficie de medida y se procedió con la lectura. Cuando las muestras se

cuantificaron se registró los valores de 260/280 nm y 260/230 nm para cada muestra, los valores de buena calidad deben estar entre 2 a 2.2 y mayor a 1.5 respectivamente.

Así mismo, la cantidad de ADN para cada método de extracción se determinó mediante el método por espectrofotometría con el análisis de la absorción de Luz Ultravioleta (UV), ya que los nucleótidos tienen un límite máximo de absorción alrededor de 260 nm. Igualmente, esta metodología proporcionó una estimación simple y precisa de la concentración de la muestra, pero sólo si ésta se encuentra pura, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorben a longitudes de onda cercanas.

D2. Cuantificación por fluorómetro Qubit. Se realizó la cuantificación del ADN utilizando el equipo fluorómetro Qubit (Invitrogen). Para ello, se utilizó el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit y preparó un mix teniendo en cuenta el número de muestras a cuantificar más dos reactivos estándares y una muestra extra, siguiendo la siguiente proporción: 199 uL de Qubit HS buffer más 1uL de Qubit HS reagent. Se aseguró que los reactivos estuvieran a temperatura ambiente antes de su uso, porque esto puede influir en la medición correcta de la cuantificación del ADN. Luego, se rotuló los tubos para Qubit usando los números de las muestras y 2 para los estándares: STD1 y STD2. A los tubos estándares se agregó 190 uL del mix preparado y se completó con 10 uL del estándar correspondiente, obteniéndose 200 uL de volumen final. A los tubos de las muestras se agregó 198 uL del mismo mix y se completó con 2 uL de muestra (ADN purificado), obteniéndose 200 uL de volumen final. Seguidamente, se homogenizó los tubos en el vortex durante 5 segundos y luego se dio un spin e incubó al menos 2 minutos a temperatura ambiente y se evitó la exposición excesiva a la luz. Por último, se insertó el primer tubo con muestra en el equipo y luego se presionó Calculate stock concentration, se seleccionó 2 uL y se

cambió la unidad de medida a ng/uL. Se registró este valor y lo mismo se realizó para todas las muestras y cada muestra debe tener una concentración inicial de al menos 10 ng/uL.

Finalmente, el ADN extraído a partir de sangre de 20 cuyes fue cuantificado mediante espectrofotómetro o fluorómetro, para posteriormente realizar el análisis molecular y secuenciamiento.

3.6.3. Procedimiento y análisis molecular

A. Enriquecimiento de muestras para PCR. Se enriqueció o repotenció los amplificadores para obtener mejor nitidez en las bandas que se observaron inicialmente, el cual este procedimiento incluyó agregar Master Mix (12,7 μ L de agua grado Biología Molecular, 2,5 μ L de Buffer 10X, 1,5 μ L de sulfato de magnesio, 0,3 μ L de Taq polimerasa, 1 μ L de dNTPs, 2 μ L de cada tipo de primer y finalmente 10 μ L del amplificado de ADN inicial), seguidamente se realizó la PCR en el termociclador con las mismas condiciones que se señalaron anteriormente para luego desarrollar la electroforesis y su posterior análisis de las bandas.

B. Electroforesis. Para el procedimiento de la electroforesis se preparó el buffer (Tris acetato-buffer TAE 50X, marca Cleaver scientific) de 50X para un litro de buffer al 1X (10 mL de TAE 50X y 990 mL de agua destilada). Seguidamente se agregó 2 g de agarosa (marca Cleaver Scientific) con 100 mL de buffer a 1X en un matraz para calentarlo en un horno microondas hasta que esté totalmente disuelto (100°C) y se torne un color transparente, seguidamente cuando la agarosa se mantuvo a una temperatura entre 45 a 50°C, pero no fría, ya que, se pudo gelificar dentro del matraz. Listo el gel de agarosa se vertió en el soporte con el peine (forman los pocillos) y sujetadores, esperado unos 30 minutos aproximadamente, se retiró los sujetadores y el peine cuando estaba totalmente gelificado. Se sumergió el gel de agarosa en tampón o buffer 1X dentro

de la cubeta de electroforesis, cubriendo todo el gel. Luego las muestras amplificadas previamente y homogenizadas se colocaron 5 μ L de cada amplificado y se mezclaron con 1 μ L de reactivo Runsafe (en proporción 1 en 5) en un papel parafilm.

El tamaño de cada ADN obtenido se comparó mediante los geles de agarosa al 2% y se utilizó el marcador de peso molecular Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England BioLabs) a una concentración de 100 μ g/ml, en otros próximos geles se usó también Generuler de 50 pb o 100 pb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) y se cargó las muestras en los pocillos del gel con un volumen final de 6 μ L. Seguidamente, se conectó y programó la fuente poder (Power Pro 300 V 700 mAmp 150W-110-230V) a 100 voltios a tiempo constante durante 60 minutos. Finalmente, el gel se fotografió bajo luz ultravioleta mediante un transiluminador (Blue light transilluminator 15.3 x 15.3 cm).

Luego de concluir con las respectivas corridas electroforéticas y su análisis de muestras de costa y sierra con los cuatro genes estudiados se consideró criterios de selección y, además, se tuvo en cuenta que por cuestiones de factores externos (obtención de materiales de trabajo) se suspendió la continuidad del estudio. Así que, después retomado el trabajo se tuvieron que volver a analizar las muestras de ADN de costa y sierra, amplicones obtenidos anteriormente, primers liofilizados y resuspendidos, kits completos (de PCR) y el análisis de viabilidad de reactivos.

C. Análisis Molecular. Para el análisis molecular se utilizó el termociclador que nos permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mencionadas anteriormente para la amplificación de los fragmentos de ADN de las regiones de Epas 1, Hmox 1, Hif1a y Bcl6.

3.6.4. Secuenciamiento

Para la secuenciación de los amplicones obtenidos sólo se consideraron volúmenes de muestra equivalentes a 400 ng que se suspendieron en el kit Barcoding nativo (Oxford Nanopore Technologies) e inmediatamente cargados en una celda de flujo R9.4.1, colocándose dentro de un secuenciador MinION Mk1C. El producto obtenido mediante el secuenciamiento por Nanopore resultó en formato FASTAq cambiándose en formato FASTA.

3.7. Análisis de datos

Verificado el análisis y la viabilidad, resultó que las muestras de ADN y los amplicones no se encontraban en óptimas condiciones para su uso, así que, se procedió a una nueva extracción de ADN, enriquecimiento de algunos amplicones y nuevas PCR de las secuencias en estudio, ya que, no se podía realizar nuevas colectas en sangre. Así mismo, se realizó una nueva extracción a partir de papeles filtro con sangre que se colectaron en su momento. Finalmente, del análisis molecular de los cuatro genes estudiados sólo se consideraron las secuencias que cumplieran los criterios de selección y la calidad para la continuación del secuenciamiento mediante el secuenciador MinION Mk1C y el uso de programas como BLAST, Bioedit y MEGA (7.0.21).

3.7.1. Análisis de Secuencias

A. Secuencias en formato FASTA. El secuenciador MinION MK1C generó resultados en formato FASTq, el cual se transformó en formato FASTA y teniendo estas secuencias en formato FASTA, se inició el análisis de secuencias mediante algunas herramientas y/o programas que fueron necesarios para la comparación y cálculo de homología. Mencionando primero, que una de las secuencias que se comparó es la secuencia de la región Epas 1 en Cavia

porcellus L. mediante el GenBank (base de datos de secuencias genéticas) y se determinó la posición de las secuencias evaluando por BLAST (por sus siglas en inglés Basic Local Alignment Search Tool) para la encontrar regiones de similitud con otras secuencias. Luego se usó el programa Bioedit que permitió editar, manipular y alinear las secuencias, también el reconocimiento de indeles, agrupaciones de secuencias. Seguidamente, se realizó el alineamiento múltiple final de la región Epas 1 (Exón 6) de las secuencias de cuyes para costa y sierra mediante el programa MEGA (7.0.21).

3.8. Consideraciones éticas

Para los principios éticos de investigación en animales se tiene en cuenta las normas establecidas por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud:

Según INS, 2020 en el marco de los principios éticos y normativos, para la colecta de muestra de sangre en cuyes, no se tuvo una participación directa, ya que los animales fueron sacrificados con fines de comercialización de su carne para consumo humano y fueron los mismos productores y criadores quienes sacrificaron a los ejemplares para su posterior venta. De esta manera nuestra participación se limitó solo a coleccionar la sangre de los animales una vez que fueron sacrificados.

IV. RESULTADOS

4.1. Cuantificación de ADN

Se realizó el proceso de extracción y cuantificación de ADN a partir de veinte muestras sanguíneas de cuyes para costa y sierra en microtubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Para ello se utilizó el protocolo con el reactivo DNAzol. Los resultados se detallan en la tabla 3, obteniéndose datos de concentración de ADN y pureza de las muestras mediante relación de absorbancias. Dichos datos se estimaron como inadecuados para la continuación del trabajo en estudio.

Tabla 3

Datos obtenidos de la cuantificación mediante espectrofotómetro (Hercuvan ND-2800)

DATOS DE MUESTRA		DATOS DE CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE REACTIVO DNAzol			
Nº	CÓDIGO INTERNO	[ADN]	A260	260/280	260/230
1C	costa 1	3,01	41,02	0,71	0,69
2C	costa 2	1,20	26,03	0,69	0,56
3C	costa 3	2,84	11,01	0,56	0,95
4C	costa 4	0,41	9,21	0,95	0,71
5C	costa 5	1,99	20,14	0,49	1,41
6C	costa 6	2,26	29,10	1,03	1,14
7C	costa 7	0,29	8,13	1,01	0,39
8C	costa 8	2,10	15,28	0,89	0,97
9C	costa 9	1,60	18,96	0,95	1,48
10C	costa 10	0,26	5,36	0,52	1,51
1S	sierra 1	1,59	27,85	0,96	2,00
2S	sierra 2	1,08	36,98	0,82	1,52
3S	sierra 3	0,84	9,52	0,93	1,80
4S	sierra 4	0,22	5,20	0,93	1,83
5S	sierra 5	0,96	6,63	0,85	1,69
6S	sierra 6	0,54	8,12	0,63	1,78
7S	sierra 7	1,39	22,45	0,41	1,77
8S	sierra 8	3,52	42,61	1,52	1,29
9S	sierra 9	2,36	15,28	0,94	1,77
10S	sierra 10	4,96	36,90	0,87	1,31

Nota. C: muestras de costa, S: muestras de sierra y A: absorbancias.

Seguidamente, en la tabla 4 se observan datos de la cuantificación de las veinte muestras extraídas con el kit Invitrogen a partir de sangre total de los cuyes evaluados. La evaluación de la concentración de ADN se realizó mediante el principio de fluorometría usando el equipo Qubit versión 2.0, el cual reveló datos con óptimas concentraciones de ADN (ng/uL), teniendo como mayores concentraciones 61,5 ng/uL y 72,05 ng/uL en costa y sierra respectivamente, lo que aseguró la continuidad del proceso en la etapa de PCR.

Tabla 4

Datos obtenidos de la cuantificación mediante fluorometría/Qubit 2.0 (Invitrogen)

DATOS DE MUESTRA		DATOS DE CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE KIT			
Nº	CÓDIGO INTERNO	[ADN]	Concentración	[10ng/ul] Vf= 10ul	H2O
1C	costa 1	57.9	ng/ul	17.3	22.7
2C	costa 2	30.3	ng/ul	33.0	7.0
3C	costa 3	28.1	ng/ul	35.6	4.4
4C	costa 4	47.5	ng/ul	21.1	18.9
5C	costa 5	25.4	ng/ul	39.4	0.6
6C	costa 6	26.1	ng/ul	38.3	1.7
7C	costa 7	59.3	ng/ul	16.9	23.1
8C	costa 8	61.5	ng/ul	16.3	23.7
9C	costa 9	29.5	ng/ul	33.9	6.1
10C	costa 10	37.9	ng/ul	26.4	13.6
1S	sierra 1	39.3	ng/ul	25.4	14.6
2S	sierra 2	41.9	ng/ul	23.9	16.1
3S	sierra 3	40.3	ng/ul	24.8	15.2
4S	sierra 4	28.7	ng/ul	34.8	5.2
5S	sierra 5	49.8	ng/ul	20.1	19.9
6S	sierra 6	25.4	ng/ul	39.4	0.6
7S	sierra 7	72.05	ng/ul	13.9	26.1
8S	sierra 8	29.3	ng/ul	34.1	5.9
9S	sierra 9	31.4	ng/ul	31.8	8.2
10S	sierra 10	54	ng/ul	3.7	36.3

Luego, en la tabla N° 5 se muestran datos de la cuantificación mediante el espectrofotómetro (Hercuvan ND-2800), realizándose la extracción a partir de papeles filtro con sangre que estaban almacenadas a temperatura de -20°C , ya que las muestras de DNA extraídas anteriormente a partir de kit comercial presentaban volúmenes muy pequeños, otras muestras se habían degradado con el tiempo y otros factores que pudieron contribuir en la viabilidad.

Tabla 5

Datos obtenidos de la cuantificación mediante espectrofotómetro (Hercuvan ND-2800)

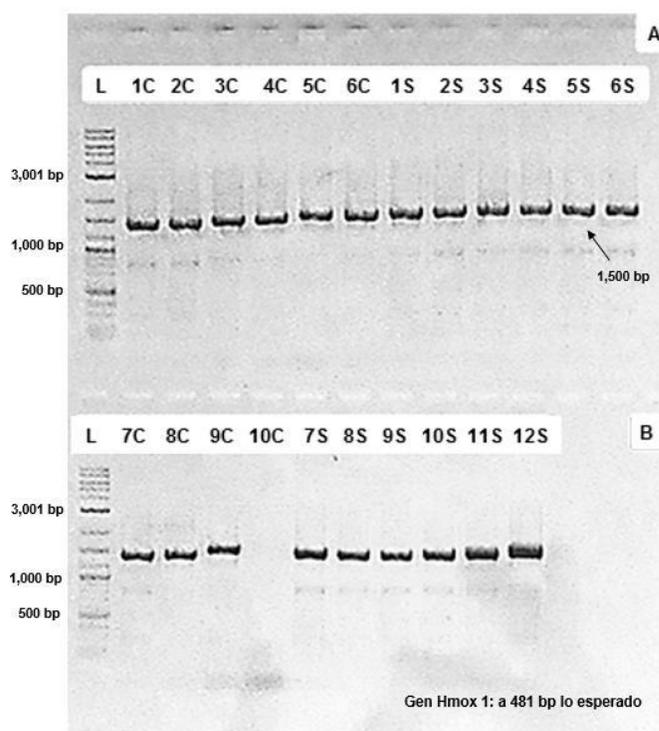
DATOS DE MUESTRA		DATOS DE CUANTIFICACIÓN A PARTIR DE PAPEL FILTRO			
N°	CÓDIGO INTERNO	[ADN]	A260	260/280	260/230
1C	costa 1	75,27	18,92	2,28	1,59
2C	costa 2	55,63	10,98	2,96	1,57
3C	costa 3	68,86	20,00	2,02	1,40
4C	costa 4	83,34	11,83	1,58	1,31
5C	costa 5	50,80	13,16	2,06	1,62
6C	costa 6	76,89	50,42	2,03	1,53
7C	costa 7	61,55	36,312	1,84	1,64
8C	costa 8	46,21	39,27	2,09	1,75
9C	costa 9	54,82	12,965	1,73	1,66
10C	costa 10	75,25	19,136	2,4	1,87
1S	sierra 1	78,45	11,692	1,9	1,68
2S	sierra 2	81,93	16,386	1,96	1,69
3S	sierra 3	91,76	16,252	1,95	1,59
4S	sierra 4	80,30	36,062	1,96	2,49
5S	sierra 5	69,36	50,097	1,99	2,09
6S	sierra 6	58,31	31,662	1,98	1,50
7S	sierra 7	84,32	60,371	2,01	1,51
8S	sierra 8	68,51	67,557	1,55	2,03
9S	sierra 9	97,85	46,313	1,71	2,09
10S	sierra 10	69,13	73,384	1,46	1,59

4.2. Análisis de la visualización de los fragmentos de ADN

En la figura 1, se pueden observar los amplificados obtenidos con los primers para el gen Hmox1, presentando un tamaño alrededor de 1500 pares de bases. Se puede observar que hay una ligera variación en la migración del ADN de las primeras muestras de la costa (1C a 4C, 7C y 8C) mientras que las muestras de sierra mostraron posiciones más inferiores de 7S a 10S y sólo la muestra 10 C no presentó el amplificado. Estas muestras corresponden a la primera extracción (Pure Link Genomic DNA Mini Kit-Invitrogen), donde se observan bandas nítidas que no corresponden a la amplificación de la región del gen Hmox1, el cual tiene una longitud de 481 pb.

Figura 1

Productos amplificados con el Primer Hmox1 para cuyes de costa y sierra: L) Ladder de 100 a 10000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%



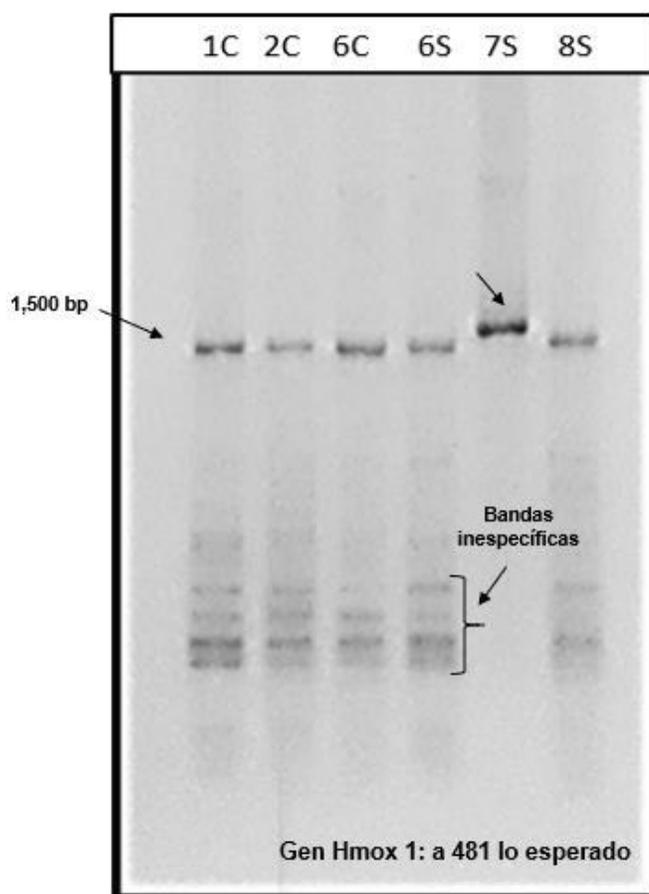
Nota. Elaboración propia.

En la figura 2, se observan amplificados enriquecidos para el gen Hmox1, donde la muestra 1C, 2C y 6C de costa presentan bandas nítidas similares a las muestras de sierra 6S y 8S que se encuentran en el mismo peso molecular de 1500 pb a diferencia del amplificado 7S que se ubicó por encima de los 1500 pb, también se visualizaron bandas inespecíficas en la corrida electroforética, lo cual confirma que los productos amplificados las muestras de costa y sierra no pertenecían al gen Hmox1.

Figura 2

Productos amplificados con el Primer Hmox1 de muestras 1, 2 y 6 de costa; 6, 7 y 8 de sierra:

L) Ladder de 100 a 10000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%

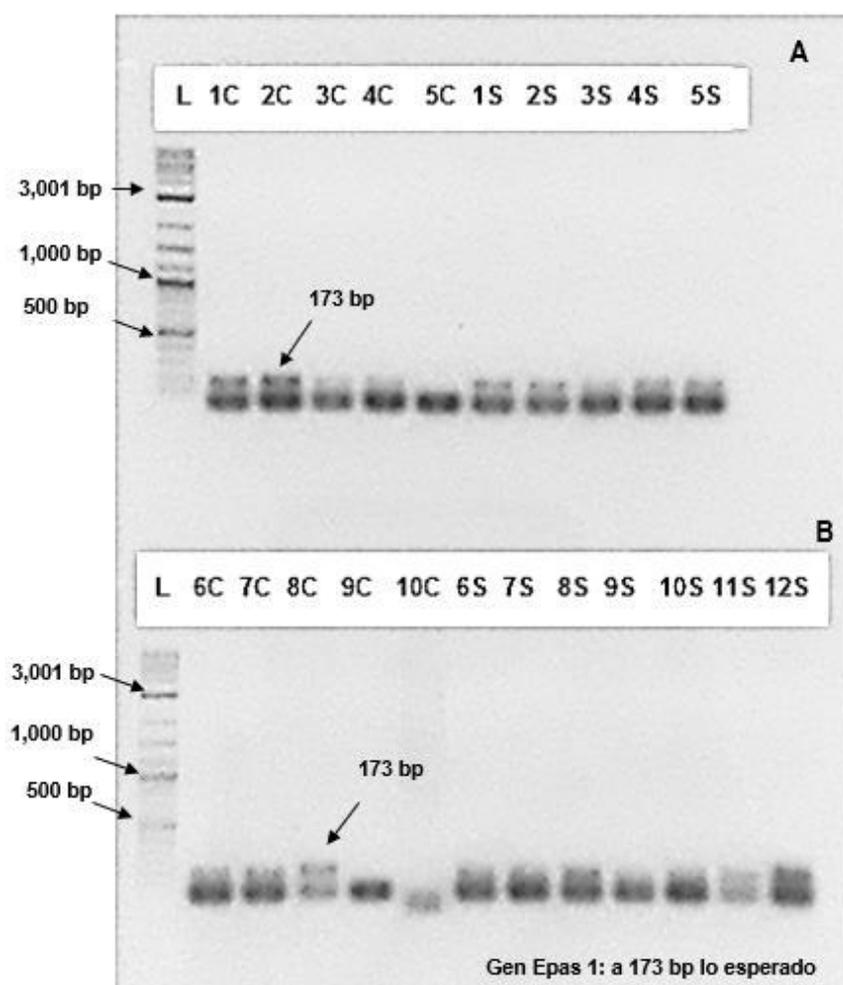


Nota. Elaboración propia.

En la figura 3, se observan los productos amplificados con primers diseñados para el gen Epas1, se detectó bandas de alrededor de 173 pb que corresponden a nuestro gen de interés. En todas las muestras de la sierra se puede observar la presencia de una banda y sólo en las muestras 5C y 9C no se pueden apreciar con nitidez las bandas, ya que, estas son muy tenues mientras que en la muestra 10C no se apreció ninguna banda.

Figura 3

Productos amplificados con el Primer Epas 1 para cuyes de costa y sierra: L) Ladder de 100 a 10000 pb, C) muestras de costa, S) muestras de sierra. Concentración de DNA es 20ng/uL. Gel de agarosa al 2%

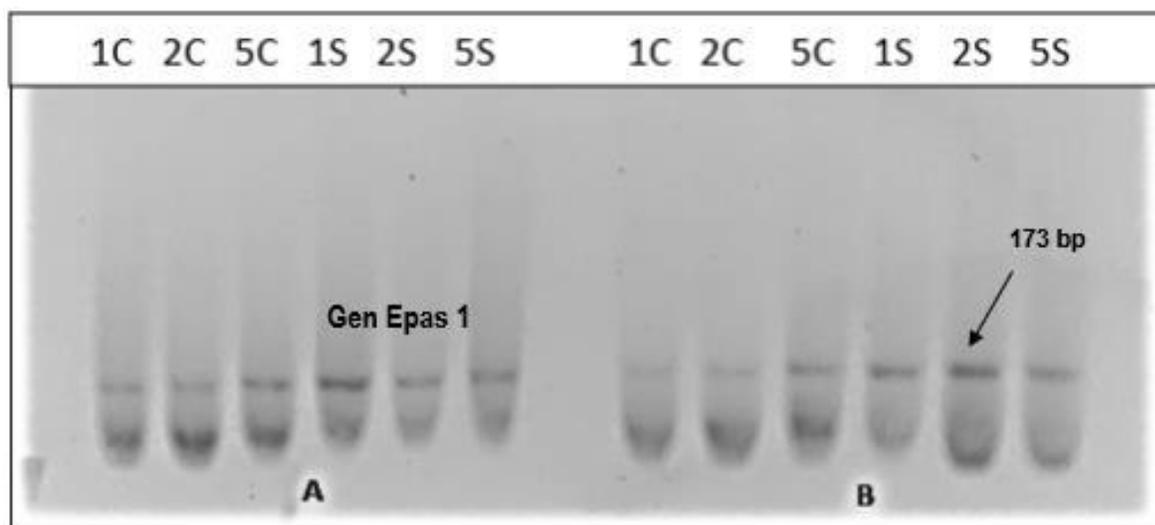


Nota. Elaboración propia.

En la figura 4 se visualizan las muestras amplificadas enriquecidas para el gen *Epas 1*, en el cual en los pocillos 1C, 2C, 5C, 1S, 2S y 5S se agregó 4 μ L del amplificado y en los pocillos restantes 6 μ L del amplificado para observar mejor la nitidez de las bandas, observándose bandas que no presentaron diferencia tanto para muestras de costa como de sierra. Las muestras mencionadas en la figura 4, fueron dejadas por 45 minutos a un voltaje de 100V de manera que las muestras puedan desplazarse de manera óptima y poder observar bandas definidas, así como diferenciar las bandas como se puede observar en la figura 3 donde se evidencia que todas presentaron bandas a excepción de la 5C, 9C y 10C, en las cuales no se distingue una banda definida.

Figura 4

Productos amplificados con el Primer Epas1 para cuyes de costa y sierra: L) Ladder de 100 a 10000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra, A) Cada pocillo contiene un volumen de 4 μ L del amplificado, B) volumen de 6 μ L. Concentración de DNA es 20ng/ μ L. Gel de agarosa al 2%

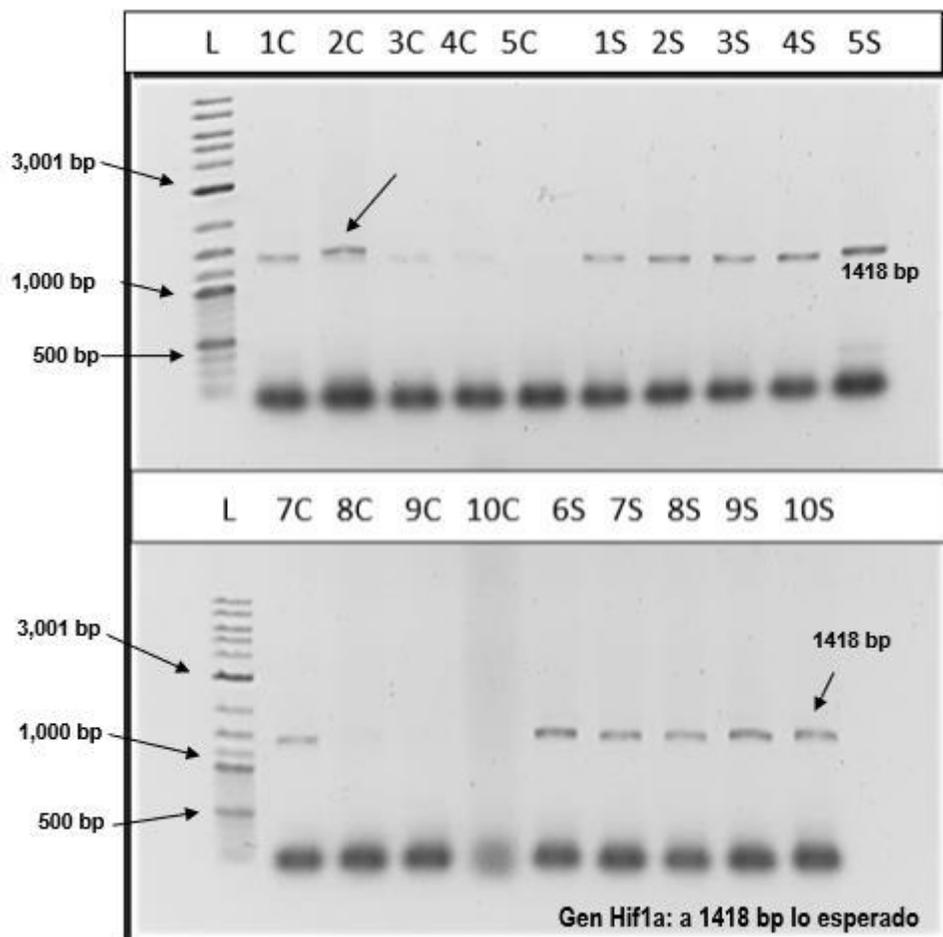


Nota. Elaboración propia.

En la figura 5, se observan los amplificados obtenidos para el gen Hif1a, con un tamaño alrededor de 1418 pares de bases. Se visualizó la presencia de dos bandas notorias perteneciente a la muestra 2C de costa y mientras en sierra se observó una variación en la movilidad electroforética (100V a 45 minutos) entre 1418 pb a diferencia de las muestras 3C y 4C que presentaron bandas muy tenues. Las muestras 5C, 8C, 9C y 10C no evidenciaron presencia de bandas.

Figura 5

Productos amplificados con el Primer Hif1a para cuyes de costa y sierra: L) Ladder de 100 a 10000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%

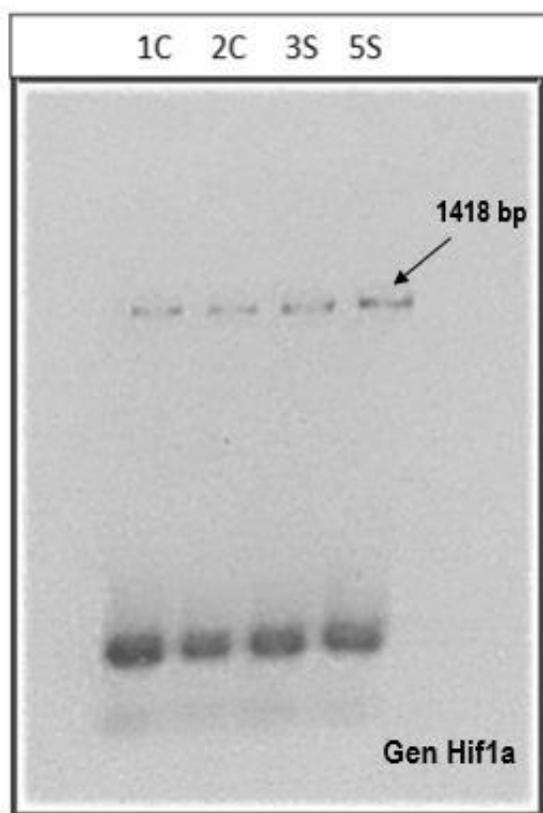


Nota. Elaboración propia.

En la figura 6 se observan los amplificados enriquecidos para el gen Hif1a, en las muestras 1C y 2C de costa se observan bandas definidas y notorias al igual que las bandas de sierra 3S y 5S, pero la banda 5S mostró una ligera diferencia en la posición de su banda. Solo se seleccionó dos muestras de costa y otras dos de sierra, ya que estas muestras presentaron una mejor definición de bandas e incluso la muestra 2C revelada en el anterior gel (Figura 5) evidencia dos bandas y las demás una sola banda, por ello se precisó realizar una nueva corrida electroforética por más tiempo (100V a 60 minutos) de manera que se puedan apreciar las bandas.

Figura 6

Productos amplificados con el Primer Hif1a de muestra 1 y 2 de costa; 3 y 5 de sierra: C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%

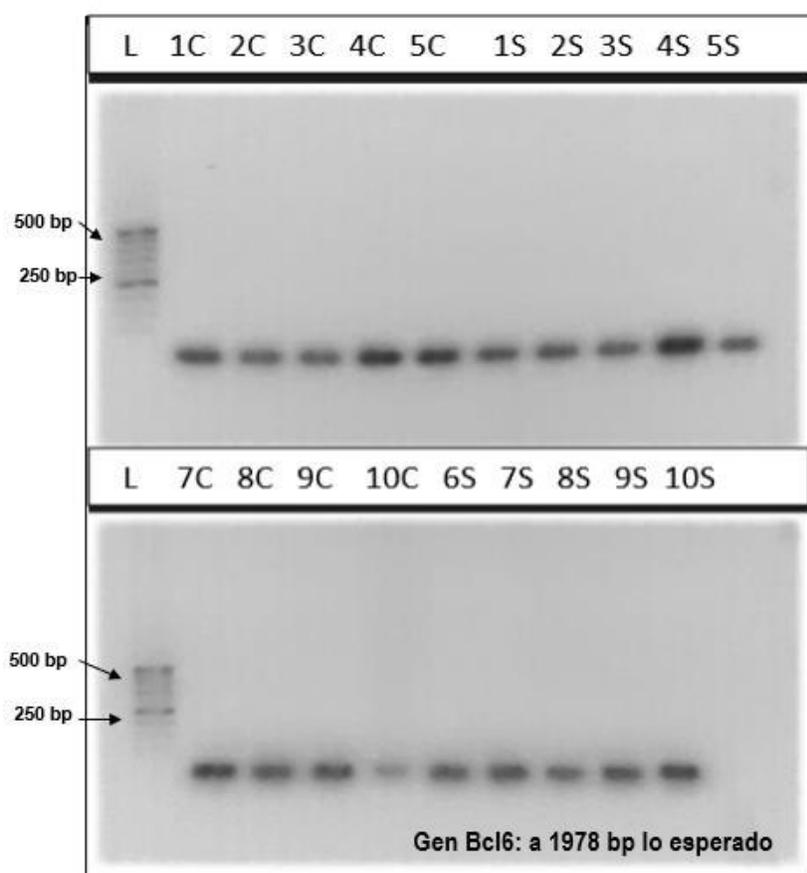


Nota. Elaboración propia.

En la figura 7, se pueden apreciar los amplificadores para el gen Bcl 6, con un tamaño alrededor de 1978 pares de bases. Se visualizó que no hay presencia de ninguna banda en todos los pocillos, por lo cual estas no fueron necesarias para volver a enriquecer o repetir una PCR para muestras de costa y sierra.

Figura 7

Productos amplificados con el Primer Bcl 6 para cuyes de costa y sierra: L) Ladder de 50 a 10000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%

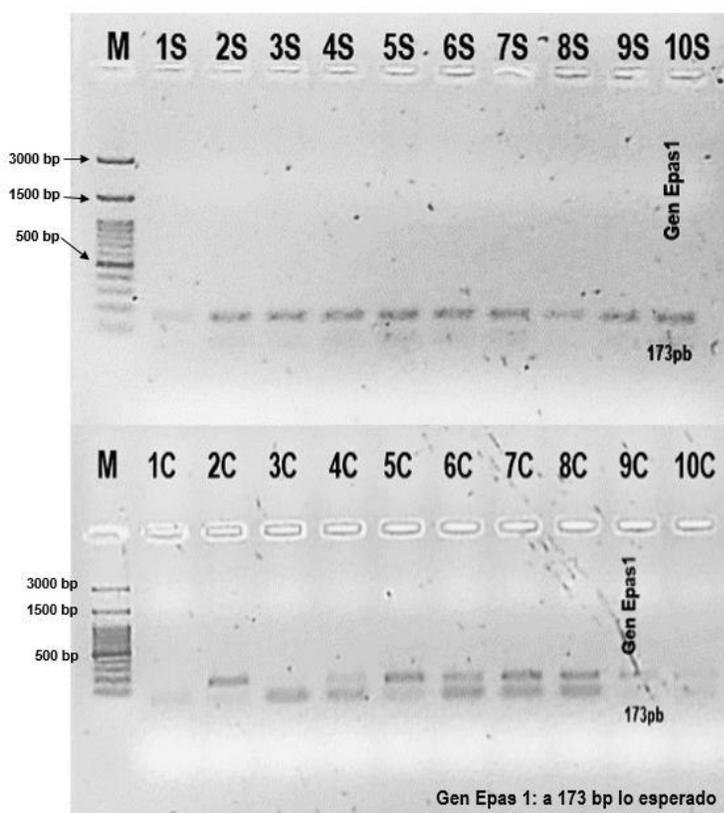


Nota. Elaboración propia.

Para continuar con el secuenciamiento de las muestras, se realizó nuevamente la extracción de DNA a partir de un kit con papel filtro para muestras de costa y sierra. Para muestras en sierra se visualizaron bandas correspondientes al fragmento esperado de 173 pb del gen EPAS 1 al igual que las muestras en costa donde se observaron bandas nítidas con el mismo peso molecular, las muestras 2C, 4C, 5C, 6C, 7C, 8C, 9C y 10C presentaron bandas notorias, a diferencia de la muestra 3C, la cual presentó una banda muy tenue. Y en la muestra 1C no se observó la amplificación para el gen Epas1 (Figura 8).

Figura 8

Productos amplificados con el Primer Epas1 para cuyes de costa y sierra: M) Ladder de 100 a 3000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%

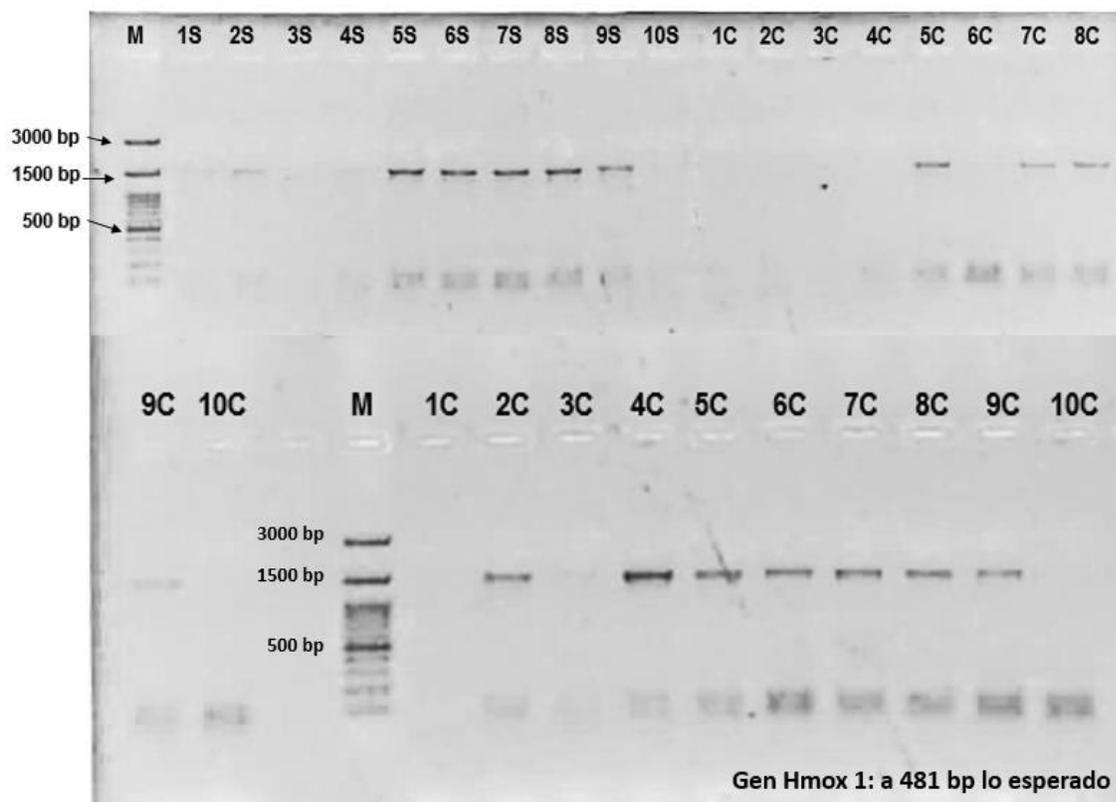


Nota. Elaboración propia.

En la figura 9, se evidencia que las bandas se encontraron en 1500 pb, lo que no corresponde a la región del gen Hmox1, ya que estas no amplificaron a 481 pb. Así mismo, se observaron otras bandas inespecíficas que no correspondían a la región buscada. Podemos ver que en muestras de sierra la mayoría de ellas amplificó a excepción de la muestra 10S, mientras que de las muestras de costa sólo 1C no amplificó.

Figura 9

Productos amplificados con el Primer Hmox 1 para cuyes de costa y sierra: M) Ladder de 100 a 3000 pb, C) muestras costa, S) muestras sierra. Concentración de DNA es 10ng/uL. Gel de agarosa al 2%



Nota. Elaboración propia.

Seguidamente, después de realizar las corridas electroforéticas se seleccionaron sólo los amplicones del gen Epas 1 para dar continuación al proceso de secuenciamiento y análisis genómico.

El criterio para seleccionar y estudiar los amplicones de la región EPAS 1 a nivel del exón se basó en las visualizaciones electroforéticas para costa y sierra y también cabe agregar que algunos autores mencionaban que en la región del exón 6 y 12 de la secuencia tipo EPAS 1 se presentan un mayor número de mutaciones. Además, la secuencia HIF1a presentó bandas correspondientes a 1418 pb en la corrida electroforética; sin embargo, no se continuó con el secuenciamiento para esta región por criterios de viabilidad a diferencia de las otras secuencias estudiadas como HMOX 1 y BCL6, las cuales no presentaron cambios y tampoco se encontraban dentro de las regiones que se diseñaron para su amplificación.

4.3. Análisis de secuenciamiento

Se utilizó la base de datos del NCBI (Centro Nacional de información Biotecnológica) y el servidor BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) para realizar el alineamiento de los amplicones secuenciados del gen EPAS 1 con los de las secuencias presentes en el banco de genes del NCBI. En la Figura 10 se observa que el alineamiento se da principalmente con una secuencia predicha para *Cavia porcellus*, así como de otras especies de roedores que se observó más cercanamente, como la *Chinchilla lanigera* con un porcentaje de identidad de 93.94% y también con un porcentaje de identidad de 87.79% a *Muscardinus avellanarius* siendo además una especie que probablemente presente secuencias del tipo Epas 1, igualmente se estimó una homología para *Cavia porcellus* con un porcentaje de identidad de 97.76% siendo el mayor para esta homología con respecto a nuestro amplicón secuenciado. La

figura 11 muestra la comparación de secuencias nucleotídicas entre uno de los amplicones obtenidos con la secuencia del gen EPAS 1 predicho para *Cavia porcellus*, observándose un cambio nucleotídico como sustitución GC; así mismo, se observan espacios (-) conocidos como indeles, sitios donde se pudieron generar inserciones y/o deleciones, también se presenció una posición que no está dentro o no es reconocido por la secuencia del banco de genes como (N).

Figura 10

Descripción de la secuencia de EPAS 1 en Cavia porcellus y otras especies con sus respectivos porcentajes de identidad de las mismas

Sequences producing significant alignments									
Download ▾ Select columns ▾ Show 100 ▾ ?									
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Cavia porcellus</i> endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), mRNA	Cavia porcellus	230	230	100%	7e-56	97.76%	5101	XM_023566291.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Chinchilla lanigera</i> endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), mRNA	Chinchilla lanigera	198	198	98%	2e-46	93.94%	5626	XM_005390973.2	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Heterocephalus glaber</i> endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), transcript variant X3, m...	Heterocephalus...	180	180	100%	7e-41	91.04%	3123	XM_004839395.2	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Heterocephalus glaber</i> endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), transcript variant X2, m...	Heterocephalus...	180	180	100%	7e-41	91.04%	2619	XM_021253816.1	
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Heterocephalus glaber</i> endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), transcript variant X1, m...	Heterocephalus...	180	180	100%	7e-41	91.04%	4896	XM_004839394.2	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Sciurus vulgaris</i> genome assembly, chromosome: 14	Sciurus vulgaris	158	158	84%	3e-34	92.04%	99237486	LR738625.1	
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Muscardinus avellanarius</i> genome assembly, chromosome: 15	Muscardinus av...	154	154	97%	4e-33	87.79%	90843079	OY726572.1	

Nota. Elaborado mediante Base de datos de NCBI.

Figura 11

Comparación de la secuencia de EPAS 1 en *Cavia porcellus* contra la base de datos del NCBI de la región EPAS 1 para su alineamiento

Download ▾ GenBank Graphics					
PREDICTED: Cavia porcellus endothelial PAS domain protein 1 (Epas1), mRNA					
Sequence ID: XM_023566291.1 Length: 5101 Number of Matches: 1					
Range 1: 2299 to 2430 GenBank Graphics				▾ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
230 bits(124)	7e-56	131/134(98%)	2/134(1%)	Plus/Plus	
Query 1	GGCAGCAGCTAGAGNGGCGAGAAGACCGAGCCCGGACCATCGGCGCATGTCCTCCATCTT	60			
Sbjct 2299	GGCAGCAGCTAGAG-GGCGAGAAGACCGAG-CCGGACCATCGGCCCATGTCCTCCATCTT	2356			
Query 61	CTTTGATGCTGGGAACAAGGGGTCACTGCCATCATGCTGTGGCCAGGCCAGCACCCCTCT	120			
Sbjct 2357	CTTTGATGCTGGGAACAAGGGGTCACTGCCATCATGCTGTGGCCAGGCCAGCACCCCTCT	2416			
Query 121	CTCTTCCATGGGCG	134			
Sbjct 2417	CTCTTCCATGGGCG	2430			

Nota. Elaborado mediante Base de datos de NCBI.

La Figura 12 muestra el alineamiento obtenido de las secuencias de los amplicones de la Costa y la Sierra, obtenidos con el programa Mega (7.0.21), en el cual se tuvieron que depurar o eliminar algunas secuencias que no cumplieron con los criterios de selección y calidad de secuencia, teniéndose un menor número de nucleótidos, o si no se secuenciaron completamente tales como las secuencias C6, C7, C8, C9 y C 10. Así mismo las secuencias S9 y S10 fueron descartadas para el análisis, quedando las demás secuencias alineadas por el programa MEGA. Se reconocieron indeles (rayas o espacios), donde hubo inserciones o deleciones y en algunos sitios se encontraron sustituciones. Se observa que las secuencias de costa, a diferencia de las de sierra, presentaban un mayor grado de similitud y homología entre sí, ya que en las de sierra hubo una mayor presencia de cambios en sus secuencias.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se analizaron un total de veinte cuyes, de los cuales diez eran provenientes de costa y las otras de sierra (Huaraz) a una altitud por encima de los 3000 msnm. Por lo tanto, primero se consideró realizar la extracción de ADN mediante el método de Cox, ya que, este nos proporcionaría un procedimiento más corto y con buenos resultados durante el proceso de extracción; sin embargo, no se pudo obtener una adecuada concentración de ADN, lo cual hizo necesario el uso de otro método a partir de un kit de extracción de ADN comercial de la marca Invitrogen, con el que se obtuvo una adecuada concentración de ADN para las muestras de sierra en comparación con muestras de cuyes de costa que revelaron una baja concentración de ADN, así mismo se logró una buena estandarización de la técnica para la identificación del gen *Epas1*, realizado por secuenciamiento, cuyos resultados evidenciaron cambios en su secuencia nucleotídica que posiblemente podrían estar asociados a la adaptación a altura en cuyes.

Se usó el reactivo DNAzol (kit), ya que para la extracción del ADN era rápido, sencillo y de bajo costo lo que hizo más factible la extracción de las muestras in situ, pero una de las limitantes de esta técnica es que el ADN recuperado fue mínimo, tanto que al realizar el procedimiento de PCR no se lograron visualizar bandas. Además, los valores de cuantificación del ADN estaban muy por debajo de lo que se había considerado. Así mismo, se corroboran estos resultados con lo mencionado por Ríos et al. (2016), ya que ellos mencionaron que el kit completo con DNAzol a pesar de tener una alta pureza y peso molecular óptimo, la recuperación de la cantidad de DNA no resultó ser la más adecuada.

La obtención de la muestra de sangre, en condiciones de altura, presentó dificultades y fue otro factor limitante en el estudio, ya que esta se coaguló rápidamente. Esto se corrobora con lo mencionado por Gonzales et al. (2021), en su estudio en el cual detallaron que el aumento de la

resistencia al flujo sanguíneo se debe a la vasoconstricción de las arteriolas pulmonares y esto hace que los glóbulos rojos presenten un número elevado del mismo ocasionando así una viscosidad en la sangre.

Según el estudio realizado por Shao et al. (2015) el roedor conocido como zokor o pika puede adaptarse a muchos cambios que se relacionan con la altura, mencionando también que los estudios con respecto al mecanismo de acción que presentan estos genes al ser expresados son escasos, así mismo en comparación con nuestros resultados obtenidos, se tendría que realizar un estudio con un mayor número de especímenes y considerar dos zonas con altitudes diferentes en sierra, a fin de verificar que a mayor variabilidad genética hay mayor posibilidad de encontrar diferentes fenotipos entre ellos y que probablemente estén relacionados con la adaptabilidad a la altura.

Los productos amplificados con el primer Hmox 1 (Figura 1) mostraron un peso molecular diferente al de 481 pb que era lo esperado, debido a que el diseño de primers para esta región codificante no resultó ser óptima ni específica dentro de los criterios y parámetros que se debieron considerar, por este motivo las secuencias resultantes no fueron analizadas. Estos resultados difieren de lo obtenido por Cao et al. (2017) quienes en su estudio si pudieron analizar la región promotora del gen Hmox 1 en trabajadores con edema pulmonar debido a las elevadas altitudes en China; sin embargo, no pudieron identificar polimorfismos que podrían estar asociados con la enfermedad. De la misma manera Appenzeller et al. (2006) realizaron un estudio en el cual lograron determinar una mayor expresión del gen Hmox 1 en pacientes de Cerro de Pasco (4338 m.s.n.m) que estaban en estado de hipoxia mientras que en pacientes en un estado fisiológico normal se encontró una disminución de la expresión de este gen.

En la figura 3, se presentan los productos amplificados con el primer Epas 1 ubicándose en el peso molecular de 173 pb que correspondían a lo esperado y también se mostró las bandas más nítidas cuando estas se enriquecieron (Figura 4) para muestras de costa y sierra. Por otra parte, en este estudio se menciona que el diseño para Epas 1 fue a partir de regiones a nivel del exón. Tal como ocurrió en un trabajo de Dong et al. (2014) donde se hallaron un mayor número de polimorfismos en el exón 10 del gen EPAS1 que estaban asociados a concentraciones altas de hemoglobina en respuesta a la hipoxia en cerdos (*Sus scrofa*). De igual forma en otro estudio por Droma et al. (2008) demostraron polimorfismos genéticos a nivel del exón 12 en Sherpas, y que estos a su vez estarían relacionados con los síntomas de la enfermedad aguda de montaña, lo que podría estar manifestándose como respuesta a hipoxia relacionada a grandes altitudes.

En base a los resultados de los productos amplificados para el gen Hif1a se logró observar, en una primera instancia, bandas nítidas y con buena resolución en las muestras de la sierra con un tamaño de 1418 pb, lo cual correspondía con el patrón de peso molecular de este marcador. En contraste las muestras de la región costa presentaban bandas tenues en algunos casos y en otros no se observaban bandas (Figura 5); sin embargo, en un segundo momento se volvió a realizar la amplificación de esta región y los productos de PCR, tanto de sierra como costa ya no pudieron ser visualizados como la primera vez, por lo cual el análisis de secuencias no pudo ser realizado por una calidad deficiente de los productos de PCR. Todo esto posiblemente debido a una degradación de los cebadores, ya que llegada la pandemia por Covid 19 se tuvo que dejar todo en stand by y durante ese tiempo los primers para la región Hif1a se mostraron aparentemente lábiles y no permanecieron viables ni tolerantes a las condiciones de almacenamiento dentro del laboratorio, por ello se considera que, por esta razón, para una segunda instancia, los productos de PCR de este marcador fueron deficientes. Tomando en cuenta los resultados de PCR para Hif1a

obtenidos en primera instancia cabe mencionar que Gladek et al. (2017) encontraron polimorfismos a nivel del exón e intrón y que los cambios en la secuencia nucleotídica o en la expresión de *Hif1a* está asociado a varias enfermedades e incluso a la adaptación a gran altitud. Estos hallazgos podrían apoyar nuestros resultados obtenidos por PCR, ya que todas las muestras de sierra presentaron la expresión de *Hif1a*.

En los productos amplificados para el gen *Hif1a* se mostró una doble banda (2C) a pesar de colocar por más tiempo la corrida electroforética. Esto podría deberse a un artefacto o banda inespecífica producido por problemas en la elección de la temperatura de anillamiento. Por lo tanto, la muestra 2C tuvo que ser repetida y el resultado de esta nueva corrida (figura 6) mostró finalmente una sola banda lo que permitiría considerarla como homocigoto mientras que en las muestras de sierra se evidenciaron dos alelos diferentes (heterocigotos), por ello se observan dos bandas en la electroforesis.

Para el amplificado del gen *Bcl6* los productos de PCR se ubicarían en un tamaño de 1978 pb (Figura 7), empero no se visualizaron presencia de bandas para ninguna muestra de costa ni de sierra. Todo esto debido probablemente al diseño de primers para esta región del *Bcl6*, el cual no resultó óptimo porque tal vez no cumplió ciertos criterios para el diseño in silico o quizás a otros factores influyentes en la PCR, no obstante Newman et al. (2011) recomendaron en su estudio seguir evaluando regiones del *Bcl6* y *Hmox 1* pero también en otros grupos de animales y si estos están asociados a procesos de adaptación a la altura. También cabe mencionar que, Goyal et al. (2013) en su estudio evidenció que especies de ganado vacuno como ovejas, la regulación del flujo sanguíneo cerebral, el cual participa el *Bcl6* puede verse afectada por la exposición a elevadas altitudes, lo que podría influir a condiciones de hipoxia, ya que, esto produce cambios en la expresión genética en las vías de señalización en arterias carótidas ovinas.

De los resultados obtenidos a partir del alineamiento de los amplicones para Epas1 mediante el programa MEGA se demostró que las secuencias de sierra presentan cambios nucleotídicos, de los cuales se evidencia una mayor variabilidad genética que se asociaría con la adaptación a altura. Ramírez (2005) menciona que, al presentarse mayor variabilidad genética en las poblaciones, puede relacionarse con una mayor diversidad fenotípica. Del mismo modo, Mantilla, et al. (2017) indicó que los cruzamientos de animales presentan una descendencia genética que puede estar vinculada con la rusticidad y así alcanzar positivamente en su descendencia la heterosis o vigor híbrido. De la misma forma se presentan estados de vigor híbrido en la mayoría de especies de granja como ganado vacuno, ovejas, cerdos y en otras especies. Incluso, para que exista vigor híbrido es imprescindible que haya un mayor grado de heterocigosis (De Alva, 1964). Esto es lo que podría estar sucediendo con los cuyes pertenecientes a la muestra de la sierra con respecto a los de la costa, que presentaron una mayor homogeneidad de secuencias, considerando que estos animales son parte de una línea mejorada para bajas altitudes proveniente de la Universidad Nacional Agraria La Molina

La principal limitación del estudio con muestras sanguíneas de *Cavia porcellus* L. asociadas a la adaptación a altura, está relacionada con el hecho de que el estudio podría realizarse en diferentes altitudes en la sierra; sin embargo, esto no fue posible debido a factores económicos y prácticos y el financiamiento sólo abarcó un número pequeño de muestras a trabajar.

VI. CONCLUSIONES

- Se logró obtener muestras de ADN a partir de manchas de sangre en papel filtro, a partir de las cuales se pudo realizar la técnica de PCR para amplificar fragmentos genéticos potencialmente asociados a la adaptación a la altura.
- Se obtuvieron muestras sanguíneas de cuyes para sierra a 3052 m.s.n.m y en costa a una altitud de 101 m.s.n.m. con las cuales se pudo evidenciar variaciones en la movilidad electroforética de productos de amplificación de varios genes posiblemente relacionados a la adaptación a la altura en cuyes.
- En el secuenciamiento de los amplicones para parte del gen Epas 1, se observó mayor número de inserciones y deleciones en secuencias de muestras de sierra, las cuales estarían relacionadas a una mayor variabilidad genética asociado a un fenómeno de vigor híbrido que explicaría la adaptación a la altura.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que este estudio pueda complementarse con un análisis de mayor número muestral de cuyes tanto para costa y sierra que probablemente nos confirmen efectivamente si se encuentra una relación.
- La importancia de la elección de un método de extracción de ADN en condiciones óptimas de pureza, integridad y concentración es significativa para la obtención de una buena amplificación mediante la técnica de PCR.
- Para la estandarización de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se sugiere que las concentraciones de reactivos y volúmenes del mix sea específico para cada gen en particular. Así mismo, en las temperaturas y ciclajes de la PCR para poder obtener óptimos resultados en la PCR.

VIII. REFERENCIAS

- Avellanas Chavala, M. L. (2017). Un viaje entre la hipoxia de la gran altitud y la hipoxia del enfermo crítico: ¿qué puede enseñarnos en la compresión y manejo de las enfermedades críticas? *Medicina Intensiva*. <https://doi.10.1016/j.medin.2017.08.006>.
- Avilés, E. (2016). *Caracterización genética del cuy doméstico en América del sur mediante marcadores moleculares* (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba. Córdoba, España. <https://helvia.uco.es/handle/10396/13382>.
- Avilés, D., Martínez, A., Landi, V., y Delgado, J. (2014). El cuy (*Cavia porcellus*): Un recurso andino de interés agroalimentario. *Animales y Recursos Genéticos Animales*, 55(3), 87-91. <https://doi.org/10.1017/S2078633614000368>.
- Appenzeller O., Minko T., Qualls C., Pozharov V., Gamboa J., Gamboa A., and Wang Y. (2006). Chronic hypoxia in Andeans; are there lessons for neurology at sea level?. *Journal of the Neurological Sciences, Elsevier*, 247(1), 93 – 99. <https://doi.10.1016/j.jns.2006.03.021>.
- Basso K, Dalla-Favera R. (2010). BCL6: master regulator of the germinal center reaction and key oncogene in B cell lymphomagenesis. *Adv Immunol* 105: 193-210. [https://doi.10.1016/S0065-2776\(10\)05007-8](https://doi.10.1016/S0065-2776(10)05007-8).
- Burga, E. (1969). *Efecto de la altura sobre el crecimiento y engorde del cobayo* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- Cabrera, A. (1953). *Los roedores argentinos de la familia Cavidae*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía y Veterinaria Pub, 1(6), 48-56. <http://pidba.com.ar/wp-content/uploads/2019/04/Los-Roedores-Argentinos-de-la-Familia-Caviidae.pdf>.

- Cao XF, Ma L, Ma S, Xu J, Ge RL. (2017). HMOX1 Promoter Microsatellite Polymorphism Is Not Associated With High Altitude Pulmonary Edema in Han Chinese. *Wilderness & Environment al medicine*, 28(1), 17–22. 10. <https://doi.1016/j.wem.2016.12.003>.
- Caycedo, A. (2000). *Experiencias investigativas en la producción de cuyes*. Universidad de Nariño. Colombia, 10(2), 41. <https://search.worldcat.org/es/title/experiencias-investigativas-en-la-produccion-de-cuyes-contribucion-al-desarrollo-tecnico-de-la-explotacion/oclc/948142749>.
- Cox, RA (1968). *Methods in Enzymology* (Grossmann, L. and Moldave, E., Eds.), 12(2), 120-129, Academic Press, Orlando, FL.
- Chauca, L. (1997). *Importancia de la crianza de cuyes en Latinoamérica y sistemas de producción*. INIA, 2(1), 13.
- Chemineau, P. (1992). *Medio ambiente y reproducción animal*. Institut national de la recherche agronomique (INRA), Laboratoire de neuroendocrinologie sexuelle, Station de physiologie de la reproduction. Nouzilly, Francia.
- Chen, XQ. et al. (2012). High -altitude hypoxia induces disorders of the brain-endocrine-immune network through activation of corticotropin-releasing factor and its type-1 receptors. *Chinese Journal of Applied Physiology*. 28(6), 481-7. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23581176/>.
- Chizu, H. et al. (2016). Changes in lung sounds during asthma progression in a guinea pig model. *Allergy International*, 65 (1), 425-431. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2016.03.010>.
- Comb, D. (1974). New England Biolabs (NEB). Herramienta para cálculos científicos y conversiones de ADN y ARN. Recuperado de <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>.

- Cueva, S. (1989). *Efecto de la hipoxia de la altura sobre el cuy mejorado* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/304/1/Investigaciones_en_cuyes.pdf.
- De Alva, J. (1967). Reproducción y genética animal. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/18037>.
- Defrance, S. (2006). The sixth toe: The modern culinary role of the Guinea pig in southern Peru. *Food & Foodways*, 1(14), 3–34. <https://doi.org/10.1080/07409710500334517>.
- Dong Kun-zhe, Kang Ye, Yao Na, Shu Guo-tao, Zuo Qing-qing, Zhao Qian-jun and Ma Yue-hui. (2014). Genetic Variation of EPAS1 Gene in Tibetan Pigs and Three Low-Altitude Pig Breeds in China. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9), 1990-1998. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60577-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60577-8).
- Droma Y, Ota M, Hanaoka M, Katsuyama Y, Basnyat B, Neupane P, Arjyal A, Pandit A, Sharma D, Ito M, Kubo K. (2008). Two hypoxia sensor genes and their association with symptoms of acute mountain sickness in Sherpas. *Aviat Space Environ Med*, 79(1), 1056-60. <https://doi.10.3357/asem.2361.2008>.
- Findlay, J. (1968). *Climatologic date needed to specify climatic stress, tropical abstracts*. 16(1), 1-320.
- Flores, M; Duarte, C; Salgado, T. (2017). *Caracterización de la carne de cuy (Cavia porcellus) para utilizarla en la elaboración de un embutido fermentado*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Ciencia y Agricultura, vol. 14, núm. 1, pp. 39-45.
- Gonzales, A; Calderon, M; Gutierrez, R y Ponce, B. (2021). Efecto de marcadores genéticos moleculares en genes inducibles por hipoxia de bovinos criollos y Brown Swiss criados en

- los Andes de Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Rev Inv Vet Perú*; 32(5): e21336. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i5.21336>.
- Goad, W. (1982). National Center for Biotechnology Information, *U.S.A National Library of Medicine*. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- Gou, X., Wang, Z., Li, N., Qiu, F., Xu, Z., Yan, D., ... Li, Y. (2014). Whole-genome sequencing of six dog breeds from continuous altitudes reveals adaptation to high-altitude hypoxia. *Genome Research*, 24(8), 1308–1315. <https://doi.org/10.1101/gr.171876.113>.
- Goyal, R.; Matei, N. and Longo, L. (2013). High altitude long-term hypoxia: Gene expression in adult ovine carotid arteries. *The FASEB Journal*. Volumen 27, Issue S1 Experimental Biology. https://doi.org/10.1096/fasebj.27.1_supplement.1189.12.
- Gladek I, Ferdin J, Horvat S, Calin G. A, Kunej T. (2017). HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. *Genes Chromosomes Cancer*. 56 (1), 439–452. <https://doi.org/10.1002/gcc.22449>.
- Guo N, Zhang N, Yan L, Cao X, Wang J, Wang Y. (2017). Correlation between genetic polymorphisms within the MAPK1/HIF-1/HO-1 signaling pathway and risk or prognosis of perimenopausal coronary artery disease. *Clin Cardiol.*, 40(8), 597–604. <https://doi.org/10.1002/clc.22708>.
- Higgins, D y Agudo, P. (1988). CLUSTAL: un paquete para realizar la alineación de secuencias múltiples en un microordenador, *Gen*. Recuperado de <https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>.
- Iglesias, M. C. (2017). *El papel del oncogén BCL6 en linfomas B*. (Tesis de grado en Medicina). Universidad de Cantabria. Cantabria, España.

- INIA (Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria). (2011). *Producción de cuyes*. Lima, Perú. Recuperado de http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/691/1/Trip-Cuy_raza_Peru.pdf.
- INS (Instituto Nacional de Salud), 2020, Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales en Investigación - Anexo: 2179 Instituto Nacional de Salud - Cápac Yupanqui N°1400 - Telf. 748-1111. Jesús María. <https://web.ins.gob.pe/es/comites-del-ins/comite-institucional-de-etica-para-uso-de-animales-en-investigacion>.
- INS (Instituto Nacional de Salud). (2009). Monitoreo Nacional de Indicadores Nutricionales: Manual del encuestador bioquímico. Dirección ejecutiva de vigilancia alimentaria nutricional. Lima, Perú. Recuperado de https://web.ins.gob.pe/sites/default/files/Archivos/cenan/van/tecnica_vigilancia_nutricion_al/bioquimica/Manual_encuestador_bioquimico.pdf.
- Lechner, A. J. & Banchemo, N. (1982). Advanced pulmonary development in newborn guinea pigs (*Cavia porcellus*). *American Journal of Anatomy*, 163(1), 235-246. <https://doi.10.1002/aja.1001630304>.
- Li Yilan, Wang Shipeng, Zhang Dandan, Xu Xueming, Yu Bo and Zhang Yao. (2019). The association of functional polymorphisms in genes expressed in endothelial cells and smooth muscle cells with the myocardial infarction. *Human Genomics*, 13(1), 5. <https://doi.10.1186/s40246-018-0189-8>.
- López, M. R. (2016). *Evaluación de tres sistemas de alimentación sobre el rendimiento productivo en cuyes de la línea Inti, Andina y Perú* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos, Ecuador.

- Mantilla J. A. (2012). *Diferenciación reproductiva, productiva y molecular de cuyes nativos de la región Cajamarca* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Cajamarca. Perú.
<http://hdl.handle.net/20.500.12390/356>.
- Mantilla J. A, Vallejos L. A y De la Torre J. (2017). *El cruzamiento y la selección y su efecto en los índices productivos de cuyes nativos y mejorados de la región Cajamarca*. Facultad de Ingeniería en Ciencias Pecuarias. Universidad Nacional de Cajamarca. Volumen 16, N° 1.
<https://revistas.unc.edu.pe/index.php/Caxamarca/article/view/27>.
- Mazorra, J; Barbero, V y Esquivel, H. (2021). La hipoxia y la inflamación en el desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud. Rev. Sal. Jal.*; 8 (2), 104-112. <https://www.medigraphic.com/pdfs/saljalisco/sj-2021/sj212f.pdf>.
- Moreno R. A. (1989). *Producción de cuyes*. Departamento de Producción Animal. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú: Segunda edición.
- Morales, E. (1994). The Guinea pig in the Andean economy: From household animal to market commodity. *Latin American Research Review*, 29(3), 129–142.
<https://www.jstor.org/stable/2503945>.
- Morales, E. (1995). *The Guinea pig: Healing, food, and ritual in the Andes*. Tucson: University of Arizona Press. <https://doi.org/10.2307/1008313>.
- Newman JH, Holt, T.N, Hedges LK, Womack B, Memon ss, Willers Ed. (2011). High altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease): Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Pulmonary Circulation*, 1(4), 462-469.
<https://doi.10.4103/2045-8932.93545>.

- Orozco, M y Pedraza, J. (2010). Hemo Oxigenasa: aspectos básicos y su importancia en el sistema nervioso central. *Arch. Neurocién.* (Mex). Vol. 15, N° 1: 47-55.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2010/ane101j.pdf>.
- Prosser, C. y Brown, A. (1961). Fisiología Comparada. AID. 2da edición. México. Recuperado de
<https://www.iberlibro.com/FISIOLOG%C3%8DA-COMPARADA-Ladd-Prosser-Frank-Brown/30557893210/bd>.
- Pulgar, V. J. (1952). *El Curí o cuy*. Ministerio de Agricultura de Colombia, Ed. Minagricultura. Bogotá.
- Qiagen (2016). QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. 5ta Edition, 43-44.
- Quispe P. E. (2011). Adaptaciones hematológicas de los camélidos sudamericanos que viven en zonas de elevadas altitudes. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(1), 01-26.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4331832>.
- Ramírez, O. (2005). Diversidad genética entre poblaciones domésticas de cuyes y sus afinidades filogenéticas con los cuyes silvestres. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Ravikumar, P., Bellotto, D. J., & Hsia, C. C. W. (2015). Persistent structural adaptation in the lungs of guinea pigs raised at high altitude. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 208(1), 37–44. <https://doi.10.1016/j.resp.2014.12.011>.
- Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4), 56-65. <https://doi.10.15174/au.2016.1078>.

- Romero L. (2014). *Efectos de zonas geográficas y de alimentación sobre los parámetros productivos de cobayos de las líneas mejoradas de costa y de sierra* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/3661>.
- Sánchez, C; Rodeiro, I; Garrido, G & Delgado, R. (2005). Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonaerense*. 24 (4): 619-26.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6790>.
- Shao, Y. and others (2015). Genetic adaptations of the plateau zokor in high-elevation burrows.
<https://doi.10.1038/srep17262>.
- Tissot van Patot, M. C. y Gassmann, M. (2011). Hypoxia: Adapting to High Altitude by Mutating EPAS-1, the Gene Encoding HIF-2 α . *High Altitude Medicine & Biology*, 12(2), 157–167.
<https://doi.10.1089/ham.2010.1099>.
- Vásquez, M. (2012). Rol de óxido nítrico en la hipertrofia arteriolar pulmonar y ventricular cardíaca derecha en pollos a nivel del mar y expuestos a hipoxia de la altura. *Rev. Inv Vet Perú*, 23(1), 1-12. Recuperado de
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000100001.
- Wu Xiao-yun, Ding Xue-zhi, Chu Min, Guo Xian, Bao Peng-jia, Liang Chun-nian, Yan Ping. (2015). Novel SNP of EPAS1 gene associated with higher hemoglobin concentration revealed the hypoxia adaptation of yak (*Bos grunniens*). *Journal of Integrative Agriculture*, 14(4), 741-748. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60854-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60854-6).
- Zaldívar, M y Chauca, L. (1991). Manual de autoinstrucción: Crianza Familiar de Cuyes; FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura); Primera

edición. Santiago de Chile, Chile. Recuperado de
<https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UNANI.018324>.

IX. ANEXOS**ANEXO A****ABREVIATURAS**

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
BCL6	Proteína 6 del linfoma de células B
Blimp 1	Proteína de maduración inducida por linfocitos B-1
dNTP's	Deoxynucleotide triphosphates (Trifosfatos de desoxinucleótidos)
EPAS 1	Proteína del dominio endotelial PAS 1
EPO	Eritropoyetina
ET-1	Endotelina 1
GO	Ontología génica
HMOX1	Gen de la hemooxigenasa 1
HIF1-A	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
Hb	Hemoglobina
INS	Instituto Nacional de Salud
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
IL	Interleucina
Mg	Magnesio
MgCl2	Cloruro de magnesio
ng	Nanogramo
ON	Óxido Nítrico

PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en la cadena de la polimerasa)
pb	pares de bases
Prdm1	Proteína 1 con dedo de zinc del dominio PR
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un solo nucleótido)
T°	Temperatura
TE	Tris EDTA
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tm	Temperatura de melting
Ta	Temperatura de anillamiento
ug	microgramo
ul	microlitro
UV	Ultraviolet light (Luz ultravioleta)

ANEXO B
PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA

Figura 15

Procedimiento de la extracción de sangre de cuyes de la sierra colocada en los tubos eppendorf que contienen el reactivo DNAzol



Nota. Elaboración propia.

Figura 16

Procedimiento de los lavados con etanol al 100%, 75% y 95% para la extracción del ADN



Nota. Elaboración propia.

Figura 17

Procedimiento de la extracción de sangre de cuyes de la costa colocada en los tubos eppendorf que contienen el reactivo DNAzol



Nota. Elaboración propia.

Figura 18

Toma de muestra de sangre en tubos con anticoagulantes ACD (Ácido Cítrico dextrosa)



Nota. Elaboración propia.

Figura 19

Cuyes adaptados a la costa, provenientes de Cieneguilla (muestra colectada en Universidad Nacional Agraria La Molina)



Nota. Elaboración propia.

Figura 20

Cuyes adaptados a la sierra a una altitud por encima de los 3000 msnm (ciudad de Huaraz)



Nota. Elaboración propia.

ANEXO C
CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA (HERCUVAN
ND-2800)

Figura 21

Equipo para la cuantificación de ADN (A 260/280)



Nota. Elaboración propia.

CUANTIFICACIÓN POR FLUOROMETRÍA MEDIANTE QUBIT 2.0

Figura 22

Equipo para la cuantificación por fluorometría



Nota. Elaboración propia.

ANEXO D

ESTANDARIZACIÓN Y CONDICIONES DE LA PCR

Figura 23

Colocado de microtubos en el termociclador con el mix previamente preparado de cuyes de costa y sierra



Nota. Elaboración propia.

Figura 24

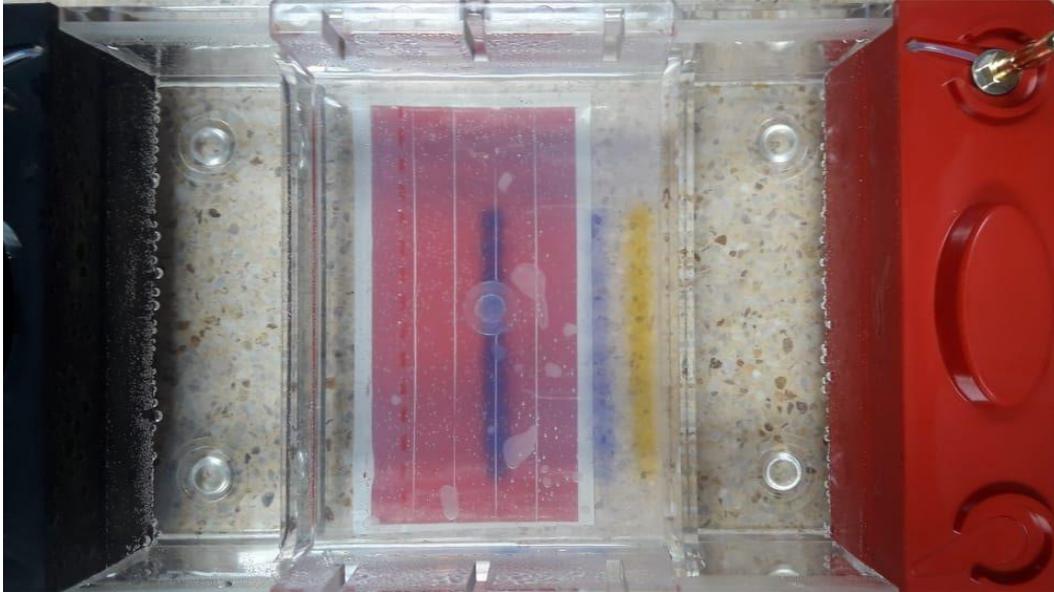
Observación de la migración de muestras de ADN en la cámara electroforética



Nota. Elaboración propia.

Figura 25

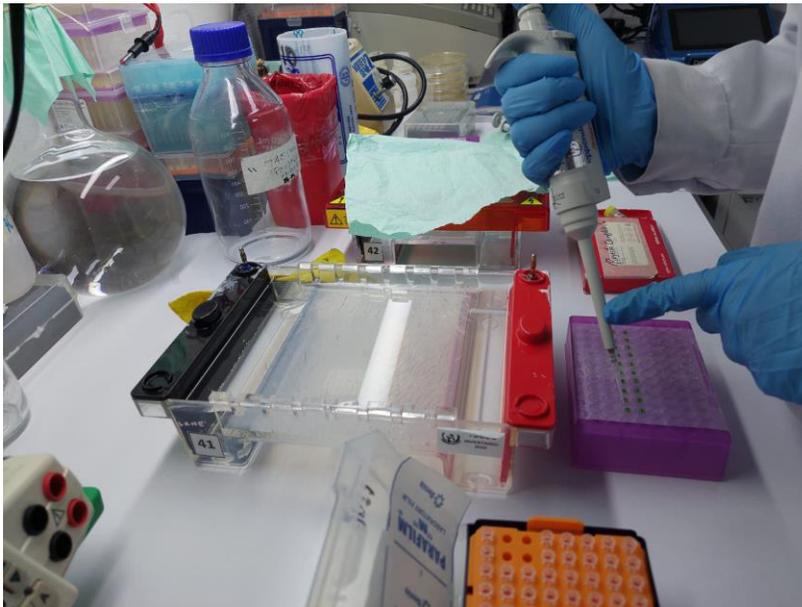
Cámara de electroforesis con las muestras en los pocillos migrando hacia el polo positivo



Nota. Elaboración propia.

Figura 26

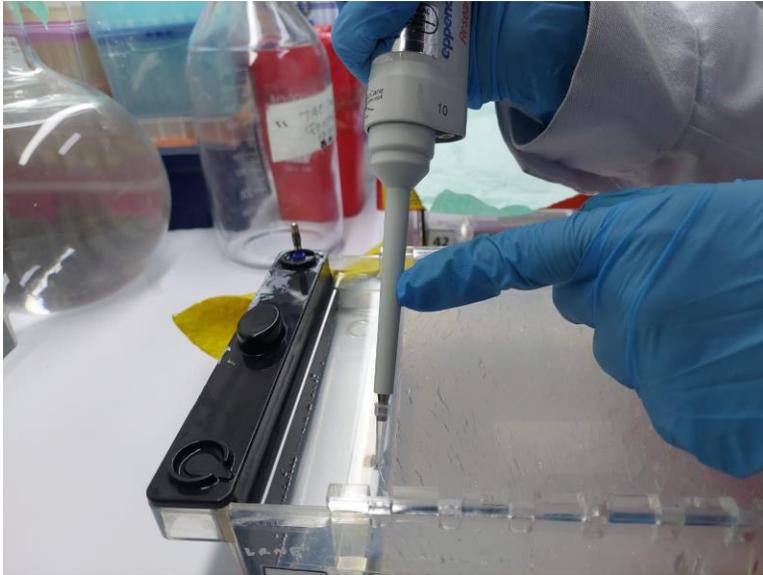
Colocación de muestras de ADN en los pocillos del gel de agarosa



Nota. Elaboración propia.

Figura 27

Cargado de muestras de ADN en cada pocillo del gel



Nota. Elaboración propia.

Figura 28

Observación del gel de agarosa con las muestras de ADN en cada pocillo a través del transiluminador



Nota. Elaboración propia.

Figura 29*Condiciones y mix para la PCR para el gen Epas 1***PROTOCOLO DE PCR PARA Epas 1**

Referencia: Dong et al., 2014

Prueba:	
Gen:	Epas 1
Tamaño:	173 pb

Vol. de reacción	25 µl/ Tubo
Muestra	20

MIX	22
-----	----

PRIMERS		SECUENCIA
Epas 1	F	CCTTCCTCCTGGACAAATACC
	R	CCACTGTGTGTTGGATCTGC

Nº. de ciclos: 35				
Desnat. Inicial	Desnaturaliz.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
5 min a 95 °C	1 min a 94°C	1 min a 66°C	2 min a 72 °C	5 min a 72°C

MIX				
Componentes	Stock []	Final []	1X	Master Mix
Buffer	10 X	1	2.5	55.00
MgCl ₂	50mM	3	1.5	33.00
dNTP's	10mM	0.4	1	22.00
Epas 1 F	10uM	1	2	44.00
Epas 1 R	10uM	1	2	44.00
Taq Polimerasa	5U/ul	1.5	0.3	6.60
ddH ₂ O			12.7	279.40
Template			3	
Volumen total			25	484
			Vol. x tubo:	22

Nota. Elaboración propia.

Figura 30*Condiciones y mix para la PCR para el gen Hmox1***PROTOCOLO DE PCR PARA Hmox 1**

Referencia: Cao et al. (2017)

Prueba:		Vol. de reacción	25 µl/ Tubo
Gen:	Hmox 1	Muestra	20
Tamaño:	481 pb		
		MIX	22

PRIMERS		SECUENCIA
Hmox 1	F	CACCAAGGAGGT GCACAC
	R	CTGCTTGAACTTGGTGGC

N° de ciclos: 35				
Desnat. Inicial	Desnaturaliz.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
5 min a 95 °C	1 min a 94°C	1 min a 65°C	2 min a 72 °C	5 min a 72°C

MIX				
Componentes	Stock []	Final []	1X	Master Mix
Buffer	10 X	1	2.5	52.50
MgCl ₂	50mM	3	1.5	31.50
dNTP's	10mM	0.4	1	21.00
Hmox1 F	10uM	1	2	42.00
Hmox1 R	10uM	1	2	42.00
Taq Polimerasa	5U/ul	1.5	0.3	6.30
ddH ₂ O			12.7	266.70
Template			3	
Volumen total			25	462
			Vol. x tubo:	22

Nota. Elaboración propia.

Figura 31*Condiciones y mix para la PCR para el gen Hif1a***PROTOCOLO DE PCR PARA Hif1a**

Referencia: Wu et al. (2015)

Prueba:	
Gen:	Hif1a
Tamaño:	1418 pb

Vol. de reacción	25 µl/ Tubo
Muestra	20

MIX	22
-----	----

PRIMERS		SECUENCIA
Hif1a	F	CCACAGCTGACCAGTTACG
	R	CGTACATCAAGGGGATGGC

N°. de ciclos: 35				
Desnat. Inicial	Desnaturaliz.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
5 min a 95 °C	1 min a 94°C	1 min a 67°C	2 min a 72 °C	5 min a 72°C

MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X	Master Mix
Buffer	10 X	1	2.5	52.50
MgCl ₂	50mM	3	1.5	31.50
dNTP's	10mM	0.4	1	21.00
Hif1a F	10uM	1	2	42.00
Hif1a R	10uM	1	2	42.00
Taq Polimerasa	5U/ul	1.5	0.3	6.30
ddH ₂ O			12.7	266.70
Template			3	
Volumen total			25	462
			Vol. x tubo:	22

Nota. Elaboración propia.

Figura 32*Condiciones y mix para la PCR para el gen Bcl6***PROTOCOLO DE PCR PARA Bcl 6**

Referencia: Newman et al., 2011

Prueba:	
Gen:	Bcl 6
Tamaño:	1978 pb

Vol. de reacción	25 µl/ Tubo
Muestra	20

MIX	22
-----	----

PRIMERS		SECUENCIA
Bcl 6	F	GACAGCTGTATCCAGTTCACC
	R	GCAGATTACACTTCTCGCAATGG

N°. de ciclos: 35				
Desnat. Inicial	Desnaturaliz.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
5 min a 95 °C	1 min a 94°C	1 min a 66°C	2 min a 72 °C	5 min a 72°C

MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X	Master Mix
Buffer	10 X	1	2.5	52.50
MgCl ₂	50mM	3	1.5	31.50
dNTP's	10mM	0.4	1	21.00
Bcl6 F	10uM	1	2	42.00
Bcl6 R	10uM	1	2	42.00
Taq Polimerasa	5U/ul	1.5	0.3	6.30
ddH ₂ O			12.7	266.70
Template			3	
Volumen total			25	462
			Vol. x tubo:	22

Nota. Elaboración propia.