

Desarrollo y evaluación de Primers para detectar el gen protamina 3 en alpacas

Development and evaluation of Primers to detect the protamine 3 gene in alpacas

Alejandra Ugarelli-Galarza^{1,2*} ; Bruna Medranda-Rocha¹ ; Alexei Santiani^{1,2} ; Shirley Evangelista-Vargas² .

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

²Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Veterinaria, Laboratorio de Reproducción animal, San Borja, Lima, Lima, Perú.

*Correspondencia: mugarelliga@cientifica.edu.pe

Recepción: 18 diciembre 2021 | Aprobación: 1 febrero 2022 | Publicación: 15 febrero 2022

RESUMEN

Objetivo. Desarrollar y evaluar primers para detectar el gen Protamina 3 (PRM3) en alpacas. **Materiales y métodos.** Los primers candidatos se diseñaron en base a las secuencias conservadas obtenidas del alineamiento del gen protamina 3 (PRM3) con la secuencia predichada del ARNm, ambos presentes en la base de datos del NCBI. Para la evaluación *in silico*, se enfrentaron los primers con el genoma de alpaca, y para la evaluación *in vitro*, se emplearon 51 muestras de tejido testicular. **Resultados.** Se obtuvieron 10 pares de primers. De estos, se seleccionaron los pares 1 y 6; denominados PRM3-P31 y PRM3-P32 y con amplicones de 240 pb y 328 pb, respectivamente. Además, la evaluación de subproductos se realizó mediante el programa Oligoanalyzer. **Conclusiones.** Se concluyó que el primer PRM3-P31 nos permite determinar la presencia del gen más seguridad que el otro primer seleccionado. Por lo tanto, fue posible desarrollar y evaluar primers para detectar la presencia del gen de la protamina 3 en alpacas.

Palabras clave: Alpaca; Gen; Primer de ADN; PRM3 (*Fuentes: MeSH*).

ABSTRACT

Objective. To develop and evaluate primers to detect the Protamine 3 (PRM3) gene in alpacas. **Materials and methods.** To do this, the candidate primers were designed based on the conserved sequences obtained from the alignment of the protamine 3 (PRM3) gene with the predicted sequence of the mRNA, both present in the NCBI database. For the *in silico* evaluation, the primers were compared with the alpaca genome. For *in vitro* evaluation, 51 testicular tissue samples were used. **Results.** 10 pairs of primers were obtained. Of these, pairs 1 and 6 were selected; named PRM3-P31 and PRM3-P32 and with amplicons of 240 bp and 328 bp, respectively. Furthermore, the evaluation of the presence of homodimers and heterodimers was carried out using the Oligoanalyzer program. **Conclusions.** It was concluded that the primer PRM3-P31 allows us to determine the presence of the gene safer than other selected primer. Therefore, it was possible to develop and evaluate primers to detect the presence of the protamine 3 gene in alpacas.

Keywords: Alpaca; DNA Primer; Gene; PRM3 (*Fuentes: MeSH*).

Como citar (Vancouver).

Ugarelli-Galarza A, Medranda-Rocha B, Evangelista-Vargas S. Desarrollo y evaluación de Primers para detectar el gen protamina 3 en alpacas. Rev Colombiana Cienc Anim. Recia. 2022; 14(1):e893. <https://doi.org/10.24188/recia.v14.n1.2022.893>

INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido que habita las zonas altoandinas de Sudamérica, principalmente los andes del Perú, y es por ello una importante fuente de ingreso económico para los habitantes de esta región. Motivo por el cual es sumamente importante establecer programas de mejoramiento genético para esta especie.

Uno de los principales pilares del mejoramiento genético es la selección de reproductores, la cual se debería realizar tomando en cuenta parámetros productivos y reproductivos; lamentablemente en alpacas, no se evalúan las muestras seminales de forma rutinaria (1). Esto se podría deber a la dificultad de obtención y manejo del semen de esta especie (2), y al hecho de que la evaluación mediante espermiograma básico no permite predecir la fertilidad del reproductor (3). Con lo cual observamos que en campo se realiza una deficiente selección de reproductores, y por ende un inadecuado mejoramiento genético. Una solución viable a esta problemática es el empleo de marcadores moleculares (4) como parte del plan de selección y evaluación reproductiva en alpacas, tal y como se viene empleando en otras especies productivas.

Existen diversos marcadores moleculares de fertilidad estudiados en especies de producción, siendo uno de ellos la familia de las protaminas (PRM's), la cual está formada por 3 proteínas. Estas proteínas son las responsables del hiperempaquetamiento del ADN espermático (PRM 1 y 2) (5,6) y participan en la motilidad espermática (PRM 3). Por ello, han sido catalogadas como marcadores moleculares de gran importancia en la fertilidad de bovinos (7).

De las 3 proteínas integrantes de la familia, la menos estudiada es la PRM3, cuya expresión ha sido cuantificada en citoplasma espermático y se ha relacionado como marcador de motilidad (7,8); sin embargo, estudios recientes en bovinos han determinado que es un marcador de fertilidad post-criopreservación (9,10,11), lo cual la hace una opción interesante de estudio, sobre todo en alpaca, que es una especie en la cual aún no se ha terminado de secuenciar el genoma, ni la expresión del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de la muestra. Primero se identificó el gen PRM3 en el genoma de la alpaca (Código de ID: 102543875) y la secuencia del ARNm (Código de acceso: XM_006204352.3) dentro de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego, se realizó el alineamiento de las secuencias empleando la herramienta bioinformática blast nucleotides (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), seleccionando el programa "megablast" (secuencias altamente similares).

Para desarrollar los primers, se empleó como base las secuencias conservadas del alineamiento previo y el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Evaluación *in vitro*. Para la evaluación *in vitro* de los primers, se trabajó un total de 51 muestras de tejido testicular obtenidas del camal municipal de Huancavelica. Los criterios de inclusión para las muestras fueron machos en un rango de edad de 1 a 4 años según dientes, con descenso de ambos testículos, sin patologías visibles y con tamaño testicular mayor a 3 cm (12). Las extracciones de ADN se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular de la Universidad Científica del Sur, empleando el kit InnuPREP DNA Mini Kit (cod. 845-KS-1040250). Para la PCR, se usó un termociclador Thermal Cycler 0.2ml x 64 PCR-300 (mcr), aplicando el siguiente protocolo: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por dos minutos, 40 ciclos de 95°C de 40 segundos (desnaturalización), 58°C de 40 segundos (anillamiento), 72°C de 40 segundos (elongación) y 1 ciclo de elongación final 72°C de 10 minutos. El producto obtenido mediante la PCR se corrió en gel de agarosa al 2% y se observaron los fragmentos amplificados en un fotodocumentador (Enduro™ GDS).

RESULTADOS

Identificación. Se identificó la secuencia del gen PRM 3, dentro del cromosoma 18, perteneciente del fichero VicPac3.1, localizado en una zona aproximada (NW_021964194.1). Según la información del NCBI, cuenta con un solo exón localizado entre el nucleótido 9.457.123 y 9.457.520 pb.

Desarrollo y evaluación de primers. Respecto al desarrollo de los primers, aplicando los criterios de diseño mencionados y las secuencias conservadas en el software Primer-Blast, se obtuvieron un total de 10 pares como se muestran en la tabla 1. Luego, empleando un muestreo no probabilístico aleatorio, se seleccionaron 2 pares: el número 1 y 6 de la tabla 1, los que fueron renombrados como par PRM3-P31 y PRM3-P32 respectivamente.

Tabla 1. Secuencias y características fisicoquímicas de los primer diseñados mediante el programa Primer-BLAST para el gen PRM 3, en base al alineamiento de secuencias de alpaca presentes en el NCBI.

N°	Tipo	Secuencia (5' -> 3')	Tamaño	Tm (°C)	GC (%)	Amplicón (pb)
1	F	CTGCGTGAGTCAGGACAAC	20	55.0	55.0	240
	R	CTCTTTGAAACAGCGGCAGG	20	55.0	55.0	
2	F	GTCCAGAGAGGCAGCCAAAG	20	60.6	60.0	120
	R	AGTTGTCTGACTCACGCAG	20	59.9	55.0	
3	F	TGCGTGAGTCAGGACAAC	20	59.5	50.0	192
	R	TCAAGAGTGTGTCTGCTCGG	20	59.6	55.0	
4	F	CAAAGCAGGTGATGGGTCC	20	59.1	55.0	86
	R	GGCCACAAGCTTCTTCATGG	20	59.4	55.0	
5	F	CAAAGCAGGTGATGGGTCC	20	59.1	55.0	278
	R	CAAGAGTGTGTCTGCTCGGG	20	60.6	60.0	
6	F	CCTTTCTCCAGTCCAGAG	20	59.0	60.0	328
	R	TCTTCTGGGCCATCGTCAT	20	60.9	55.0	
7	F	CCGAGCAGACACTCTTGA	20	59.6	55.0	70
	R	CTTCTCTTTGAAACAGCGGCA	20	59.4	47.6	
8	F	CCTGCGTGAGTCAGGACAAC	20	60.9	60.0	195
	R	ATCAAGAGTGTGTCTGCTCGG	21	60.0	52.3	
9	F	CAGTGGCCTTCTCCAG	19	60.0	63.1	108
	R	TCTTCATGGAGGATTCGTGGC	21	60.1	52.3	
10	F	GTGGCCTTCTCCAGTC	19	60.0	63.1	138
	R	GAAGTTGTCTGACTCACGC	20	58.8	55.0	

Posteriormente, se evaluaron posibles subproductos (horquillas, homodímeros y heterodímeros) con la herramienta oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) (Tabla 2). Los valores que se observar se dan por la valoración de la estabilidad termodinámica (ΔG°) de las interacciones entre los primers. En ambas parejas de primers se pueden producir siendo más o menos estables, ya que los valores de energía libre de Gibbs son cercanos a 0.

Tabla 2. Evaluación de posibles subproductos de PCR *in silico* de los primers PRM3-P31 y PRM3-P32 mediante la herramienta OligoAnalyzer.

Secuencias	(ΔG°) kcal/mol	Horquillas	N° de Homodímeros	N° de Heterodímeros	
P31	Forward	-36.07 kcal/mole	3	12	13
	Reverse	-40.55 kcal/mole	16	13	13
P32	Forward	-38.78 kcal/mole	2	7	14
	Reverse	-40.62 kcal/mole	10	9	14

La evaluación *in silico* del primer PRM3-P31 *in silico*, determinó una amplificación de 240 pb, que el forward está ubicado entre los nucleótidos 9457395 – 9457396 pb y el reverse entre 9457156 y 9457175 pb (Figura 1) dentro del cromosoma 18. Sin embargo, se observó que tiene localización con otras porciones en diferentes cromosomas, pero con productos mayores a 600 pb (Tabla 3).

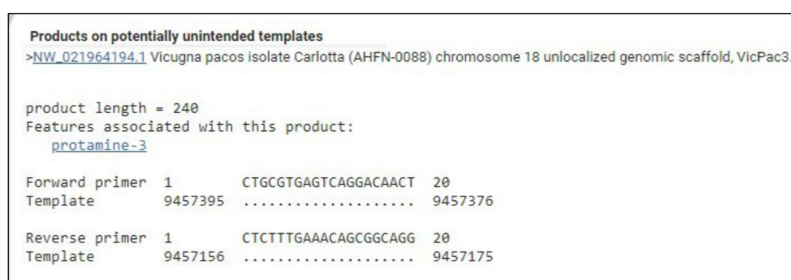


Figura 1. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de ADN del genoma de la alpaca y el primer par de primers PRM3-P31 (forward y reverse) obtenida con el programa Primer-BLAST.

Tabla 3. Determinación de otras posibles zonas de unión del par de primer PRM3-P31 con el genoma VicPac3.1 de alpaca.

N°	Localización	Amplicón (pb)
1	NW_021964184.1 (cromosoma 14)	2822
2	NW_021964160.1 (cromosoma 3)	2086
3	NW_021964186.1 (cromosoma 10)	2079
4	NW_021964156.1 (cromosoma 1)	610

La evaluación del primer PRM3-P32 *in silico*, determinó una amplificación de 328 pb, el forward está entre los 9457395 y 9457376 pb y el reverse está entre los 9457180 y 9457199 pb (Figura 2) dentro del cromosoma 18. Sin embargo, también se observó que tiene localización con otras porciones en diferentes cromosomas; con diversos tamaños de amplicones (Tabla 4).

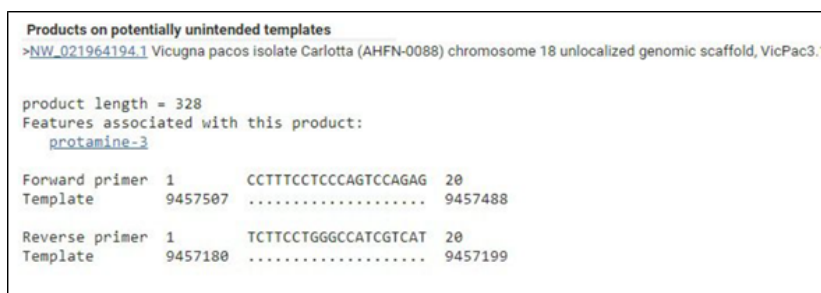


Figura 2. Alineamiento de la secuencia nucleotídica de ADN del genoma de la alpaca y el segundo par de primers PRM3-P32 (forward y reverse) obtenida con el programa Primer-BLAST.

Tabla 4. Determinación de otras posibles zonas de unión del par de primer PRM3-P32 con el genoma VicPac3.1 de alpaca.

N°	Localización	Amplicón (pb)
1	NW_021964165.1 (cromosoma 6)	816
2	NW_021964192.1 (cromosoma 16)	598
4	NW_021964204.1 (cromosoma 23)	28
5	NW_021964178.1 (cromosoma 12)	1077
6	NW_021964161.1 (cromosoma 4)	307
7	NW_021977394.1	502
8	NW_021964157.1 (cromosoma 2)	187
9	NW_021964166.1 (cromosoma 6)	2735
10	NW_021964196.1 (cromosoma 19)	608
11	NW_021985328.1	331

Respecto a la evaluación *in vitro*, se observó la amplificación esperada para el par de primers PRM3-P31 es de 240 pb (Figura 3), por lo que coincide el tamaño de producto obtenido *in silico* y observado en la tabla 1, valor que no corresponde a ningún otro punto de unión observado en la tabla 3.

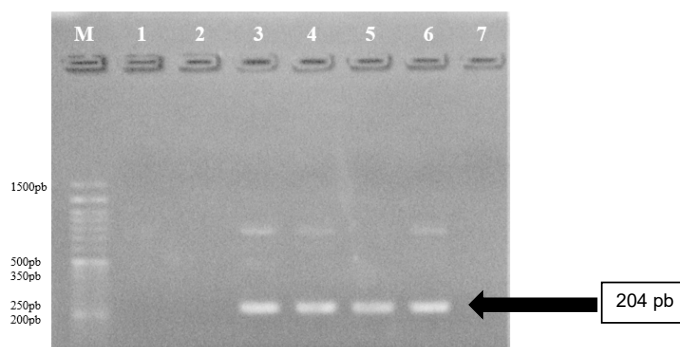


Figura 3. Primers PRM3-P31. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1 y 7: Control negativo; Carril 2: Control positivo. Carriles 3 - 6: Repeticiones de amplicones de ADN de alpaca.

En el caso del par de primers PRM3-P32, la amplificación observada (Figura 4) coincide con el tamaño de producto esperado en la evaluación *in silico*; sin embargo, este valor es muy cercano a los puntos de localización 12 y 28 observados en la tabla 4.

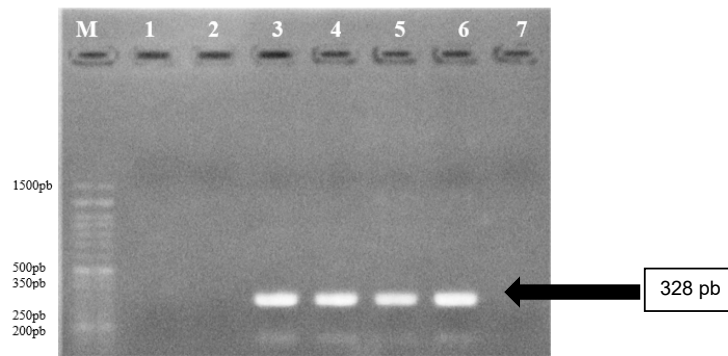


Figura 4. Primers PRM3-P32. Carril M: Marcador de peso molecular; Carril 1 y 7: Control negativo; Carril 2: Control positivo. Carriles 3 - 6: Repeticiones de amplicones de ADN de alpaca.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que desarrolla y valida primers para el gen protamina 3 (PRM3) en alpacas.

Identificación. Se realizó la búsqueda del gen dentro del genoma de la alpaca (GCF_000164845.3), ubicándolo en el cromosoma 18, lo que coincide con la ubicación del mismo gen en dromedarios, especie filogenéticamente relacionada. Así mismo, cumple las características indicadas en otros artículos (13).

Desarrollo de primers. Respecto al desarrollo de los primers, el no tener datos corroborados en el NCBI, el emplear como base la zona conservada obtenida del alineamiento del gen con el ARNm, nos brindó mayor confiabilidad de los resultados.

La evaluación de la energía libre de Gibbs (ΔG°), nos permite evaluar que tanta posibilidad existe de que se formen horquillas, homodímeros y heterodímeros (14)time consuming, and less sensitive. En ambos primers se observaron valores bastante cercanos, siendo la diferencia más resaltante la presencia de más horquillas y homodímeros en el par PRM3-P31; no obstante, esto no se vio reflejado en la evaluación *in vitro* con el gel de agarosa.

Validación de primers. Respecto a la validación *in silico*, esta se logró enfrentando los primers con el genoma completo presente en la base de datos del NCBI, determinando que los primers no son específicos. Esto podría deberse a que la secuencia del gen está presente en el cromosoma 18 pero no ordenado ni orientado en este, lo que también podríamos verificar por la secuencia del ARNm. Para el par PRM3-P31, este obtuvo 5 distintos puntos de unión en diversas cromosomas, mientras que el par PRM3-P32, tiene en total 44 distintos puntos; esto hace que el primer par sea mucho más específico que el segundo par.

Otro punto importante es el tamaño de los amplicones. Para el par PRM3-P31, el amplicón más pequeño fue el obtenido con la localización del gen PRM3 (204 pb) y al observar el gel de este par, se observó que efectivamente cumplió con la localización, verificándose así la especificidad para encontrar al gen PRM3. En el caso del par PRM3-P32, de los 44 puntos de localización, determinamos la cercanía de 3 puntos en distintos cromosomas: (1) en el cromosoma 18 con un amplicón de 328 pb, (2) en el cromosoma 4 con un amplicón de 307 pb y (3) sin localización específica con un amplicón de 331 pb. Al observar el gel, se observó un tamaño de 328 pb correspondiente al gen PRM3; sin embargo, la cercanía de las otras zonas hace dudar que realmente corresponda al gen. Por otro lado, se observa en el gel otra banda mucho más débil y de mucho menor tamaño. Estas bandas podrían ser amplificadas de los mismos primers o por la unión a otras zonas del genoma; lo que descarta la fiabilidad del empleo de este, dejando al par PRM3-P31 como mejor elección.

En conclusión, este estudio ha permitido desarrollar y evaluar primers para detectar el gen Protamina 3 en alpacas. Este estudio da pie a iniciar la investigación de este gen en alpacas.

Conflicto de intereses

Declaro no tener conflictos de interés con respecto al trabajo presentado.

Agradecimientos

Esta investigación se realizó gracias al proyecto “Caracterización de marcadores moleculares en genes relacionados a espermatogénesis y fertilidad espermática a partir de transcriptomas de testículo y epidídimo de alpaca” (código: E041-2016-01), contrato 118-2016 financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT).

REFERENCIAS

1. García W, Ccana E, Apaza E. Manual de empadre controlado de alpacas. Soluciones prácticas-ITDG. 2009. <http://www.funsepa.net/soluciones/pubs/Mzcy.pdf>
2. Muchotrigo D, Trelles X, Olazábal J, Choez K, Evangelista S, Santiani A. Probability of obtaining alpaca semen using an artificial vagina in groups of males without training. *Spermova*. 2013; 3(1):94–96. <http://spermova.pe/site/files/revista%202013%20vol.3%20No.%201/95-96-24-Muchotrigo - Alpacas.pdf>
3. Kizilay F, Altay BB, Kızılay F, Altay BB. Sperm function tests in clinical practice. *Turk J Urol*. 2017; 43(434):393–400. <https://doi.org/10.5152/tud.2017.96646>
4. Nyberg KG, Carthew RW. Out of the testis: biological impacts of new genes. *Genes Dev*. 2017; 31:1825–1826. <https://doi.org/10.1101/gad.307496.117>.
5. Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R. Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics*. 2017; 162:125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>
6. Hamilton T, Simoes R, Mendes M, Goissis MD, Nakajima E, Martins E, et al. Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*. 2019; 7:373–381. <https://doi.org/10.1111/andr.12610>
7. Moore SS. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. *Andrology*. 2014; 2:370–378. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00196.x>.
8. Ribas-Maynou J, Benet J. Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes*. 2019; 10(2). <https://doi.org/10.3390/genes10020105>
9. Kadivar A, Shams Esfandabadi N, Dehghani Nazhvani E, Shirazi A, Ahmadi E. Effects of cryopreservation on stallion sperm protamine messenger RNAs. *Reprod Domest Anim*. 2020;55(3):274–82. <https://doi.org/10.1111/rda.13615>
10. Martin-Coello J, Gomendio M, Roldan ERS. Protamine 3 shows evidence of weak, positive selection in mouse species (genus *Mus*) - But it is not a protamine. *Biol Reprod*. 2011; 84(2):320–326. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086454>
11. Kumar S, Singh U, Ganguly I, Rajib D, Rani S, Sandeep M, et al. Protamine 3 expressions in crossbred bull spermatozoa may not be a prognostic marker for differentiating good and poor quality semen. *Afr. J. Biotechnol*. 2014; 13(20):1999–2003. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.13535>
12. Abraham MC, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe EM, Verdier K., Morrell JM, Båge R. Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Vet Scand*. 2016; 58(1). <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0191-x>
13. Zamzami RS, Akmal M, Helmi TZ, Rusli R, Sugito S., Siregar TN, Wahyuni S. Identification and Characterization of Protamine 3 (prm3) Gene in Aceh Bull Testis. *Adv. Biol. Res. In Icvaes 2020*. 2021; 12(1):145–148. <https://doi.org/10.2991/absrk.210420.031>
14. Orozco-Ugarriza M, Franco-Anaya P, Olivo-Martinez Y. Validación In silico de oligonucleótidos-primers para la detección específica de *Salmonella* spp. mediante reacción en cadena de la polimerasa. *RIADS*. 2016; 1:42–50. <http://revistas.sena.edu.co/index.php/riads/article/view/703>.