



Expresión de genes B-actina y GAPDH a partir de linfocitos del género de *Lama glama*

Benavides Vera, Odalys Jelissa

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

Dra. Torres Arias, Marbel

4 de septiembre del 2023

Resultados del Software Compilatio Magister



MARBEL TORRES ARIAS

Plagiarism report

Benavides_Trabajo de Integración cu...

Scan details

Scan time:
August 28th, 2023 at 13:21 UTC

Total Pages:
46

Total Words:
11427

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.1%	13
Minor Changes	0.1%	9
Paraphrased	0.2%	21
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

🔍 Plagiarism Results: (2)

📄 198129942.pdf

0.3%

<https://core.ac.uk/download/pdf/198129942.pdf>

Carla Zegarra

Universidad Católica De Santa María Facultad De Ciencias Farmaceuticas,
Bioquímicas y Biotecnológicas Escuela Profesional De Ingeniería B...

📄 Evolucion clinica del niño inmunoalergico con otitis ...

0.1%

<https://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/40...>

Revista Electronica de PortalesMedicos.com INICIO - NOVEDADES - ÚLTIMO
NÚMERO - ESPECIALIDADES - INFORMACIÓN AUTORES - CONTACT...

Torres Arias, Marbel Ph D.

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo Integración curricular, “**Expresión de genes B-actina y GAPDH a partir de linfocitos del género de *Lama glama***”, fue realizado por la señorita **Benavides Vera, Odalys Jelissa**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de septiembre 2023

Torres Arias, Marbel Ph D.

C.C: 1802949154



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Benavides Vera, Odalys Jelissa**, con cédula de ciudadanía N°1718644113, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Expresión de genes B-actina y GAPDH a partir de linfocitos del género de *Lama glama***", es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 27 de septiembre 2023

Benavides Vera, Odalys Jelissa

C.C: 1718644113



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Benavides Vera, Odalys Jelissa**, con cédula de ciudadanía N°1718644113, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Expresión de genes B-actina y GAPDH a partir de linfocitos del género de *Lama glama*”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 27 de septiembre 2023

Benavides Vera, Odalys Jelissa

C.C: 1718644113

Dedicatoria

Dedicado al pilar de mi vida, mis padres, Diego Benavides y Verónica Vera, quiénes han permitido que mis propósitos sean fructíferos y valiosos con su esfuerzo y apoyo diario. Sus enseñanzas llenas de sabiduría me han ayudado a tomar decisiones razonables en mi vida profesional, generando persistencia en mis caídas y orgullo en mis victorias.

Odalys Jelissa Benavides Vera

Agradecimientos

A mi papá, Diego Benavides, por entregarme todo su esfuerzo y constancia para convertirme en una mujer con un paso más en la ciencia.

A mi mamá, Verónica Vera, por acompañarme desde siempre con su fuerza y amor para trazar un camino fijo sin límites y vueltas atrás.

Gracias, a mis hermanos, Alisson y Andrew, por ser mis compañeros en mis buenos y malos momentos. A mis abuelitos, por enseñarme que todos los comienzos tienen que ser culminados satisfactoriamente.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, por permitirme haber cumplido un sueño más de todos los planeados. A mis profesores, por ser la fuente principal de conocimiento en este camino.

Agradezco a mi tutora de proyecto, Marbel Torres, Ph.D., por inspirarme a ser parte del mundo de la ciencia y por ser mi guía constante en cada paso final de mi carrera profesional. Gracias, por permitirme comprender que el trabajo en grupo crea grandes cosas y que en un ambiente laboral todos somos un equipo. Gracias a la colaboración de Jorge Ron, Ph.D., médico veterinario encargado de la Hacienda IASA, por su colaboración y gran trabajo en la toma de muestras de los animales.

A las ingenieras Andrea Aluisa y FeARNnda Toscano, por compartir sus aprendizajes para mejorar en el ámbito personal y profesional, y por lograr hacer de un lugar de trabajo una posibilidad de cumplir sueños y retos con mucha disciplina y amabilidad.

Odalys Jelissa Benavides Vera

Índice de Contenidos

Resultados del Software Compilatio Magister	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema	18
Hipótesis	19
Objetivos.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Capítulo II: Revisión de literatura	20
Camélidos	20
Llama (Lama glama)	22
Nanoanticuerpos y su producción.....	23
Clasificación de los nanoanticuerpos	25

Aplicaciones de los nanoanticuerpos	26
Expresión génica	28
Genes constitutivos.....	28
qPCR.....	31
Capítulo III.....	33
Materiales y métodos	33
Extracción de toma de sangre periférica de llama (<i>Lama glama</i>).....	33
Obtención y cuantificación de linfocitos	34
Aislamiento de ARN mediante el método TRI-Reagent.....	36
Transformación de ARN a ADNc con “M-MLV reverse transcriptase”	37
Diseño de cebadores para la amplificación de genes ACTB y GAPDH	39
Diseño de primers	39
Resuspensión de cebadores de ACTB y GAPDH.	39
PCR.....	40
Técnica de qPCR para la amplificación de ACTB y GAPDH.....	42
Capítulo IV: Resultados	45
Registro de características y pruebas tomadas de las llamas (<i>Lama glama</i>).....	45
Obtención y cuantificación de linfocitos	48
Cuantificación e integridad de ARN por espectrofotometría	50
Cuantificación de ARN con DNAsas.....	52

Cuantificación de ADNc con “M-MLV reverse transcriptase”	53
Selección cebadores para la amplificación de genes ACTB y GAPDH	54
Estandarización de PCR de los genes de interés	56
Técnica de qPCR.....	58
Capítulo V: Discusión	66
Capítulo VI: Conclusiones.....	72
Capítulo VII: Recomendaciones.....	73
Referencias bibliográficas	74

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Estudios preclínicos del uso de nanoanticuerpos</i>	27
Tabla 2 <i>Diferencias específicas entre genes constitutivos y especialistas</i>	28
Tabla 3 <i>Características de diferentes genes constitutivos</i>	29
Tabla 4 <i>Proporción de reactivos de Lymphoprep</i>	34
Tabla 5 <i>Reacción para el tratamiento de ARN con DNAasas</i>	37
Tabla 6 <i>Reacciones para síntesis de ADNc</i>	38
Tabla 7 <i>Componentes para PCR con “DNA Taq Polimerasa”</i>	40
Tabla 8 <i>Pasos de PCR en termociclador Proflex PCR System</i>	41
Tabla 9 <i>Componentes para qPCR con “GoTaq qPCR Master Mix”</i>	42
Tabla 10 <i>Pasos de PCR en termociclador BIORAD equipo CFX96</i>	43
Tabla 11 <i>Registro de cada animal con su respectiva prueba de hematocrito y proteínas totales</i>	45
Tabla 12 <i>Características de cada muestreo realizado</i>	49
Tabla 13 <i>Número de linfocitos según variables como sexo, cantidad de linfocitos y ARN</i>	49
Tabla 14 <i>Cuantificación de ARN según variables como sexo, cantidad de linfocitos y ARN</i>	50
Tabla 15 <i>Cuantificación de ARN según el número del animal</i>	51
Tabla 16 <i>Cuantificación de ARN tratado con DNAsas según el número del animal</i>	53
Tabla 17 <i>Cuantificación de ADNc según variables como sexo y ARN</i>	53
Tabla 18 <i>Cuantificación de ADNc según número de animal</i>	54
Tabla 19 <i>Cuantificación de ADNc según número de animal</i>	54
Tabla 20 <i>Componentes para PCR con “DNA Taq Polimerasa”</i>	56
Tabla 21 <i>Componentes para PCR con “DNA Taq Polimerasa”</i>	57
Tabla 22 <i>Comparación de datos obtenidos de la curva estándar de BIORAD y EXCEL</i>	63

Índice de figuras

Figura 1 <i>Distribución de camélidos en Sudamérica</i>	21
Figura 2 <i>Proceso de producción de anticuerpos a partir de linfocitos B nativos</i>	24
Figura 3 <i>Producción de nanoanticuerpos a partir de la obtención de linfocitos tipo B de la inmunización de un camélido</i>	25
Figura 4 <i>Secuencia genómica de B-actina de Camelus dromedarius con sus respectivos intrones y exones</i>	30
Figura 5 <i>Secuencia genómica de B-actina de Vicugna pacos</i>	30
Figura 6 <i>Sistema de fluorescencia a través del uso de un colorante fluorescente denominado SYBR Green</i>	31
Figura 7 <i>Curva de amplificación de la técnica de qPCR</i>	32
Figura 8 <i>Establecimiento de recolección de sangre de llamas</i>	33
Figura 9 <i>Número de linfocitos con respecto al volumen de sangre extraída</i>	48
Figura 10 <i>Cuantificación de ARN con respecto al número de linfocitos de diferentes llamas</i>	51
Figura 11 <i>Integridad de ARN a partir de linfocitos de Lama glama</i>	52
Figura 12 <i>Visualización de bandas de cebadores ACTB y GAPDH</i>	55
Figura 13 <i>Amplificación del gen ACTB</i>	57
Figura 14 <i>Amplificación del gen GAPDH</i>	58
Figura 15 <i>Curva de amplificación del gen ACTB</i>	59
Figura 16 <i>Curva de amplificación del gen GAPDH</i>	60
Figura 17 <i>Comparación de la amplificación del gen ACTB y GAPDH con valores de Ct con respecto a cada llama analizada</i>	61
Figura 18 <i>Linealización de ciclo de amplificación y amplificación inicial</i>	62
Figura 19 <i>Relación de la muestra estándar con respecto al número de llama (Racio)</i>	63

Figura 20 <i>Genes amplificados a partir de linfocitos de Lama glama</i>	64
Figura 21 <i>Verificación de normalidad en la linealización de los datos en la gráfica QQplot</i>	64
Figura 22 <i>Comparación de la amplificación entre genes</i>	65

Índice de abreviaturas

nAbs o Nbs: Nanoanticuerpos

ACTB: Gen B-actina

GAPDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

pb: Pares de bases

ARN: Ácido ribonucleico

ADNc: ADN complementario

qPCR: PCR cuantitativa

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

M-MLV: Virus de la leucemia murina

RT: Retrotranscripción

MMLV-RT: Enzima de retrotranscripción de virus de la leucemia murina

HcABs: Por sus siglas en inglés Heavy chain-only antibodies, Anticuerpos solo de cadena pesada

Ct o cq: Ciclo de detección de fluorescencia tras la amplificación de las moléculas

Sq: Cantidad inicial de copias amplificadas

SBF: Suero bovino fetal

PBS: Tampón fosfato salino

Resumen

Los diferentes tratamientos médicos tienen la capacidad de prevenir o erradicar enfermedades infecciosas o no infecciosas. Los anticuerpos son agentes importantes en la defensa dentro del sistema inmune, en su clasificación se encuentran los nanoanticuerpos, proteínas muy pequeñas que poseen mayor estabilidad, afinidad al antígeno y mejor posibilidad de migración dentro de los tejidos, logrando ser de interés en la terapia alteARNtiva. *Lama glama*, es una especie de camélidos capaz de producirlos, por lo tanto, se requieren hacer investigaciones sobre la presencia de las secuencias de estos genes que cuentan únicamente con la cadena pesada de su región variable, para ello es necesario comparar la expresión de los genes de interés con genes constitutivos, como b-actina (ACTB) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La expresión de estos genes se generó a partir del aislamiento de linfocitos de sangre periférica del animal y tras un proceso de obtención de ARN, transformación a ADNc y amplificación cuantitativa con cebadores previamente diseñados, se logró obtener ciclos con valores entre 21 y 35 que indican una expresión positiva de cada uno de los genes. Además, se comprobaron los resultados mediante electroforesis con la presencia de los fragmentos esperados de 151 y 205 pb para el gen ACTB y GAPDH, respectivamente.

Palabras clave: Genes constitutivos, cebadores, amplificación, expresión génica nanoanticuerpos.

Abstract

The different medical treatments have the capacity to prevent or eradicate infectious or non-infectious diseases. Antibodies are important agents in the defense within the immune system, in their classification are the nanoantibodies, very small proteins that have greater stability, affinity to the antigen and better possibility of migration within the tissues, becoming of interest in alternative therapy. Lama glama is a species of camelids capable of producing them, therefore, research is required on the presence of the sequences of these genes that have only the heavy chain of its variable region, for this it is necessary to compare the expression of the genes of interest with constitutive genes, such as b-actin (ACTB) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The expression of these genes was generated from the isolation of peripheral blood lymphocytes from the animal and after a process of obtaining ARN, transformation to ADNc and quantitative amplification with previously designed primers, it was possible to obtain cycles with values between 21 and 35 that indicate a positive expression of each of the genes. In addition, the results were verified by electrophoresis with the presence of the expected fragments of 151 and 205 bp for the ACTB and GAPDH genes, respectively.

Key words: Constitutive genes, primers, amplification, gene expression, nanoantibodies.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Las enfermedades han prevalecido durante toda la historia de la humanidad y se mantienen en una interacción dinámica entre humanos, animales, plantas y otros organismos existentes dentro del ecosistema terrestre (Losa, 2021). Esto como resultado del acoplamiento de las diferentes especies a los hábitats de otras, generando una interrelación tanto benéfica como perjudicial cuando se trata de la transmisión de enfermedades infecciosas a través de agentes patógenos como bacterias, virus u otros microorganismos (Sánchez-González, 2021).

Debido al escaso control de las enfermedades y la falta de información sobre las mismas, han existido pandemias y epidemias que han erradicado varias poblaciones (Hernández-Mesa et al., 2020). Durante varios años, los avances en tratamientos y eliminación de los agentes causales han tenido éxitos y fallos por las resistencias que presentan estos organismos ante medicamentos o procedimientos de control (Franco-Paredes & Rodríguez-Morales, 2020).

La implementación de tratamientos con anticuerpos policlonales y monoclonales es una estrategia de la inmunoterapia para combatir y controlar varias enfermedades, por ejemplo, el cáncer (Salguero Jiménez, 2015). Sin embargo, estos anticuerpos presentan limitaciones tales como: su baja estabilidad, altos costos de producción, estructura grande que limita el transporte eficiente por los tejidos del cuerpo humano y de animales (Abreu & Laura, 2021). Otra desventaja de los anticuerpos convencionales es el rechazo de los mismos por parte del sistema de los pacientes tratados por su baja especificidad, y la presentación de varios ensayos experimentales para la comprobación de su eficacia y el lanzamiento al mercado farmacéutico (Ortega-Portilla, Cancino-Villeda, Coronado-Aceves, Espitia-Pinzón, et al., 2021).

Los nanoanticuerpos (Nbs) son producidos principalmente por los siguientes grupos de animales: peces y camélidos (Chiesa Campeas & Olivera Ferreira, 2021). Las especies dentro de un ecosistema marino son limitantes en el campo investigativo debido a que no se genera un control adecuado en la producción de los anticuerpos, principalmente por las condiciones cambiantes de su hábitat (Ureta Santillan, 2022).

En la investigación experimental, la producción de estos pequeños fragmentos de anticuerpos requiere de un grupo de animales específicos como sujetos de prueba, que al ser sometidos a un proceso experimental pueden generar un cambio sustancial en la respuesta del sistema inmune y la expresión de sus genes (Triana-Gutiérrez et al., 2021).

Justificación del problema

Los camélidos tienen la capacidad de producir anticuerpos con mayor capacidad de reconocimiento a los agentes patógenos como bacterias y/o virus, presentan una mayor estabilidad, además su producción presenta un costo reducido debido a que su sistema de expresión se genera en *Escherichia coli* (Iraola et al., 2023). A diferencia de los anticuerpos convencionales que son usados en aplicaciones terapéuticas, estos nanoanticuerpos (Nbs) producidos por la familia Camelidae se caracterizan por su estructura simple y robusta, permitiéndoles interactuar con facilidad dentro del sistema inmune para el tratamiento y diagnóstico de diferentes enfermedades (Abreu & Laura, 2021).

Tras conocer que los nanoanticuerpos son generados por ciertas familias específicas, los más usados para su producción y línea de investigación, han sido los camélidos, debido a que el manejo de cada animal y el proceso de inmunización es más controlado dentro del área de investigación, logrando una producción eficiente de estos agentes terapéuticos (Chiesa Campeas & Olivera Ferreira, 2021) .

Para realizar una cuantificación de los niveles de expresión de los genes ante una respuesta inmunitaria en especies de camélidos (por ejemplo, *Lama glama*) se emplea la técnica de qPCR, dado

que al estimular al sujeto experimental a un antígeno o una sustancia extraña, este tiende a inducir genes en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Rodon et al., 2023).

El análisis de la expresión genética con genes constitutivos es útil para establecer un control general del animal, lo cual se realiza previo a un proceso de experimentación como es la inmunización (Jaime, 2019). Esto permite obtener datos experimentales normalizados que varíen de forma mínima posteriormente a ser sometidos a condiciones específicas en un experimento (Linares Huapaya, 2023). Los datos de los genes constitutivos ayudan a facilitar la comprensión de los resultados del nivel de expresión de otros genes de interés (Jaime, 2019).

Hipótesis

La especie *Lama glama* perteneciente a la familia Camelidae presentará una expresión génica positiva a B-actina y GAPDH a partir de extracción de linfocitos.

Objetivos

Objetivo general

Expresar de forma génica los cebadores B-actina y GAPDH por el método de reacción de cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) a partir de linfocitos de *Lama glama* para el análisis de los niveles de expresión de los genes de interés.

Objetivos específicos

- Obtener linfocitos mediante una diferenciación celular con el gradiente de densidad a partir de sangre periférica de *Lama glama* con el fin de obtener posteriormente ARNm codificador de los genes de interés.
- Transformar ARN a ADNc mediante el proceso de transcripción reversa con la enzima “M-MLV Reverse Transcriptase” para usarse como plantilla de la amplificación por qPCR.

- Analizar Delta ct mediante PCR cuantitativa (qPCR) a fin de verificar los niveles de expresión de los genes B-actina y GAPDH.

Capítulo II: Revisión de literatura

Camélidos

Las especies pertenecientes a la familia Camelidae son vicuña (*Vicugna vicugna*), guanaco (*Lama guanicoe*), alpaca (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*) ubicadas principalmente en Sudamérica y dos especies consideradas camélidos grandes en el medio Oriente: camello bactriano (*Camelus bactrianus*) y camello dromedario (*Camelus dromedarius*) (Vincenzetti et al., 2022). Según su clasificación taxonómica, pertenecen al Orden Artiodactyla y el suborden Tylopoda. Su hábitat se encuentra principalmente en páramos con una altitud de 3800 a 4800 metros sobre el nivel mar (m.s.n.m) o en zonas áridas, adaptándose sin problemas a condiciones extremas, a diferencia de otros animales (García Tapia, 2020).

En el año 2020, se estimó que a nivel mundial existe una población de camélidos aproximadamente de 40 millones de animales, además en un estudio demográfico determinan que después de 25 años la cifra podría ascender a 60 millones (Faye, 2020). Estos datos proporcionan un papel fundamental para la producción de carne y leche, la economía ganadera y como beneficio humano tras ser criados como medio de transporte (Lau, 2021).

Además, los camélidos han sido considerados especies exóticas y útiles para fines medicinales o terapéuticos, esto debido a que la estructura de ciertas sustancias que producen son de pequeño tamaño lo que permite que interactúen con mayor facilidad con el sistema inmune, tejidos y/o células. Tal es el caso de la producción de nanoanticuerpos utilizados en aplicaciones biomédicas como el tratamiento de enfermedades autoinmunes, infecciosas, entre otras (Yu et al., 2020). Otro caso, es la leche de ciertas especies como es el caso del camello dromedario (*Camelus dromedaries*), que actúa

combatiendo enfermedades autoinmunes debido a que sus inmunoglobulinas al ser de tamaño reducido, logran pasar del animal a su leche y posteriormente al consumirla se transfieren a la sangre humana, atacando a los antígenos (Vincenzetti et al., 2022).

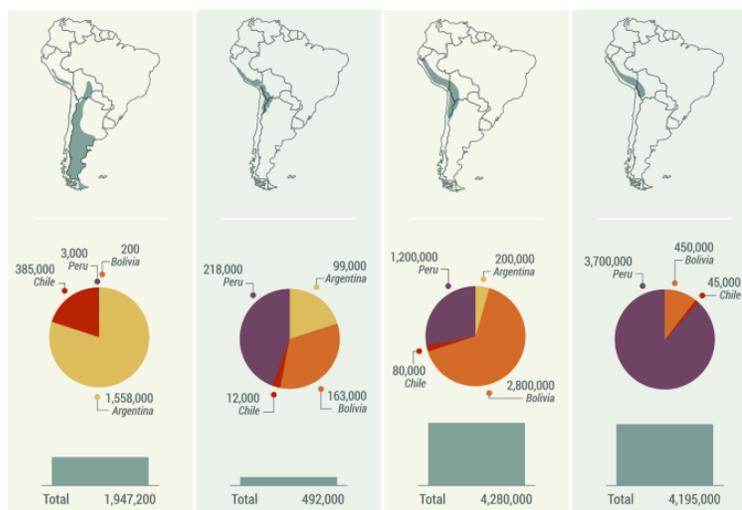
La siguiente figura muestra la distribución de los camélidos sudamericanos, en donde las llamas representan un porcentaje mayor de distribución en zonas cercanas a Ecuador y se presenta una mayor cantidad de individuos (Vilá & Arzamendia, 2022).

Figura 1

Distribución de camélidos en Sudamérica



Figura 1



Nota. Adaptado de *South American Camelids* (p.708), Vilá & Arzamendia, 2022, *Sustainability Science* (2022).

Llama (Lama glama)

Esta especie es considerada como un camélido sudamericano domesticado, siendo uno de los animales más grandes dentro de este grupo de domesticación. Se adaptan fácilmente a un hábitat con una elevación de 3800 hasta 5000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), los países en los que se encuentran generalmente son en Colombia, Ecuador, Bolivia y Chile. El porcentaje de distribución de esta especie en comparación al resto de los camélidos sudamericanos es del 45% (Alcon Tambo, 2003). Su alimentación se basa en el consumo de pastos naturales en una zona abierta, principalmente en campos o potreros (Apaza Zúñiga et al., 2022).

El manejo y la crianza se basan principalmente en proporcionar una adecuada alimentación, revisiones sobre su salud, un mejoramiento genético, la reproducción y el control dentro de su hábitat. La buena salud consiste en mantener al animal en una zona libre de patógenos o brotes infecciosos, por otra parte, la alimentación se proporciona por los pastizales, no es necesario abonar con nutrientes a estos campos, sin embargo, puede ser un suplemento para mejorar el estado de salud del animal (Ayala Vargas, 2018).

Generalmente se realizan investigaciones con llamas (*Lama glama*) por el interés biotecnológico en cuanto a la producción de inmunoglobulinas IgG de cadena pesada, importantes por su estabilidad y el alto nivel de producción en sistemas de bacterias (Van der Linden et al., 2000). Las llamas (*Lama glama*) se utilizan con mayor frecuencia en la experimentación de la selección de nanoanticuerpos por su facilidad de tener una zona de control dentro de una institución pública o una empresa asociada a la línea de investigación (Desmyter et al., 2015).

Nanoanticuerpos y su producción

Se caracterizan por tener dominios variables de unión al antígeno, únicamente de la cadena pesada, conocidos como fragmentos de anticuerpo VHH (Ortega-Monge et al., 2022). Las características que presentan estas biomoléculas son: su estructura robusta, peso molecular bajo que a diferencia del anticuerpo convencional que tiene 150 kDa, estos presentan un tamaño entre 12 a 15 kDa, alta especificidad, afinidad y penetración en tejidos (Yu et al., 2020). Tienen una mejor accesibilidad a los compartimentos de proteínas, al ingreso en tejidos para atacar a aquellos tumores que se encuentran compactos (Cortez-Retamozo et al., 2002).

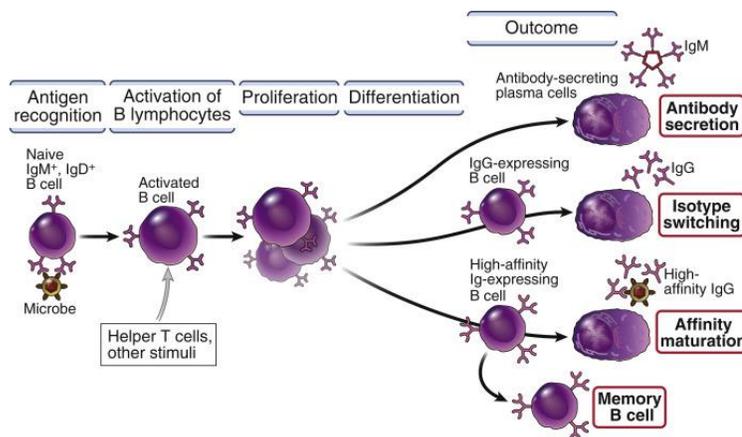
Estas moléculas son parte de una nueva estrategia terapéutica en desarrollo para mejorar los tratamientos de enfermedades autoinmunes, infecciones por patógenos que resultan transmisibles y la resistencia que presentan los agentes infecciosos a una multitud de medicamentos, principalmente a los antibióticos (Del Rio et al., 2019). Sus aplicaciones más notables se centran en el área biomédica utilizados como sistemas de reconocimiento molecular, inmunoterapias, inmunodiagnósticos y para la administración de fármacos (Ortega-Portilla et al., 2021). Para evitar la inmunización directa en estos animales, se han creado bibliotecas de nanoanticuerpos (Nb) sintéticos, inmunes o Naïve, lo cual se ha realizado con la finalidad de que los diferentes individuos experimentales no sean perjudicados por la alta toxicidad que se podría presentar (Muyldermans, 2021).

Existen dos tipos de linfocitos: linfocitos T encargados de la respuesta celular y los linfocitos B responsables de la producción de anticuerpos como consecuencia de una respuesta humoral ante la presencia de agentes externos a la célula, tienen diversas funciones ante las respuestas inflamatorias, se expresan cuando se presentan auto antígenos y también sirven para exponer antígenos a las células de linfocitos T (Prieto Martín et al., 2013). El proceso de producción de anticuerpos se centra primero en el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos B nativos con anticuerpos IgM o IgD en su

membrana que son los receptores de antígenos, posteriormente se activan a través de los linfocitos T auxiliares (Helper T cell en inglés) por un sistema de reconocimiento MHC, es decir, complejo péptido-complejo principal de histocompatibilidad, únicamente cuando los antígenos son proteicos, mientras que cuando se trata de otros antígenos como polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos no es necesario una célula T para la activación del linfocito B. La fase de proliferación se fundamenta en la generación de células plasmáticas, las cuales son las encargadas de producir una infinidad de anticuerpos, y luego pasan a un proceso de diferenciación donde el resultado son varios anticuerpos de distintas clases de cadena pesada como las células plasmáticas secretoras de anticuerpos IgM, las células B que expresan IgG, células B que expresan alta afinidad y maduran con el tiempo para la producción de IgG, y las células B de memoria de larga vida (Figura 2) (Themes, 2019).

Figura 2

Proceso de producción de anticuerpos a partir de linfocitos B nativos



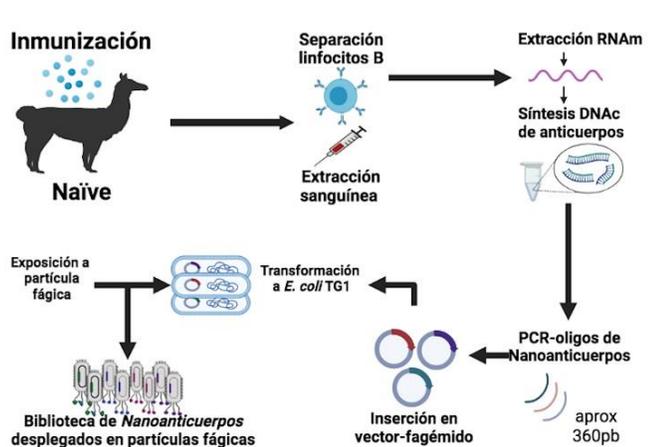
Nota. Tomado de *Humoral Immune Responses*, Themes, 2019, *Basicmedical Key*, (2019).

El proceso de producción o aislamiento de nanocuerpos que neutralicen los agentes causales de enfermedades consiste en la inmunización del animal, para después extraer células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) (Xu et al., 2021). Posteriormente se extrae ARN que se transforma en ADNc,

y a partir de este paso se prepara una biblioteca para el uso posterior como marcadores moleculares en los avances de la biología (Itoh & Sokol, 2014). Los sistemas de expresión en levaduras tiene la limitación de la existencia de azúcares de manosa que impide que el nanocuerpo tenga una funcionalidad óptima y específica, por otra parte, en hongos se puede generar una degradación de las moléculas por la producción constante de proteasas, debido a las desventajas existentes, el sistema de expresión que genera un mejor resultado es en el periplasma de la bacteria *Escherichia coli*, debido a la facilidad en la purificación de los fragmentos de interés (Nagy-Fazekas et al., 2023) (Figura 3).

Figura 3

Producción de nanoanticuerpos a partir de la obtención de linfocitos tipo B de la inmunización de un camélido



Nota. Tomado de *Nanoanticuerpos: desarrollo biotecnológico y aplicaciones*, Ortega-Portilla et al., 2021, *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológica* (2021).

Clasificación de los nanoanticuerpos

Los nanoanticuerpos se dividen según su origen:

- Origen de camélidos: Todos los individuos que pertenecen a la familia Camelidae presentan la capacidad de producir anticuerpos con cadenas pesadas (HcABs) de tamaño de 15kDa,

entre ellos están los del Viejo Mundo como son los camellos y dromedarios y del Nuevo Mundo las llamas, alpacas y vicuñas (Pedreáñez et al., 2021). Las especies de camellos que se han estudiado para la obtención de HcAbs son *Camelus bactrianus* y *Camelus dromedarius*, la cantidad de estos anticuerpos varía entre un 50 y 80% en el suero de los mismos, mientras que en los animales del Nuevo Mundo, tienen una cantidad menor al 25%, a pesar de ello son usados por su gran distribución en Sudamérica (Bessalah et al., 2021).

- Origen de tiburones: Las especies *Ginglymostoma cirratum* y *Galeorhinus galeus* tienen una mayor capacidad de producir Nbs y son pertenecientes de la familia Orectolobidae y presentan entre 3 y 5 dominios constantes y tienen un tamaño de 73kDa (Ortega-Monge et al., 2022).
- Origen de ratones: Han sido modificados y se han convertido en especies transgénicas con la capacidad de producir anticuerpos con cadena pesada (HCAb) (Muyldermans, 2021).

Aplicaciones de los nanoanticuerpos

Las diferentes características de los Nbs son favorables para distintas e importantes aplicaciones en áreas de diagnóstico, terapia e investigación.

En el campo de investigación se tienen las siguientes aplicaciones: Nanotrap: Adsorbente por afinidad; Chaperona: Cristalización; Cromocuerpo: Rastreo de antígenos; deGradFP: Degradación del objetivo; Morfotrampa, optocuerpo y fotocuerpo. Por otra parte, está en el campo terapéutico: Hematología; Oncología; Neurología; Enfermedades virales; Vacunación pasiva; Envenenamiento (Toxina bacteriana, veneno de escorpión y serpiente). Y por último en el campo de diagnóstico: Ensayos electroquímicos (in vitro); ELISA sándwich de doble anticuerpo (in vitro); ELISA competitivo (in vitro); Ensayo de flujo lateral

(in vitro); Imágenes no invasivas (in vivo); Tomografía de emisión de fotón único (in vivo); Tomografía positrones (in vivo).

La siguiente tabla muestra diferentes estudios preclínicos pertenecientes al área médica (Tabla 1).

Tabla 1

Estudios preclínicos del uso de nanoanticuerpos

Aplicación	Descripción
Detección de cáncer	Selección de nanoanticuerpos específicos contra a-fetoproteína, para la detección ultrasensible de un biomarcador de cáncer
Impedimento de propagación del cáncer	Uso de nAbs CAPNb2 contra CapG humano para impedir la formación de lesiones metastáticas o migración celular en el cáncer de mama.
Impedimento de propagación del cáncer	Desarrollo de nAbs dirigidos al receptor de quimiocinas para alterar el crecimiento tumoral en los glioblastomas
Reducción de la recurrencia del cáncer	Uso de células CAR-T derivadas de nAbs bioespecíficos en linfoma B en período de recaída para evaluar la seguridad y eficacia de las mismas.
Inhibición de la replicación de la Hepatitis C	Desarrollo de nAbs con clones de E.coli para penetrar e inhibir el virus.
Diagnóstico de la EA	Uso de los VHH como sondas específicas para diana localizadas en el cerebro, como posible herramienta diagnóstica
Prevención de la EA	Uso de VHH anti BACE1 por medio de virus adenoasociados (AAV) para disminuir la cantidad de amiloide en ratones con la EA.
Impedimento de la propagación del parkinson	Uso de los nAbs VH14PEST para contrarrestar los efectos tóxicos de la proteína a-sinucleína que forma agregados facilitadores de degeneración neuronal.
Inhibición y tratamiento de la diarrea por rotavirus	Inhibición de la propagación del rotavirus mediante el uso de VHH anti-VP6.
Tratamiento preventivo contra COVID-19	Desarrollo de una biblioteca de VHH e identificación de su potencial como tratamiento preventivo contra COVID-19

Nota. Tomado de *Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina (p. 193), Ortega-Monge et al., 2022,*

Ars Pharm (2022).

Expresión génica

La expresión de una variedad de genes es la respuesta del funcionamiento normal de un sistema y también sirve para evaluar el efecto producido por enfermedades o tratamientos en contra las mismas. Cuando se realiza un análisis exhaustivo del nivel de expresión de genes se copia información mediante los patrones de respuesta que presentan una variedad de genes ante condiciones específicas (Caramelo et al., 2006). Existen dos clases de genes, la tabla 2 describe las diferencias entre los genes constitutivos y genes especialistas.

Tabla 2

Diferencias específicas entre genes constitutivos y especialistas

Característica	Genes constitutivos	Genes especialistas
Definición	Los genes constitutivos son genes constantemente expresados en todas las células	Los genes especialistas son los genes expresados solo cuando sus productos son necesarios
Sinónimos	Genes Housekeeping	Genes no constitutivos o genes de lujo
Expresión de genes	Mantienen una tasa de expresión constante	No se expresan siempre
Donde se expresan	En todas las células	En ciertos tipos de células
Productos proteicos	Aquellas que son requeridas constantemente	Aquellos que son productos especializados
Estado	Se mantienen en modo activo todo el tiempo	Se mantienen inactivos hasta ser necesarios
Ejemplos	Genes para enzimas de la glucólisis, ATAasa	Gen para nitrato reductasa en plantas, sistema lactosa en <i>E. coli</i>
Expresión	No está regulada	Está regulada

Nota. Tomado Difference Between Housekeeping Genes and Luxury Genes (p. 1), Samantha, 2020, Difference Between (2020).

Genes constitutivos

Se trata de genes hospederos que están constantemente expresándose, generalmente están implicados en el funcionamiento celular general, por lo tanto, se espera que su expresión se manifieste

sin variaciones en las células a pesar de que las mismas estén en diferentes tejidos, ciclos o presenten una señal exteARN. La aplicación principal de estos genes es mantenerlos como un control interno de expresión durante un proceso experimental (Eisenberg & Levanon, 2013).

Existen varios genes constitutivos con sus respectivas funciones (Tabla 3).

Tabla 3

Características de diferentes genes constitutivos

Nombre del Gen	Abreviatura	FUNCIÓN
ATP sintasa, transportador de H ⁺ , complejo FO mitocondrial, subunidad C3 (subunidad 9)	ATP5G3	Fosforilación oxidativa
B-2 Microglobulina	B2M	B-Cadena de mayor complejo de histocompatibilidad molecular de clase I
B-actina	ACTB	Proteína estructural del citoesqueleto
B-Glucoronidasa	GUSB	Exoglucosidasa en lisosomas
Ciclofilina A	PPIA	Serina-treonina inhibidor de la fosfatasa
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	Enzima de glucólisis
Hipoxantina fosforibosiltransferasa I	HPRT1	Hidrolasa en el metabolismo de los carbohidratos
Fosfoglicerato quinasa I	PGK1	Enzima de glucólisis
Caja de unión proteica (TATA)	TBP	Factor de transcripción general de ARN polimerasa
Receptor de transferina	TFRC	Captación de hierro celular

Nota. Tomado de *Desperate house genes*, Caradec et al., 2010, *British jouARNI of cancer*, (2020).

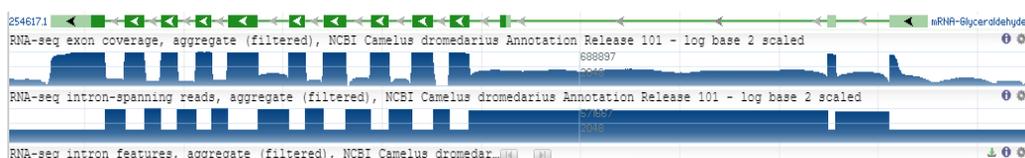
Los genes de interés en este trabajo, se describen a continuación:

Gen B-actina (ACTB): Se expresa en células eucariotas de mamíferos y aves (Guirado Blanco et al., 2002). Este gen forma parte de las actinas, grupo de proteínas más abundantes dentro del sistema celular eucariota, las cuales han presentado una secuencia y estructura conservada en varias especies. Siendo la b-actina una isoforma perteneciente al grupo de las actinas clasificadas en actinas no musculares o citoplasmáticas, sin embargo, son codificadas por diferentes genes (Pastor et al., 2023) .

Las funciones de este gen son los cambios conformacionales durante el ciclo de las células, la motilidad celular, implementación de una fuerza como respuesta ante señales exteARNs, y además sirve como transporte intracelular. Su estructura presenta seis exones y cinco intrones (Guirado Blanco et al., 2002).

Figura 4

Secuencia genómica de B-actina de Camelus dromedarius con sus respectivos intrones y exones

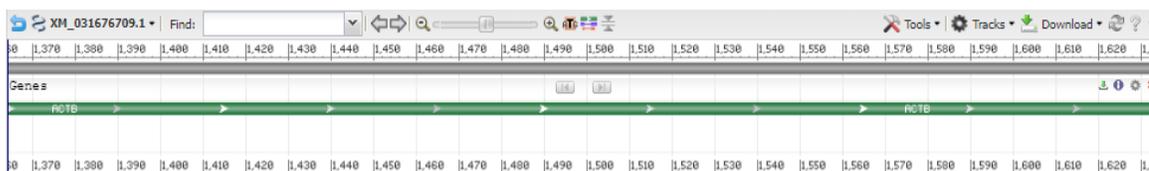


Nota. Tomado de ACTB actin beta [Camelus dromedarius (Arabian camel)] - Gene - NCBI, s. f.

Gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH): Este gen es una enzima partícipe del proceso de glucólisis, método para la producción de energía por parte de las células cuando se da la conversión de gliceraldehído-3-fosfato (GAP) a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) (Valsalam et al., 2023). Además, tiene multifunciones importantes, una de ellas es la interacción con los distintos componentes que forman parte del citoesqueleto, regulación de la expresión génica, la regulación de los genes y su expresión, entre otras (Garcin, 2019). Otras funciones son la autofagia y reparación de ADN (Butera et al., 2019). Presenta una estructura conservada tridimensional con dominios catalíticos de unión al sustrato y al NAD⁺ (Lyu et al., 2023).

Figura 5

Secuencia genómica de B-actina de Vicugna pacos



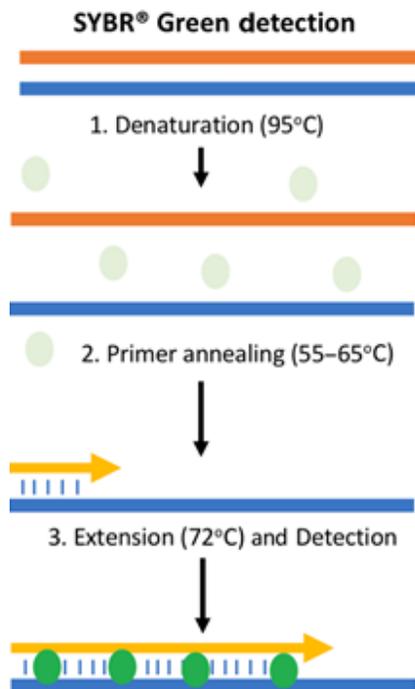
Nota. Tomado de ACTB actin beta [Vicugna pacos (alpaca)] - Gene - NCBI, s. f.

qPCR

Es una herramienta molecular destacable en la aplicación biomédica para la detección y cuantificación de la molécula de ARNm, útil para la normalización de genes de referencia utilizados en estudios experimentales. El proceso general consiste en la hibridación de los cebadores a la secuencia de ADN o ADNc, y la polimerización del ADN por acción de una enzima polimerasa que permite la extensión o la síntesis de la cadena complementaria, luego se genera la detección de la fluorescencia tras la excitación de los fluoróforos cuando se intercala con el ADN sintetizado, y se produce mayor fluorescencia tras la producción de las múltiples copias de las secuencias provocando la emisión de una respuesta al sistema de qPCR durante un ciclo determinado (Ct o Cq) (Figura 5) (Sidstedt et al., 2020).

Figura 6

Sistema de fluorescencia a través del uso de un colorante fluorescente denominado SYBR Green

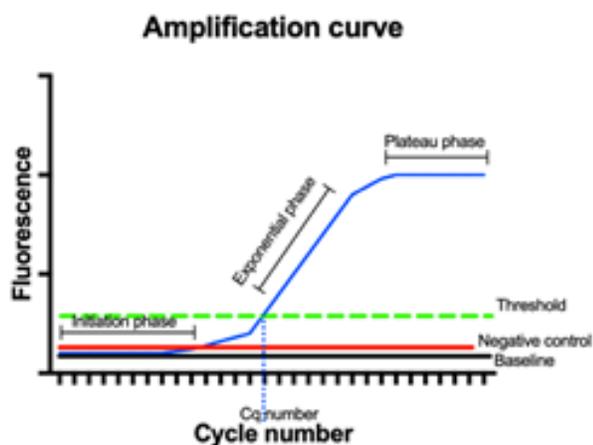


Nota. Tomado de *Guía de qPCR* (p.48), Adams, 2020, *The Biochemist*, (2020).

El resultado de la amplificación a través de qPCR es la obtención de una curva con tres fases: la primera es la fase de iniciación en donde se activa la enzima utilizada para la síntesis del ADN, además es el paso en donde el nivel de amplificación es relativamente bajo y es utilizado como referencia para el análisis de la amplificación posterior, la segunda es la fase exponencial basada en el avance de la reacción tras la producción de la fluorescencia por la amplificación de las copias del gen de interés, cuando la fluorescencia supera el nivel de la línea base o de referencia a este se le denomina umbral, y es la parte principal de la cuantificación, debido a que el punto de cruce es el valor expresado en el eje x conocido como Ct o Cq (Adams, 2020) (Figura 7).

Figura 7

Curva de amplificación de la técnica de qPCR



Nota. Tomado de *Guía de qPCR* (p.48), Adams, 2020, *The Biochemist*, (2020).

Capítulo III

Materiales y métodos

Extracción de toma de sangre periférica de llama (*Lama glama*)

Para el proceso de recolección de sangre, se utilizaron llamas de la zona de Sangolquí, pertenecientes a las instalaciones Hacienda el Prado de la Universidad de las Fuerzas Armadas (IASA-ESPE) (Figura 8).

Figura 8

Establecimiento de recolección de sangre de llamas



Nota. Zona 1: Establecimiento de la Hacienda El Prado, Selva Alegre de la provincia de Pichincha donde se realizaron los muestreos respectivos a las llamas.

Cada animal fue registrado según sus características físicas, sexo, temperatura y peso (kg aproximado). Además, el laboratorio de mejoramiento genético y sanidad animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) realizó pruebas diagnósticas tales como hematocrito, proteínas totales y coproparasitarios para evaluar su estado de salud. En el primero muestreo los animales estuvieron desparasitados con Fenbendazol.

Los animales fueron asegurados y se procedió a extraer la sangre de la vena yugular, zona desinfectada con alcohol (70%). Para la extracción de sangre, se utilizó una bolsa para colección y preservación de sangre (capacidad de llenado hasta 150mL), estéril y no tóxica con una aguja de calibre 16G con una solución de adenina dextrosa fosfato citrato como anticoagulante. Las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), en una cadena de frío para la preservación y evitar la degradación del material de interés. Las muestras fueron tratadas dentro del tiempo máximo de conservación que son 24 horas.

Obtención y cuantificación de linfocitos

Se tomó como referencia el protocolo del gradiente de densidad *Lymphoprep* para la obtención de linfocitos. Para lo cual, primero se agitó varias veces la botella del medio y se procedió a extraer el volumen necesario con la ayuda de una jeringa a través del septo del caucho manteniendo a la botella invertida (Tabla 4).

Tabla 4

Proporción de reactivos de Lymphoprep

Sangre (mL)	PBS+2% SBF (mL)	LYMPHOPREP (mL)	CAPACIDAD DEL TUBO (mL)
1	1	1.5	5
2	2	3	14
3	3	3	14
4	4	4	14
5	5	10	50
10	10	15	50
15	15	15	50

Nota. Volumen de reactivos y capacidad del tubo para realizar la separación de linfocitos según el volumen de sangre.

En otro tubo cónico de 50mL, se agregó un volumen de 15mL de la sangre recolectada en bolsas y para la dilución, se preparó una solución de tampón fosfato salino (PBS) filtrada con jeringa de 0,2um en cámara y se añadió 2% suero bovino fetal (SBF), y se vertió la cantidad respectiva de PBS según las indicaciones de la tabla 3. La sangre diluida se colocó cuidadosamente en el tubo cónico donde se puso previamente el volumen adecuado de la solución de *Lymphoprep*, se evitó que se mezclen las dos soluciones para obtener una mejor extracción de linfocitos. Posteriormente, se centrifugó a 800g durante 40 minutos a 4°C con el freno en cero. Se observaron cuatro fases, la primera perteneciente al plasma se desechó y se conservó en tubos estériles de 15mL, la interfase de células mononucleares (linfocitos). Para determinar el número de células, se realizó un conteo celular utilizando la cámara de Neubauer, en la cual se colocó una dilución de 1:10 (10uL de células en suspensión y 90uL del colorante azul de tripán). Con la ayuda de un microscopio, se observaron y contaron las células de los cuatro cuadrantes y se utilizó la ecuación 1 para el cálculo aproximado de linfocitos en cada muestra.

$$\frac{\#cell}{mL} = \frac{\#cell}{C} \times 10000 \times \frac{Vf}{Vc}$$

En donde:

#Cell: número de células

C: cuadrante

Factor de cada cuadrante: 10000

Vf: volumen final (dilución)

Vc: volumen de células (dilución)

VT: volumen en el que se encuentran en suspensión las células

Según el número de células que se necesiten, se realizó la separación en tubos estériles de 2mL y se centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos para conservar la muestra en pellet seco a una temperatura de -80°C, hasta su posterior análisis.

Aislamiento de ARN mediante el método TRI-Reagent.

Todo el proceso se trabajó con las muestras sobre hielo para evitar la degradación del material de interés. Primero se realizó, la lisis celular que consistió en colocar 1mL del reactivo TRIzol a las células guardadas en pellet seco ($5 \times 10^6 - 10 \times 10^6$ células) y se incubó durante 5 minutos.

Posteriormente, en la separación de fases, se añadió 0,2mL de cloroformo, en el caso de haber agregado 1mL de TRIzol, se homogeneizó por inversión durante 15 segundos, las muestras se incubaron durante 3 minutos y se centrifugaron a 12000G por 15 minutos a una temperatura de 4°C. Luego, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se colocó 0,5mL de isopropanol, en el caso de haber agregado 1mL de TRIzol. Se homogenizó por inversión 20 veces y se incubaron las muestras durante 10 minutos. Para que el ARN precipite, se centrifugó a 12000rpm durante 10 minutos a 4°C. Para el lavado de la muestra, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido en el paso anterior, en 1mL de etanol (75%), en el caso de haber agregado 1mL del reactivo TRIzol. Se homogenizó por inversión y se centrifugó a 7500G durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se dejó secar durante 10 minutos para eliminar todo el exceso de los reactivos.

Finalmente, se solubilizó el ARN con 30uL de agua tratada DEPC (dietilpirocarbonato). Las concentraciones (ng/uL) y la pureza y calidad (ratios de 260/280 y 260/230) de las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro Nanodrop y para verificar la integridad se visualizó las bandas de ARN en un gel al 2,5% con un marcador de peso molecular de ARN, a un tiempo de corrida de 60

minutos con un voltaje constante de 90 voltios (V) de la fuente de poder y se guardaron las muestras a 80°C hasta su posterior análisis.

Para evitar la contaminación con otro material genético, las muestras de ARN fueron tratadas con DNAsas, para ello se colocaron los componentes de la reacción (Tabla 5).

Tabla 5

Reacción para el tratamiento de ARN con DNAsas

Componentes	Reacción 1X (μL)	Concentración Inicial	Concentración final
DNAsa I Buffer	1 μL	10X	1X
DNAsa I (Libre de ARNs)	1 μL	2 U/ μL	0,2U/ μL
ARN (500-1500 ng)	4-8 μL	Depende de la muestra	500-1000 ng
Agua DEPC	1-5 μL	-	-
Volumen final		10 μl	

Nota. La muestra de ARN se descongeló previamente en un recipiente con hielo para evitar la degradación.

Las muestras fueron incubadas en el termociclador durante 20 minutos a 37°C. Por último, con el fin de evitar la acción de enzimas degradadoras del material genético se añadió 1 μL del reactivo EDTA (5mM) y se incubó durante 10 minutos a 75°C.

Transformación de ARN a ADNc con “M-MLV reverse transcriptase”

Primero, se agregaron los reactivos descritos en la Tabla 3 a la alícuota de ARN tratada previamente con DNAsa I, y se incubó durante 10 minutos a 65°C en el equipo termociclador. Después, se procedió a añadir y mezclar los componentes del master mix 2 utilizando una minicentrífuga, y nuevamente se incubaron las muestras durante 2 minutos a 37°C. Posteriormente, se agregaron los

reactivos del master mix 3, y se pasó al último proceso de incubación que se basó en dos tiempos y dos temperaturas diferentes, primero durante 50 minutos a 37°C y finalmente a 15 minutos y a 70°C (Tabla 6).

Las concentraciones (ng/uL) y la pureza y calidad (radios de 260/280 y 260/230) de las muestras se cuantificaron en el espectrofotómetro *Nanodrop 2000* de Thermo Scientific, y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis molecular.

Tabla 6

Reacciones para síntesis de ADNc

Reacción	Componentes	Reacción 1X (μ L)	Concentración Inicial	Concentración final
Master Mix 1	Oligo (dT) 12-18	1	500 μ g/mL	25 μ g/mL
	dNTP Mix	1	10 mM	0,5 mM
	ARNm tratado con DNasa	2	Depende de la	1-500 ng
	I	8	muestra	-
	Agua DEPC		-	
Master Mix 2	Master Mix 1	12		
	First-Strand Buffer	4	5X	1X
	DTT	2	0,1 M	0,01 M
Master Mix 3	Master Mix 2	18		
	M-MLV RT	0,8	200 U/ μ L	8 U/ μ L
	Agua DEPC	1,2	-	-
	Volumen final		20uL	

Diseño de cebadores para la amplificación de genes ACTB y GAPDH

Diseño de primers

Las secuencias de especies pertenecientes a la familia Camelidae, similares a *Lama glama* se exportaron del *GenBank* del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para obtener una secuencia consensus, se realizó un alineamiento múltiple en la herramienta bioinformática *Blenchling*.

Para la obtención de los cebadores se utilizó el programa *Primer3Plus* y se escogió el mejor par de cebadores según los siguientes parámetros:

- Contenido de guanina/citosina (%CG): 50-55%
- Temperatura de melting (Tm): aproximadamente 60°C
- Tamaño del amplicón: 130-200 pb
- Tamaño de los cebadores: 12-20 pb

Además, con el fin de verificar la especificidad de cada uno de los cebadores con respecto a la formación de otros productos como heterodímeros u homodímeros de diferentes especies, se analizó las secuencias en *PrimerBLAST* del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Adicionalmente, se utilizó el programa informático *Serial Cloner* para comprobar la amplificación de cada gen, mediante una PCR *in silico*.

Resuspensión de cebadores de ACTB y GAPDH.

Las secuencias fueron enviadas a sintetizar con el servicio de secuenciación MACROGEN (Ligo). Después de obtener los cebadores sintetizados a una concentración de 60nmol, se realizó una precipitación del contenido liofilizado a través del uso de una minicentrífuga, y para resuspender, se añadió 600 uL del buffer TE 1x para tener una solución madre de 10X, evitando homogeneizar. Se incubaron durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente, se realizó una dilución del

contenido para tener una concentración de 1X, colocando 10uL de la solución madre de 10X y 90uL de agua libre de nucleasas y se almacenaron a una temperatura de -20°C.

En la determinación de la integridad de la reconstitución de los primers, se procedió a cuantificar en el espectrofotómetro *Nanodrop 2000* de Thermo Scientific y posteriormente se realizó una electroforesis con un gel al 3%, tiempo de corrida de 30 minutos y un voltaje constante de 90 voltios (V) de la fuente de poder.

PCR

En primer lugar, paso previo al proceso de qPCR se optimizó y estandarizó los parámetros de amplificación de los genes en una PCR convencional. Para ello, se modificaron ciertos componentes y temperaturas de annealing con la finalidad de obtener una banda definida del amplicón de cada gen. Todo el proceso se efectuó con las muestras sobre hielo para evitar su degradación.

Se trabajó con el kit de la enzima “*DNA Taq Polimerasa*” perteneciente a la corporación Thermo Fisher Scientific. Dentro del aura PCR, se añadieron y homogeneizaron todos los componentes descritos en la tabla 7, excepto la muestra de ADNc, misma que se agregó posteriormente fuera del lugar. Se incrementó una muestra de control positivo con DNA de *Lama glama* y un control negativo únicamente con agua libre de nucleasas para garantizar que no exista una posible contaminación durante el proceso.

Tabla 7

Componentes para PCR con “DNA Taq Polimerasa”

Componentes	Reacción 1X (μ L)	Concentración Inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5 μ L	10X	1X
MgCl ₂	0,75 μ L	50 mM	1,5 mM
dNTPs mix	0,5 uL	10mM	0,2 mM

Componentes	Reacción 1X (μL)	Concentración Inicial	Concentración final
Taq DNA Polimerasa	0,1 uL	5 U/uL	0,02 U/uL
Primer Forward	1 uL	10 uM	0,4 uM
Primer Reverse	1 uL	10 uM	0,4 uM
Muestra de ADNc	2 uL	100 ng/uL	200 ng/uL
Agua libre de nucleasas	17,65 uL	-	-
Volumen final		25 uL	

Los componentes de la reacción y la muestra biológica de ADNc se mezclaron con la ayuda de la minicentrífuga, logrando que todo el material se conserve en la parte inferior del tubo de PCR. Se colocaron todas las muestras dentro del termociclador Proflex PCR System, mismo que fue configurado según la programación estandarizada de su protocolo como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8

Pasos de PCR en termociclador Proflex PCR System

Pasos	Temperatura ($^{\circ}$C)	Tiempo
	95	3 minutos
Desnaturalización Inicial		
Desnaturalización	95	30 segundos
Alineamiento	61	30 segundos
35 ciclos		
Extensión	72	30 segundos
Extensión final	72	7 minutos
Incubar	4	infinito

Para verificar la amplificación de los productos de la técnica de PCR, se realizó electroforesis en gel al 2%, a un tiempo de corrida de 45 minutos con un voltaje constante de 110 voltios (V) de la fuente de poder.

Técnica de qPCR para la amplificación de ACTB y GAPDH

En la comparación del análisis de la expresión génica de cada producto de PCR, se necesitó tener diluciones de la muestra de ADNc de 100ng con el propósito de obtener una concentración final en la reacción de 200ng, debido a que el protocolo se especifica la cantidad máxima con la que trabaja la enzima “*GoTaq DNA Polymerase*” de la corporación Promega.

Previamente, se ejecutó un plan de placa, en donde se ubicó en cada pocillo las muestras de interés, la gamma estándar comparativa de diluciones a diferentes concentraciones, controles negativos y positivos, y se planificó para que cada reacción tenga triplicados. Después, se agregaron los componentes de la reacción (Tabla 9).

Tabla 9

Componentes para qPCR con “GoTaq qPCR Master Mix”

Componentes	Reacción 1X (μL)	Concentración Inicial	Concentración final
GoTaq qPCR Master Mix	10 μL	2X	1X
Primer Forward	4 μL	1 μM	0,2 μM
Primer Reverse	4 μL	1 μM	0,2 μM
Agua libre de nucleasas	0,1 μL	-	0,02 U/ μL
Muestra de ADNc	2 μL	100 ng	200 ng
Volumen final	20 μL		

Las muestras de ADNc, DNA (control positivo) y agua libre de nucleasas (control negativo) se agregaron en cada pocillo de la mezcla previamente colocada. Los pocillos de la placa se sellaron con un film óptico, y se centrifugó toda la placa con el contenido en una centrifugadora a 1000 rpm durante 1 minuto. Las condiciones en el termociclador para la amplificación de los genes se observan en la tabla 10.

Tabla 10

Pasos de PCR en termociclador BIORAD equipo CFX96

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
	Activación de la Polimerasa	95	2 minutos
	GoTaq Hot		
	Desnaturalización	95	15 segundos
35 ciclos	Hibridación	Depende de la temperatura de hibridación de cada cebador	15 segundos
	Extensión	60	45 segundos
	Curva de melting	58 a 95 (aumento de 0,5°C)	5 seg/paso
	Incubación	4	infinito

Los datos se analizaron en el software Bio-Rad CFX Maestro. Dentro de este programa, se obtienen cuatro ventanas, en la primera se obtuvo la curva de amplificación de cada muestra y por consiguiente se visualizó una gráfica de regresión lineal en donde se expresa un valor sobre la eficacia y el R^2 , permitiendo conocer la eficiencia del ensayo. Las dos últimas ventanas mostraron el plan de placa general y una tabla de valores del número de ciclos (Ct) en donde se generó la fluorescencia de cada pocillo al acumularse un número suficiente de amplicones de cada gen.

En la curva de amplificación, con el fin de conseguir un mejor ajuste, se desplazó la línea del umbral, conocida como treshold, por encima de los datos base o controles negativos, los cuales no representaron una amplificación real y simplemente se expresaron como una señal de fluorescencia de fondo o basal antes de la detección de fluorescencia propia de cada producto.

En el software Excel de Microsoft, se importaron los datos expresados en el programa de BIORAD CFX96 para la construcción de una recta entre Ct y el $\text{Log}_{10}(Sq)$.

Se calculó la cantidad inicial de copias que expresa cada gen por el volumen de la muestra (Sq) con la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10}(Sq) = x$$

Donde x se expresó según la ecuación mostrada a continuación:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Siendo:

- $y = Ct = Cq$
- $m = pendiente$
- $b = y - intercept$

Además, se realizó un cálculo de variación entre el promedio de los valores de Ct de la gamma estándar y los amplicones de interés, para obtener un ratio de la expresión absoluta, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\Delta Ct = Ct_{(interés)} - Ct_{(estándar)}$$

$$Racio = \frac{Ct_{(interés)}}{Ct_{(estándar)}}$$

En el programa de BIORAD CFX96, se observó la curva de Melting para comprobar la amplificación de los productos.

En la comparación de los dos genes estudiados de ACTB y GAPDH se realizó un análisis estadístico para comparar dos conjuntos de mediciones, además de evaluar la normalidad y homocedasticidad que comprueban la homogeneidad de los errores y las desviaciones estándares en las repeticiones, para lo cual se usó una prueba paramétrica denominada ANOVA de dos vías y T-test en el programa estadístico GraphPad Prism.

Capítulo IV: Resultados

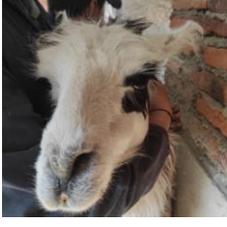
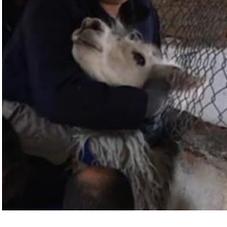
Registro de características y pruebas tomadas de las llamas (*Lama glama*)

El registro de los animales presenta características como el aspecto físico, el número del animal, sexo, la temperatura y el peso (Tabla 11). Los resultados del estado de salud del animal fueron presentados por el laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Los valores de las pruebas de hematocrito y de proteínas totales se encuentran dentro del rango de referencia, indicando una buena condición de salud del animal, a excepción de la llama 4 y 16, que presentan un valor elevado al rango, tratándose posiblemente de un caso de deshidratación de los animales.

Tabla 11

Registro de cada animal con su respectiva prueba de hematocrito y proteínas totales

Fecha de muestreo	# animal	Identificación gráfica	Sexo	Temperatura (°C)	Peso (Kg) aprox.	Hematocrito (Valor de referencia: 22,9-50,1 %)	Proteínas totales (Valor de referencia: 4,3-7,4 g/dL)
26/01/23	1	-	Macho	-	120	36	6
26/01/23	2		Hembra	-	60	37	6,5
26/01/23	3		Hembra	-	120	36	7

Fecha de muestreo	# animal	Identificación gráfica	Sexo	Temperatura (°C)	Peso (Kg) aprox.	Hematocrito (Valor de referencia: 22,9-50,1 %)	Proteínas totales (Valor de referencia: 4,3-7,4 g/dL)
26/01/23	4		Macho	-	120	45	7,5
26/01/23	5		Hembra	-	120	36	7
26/01/23	6		Hembra	-	120	NR	NR
26/01/23	7		Macho	-	120	40	6,8
02/02/23	8		Macho	-	40	44	6,3
02/02/20 23	9		Macho	-	120	NR	7,1

Fecha de muestreo	# animal	Identificación gráfica	Sexo	Temperatura (°C)	Peso (Kg) aprox.	Hematocrito (Valor de referencia: 22,9-50,1 %)	Proteínas totales (Valor de referencia: 4,3-7,4 g/dL)
02/02/23	10		Macho	-	100	37	7,2
02/02/23	11		Macho	-	100	41	7,2
02/02/23	12		Macho	-	100	NR	NR
02/02/23	13		Macho	-	120	47	6,9
02/02/23	14	-	Macho	-	110	NR	NR
19/04/23	15		Macho	37,8	-	41	NR

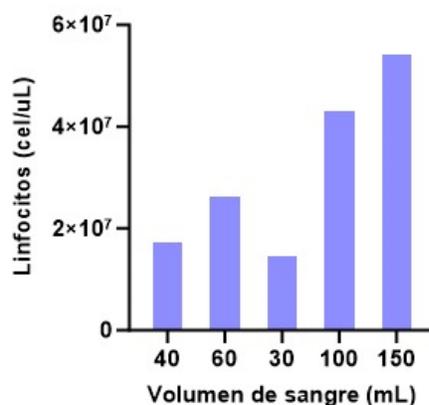
Fecha de muestreo	# animal	Identificación gráfica	Sexo	Temperatura (°C)	Peso (Kg) aprox.	Hematocrito (Valor de referencia: 22,9-50,1 %)	Proteínas totales (Valor de referencia: 4,3-7,4 g/dL)
19/04/23	16		Macho	38	-	43	7,6

Obtención y cuantificación de linfocitos

Después de la recolección de las muestras de sangre y el uso del gradiente de densidad para la separación de linfocitos, se obtienen los datos de la cuantificación de las células utilizando la fórmula indicada en el apartado de materiales y métodos. En cada uno de los 5 muestreos para la recolección de sangre de las llamas, se obtuvieron diferente número de linfocitos, debido a distintas características tales como: número de llamas y material utilizado para la extracción de sangre (Figura 9; Tabla 12).

Figura 9

Número de linfocitos con respecto al volumen de sangre extraída



Nota. T-test (m. independientes) $\alpha=0,05$; $p=0,0138$. Realizado en GraphPad.

Tabla 12

Características de cada muestreo realizado

Muestreo	Material de recolección de sangre
40	Tubos EDTA
60	Tubos EDTA
30	Tubos EDTA
100	Bolsas de extracción de sangre
150	Bolsas de extracción de sangre

El número de linfocitos de las llamas se clasificaron de acuerdo a tres variables: sexo, #linfocitos y ARN (Tabla 13). Para el análisis de los siguientes procesos se realizó una separación de las células para mantener constantes a los mismos e implementar una comparación.

Tabla 13

Número de linfocitos clasificados según variables como sexo, cantidad de linfocitos y ARN

VARIABLE: SEXO			
SEXO	Fecha	Código	#Linfocitos
MACHO	01/06/2023	SM	3000000
HEMBRA	30/03/2023	SH	3650000
VARIABLE: LINFOCITOS			
#LINFOCITOS	Fecha	Sexo	Código
2×10^6	30/06/2023	Macho	L11
2×10^6	30/06/2023	Macho	L22
2×10^6	30/06/2023	Macho	L92
5×10^6	30/06/2023	Macho	L15
5×10^6	30/06/2023	Macho	L25
5×10^6	29/06/2023	Macho	L95
VARIABLE: ARN			
#LINFOCITOS	Fecha	Sexo	Código
3×10^6	01/06/2023	Macho	R11
3×10^6	01/06/2023	Macho	R12
3×10^6	01/06/2023	Macho	R13
3×10^6	01/06/2023	Macho	R14

Cuantificación e integridad de ARN por espectrofotometría

Mediante la implementación del método de aislamiento de ARN se obtuvieron los siguientes valores del ácido nucleico (ng/uL) con sus respectivas ratios de 260/280 y 260/230. Los resultados están expresados según la clasificación de las variables previamente mencionadas (Tabla 14).

Tabla 14

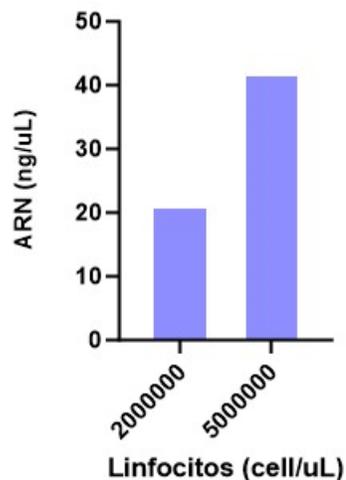
Cuantificación de ARN según variables como sexo, cantidad de linfocitos y ARN

VARIABLE: SEXO				ARN			
SEXO	Fecha	Código	#Linfocitos	Ácido nucleico (ng/uL)	260/280	260/230	Volumen total
MACHO	01/06/2023	SM	3000000	112,3	2	1,58	30
HEMBRA	30/03/2023	SH	3650000	106,8	2,05	1,3	24
VARIABLE: LINFOCITOS				ARN			
#LINFOCITOS	Fecha	Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	260/280	260/230	Volumen total
2×10^6	30/06/2023	Macho	L11	13,6	1,98	0,15	30
2×10^6	30/06/2023	Macho	L22	36,6	2,12	0,33	30
2×10^6	30/06/2023	Macho	L92	13,7	2,23	0,16	30
5×10^6	30/06/2023	Macho	L15	27,6	2,04	0,62	30
5×10^6	30/06/2023	Macho	L25	73,4	2,09	0,22	30
5×10^6	29/06/2023	Macho	L95	25,2	2,02	1,49	30
VARIABLE: ARN				ARN			
#LINFOCITOS	Fecha	Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	260/280	260/230	Volumen total
3×10^6	01/06/2023	Macho	R11	59,6	2,01	0,64	20
3×10^6	01/06/2023	Macho	R12	67,7	1,98	1,15	20
3×10^6	01/06/2023	Macho	R13	127,5	1,96	0,8	20
3×10^6	01/06/2023	Macho	R14	76	2	0,36	20

Se representó los valores obtenidos de ARN según diferente número de linfocitos, se obtiene una cuantificación mayor cuando existe mayor número de linfocitos, por lo cual es proporcional el número de linfocitos con respecto al ARN obtenido (Figura 10).

Figura 10

Cuantificación de ARN con respecto al número de linfocitos de diferentes llamas



Nota. T-test (m. indep): $\alpha=0,05$; $p<0,0001$. Realizado en *GraphPad*.

El resultado de la cuantificación de ARN según las muestras unidas de linfocitos está clasificado por el número del animal (Tabla 15).

Tabla 15

Cuantificación de ARN según el número del animal

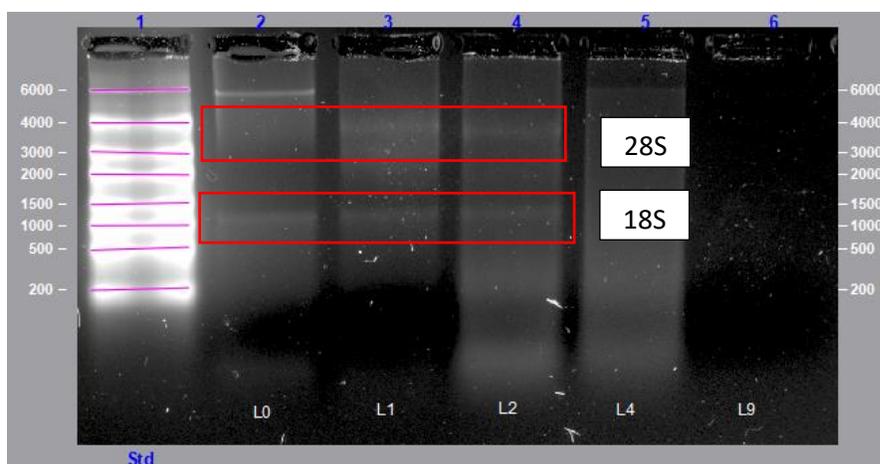
Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	260/280	260/230	Volumen total
Macho	0	56,8	2,1	0,61	100
Macho	1	89	2,05	0,44	30
Macho	2	240,1	2,04	0,74	50
Macho	4	160,4	2,01	0,56	30
Macho	5	76,3	1,81	0,28	20
Macho	6	30,4	1,75	0,27	20
Macho	9	21,6	1,68	0,34	50

La integridad de ARN en el gel de agarosa al 2,5% se evidencia de la siguiente forma: en el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular de ARN; el segundo carril muestra una

degradación de la muestra comprendida por la unión de ARNs obtenidos de las llamas del primer muestreo; el tercer carril presenta dos bandas bien definidas de las muestras unidas de la llama 1; el cuarto carril presenta dos bandas bien definidas de las muestras unidas de la llama 2; el quinto carril presenta dos bandas bien definidas de las muestras unidas de la llama 4; y por último en el carril 6 no se observaron bandas, ni degradación del ARN (Figura 11).

Figura 11

Integridad de ARN a partir de linfocitos de Lama glama



Nota. Gel de agarosa al 2,5%, 60 minutos a 90V, con marcador de peso molecular High Range ARN Ladder (Ref. SM1821). Carril 2: Todas las muestras de las llamas; Carril 3: Llama 1; Carril 4: Llama 2; Carril 5: Llama 4; Carril 6: Llama 9. Bandas de 3500 pb y 1300 pb de genes 28 S y 18 S, respectivamente. Edición: *ImageLab*

Cuantificación de ARN con DNAsas

A continuación, se observan los valores obtenidos tras la cuantificación de las muestras de ARN tratadas mediante DNAsas. Las concentraciones disminuyeron a la mitad de los valores obtenidos inicialmente de ARN debido a la reducción de moléculas de ADN (Tabla 16).

Tabla 16

Cuantificación de ARN tratado con DNAsas según el número del animal

Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	260/280	260/230	Volumen total
Macho	0	42,2	1,98	0,57	24
Macho	1	43	1,94	0,49	24
Macho	2	45,4	1,9	0,56	24
Macho	4	59,1	1,91	0,44	24
Macho	5	49,6	1,81	0,29	24
Macho	6	18	1,66	0,25	24
Macho	9	15,9	1,69	0,16	24

Cuantificación de ADNc con “M-MLV reverse transcriptase”

Se obtuvieron los valores de la concentración del ácido nucleico (ng/uL). Los datos de ADNc están clasificados según la variable de cantidad de ARN y sexo (Tabla 17).

Tabla 17

Cuantificación de ADNc según variables como sexo y ARN

Variable: Sexo				
Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)		Volumen total
Macho	SM	761,5		20
Hembra	SH	566,2		20
Variable: ARN				
Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL) ARN	Ácido nucleico (ng/uL) ADNc	Volumen total
Macho	R11	125	663,2	20
Macho	R12	250	664,75	20
Macho	R13	375	683,8	20
Macho	R14	500	682,75	20

Nota. T-test (m. independientes): $\alpha=0,05$; $p=0,123$. Realizado en *GraphPad*.

La cuantificación de ADNc a partir de las muestras se encuentra clasificadas por número de llama, donde se obtiene la concentración y los valores de las ratios de 260/280 y 260/230 (Tabla 18).

Los resultados reflejan que las cantidades están comprendidas entre valores alrededor de 600 y 700 ng/uL.

Tabla 18

Cuantificación de ADNc según número de animal.

Sexo	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	Volumen total
Macho	0	683,25	20
Macho	1	705,05	20
Macho	2	707,2	20
Macho	4	689,6	20
Macho	5	49,6	20
Macho	6	18	20
Macho	9	687,3	20

Selección cebadores para la amplificación de genes ACTB y GAPDH

A continuación, se reflejan la elección de los cebadores con las características más adecuadas para la amplificación de los genes B-actina (ACTB) y gliceraldehído 3- fosfatasa (GAPDH) (Tabla 19).

Tabla 19

Cuantificación de ADNc según número de animal

Gen	Producto	Longitud		Secuencia 5'-3'	Tf (°C)	GC (%)	Especie
ACTB	151	20	F	GAAGATCTGGCACCACACCT	59.67	55,00	alineamiento múltiple 2 secuencias: <i>Lama glama</i> y <i>Vicugna pacos</i>
		20	R	GTACATGGCTGGGGTGTGTA	59.96	55,00	
GAPDH	205	20	F	GTTTGTGATGGGCGTGAACC	60.1	55.00	Secuencia consenso: <i>Camelus ferus</i> ; <i>Camelus bactrianus</i> ; <i>Vicugna pacos</i> ;
		20	R	ATCACGCCACATCTTCCCAG	60.2	50.00	

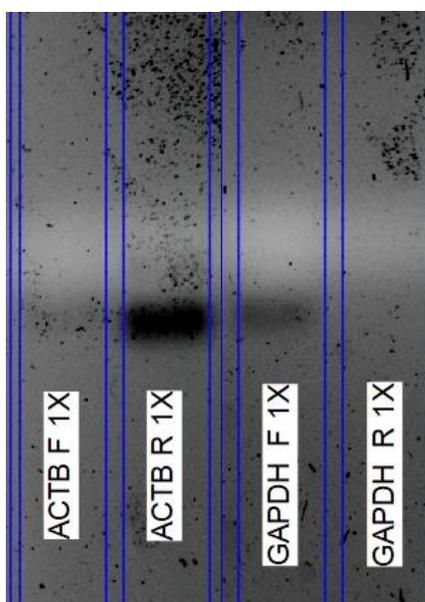
Gen	Producto	Longitud	Secuencia 5'-3'	Tf (°C)	GC (%)	Especie
						<i>Camelus dromedarius</i>

F: Forward; R: Reverse

Los cebadores están resuspendidos y se verificaron por la presencia de una banda en el gel al 3% tanto del cebador forward y reverse para los genes de interés de ACTB y GAPDH. La intensidad de las bandas en los cebadores forward de ACTB y reverse de GAPDH fueron bajas (Figura 13).

Figura 12

Visualización de bandas de cebadores ACTB y GAPDH



Nota. Gel de agarosa al 3%, 30 minutos, 100V. Carril 1: Cebador Forward ACTB (1X); Carril 2: Cebador Reverse ACTB (1X); Carril 3: Cebador Forward GAPDH (1X); Carril 4: Cebador Reverse GAPDH (1X).

Edición: *ImageLab*

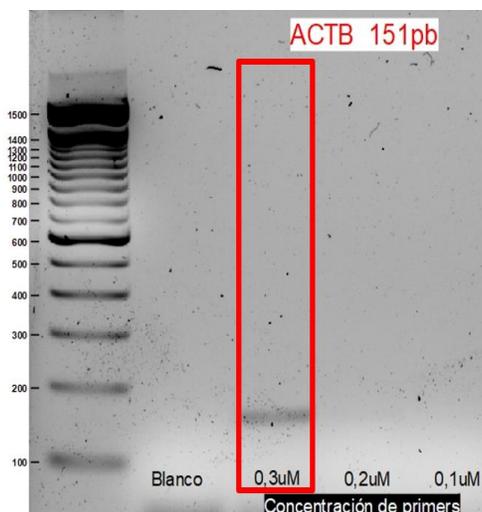
Estandarización de PCR de los genes de interés

Para obtener una amplificación eficaz de los productos del gen ACTB y GAPDH, se procedió a estandarizar el proceso de PCR. Se obtuvo una banda definida del amplicón ACTB tras modificar los siguientes parámetros dentro de la reacción de PCR, tales como: concentración de 0,3 μM de cebadores, temperatura de hibridación de 62°C y 5% de DMSO (Figura 14). A continuación, se exponen las concentraciones y los volúmenes de los componentes de la PCR (Tabla 20).

Tabla 20

Componentes para PCR con "DNA Taq Polimerasa"

Componentes	Reacción 1X (μL)	Concentración Inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5 μL	10X	1X
MgCl ₂	0,75 μL	50 mM	1,5 mM
dNTPs mix	0,5 μL	10mM	0,2 mM
Taq DNA Polimerasa	0,1 μL	5 U/ μL	0,02 U/ μL
Primer Forward	0,75 μL	10 μM	0,3 μM
Primer Reverse	0,75 μL	10 μM	0,3 μM
Muestra de ADNc	2 μL	100 ng/ μL	200 ng/ μL
Agua libre de nucleasas	16,4 μL	-	-
% DMSO	1,25	-	5%
Volumen final		25 μL	

Figura 13*Amplificación del gen ACTB*

Nota. Gel de agarosa al 1,5%, con marcador de peso molecular 1500 pb DNA Ladder (Ref. G2101). Carril 1: Blanco (No existe contaminación); Carril 2: Concentración de cebador: 0,3uM; Carril 3: Concentración de cebador: 0,2uM; Carril 4: Concentración de cebador: 0,1uM. Banda del amplicón de 151 pb. Edición: *ImageLab*

La mejor amplificación del gen GAPDH (Figura 15) se obtuvo al variar las condiciones de los cebadores con respecto a la concentración de los cebadores, la cual fue de 0,2uM, el porcentaje de DMSO del 5% y la temperatura de hibridación a 60°C, observada en el carril 4 (Tabla 21).

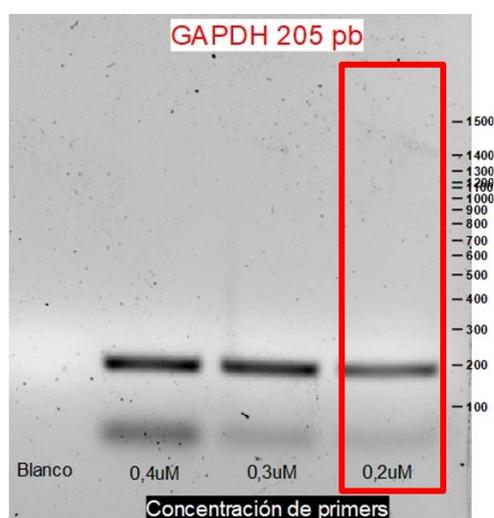
Tabla 21*Componentes para PCR con "DNA Taq Polimerasa"*

Componentes	Reacción 1X (μL)	Concentración Inicial	Concentración final
PCR Buffer	2,5 μL	10X	1X
MgCl ₂	0,75 μL	50 mM	1,5 mM
dNTPs mix	0,5 μL	10mM	0,2 mM
Taq DNA Polimerasa	0,1 μL	5 U/ μL	0,02 U/ μL

Componentes	Reacción 1X (μ L)	Concentración Inicial	Concentración final
Primer Forward	0,5 uL	10 uM	0,2 uM
Primer Reverse	0,5 uL	10 uM	0,2 uM
Muestra de ADNc	2 uL	100 ng/uL	200 ng/uL
Agua libre de nucleasas	16,9 uL	-	-
% DMSO	1,25	-	5%
Volumen final		25 uL	

Figura 14

Amplificación del gen GAPDH



Nota. Gel de agarosa al 1,5%, con marcador de peso molecular 1500 pb DNA Ladder (Ref. G2101). Carril 1: Blanco (No existe contaminación); Carril 2: Concentración de cebador: 0,4uM; Carril 3: Concentración de cebador: 0,3uM; Carril 4: Concentración de cebador: 0,2uM. Banda del amplicón de 205 pb. Edición: *ImageLab*

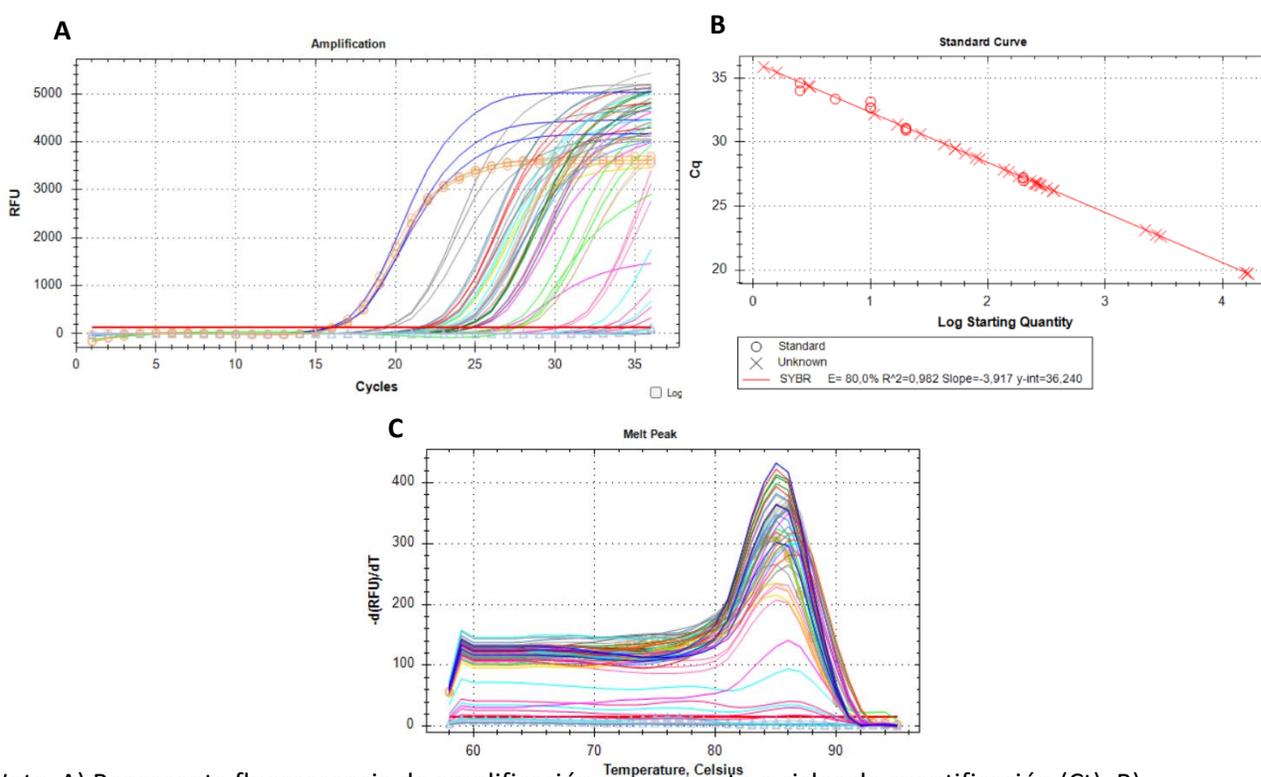
Técnica de qPCR

El programa de BIORAD expuso las curvas de amplificación con su fase de inicio y la exponencial, el threshold se colocó por encima de los valores del control negativo y de la línea basal manteniendo a

estos datos como referenciales con respecto a los productos amplificados de cada gen. La gráfica (Figura 16A; 17A) representa las unidades de fluorescencia (RFU) con respecto a los ciclos de amplificación. Para mejorar el ajuste de los datos el software presenta una gráfica linealizada entre el Cq y el Log (Sq) (Figura 16B; 17B). Los valores obtenidos en la amplificación del gen ACTB y GAPDH fueron los siguientes: eficiencia del 80,03% y 54,91%; R^2 de 0,98 y 0,95; y la pendiente de -3,9 y -5,26 respectivamente. Para ambos genes los valores de los Ct están comprendidos entre 21 y 35 ciclos. Con el fin de verificar que la emisión de la señal fluorescente es propia de las secuencias de interés se observó la presencia de curvas de la temperatura de hibridación o Melting para el gen ACTB y GAPDH (Figura 16C; 17C).

Figura 15

Curva de amplificación del gen ACTB

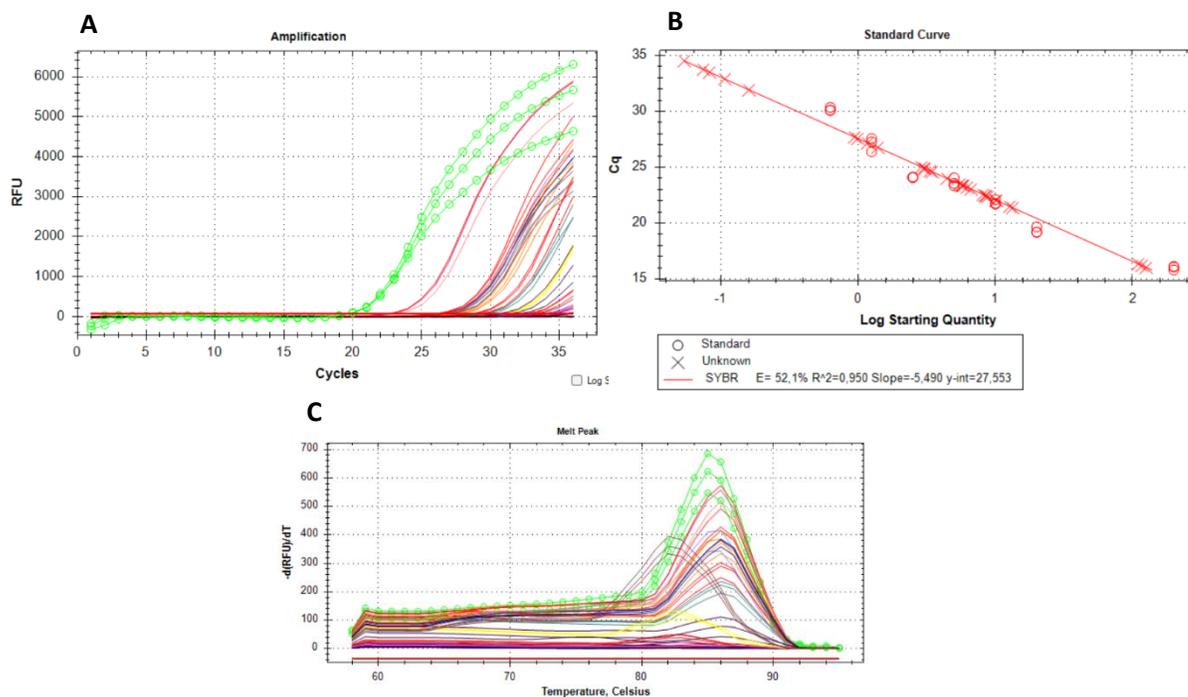


Nota. A) Representa fluorescencia de amplificación con respecto a ciclos de cuantificación (Ct); B) Linealización de la relación de los datos entre Cq y el Log (Sq) del gen ACTB y C) Curvas de Melting.

BIORAD-CFX Maestro.

Figura 16

Curva de amplificación del gen GAPDH

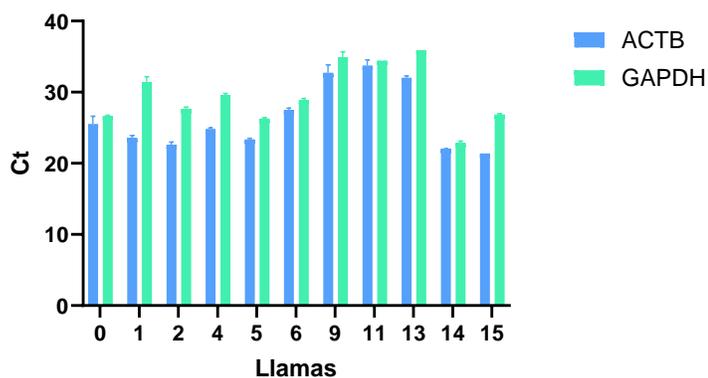


Nota. A) Representa fluorescencia de amplificación con respecto a ciclos de cuantificación (Ct); B) Linealización de la relación de los datos entre Cq y el Log (Sq) del gen GAPDH y C) Curvas de Melting. *BIORAD-CFX Maestro.*

Para el análisis estadístico de la amplificación del gen ACTB y GAPDH, se comparó los ciclos de amplificación (Ct) de cada llama a través de una prueba de ANOVA de dos vías, en donde se llegó a la conclusión de que existen diferencias significativas entre las llamas 9, 11, y 13 con respecto al resto de animales, y se comprobó que las repeticiones de cada muestra tienen desviaciones estándares menores que 1, lo que indica que no existe dispersión entre los valores analizados (Figura 18).

Figura 17

Comparación de la amplificación del gen ACTB y GAPDH con valores de Ct con respecto a cada llama analizada.



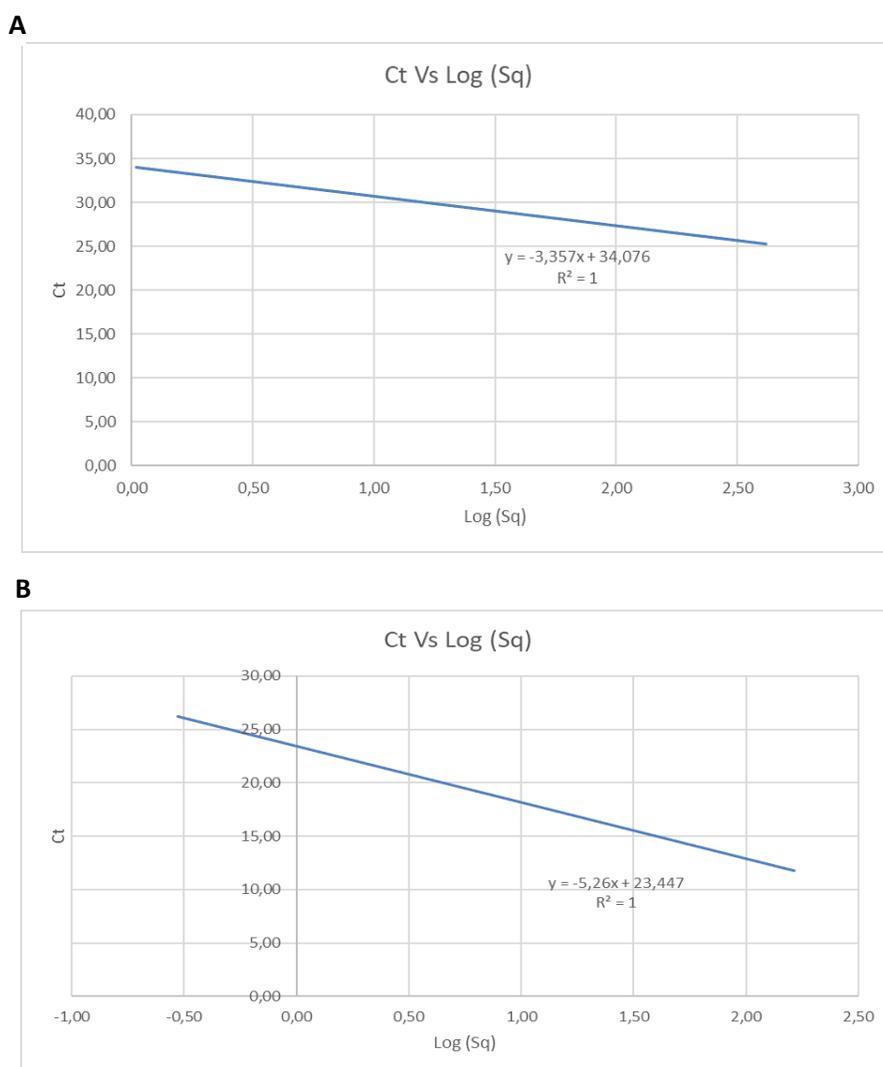
Nota. Realizado en *GraphPad*.

El análisis estadístico de cada uno de los valores de amplificación de las muestras, nos permitió conocer que existen diferencias significativas, es decir que los ciclos de fluorescencia en el que se amplifica cada uno de los genes es distinto para todas las llamas analizadas. Obteniendo valores más cercanos y una cantidad mínima a 1, indicando mayor expresión génica.

Los datos obtenidos de la cantidad inicial de copias amplificadas (Sq) del gen ACTB y GAPDH se calcularon en la herramienta informática de Excel, con estos valores se obtiene la gráfica linealizada entre Ct con respecto al Log (Sq) que analiza según la ecuación presentada la eficacia de la técnica (Figura 18A; 18B). Además, para corroborar los resultados expresados por el programa se hizo una comparación de los datos de Eficiencia, R^2 , la pendiente y la ecuación obtenidos de la gráfica (Tabla 22).

Figura 18

Linealización de ciclo de amplificación y amplificación inicial



Nota. A) Ecuación de la recta y R^2 del gen ACTB; B) Ecuación de la recta y R^2 del gen GAPDH. Realizado en Microsoft Excel.

Tabla 22

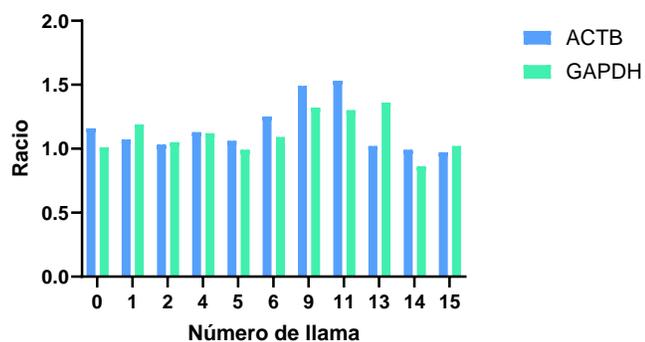
Comparación de datos obtenidos de la curva estándar de BIORAD y EXCEL

GEN: ACTB		
Datos	BIORAD	EXCEL
Eficiencia	80,03	80,1
Pendiente	-3,91	-3,92
R2	0,98	1,00
GEN: GAPDH		
Datos	BIORAD	EXCEL
Eficiencia	54,91	54,92
Pendiente	-5,27	-5,26
R2	0,95	1,00

El ΔCt o ratio es la relación existente entre la muestra estándar y la muestra de interés, la cual se expresó como la variación entre los valores de la muestra estándar y las muestras de interés, obteniendo ratios de la expresión génica de cada gen (Figura 20). Las muestras que presentaron una relación mayor a 1, tienen ciclos más lejanos comparando con el promedio de la muestra estándar. Es decir, las llamas 9, 11 y 13 muestran una expresión baja, con respecto al resto.

Figura 19

Relación de la muestra estándar con respecto al número de llama (Ratio)

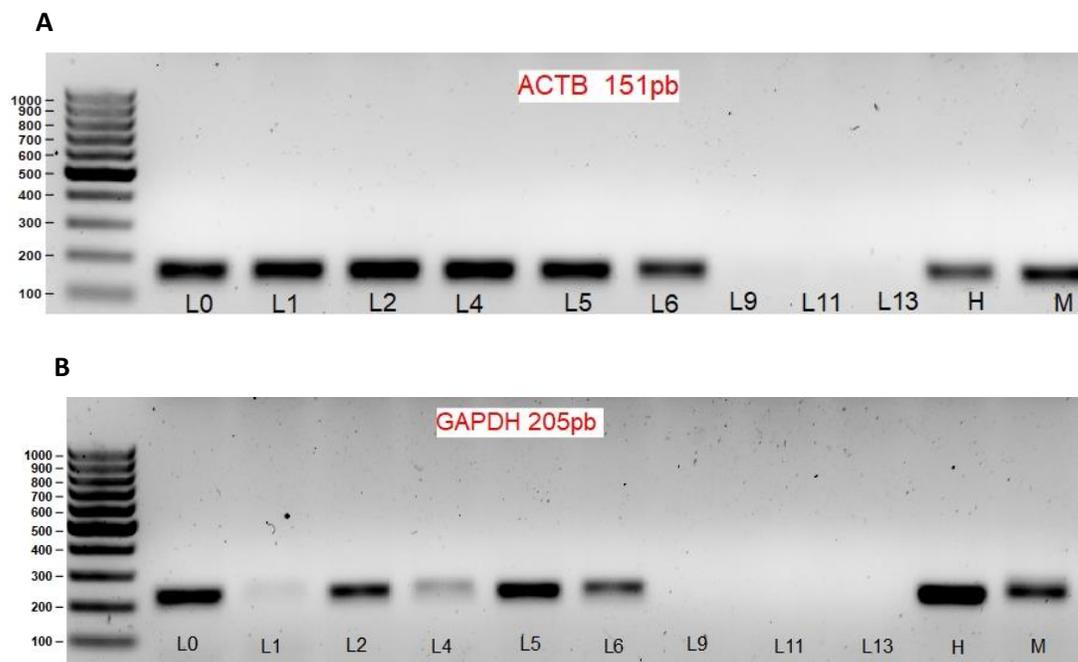


Nota. Realizado en GraphPad.

Los productos amplificados de los genes de ACTB y GAPDH presentaron su longitud correspondiente: 151 y 205 pares de bases (pb), respectivamente (Figura 21).

Figura 20

Genes amplificados a partir de linfocitos de Lama glama

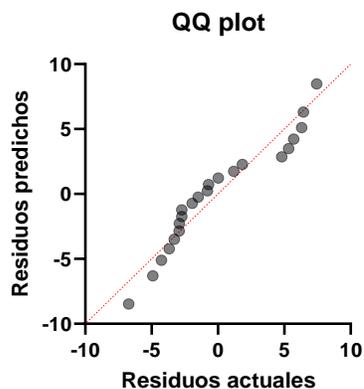


Nota. Gel de agarosa al 2%. A) ACTB, amplicón de 151pb; B) GAPDH, amplicón de 205pb. Edición: ImageLab.

Se realizó un análisis estadístico del gen más óptimo para ser usado como gen constitutivo. Primero se evaluó la normalidad y se obtuvo una gráfica lineal que muestra los datos cercanos a la línea, con lo cual se comprobó la distribución normal de los mismos

Figura 21

Verificación de normalidad en la linealización de los datos en la gráfica QQplot

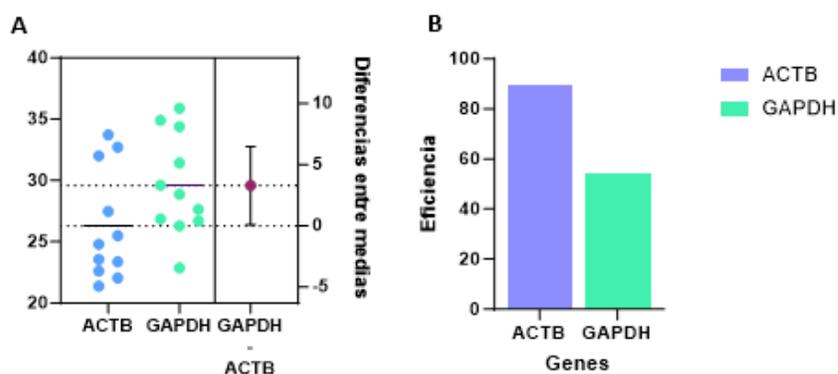


Nota. Residuos predichos con respecto a residuos actuales, *GraphPad*

Después de la verificación de este supuesto se realizó la prueba paramétrica T-test que permitió analizar a través de un gráfico la comparación de los ciclos del umbral (Ct) de cada gen, escogiendo al gen ACTB como el más óptimo debido a su presentación de ciclos más tempranos, por lo que su expresión génica resulta mayor para cada llama (Figura 23A). Además, se corroboró este resultado con su eficiencia según la curva estándar dada por el programa de qPCR (Figura 23B).

Figura 22

Comparación de la amplificación entre genes



Nota. A) Ciclo del umbral (Ct) con respecto a los genes estudiados ($\alpha = 0,1$; $p = 0,0898$); B) Eficiencia de la curva estándar de cada gen. *GraphPad*

Capítulo V: Discusión

La recolección de sangre periférica proveniente de la vena yugular de los camélidos es realizada en tubos Vacutainer con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), heparina sódica, entre otros. Se mantiene en refrigeración antes de cumplirse 72 horas de conservación, para su posterior análisis como es el cultivo de linfocitos o para transformaciones moleculares (Ramos et al., 2014). En el presente trabajo, la sangre fue recolectada en tubos Vacutainer y las muestras se transportaron a temperatura ambiente en los tres primeros muestreos logrando obtener una cantidad menor de linfocitos en comparación con los dos últimos muestreos donde las muestras de sangre fueron recolectadas en bolsas con capacidad de 100 y 150mL conservadas en refrigeración de un menor número de llamas (Figura 9). La mayor cantidad de linfocitos presentados entre tres llamas fue de 5×10^7 en 450mL de sangre, representando una cantidad óptima de células obtenidas en estos animales lo cual se comprueba al comparar con un estudio donde evalúan parámetros hematológicos sobre las alpacas que presentan valores de 3,55 a $2,76 \times 10^8$ por cada litro de sangre de un único animal, (Sánchez Iza, 2015).

El método más usado para la obtención de linfocitos a partir de la muestra de sangre recolectada es mediante el uso de un gradiente de densidad denominado *Lymphoprep* que separa a los componentes más densos como los eritrocitos y granulocitos de los menos densos tales como las células mononucleares (linfocitos y monocitos) después de una centrifugación (Tocheva et al., 2020). El proceso de separación y aislamiento de linfocitos a través de esta técnica, no representa un inconveniente con respecto a los resultados de los diferentes muestreos, presentándose a este proceso en la mayoría de trabajos experimentales para la obtención de nanoanticuerpos en camélidos (Hassan et al., 2021).

Para la obtención de los fragmentos de interés de diferentes genes se necesita información genética proveniente del ARN de los linfocitos, el cual debe presentar buena calidad e integridad. El

primer parámetro se evalúa mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia, en donde se tienen dos relaciones, una de ellas es A260/280 que debe estar dentro del rango entre 2.0-2.2 y los valores aceptados son desde 1,7. Dado el caso, las muestras de ARN obtenidas representan pureza ya que están en un rango entre 1,98 y 2,12, descartando la posibilidad de contaminación con compuestos fenólicos y proteínas. La otra relación es de A260/230 la cual debe ser mayor a 1,5 y en este trabajo se presentaron valores inferiores representando contaminación con carbohidratos, sales y fenoles (Mormontoy Cardenas, 2022).

Es importante mencionar que existen otros métodos para evaluar la integridad de ARN con geles de agarosa y un marcador de peso molecular, en donde se debe presentar dos bandas principalmente del ARN 18S y 28S, la banda superior representa contaminación con ADN por lo cual se debe realizar tratamiento con DNAsas. En un estudio realizado para evaluar la integridad del ácido nucleico se realizaron tres procedimientos y observaron las bandas íntegras en un gel de agarosa al 1%, obteniendo bandas mejor definidas con el proceso de SDS y fenol, en comparación del TRIZOL (Michel-López et al., 2018). A pesar de lo expuesto, el presente trabajo muestra la integridad del ARN con la presencia de dos bandas de ARN en gel de agarosa al 2,5% con el protocolo de TRIZOL correspondiente al aislamiento de ARN, presentándose bandas bien definidas en tres muestras de las cuatro cargadas, la última muestra exhibe una degradación. Al igual que en otro estudio, la evaluación de la integridad de ARN para RT-PCR, se lo hizo mediante electroforesis en un gel de agarosa con un porcentaje del 2%, donde no se presentó degradación de ninguna muestra y se aisló con fenol-cloroformo, reactivos elaborados en el laboratorio (Díaz-Alonso et al., 2013). El ARN es un ácido nucleico que se degrada rápidamente en cualquier parte del proceso de aislamiento afectando su rendimiento debido a la manipulación en los pasos de extracción, precipitación, centrifugación, lavado, etc. Además, se debe considerar que la muestra en todo el procedimiento debe conservarse en condiciones frías (Liesveld & Lichtman, 2015).

El método de RT-PCR es una de las aplicaciones de la obtención de ARN para estudiar la expresión de las moléculas de ARN mensajeros. Según se menciona en un estudio sobre el análisis de ARN para procesos de expresión génica, no se necesita una gran cantidad de este ácido nucleico, al igual que un alto grado de pureza, debido a su posterior amplificación específica (Hernández et al., 1994)

Las concentraciones de ADNc de las muestras se encuentran en valores alrededor de 600ng/uL, donde no se observa una variación significativa a pesar de las concentraciones diferentes de ARN evaluadas. Las relaciones de A260/280 están en un rango entre 1,45 y 1,5 y A260/230 entre 1,5 y 1,6, los valores se aproximan al valor 1,7 aceptado, sin embargo, se considera que existe baja contaminación tanto de proteínas como de sales, carbohidratos y fenoles. El obtener ADNc de alta calidad permite que el proceso de qPCR refleje mayor eficiencia (Barraza et al., 2017). Sin embargo, en un estudio que analiza las moléculas importantes para la amplificación de fragmentos génicos, considera que la calidad del ADNc no debe tener obligatoriamente una alta pureza en procesos de RT-PCR, dado que es un proceso específico a diferencia de si se construyen genotecas de ADNc, en donde se deben considerar los parámetros de puridades más óptimos. También mencionan que el paso de generar una cadena secundaria que sea complementaria al ADNc es innecesario dado que la misma se genera en el primer ciclo de PCR mediada por una enzima polimerasa Taq. Para que el ADNc objetivo sea más abundante es necesario la utilización de oligo (dT) debido a la unión ventajosa a las colas de poli(A) de los ARNm, obteniendo una cantidad adecuada de estas moléculas para su posterior utilidad. (Hernández et al., 1994).

La evaluación de la funcionalidad de la molécula de ADNc se corrobora en el proceso de reacción de cadena de polimerasa (PCR), a través de la amplificación de fragmentos de genes de interés, en este caso ACTB y GAPDH. Dado que se presentaron bandas correspondientes al tamaño del producto esperado, significa que no existe contaminación con ADN genómico al no presentar bandas con una mayor longitud (Banco Nacional de ADN et al., 2020).

La elección de los dos genes constitutivos se basó en estudios previos sobre la expresión de los mismos en camélidos, por lo tanto, han considerado que el gen ACTB es el gen más estable dentro de la expresión en un análisis realizado de varios tejidos del camello. Las funcionalidades de estos genes son potencialmente representativas para hacer que sean elementos constitutivos principales en la mayoría de mamíferos. Tras el análisis de camellos de los valores de Ct de cinco genes de referencia se comprobó que GAPDH presentó consistencia en la expresión seguido de ACTB (Ibrahim et al., 2020).

La estandarización de las condiciones, parámetros y componentes de la PCR es útil para analizar la detección apropiada de fragmentos amplificados de genes de interés (Martínez Sepúlveda & Solís, 2019). Las amplificaciones inespecíficas son un problema en el producto de PCR, una de las causas son las estructuras secundarias ricas en guanina-citosina y para evitar esta formación se adiciona DMSO que separa estas conformaciones (Chacón et al., 2010). En un estudio donde se evalúan diferentes parámetros de PCR, logran identificar que la disminución de las concentraciones de los cebadores hasta 0,2uM permite obtener bandas íntegras y bien definidas, optimizando los costos, al igual que en el caso de este trabajo que se utilizaron concentraciones de 0,3 y 0,2 uM para el gen GAPDH y ACTB, respectivamente (Reyes et al., 2015).

Los cebadores son secuencias cortas de ADN sintéticas empleadas en la PCR y la secuenciación de ADN. Estos son diseñados para la producción de genes de interés ya que reconocen la secuencia complementaria en un origen y sintetizan las cadenas de ADN en el paso de amplificación. El tamaño de cada cebador varía entre 20 a 30 nucleótidos (Sánchez et al., 2014).

El diseño de cebadores es un paso importante para tener una amplificación específica para lo cual se consideran varios factores como la especificidad en la amplificación correspondiente a la región de interés, evitando que se unan a otras secuencias con regiones similares a las estudiadas. Otra condición importante es la temperatura de fusión (annealing) que proporciona una unión estable de los

cebadores con la secuencia específica dentro del estudio. Antes de realizar una síntesis de los cebadores, estas secuencias se diseñan *in silico* según las condiciones necesarias para la amplificación de la secuencia, además del porcentaje de guanina-citosina debe estar entre el 50 y 55, debe poseer una temperatura de melting aproximada de 60°, un tamaño del amplicón entre 130-200 pb y del cebador de 12 a 20 pb para qPCR (Mejía et al., 2019).

En la cuantificación de los productos amplificados se emplea la técnica de qPCR, analizando la expresión génica de los mismos, en donde la presencia de una curva de amplificación no da significado a obtener datos interpretables. La inhibición de la reacción de qPCR puede tratarse de la interferencia con los componentes de otras reacciones como es la de transcripción inversa (RT), por esta razón se debe diluir el contenido de ADNc, proporcionando reacciones de qPCR ideales que exhiban datos reales de las muestras objetivas. Los valores que sobrepasan los 29 ciclos (Cq o Ct) representan una baja o escasa amplificación por razones como la implementación de un ADNc muy diluido, limitando a los cebadores a unirse a todas las moléculas dentro del primer ciclo, ya que se amplifican fracciones de la muestra antes de la amplificación completa. Se debe implementar más proporción de la muestra para aumentar su expresión (Taylor et al., 2019).

En el presente trabajo, los ciclos del umbral (Ct o Cq) están en un rango entre 21,37 y 35,89 de las diferentes muestras de llamas, comparando con los resultados de un estudio de selección de genes de referencia para equinos se evaluaron siete genes, en donde los escogidos fueron tres: ACTB, RPL32 y UBB con ciclos de cuantificación entre 25 y 35, mencionando que los mismo son resultados satisfactorios (Pérez Rico et al., 2014)

La expresión génica óptima se evalúa a través de la especificidad de la amplificación en la curva de melting, en donde la presencia de un único pico representa la ausencia de productos inespecíficos formados en el proceso de reacción de la cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR) y el gel de agarosa

es una prueba de confirmación del tamaño esperado de los genes (Pérez Rico et al., 2014). En las curvas de melting obtenidas para el gen ACTB, se presentó un solo pico a una temperatura de 83°C, mientras que para el gen GAPDH existieron dos picos sobresalientes, interpretando que el pico con una temperatura de 50°C representa un producto inespecífico en el control positivo, según un análisis en el software informático Primer Blast se presenta un posible producto de 400 pb de la secuencia completa de ADN de este gen. El gel de agarosa de todas las muestras procesadas a partir de linfocitos, presentaron las bandas correspondientes al producto amplificado con el tamaño esperado.

Los valores de los resultados de la curva estándar representan la validez de los datos obtenidos de las muestras analizadas. Uno de estos parámetros es la correlación lineal R^2 que debe ser un valor próximo a 1. Es decir, los valores tanto del gen ACTB y GAPDH de 0,95 y 0,98, respectivamente, son aceptados e indican el ajuste ideal de los datos con respecto a línea de regresión de la gráfica de la curva estándar (Valle, 2019). Por otra parte, está la pendiente que se relaciona proporcionalmente a la eficiencia, valores más bajos a -3 dan como resultado una eficiencia menor al 100%, representando a este resultado como un rendimiento no aceptado de la técnica de qPCR, con respecto a dicho gen, para corregir estos errores se debe estandarizar la qPCR, según sus componentes y condiciones (Bustin et al., 2009). El gen ACTB y GAPDH presentan una eficiencia del 90 y 54%, respectivamente, donde el segundo valor representa un rendimiento bajo.

Los valores de los ciclos de cuantificación (Ct) de los productos de cada gen en las diferentes muestras, representan una comparación entre ellos, otorgando un mayor nivel de expresión génica al que tenga valores bajos de Ct (Serrano-Cumplido et al., 2021). Por otra parte, la relación entre Ct de la gamma estándar y las muestras de interés (racio) son la forma significativa de representar los niveles de expresión génica, de manera que si el valor es mayor a 1 representa un rango fuera de la relación comparativa con los ciclos de la muestra estándar, indicando una expresión baja o nula, como es el caso de las muestras de las llamas 9, 11 y 13 para el gen GAPDH y ACTB.

Capítulo VI: Conclusiones

Los genes ACTB y GAPDH presentaron una expresión génica positiva en la mayoría de las muestras de la especie de *Lama glama* a partir de la recolección de sangre periférica proveniente de la vena yugular.

Los linfocitos fueron aislados de la sangre total del animal mediante un gradiente de densidad que logró separar a estas células mononucleares en la parte superior por su menor densidad con respecto a otras células como los eritrocitos. Además, la mayor cantidad de linfocitos que se obtuvo fue de 5×10^7 cuando las muestras se recolectaron en bolsas de extracción de sangre y se conservaron en frío, evitando la degradación.

La obtención de ARN a partir de los linfocitos mediante el método de TRIzol permitió obtener un material de interés con alta pureza que, a pesar de su contaminación con fenoles, resultó óptimo para evitar la interferencia con los siguientes procesos moleculares. La evaluación de la integridad de ARN con la presencia de dos bandas bien definidas de los genes 18S y 28S, confirmó que el procedimiento con TRIzol resulta eficiente para el aislamiento de esta molécula. La transformación de ARN a ADNc, a concentraciones de 125, 250, 375 y 500 ng/uL, se generó a través de un proceso de transcripción inversa (RT), obteniendo valores cercanos a 600 ng/uL, lo cual se implementó como plantilla principal para la técnica de qPCR.

Los valores entre 21 a 35 de los ciclos de cuantificación (Cq o Ct) como resultados de la técnica qPCR demostraron el nivel de expresión génica de los genes ACTB y GAPDH de diferentes muestras procesadas de llamas. El gen ACTB mostró resultados más confiables por la eficiencia presentada, además sus ciclos fueron más bajos por lo que el nivel de expresión resultó más alto para la mayoría de muestras de llamas, a excepción de la 9, 11 y 13 por diferentes causas como la baja obtención de linfocitos, ARN degradado o ADNc muy diluido. Los valores ΔCt o ratio fueron cercanos a 1, verificando

la expresión génica de los genes analizados en comparación con la gamma estandarizada de ADNc a diferentes concentraciones.

Capítulo VII: Recomendaciones

El transporte de las muestras debe ser en cadena de frío y la recolección de sangre en bolsas de 150 mL, obteniendo mayor número de linfocitos y una cantidad mayor de ARN, lo que permite obtener mejores resultados sobre las bandas bien definidas en gel de agarosa para evaluar su integridad.

Para evitar la degradación en cualquier paso de aislamiento de linfocitos, obtención de ARN y transformación a ADNc es importante mantener las muestras en frío, los tiempos de incubación deben ser precisos y se debe trabajar en una zona libre de nucleasas.

El diseño de los cebadores es un paso crítico para la obtención de productos amplificados óptimos en la qPCR, teniendo en cuenta que a pesar de que las secuencias no son específicas para la especie de *Lama glama*, el realizar un alineamiento múltiple entre especies de la misma familia y el análisis de estas secuencias, permite que se obtengan resultados específicos y de calidad.

Para obtener valores más favorables del rendimiento de la qPCR, se debe estandarizar el método, logrando obtener mejores resultados de cada muestra y de cada gen.

Considerando que existen más genes constitutivos, es óptimo realizar el análisis sobre la expresión de los mismos, para que se obtengan bibliotecas de varios genes de control y que permitan comparar con los fragmentos de interés VHH de nanoanticuerpos.

Referencias bibliográficas

- Abreu, S., & Laura, M. (2021). *Nanoanticuerpos contra epítopes nativos*.
<https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/4515>
- ACTB actin beta [Camelus dromedarius (Arabian camel)]—Gene—NCBI*. (s. f.). Recuperado 24 de agosto de 2023, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/105104247>
- ACTB actin beta [Vicugna pacos (alpaca)]—Gene—NCBI*. (s. f.). Recuperado 24 de agosto de 2023, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM_031676709.1
- Adams, G. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*, 42(3), 48-53.
<https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Alcon Tambo, L. H. (2003). *Producción y exportación de camélidos en Bolivia (Carne de Llama 1990-2000)* [Thesis]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/22249>
- Apaza Zúñiga, E., Olarte Daza, C. U., Quispe Coaquira, J. E., Apaza Zúñiga, E., Olarte Daza, C. U., & Quispe Coaquira, J. E. (2022). Calidad textil de la fibra descordada de llamas (*Lama glama*) en piso ecológico húmedo. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(3), 68-78. <https://doi.org/10.53287/hfvl7514as10k>
- Ayala Vargas, C. (2018). Los camélidos sudamericanos. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 5(ESPECIAL), 7-12.
- Banco Nacional de ADN, Carlos III, & Carlos III. (2020). "Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Barraza, M. H. P., Espinosa, M. A. G., Medrano, R. C., Luna, A. I. P., Enciso, T. O., & Acuña, I. J. G. (2017). Ambiente y reguladores de crecimiento en la expresión de Flowering Locus T en mango. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 19, 3839-3853.

- Bessalah, S., Jebahi, S., Mejri, N., Salhi, I., Khorchani, T., & Hammadi, M. (2021). Perspective on therapeutic and diagnostic potential of camel nanobodies for coronavirus disease-19 (COVID-19). *3 Biotech*, *11*(2), 89. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02647-5>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Butera, G., Mullappilly, N., Masetto, F., Palmieri, M., Scupoli, M. T., Pacchiana, R., & Donadelli, M. (2019). Regulation of Autophagy by Nuclear GAPDH and Its Aggregates in Cancer and Neurodegenerative Disorders. *InteARNtional JouARNI of Molecular Sciences*, *20*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms20092062>
- Caradec, J., Sirab, N., Keumeugni, C., Moutereau, S., Chimingqi, M., Matar, C., Revaud, D., Bah, M., Manivet, P., Conti, M., & Loric, S. (2010). Desperate house genes: The dramatic example of hypoxia. *British jouARNI of cancer*, *102*, 1037-1043. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605573>
- Caramelo, C., Peña Deudero, J. J., Castilla, Á., Justo, S., De Solís, A. J., Neria, F., Peñate, S., & González-Pacheco, F. R. (2006). Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (Buenos Aires)*, *66*(2), 155-164.
- Chacón, L., Barrantes, K., García, C., & Rosario, A. (2010). Estandarización de una PCR para la detección del gen invA de Salmonella spp. En lechuga. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *30*(1), 18-23.
- Chiesa Campeas, C. V., & Olivera Ferreira, A. (2021). *Nanoanticuerpos como biopesticidas con actividad antifúngica para su aplicación en agricultura*. <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/4516>

- Cortez-Retamozo, V., Lauwereys, M., Hassanzadeh Gh., G., Gobert, M., Conrath, K., Muyldermans, S., De Baetselier, P., & Revets, H. (2002). Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *International Journal of Cancer*, *98*(3), 456-462.
<https://doi.org/10.1002/ijc.10212>
- del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2019). Lactic Acid Bacteria as a Live Delivery System for the in situ Production of Nanobodies in the Human Gastrointestinal Tract. *Frontiers in Microbiology*, *9*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03179>
- Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A., & Cambillau, C. (2015). Camelid nanobodies: Killing two birds with one stone. *Current Opinion in Structural Biology*, *32*, 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.001>
- Díaz-Alonso, C., Garrote-Santana, H., Amor-Vigil, A. M., Suárez-González, Y., & González-Mugica Romero, R. (2013). Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT-PCR. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, *29*(3), 298-303.
- Eisenberg, E., & Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*, *29*(10), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>
- Faye, B. (2020). How many large camelids in the world? A synthetic analysis of the world camel demographic changes. *Pastoralism*, *10*(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13570-020-00176-z>
- Franco-Paredes, C., & Rodríguez-Morales, A. (2020). El comodín de la historia universal: Las enfermedades infecciosas. *Revista del Hospital del Niño*.
- García Tapia, L. I. (2020). *Bioteconologías reproductivas en camélidos sudamericanos*.
<http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8704>
- Garcin, E. D. (2019). GAPDH as a model non-canonical AU-rich ARN binding protein. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *86*, 162-173. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.03.013>

- Guirado Blanco, O., Solanas García, M., Costa Traschel, I., & Escrich Escriche, E. (2002). El citoesqueleto de actina: Una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(2), 115-122.
- Hassan, F. A., Anouassi, A., Thueng-in, K., Ketudat-Cairns, M., & Parnpai, R. (2021). Generation of a Single-Domain Antibody against Isolated Escherichia Coli that Causes Camel-Calf Death. *JouARNI of Veterinary Healthcare*, 2(3), 6-16. <https://doi.org/10.14302/issn.2575-1212.jvhc-21-3767>
- Hernández, A., Martín, P., Torres, A., & Salido, E. (1994). Análisis del ARN: Estudio de la expresión génica. *Revista NEFROLOGIA*, XIV(2), 18.
- Hernández-Mesa, N., Hernández Llanes, J., Llanes Betancourt, C., Hernández-Mesa, N., Hernández Llanes, J., & Llanes Betancourt, C. (2020). Las grandes epidemias de la Historia. De la peste de Atenas a la COVID 19. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 19(5). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2020000600003&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- Ibrahim, M. A., Radwan, M. I., Kim, H. K., Han, J., & Warda, M. (2020). Evaluation of global expression of selected genes as potential candidates for inteARNI normalizing control during transcriptome analysis in dromedary camel (*camelus dromedarius*). *Small Ruminant Research*, 184, 106050. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106050>
- Iraola, M. C. S. R., Benavides, L., Castro, M. A., Murgida, D., Ibañez, I., & Pavan, F. (2023). DISEÑO DE UN SENSOR PLASMÓNICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE EL USO DE NANOANTICUERPOS. *Libro de Resúmenes XXIII CAFQI*. <https://conferencias.unpa.edu.ar/index.php/cafqi/article/view/35>
- Itoh, K., & Sokol, S. Y. (2014). Expression Cloning of Camelid Nanobodies Specific for Xenopus Embryonic Antigens. *PLOS ONE*, 9(10), e107521. <https://doi.org/10.1371/jouARNI.pone.0107521>

- Jaime, M. Q. (2019). Validation of housekeeping genes as an inteARNI control for gene expression studies in *Giardia lamblia* using quantitative real-time PCR. *Gene* 581(1):21 - 30.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.018>
- Lau, G. (2021). Camelids as Food and Wealth: Emerging Political and Moral Economies of the Recuay Culture. En J. E. Staller (Ed.), *Andean Foodways: Pre-Columbian, Colonial, and Contemporary Food and Culture* (pp. 61-87). Springer InteARNtional Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51629-1_3
- Liesveld, J. L., & Lichtman, M. A. (2015). Acute Myelogenous Leukemia. En K. Kaushansky, M. A. Lichtman, J. T. Prchal, M. M. Levi, O. W. Press, L. J. Burns, & M. Caligiuri (Eds.), *Williams Hematology* (9.^a ed.). McGraw-Hill Education.
accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1147671277
- Linares Huapaya, S. M. (2023). *Identificación de genes de referencia en *Lupinus mutabilis* Sweet para estudios cuantitativos de expresión génica.*
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/5593>
- Losa, J. E. (2021). Enfermedades infecciosas emergentes: Una realidad asistencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 44(2), 147-151. <https://doi.org/10.23938/assn.968>
- Lyu, M., Bai, Y., Orihara, K., Miyanaga, K., & Yamamoto, N. (2023). GAPDH Released from *Lactobacillus johnsonii* MG Enhances Barrier Function by Upregulating Genes Associated with Tight Junctions. *Microorganisms*, 11(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061393>
- Martínez Sepúlveda, L., & Solís, E. (Profesor G. (2019). *Estandarización de PCR para la detección de la mutación del gen HTT en la enfermedad de Huntington* [Thesis, Universidad de Talca (Chile). Escuela de Tecnología Médica.]. <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/12246>

- Mejía, A. S., García, Y. M. G., Sánchez, P. A. G., & Montoya, M. A. M. (2019). Diseño de cebadores específicos para la detección por RT-PCR del *Potato Virus Y* (PVY). *Acta Biológica Colombiana*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n3.76523>
- Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., Bermúdez-Guzmán, M. de J., Michel-López, C. Y., González-Mendoza, D., Zapata-Pérez, O., Rubio-Piña, J., Cervantes-Díaz, L., & Bermúdez-Guzmán, M. de J. (2018). Evaluación de tres protocolos para la extracción rápida de ARN total de tejidos de *Prosopis juliflora* (SW). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(6), 1259-1267. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i6.788>
- Mormontoy Cardenas, S. D. (2022). *Detección molecular de coronavirus a partir del gen n en crías de alpaca (Vicugna pacos) en el CICAS La Raya provincia de Canchis-Cusco*. <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/6787>
- Muyldermans, S. (2021). *Applications of Nanobodies | Annual Review of Animal Biosciences*. 9. https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-animal-021419-083831#_i2
- Nagy-Fazekas, D., Stráner, P., Ecsédi, P., Taricska, N., Borbély, A., Nyitray, L., & Perczel, A. (2023). A Novel Fusion Protein System for the Production of Nanobodies and the SARS-CoV-2 Spike RBD in a Bacterial System. *Bioengineering*, 10(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030389>
- Ortega-Monge, C., Arce-Rodríguez, N., Santamaría-Muñoz, M., Chavarria-Rojas, M., Rojas Salas, M. F., Baltodano Viales, E., Madrigal Redondo, G. L., Ortega-Monge, C., Arce-Rodríguez, N., Santamaría-Muñoz, M., Chavarria-Rojas, M., Rojas Salas, M. F., Baltodano Viales, E., & Madrigal Redondo, G. L. (2022). Aplicaciones de los nanoanticuerpos en la medicina. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 63(2), 189-203. <https://doi.org/10.30827/ars.v63i2.22199>

- Ortega-Portilla, P. A., Cancino-Villeda, L., Coronado-Aceves, E. W., & Espitia-Pinzón, C. (2021). Nanobodies: Biotechnological development and applications. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.398>
- Ortega-Portilla, P. A., Cancino-Villeda, L., Coronado-Aceves, E. W., Espitia-Pinzón, C., Ortega-Portilla, P. A., Cancino-Villeda, L., Coronado-Aceves, E. W., & Espitia-Pinzón, C. (2021). Nanoanticuerpos: Desarrollo biotecnológico y aplicaciones. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.398>
- Pastor, D. M., Ceja, K. A. G., Garrocho, M. S., & Silva, M. M. (2023). El proteosoma: Su interregulación con el citoesqueleto de actina y sus alteraciones en patologías. *Revista de Educación Bioquímica*, 41(4), 140-153.
- Pedreáñez, A., Mosquera, J., Muñoz, N., & Tene, D. (2021). *Nanoanticuerpos, pequeñas moléculas grandes posibilidades*. 11(22), 24. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.14200553>
- Pérez Rico, A., Crespo Castejón, F., Sanmartín Sánchez, L., Miró Arias, M., & Vega Pla, J. L. (2014). Selección de genes de referencia en semen equino criopreservado para su uso en estudios de expresión genética con la técnica de PCR cuantitativa. *Sanidad Militar*, 70(1), 20-24. <https://doi.org/10.4321/S1887-85712014000100003>
- Prieto Martín, A., Barbarroja Escudero, J., Barcenilla Rodríguez, H., & Díaz Martín, D. (2013). Funciones de los linfocitos B. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1752-1759.
- Ramos, M. R., L, J. D., R, M. V., L., W. H., Iannuzzi, L., & Perucatti, A. (2014). Adaptación de la Técnica de Cultivo de Linfocitos de Alpacas y Llamas para el Análisis de Intercambio de Cromátides Hermanas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 461-467. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10781>

- Reyes, J., Viettri, M., Rivas, A., Lares, M., Herrera, L., Aguilar, C. M., & Ferrer, E. (2015). Estandarización de la técnica de PCR para la detección de ADN de *Leishmania* sp. En muestras de sangre de caninos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 56(2), 72-79.
- Rodon, J., Te, N., Ballester, M., Segalés, J., Vergara-Alert, J., & Bensaid, A. (2023). *High-throughput quantification of camelid cytokine mRNA expression in PBMCs by microfluidic qPCR technology* (p. 2023.01.15.524100). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.01.15.524100>
- Salguero Jiménez, A. (2015). Biotecnología e ingeniería de anticuerpos: Inmunoterapia y Alzheimer. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, 19, 11.
- Samanthi. (2020, septiembre 8). *Difference Between Housekeeping Genes and Luxury Genes*. Compare the Difference Between Similar Terms. <https://www.differencebetween.com/difference-between-housekeeping-genes-and-luxury-genes/>
- Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. *Revista CON-CIENCIA*, 2(1), 127-140.
- Sánchez Iza, A. E. (2015). *Caracterización de valores hemáticos (biometría hemática) en la especie lama pacos (alpacas)* [BachelorThesis, LATACUNGA / UTC / 2015]. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2795>
- Sánchez-González, M. A. (2021). HISTORIA Y FUTURO DE LAS PANDEMIAS. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(1), 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.12.007>
- Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Semergen*, 47(5), 337-341. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2021.05.003>

- Sidstedt, M., Rådström, P., & Hedman, J. (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2009-2023.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761-774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Themes, U. F. O. (2019, noviembre 8). Humoral Immune Responses: Activation of B Lymphocytes and Production of Antibodies. *Basicmedical Key*. <https://basicmedicalkey.com/humoral-immune-responses-activation-of-b-lymphocytes-and-production-of-antibodies/>
- Tocheva, A. S., Lerrer, S., & Mor, A. (2020). In Vitro Assays to Study PD-1 Biology in Human T Cells. *Current Protocols in Immunology*, 130(1), e103. <https://doi.org/10.1002/cpim.103>
- Triana-Gutiérrez, R. I., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Mora-Aguilera, G., Cano-Medrano, R., Velázquez-Monreal, J. J., Triana-Gutiérrez, R. I., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Mora-Aguilera, G., Cano-Medrano, R., & Velázquez-Monreal, J. J. (2021). Selección de genes de referencia en expresión génica de *Citrus sinensis* infectados con CLas o CTV mediante RT-qPCR. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(2), 354-370. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2102-2>
- Ureta Santillan, S. N. (2022). Determinación del nanoplásticos y microplásticos en contenido estomacal de peces amazónicos de consumo humano: Carachama (*pseudorinelepis genibarbis*) toa (hemisorubim platyrhynchos), procedentes del río huallaga en el km 25 al noreste de tingo maria (aucayacu) 2021. *Universidad de Huánuco*.
<http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/3548>
- Valle, M. (2019). *Validación de técnicas de PCR cuantitativa (qPCR) para la cuantificación de genes de resistencia a antibióticos* [Universidad Técnica de Ambato].
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30546/1/BQ%20209.pdf>

- Valsalam, A., P, G.-B., Rajendran, K. V., Tripathi, G., & Bedekar, M. K. (2023). Re-engineering of bicistronic plasmid pGPD/IFN to construct fusion gene co-expressing Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) of *Edwardsiella tarda* and Interferon-gamma (IFN- γ) gene of *Labeo rohita* (Hamilton) and its in vitro functional analysis. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 61(03), Article 03. <https://doi.org/10.56042/ijeb.v61i03.62517>
- Van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., & Frenken, L. (2000). Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama*. *Journal of Immunological Methods*, 240(1), 185-195. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00188-5)
- Vilá, B., & Arzamendia, Y. (2022). South American Camelids: Their values and contributions to people. *Sustainability Science*, 17(3), 707-724. <https://doi.org/10.1007/s11625-020-00874-y>
- Vincenzetti, S., Cammertoni, N., Rapaccetti, R., Santini, G., Klimanova, Y., Zhang, J.-J., & Polidori, P. (2022). Nutraceutical and Functional Properties of Camelids' Milk. *Beverages*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/beverages8010012>
- Xu, J., Xu, K., Jung, S., Conte, A., Lieberman, J., Muecksch, F., Lorenzi, J. C. C., Park, S., Schmidt, F., Wang, Z., Huang, Y., Luo, Y., Nair, M. S., Wang, P., Schulz, J. E., Tessarollo, L., Bylund, T., Chuang, G.-Y., Olia, A. S., ... Casellas, R. (2021). Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 595(7866), Article 7866. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03676-z>
- Yu, X., Xu, Q., Wu, Y., Jiang, H., Wei, W., Zulipikaer, A., Guo, Y., Jirimutu, & Chen, J. (2020). Nanobodies derived from Camelids represent versatile biomolecules for biomedical applications. *Biomaterials Science*, 8(13), 3559-3573. <https://doi.org/10.1039/D0BM00574F>