



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
BIOLÓGICAS
CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

“DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN PRM3 EN
ALPACAS”

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:
BRUNA MEDRANDA ROCHA (0000-0002-5712-3736)

Asesor:
SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS: (0000-0001-6105-
1889)

Lima – Perú
2021

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 30 de junio del 2021.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dra. BERTHA ISABEL TUPAC-YUPANQUI SAGASTEGUI
Miembro: Mg. NATHALY ENCISO BENAVIDES
Miembro: Mg. SERGIO BARAHONA PADILLA

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

“DISEÑO Y VALIDACIÓN DE PRIMERS PARA EL GEN PRM3 EN ALPACAS”

Presentada por la bachiller:

BRUNA MEDRANDA ROCHA

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

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

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

Tesisista: BRUNA MEDRANDA ROCHA			Nota : Dieciséis	
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (16)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()	

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.


Dra. BERTHA ISABEL TUPAC-YUPANQUI SAGASTEGUI
Presidente


Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS
Asesora

ENCISO BENAVIDES NATHALY - Y2096523H
 Firmado digitalmente por ENCISO BENAVIDES NATHALY - Y2096523H Fecha: 2021.07.06 00:23:20 +02'00'
Mg. NATHALY ENCISO BENAVIDES
Miembro 1


Mg. SERGIO BARAHONA PADILLA
Miembro 2

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).

Agradezco también a mi familia, por todo el apoyo a lo largo de mi carrera. A Shirley y Alejandra, por toda la ayuda y orientación para el desarrollo de este trabajo y a todos los tesisistas del proyecto, con quienes trabajamos en conjunto. A todos los técnicos de laboratorio y personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis.

RESUMEN

Hasta la fecha no se ha anotado al gen PRM3 en el genoma de la alpaca, a pesar de su potencial relación con la motilidad espermática y su potencial utilidad para la selección y reproducción. El objetivo del presente estudio fue diseñar primers para amplificar por PCR convencional el gen PRM3 en alpacas. Los primers fueron diseñados empleando el programa Primer-BLAST y seleccionados con el programa OligoAnalyzer. De los 10 pares de primers diseñados, seleccionamos a los dos mejores de acuerdo al tamaño del amplicón (240 y 328pb) y sus propiedades termodinámicas (espontaneidad de hairpin y dímeros). Con el fin de validar los primers diseñados se realizaron pruebas de PCR convencional usando ADN genómico extraído a partir de tejido testicular. Los productos de PCR fueron corridos mediante electroforesis horizontal en gel agarosa al 2% y visualizados con SafeView Classic (abm®). Las bandas a tamaño esperado permitieron comprobar que el diseño de primers fue exitoso. Se concluyó que fue posible diseñar primers *in silico* para el gen PRM3 en alpaca y validarlos experimentalmente mediante PCR convencional.

Palabras clave: Diseño de primers, ADN, PRM3, alpacas, PCR

ABSTRACT

To date, the PRM3 gene has not been annotated in the alpaca genome, despite its potential relationship with sperm motility and its potential utility for selection and reproduction. The objective of the present study was to design primers to amplify the PRM3 gene in alpacas by conventional PCR. Primers were designed using the Primer-BLAST program and selected with the OligoAnalyzer program. From the 10 pairs of primers designed, we selected the best two according to the size of the amplicon (240 and 328bp) and their thermodynamic properties (spontaneity of hairpin and dimers). In order to validate the designed primers, conventional PCR tests were performed using genomic DNA extracted from testicular tissue. The PCR products were run by horizontal 2% agarose gel electrophoresis and visualized with SafeView Classic (abm®). The bands at the expected size allowed us to verify that the primer design was successful. It was concluded that it was possible to design *in silico* primers for the PRM3 gene in alpaca and to validate them experimentally using conventional PCR.

Key words: Primer design, DNA, PRM3, alpacas, PCR

INTRODUCCIÓN

En el Perú se encuentra la mayor población de alpacas (*Vicugna pacos*) a nivel mundial (MINAGRI, 2017). Este camélido sudamericano se destina principalmente a la producción de fibra, siendo de gran importancia para la industria textil y para las comunidades altoandinas (Fernández-Baca, 2005).

El escenario ideal en producción animal es generar del mayor número posible de individuos superiores desde el punto de vista productivo y reproductivo. La calidad seminal es esencial para este fin, pero este carácter es multifactorial pues en él participan factores nutricionales, ambientales, fisiológicos y genéticos (Aoki *et al.*, 2006). En alpacas, la continua selección de los parentales con la mejor fibra puede conllevar a la disminución de la calidad seminal (Cervantes *et al.*, 2010b; Cruz *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2017a; Cruz *et al.*, 2017b; Gutiérrez *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2014; Paredes *et al.*, 2014; Pérez-Cabal *et al.*, 2010) afectando la producción a largo plazo.

Una solución a este problema es la selección de parentales basado en marcadores moleculares. Se han descubierto marcadores moleculares asociados a caracteres reproductivos en varias especies (Barazani *et al.*, 2014; Du Plessis *et al.*, 2011; Harayama *et al.*, 2017; Jodar *et al.*, 2017; Kashou *et al.*, 2013). Por ejemplo, en toros y ratones, los genes que codifican las llamadas protaminas son marcadores para calidad seminal (Grzmil *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2014). Una ventaja de aplicar esta tecnología es la facilidad de selección en edades tempranas (Hood *et al.*, 2004), pero para poder aplicarlo en alpacas es necesario encontrar los marcadores moleculares asociados a este carácter en esta especie.

Las mencionadas protaminas, que son las codificadas por tres genes nucleares (PRM1, PRM2 y TNP2), se encargan del correcto empaquetamiento del ADN nuclear espermático, lo cual está estrechamente ligado a la calidad seminal (Cho *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2019; Jodar *et al.*, 2017; Oliva, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006). Sin embargo, hay una cuarta protamina inicialmente encontrada en ratones, codificada por el gen nuclear PRM3, cuya presencia y rol han sido estudiados en varios mamíferos (Grzmil *et al.*, 2008), más no en alpacas. Este gen sin intrones parece tener una estrecha relación con la motilidad espermática (Coello *et al.*, 2010; Grzmil *et al.*, 2008; Jodar & Oliva, 2014). Por ejemplo, se demostró que los ratones a los que se les eliminó el gen PRM3 mantuvieron su fertilidad, pero disminuyeron su motilidad espermática (Grzmil *et al.*, 2008), mientras que en toros se concluyó de forma similar que la fertilidad no era afectada, pero que también juega un rol en la motilidad espermática (Kumar *et al.*, 2014). Si bien en estas especies la tasa de fertilidad no es afectada, no es posible afirmar lo mismo en alpacas. Es conocida la complejidad de la reproducción en alpacas debido

a su baja tasa de fertilidad (San Martín *et al.*, 1968; Sumar & Adams, 1997), por lo que es necesario asegurar la producción seleccionando machos con espermatozoides de alta motilidad. Por este motivo, identificar la presencia y expresión del gen PRM3 en alpacas es esencial tanto para mejorar la comprensión de la fertilidad de esta especie como para optimizar los procesos de selección de reproductores.

Para obtener marcadores moleculares asociados a este gen, se necesita la secuencia del mismo (e.g. bases de datos) y con ello es posible el diseño *in silico* de primers.

El presente estudio tiene como objetivo el diseñar y validar primers para el gen PRM-3 en alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Debido que no se ha anotado la secuencia del gen PRM3 en alpacas, se utilizó el ARNm “predicted” de dicho gen (Código de acceso: XM_006204352.3), obtenido de la base de datos de la NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Esta es una secuencia obtenida *in silico*, en base a la información del genoma y a especies filogenéticamente relacionadas a la especie estudiada, más no ha sido secuenciada experimentalmente. Esta secuencia de ARN mensajero vendría a ser idéntica a la secuencia de ADN puesto que al ser un gen carente de intrones no hay proceso de splicing (Belluscio, 2013). Esta secuencia fue comparada con el genoma completo de la alpaca utilizando el programa bioinformático Nucleotide Blast, usando la base de datos RefSeq Genome Database (refseq Genomes), organism *Vicugna pacos* (taxid:30538) y optimizado para la búsqueda de secuencias altamente similares (“megablast”).

Luego se diseñaron primers *in silico* usando el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) especificando como *PCR template* a la secuencia del ARNm del gen PRM-3 (XM_006204352.3), en la opción *database* a la secuencia completa del cromosoma 18 de la alpaca (NW_021964194.1) y en *organism* a *Vicugna pacos* (taxid:30538). Para evaluar estos primers y seleccionar los más adecuados se utilizaron los criterios de inclusión establecidos por Abd-Elsalam (2003) (Cuadro 1).

Cuadro 1: Cuadro de criterios de diseño de oligonucleótidos – primers

Criterio de diseño	Características
Tamaño	20-25 nucleótidos de longitud
Base en el extremo 3'	Guanina (G) o Citosina (C)
Temperatura melting (Tm)	50-65 °C

Contenido %GC	40-60%
Auto-complementariedad	Evitarla para minimizar formación de estructuras secundarias y dímeros
Similaridad	100% de apareamiento con el molde

Fuente: Modificado de Abd-Elsalam, 2003.

Adicionalmente al uso de estos criterios de inclusión, se necesitó evaluar la espontaneidad de la formación de estructuras secundarias (horquillas y dímeros). Para ello se utilizaron los siguientes valores límites de energía libre de Gibbs (ΔG):

- Para horquillas, un ΔG mínimo de -3 KCal/mol. Se seleccionaron valores mayores a este valor o positivos. Primers con valores más negativos fueron descartados.
- Para homodímeros y heterodímeros, un ΔG mínimo de -6 KCal/mol. Se seleccionaron valores mayores a este valor o positivos. Primers con valores más negativos fueron descartados.

Este paso se realizó *in silico* mediante el programa OligoAnalyzer Tool Primer Analysis de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>).

Por ser parte del proyecto “Caracterización de marcadores moleculares en genes relacionados a espermatogénesis y fertilidad espermática a partir de transcriptomas de testículo y epidídimo de alpaca”, se trabajó con testículos de alpacas beneficiadas en el camal municipal de Huancavelica, que luego servirían para medir los niveles de expresión genética de los genes involucrados. Las alpacas machos seleccionados estuvieron en un rango de edad de 1 a 4 años, y que tuvieran ambos testículos, sin patologías visibles y un diámetro testicular mayor a 3 cm. En total, para todo el proyecto, se tomaron 51 muestras, haciendo referencia a un estudio similar realizado en humanos (Steger *et al*, 2003). Las muestras obtenidas fueron lavadas con suero fisiológico al 0.9% (luego de retirarse la túnica vaginal) y luego se colocaron por pares en bolsas con suero, que fueron conservadas a 5°C para poder ser transportadas a Lima (Banda *et al.*, 2010). Una vez en Lima, las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C .

Para la extracción de ADN se utilizó el kit InnuPREP DNA Mini Kit (número de catálogo: 845-KS-1040250), siguiendo las instrucciones del fabricante (Analytik Jena AG, 2017). Se utilizaron las muestras que estuvieron almacenadas bajo criopreservación. La muestra tuvo que pasar por baño maría a 45°C para el descongelamiento, luego se colocó en una placa Petri y se hicieron diversos trozos de 1cm^3 con hoja de bisturí, de un peso máximo de 50mg. Este kit permitió la obtención de ADN mediante la lisis de la membrana nuclear y la realización de dos lavados con el fin de disminuir agentes contaminantes. Finalmente, en la elución se disminuyó a la mitad el volumen obtenido con el fin de concentrar el ADN. Este procesamiento molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular de la Universidad Científica del Sur.

Para la cuantificación y medición de la pureza del ADN extraído, se utilizó un espectrofotómetro “Genova Nano micro-volume spectrophotometer”, el cual mide la absorbancia del compuesto presente, a una longitud de onda determinada. En el caso de la pureza, un ratio de A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2 indica una pureza alta de ADN libre de proteínas contaminantes, mientras que valores menores que 1.8 indicarían la presencia de proteínas. Por otro lado, valores menores a 1.5 en el ratio A_{260}/A_{230} indica la presencia de contaminantes como carbohidratos, fenoles o sales siendo el rango óptimo es de 2.0 a 2.2. Las muestras de ADN que fueron amplificadas fueron aquellas que cumplieron con los criterios óptimos de pureza de ADN.

El ADN extraído se mezcló con el reactivo innuMIX Standard PCR MasterMix (Analytik Jena AG) para preparar la mezcla de PCR convencional. Adicionalmente a esto, se corrieron controles negativos (agua, sin ADN) para corroborar que no ha habido contaminación. La receta que se siguió fue:

- 5 μL de innuMIX Standard PCR Master Mix
- 3.5 μL de H_2O
- 0.5 μL de cada primer (forward y reverse) los cuales tienen una concentración stock de 10 μM (Concentración final: 0.5 μM)
- 1 μL de ADN molde, de ADN's concentrados a 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ y 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$

La reacción fue llevada a cabo utilizando un termociclador Thermal Cycler (TC 9639, Benchmark) aplicando el siguiente perfil térmico:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por dos minutos
- 40 ciclos de 95°C por 40 segundos (desnaturalización), 58°C por 40 segundos (anillamiento), 72°C por 40 segundos (elongación)
- 1 ciclo de elongación final 72°C de 10 minutos

Por último, se evaluó la presencia y tamaño de los productos de PCR utilizando un gel de agarosa al 2%, una cámara horizontal (10cm x 10cm Labnet Enduro™) y buffer de corrida TAE 1X (Clever Scientific®). Se corrió los amplicones durante 40 minutos a 90 voltios y para la visualización de los fragmentos amplificados se utilizó el colorante comercial de ácidos SafeView Classic (abm®) y se utilizó el marcador de peso molecular comercial de 1500pb (Ladder Express de Analytik Jena). Finalmente, se observaron los fragmentos amplificados en un fotodocumentador (Enduro™ GDS).

RESULTADOS

En la base de datos del NCBI se identificó la secuencia del ARNm predicted del gen PRM3 en alpacas (XM_006204352.3) a partir de su Portal Gene (Gene ID:

102543875). De acuerdo con los criterios de selección mencionados en el Cuadro 1, se programó el diseño para 10 pares de primers usando el programa Primer-BLAST del NCBI. Los valores de espontaneidades de horquillas y estructuras secundarias evaluados usando el programa OligoAnalyzer se muestran en el cuadro 2. De todos ellos se escogieron los dos mejores pares de primers, a los cuales se les denominó PRM3-P31-F, PRM3-P31-R, PRM3-P32-F y PRM3-P32-R. El primer PRM3-P31-F está ubicado entre los nucleótidos 9457507 y 9457488; el primer PRM3-P31-R entre 9457180 y 9457199, del cromosoma 18 (GCF_000164845.1). De la misma forma, el primer PRM3-P32-F está entre los 9457395 y 9457376 y el primer PRM3-P32-R está entre los 9457156 y 9457175 (Figura 1, 2, 3).

Por otro lado, en la Figura 4, podemos observar los amplicones obtenidos para el par de primers PRM3-P31. Y en la Figura 5 vemos los amplicones correspondientes al par de primers PRM3-P32. En ambos casos se amplificó un producto comprendido entre los 250 y 350 pares de bases, lo que significa que el tamaño de los amplicones coincide con el tamaño de producto obtenido del programa Primer-BLAST: 240 pares de bases para PRM3-P31 y 328 pares de bases para PRM3-P32. En cuanto a los geles, el orden de los carriles fue el mismo para los dos primers:

- Carril M: Marcador de peso molecular (1500pb)
- Carril 1, 2: Non-template Control (NTC)
- Carril 3: 10 ng de ADN
- Carril 4: 5 ng de ADN
- Carril 5: 2 ng de ADN
- Carril 6: 15 ng de ADN

Cuadro 2. Características de los 10 primers diseñados mediante el programa Primer-BLAST y evaluados en el programa OligoAnalyzer para el gen PRM3 en el genoma de la alpaca.

#	Primer	Secuencia 5' - 3'	Tamaño amplicón (pb)	Long (bases)	GC%	Tm (°C)	ΔG (KCal/mol)	Tm (°C) Hair pin	ΔG (KCal/mol) Homo dímero	ΔG (KCal/mol) Hetero dímero
1	Forward	CTGCGTGAGTCAGGACAAC	240	20	55	63,7	-0,92	36,9	-1.34	-1.6
	Reverse	CTCTTTGAAACAGCGGCAGG		20	55	63,3	1,6	-0,5	-1.57	
2	Forward	GTCCAGAGAGGCAGCCAAAG	120	20	60	64,3	-0,58	37	-1.57	-1.57
	Reverse	AGTTGTCCTGACTCACGCAG		20	55	63,7	-0,68	33,5	-1.34	
3	Forward	TGCGTGAGTCAGGACAAC	192	20	50	63,6	-0,92	36,9	-1.34	-1.34
	Reverse	TCAAGAGTGTGTCTGCTCGG		20	55	63,4	-0,75	39,2	-1.57	
4	Forward	CAAAGCAGGTGATGGGTTCC	86	20	55	63	-0,36	30,4	-1.47	-1.34
	Reverse	GGCCACAAGCTTCTTCATGG		20	55	63,3	-1,28	44	-1.95	

5	Forward	CCAAAGCAGGTGATGGGTTC	278	20	55	63	-0,62	33	-1.47	-1.57
	Reverse	CAAGAGTGTGTCTGCTCGGG		20	60	64,1	-0,75	39,2	-1.6	
6	Forward	CCTTTCTCCCAGTCCAGAG	328	20	60	63,1	-0,08	26	-1.57	-1.57
	Reverse	TCTTCTGGGCCATCGTCAT		20	55	65,2	0,98	4,3	-1.47	
7	Forward	CCGAGCAGACACTCTTGA	70	20	55	63,4	-0,71	32,8	-1.57	-1.57
	Reverse	CTTCTCTTTGAAACAGCGGCA		21	47,6	63,1	-0,41	30,2	-1.57	
8	Forward	CCTGCGTGAGTCAGGACAAC	195	20	60	64,4	-2,95	47,3	-1.34	-1.34
	Reverse	ATCAAGAGTGTGTCTGCTCGG		21	52,4	63,7	-0,75	39,2	-1.47	
9	Forward	CAGTGGCCTTCTCCAG	108	19	63,2	64,1	-0,85	37,3	-1.6	-1.6
	Reverse	TCTTCATGGAGGATTCGTGGC		21	52,4	63,9	-0,15	26,9	-1.47	
10	Forward	GTGGCCTTCTCCAGTC	138	19	63,2	64	-0,85	37,3	-1.6	-1.34
	Reverse	GAAGTTGTCTGACTCACGC		20	55	62,4	-0,68	33,5	-1.34	

*Espontaneidad expresada como energía libre de Gibbs (ΔG°) en Kcal/mol

Cuadro 3. Características de los primers diseñados mediante el programa Primer-BLAST y evaluados en el programa OligoAnalyzer para el gen PRM3 en el genoma de la alpaca. Seleccionados en base a sus características termodinámicas.

#	Primer	Secuencia 5' - 3'	Tamaño amplificación (pb)	Long (bases)	GC%	Tm (°C)	ΔG (KCal/mol)	Tm (°C) Hair pin	ΔG (KCal/mol) Homo dímero	ΔG (KCal/mol) Hetero dímero
P31	Forward	CTGCGTGAGTCAGGACAAC	240	20	55	63,7	-0,92	36,9	-1.34	-1.6
	Reverse	CTCTTTGAAACAGCGGACAG		20	55	63,3	1,6	-0,5	-1.57	
P32	Forward	CCTTTCTCCCAGTCCAGAG	328	20	60	63,1	-0,08	26	-1.57	-1.57
	Reverse	TCTTCTGGGCCATCGTCAT		20	55	65,2	0,98	4,3	-1.47	

*Espontaneidad expresada como energía libre de Gibbs (ΔG°) en Kcal/mol



Figura 1. Vista gráfica de los pares de primers diseñados mediante el programa Primer-BLAST, de los que se seleccionó los pares 1 y 6.

```

Products on target templates
>NW_021964194.1 Vicugna pacos isolate Carlotta (AHFN-0088)
chromosome 18 unlocalized genomic scaffold, VicPac3.1 ScfyRBE_3095;HRSCAF=4310

product length = 328
Forward primer 1          CCTTTCCTCCCAGTCCAGAG  20
Template        9457507  ..... 9457488

Reverse primer 1          TCTTCCTGGGCCATCGTCAT  20
Template        9457180  ..... 9457199
    
```

Figura 2. 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.

```

Products on target templates
>NW_021964194.1 Vicugna pacos isolate Carlotta (AHFN-0088)
chromosome 18 unlocalized genomic scaffold, VicPac3.1 ScfyRBE_3095;HRSCAF=4310

product length = 240
Forward primer 1          CTGCGTGAGTCAGGACAACT  20
Template        9457395  ..... 9457376

Reverse primer 1          CTCTTTGAAACAGCGGCAGG  20
Template        9457156  ..... 9457175
    
```

Figura 3. 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.

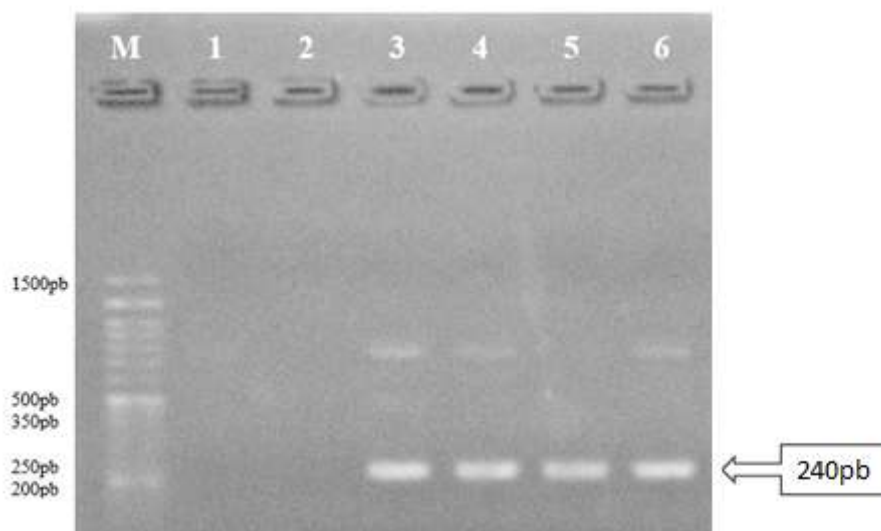


Figura 4. Primer PRM3-P31. Gel de agarosa al 2%. Carril M: Marcador de peso molecular de 1500pb; Carril 1 y 2: NTC. Carril 3: 10 ng/μL de ADN. Carril 4: 5 ng/μL de ADN. Carril 5: 2 ng/μL de ADN. Carril 6: 15 ng/μL de ADN. Tamaño de amplicón: 240 pb.

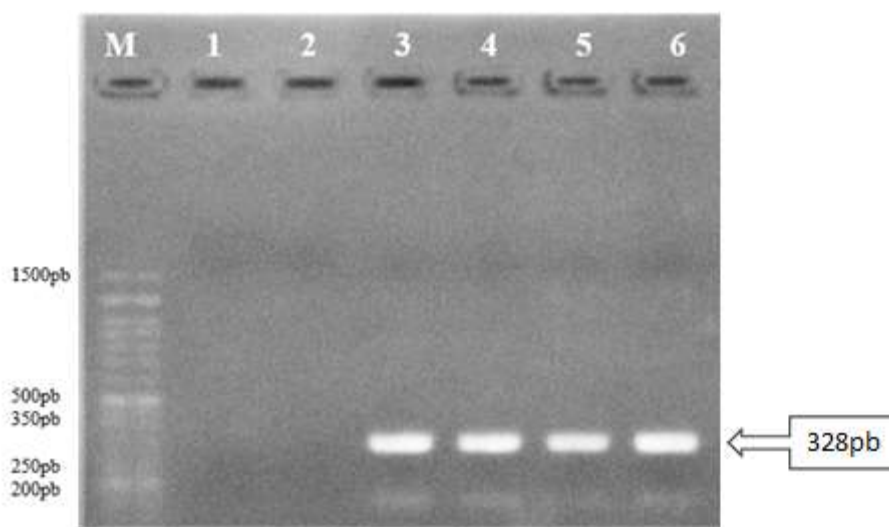


Figura 5. Primer PRM3-P32. Gel de agarosa al 2%. Carril M: Marcador de peso molecular de 1500pb; Carril 1 y 2: NTC. Carril 3: 10 ng/μL de ADN. Carril 4: 5 ng/μL de ADN. Carril 5: 2 ng/μL de ADN. Carril 6: 15 ng/μL de ADN. Tamaño de amplicón: 328 pb.

DISCUSIÓN

El gen PRM3 codifica para la proteína Protamina 3. Si bien hay pocos estudios acerca de esta proteína, hay evidencia de que cumple un rol relacionado con la motilidad espermática. Grzmil *et al.* (2008), realizaron un estudio donde se demostró que dicho

gen se encuentra en varias especies de mamíferos. El gen PRM3 ha sido secuenciado en el dromedario *Camelus dromedarius* (Gene ID: 105089044), que es una especie relacionada con las alpacas. Gracias a esto, partimos de la premisa de que el gen se encuentra en el cromosoma 18 (Elbers *et al.*, 2019). En este estudio, al utilizar el Primer-BLAST, los pares de primers seleccionados se unieron con una secuencia dentro del cromosoma 18. Esto, adicionalmente al hecho de que se diseñaron los primers en base al ARNm predicted del gen PRM3 de alpacas, nos llevan a comprobar que los primers sí amplifican el gen esperado en esta especie. Cabe resaltar, que el primer gel (Figura 4), muestra unas bandas inespecíficas que, si bien desaparecen utilizando 2 ng de ADN en la reacción, podrían indicar que los primers del par P31 se están adhiriendo a otra porción del genoma, aunque con menor intensidad. Esto nos indicaría que este primer par de primers no es específico. Esto no sucede en el segundo gel (Figura 5), por lo que el par P32 sería la mejor opción para futuros estudios. Existen otras investigaciones donde se realizaron alineamientos de secuencias entre especies filogenéticamente relacionadas para buscar zonas conservadas de interés por no contar con suficiente información acerca de la especie a investigar en la base de datos del NCBI (Tataje, 2013). El presente estudio, representaría una mejor opción en cuanto a metodología para obtener primers *in silico*.

Muy pocos estudios describen el proceso de creación de primers, es por ello que en este trabajo se buscó validar el protocolo de diseño de primers *in silico*, con el fin de que este pueda ser utilizado en otras investigaciones como punto de partida. Para el diseño de primers en esta investigación se utilizaron programas bioinformáticos que permitieron que los primers creados respeten los principios propuestos por Rodríguez *et al* (2015), donde se permite predecir *in silico* diferentes características como el tamaño del primer, la temperatura melting (Tm), porcentaje de Guanina-Citosina (GC), estabilidad del extremo 3', tamaño del amplicón, entre otras. Se utilizó principalmente el programa Primer-BLAST, que permite la alineación de las secuencias para su validación. Adicional a ello, se empleó la PCR convencional para la validación de los primers por ser la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener *in vitro* millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula (Tamay de Dios *et al.*, 2013). También, al igual que en un estudio realizado por Flores (2016), se consideraron válidos los primers cuyos amplicones obtenidos a través de la PCR convencional y corridos en gel de agarosa tenían un tamaño igual a los pares de bases esperados en el diseño *in silico*. Este estudio puede, por tanto, ayudar a tener un protocolo completo y fácil para obtener primers confiables y específicos *in silico*, especialmente en especies en las que el gen de interés no ha sido secuenciado.

Es importante mencionar que se utilizó distintas cantidades de ADN target (en ng) para saber con qué cantidad se obtenía un mejor resultado. Se utilizaron cuatro

diferentes cantidades en ng, obteniéndose el resultado esperado con cada una de ellas. Esto ayudó a demostrar que se puede usar menor cantidad de ADN (que en este caso fue de 2ng por reacción) sin que se vea afectado el resultado y obteniendo una banda definida en el gel (Figuras 4 - 5). Finalmente, cabe resaltar que el tiempo que se utilizó para correr el gel en electroforesis fue de 20 minutos, es por ello que se observa una gran separación entre el pocillo y el inicio del Ladder (marcador molecular). Así mismo, se podría utilizar un gel al 3% para mejorar la separación de las bandas del Ladder. Si bien esto no afecta el resultado final, si se puede mejorar dicha parte del protocolo con el fin de obtener una mejor separación de las bandas en el gel.

CONCLUSIONES

En conclusión, gracias a este estudio, se puede decir que es posible diseñar primers *in silico* para identificar el gen PRM3 en alpacas, así como validarlos experimentalmente mediante la técnica de PCR convencional y electroforesis en gel. Los primers diseñados pueden servir como base para realizar más estudios acerca de este gen. Por último, la presente investigación es el primer reporte de diseño y validación de primers para la identificación del gen PRM3 de alpacas.

LITERATURA CITADA

1. Abd-Elsalam, K. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*. 2(5): 91-95.
2. Aoki, V. Liu, L. Carrell, D. (2006). A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Molecular Human Reproduction*. 12: 41–50.
3. Banda, J. Evangelista, S. Ruiz, L. *et al.* (2010). Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Inv Vet Perú*; 21(2).
4. Barazani, Y., Agarwal, A., & Sabanegh, E. S. (2014). Functional sperm testing and the role of proteomics in the evaluation of male infertility. *Urology*, 84(2), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.04.043>
5. Belluscio, A. (2013). Los secretos del código celular. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET.
6. Cervantes, I. Pérez-Cabal, MA. Morante, R. Burgos, A. Salgado, C. Nieto, B. Goyache, F. Gutiérrez, JP. (2010b). Genetic parameters and relationship between fibre and type traits in two breeds of Peruvian alpacas. *Small Ruminant Research* 88, 6-11.
7. Cho, C. Willis, WD. Goulding, EH. Jung-Ha, H. Choi, YC. Hecht, NB. Eddy, EM. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*. 28: 82– 86.
8. Coello, JM. Gomendio, M. Roldan, E. (2010) Protamine 3 shows evidence of weak, Positive selection in mouse species (*Genus mus*) – But is not a protamine. *Biology of Reproduction*. Volume 84: 320-326.
9. Cruz, A. Cervantes, I. Burgos, A. Morante, R. Gutiérrez, JP. (2015). Estimation of genetic parameters for reproductive traits in alpacas. *Animal Reproduction Science* 163, 48-55
10. Cruz, A. Cervantes, I. Burgos, A. Morante, R. Gutiérrez, JP. (2017a). Genetic parameters estimation for preweaning traits and their relationship with reproductive, productive and morphological traits in alpaca. *Animal*, in press.
11. Cruz, A. Morante, R. Cervantes, I. Burgos, A. Gutiérrez, JP. (2017b). Effect of the gestation and lactation on fiber diameter and its variability in Peruvian alpacas. *Livestock Science* 198, 31-36.
12. Du Plessis, SS. Kashou, AH. Benjamin, DJ. Yadav, SP. Agarwal, A. (2011). Proteomics: A subcellular look at spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-36>
13. Elbers, JP. Rogers, MF. Perelman, PL. Proskuryakova, A. Serdyukova, N.

- Johnson, W. Horin, P. Corander, J. Murphy, D. Burger, P. (2019) Improving Illumina assemblies with Hi-C and long reads: An example with the North African dromedary. *Mol Ecol Resour* 19(4). 1015-1026.
14. Fernández-Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
 15. Flórez, F. (2016). Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato [Tesis de Maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/127>
 16. García W. (2009) manual de empadre controlado de alpaca. Perú: Soluciones Prácticas – ITDG. 1.
 17. Grzmił, P. Boinska, D. Kleene, K. Adham, I. Schluter, G. Kamper, M. Buyandelger, B. Meinhardt, A. Wolf, S. Engel, W. (2008). Prm3, the fourth gene in the mouse protamina gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects sperm motility. *Biol Reprod*.
 18. Gutiérrez, JP. Cervantes, I. Pérez-Cabal, MA. Burgos, A. Morante, R. (2014). Weighting fibre and morphological traits in a genetic index for an alpaca breeding program. *Animal* 8, 360-369
 19. Gutiérrez, JP. Varona, L. Pun, A. Morante, R. Burgos, A. Cervantes, I. Pérez-Cabal, MA. (2011). Genetic parameters for growth of fiber diameter in alpacas. *Journal of Animal Science* 89, 2310-2315.
 20. Gutiérrez, JP. Goyache, F. Burgos, A. Cervantes, I. (2009). Genetic analysis of six production traits in Peruvian alpacas. *Livestock Science* 123, 193-197
 21. Hamilton. Simoes, R. Mendes, M. Goissis, MD. Nakajima, E. Martins, E. AL. And, JAV. Assumpção, MEOA. (2019). Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*, 7, 373–381. <https://doi.org/10.1111/andr.12610>
 22. Harayama, H., Minami, K., Kishida, | Kazumi, & Noda, | Taichi. (2017). Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 89–98. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12021>
 23. Hood, L., Heath, J.R., Phelps, M.E. y Lin, B. (2004). Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine. *Science*, 306: 640–643.

24. Jodar, M. Oliva, R. (2014). Protamine Alterations in Human Spermatozoa. In E.Baldi and M. Muratori (Ed.), *Genetics Damage in HUMAN Spermatozoa, Advance in Experimental Medicine and Biology* (pp. 83–102). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9>.
25. Jodar, M. Soler-Ventura, A. Oliva, R. (2017). Semen proteomics and male infertility. *Journal of Proteomics*, 162, 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018>
26. Kashou, AH. Sharma, R. Agarwal, A. (2013). Assessment of Oxidative Stress in Sperm and Semen. In *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 757, pp. 171–203). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4-7>
27. Kumar, S. Singh, U. Ganguly, I. *et al.* (2014) Protamine 3 expressions in crossbred bull spermatozoa may not be a prognostic marker for differentiating good and poor-quality semen. *African Journal of Biotechnology*.
28. Ministerio de Agricultura y Riego - MINAGRI. (2017). “Perú es el mayor productor de fibra de alpaca en el mundo. Minagri. Recuperado de: <http://minagri.gob.pe/portal/noticias-antteriores/notas-2017/19720-peru-es-el-mayor-productor-de-fibra-de-alpaca-en-el-mundo>
29. Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4), 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
30. Paredes, MM. Membrillo, A. Gutiérrez, JP. Cervantes, I. Azor, PJ. Morante, R. Alonso-Moraga, A. Molina, A. Muñoz-Serrano, A. (2014). Association of microsatellite markers with fiber diameter trait in Peruvian alpacas (Vicugna pacos). *Livestock Science* 161, 6-16.
31. Pérez-Cabal, MA. Cervantes, I. Morante, R. Burgos, A. Goyache, F. Gutiérrez, JP. (2010). Analysis of the existence of major genes affecting alpaca fiber traits. *Journal of Animal Science* 88, 3783-3788.
32. Rodríguez, A. Rodríguez, M. Córdoba, J. Andrade, M. (2015). Design of primers and probe for quantitative real-time PCR methods. *Springer Science Business Media*. 1275: 31-57. DOI: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3
33. San Martin, M. Copaira, M. Zuniga, J. Rodriguez, R. Bustinza G. Acosta, L. (1968). Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fertil*. 16:395-9.
34. Steger, K. Fink, L. Failing, K. *et al.* (2003) Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Molecular Human Reproduction*; 9: 331–336.
35. Sumar, J. Adams, G. (1997) Reproductive anatomy and physiology of the female llama. In: Youngquist RS, editor. *Current therapy in large animal theriogenology*. WB Saunders; p. 792–798.

36. Tamay de Dios, L. Ibarra, C. Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2:70-78.
37. Tataje, L. (2013). Expresión testicular de ciclina A1 (CCNA1) en alpacas (Lama pacos) [Tesis Posgrado-Universidad Mayor de San Marcos, Perú].
38. Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Shirley, C. R., Meistrich, M. L., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Human Reproduction*, 21(8), 2084–2089. <https://doi.org/10.1093/humrep/del114>