

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Aislamiento, caracterización y análisis del ADN
codificante de la glicoproteína de zona pelúcida de tipo
2 (aZP2) de alpaca (Lama pacos)**

TESIS

para optar el grado académico de Bachiller en Genética y Biotecnología

AUTOR

Susan Karen Pérez Gamarra

ASESORA

Martha Valdivia Cuya

Lima-Perú

2009

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se pudo llevar a cabo debido al apoyo de los miembros y mentores de los laboratorios de Fisiología de la Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del Instituto Peruano de Biología Molecular, con mención especial al Vicerrectorado de Investigaciones de nuestra universidad.

Deseo agradecer profundamente a mi asesora, Mg. Sc. Martha Valdivia Cuya y directora del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal por darme la oportunidad de integrar su equipo de investigación; brindarme su consejo, guía, apoyo incondicional; por ser ejemplo y por siempre haber mostrado disposición, mente abierta para nuevas ideas y proyectos; por ver en cada uno de nosotros a un hijo.

A los miembros del Instituto Peruano de Biología Molecular por enseñarme que no hay límites para los sueños, con mención especial a Ricardo Pella Cáceres por su derroche de sencillez y humildad al compartir sus conocimientos, su tiempo, su amistad. A su esposa, Sra. Milagros Saavedra por acompañarnos en los experimentos, su chispa, sinceridad y paciencia durante la colecta del material empleado en esta tesis. A Juan Carlos Gómez de la Torre, a Mario Monteghirfo Gomero, a Miguel Talledo por confiar en mí.

Al Vicerrectorado de Investigación por apostar a noveles científicos e impulsar la investigación de nivel y calidad en nuestra querida universidad.

Deseo agradecer a mi mamá Meche por estar siempre conmigo, por su amor, su entrega, sus jaladas de oreja y su confianza; a papá Roly por sus palabras y su apoyo. A mis hermanitos Meche por su gracia y amistad; Roly por sus palabras, su amor y sus anecdóticas ocurrencias; a Elvita por ser siempre la esperanza desde su concepción, por su elocuencia y los cariños brindados a toda hora. A mis abuelitos, tíos y primos por estar siempre pendientes de mi familia.

Un agradecimiento especial a Luis Guzmán Masías, maestro, incondicional amigo, por su soporte, paciencia y por sus críticas fundamentales en el diseño de esta tesis. Por las largas jornadas de trabajo, por los gratos momentos y las incontables lecciones juntos.

A mis amigos y compañeros con los que compartí y aprendí “lecciones de vida”.

Al profesor Fernando Retuerto Prieto por su apoyo a toda hora y por llevar en buena dirección a la Escuela de Genética y Biotecnología.

A todos aquellos que no nombro mas saben que su predica, dedicación y lucha en el día a día son ejemplos dignos de seguir. A aquellos que en los últimos tiempos me mostraron amor, se rieron conmigo y me dan la mano en momentos importantes.

Gracias de corazón.

Susan Karen Pérez Gamarra

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
PALABRAS CLAVES	7
1.-INTRODUCCIÓN	8
2.-OBJETIVOS	12
2.1.Objetivo General	
2.2.Objetivos Específicos	
3.-ANTECEDENTES	13
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Colecta	17
4.2. Aislamiento de ARNm	17
4.3. Síntesis de la primera hebra de ADNc por transcripción reversa del ARNm	18
4.4. Amplificación del segmento específico para ADNc de aZP2 por PCR	18
4.5. Análisis de datos	19
5.-RESULTADOS	20
6.-DISCUSIÓN	25
7.-CONCLUSIONES	26
8.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	31

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DEL ADN
CODIFICANTE DE LA GLICOPROTEINA DE ZONA PELÚCIDA DE TIPO 2
(aZP2) DE ALPACA *Lama pacos***

RESUMEN

La Zona Pelúcida es la matriz extracelular que rodea a los ovocitos de vertebrados, cumple roles trascendentales en la reproducción, incluyendo el reconocimiento y unión de gametos especie-específico, inducción de la reacción acrosómica (RA) del espermatozoide, el bloqueo de la poliespermia, mantiene la integridad del embrión temprano durante su transición por el oviducto; está constituida por tres glicoproteínas: ZP3 que induce RA; ZP1, estructural, que interconecta a ZP3 y ZP2. ZP2 es la molécula de unión secundaria, interactúa con los receptores espermáticos expuestos después de RA siendo necesaria para mantener la unión del espermatozoide al ovocito, su modificación proteolítica después de la fertilización permite el bloqueo de la poliespermia. ZP2 participa también en la organización, el desarrollo y maduración del ovocito, puesto que mantiene consistente la matriz y la interacción entre las células periféricas y la célula germinal.

Se caracterizó y analizó *in silico* la secuencia codificante parcial de la glicoproteína de Zona Pelúcida tipo 2 (aZP2) en alpacas, se determinó que esta proteína se expresa exclusivamente en los ovarios. Además esta secuencia parcial analizada se encuentra conservada, constituyéndose un grupo monofilético. entre los Cetarteodactyla.

La presente Tesis aporta conocimiento básico sobre la glicoproteína aZP2 en alpacas, proteína implícita en la fecundación, conocerla implícitamente beneficia el mejoramiento de las actuales técnicas biotecnológicas reproductivas tales como la

maduración folicular-ovocitaria, criopreservación de gametos y embriones, fertilización *in vitro* e inyección intracitoplasmática del espermatozoide, técnicas que se intentan aplicar con muchas dificultades en camélidos.

ABSTRACT

The zona pellucida is an extracellular matrix that surrounds vertebrate oocytes, and plays important roles in the recognition and interaction of gametes species-specific, induction of Acrosome Reaction (AR) of the spermatozoa, block to polyspermy, keeps the integrity of the early embryo through its transition by the oviduct; It is composed of three glycoproteins: ZP3 that induces RA; ZP1, structural, crosslinks ZP3 and ZP2. ZP2 acts as a secondary sperm receptor that is necessary for the maintenance of sperm binding to the egg, its proteolytic modification after fertilization permits the block to polyspermy. ZP2 participates also in the organization, development, maturation of the oocyte because it keeps consistently the matrix and the interaction between peripheral cells with the germ cell.

We isolated and analyzed *in silico* a partial coding sequence of the glycoprotein of type 2 (aZP2) in alpacas, we determined that this protein is expressed exclusively in the ovaries. Also this analyzed partial sequence is conserved, constituting a monophyletic group between Cetartodactyla.

This thesis work provides basic knowledge on the glycoprotein aZP2 in alpacas, a protein implicitly involved in fertilization, to know it benefits the improvement of existing reproductive biotechnology techniques such as the follicular-oocyte maturation, cryopreservation of gametes and embryos in vitro fertilization and injection of intracytoplasmic sperm, techniques that are trying to be implemented with many difficulties in camelids.

PALABRAS CLAVES:

Zona pelúcida, glicoproteína, reacción acrosómica, RT-PCR, alpaca

1.-INTRODUCCION

La zona pelúcida es una envoltura extracelular que rodea a los ovocitos de la mayoría de los vertebrados y cumple roles importantes en el proceso de la fecundación (Sinowatz et al., 2001; Wassarman et al., 2001). Los espermatozoides al ser depositados en el interior del tracto reproductor femenino viajan a través de éste hasta su encuentro con el ovocito. Durante este tiempo, el espermatozoide sufre una serie de modificaciones fisiológicas que le confieren capacidad fecundante, fenómeno que puede ser reproducido bajo condiciones de laboratorio (Wassarman *et al.*, 2001). El primer contacto entre el espermatozoide y el ovocito se realiza a través de la zona pelúcida en un encuentro que es específico de la especie mediado por un sistema de receptores complementarios en la zona pelúcida (receptores espermáticos) y sobre la superficie del espermatozoide (Talbot *et al.*, 2003). Una vez que ha ocurrido la fijación, el espermatozoide experimenta la llamada reacción acrosómica activada por la zona pelúcida, en la cual se libera una serie de enzimas hidrolíticas del acrosoma, localizado en la cabeza espermática. Esto permite que el espermatozoide degrade y penetre la matriz de la zona pelúcida por la acción sinérgica de las enzimas hidrolíticas y la vigorosidad del batido de su cola. Durante este proceso el espermatozoide está temporalmente ligado a las glicoproteínas de la zona pelúcida a través de un mecanismo de receptores secundarios. Una vez que el espermatozoide alcanza el espacio perivitelino, hace contacto con la membrana citoplasmática del ovocito y lo induce a liberar los gránulos corticales que modifican tanto la membrana misma del ovocito; así como a la zona pelúcida, evitando que más espermatozoides ingresen al ovocito.

En estudios realizados en el ratón, se ha identificado tres glicoproteínas de zona pelúcida que de acuerdo a su movilidad electroforética, se han denominado mZP1 (ZPB) (200,000 Da; dimérica), mZP2 (ZPA) (120,000 Da) y mZP3 (ZPC) (83,000 Da)

y son codificadas por tres genes conservados (Wassarman & Mortillo, 1991). En el ratón estas glicoproteínas son sintetizadas íntegramente por el ovocito en crecimiento, mientras que en conejos y perros las células de la granulosa así como los ovocitos intervienen en su síntesis (Blackmore *et al.*, 2004).

Dos de estas glicoproteínas: ZP2 y ZP3, interactúan una con otra formando heterodímeros periódicos a lo largo de filamentos (Jovine *et al.*, 2002). Estos filamentos se interconectan con la ZP1 formando una estructura tridimensional. Cada una de estas glicoproteínas consisten en un solo polipéptido que es heterogéneamente glicosilado con los complejos oligosacáridos asparagina *N-linked* y serina/threonina *O-linked* (Wassarman & Mortillo, 1991). Los últimos han sido determinados en una gran variedad de mamíferos, incluyendo al hombre y especies domésticas en que la zona pelúcida está compuesta por un pequeño número de glicoproteínas que están cercanamente relacionadas (Schwoebel *et al.*, 1991; Lefièvre *et al.*, 2004). La similaridad de estos péptidos con la mZP1, mZP2 y mZP3 están en un rango que varía entre el 40% al 90% (Wassarman *et al.*, 2001; Wassarman & Liestcher, 2001). Más aún, la membrana vitelina que rodea a los huevos de los peces, anfibios y aves contienen polipéptidos relacionados a las proteínas de la zona pelúcida del ratón (Spargo & Hopes, 2003).

Algunos investigadores concluyeron sobre la importancia de ZP2 en la fertilidad; a través de mutagénesis dirigida establecieron linajes celulares de ratones nulos para ZP2, determinando su importancia en la fertilidad. Estos linajes no expresan la glicoproteína ZP2, mientras ZP1 y ZP3 se expresan normalmente formando una delgada matriz en folículos tempranos que no es sostenida en folículos pre-ovulatorios. La zona pelúcida anormal no afecta la foliculogénesis, pero hay una disminución del número de folículos antrales en ovarios aislados de ratones carentes de ZP2. Pocos huevos son detectados en

el oviducto después de la estimulación con gonadotropinas y no se recuperan embriones después del cruce de hembras nulas para ZP2 con machos normales (Rankin *et al.*, 2001).

El defecto en la estructura de la zona pelúcida es más severo en ratones nulos para ZP2 que lo observado en ratones nulos para ZP1, en el cual la tasa de fecundidad está disminuida, pero no es tan severa como la observada en ratones nulos para ZP3, el cual no forma una zona pelúcida visible y los individuos son estériles. Estos ovocitos de ratones nulos para ZP2 son aparentemente normales, pero presentan matriz inconsistente y desorganizada, no hay fijación de la matriz con células que la rodean.

Los ovocitos normales, maduros y libres de ZP son fertilizados *in vitro* y pueden progresar a estadio de blastocisto, el desarrollo potencial de blastocisto derivados de huevos nulos para ZP2 o ZP3 parecen comprometidos y después de la transferencia a madres adoptivas no se observan nacimientos vivos (Rankin *et al.*, 2001).

La importancia de estudiar las moléculas que participan en el reconocimiento de gametos y en la fecundación de la alpaca radica en que este camélido sudamericano es de gran valor económico en los países andinos y el nuestro principalmente, pues el Perú posee el 90% de las alpacas existentes, aproximadamente millón y medio de ejemplares (Adams & Ratto, 2001). El valor de esta especie se fundamenta en la calidad de la fina fibra que se comercializa en muchos países del mundo. Es por ello que muchos investigadores fijan sus objetivos en desarrollar estudios para el entendimiento de la fisiología reproductiva de la alpaca y en los últimos años al estudio de los gametos y embriones para el desarrollo de tecnologías reproductivas que permitan una selección y ganancia genética acelerada para el mejoramiento de su fibra y carne (Bravo, 1995). De esta manera, establecer sistemas *in vitro* para el estudio de la interacción gamética en estos animales constituye una herramienta valiosa en el

desarrollo de estas tecnologías. La caracterización y posterior producción de proteínas recombinantes de zona pelúcida de alpaca permitirá profundizar los estudios de fisiología espermática e interacción gamética sin la necesidad de utilizar ZP de ovocitos como material biológico, lo que constituye una ventaja pues la recolección de ovocitos frescos y maduros es muy limitada (Van Duin *et al.*, 1994; Tsubamoto *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2002).

2.-OBJETIVOS

2.1.Objetivo General

El presente trabajo tiene por finalidad aislar, caracterizar y analizar a la glicoproteína homóloga a ZP2 de otras especies en *Lama pacos* bajo la hipótesis que esta solo se expresa en los ovarios, para dilucidar el problema se diseñaron cebadores específicos en base a secuencias conservadas de zona pelúcida de tipo 2 de diferentes especies y se emplea como control de expresión al gen housekeeping gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

2.2.Objetivos Específicos

Aislar RNAm de diferentes tejidos de alpaca y retrotranscribirla a DNAc.

Evidenciar la expresión de ZP2 en el ovario de alpaca.

Establecer la secuencia de nucleótidos del DNAc y la secuencia aminoacídica de aZP2.

Establecer la comparación filogenética

3.- ANTECEDENTES

Los camélidos de América del Sur pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Ruminantia, familia Camelidae y están representados por la vicuña (*Vicugna vicugna*), el guanaco (*Lama guanicoe*), la llama doméstica (*Lama glama*) y la Alpaca (*Lama pacos*) (Smith *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 1992).

La alpaca es un recurso importante para los países altoandinos, especialmente para el Perú que posee el 90% de las alpacas, aproximadamente millón y medio de ejemplares (Adams & Ratto, 2001). La importancia de este camélido radica en la calidad y fineza de su fibra, los altos valores protéicos de su carne, su bajo contenido de colesterol y grasas. Posee además algunos valores “escondidos” tales como la sangre en la industria piscícola, huesos y heces como abono agrícola y su piel en el arte de la curtiembre (Bravo *et al.*, 1997; Hacks, 2001).

En términos socioeconómicos la alpaca representa ingresos para más de 500,000 familias en zonas de gran altitud en nuestro país (Ministerio de Economía del Perú, 2004). Las dificultades que enfrentan los criadores es producto de un sistema extensivo tradicional no tecnificado, caracterizado por los bajos niveles de productividad y *performance* reproductivo (Ministerio de Agricultura del Peru, 2004). Esto viene siendo estudiado desde hace 80 años por investigadores sociales (Bonavia, 1996) y hoy en día se están realizando diversas investigaciones a nivel de ciencias básicas para la selección, mejoramiento genético y reproductivo de la alpaca (Bravo *et al.*, 1997). El mejoramiento reproductivo en alpacas se inicia estudio de las moléculas (acrosina, zona pelúcida) y mecanismos participantes en la interacción de los gametos y la fertilización. La zona pelúcida es una envoltura extracelular que rodea a los ovocitos de la mayoría de los vertebrados y cumple roles importantes en el proceso de la fecundación (Sinowatz *et*

al., 2001; Wassarman *et al.*, 2001) . Los espermatozoides al ser depositados en el interior del tracto reproductor femenino viajan a través de éste hasta su encuentro con el ovocito. Durante este tiempo, el espermatozoide sufre una serie de modificaciones fisiológicas que le confieren capacidad fecundante, fenómeno que puede ser reproducido bajo condiciones de laboratorio (Wassarman *et al.*, 2001). El primer contacto entre el espermatozoide y el ovocito se realiza a través de la zona pelúcida en un encuentro que es específico de la especie mediado por un sistema de receptores complementarios sobre la zona pelúcida (receptores espermáticos) y sobre la superficie del espermatozoide (Talbot *et al.*, 2003). Una vez que ha ocurrido la fijación, el espermatozoide sufre la llamada reacción acrosómica activada por la zona pelúcida, en la cual se libera una serie de enzimas hidrolíticas del acrosoma localizado en la cabeza espermática. Esto permite que el espermatozoide degrade y penetre la matriz de la zona pelúcida por la acción sinérgica de las enzimas hidrolíticas y la vigorosidad del batido de su cola. Durante este proceso el espermatozoide es temporalmente ligado a las glicoproteínas de la zona pelúcida a través de un mecanismo de receptores secundarios. Una vez que el espermatozoide alcanza el espacio perivitelino, hace contacto con la membrana citoplasmática del ovocito y lo induce a liberar los gránulos corticales que modifican tanto la membrana misma del ovocito; así como a la zona pelúcida, evitando que más espermatozoides ingresen al ovocito.

En estudios realizados en el ratón, se ha identificado tres glicoproteínas de zona pelúcida que de acuerdo a su movilidad electroforética, se han denominado mZP1 (ZPB) (200,000 Da; dimérica), mZP2 (ZPA) (120,000 Da) y mZP3 (ZPC) (83,000 Da) y son codificadas por tres genes conservados (Wassarman & Mortillo, 1991).

En *Lama pacos*, mediante el aislamiento molecular en geles SDS-PAGE al 10% de solubilizados proteicos de ZP se ha identificado tres glicoproteínas de zona pelúcida

correspondiente a 110 000 Da, 75 000 Da y 65 000 Da los cuales corresponderían a proteínas similares a ZP1, ZP2 y ZP3 respectivamente. (ANEXO II, figura 11)

En el ratón estas glicoproteínas son sintetizadas íntegramente por el ovocito en crecimiento, mientras que en conejos y perros las células de la granulosa así como los ovocitos intervienen en su síntesis (Blackmore *et al.*, 2004).

Dos de estas glicoproteínas, ZP2 y ZP3, interactúan una con otra formando heterodímeros periódicos a lo largo de filamentos (Jovine *et al.*, 2002). Estos filamentos se interconectan con la ZP1 formando una estructura tridimensional. Cada una de estas glicoproteínas consisten en un solo polipéptido que es heterogéneamente glicosilado con los complejos oligosacáridos *asparagina N-linked* y *serina/threonina O-linked* (Wassarman & Mortillo, 1991). Los últimos han sido determinados en una gran variedad de mamíferos, incluyendo al hombre y especies domésticas en que la zona pelúcida está compuesta por un pequeño número de glicoproteínas que están cercanamente relacionadas (Schwoebel *et al.*, 1991; Lefièvre *et al.*, 2004). La similaridad de estos péptidos con la mZP1, mZP2 y mZP3 están en un rango que varía entre el 40% al 90% (Wassarman *et al.* 2001; Wassarman & Liestcher, 2001). Más aún, la membrana vitelina que rodea a los huevos de los peces, anfibios y aves contienen polipéptidos relacionados a las proteínas de la zona pelúcida del ratón (Spargo & Hopes, 2003).

Algunos investigadores concluyeron sobre la importancia de ZP2 en la fertilidad; a través de mutagénesis dirigida establecieron linajes celulares de ratón nulos para ZP2 para determinar su importancia en la fertilidad. Estos linajes no expresan ZP2, mientras ZP1 y ZP3 se expresan normalmente formando una delgada matriz en folículos tempranos que no es sostenida en folículos pre-ovulatorios. La zona pelúcida anormal no afecta la foliculogénesis, pero hay una disminución del número de folículos antrales en ovarios aislados de ratones carentes de ZP2. Pocos huevos son detectados en el

oviducto después de la estimulación con gonadotropinas y no se recuperaron embriones después del cruce de hembras nulas para ZP2 con machos normales (Rankin *et al.*, 2001).

El defecto en la estructura de la zona pelúcida es más severo en ratones nulos para ZP2 que lo observado en ratones nulos para ZP1, en el cual la tasa de fecundidad está disminuida, pero no es tan severa como la observada en ratones nulos para ZP3, el cual no forma una zona pelúcida visible y los individuos son estériles. Estos ovocitos de ratones nulos para ZP2 son aparentemente normales, pero presentan matriz inconsistente y desorganizada, no hay fijación de la matriz con células que la rodean. Los ovocitos normales, maduros y libres de ZP son fertilizados *in vitro* y pueden progresar a estadio de blastocisto, el desarrollo potencial de blastocisto derivados de huevos nulos para ZP2 o ZP3 parecen comprometidos y después de la transferencia a madres adoptivas no se observan nacimientos vivos (Rankin *et al.*, 2001).

4.-MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.-Colecta

Se colectaron ovarios y otros tejidos frescos de alpacas (Huancavelica-4050 msnm), estos fueron cortados en trozos de 0.5 cm. por lado y sumergidas en *RNAlater* (Sigma, Cat. No. R0901, St. Louis, Missouri, USA) frío, para mantener la integridad del ARN. Fueron trasladadas a Lima a -4 °C, luego almacenadas a -40°C. (ANEXO III)

4.2.-Aislamiento de ARNm

Las muestras almacenadas a -20°C en *RNAlater* se descongelaron a temperatura ambiente para su procesamiento inmediato. Para el aislamiento de ARNm de todos los tejidos se utilizó el *GenElute™ Direct mRNA kit* (Sigma Cat. No. DMN-70, St. Louis, Missouri, USA) el cual utiliza perlas de oligo(dT) que hibridizan con las colas poly(A) de los ARNm. Se empleó aproximadamente 60 mg de tejido, se homogenizó el tejido en 1mL de solución de homogenización conteniendo SDS y proteinasa K. Se realizó dos pasos de hibridización para enriquecer la preparación. Las perlas serán transferidas a la membrana del *GenElute™ spin filter-collection tube* contenidas en el mismo kit, con el cual se realizó dos pasos de elución. La solución de ARNm sería empleada inmediatamente para la síntesis de ADNc (Badley *et al.*, 1988)

4.3.- Síntesis de la primera hebra ADNc por transcripción reversa del ARNm

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se utilizó el *kit SuperScript™ First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen™, Cat. No. 12371-019, Carlsbad, California, USA). Se empleó como control de la reacción los cebadores diseñados para el gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. El control negativo no contiene transcriptasa reversa. Se prepararon las mezclas de reacción con 6 µl de ARNm aislado y purificado de ovario de alpaca, 10 mM de dNTP mix, 0.5 µg/µl de oligo(dT) y agua tratada con

DEPC. Los tubos se incubaron a 65 °C por 5 minutos y luego se colocaron en hielo por 2 minutos. Luego se agregó a cada tubo 2 µl de buffer RT 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de DTT 0.1M y 1 µl de RNaseOUT™, recombinante inhibidor de ribonucleasas. Se incubó a 42 °C por 2 minutos y se agregará 1 µl de transcriptasa reversa SuperScript™ II. Se incubará a 42°C por 50 minutos. La reacción finalizó colocando los tubos a 70°C por 15 minutos, posteriormente a hielo por 2 minutos. Se agregó 1 µl de *E. coli* RNasa H y se incubará a 37°C por 20 minutos (Compton, 1990) (ANEXO IV, figura 15)

4.4.- Amplificación del segmento específico para ADNc de aZP2 por PCR

Las secuencias codificantes para aZP2 de los mamíferos poseen regiones conservadas que fueron empleadas para diseñar los cebadores de aproximadamente 20 *mer*, cuyos productos amplificados serán aproximadamente de 500pb (Mate & McCartney, 1998) estos fueron sintetizados por *Integrated DNA Technology*. Los cebadores diseñados manualmente para aZP2 son forward: 3`AATGCCACACACRTGACTC5`, reverse: 3`GTTCCACATCCATTCAGGG5`, resultando en un producto de aproximadamente 474 pb y para el gen *housekeeping*, GDAPH forward: 3`CATCCCTGAGCTSAACGGGA5` y reverse: 3`GAGCTTGACAAAGTGGTCGT5`, resultando en un producto de aproximadamente 272 pb.

Se utilizó el termociclador Thermo® PCR Sprint Thermalcycler (Termo Electrón Corporation, Waltham, Massachuset, USA) con el programa determinado para cada cebador. Los productos amplificados se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y se colorearon con bromuro de etidio. El amplificado de los cebadores para aZP2 se envió a secuenciar al *Center for Innovations in Medicine, The Biodesign Institute of Arizona State University* (Church & Gilbert, 1984). (ANEXO IV, figura 16)

4.5.- Análisis De Datos

Se utilizó la base de datos *GenBank* para verificar que la secuencia del producto amplificado corresponde a aZP2; la secuencia del amplificado fue comparada mediante el programa BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) considerando sólo a aquellas secuencias que posean un valor menor a 10^{-5} como valor significativo.

Se realizó el alineamiento múltiple con el programa *Clustal X* (Thompson, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998), contrastando y determinando las posiciones conservadas y divergentes respecto a las secuencias de ZP2 de diferentes especies (*Bos taurus*, *Sus scrofa* y otras existentes en base de datos).

Empleando *BioEdit* (Hall, 1999) se editó el alineamiento realizado con *Clustal X*, así mismo será determinado el porcentaje de identidad individual entre las diferentes secuencias de ZP2 y aZP2.

El análisis filogenético se realizó con el programa *Mega 3* (Kumar *et al.*, 2004), empleando la herramienta *Neighbour Joining* con 1000 iteraciones de *Bootstrap* para demostrar si las secuencias analizadas presentan una mayor homología con las secuencias del gen ortólogo de ZP2 de *Sus scrofa* (N° acceso *Genbank* BAA08092) *Bos taurus* (NP_776398), *Mus musculus* (EDL17202), *Felis catus* (BAA08095), *Ratus norvegicus* (NP_112412), *Canis familiaris* (BAA08097), como *outgroup* se emplean las secuencias ortólogas de las especies *Gallus gallus* (NP_001034187), *Homo sapiens* (AAH96307), *Danio rerio* (AAI27569).

5.-RESULTADOS

Se aisló el RNAm de diferentes tejidos de *Lama pacos*, este RNAm fue retrotranscrito a DNAc sin dificultad, lo cual nos indica que la degradación del mismo fue mínimo.

El DNAc de todos los tejidos fue empleado para la amplificación de una secuencia parcial de zona pelúcida de la glicoproteína de tipo 2 de alpaca y para la secuencia de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, un gen *housekeeping* usado como control de expresión. La amplificación de aZP2 (450 aprox.) se dió solamente con la muestra ovárica mas no en los otros tejidos (hígado, músculo, bazo, testículo) (figura1.A) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (270 pb aprox.) amplifica en todas las muestras empleadas excepto en testículo El amplificado correspondiente a aZP2 secuenciado tiene una longitud exacta de 466pb, longitud predicha con los cebadores específicos empleados, esta secuencia fue indexada en el banco de datos del GENBANK para dominio público.(ANEXO V, figuras 17 y 18)

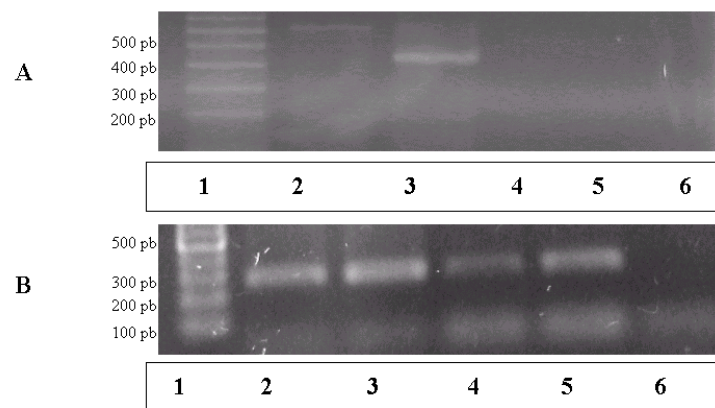


Figura 1: A. gel de amplificación de aZP2 con DNAc de alpaca; B gel de amplificación de gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenada con DNAc de alpaca. La posición 1: marcador de peso (100pb); 2: DNAc de testículo de alpaca; 3: DNAc de Ovario de Alpaca, 3: DNAc de Hígado de Alpaca; 4: DNAc de Músculo de Alpaca; 5; DNAc de Bazo de Alpaca; 6: Control Negativo.

Se muestra el alineamiento de la secuencia parcial nucleotídica de aZP2 de alpaca con diferentes especies, este alineamiento local muestra una gran homología entre las secuencias de las diferentes especies analizadas, este fue empleado para la reconstrucción filogenética (figura 4).



Figura 4.- Alineamiento Múltiple de las secuencias nucleotídicas de ZP2 entre diferentes especies con Alpaca.

En la figura 5 se aprecia el alineamiento múltiple aminoacídico de las secuencias homólogas de ZP2, este alineamiento no ha sido bioeditado para poder apreciar la localización de la secuencia codificante de aZP2 transcrita a proteína. Aproximadamente entre las posiciones 332 y 592 se ubica el dominio de la

superfamilia de las Zonas Pelúcidas, el cual es de aproximadamente 260 aminoácidos. Esta región común a estas proteínas contiene 8 cisteínas estrictamente conservadas, los que probablemente formen puentes disulfuro. La conservación de su polaridad hidrofóbica en diferentes posiciones es coherente con la conservación de una estructura tridimensional. Además de estas cisteínas conservadas, pocos aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos son invariables, probablemente debido a su importancia funcional antes que su estructura. Este patrón de conservación es típico de dominios de proteínas mosaico involucradas con funciones de unión. (Bork & Sander, 1992)

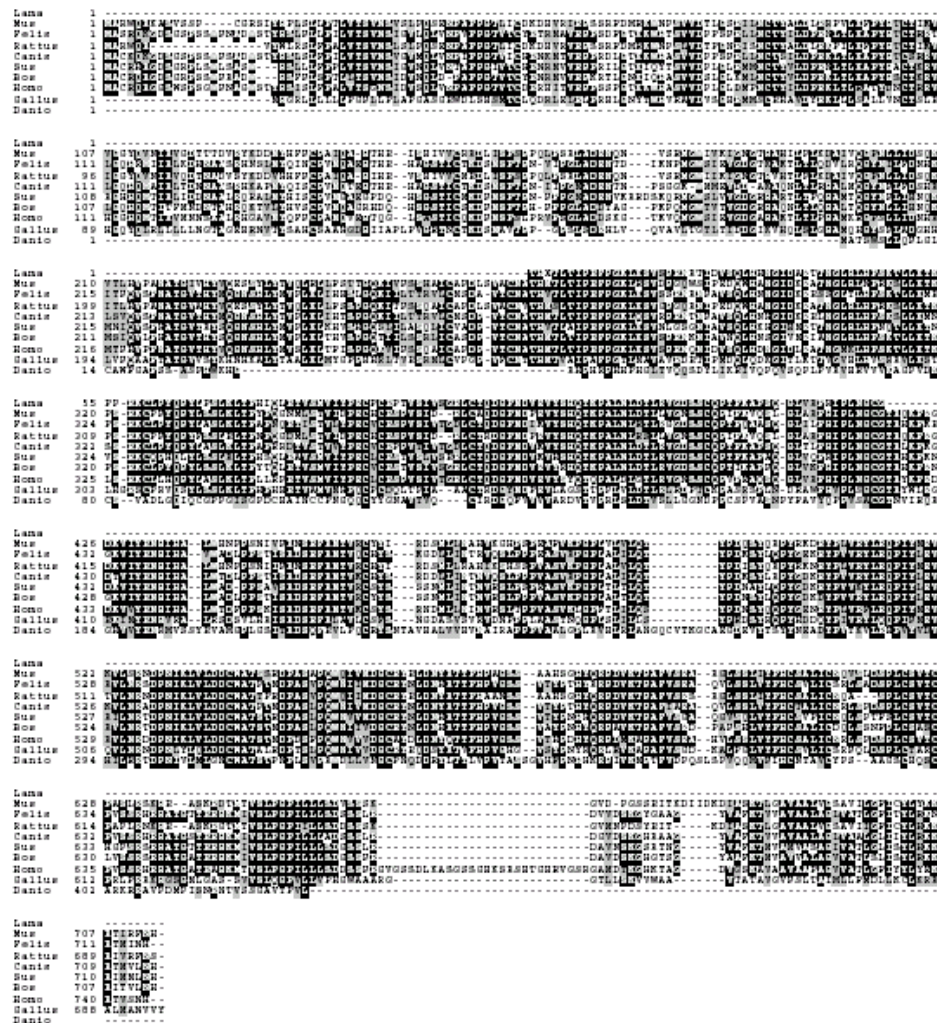


Figura 5.- Alineamiento Múltiple aminoácido de las secuencias de ZP2 entre diferentes especies con aZP2 parcial de Alpaca.

La secuencia aislada de aZP2, comparte una región de este superdominio común a las ZP, en este segmento parcial se detectan 3 cisteínas estrictamente conservadas para todas las especies y otras 3 cisteínas que no se encuentran en *Danio rerio*. (Figura 6 y 7)

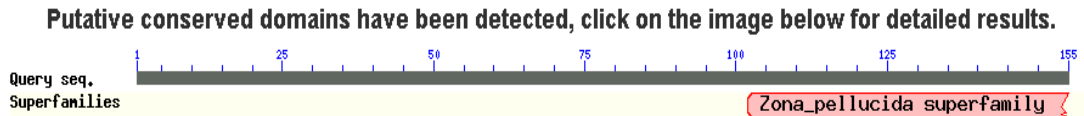


Figura 6.- Detección de un fragmento de un dominio putativo para la superfamilia de las zonas pelúcidas ha sido detectado entre la posición 100 a 150 de aZP2.

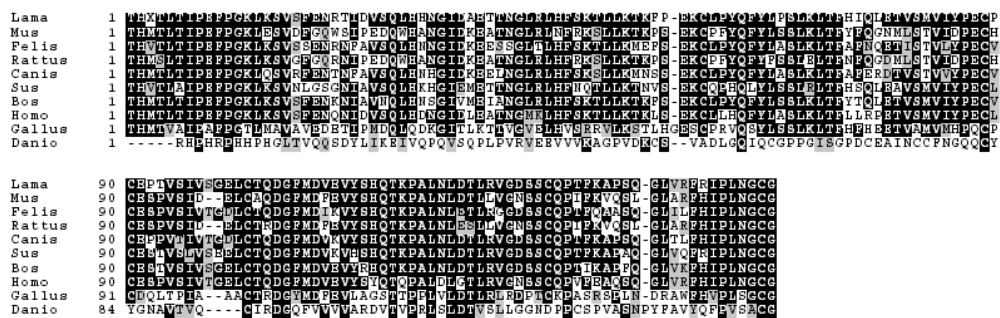


Figura 7.- Alineamiento Múltiple aminoacídico bioeditado de las secuencias parciales homólogas de ZP2 entre diferentes especies con aZP2 parcial de Alpaca.

En base a las secuencias aminoacídicas bioeditadas de ZP2 de las diferentes especies, se realizó un alineamiento local empleando BLAST para la comparación de 2 proteínas, la tabla 1 muestra los resultados. Los valores E son significativos para todas las especies, excepto para *Danio rerio* cuya secuencia diverge más de aZP2, lo que da cuenta a que esta secuencia no forma parte de otras proteínas y tampoco se encuentra al azar en alguna otra.

Tabla 1.- Porcentajes de identidad de la secuencia aminoacídica parcial de ZP2 de alpaca (155 aa) respecto de otras especies de mamíferos

Especie	Longitud (aa)	Porcentaje de Identidad	Porcentaje de similaridad	Valor E
<i>Bos taurus</i>	155	133/155 (85%)	139/155 (89%)	5e-79
<i>Homo sapiens</i>	155	125/155 (80%)	137/155 (88%)	1e-73
<i>Sus scrofa</i>	155	122/155 (78%)	135/155 (87%)	7e-73
<i>Felis catus</i>	155	119/155 (76%)	132/155 (85%)	3e-71
<i>Canis familiaris</i>	155	121/155 (78%)	132/155 (85%)	6e-72
<i>Ratus novergicus</i>	153	107/155 (69%)	117/155 (75%)	3e-59
<i>Mus musculus</i>	153	109/155 (70%)	116/155 (74%)	2e-59
<i>Gallus gallus</i>	154	73/156 (46%)	99/156 (63%)	5e-40
<i>Danio rerio</i>	146	19/57 (33%)	27/57 (47%)	0.001
		8/22 (36%)	13/22 (59%)	0.060

Los datos mostrados en esta tabla fueron calculados con el programa protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) el cual se basa en el método *Compositional matrix adjust* (Stephen F *et al*, 2005)

El Análisis Filogenético basado en la secuencia ZP2 de las diferentes especies y la alpaca, muestra que el grupo Cetarteodactyla constituye un grupo monofilético robusto (Figura 5), dando cuenta una alta homología entre las secuencias nucleotídicas parciales de las secuencias codificantes para ZP2.

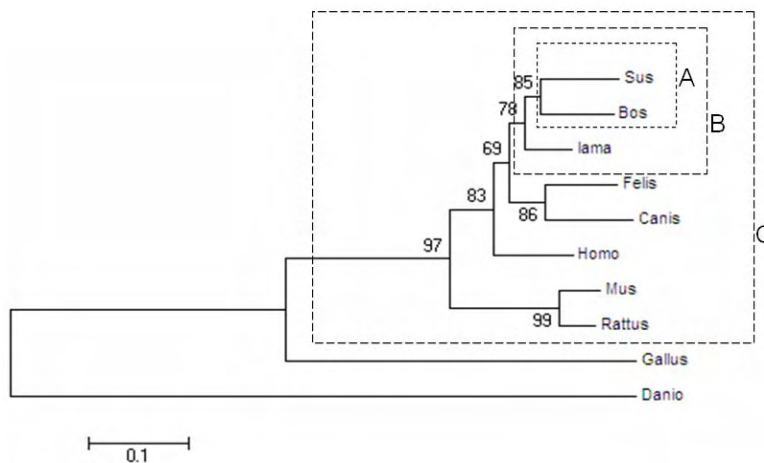


Figura 8. Análisis Filogenético, se observa al nodo B constituido por los cetartiodactyla, cuyas secuencias están más conservadas entre sí.

6.-DISCUSIÓN

La Zona Pelúcida, matriz extracelular que rodea al ovocito de alpaca (ANEXO I, figuras 9 y 10) está constituida por tres glicoproteínas (ANEXO II, figura 11): ZP3 que induce RA; ZP1, estructural, que interconecta a ZP3 y ZP2. ZP2 es la molécula de unión secundaria, interactúa con los receptores espermáticos expuestos después de RA siendo necesaria para mantener la unión del espermatozoide al ovocito, su modificación proteolítica después de la fertilización permite el bloqueo de la poliespermia. ZP2 participa también en la organización, el desarrollo y maduración del ovocito, puesto que mantiene consistente la matriz y la interacción entre las células periféricas y la célula germinal. En este trabajo se demuestra que la amplificación de aZP2 es específica del ovario, siendo evidencia de la presencia de un transcripto similar a la ZP2 de otros mamíferos. Las muestras de testículo analizadas no amplifican para el gen *housekeeping* G3PDH, esto podría deberse a que el RNA para este gen se degradaron o los niveles de expresión son más reducidos a comparación de los otros tejidos, este marcador aún no ha sido validado para este tipo de muestras en esta especie puesto que con una alícuota del DNA del mismo se logró amplificar otros genes específicos de testículo. (resultados no mostrados).

La secuencia peptídica de aZP2 comparte un segmento con el dominio de la superfamilia de las ZPs, encontrándose 3 cisteínas altamente conservadas en todas las especies analizadas en este estudio las que probablemente formen puentes disulfuro importantes para su estructura y función (Bork & Sander, 1992).

El Análisis Filogenético de ZP2 de las diferentes especies, demuestra que el grupo Cetartodactyla constituye un grupo monofilético robusto (Figura 5), dando cuenta una alta homología entre las secuencias nucleotídicas parciales del gen ZP2 y sus

homólogos en mamíferos, manteniéndose distante de *Gallus gallus* y *Danio rerio.*, corroborando la importancia de aZP2 en el reconocimiento de los gametos en el proceso de fertilización.

Estos resultados nos indican que Alpaca expresa una proteína similar a la ZP2 de otros mamíferos, la cual es sintetizada en los ovocitos en desarrollo, es por ello que sus niveles de expresión pueden ser usados como marcadores de maduración folicular ovocitaria.

7.-CONCLUSIONES

Lama pacos expresa la glicoproteína de zona pelúcida de tipo 2 específicamente en los ovarios; esta secuencia parcial analizada se encuentra conservada, constituyéndose un grupo monofilético. entre los Cetartodactyla. Se sugiere que la divergencia que estas secuencias presentan podrían estar involucradas en el reconocimiento especie-específico de gametos.

8.-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS GP, RATTO MH. 2001. Reproductive biotechnology in South American camelids. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 1:134-141.
- BADLEY JE., BISHOP GA., JOHN SI., FRELINGER JA. 1988. A simple, rapid method for the purification of poly(A)+ RNA. *BioTechniques* 6(2), 114-116
- BLACKMORE DG, BAILLIE LR, HOLT JE, DIERKX L, AITKEN RJ, MCLAUGHLIN EA. 2004. Biosynthesis of the canine zona pellucida requires the integrated participation of both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod* 71: 661-668

- BONAVIA D.1996. Los camélidos sudamericanos: una introducción a su estudio. Lima. IFEA , 843 p.
- BORK P., SANDER C.1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-p type III receptor. *Federation or European Biochemical societies* 300 (3)237-440
- BRAVO PW. 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science* 257:61-66.
- BRAVO, P.W., U. FLORES, J. GARNICA, C. ORDOÑEZ. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas, *Theriogenology* 47: 619-626.
- CHURCH GM, GILBERT W. 1984. Genomic secuencing. *PNAS* 81;1991.
- COMPTON, T. 1990 in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T., eds.), p. 39, Academic Press, Inc.
- HALL TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98.
- HACKS W. 2001.The Peruvian Alpaca Meat and Hide Industries. *Rural Industries Research and Development Corporation*, p. 11, RIRDC.
- HOWES E, PASCALL JC, ENGEL W AND JONES R. 2001. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J Cell Sci* 114, 4127–4136

- JEANMOUGIN F, THOMPSON JD, GOUY M, HIGGINS DG, GIBSON TJ. 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23: 403–405
- JOVINE L, QI H, WILLIAMS Z, LITSCHER E, WASSARMAN PM. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biol* 4; 457-461.
- KUMAR S, TAMURA K Y NEI M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- LEFIÈVRE L., CONNER S.J., SALPEKAR A., OLUFOWOBI O., ASHTON P., PAVLOVIC B., LENTON W., AFNAN M., BREWIS I.A., MONK M., HUGHES D.C., BARRATT C.L. 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*,19:1580-6.
- MATE KE, MCCARTNEY CA. 1998. Sequence and analysis of the zona pellucida 2 (ZP2) ADNc from a marsupial, the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *Mol Reprod Dev* 51: 322-329.
- MCLESKE SB, DOWDS C, CARBALLADA R, WHITE RR, SALING PM. 1998. Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Int Rev Cytol* 177: 57-113.
- MINISTERIO DE ECONOMIA Y PLANIFICACION DEL PERU. 2004. Reporte anual de la comercialización de auquénidos y sus derivados. Vol 1, 37p.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA DEL PERU. 2004. Informe anual de crianzas altoandinas. Vol. 2, 95p.

- QI H, WILLIAMS Z, WASSARMAN PM. 2002. Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged ADNs for mZP2 and mZP3. *Mol Biol Cell* 13: 530-541.
- RANKIN T, DEAN J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5: 114-121.
- RANKIN T., O'BRIEN M, LEE E, WIGGLESWORTH K, EPPIG J, DEAN J. 2001. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128, 1119-1126
- SCHWOEBEL E, PRASAD S, TIMMONS TM, COOK R, KIMURS H, NIU E-M, CHEUNG P, SKINNER S, AVERY SE, WILKINS B, DUNBAR BS. 1991. Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the 55-kDa Rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem* 266: 7214-7219.
- SINOWATZ F, TÖPFER-PETERSE E, KÖLLE S, PALMA G. 2001. Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Hist Embryol* 30: 251-263.
- SPARGO SC, HOPE RM. 2003. Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol Reprod* 68: 358-362.
- SMITH, C.L., A.T. PETER, D.G. PUGH. 1994. Reproduction in llamas and alpacas: a review. *Theriogenology* 41: 573-592.
- STEPHEN F. ALTSCHUL, JOHN C. WOOTTON, E. MICHAEL GERTZ, RICHA AGARWALA, ALEKSANDR MORGULIS, ALEJANDRO A. SCHÄFFER, AND YI-KUO YU 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices *FEBS J.* 272:5101-5109.
- TALBOT P., BD. SHUR, GD MYLES. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *BiolReprod*, 68:1-9.

- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. AND D. G. HIGGINS. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- TSUBAMOTO HT, HASEGAWA A, NAKATA Y, NAITO S, YAMASAKI N, KOYAMA K. 1999. Expression of recombinant zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* 61: 1649-1654.
- VAN DUIN M, POLMAN J, DE BREET I, VAN , BUNSCHOTEN H, GROOTENHUIS A, BRINDELE J, ATKEIN R. 1994. Recombinant human Zona Pellucida protein ZP3 produced bu Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biology of Reproduction* 51:607-617
- WASSARMAN, P.M. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Ann Rev Biochem*, 57:415-42.
- WASSARMAN PM, JOVINE L, LITSCHER ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature* 3: E59-E64.
- WASSARMAN PM, LITSCHER ES. 2001. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cell Tiss Org.* 168: 36-45.
- WASSARMAN PM, MORTILLO S. 1991. Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Itm Rev Cytol* 130: 85-110.
- WHEELER, J.C., RUSSEL, A.J.F AND STANLEY, H.F. 1992. A measure of loss:prehispanic llama and alpaca breeds. *Arch. Zootec.* 41 (extra): 467-475.
- YANAGIMACHI, R. 1994. Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction. Ed. Knobil - Neill*, pp. 189-317. New York Raven Press.

ANEXO I

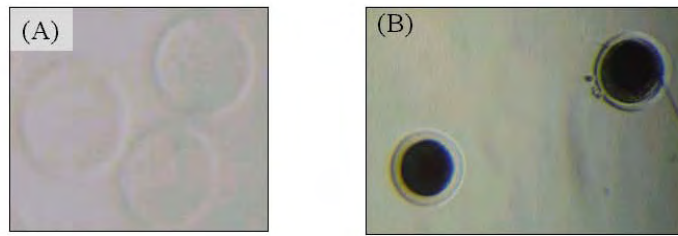


Figura 9: Zona pelúcida de *Lama pacos*
(A) Zonas pelúcidas de alpaca (40x) (B) Ovocito de alpaca (20x)
Fotografías incluidas con autorización del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

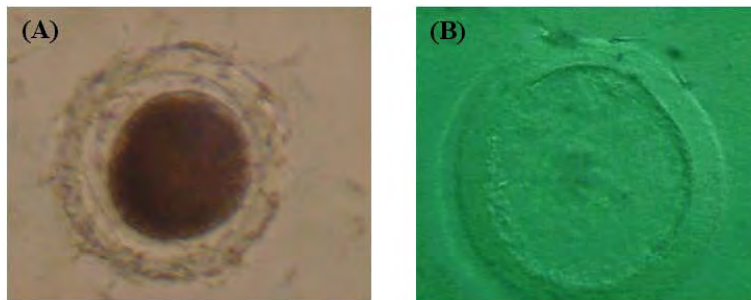


Figura 10: (A) Interacción gamética ovocito de alpaca- espermatozoides (400x).
(B) Interacción zona pelúcida de alpaca-espermatozoides (400x)
Fotografía incluida con autorización del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

ANEXO II

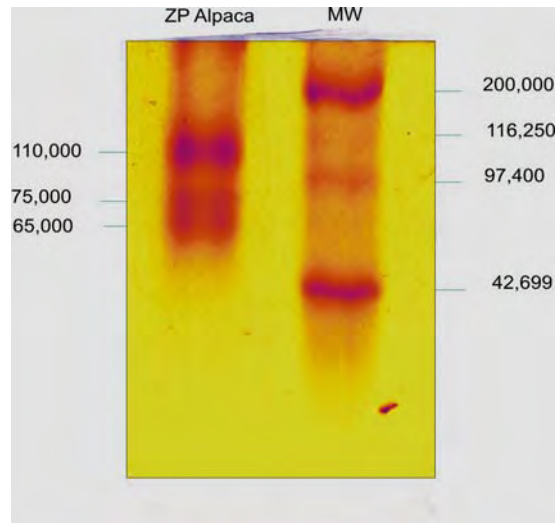


Figura 11: Electroforesis en condiciones reductoras de solubilizados de zona pelúcida. La Zona pelúcida de alpaca está constituida por 3 glicoproteínas : aZP1, aZP2 y aZP3; las cuales se observan como bandas anchas y difuminadas debido a la alta glicosilación que presentan . **Fotografía incluida con autorización de Luis Guzmán Masías.**

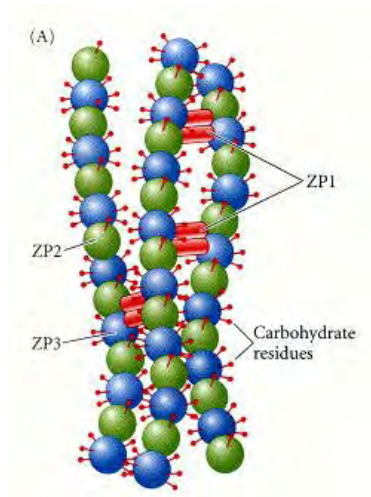


Figura 12: Diagrama de la estructura fibrilar de la zona pelúcida de ratón. La cadena mayor de la zona esta compuesta por dímeros de proteínas ZP2 y ZP3. Esas cadenas son ocasionalmente ligadas junto con ZP1, formando una red.

ANEXO III



Figura 13: (A)Camal Alpaquero regional de la localidad de Pilpichaca, (B) y (C) Capital alpaquera de la provincia de Huaytará -Huancavelica (4,050 msnm), donde se colectó tejido ovárico, pulmón, hígado, riñón y testículo de alpacas.

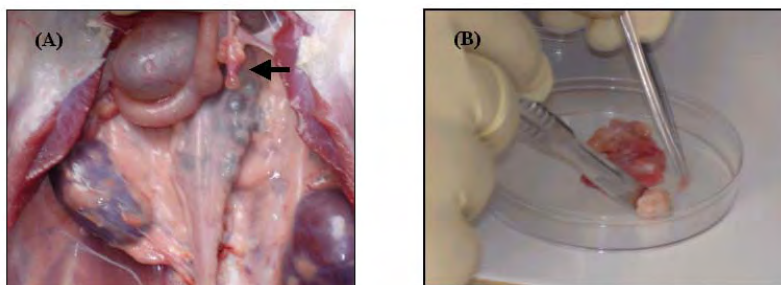


Figura 14: (A)Alpaca beneficiada, la flecha indica la posición de los ovarios el cual contiene abundantes folículos; (B) procesamiento del ovario.

ANEXO IV

Síntesis de la primera hebra de DNAc

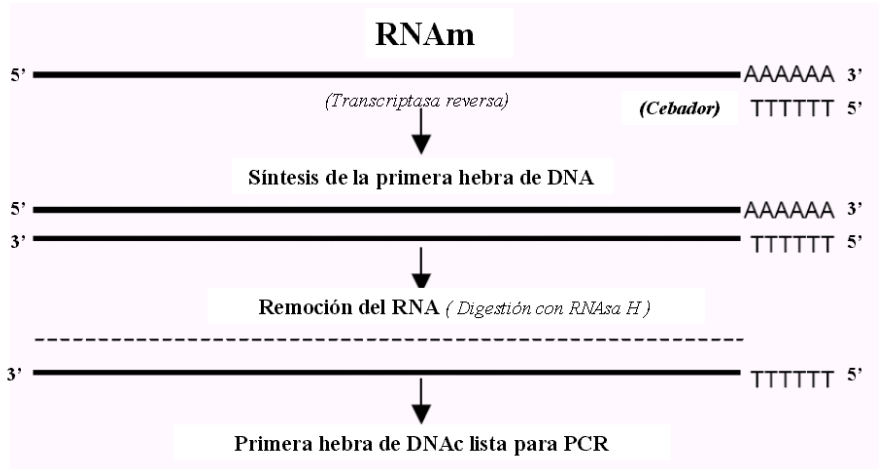


Figura 15: Esquema gráfico sobre la síntesis de la primera hebra de DNAc.

Se utilizó el kit *SuperScript First-Strand Synthesis System* para RT-PCR de Invitrogen. Se utilizó el mRNA aislado y purificado con las perlas de oligo(dT) que hibridizaron con las colas poly(A) de los ARNm. Se mezcló la transcriptasa reversa *SuperScript II RT*, dNTPs y oligo dTs y se colocó en un termociclador a 65°C para linealizar los RNAm, luego a 42°C para el annealing de los oligo dT con las colas poly-A de los RNAm para la síntesis de la primera hebra de DNAc. A la reacción se agregó RNasa H para digerir todo el RNA y dejar limpio el DNAc.

Amplificación de los segmentos específicos para ZP2 y G3PDH

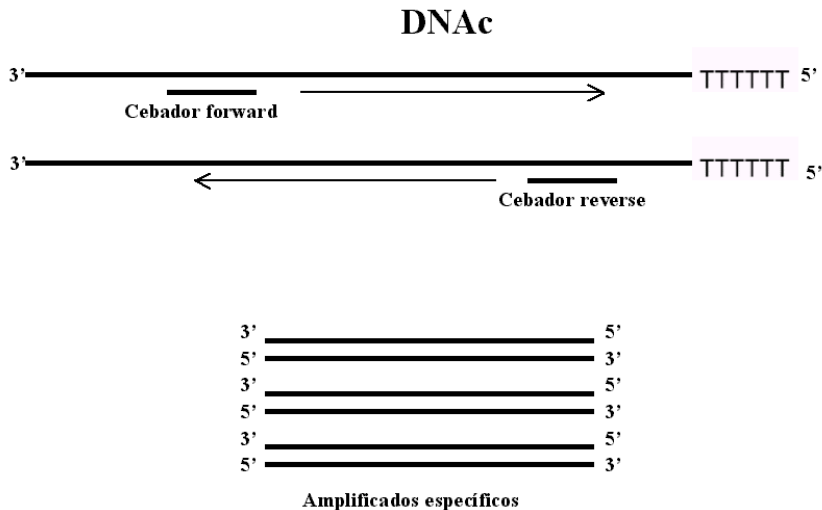
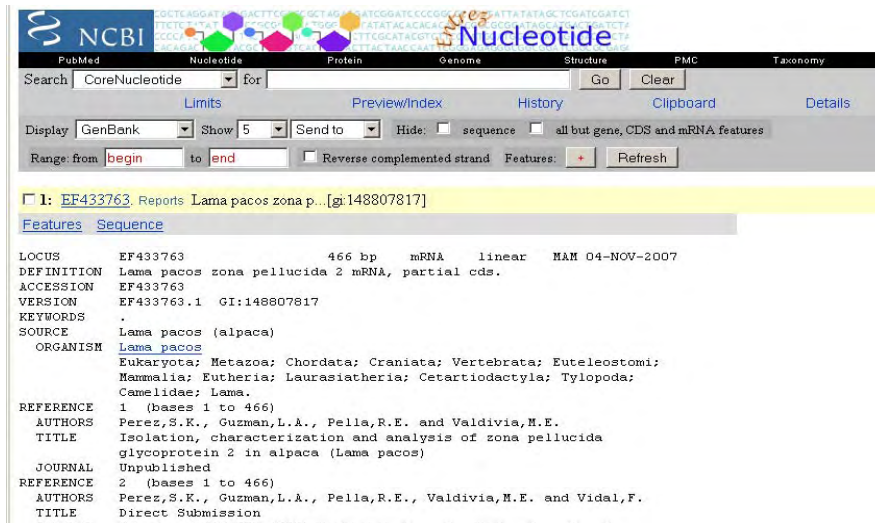


Figura 16: Esquema de la Amplificación del segmento específico de aZP2 y deG3PDH. El DNAc obtenido se colocó a 4°C y se adicionó la Taq polimerasa y los primers específicos para aZP2 y deG3PDH en reacciones independientes

ANEXO V



1: EF433763. Reports Lama pacos zona p...[gi:148807817]

[Features](#) [Sequence](#)

LOCUS EF433763 466 bp mRNA linear MAM 04-NOV-2007
 DEFINITION Lama pacos zona pellucida 2 mRNA, partial cds.
 ACCESSION EF433763
 VERSION EF433763.1 GI:148807817
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama pacos (alpaca)
 ORGANISM Lama pacos
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
 Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 466)
 AUTHORS Perez,S.K., Guzman,L.A., Pella,R.E. and Valdivia,M.E.
 TITLE Isolation, characterization and analysis of zona pellucida
 glycoprotein 2 in alpaca (Lama pacos)
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 466)
 AUTHORS Perez,S.K., Guzman,L.A., Pella,R.E., Valdivia,M.E. and Vidal,F.
 TITLE Direct Submission

figura 17 : Datos generales de la secuencia indexada banco de datos *GENBANK* de zona pelucida de tipo 2 de alpaca. Con número de accesoión EF33763.

```

LOCUS EF433763 466 bp mRNA linear MAM 04-NOV-2007
DEFINITION Lama pacos zona pellucida 2 mRNA, partial cds.
ACCESSION EF433763
VERSION EF433763.1 GI:148807817
KEYWORDS .
SOURCE Lama pacos (alpaca)
ORGANISM Lama pacos
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
Camelidae; Lama.
REFERENCE 1 (bases 1 to 466)
AUTHORS Perez,S.K., Guzman,L.A., Pella,R.E. and valdivia,M.E.
TITLE Isolation, characterization and analysis of zona pellucida
glycoprotein 2 in alpaca (Lama pacos)
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 466)
AUTHORS Perez,S.K., Guzman,L.A., Pella,R.E., valdivia,M.E. and Vidal,F.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (12-FEB-2007) Unidad de Genetica Molecular, Instituto
Peruano de Biologia Molecular, Av. Guardia Civil 715, Lima Lima41,
Peru
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..466
/organism="Lama pacos"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:30538"
/tissue_type="ovary"
/note="PCR-primers=fwd_name: FZP2, rev_name: RZP2"
CDS
<1..>466
/note="ZP2"
/codon_start=1
/product="zona pellucida 2"
/protein_id="ABR13697.1"
/db_xref="GI:148807818"
/translation="THKTLIPEFPGKLVSVFENRTIDVSQLHHNGIDAETTTNGLRL
HFSKTLTKKPKPEKCLPYQFYLPKLTFLHQLQLETVSMVITYPECPCEPTVSIYSGELC
TQGFMDVEVYSHQTKPALNLDLRLVGDSSCQPTFKAPSQLVFRFRIPLNGCG"
ORIGIN
1 acacacrtga ctctcaccat accagagttt cctgggaagt taaaatctgt gagctttgaa
61 aataggacta ttgatgtgag ccagctgcac cacaatggga ttgatgcaga aacaacaat
121 ggcttgcggt tgcatttcag caaaactctt ctcaaaacaa aatcccttga aaagtgccta
181 cctactcaat tctacttacc ttactctcag ctgaccttcc acattcaact ggaactgta
241 tccatggtag ttacccttga gtgtccctgt gaaccaacag ttcttatagt ttcaggtgag
301 ctgtgactc aggatgggtt tatggacgtg gaggtctaca gccaccagac aaaaacagct
361 ctcaacttgg ataccctcag ggtaggagac tcctcctgcc agccaacttt caaagctcca
421 tctcaggggc tggtagcctt tcgcatacc ctagatggat gtggaa
//
  
```

Figura 18: Datos generales de la secuencia indexada de zona pelucida de tipo 2 de alpaca.