



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

Desarrollo de una Vacuna de ADN Para la Castración Inmunológica en Caninos

Tesis

Que para optar por el grado de Maestra en Ciencias presenta

Gloria Irene Guevara Ledón

**Tutor Principal: Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Comité tutorial: Rogelio Alejandro Alonso Morales,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Gabriel Gutiérrez Ospina, Instituto de Investigaciones
Biomédicas**

México D.F. abril, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A mi madre Ana Irene. Cada paso dedicado a ti.

A mi hermana Ana Elena. Mi ejemplo a seguir.

A mi abuela. Continúas siendo mi inspiración.

A Aramis y Hecatombe, siempre compañeros pacientes en esta etapa.

Agradecimientos

Al financiamiento obtenido del proyecto PAPIIT, clave IN220012

Biol. Amanda Gayosso Vázquez, técnico académico del Laboratorio de Biología Molecular, departamento de Genética y Estadística, FMVZ – UNAM, quien me capacitó en las técnicas de biología molecular.

Dr. Bruno Rivas Santiago, investigador adscrito a la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas - IMSS , quien amablemente proporcionó el electroporador para llevar a cabo la transfección in situ de ADN en este proyecto.

MVZ Hilda Jandete Díaz, Directora Técnica de la Producción Cunicola en CEIEPAv – FMVZ – UNAM, por su excelente disposición para ocupar una porción de las instalaciones para alojar a los animales de estudio del presente proyecto.

MC, MVZ Clara Murcia Mejía, Técnica Académica, quien me capacitó en la técnica de radioinmunoensayo para el presente proyecto.

Resumen

La sobrepoblación canina es un problema patente en el país, tanto en regiones urbanas como rurales. La primera alternativa para su control en países en desarrollo es la captura y sacrificio y la segunda la esterilización, siendo la primera cada vez menos aceptada por la sociedad. Ambas alternativas implican un alto costo y bajo impacto debido a las altas tasas de fertilidad y prolificidad características de los caninos. En las últimas dos décadas se ha promovido el desarrollo de métodos inmunológicos para controlar la actividad reproductiva de poblaciones animales de vida libre, idealmente logrando la esterilización a través de la estimulación de una respuesta inmune contra alguna molécula fundamental dentro del eje hipotálamo – hipófisis - gónada. El presente trabajo describe el desarrollo de vacunas génicas dirigidas contra la primera región extracelular del receptor de GnRH canino, flanqueado en tres configuraciones diferentes por los epítomos del toxoide tetánico p2 y p30. Se generaron cuatro construcciones de ADN recombinante clonadas en un vector de expresión en células de mamífero. Cada una se inoculó a un grupo de conejos machos de 12 semanas de edad de la raza Blanco de Nueva Zelanda. Se obtuvieron semanalmente medidas morfométricas y suero por un periodo de 10 semanas. El peso, los ejes longitudinal y transversal testiculares in vivo y concentración sérica de testosterona no difirieron entre grupos al final del ensayo ($P>0.05$). A nivel histológico no hubo diferencia en la proporción de túbulos seminíferos desarrollados (con lumen) o con presencia de espermatozoides ($P>0.05$). Este hallazgo, junto con el fracaso en la búsqueda de anticuerpos anti GnRHR-exr confirma que las vacunas generadas no lograron estimular una respuesta inmune suficiente para inhibir la función reproductiva.

Palabras clave: Sobrepoblación canina, anticoncepción, vacunas ADN recombinante, control de poblaciones animales, inmunocontracepción,

Abstract

Dog overpopulation in Mexico is a public health problem in both, cities and the country. The first alternative to control this population in developing countries is the capture and humanitarian sacrifice and surgical neutering, being the first resource rejected by general population. Both alternatives are expensive and give low impact results due to the high fertility and prolificity rate of the canine species. During the last two decades, immunological methods have been promoted in aim to control the reproductive activity in free ranging populations, with the goal to achieve sterility throughout the stimulation of an immune response targeted to an essential molecule within the hypothalamus – hipophysis – gonadal axis. The present work describes the construction of genetic vaccines targeting the first extracellular region of the canine gonadotrophin releasing hormone (GnRH) receptor flanked, in three different configurations, by the tetanus toxoid epitopes p2 and p30. The four recombinant DNA constructions were cloned into a mammalian expression vector. Each one was inoculated into 12 weeks old male New Zealand white rabbits. Morphometric and serum samples were obtained weekly throughout a 10 weeks period. Weight, in vivo testicular length and width and testosterone serum concentration, did not differ within groups at the end of experiment ($P > 0.05$). Histologically

there were any difference in the proportion of seminiferous tubes development (presence of lumen inside) or spermatozoa presence into the seminiferous tubules $P (> 0.05)$. These findings and the failure in the search of antibodies anti GnRH receptor confirms that the vaccines generated could not stimulate a proper immune response to inhibit the reproductive function.

Key words: Dog overpopulation, immunocontraception, contraception, recombinant DNA vaccines, animal population control.

Tabla de contenido

CUADROS	IX
CUADROS COMPLEMENTARIOS	X
ILUSTRACIONES	X
ILUSTRACIONES COMPLEMENTARIAS	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	2
1.1.1 <i>La sobrepoblación animal: un problema de salud mundial.....</i>	2
1.1.2 <i>La sobrepoblación canina en México.....</i>	2
1.2 <i>Control endócrino de la reproducción: Eje hipotálamo-hipófisis-gónada.....</i>	3
1.2.1 <i>El Receptor de GnRH (GnRHR).....</i>	5
1.2.2 <i>Control endócrino de la espermatogénesis.....</i>	6
1.3 <i>Las vacunas como una herramienta para controlar la actividad reproductiva.....</i>	7
1.4 <i>Vacunas comerciales para regular la reproducción.....</i>	8
1.5 <i>Vacunas de ADN.....</i>	9
1.5.1 <i>Vacunas de ADN como alternativa para generar inmunidad contra antígenos propios.....</i>	9
1.6 <i>Epítomos del toxoide tetánico como inmunoestimulantes.....</i>	10
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
2.1 CONSTRUCCIÓN DE VACUNAS DE ADN CONTRA EL PRIMER DOMINIO EXTRACELULAR DEL RECEPTOR CANINO DE GnRH (GnRHR- EXR) CON LOS EPÍTOPOS p2 Y p30 DEL TOXOIDE TETÁNICO EN DISTINTAS CONFIGURACIONES.	12
2.1.1 <i>Diseño de iniciadores para amplificar el fragmento GnRHR-exr y de las construcciones quiméricas con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico.....</i>	12
2.1.2 <i>Extracción de ADN genómico.....</i>	13
2.1.3 <i>Amplificación del fragmento de la primera región extracelular de GnRHR por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....</i>	14
2.1.4 <i>Ligación de GnRHR-exr en un Vector de Clonación T.....</i>	15
2.1.5 <i>Secuenciación del Plásmido pGEM-T/GnRHRexr.....</i>	16
2.1.6 <i>Amplificación de Clonas con los epítomos p2 y p30 en 3 configuraciones diferentes mediante PCR punto final.....</i>	17
2.1.7 <i>Clonación de cada construcción en un vector de clonación T.....</i>	17
2.1.8 <i>Movilización de Clonas al Vector de Expresión en Mamíferos.....</i>	17
2.1.9 <i>Evaluación de orientación dentro del marco de lectura del vector.....</i>	19
2.1.10 <i>Extracción de ADN plasmídico libre de endotoxinas.....</i>	20
2.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA A LA VACUNACIÓN.....	20
2.2.1 <i>Animales de estudio.....</i>	20
2.2.2 <i>Inmunizaciones.....</i>	21
2.2.3 <i>Muestreo y medición de variables morfométricas.....</i>	21
2.2.4 <i>Evaluación de testosterona sérica total.....</i>	22
2.2.5 <i>Recolección y evaluación histológica de tejidos al final del estudio.....</i>	22
2.2. 6 <i>Análisis estadístico.....</i>	22
2.3 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GnRHR-EXR.....	23
2.3.1 <i>Producción del antígeno para evaluar la producción de anticuerpos.....</i>	23
2.3.2 <i>Movilización del fragmento p2-GnRHRexr-p30His al vector pET11a.....</i>	24

2.3.3 Inducción de proteínas: Expansión del cultivo bacteriano e inducción de proteínas recombinantes	25
2.3.4 Electroforesis de proteínas	25
2.3.5 Western blot para la detección de proteínas recombinantes.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1 CONSTRUCCIÓN DE VACUNAS DE ADN CONTRA EL PRIMER DOMINIO EXTRACELULAR DEL RECEPTOR CANINO DE GnRH (GnRHR- EXR) CON LOS EPÍTOPOS P2 Y P30 DEL TOXOIDE TETÁNICO EN DISTINTAS CONFIGURACIONES	27
3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON VACUNAS GENÓMICAS SOBRE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE CONEJOS 27	
3.3 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE TESTÍCULOS	28
3.5 EVALUACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-GnRHR	30
4. DISCUSIÓN.....	34
ANEXO 1	37
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE VACUNAS DE ADN CONTRA EL PRIMER DOMINIO EXTRACELULAR DEL RECEPTOR DE GnRH CANINO FLANQUEADO POR EPÍTOPOS DEL TOXOIDE TETÁNICO.....	37
<i>Secuenciación del plásmido GnRHR-exr/pGEM – T</i>	<i>37</i>
<i>Secuenciación de ADN plasmídico en el vector de expresión en mamíferos pCI neo.....</i>	<i>38</i>
ANEXO 2	41
DETALLES DEL TRABAJO DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA VACUNA GÉNICA CONTRA EL RECEPTOR DE GnRH CANINO FLANQUEADO POR EPÍTOPOS DEL TOXOIDE TETÁNICO	41
<i>Amplificación del fragmento GnRHR-exr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final.....</i>	<i>41</i>
<i>Amplificación de clonas con los epítomos p2 y p30 en 3 configuraciones diferentes mediante PCR Punto Final</i>	<i>43</i>
<i>Clonación de cada construcción en un vector de clonación T.....</i>	<i>44</i>
<i>Movilización de Clonas al Vector de Expresión en Mamíferos.....</i>	<i>46</i>
<i>Evaluación de clonas recombinantes en el vector de expresión en mamíferos pCI neo</i>	<i>48</i>
ANEXO 3	56
DETALLES DEL TRABAJO DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA CLONACIÓN DE LA SECUENCIA P2 – GnRHREXR–P30 – HIS EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN BACTERIANA PÉT 11, EXPRESIÓN PROTEICA Y CONFRONTACIÓN DE SUEROS CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE	56
<i>Inducción de proteínas</i>	<i>59</i>
<i>Análisis electroforético de inducción de proteínas</i>	<i>60</i>
ANEXO 4 CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA POR GRUPO E INDIVIDUO.....	61
LA GRÁFICA COMPLEMENTARIA 2 REPORTA LA CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA SÉRICA POR INDIVIDUO Y GRUPO A LO LARGO DEL ENSAYO.	61
.....	61
ANEXO 5 EVALUACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS	62
5. BIBLIOGRAFÍA	63

Cuadros

Cuadro 1-1 Secuencias reportadas para los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico.....	11
Cuadro 2-1. Secuencia de bases y aminoácidos correspondientes al primer dominio extracelular de GnRHR canino, seleccionado para construir las vacunas génicas.....	12
Cuadro 2-2 Secuencia de bases para los iniciadores que clonan el primer dominio extracelular del GnRHR canino	12
Cuadro 2-3 Secuencia de los iniciadores delantero y reverso para la síntesis del polipéptido p2-GnRHRexr-p30	13
Cuadro 2-4 Reactivos utilizados para PCR Punto Final.....	14
Cuadro 2-5 Protocolo de Ligación en Vector de Clonación	15
Cuadro 2-6 Protocolo de Transformación de bacterias E. coli DH5 α	16
Cuadro 2-7 Condiciones para la Reacción de Secuenciación	16
Cuadro 2-8 Condiciones de Temperatura para Reacciones de Secuenciación de Ácidos Nucléicos a Partir de ADN Plasmídico	17
Cuadro 2-9 Protocolo de Restricción de ADN Plasmídico	18
Cuadro 2-10 Protocolo de Ligación en el Vector pCI neo.....	18
Cuadro 2-11 Secuencia de Iniciadores para Amplificar el sitio Múltiple de Clonación del Vector pCI - neo	19
Cuadro 2-12 Juego de Iniciadores Utilizados para Verificar la Orientación de Lectura de las Construcciones Clonadas en el Vector de Expresión en Mamíferos pCI - neo.....	20
Cuadro 2-13 Denominación de Grupos y Vacunas Inoculadas.....	21
Cuadro 2-14 Iniciadores para Amplificar el Fragmento p2 - GnRHRexr - p30 con Secuencia de Histidinas	23
Cuadro 2-15Condiciones de Temperatura para la Amplificación del Fragmento p2 - GnRHRexr - p30 - His a partir de la Clona p2 - GnRHR - exr - p30 Clonada en el Vector pCI neo	24
Cuadro 2-16 Secuencia de iniciadores para evaluar clonas recombinantes en el vector PTZ 57 R/T	24
Cuadro 2-17 Condiciones de temperatura para la amplificación del fragmento	24
Cuadro 2-18 Secuencia de residuos para la quimera p2 – GnRHR-exr – p30 - His	25
Cuadro 2-19 Diluciones de los sueros de los conejos inmunizados para confrontar anticuerpos ...	26
Cuadro 3-1 Cuantificación de la producción de ADN libre de endotoxinas en el vector de expresión en mamíferos pCI-neo.....	27

Cuadros Complementarios

Cuadro complementario 1 Secuencia de Iniciadores para Clonar en GnRHR – exr y los Epítomos Fusionados al Mismo.....	37
Cuadro complementario 2 Condiciones de Temperatura Para Amplificar el Fragmento GnRHR-exr	41
Cuadro complementario 3 Condiciones de temperatura para la amplificación de fragmentos de cada construcción con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico.....	43
Cuadro complementario 4 Determinación de la Concentración y Pureza de ADN Plasmídico. Clona p2-GnRHR-exr-p30 His en el vector PTZ 57 R/T.....	57
Cuadro complementario 5 Protocolo de doble digestión para obtener el fragmento P2-GnRHR-exr-P30His clonado en el vector PTZ 57 R/T.....	58
Cuadro complementario 6 Protocolo de Ligación en el vector pET 11a.....	59
Cuadro complementario 7 Preparación de geles de acrilamida al 15 %	60

Ilustraciones

Ilustración 2-1 Representación esquemática de las construcciones quiméricas con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico flanqueando el primer dominio extracelular del GnRHR canino.	13
Ilustración 3-1 Western blot. Confrontación de sueros del grupo p2-GnRHR-exr con el cultivo bacteriano de inducción de la proteína p2 - GnRHR - exr - p30 - His. Arriba de cada carril se muestra el elemento confrontado y la dilución realizada. MPM Fermentas Protein Ladder #SM 1811. Anticuerpo Anti-His, dilución 1:300.	31

Ilustraciones complementarias

Ilustración complementaria 1. Electroferograma generado por la lectura del plásmido pGEM-T/GnRHR-exr. Las ondas uniformes muestran la correspondencia de cada base según el color de éstas.	38
Ilustración complementaria 2. Comparación de la secuencia obtenida por la reacción de secuenciación del plásmido pGEM-T/GnRHR-exr con la secuencia reportada previamente en el banco de información genética GenBank mostrando 100 % de homología	38
Ilustración complementaria 3. Comparación de secuencias dentro del marco abierto de lectura para la construcción GnRHR-exr – pCI neo. De arriba hacia abajo: Primera secuencia: clona virtual GnRHR-exr/pCI neo en dirección 3' - 5'; segunda y tercera secuencias: electroferogramas para dos clonas de GnRHR-exr/pCI neo; cuarta secuencia: Secuencia virtual de GnRHR-exr. Las dos clonas secuenciadas muestran homología entre sí y con las secuencias virtuales.	39
Ilustración complementaria 4. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción p2-GnRHR-exr. Alineamiento de la secuencia obtenida en electroferograma con la secuencia virtual esperada. Se observa	

coincidencia entre secuencias a partir de la base 89 de la lectura obtenida hasta la base 247 de la misma.....	39
Ilustración complementaria 5. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción GnRH _{exr} -p30. Alineamiento de la secuencia obtenida en electroferograma con la secuencia virtual esperada. Fila superior: Clona virtual. Fila inferior: lectura de ADN plasmídico. Se observa coincidencia entre secuencias a partir de la base 140 de la lectura obtenida hasta la base 311 de la misma.	40
Ilustración complementaria 6. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción p2-GnRH _{exr} -p30. Secuencia en la fila superior: Lectura de ADN plasmídico. Fila inferior: Secuencia virtual esperada. Se observa coincidencia entre secuencias a partir de la base 89 de la lectura obtenida hasta la base 310 de la misma.....	40
Ilustración complementaria 7. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1%: extracción de ADN genómico. Carriles 1 y 5: Marcador de peso molecular λ BSte II Hind digest. Carriles 2, a 4: ADN de alto peso molecular.....	41
Ilustración complementaria 8 . Análisis electroforético en gel de agarosa al 3.5 %. Amplificación del fragmento GnRHR - exr.....	42
Ilustración complementaria 9. Análisis electroforético de productos de PCR en gel de agarosa al 3%: amplicones correspondientes al fragmento GnRHR-exr. Carriles 1 y 7: MPM PBR 322 Mspl. Carriles 1, 3 y 4 amplicones en el peso esperado; carriles 2 y 5 reacciones sin amplicones; carril 6: control negativo de la mezcla de reacción.....	42
Ilustración complementaria 10.....	62

1. Introducción

El desarrollo de vacunas como método anticonceptivo se ha planteado como una alternativa para el control temporal de la reproducción en poblaciones animales silvestres^{1,2,3} y domésticas^{4,5}, y se postula como una opción viable para utilizarse en el humano^{6,7}. Entre las moléculas blanco evaluadas con esta finalidad se encuentran la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)^{5,8,9}, la proteína tres de la zona pelúcida (ZP3)^{1-5,10,11} la proteína morfogénica de hueso 15 (BMP 15)⁴⁻⁶, la gonadotropina coriónica humana³, proteínas de la familia de los canales de cationes espermáticos⁷, el antígeno asociado a espermatozoides humanos⁹, etc.

Las vacunas anticonceptivas han evolucionado en su diseño³. Inicialmente comenzaron como extractos completos o purificados de proteínas como ZP3 porcina inoculados en diversas especies^{1,4}. Posteriormente se desarrollaron las vacunas recombinantes con determinantes antigénicos diversos^{2-4, 6-12}. Se han propuesto también microorganismos virales y bacterianos, e incluso “fantasmas bacterianos” recombinantes como vehículos para la inmunización de poblaciones de animales libres^{1, 3, 4, 9, 13}. También se ha planteado el uso de plantas recombinantes que expresen los antígenos deseados⁴ para la inmunización de animales herbívoros.

A pesar de los avances obtenidos, las vacunas anticonceptivas actualmente desarrolladas presentan múltiples efectos colaterales indeseables. Entre ellos figuran la síntesis de anticuerpos sin efecto biológico, la generación de anticuerpos con efecto estimulante en lugar de inhibitorio, síntesis de anticuerpos neutralizantes contra los vectores que contienen la proteína de interés⁵¹, desarrollo de reacciones inflamatorias indeseables como orquitis u oforitis¹⁴. El uso de sistemas de expresión de antígenos por fagos (phage display)^{2, 13} o la inoculación de ADN en el individuo para que el propio individuo exprese los epítomos específicos, unidos a fragmentos inmunogénicos (epítomos), permite disminuir las reacciones adversas^{15, 51}.

El fundamento para generar una respuesta inmune con los métodos mencionados reside en la inoculación de una proteína endógena imprescindible para el eje hipotálamo-hipófisis-gónada^{8, 9, 16}, para la fecundación^{1, 7, 10-12, 14} o para el desarrollo embrionario⁴, modificada antigénicamente para superar la tolerancia inmunológica del individuo hacia sus propias proteínas. Las especies en las que se han desarrollado y probado con éxito estas vacunas incluyen a primates no humanos, la zarigüeya de cola esponjada, caballos, venados, ratones, conejos⁴, elefantes¹, focas, perros, hámsteres, ratas, zorros rojos, gatos^{4, 10}, etc. Logrando esterilidad por periodos entre 8 y 18 meses.^{1, 4}

Las vacunas de ADN proponen un mecanismo innovador para estimular la respuesta inmune contra antígenos propios^{6, 51}. En este trabajo, se diseñó de una vacuna de ADN, dirigida contra el primer dominio extracelular del receptor de GnRH canino y que genere una respuesta inmune contra los gonadotropos dirigida en principio para el control reproductivo en perros, aunque con el potencial de ser utilizada en otras especies mamíferas.

Antecedentes

1.1.1 La sobrepoblación animal: un problema de salud mundial

La sobrepoblación animal es un problema ambiental, económico, social y de salud pública reconocido por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) asociado comúnmente con el pobre desarrollo económico de los países ^{1, 17, 18, 19, 23}. La causa del desbalance de una población animal es multifactorial y cada caso debe de estudiarse individualmente. Sin embargo, el crecimiento descontrolado de la población canina feral representa un problema de salud pública, ya que funge como un reservorio importante para el virus de la rabia, aunado a la asociación de traumatismo por mordida como el problema principal generado por perros de vida libre ^{8, 18, 23}.

A nivel internacional existen organizaciones no gubernamentales enfocadas al control de poblaciones. El método más utilizado para control reproductivo es la intervención quirúrgica. Sin embargo, estas organizaciones y la comunidad científica han buscado el desarrollo de sistemas de control de poblaciones más eficientes ^{10,11, 13, 14, 16 - 20}.

1.1.2 La sobrepoblación canina en México

La Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal define la sobrepoblación animal como la existencia desproporcional, y en exceso, de especies domésticas que causan desequilibrio zoológico y ambiental ²¹. Los registros que la reconocen como un problema de salud pública datan del año 1709 en la Nueva España, época en la que se reportó la primera epizootia de rabia en el centro del país y poblados vecinos como Puebla. Para enfrentarla, en 1841 se establecieron legalmente los primeros intentos de controlar la población canina en México, que consistían en el exterminio de los animales por “decencia pública”²².

La sobrepoblación canina per sé refleja un problema que requiere atención gubernamental y de la comunidad científica del país^{23, 25}. Las mermas generadas en cada medio son diferentes. En el ámbito rural, la transmisión de la rabia al humano o a animales de granja a través de la mordedura de los caninos es la principal preocupación, mientras que en las comunidades urbanas la vacunación antirrábica ha demostrado efectos favorables, dejando a los traumatismos por mordedura^{24, 25} y la parasitosis como los riesgos más importantes. Dentro de una misma ciudad, la distribución de la población canina libre varía considerablemente. Entonces el riesgo al que la población humana está expuesta para contraer rabia, adquirir parasitosis o ser agredida por un perro de vida libre, aumenta en áreas de mayor densidad de población, siendo los infantes el grupo más vulnerable a la agresión de caninos²⁴.

Actualmente, la estabilización de la población canina es un tema prioritario dentro de la agenda de control de zoonosis en México ²⁵. La secretaría de Salud reconoce que la “eliminación humanitaria” de perros capturados es el recurso principal para el control de la población canina feral del país ²⁵. El sacrificio humanitario se realiza de forma constante en 22 estados del país, mientras que en 8 (Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas, Jalisco, Sinaloa, Tabasco y Tamaulipas) se realiza de forma esporádica y en Zacatecas no se realiza. También representa un método oneroso debido a la infraestructura necesaria para la captura, resguardo, sacrificio y disposición post-mortem de los animales. Es importante además recordar que la población se restablece rápidamente gracias a la prolificidad de la especie. Sin embargo, la “eliminación humanitaria” ha demostrado ser insuficiente²⁶, ya que a pesar del gran número de animales sacrificados, la población canina no se estabiliza y cada año el censo de animales eliminados es mayor, así como el creciente número de perros vacunados contra rabia²⁵. En el año de 1989 el promedio anual de perros sacrificados fue de 100 000 animales ²² y para el año 2000 se reportó el sacrificio de 260 072 perros (Secretaría de Salud, México, 2001).

El sacrificio humanitario de perros como estrategia para el control de la población canina es un método poco eficiente y en general rechazado por la sociedad ^{18, 20, 25, 26}. Considerando este panorama, organizaciones no gubernamentales, como las protectoras de animales, trabajan en conjunto con las autoridades sanitarias para impulsar la esterilización quirúrgica como un método de control reproductivo mediano plazo. A partir de 1994 se ha llevado un registro de esta actividad, que ha tenido resultados incipientes pero prometedores, ya que el número de animales esterilizados es mayor año con año²⁵. En este aspecto se registran como instituciones involucradas en esta actividad, la Secretaría de Salud, organizaciones protectoras de animales y la Escuelas y Facultades de Medicina Veterinaria del país ^{22, 25}.

1.2 Control endócrino de la reproducción: Eje hipotálamo-hipófisis-gónada

Desde la década de 1930 comenzaron los esfuerzos por describir la estructura química de las hormonas, su órgano blanco y los efectos producidos. En estos años se avanzó también en el conocimiento de la relación entre los sistemas nervioso y endócrino con la descripción de las neurohormonas y su acción sobre glándulas endócrinas²⁷. A grandes rasgos, se entiende la actividad reproductiva de los mamíferos a través de la descripción del eje hipotálamo – hipófisis – gónada, cuyos componentes se comunican entre sí a través de hormonas de diversa naturaleza química²⁷.

El hipotálamo es una estructura cerebral especializada que rodea el tercer ventrículo; es responsable del inicio de la cascada de señalización para la gametogénesis a través de la secreción de kisspeptina (Terasaka T et al., 2013), una neurohormona que a través de la unión a su receptor GPR54 en las neuronas productoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)²⁸, estimula la expresión y secreción de esta última. Las células blanco del GnRH en la hipófisis anterior son los gonadotropos, en cuya membrana citoplásmica se localiza el receptor de GnRH

(GnRHR). Cuando el GnRH se une a su receptor, se produce en éste último un cambio conformacional para desencadenar la señalización intracelular a través de un sistema de segundos mensajeros que deriva en el estímulo para la expresión y secreción de dos glicoproteínas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH)^{27, 29}. Ambas gonadotropinas tienen su acción principal sobre las gónadas, estimulando la síntesis de hormonas esteroideas que a su vez estimulan la gametogénesis en el ovario o en el testículo²⁷.

La liberación de gonadotropinas está supeditada a la influencia de varias moléculas sobre los gonadotropos y el hipotálamo. Tal es el caso de hormonas esteroideas gonadales (andrógenos, progesterona, estradiol), que ejercen retroalimentación negativa o positiva sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, la inhibina (secretada por células de Sertoli, granulosa, placenta y cerebro), que particularmente disminuye la secreción de FSH en los gonadotropos, y la kisspeptina, que tiene un poderoso efecto estimulante para la síntesis de GnRH²⁸. La influencia de las hormonas mencionadas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y los sistemas de retroalimentación entre ellas, mantienen en equilibrio constante la función reproductiva

En el macho, la regulación del eje sucede a través de la unión de testosterona secretada por las células de Leydig a los receptores hipotalámicos e hipofisarios para ésta hormona, ampliando así el intervalo entre los pulsos de secreción de LH. En cambio, el estradiol sintetizado en el hipotálamo por la aromatización de una proporción de la testosterona que llega a esta región, se une a sus receptores hipotalámicos e hipofisarios, causando pulsos más frecuentes de secreción de LH.²⁷ Además la gametogénesis es estimulada directamente por testosterona, que actúa de forma parácrina²⁷ sobre células de Sertoli en el epitelio del túbulo seminífero.

En las hembras, la regulación es dependiente de estradiol. Al inicio de la fase folicular del ciclo reproductivo, esta hormona genera una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, reduciendo la secreción de gonadotropinas, mientras que al final del ciclo, aumenta su secreción para llevar a cabo la maduración folicular y la ovulación.²⁷

Conforme se describieron las moléculas participantes en el proceso reproductivo, se les asignó un nombre alusivo a su función obvia. Sin embargo, el nombre de cada molécula definitivamente no sentencia su función. Como es de esperarse, varias de las moléculas con efecto principal sobre el eje hipotálamo – hipófisis – gónada, también han sido encontradas en otros tejidos, y en su mayoría se desconoce aún su función “extra reproductiva”. Tal es el caso de los receptores para GnRH y LH. El ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de éstos receptores se ha encontrado en la vejiga urinaria³⁰, gónadas, uretra^{30, 30} y glándula mamaria de perras y otras especies. Además de los receptores, se ha encontrado evidencia que sugiere la expresión de GnRH fuera del hipotálamo, por ejemplo en la glándula salival submaxilar de ratas, en donde también se expresa su receptor.³¹ A pesar de localizarse en tejidos independientes a los reproductivos, se postula que los cambios fisiológicos o los inducidos por esterilización también afectan la expresión de estas moléculas.³⁰

1.2.1 El Receptor de GnRH (GnRHR)

Esta molécula fue clonada en 1992 por Tutsui et al. a partir de una línea tumoral de gonadotropos murinos. En el perro, el gen para este receptor está localizado en el cromosoma 13 y consta de tres exones y dos intrones (número de acceso del NCBI: 403718³²). El ARNm del receptor canino (número de acceso del NCBI: NM_00103121.1³³) consta de 984 pares de bases (bp por su nombre en inglés) y da origen a una proteína de 327 aminoácidos (número de acceso del NCBI: NP_001003121³⁴) que sufre diversos cambios post-traduccionales, como glicosilaciones en el primer, segundo y tercer dominio extracelular, así como cambios conformacionales debidos al establecimiento de dos puentes disulfuro formados por los residuos de cisteína entre el primer y tercer dominios extracelulares y otro entre el segundo y tercer dominio extracelular²⁹.

El GnRHR de los mamíferos es una molécula con estructura y secuencia altamente conservada entre especies, perteneciente a la familia de receptores transmembranales asociados a proteína G, con una longitud de 327 o 328 aminoácidos. Consta de 4 dominios extracelulares, 7 transmembranales y 4 intracelulares^{35,36}. A diferencia de su homólogo en otras clases animales, como aves, reptiles y peces, carece de una región carboxi terminal intracelular, localizándose ésta en el séptimo dominio transmembranal. A esta característica se le atribuye una lenta internalización y desensibilización en comparación con otros receptores transmembranales de la familia de la rodopsina.³⁷ Se ha propuesto que la pérdida del extremo amino terminal del receptor disminuye la afinidad de unión con GnRH. Una vez internalizado el receptor, puede ser degradado por lisosomas o bien ser reciclado a la membrana celular³⁶.

Con fines reproductivos, el GnRHR se expresa en los gonadotropos localizados en la adenohipófisis³⁸. Para su expresión, los gonadotropos son sensibles a diversos estímulos, según el banco de receptores presentes en los mismos en un momento determinado. Factores como el factor esteroideogénico 1 (SF-1 por su nombre en inglés) y el receptor homólogo 1 del hígado (LRH-1 por su nombre en inglés), otro receptor nuclear, estimulan a la región promotora del GnRHR, al igual que subunidades de gonadotropinas³⁸.

La función principal, aunque no exclusiva, del receptor de GnRH se atribuye a su expresión en la adenohipófisis. Sin embargo, se ha encontrado también en otros tejidos como glándulas salivales³⁹, hígado, corazón, músculo esquelético, riñón, ovario⁴⁰ (particularmente en células de la granulosa⁴¹), oviducto, útero (endometrio y miometrio) placenta, glándula mamaria y vejiga urinaria⁴². Igualmente se ha encontrado en tumores dependientes de hormonas esteroideas, tales como los tumores de glándula mamaria, testículo y próstata, tanto dependiente como resistente a hormonas⁴³.

La expresión de este receptor y su ligando en células de la granulosa del folículo ovárico en ciertos momentos de su desarrollo, particularmente en folículos preovulatorios, sugiere una función autócrina y parácrina además de la clásica función endócrina descrita para la liberación de

gonadotropinas³⁹. Cabe mencionar que se estima que la expresión de ARNm para GnRHR en el tejido ovárico es 200 veces menor que en la hipófisis³⁰.

El ligando del receptor es la GnRH, que al interactuar con éste induce un cambio conformacional cuya consecuencia es la activación de una fosfolipasa C a través de proteínas G q/11. La respuesta para la transcripción de gonadotropinas se genera a través de dos vías: la vía de proteínas cinasas independientes de calcio (PKC) y la vía de proteínas cinasas activadas en mitosis (MAPK), cuya cascada depende del ingreso de Ca^{2+} para continuar. Las cascadas enzimáticas resultan en la transcripción inmediata de factores de transcripción que se unirán a regiones promotoras en un inicio para la expresión del gen de la cadena β de la hormona luteinizante (LH β), entre 30 y 60 minutos después de estimular el receptor y más tarde en regiones promotoras para el gen de la cadena β de la hormona folículo estimulante (FSH β) y enzimas participantes en un sistema de regulación negativa.³⁶

La expresión de LH β o FSH β por los gonadotropos depende de la frecuencia de estimulación del GnRHR. La expresión de la primera cadena sucede ante estímulos del GnRHR a intervalos de 30 a 60 minutos, mientras que la expresión de FSH β se observa a intervalos de mayor amplitud. Se ha encontrado que la variable fundamental para la expresión de estas gonadotropinas es el intervalo del estímulo y no la concentración del ligando (GnRH)³⁶, interviniendo además otras hormonas que actúan sobre los gonadotropos, como estrógenos, andrógenos, progesterona e inhibina²⁸.

El mecanismo endógeno de regulación negativa para cesar la expresión de gonadotropinas debe a la expresión tardía de dos enzimas: la GTPasa y dos MAP cinasa fosfatasa (MKP por su nombre en inglés) que interrumpen las dos vías principales de expresión de LH β y FSH β .³⁶ Otros estímulos exógenos también contribuyen a la regulación de la expresión de gonadotropinas. Por ejemplo, en el caso de la secreción de FSH, la hormona inhibina regula negativamente su secreción²⁸.

La expresión del GnRHR también es regulada, principalmente ante estímulos de baja concentración y mayor amplitud de GnRH. Se ha propuesto que la activación de la transcripción del gen de GnRHR se da a través de un sitio AP-1 dependiente de cinasas reguladas extracelularmente (ERK por su nombre en inglés: extracellular regulated kinase) localizado en la región promotora del gen de GnRHR.³⁶

1.2.2 Control endócrino de la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso que depende tanto de la señalización endócrina clásica, es decir, del estímulo de la gónada por hormonas recibidas a través del torrente sanguíneo, como de señales parácrinas entre las células germinales y las células de Sertoli, quienes dan sostén y dirección a las primeras dentro del túbulo seminífero^{45, 44, 45}. Las células de Sertoli tienen receptores tanto para FSH como para testosterona, que estimulan entonces la señalización pertinente para evocar el proceso de espermatogénesis; además generan proteínas que cumplen fundamentalmente tres funciones para beneficio de las células germinales: proteínas

transportadoras de otros elementos (iones, hormonas u otras proteínas), proteasas o sus inhibidores, que participan en la etapa de espermiación y finalmente proteínas de soporte en la lámina basal entre las células de Sertoli y las células germinales ⁴⁴.

También se han descrito diversos factores de crecimiento parácrinos secretados por las células de Sertoli, como la hormona anti muleriana, inhibina, el factor neurotrópico derivado de células de la glía (GDNF por su nombre en inglés glial cell line – derived neurotrophic factor) y el factor de células madre (SCF por su nombre en inglés: stem cell factor) ⁴⁴.

A grandes rasgos, el proceso de espermatogénesis inicia cuando las espermatogonias son estimuladas por la testosterona, hormona esteroide con efecto parácrino secretada por las células de Leydig, que rodean a los túbulos seminíferos²⁷ y estimula el inicio de la mitosis de las espermatogonias, que al irse dividiendo en generaciones sucesivas resultan en espermatogonias A0, A1, A2, A3 y A4. Las mitosis subsecuentes, generan a las espermatogonias intermedias, luego a las espermatogonias B y finalmente a los espermatoцитos primarios, los cuales sufren 2 meiosis, generando en la primera división meiótica los espermatoцитos secundarios y en la segunda células haploides llamadas espermátides, que posteriormente sufrirán una metamorfosis (espermiogénesis) para formar espermatozoides maduros, que se liberan al lumen del tubo seminífero.

En el mecanismo de regulación de la espermatogénesis intervienen múltiples hormonas. Dentro del mecanismo de regulación negativa, participa la secreción de inhibina por las células de Sertoli que disminuyen la secreción de FSH por los gonadotropos.

1.3 Las vacunas como una herramienta para controlar la actividad reproductiva

Los métodos inmunológicos para controlar la reproducción animal han sido una alternativa considerada humanitaria frente a opciones menos efectivas y cada vez más rechazadas por la sociedad como el sacrificio masivo o el envenenamiento de animales domésticos, ferales y silvestres ^{4, 5}. Para enfrentar esta problemática, que conlleva problemas de salud, económicos y sociales, se ha desarrollado investigación alrededor de métodos humanitarios para evitar la reproducción de varias poblaciones animales como alces, venados, caballos, borregos, perros, gatos, wallabys, ratones, conejos, elefantes, etc.^{1, 4, 8}.

Siendo los métodos hormonales ineficientes para generar infertilidad a largo plazo, el desarrollo de vacunas dirigidas contra moléculas fundamentales para la gametogénesis, fertilización o implantación del embrión ha sido un concepto estudiado desde la década de los noventas. Las moléculas blanco propuestas, pretenden inhibir la capacidad reproductiva, la fertilización o la implantación del embrión ^{1·3·5·6·8·9, 10, 12}.

Para generar una herramienta que funja como una vacuna contra antígenos propios, es necesario rebasar la tolerancia inmunológica natural a auto antígenos. Durante el desarrollo de vacunas heterólogas, que implicaban la inoculación de extractos proteínicos de origen distinto al de la

especie en la que se inoculan, se consiguió rebasar dicha tolerancia, aunque sin resultados contundentes^{10,12}.

Las vacunas recombinantes, en combinación o no con diversos adyuvantes han demostrado resultados variables dependiendo de la molécula contra la que se desea formar una respuesta inmune, la unión, mediante clonación de diversos determinantes antigénicos, el uso de adyuvantes, la vía de administración y la especie^{8,10-14}.

Para el control de poblaciones de animales ferales, se ha propuesto la infección masiva de las mismas con virus modificados, como citomegalovirus o mixomavirus apatógenos, que expresen moléculas candidatas para el control de la reproducción, particularmente proteínas de la zona pelúcida. La gran desventaja que presentan los vectores virales es la resistencia de algunos individuos de la población o la inmunidad generada contra estos virus^{4,16}.

Diversos blancos se han investigado y descrito para interrumpir la función reproductiva, tal es el caso de GnRH^{2,9,20}, proteínas de la zona pelúcida^{1,10}, proteína epididimaria de rata (DE) y la proteína Eppin¹².

1.4 Vacunas comerciales para regular la reproducción

Actualmente existen vacunas a nivel comercial dirigidas contra GnRH que no están disponibles en México, tales como la vacuna Canine Gonadotrophin Immunotherapeutic Factor (Pfizer Animal Health, EUA) y SpayVac (Wildlife Inc., EUA). La primera está recomendada para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna y la segunda se promueve como un inmunógeno anticonceptivo⁸. Una tercera vacuna se ha registrado en los Estados Unidos pero todavía no está disponible de forma comercial; consiste en GnRH conjugada con KLH (keyhole limpet hemocyanin) y *Mycobacterium avium* desactivado (GonaConTM)³. Por otra parte, la vacuna Improvac (Pfizer Animal Health) se comercializa en nuestro país y está dirigida a la producción porcina³. Para el ganado bovino y porcino se está estudiando una proteína recombinante que ancla cadenas de GnRH, (Bopriva)^{46,47}. Otras vacunas recombinantes en desarrollo, también dirigidas contra GnRH se reportan por otros autores en diferentes especies^{48,49}.

Con miras al control de la rabia canina como un problema de salud pública que involucra principalmente a países en desarrollo con altos índices de poblaciones caninas ferales, ha comenzado la investigación alrededor de vacunas capaces de generar anticoncepción e inmunidad contra el virus rábico. Wu X, et al. (2009) proponen al virus rábico ERA como un vector de expresión de GnRH capaz de estimular la respuesta inmune contra GnRH y contra el virus rábico de calle. La secuencia codificante para GnRH se insertó en diversos sitios antigénicos descritos de la glicoproteína G del virus, una proteína de superficie estimulante de la respuesta inmune. Los estudios son preliminares y apenas abren el campo de investigación alrededor de esta opción^{6,8}.

Utilizando al perro como modelo animal, se han hecho estudios preliminares para administrar simultáneamente anticonceptivos y vacunas antirrábicas, con resultados favorables. Bender et al. (2009), reportan la administración de GonaConTM y una vacuna antirrábica comercial en perras con

resultados favorables para la producción de anticuerpos anti GnRH y anticuerpos neutralizantes del virus rábico ⁸.

1.5 Vacunas de ADN

La expresión de proteínas secundarias a la inoculación de vectores plasmídicos en mamíferos se reporta desde 1990. La inoculación de estos plásmidos modificados y clonados con uno o varios genes de interés para su expresión se han utilizado como un recurso para el desarrollo de vacunas contra diferentes patógenos ^{48, 49}. Las vacunas de ADN se han utilizado también para el desarrollo de vacunas para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas. También se ha utilizado para la expresión de diferentes citosinas para inmunoterapia en el tratamiento de diversos tipos de cáncer ^{58, 56, 57}.

Una vacuna de ADN se basa en un plásmido modificado, conformado por una región promotora de origen viral para la expresión en células eucariontes, una secuencia de ADN clonada delante de ésta, una secuencia de terminación y finalmente genes para selección de plásmidos recombinantes, generalmente genes de resistencia a antibióticos.

En el campo de la inmunología, la manipulación de genes es de gran ayuda ya que es posible acoplar varias secuencias de ADN que permitan la expresión de proteínas quiméricas con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad de ciertas moléculas de interés, como es el caso en las terapias anti cáncer ^{56, 57} y el campo de la inmunocontracepción; ambos campos de estudio utilizan como blanco moléculas endógenas con la intención de desencadenar una respuesta inmune, enfrentándose con la dificultad de la tolerancia inmunológica natural.

Se desconoce a detalle el mecanismo por el que el ADN plasmídico se transporta al interior del núcleo para la expresión proteica. Sin embargo, para facilitar la movilización de estos vectores al espacio intracelular se han desarrollado métodos químicos y físicos; como métodos químicos se generan macromoléculas de ADN acopladas a diversos polímeros sintéticos como polilisina, polietilenimina ⁵⁰, polisacáridos como quitosán o complejos lipídicos catiónicos ^{51, 52} o adsorción a micro moléculas de oro.

Además de los métodos químicos para el ingreso eficiente de los vectores plasmídicos, se han combinado métodos físicos como la electroporación bajo el principio de que una corriente eléctrica desestabiliza las membranas celulares para abrir poros sobre la membrana citoplasmática de diámetro suficiente que permitan el paso de los plásmidos al espacio intracelular y de igual forma, al núcleo, donde teóricamente se conservan en forma de episomas por un periodo determinado ^{58, 59, 61, 67, 53, 54}.

1.5.1 Vacunas de ADN como alternativa para generar inmunidad contra antígenos propios

Las vacunas de DNA representan una propuesta para generar inmunidad contra moléculas propias de un individuo; tal es el caso del desarrollo de este tipo de vacunas como parte de la terapia para el tratamiento de cáncer ⁵¹.

El principio básico de estas vacunas reside en la inoculación en la inserción de un ADN plasmídico de la secuencia vacunal. Cuando el antígeno vacunal es de baja inmunogenicidad, se pueden añadir otras secuencias inmunoestimulantes para rebasar la barrera de tolerancia a los antígenos propios reconocidos por el MHC ⁵¹.

La dirección para la expresión del antígeno puede ser guiada en el ambiente intracelular, a través de la secuencia líder del plásmido, utilizando secuencias adicionales que se incluyen en la construcción. Cuando se pretende glicosilar un antígeno, éste deberá ser dirigido para llegar al retículo endoplásmico y así esperar una respuesta humoral favorable, mientras que los antígenos que permanecen en el citosol quedarán expuestos para entrar al sistema de degradación del proteosoma para dirigir entonces una respuesta de linfocitos T CD8 (citotóxicos) específica contra péptidos ⁵¹.

En el caso de este proyecto, se pretende estimular la respuesta inmune contra el receptor de GnRH insertando la secuencia génica de la primera región extracelular de éste receptor, modificado con determinantes antigénicos del toxoide tetánico, que han reportado generar inmunidad en el plásmido de expresión en mamíferos pCI-Neo.

1.6 Epítopos del toxoide tetánico como inmunoestimulantes

El toxoide tetánico es una proteína neurotóxica para los mamíferos que es producida por la bacteria *Clostridium tetani* a partir de su plásmido. (Brüggemann et al., 2003)⁵⁵ La toxina se une al receptor neuronal a través de su región carboxilo terminal, iniciando así el evento de intoxicación en un individuo. Dentro de esta región, se han descrito varios epítopos inmunogénicos pero atóxicos, entre ellos los epítopos p2 y p30. Estas moléculas se consideran inmunoestimulantes eficaces capaces de inducir la estimulación de linfocitos T en el contexto de diferentes haplotipos murinos y humanos(Keitel et al., 1999)⁵⁶. Mediante tecnologías de ADN recombinante, estos epítopos unidos a otras proteínas de superficie han logrado generar respuestas inmunes protectoras contra la malaria (Valmori, Pessi, Bianchi, & Corradin, 1992)⁵⁷ y respuestas inmunes anticancerígenas (Williams et al., 2008) ⁵⁸. El epítipo p2 se ha utilizado como parte de una proteína quimérica contra GnRH-I ⁵⁹ En el

Cuadro 1-1 se reportan las secuencias de residuos de aminoácidos y bases según diversas fuentes.

Cuadro 1-1 Secuencias reportadas para los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico

Epítomo	Secuencia de aminoácidos	Secuencia de bases (5' - 3')	Referencia
P2	QYIKANSKFIGITE	No reportada	Valmori et al., 1992 ⁵⁷
P2	QYIKANSKFIGITEL	Atg gca cag tat ata aaa gca aat tct aaa ttt ata ggt ata act gaa cta gca atg gcc cgg aga ccc cga	Williams et al., 2008 ⁵⁸
P30	FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE	No reportada	Valmori et al., 1992 ⁵⁷
P30	FNNFTVSFWLRVP-KVSASHLE	ctc gag tca ttc taa atg act agc aga tac ttt agg aac cct caa cca aaa gct aac ggt aaa att att aaa cat gac cag agt tcg agc tga	Williams et al., 2008 ⁵⁸

2. Material y Métodos

2.1 Construcción de vacunas de ADN contra el primer dominio extracelular del receptor canino de GnRH (GnRHR- exr) con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico en distintas configuraciones.

2.1.1 Diseño de iniciadores para amplificar el fragmento GnRHR-exr y de las construcciones quiméricas con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico.

El diseño de iniciadores se hizo partiendo de la secuencia de bases y aminoácidos correspondientes al receptor de GnRH (GHRHR) canino reportada previamente por Reichler et al. (2007) (GenBank, número de acceso: NM_00103121.1)³⁰. La secuencia seleccionada corresponde al primer dominio extracelular (Cuadro 2-1), que se evaluó con el programa Clone Manager 9 para obtener la longitud del amplicón y la secuencia adecuada de los iniciadores (Cuadro 2-2).

Cuadro 2-1. Secuencia de bases y aminoácidos correspondientes al primer dominio extracelular de GnRHR canino, seleccionado para construir las vacunas génicas

Secuencia de bases (3' - 5'; 99 bp)	Secuencia de residuos (NH – COO-) (33 residuos)
Atg gca agc gcc tct cct gaa cag aat caa aat cac tgc tca gct gta aac aac agc aac atg ctg atg cag ggc aac ctc ccc acc ctg acc tta tct	M A S A S P E Q N Q N H C S A V N N S N M L M Q G N L P T L T L S

Cuadro 2-2 Secuencia de bases para los iniciadores que clonan el primer dominio extracelular del GnRHR canino

Nombre del Iniciador	Secuencia de bases (3' a 5')
GnRHR-exr-F (delantero)	TTCTAGA ATG GCA AGC GCC TCC CTG AAC
GnRHR-exr-R (reverso)	TTCTAGA TTA AGA TAA GGT CAG GGT GGG GAG

Al extremo de cada iniciador se añadió una secuencia para la endonucleasa de restricción XbaI. Para el diseño de los iniciadores de los epítomos p2 y p 30 se tomó como referencia las secuencias reportadas por Williams et al. (2008)⁵⁸. Al iniciador delantero del receptor de GnRH (alineamiento en sentido 5'-3') se le acopló la secuencia codificante para el epítomo p2 del toxoide teánico. De la misma manera en el extremo 3' de la construcción del receptor se le acopló la secuencia del

Brevemente, Cada muestra de sangre (0.5ml) se resuspendió en agua (1.5ml) y centrifugó a 12 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en 0.5ml de solución de lisis (Tris HCl 10mM pH 8, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, SDS 0.5 %, 150 µg / ml de RNAsa) e incubada a 37°C por 60 minutos. Posteriormente se adicionaron 100 µg / ml de proteinasa K e incubó toda la noche a 50°C. Al día siguiente se agregó NaCl 2 M y centrifugó a 12 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). El ADN recuperado en suspensión, se precipitó con 500 µl de etanol al 70%y se centrifugó 5 minutos a 10 00 rpm, después se decantó el sobrenadante. Los residuos de etanol se evaporaron a 50°C. Finalmente, el ADN se resuspendió en 100 µl de agua estéril (agua inyectable).

La extracción de ADN se evaluó cualitativa y cuantitativamente. La evaluación cualitativa se realizó mediante electroforesis horizontal, corriendo una muestra de 5 µl en un gel de agarosa 1% durante 1 hr a 84 volts. Posteriormente el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 µg / ml y observado en un equipo de foto documentación con luz ultravioleta.

Para la evaluación cuantitativa se realizó una dilución 1:200 de una alícuota de la muestra y se midió la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro Perkin Elmer a una longitud de onda de 260 nm. Para determinar la pureza del procedimiento, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

El cálculo de la concentración de ADN se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/ml}) = (\text{Absorbancia } 260\text{nm}) (50 \mu\text{g} / \text{ml}) (\text{Dilución}) (\text{Vol. Muestra en ml})$$

Para calcular la pureza de la muestra se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Pureza} = \text{Absorbancia } 260 \text{ nm} / \text{Absorbancia } 280 \text{ nm}$$

2.1.3 Amplificación del fragmento de la primera región extracelular de GnRHR por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Se utilizaron las condiciones estandarizadas en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Genética y Bioestadística, FMVZ UNAM para cada amplificación. La mezcla de reactivos que se utilizó para cada reacción en todos los ensayos de la presente tesis se resume en el Cuadro 2-4.

Cuadro 2-4 Reactivos utilizados para PCR Punto Final

Reactivos	Concentración en Stock	Concentración final
ADN	50 ng / µl	250 ng
Iniciadores (F+R)	10 mM	0.4 Mm
MgCl	30mM	1.5 mM
Buffer PCR	10 X	1 X
Taq Polimerasa	5 u / µl	1 u / Rx
H ₂ O		cbp 20 µl

Se utilizó la siguiente fórmula para establecer la temperatura adecuada de amplificación del fragmento GnRHR-exr mediante un gradiente de temperatura:

$$\text{Temperatura de alineamiento (TA)} = \frac{(T^{\circ} \text{ iniciador F} + T^{\circ} \text{ iniciador R})}{2}$$

Donde la temperatura de cada iniciador corresponde a la reportada por el programa Clone Manager 9. A partir de la TA obtenida se realizaron 6 reacciones más con una TA en un rango 6 °C arriba y 6 °C debajo de la TA calculada a intervalo de 2°C cada una. Se probaron entonces 7 condiciones de alineamiento por construcción. Una vez determinada la mejor TA, se repitieron las reacciones correspondientes a cada construcción con sus temperaturas específicas.

Todas las reacciones de amplificación se evaluaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3 o 3.5 % de bajo punto de fusión resuspendida en TAE corriendo 5 µl de cada muestra 90 minutos a 90volts.

Una vez comprobada la presencia del fragmento esperado, se corrieron los 15 µl restantes de la reacción para recortar la banda inmersa en el gel de agarosa y purificar el amplicón por el método descrito por Boyle y Lew (1995)⁶⁰. La recuperación de ADN se comprobó mediante análisis electroforético descrito en el párrafo anterior.

2.1.4 Ligación de GnRHR-exr en un Vector de Clonación T

Los fragmentos recuperados se ligaron al vector de clonación pGEM- T easy vector (Promega pGEM-T Easy Vector System, EUA) bajo el protocolo descrito por el fabricante y permanecieron en incubación a 4°C toda la noche. Las condiciones para realizar la reacción de ligación fueron:

Cuadro 2-5 Protocolo de Ligación en Vector de Clonación

Reactivo	Concentración o volumen Stock	Concentración Final
Amplicón	15 µl	3 µl
Vector pGEM-T	50ng / µl	50 ng
T4 DNA ligasa	1 u / µl	1 u
Buffer de ligación	2x	1x
H ₂ O		cbp 10 µl

Posteriormente se transformaron 20 ng de cada producto de ligación en 9×10^4 UFC de bacterias competentes E. coli DH5α (Invitrogen[®]) mediante la técnica de choque térmico, bajo el protocolo descrito en el Cuadro 2-6. Inmediatamente después, las bacterias se incubaron en 1 ml de medio

enriquecido Luria Bertani (LB) por 60 minutos a 37°C en agitación constante (200rpm) y después se sembraron 200 µl en una caja Petri con medio LB – Agar/ampicilina/ Xgal/ IPTG para incubar toda la noche a 37°C

Cuadro 2-6 Protocolo de Transformación de bacterias E. coli DH5α

Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
30	4
1	42
2	4

Después de la incubación, se seleccionaron las clonas recombinantes por el marcador colorimétrico correspondiente al catabolismo de galactosa, donde las colonias de bacterias recombinantes se distinguen por generar colonias blancas, mientras que las colonias no recombinantes se muestran en color azul. Las colonias positivas se comprobaron mediante PCR de punto final bajo las condiciones reportadas en el Cuadro 2-4 y las condiciones de amplificación encontradas después de probar el gradiente de temperaturas descrito al inicio de la presente sección, al igual que el análisis electroforético.

Una de las colonias bacterianas cuya transformación fue confirmada se incubó en 9 ml de medio LB adicionado con ampicilina como antibiótico selectivo toda la noche a 37°C y agitación constante (200 rpm) para realizar una minipreparación de ADN plasmídico según la técnica descrita por Silhavy et al. (1984). La recuperación de ADN plasmídico se confirmó a través de un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.2.

2.1.5 Secuenciación del Plásmido pGEM-T/GnRHExr

Para todas las reacciones de secuenciación, se siguió el protocolo sugerido por el proveedor del kit comercial (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems). El protocolo fue el siguiente:

Cuadro 2-7 Condiciones para la Reacción de Secuenciación

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
ADN	50 ng / µl	150 ng
Primer	2 pm	3.2 pm
Ready Reaction Premix	2.5 X	0.5 X
Big Dye Sequencing Buffer	5 X	1 X
H ₂ O		Cbp 20 µl

Las condiciones de temperatura para la reacción de secuenciación se resumen en el siguiente cuadro.

Cuadro 2-8 Condiciones de Temperatura para Reacciones de Secuenciación de Ácidos Nucleicos a Partir de ADN Plasmídico

Desnaturalización inicial (°C / Min)	Desnaturalización (°C / seg)	Hibridación (°C / seg)	Extensión (°C / min)	Ciclos de Amplificación
96 / 1	96 / 10	50 / 15	60 / 4	25

Cada reacción de secuenciación se filtró en columnas con sephadex G-50 a 3500 rpm / 4 minutos. El filtrado se secó al vacío y congeló a – 20°C hasta ser procesadas en un secuenciador automático Applied Biosystems 310, en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El análisis de los electroferogramas arrojados por el secuenciador automático se realizó con el programa Chromas Pro 1.5 para Windows y la comparación de secuencias con el programa Clone Manager 9.

2.1.6 Amplificación de Clonas con los epítomos p2 y p30 en 3 configuraciones diferentes mediante PCR punto final

La construcción de cada clona con epítomos se realizó partiendo de la clona secuenciada pGEM-T/GnRHR-exr. La metodología para encontrar la TA óptima fue la misma que la descrita en la sección 2.1.3.

La evaluación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3 % bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.3.

2.1.7 Clonación de cada construcción en un vector de clonación T

Una vez obtenidos los amplicones de cada construcción, se siguió la misma metodología para clonar y secuenciar el fragmento GnRHR-exr descrita en las secciones 5.1.4 y 5.1.5. Se obtuvieron entonces los vectores de clonación T con las siguientes construcciones:

- pGEM-T/p2-GnRHR-exr
- pGEM-T/GnRHR-exr-p30
- pGEM-T/p2-GnRHR-exr-p30

2.1.8 Movilización de Clonas al Vector de Expresión en Mamíferos

El ADN de cada construcción se liberó del plásmido de clonación T mediante una digestión con la endonucleasa de restricción XbaI (New England Biolabs, Reino Unido), cuyos sitios de corte se localizan al extremo de cada inserto clonado. El protocolo utilizado para cada restricción se resume en el Cuadro 2-9. Cada reacción se incubó toda la noche a 37°C.

Cuadro 2-9 Protocolo de Restricción de ADN Plasmídico

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
ADN Plasmídico	x	1 µg
XbaI	20 u/µl	1 u/µg
Amortiguador de restricción NE4	10 X	1 X
BSA	100 X	1 X
Agua		Cbp 200 µl

Las reacciones de restricción se evaluaron cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% hasta observar los plásmidos linearizados. Una vez digerido el ADN, se concentró la reacción de restricción en un volumen de 100 µl utilizando una centrifuga al vacío a 42 ° C durante 30 minutos para cargar el volumen total en un gel de agarosa a 3% adecuado al volumen de las reacciones para recuperar y purificar el fragmento de interés mediante la técnica descrita por Boyle y Lew (1995) ⁶⁰, re suspendiendo el ADN recuperado en un volumen de 25 µl.

Después de obtener el ADN correspondiente a cada construcción, cada una se ligó en el vector de expresión en células de mamífero pCI-neo (pCI-neo Mammalian Expression Vector, Promega, EUA) con el protocolo reportado en el Cuadro 2-10. Las reacciones se llevaron a cabo toda la noche a 4°C.

Cuadro 2-10 Protocolo de Ligación en el Vector pCI neo

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
ADN del vector	50 ng/µl	100 ng
T4 DNA ligasa	1 u/µl	1 u
ADN construcción		100 ng
Buffer de ligación	10 X	1 X
Agua		Cbp 20 µl

Al día siguiente se transformaron 9×10^4 UFC de células *E. coli* DH5α, bajo el protocolo descrito en la sección 2.1.4. De cada reacción de transformación, se sembraron 40ng de ADN en placas con medio LB-Agar, adicionado con ampicilina como antibiótico selectivo. Cada placa se incubó a 37°C toda la noche. Todas las colonias encontradas en las placas fueron evaluadas por PCR punto final

con los iniciadores correspondientes a cada construcción bajo las condiciones de reacción descritas en el Cuadro 2-4 y las condiciones de alineamiento respectivas a cada construcción, resumidas en el Cuadro complementario 3 localizados en el anexo 2 de esta tesis.

Se realizó una mini preparación de ADN a partir de un cultivo de 9ml de medio LB adicionada con ampicilina con cada clona positiva a cada fragmento esperado por construcción. Los cultivos se incubaron a 37°C toda la noche en agitación constante a 220 rpm. Para la obtención de ADN se siguió el protocolo descrito por Silhavy et al. (1984). Cada purificación de ADN se evaluó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% bajo las condiciones descritas en la sección 2.1.3.

2.1.9 Evaluación de orientación dentro del marco de lectura del vector

Mediante PCR de punto final, se evaluó la correcta orientación de cada construcción dentro del marco abierto de lectura de su respectivo vector. Para tal fin, se diseñaron iniciadores para amplificar el sitio múltiple de clonación del vector. La secuencia de los iniciadores se reporta en el Cuadro 2-11.

Cuadro 2-11 Secuencia de Iniciadores para Amplificar el sitio Múltiple de Clonación del Vector pCI – neo

Iniciador	Secuencia de bases (3' a 5')	Longitud del amplicón en el vector cerrado
pCI-F (delantero)	GCTAGCCTCGAGAATTCAC	83 bp
pCI-R (reverso)	GTCTGCTCGAAGCATTAAAC	

Las construcciones orientadas correctamente se amplificaron utilizando el iniciador delantero del inserto con el iniciador reverso del vector, que cae en el extremo 5' del sitio múltiple de clonación. Las clonas con la construcción insertada en la dirección opuesta se amplificaron utilizando el iniciador reverso del inserto con el mismo iniciador reverso del vector, que se usó para confirmar la orientación adecuada. Los iniciadores utilizados y el tamaño de los amplicones esperados por cada construcción se reportan en el Cuadro 2-12. Las clonas que resultaron positivas ante la evaluación por PCR punto final, se sometieron a reacciones de secuenciación bajo el protocolo mencionado en la sección 2.1.5.

Cuadro 2-12 Juego de Iniciadores Utilizados para Verificar la Orientación de Lectura de las Construcciones Clonadas en el Vector de Expresión en Mamíferos pCI - neo

Orientación	Construcción	Iniciador delantero utilizado	Iniciador reverso utilizado	Longitud esperada del amplicón (bp)
Positiva (5' - 3')	p2- GnRHR-exr	GnRHR-exr-F	pCI-R	167
	GnRHR-exr-p30	GnRHR-exr-F	pCI-R	220
	p2-GnRHR-exr-p30	P2GnRHR-F	pCI-R	263
	GnRHR-exr	GnRHR-exr-F	pCI-R	172
Negativa (3' - 5')	p2- GnRHR-exr	GnRHR-exr-R	pCI-R	212
	GnRHR-exr-p30	P30GnRHR-R	pCI-R	220
	p2-GnRHR-exr-p30	P30GnRHR-R	pCI-R	263
	GnRHR-exr	GnRHR-exr-R	pCI-R	172

2.1.10 Extracción de ADN plasmídico libre de endotoxinas

Una vez confirmada la secuencia de cada construcción, se procedió a expandir las bacteria transformadas con cada construcción en un cultivo de 1litro de medio LB adicionado con ampicilina incubado a 37°C toda la noche en agitación constante a 200rpm para realizar una extracción de ADN plasmídico libre de endotoxinas utilizando un kit comercial (Endofree[®] Plasmid Purification, Mega kit QIAGEN[®]). Se siguió el protocolo descrito en el manual del kit para los plásmidos de alto número de copias.

Cada extracción se evaluó cualitativa y cuantitativamente, en geles de agarosa al 1% y espectrofotometría respectivamente, se siguió el procedimiento descrito en la sección 5.1.2.

Posterior a la cuantificación de ADN se prepararon las alícuotas para inmunizar a los grupos de estudio. Cada alícuota constó de 100 µg de ADN plasmídico libre de endotoxinas resuspendido en PBS estéril hasta alcanzar un volumen de 500 µl. Todas las alícuotas fueron congeladas a -20°C hasta el momento de la inoculación en animales.

2.2 Evaluación de la respuesta fisiológica a la vacunación

2.2.1 Animales de estudio

Cada vacuna construida se evaluó en un grupo (n=4) de conejos machos pre púberes de la raza Nueva Zelanda, variedad blanca a través de la determinación semanal de testosterona total sanguínea. Al inicio del estudio la edad de los conejos fue de 10 semanas y la duración del ensayo

fue de 56 días. La denominación de los grupos y la vacuna construida que se inoculó por grupo se resumen en el Cuadro 2-13.

Cuadro 2-13 Denominación de Grupos y Vacunas Inoculadas

Nombre del inmunógeno	Secuencia predicha de aminoácidos en los péptidos codificados por la vacuna
P2- GnRHR-exr	MQYIKANSKFIGITEL - <i>MASASPEQNNHCSAVNNSNMLMQGNLPTLTLSHHHHHH</i>
GnRHR-exr – p30	<i>M MASASPEQNNHCSAVNNSNMLMQGNLPTLTL</i> FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
P2-GnRHR-exr-p30	MQYIKANSKFIGITEL - <i>MASASPEQNNHCSAVNNSNMLMQGNLPTLTL</i> FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE
GnRHR-exr	<i>MASASPEQNNHCSAVNNSNMLMQGNLPTLTLSHHHHHH</i>
Control	Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

*Las letras itálicas indican la secuencia de aminoácidos que corresponde a la primera región extracelular del GnRHR canino

Los animales se alojaron en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) – FMVZ – UNAM, de forma individual en jaulas situadas a 90cm del piso con dimensiones de 90cm x 40cm x 30cm, con agua y alimento de mantenimiento *ad libitum*.

2.2.2 Inmunizaciones

Los animales fueron inmunizados en los días 0, 14, 28 y 35 del ensayo en la piel del dorso del borde escapular izquierdo previamente depilado. En los días 0 y 14, se inocularon 100µg de ADN resuspendido en 500µl de solución buffer fosfato estéril (PBS) y pH neutro por vía subcutánea. Para las inoculaciones se utilizaron jeringas para capacidad de 1ml con aguja calibre 25G. En Los días 28 y 35 los animales se inmunizaron bajo anestesia con Xilazina a razón de 0.5mg/kg y Ketamina a 25mg/kg administrada por vía intramuscular. Después de confirmar el nivel de sedación por la ausencia del reflejo podal se realizó la inoculación por vía intradérmica con 100µg de ADN en un volumen de 500µl e inmediatamente se utilizó un electroporador (PA-3000 Cyto Pulse Sciences, INC) para aplicar 5 pulsos de 200V, con duración de 10ms cada uno a intervalos de 1 segundo, basados en el protocolo reportado por Medi et al (2005)⁶¹.

2.2.3 Muestreo y medición de variables morfométricas

A partir del día cero, se recabó semanalmente la siguiente información:

- Peso de cada animal. Se utilizó una báscula comercial digital marca Tor – Rey.
- Eje longitudinal y transversal de cada testículo (cm): Se utilizó un vernier de 15cm, marca PRETUL.

- c) Sangre arterial completa: mediante punción de la arteria auricular, previa depilación del área. La zona puncionada se desinfectó con alcohol al 70% y se utilizaron agujas calibre 20g para la obtención de 3ml de sangre completa en tubos vacutainer sin anticoagulante.

Cada muestra de sangre se conservó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente se refrigeraron y se transportaron al laboratorio de Endocrinología de Departamento de Reproducción, FMVZ-UNAM. El suero se separó por centrifugación de la muestra a 3500rpm durante 15 minutos y se conservó a -75°C en un ultra congelador hasta el momento de su evaluación.

2.2.4 Evaluación de testosterona sérica total

Al final del muestreo se realizó la determinación de testosterona sérica total por radio inmuno análisis (RIA), utilizando el kit comercial COAT-A-Count, Total Testosterone (Lab. Siemens).

2.2.5 Recolección y evaluación histológica de tejidos al final del estudio

Después de 4 inmunizaciones y a los 56 días de iniciado el estudio los conejos fueron anestesiados con 66mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Los conejos fueron sangrados a blanco mediante punción intracardiaca con agujas hipodérmicas 16G hasta que cesaron los signos vitales de los animales. Se obtuvieron los testículos, que fueron sumergidos en solución de paraformaldehído al 4% por 24 horas y deshidratados en soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30 %, permaneciendo 24 horas en cada una. El proceso de fijación y deshidratación se realizó en una cámara fría a 4 °C.

Para cada animal se incluyó un testículo en parafina del cual se obtuvo 10 cortes de 5 µm, iniciando por el polo craneal, a distancia de 200µm entre cortes y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Se evaluó la presencia o no de luz en los túbulos seminíferos como señal de inicio de actividad espermatogénica^{62, 63, 64, 65} de 3 cortes por individuo, utilizando un aumento de 100x⁶⁶.

2.2. 6 Análisis estadístico

El efecto de la vacuna sobre el peso de los animales, eje longitudinal y transversal de los testículos, la concentración sérica total de testosterona se realizó por análisis de varianza. Los análisis se realizaron con el programa SPSS Statistics IBM, versión 19. En todos los casos el intervalo de confianza fue de 95 % ($\alpha = 0.05$). Las diferencias entre medias se determinaron mediante comparaciones múltiples de medias por el método de Tukey.

Además, para la concentración sérica de testosterona, se evaluó la homogeneidad de varianzas de la concentración de testosterona por grupo en dos momentos: antes de las inmunizaciones (semanas 1 y 2 de tratamiento) y después de las inmunizaciones (últimas 3 semanas del ensayo) mediante Chi cuadrada, donde el intervalo de confianza fue de 99.995% ($\alpha = 0.005$)

El efecto del tratamiento sobre la probabilidad de la presencia de espermatozoides o de luz en los túbulo seminíferos fue evaluada por modelos lineales mixtos (GLMM) después de la transformación logística de la variable de respuesta (número de túbulos con presencia de luz o espermatozoides / total de túbulos) incluyendo al tratamiento como variable fija y el efecto aleatorio del campo de observación anidado dentro del individuo.

2.3 Evaluación de producción de anticuerpos anti-GnRHR-exr

2.3.1 Producción del antígeno para evaluar la producción de anticuerpos

El antígeno para el que se esperan anticuerpos es un péptido quimérico no disponible comercialmente, por lo que se realizaron ensayos en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística, FMVZ – UNAM, para movilizar el péptido p2-GnRHR-exr-p30 clonado en el vector de expresión en mamíferos al vector de expresión bacteriano pET – 11 a (Merck Millipore). Al final de la secuencia p30, se añadió una “etiqueta” de 6 histidinas consecutivas, para su localización y purificación^{67 68 69}.

La amplificación del fragmento requirió el diseño de dos iniciadores: el delantero codificante para la secuencia del epítipo p2 flanqueado en el extremo 3’ por el sitio de corte para la endonucleasa de restricción NdeI. El reverso se diseñó para alinearse con la secuencia del epítipo p30 y la etiqueta de 6 histidinas flanqueando el extremo 5’ del iniciador, seguido por el sitio de corte para endonucleasa de restricción BamHI. La secuencia de los iniciadores diseñados se reporta en el cuadro 2.3.1.1. Las condiciones de la mezcla de reacción de amplificación se resumen en la sección 2.1.3 y las condiciones para la amplificación del fragmento se resumen en el Cuadro 2-15. Los productos de amplificación y recuperación de fragmentos de interés se hicieron acorde a la metodología descrita en la sección 2.1.3.

Cuadro 2-14 Iniciadores para Amplificar el Fragmento p2 - GnRHR-exr - p30 con Secuencia de Histidinas

Nombre del iniciador	Secuencia	Longitud del amplicón (bp)
P2 NdeI(F)	CATATG ATGCAGTATATAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATAACTGAA	243
P30 Bam HI (R)	GGATCC TTA GTGGTGGTGGTGGTGGTG TTCTAAATGACT AGC AGATAC TTT AGG AACCCTCAACCAAAGCTAACGGTAAAATTATATAA	

Cuadro 2-15 Condiciones de Temperatura para la Amplificación del Fragmento p2 - GnRHR-exr - p30 - His a partir de la Clona p2 - GnRHR - exr - p30 Clonada en el Vector pCI neo

Desnaturalización inicial (°C / Min)	Desnaturalización (°C / seg)	Alineamiento (°C / seg)	Amplificación (°C / seg)	Ciclos de Amplificación	Extensión final (°C/min)
94 / 5	94 / 30	64 / 30	72 / 30	30	72 / 15

Una vez recuperado el fragmento esperado, éste se insertó en el vector de clonación T pTZ 57 R/T InstAclone (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo de ligación sugerido por el fabricante. La transformación de células competentes y expansión de las mismas para obtener ADN plasmídico suficiente se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.1.4 del presente documento. Para la evaluación de colonias bacterianas positivas se diseñaron iniciadores que flanquean el sitio múltiple de clonación del vector (Cuadro 2-16), que corresponden a secuencias dentro del gen lac Z bajo las condiciones de amplificación reportadas en el Cuadro 2-17.

Cuadro 2-16 Secuencia de iniciadores para evaluar clonas recombinantes en el vector PTZ 57 R/T

Nombre del Iniciador	Secuencia de bases (3' a 5')	Longitud del amplicón recombinante (bp)
pUC M13 F	GTTTTCCAGTCACGAC	371
PUC M13 R	GTCATAGCTGTTTCCTG	

Cuadro 2-17 Condiciones de temperatura para la amplificación del fragmento p2 – GnRHR-exr – p30 His

Desnaturalización inicial (°C / Min)	Desnaturalización (°C / seg)	Alineamiento (°C / seg)	Amplificación (°C / seg)	Ciclos de Amplificación	Extensión final (°C/min)
94 / 5	94 / 30	58 / 30	72 / 30	30	72 / 5

Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% según las condiciones reportadas en la sección 5.1.4. Dos clonas positivas se seleccionaron para realizar mini preparaciones de ADN plasmídico a partir de un cultivo de 9ml en LB ampicilina siguiendo el protocolo reportado por Silhavy et al. (1984). El ADN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría como se describió en la sección 2.1.2.

2.3.2 Movilización del fragmento p2-GnRHR-exr-p30His al vector pET11a

La secuencia para el polipéptido p2-GnRHR-exr-p30-His se liberó del vector sometiendo 712 µg de ADN plasmídico a una doble digestión utilizando las endonucleasas de restricción NdeI (New England Biolabs) y BamHI (Fermentas) bajo el protocolo que se reporta en el anexo 1 y la metodología sugerida por el fabricante. La evaluación de cada reacción de restricción,

recuperación de fragmentos de interés, ligación, transformación y selección de clonas recombinantes se realizó conforme el método descrito en la sección 2.1.8 de este documento.

Como particularidades para el protocolo de expresión del polipéptido, el plásmido se insertó en bacterias *E. coli* BL21 Gold y se siguió el protocolo de transformación propuesto por el fabricante. La selección de clonas recombinantes se realizó mediante PCR punto final utilizando los iniciadores específicos del fragmento ya reportados en este documento.

Una de las clonas positivas se sembró en 9 ml de medio LB adicionado con ampicilina para iniciar el protocolo de inducción de proteínas. El cultivo se incubó a 37 °C, a 220 rpm durante toda la noche.

2.3.3 Inducción de proteínas: Expansión del cultivo bacteriano e inducción de proteínas recombinantes

El cultivo de 9ml se expandió en 150 ml de LB – ampicilina y se siguió el protocolo descrito por el fabricante para inducir la expresión de proteínas al alcanzar una densidad óptica (OD) de 1 a 600 nm de longitud, momento en el que se añadió isopropil - β - D - 1 - tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 1mM. Se tomaron alícuotas de 1 ml previas a la expansión del cultivo e inducción de expresión con muestreo cada hora. Al final del ensayo el cultivo se centrifugó a 3500 rpm / 5 minutos, el medio de cultivo fue desechado y la pastilla del cultivo total fue resuspendida en 50 ml y las alícuotas en 100 μ l de agua bidestilada respectivamente y después se congelaron para el análisis electroforético.

2.3.4 Electroforesis de proteínas

El peso de la proteína recombinante se calculó utilizando una calculadora de peso molecular disponible en línea⁷⁰. La secuencia predicha de aminoácidos y el peso de la proteína química se reporta en Cuadro 2-18.

Cuadro 2-18 Secuencia de residuos para la quimera p2 – GnRHR-exr – p30 - His

Secuencia de residuos	Peso (kDa)
MQYIKANSKFIGITELMASASPEQNNHCSAVNNSNMLMQGNLPTLTLFSN NFTVSFWLRVP-KVSASHLEHHHHHH	8.5

Se prepararon geles de acrilamida al 15% para el análisis de proteínas en condiciones desnaturizantes con los reactivos reportados en el anexo 1. Las soluciones para amortiguadores de corrida y transferencia de western blot se prepararon según las recomendaciones del fabricante del anticuerpo anti histidinas utilizado para la detección de la proteína recombinante⁷¹.

Las alícuotas para la electroforesis fueron desnaturizadas durante 1 minuto a 95 °C con el amortiguador desnaturizante para proteínas⁷¹.

La electroforesis se llevó con 10 µl de muestra en un sistema vertical para 4 mini geles de 10 cm x 8 cm Mini-PROTEAN® 3 Cell de BIORAD. Todas las electroforesis se corrieron a 20 V durante 20 minutos y posteriormente a 100 V y 50 mA durante 50 minutos. Se utilizó azul de Coomassie para teñir los geles ⁷¹. Una vez detectada bandas cercanas al peso esperado, se cargaron 100 µl en mini geles con peines ciegos para transferirlos a membranas de nitrocelulosa para western blot.

2.3.5 Western blot para la detección de proteínas recombinantes

Un extremo de cada gel se recortó para teñirlo con azul de Coomassie como control. El resto del gel se utilizó para transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa mediante una cámara de transferencia semi -seca (Trans-Blot® de BIORAD) a 100 V y 200 A durante 2 horas. La identificación de anticuerpos en el suero de los conejos contra la proteína se realizó confrontando cada suero con la membrana conteniendo la proteína recombinante. Previo a la exposición de las membranas contra los sueros de los conejos inmunizados éstas

Se bloquearon con una solución de TBST + leche descremada en polvo a 5% durante 30 minutos a TA y se recortaron en tiras Como control positivo en la identificación de la proteína se utilizó el anticuerpo comercial anti-histidina. Las diluciones de cada anticuerpo se reportan en el Cuadro 2-19.

Cuadro 2-19 Diluciones de los sueros de los conejos inmunizados para confrontar anticuerpos

Primer anticuerpo	
Anticuerpo	Dilución realizada
Anti Histidinas (QIAGEN)	1:300
Sueros grupo p2-GnRHReXr	1: 100 y 1:200
Sueros Grupo GnRHReXr-p30	1:100 y 1:200
Sueros grupo p2-GnRHReXr-p30	1:100 y 1:200
Sueros grupo GnRHR-exr	1: 100 y 1:200
Sueros grupo PBS	1:100 y 1:200
Segundo anticuerpo	
Anti conejo (Sigma)	1:1 500

Las membranas fueron expuestas al suero de los conejos durante toda la noche a 4 °C. Al otro día se realizaron 3 lavados de 5 minutos en agitación constante a TA con solución TBST y se confrontó el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa diluido en solución TBST y leche en polvo al 5% a 37 °C durante 1 hora. Se revelaron con el kit para revelado de western blot Opti 4 C (Bio Rad) según las instrucciones del fabricante.

3. Resultados

3.1 Construcción de vacunas de ADN contra el primer dominio extracelular del receptor canino de GnRH (GnRHR- exr) con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico en distintas configuraciones

Se lograron realizar cuatro construcciones de ADN libre de endotoxinas para su expresión en células mamíferas utilizando el vector pCI neo (PROMEGA®). La secuencia esperada y orientación dentro del marco de lectura se confirmó para cada construcción mediante secuenciación automática de ADN. El Cuadro 3-1 resume la cantidad de ADN libre de endotoxinas correspondiente a cada construcción obtenida para la inmunización de los animales de estudio. El proceso detallado se reporta en el Anexo 1 del presente documento.

Cuadro 3-1 Cuantificación de la producción de ADN libre de endotoxinas en el vector de expresión en mamíferos pCI-neo

Construcción	Miligramos totales	Volumen total (ml)	µg /µl
GnRHR – exr	3.350	1.25	2.68
P2 – GnRHR-exr	4.239	1.35	3.14
GnRHR-exr – p30	2.68	1.8	1.48
P2 – GnRHR-exr - p30	2.5	1.8	1.39

Los resultados a detalle del diseño y la elaboración de los tres inmunógenos y la clona control se presentan en el anexo 1.

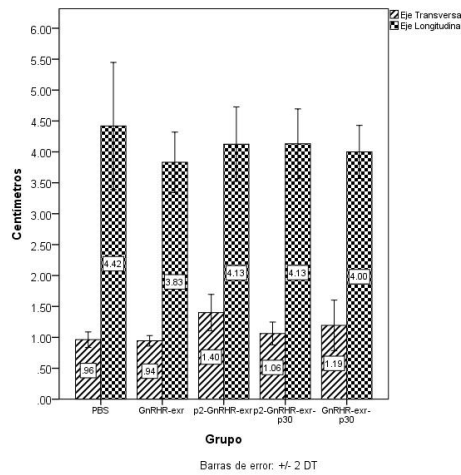
3.2 Evaluación del efecto de la inmunización con vacunas genómicas sobre las variables morfométricas de conejos

El peso de los conejos no difirió entre los grupos después de ser o no inmunizados contra la primera región extracelular del receptor de GnRH en la forma de una vacuna génica en tres configuraciones diferentes. ($p > 0.05$).

La Gráfica 1 muestra la media de los ejes longitudinal y transversal de los testículos a las 10 semanas de iniciado el ensayo (56 días de ensayo; conejos de 20 semanas de edad). No se observó diferencia entre grupos para el eje longitudinal ($p = 0.05$), mientras que el eje transversal de los grupos inmunizados con las construcciones p2-GnRHR-exr y GnRHR – exr – p30 fueron mayores que los grupos control (PBS), el grupo inmunizado con la construcción p2-GnRHR-exr-p30 y el

inoculado solamente con el primer fragmento extracelular (GnRHR-exr) ($p < 0.05$). Estos tres grupos entre sí no mostraron diferencia.

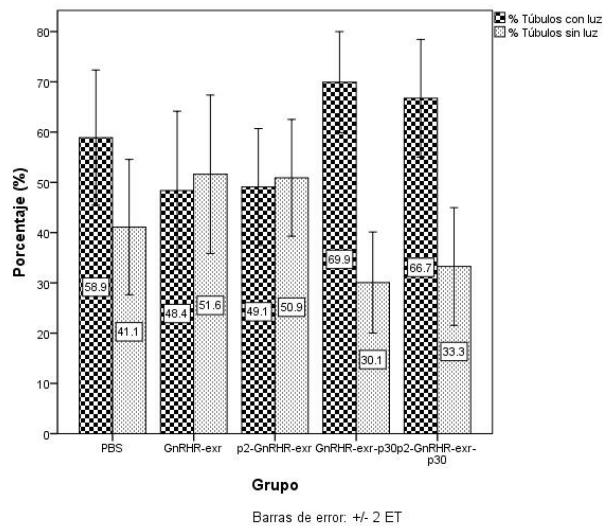
Gráfica 1 Promedio de ejes longitudinales y transversales testiculares



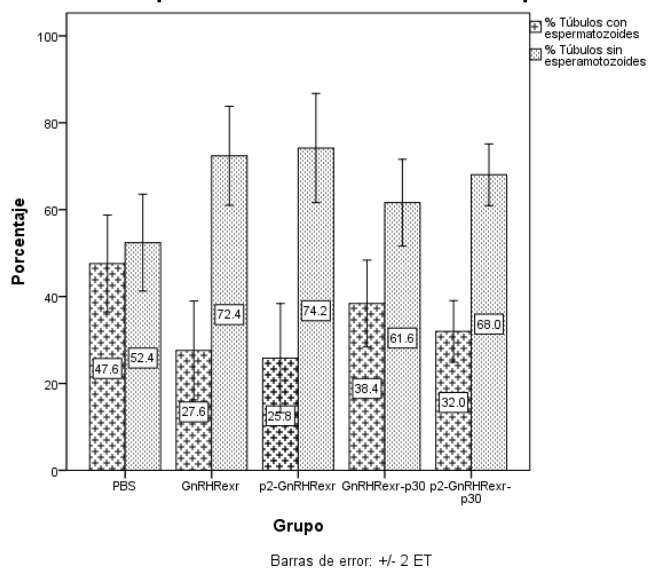
3.3 Evaluación histológica de testículos

No hubo diferencia en el porcentaje de túbulos seminíferos desarrollados o con espermatozoides entre los grupos al final del estudio ($p > 0.05$). (Gráfica 2 y Gráfica 3).

Gráfica 2 Proporción de túbulos con o sin lumen en su interior



Gráfica 3 Proporción de túbulos con o sin espermatozoides

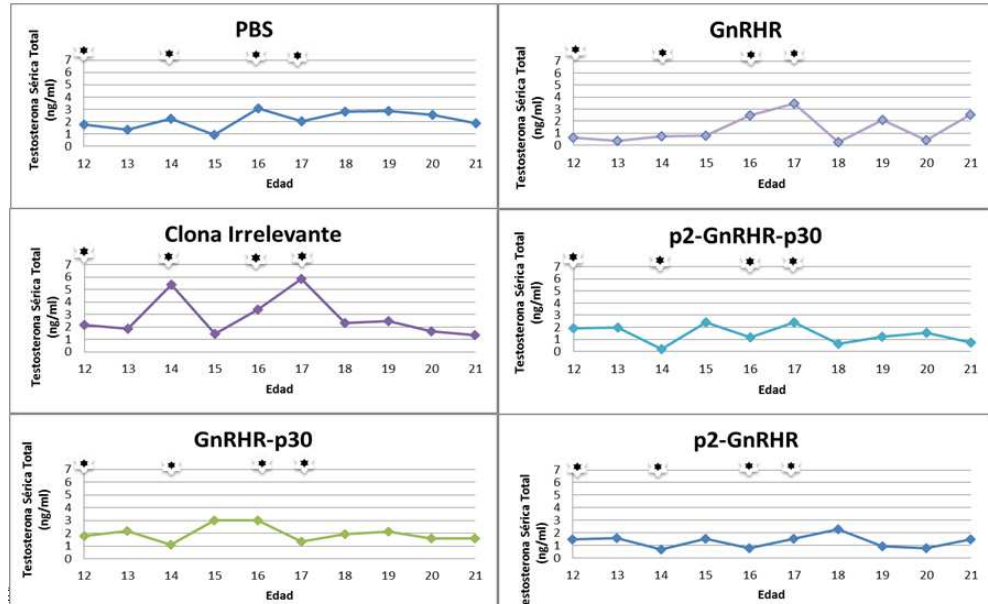


3.4 Evaluación de las concentraciones séricas de testosterona total en animales inmunizados con una vacuna de ADN contra GnRHR-exr flanqueado por epítomos del toxoide tetánico en tres diferentes configuraciones

La Gráfica 4 muestra la concentración de testosterona en relación a la inmunización de los conejos. Estadísticamente, no se encontró diferencia entre la concentración media de testosterona entre grupos al final del estudio ($P > 0.05$).

Al considerar la varianza de la concentración de testosterona por grupo antes (semanas 1 y 2) y después de las inmunizaciones (últimas tres semanas), no hay reducción estadística significativa en la variación de la concentración de testosterona ($P > 0.005$).

Gráfica 4 Concentración media de testosterona total por muestreo por grupo



3.5 Evaluación de producción de anticuerpos anti-GnRHR

A partir de la construcción clonada en el vector de expresión en células de mamífero, se logró migrar la secuencia p2 – GnRHR – exr –p30 – His al vector de expresión bacteriano pET-11a. La ilustración 6.4.1 muestra la amplificación por PCR del fragmento clonado en el vector de expresión bacteriana pET – 11a. Los resultados detallados de la producción y proceso de evaluación de la producción del péptido p2 – GnRHR-exr-p30 se muestran en el anexo 2 del presente documento.

Después de los ensayos de inducción y western blot que evaluó los anticuerpos comerciales contra el polipéptido de histidinas diseñado para expresarse en el extremo amino del péptido, no se encontró una señal clara de bandas en el peso esperado de 8.5 kDa. Tampoco hubo marcaje al evaluar los sueros de los animales tratados obtenidos al final del estudio contra el antígeno.

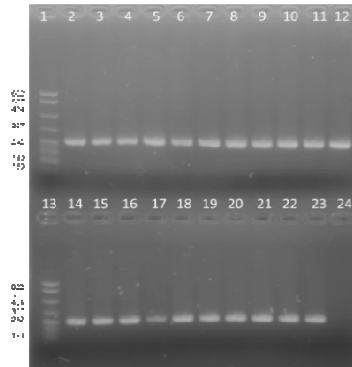


Ilustración 3-1 Evaluación de clonas recombinantes por PCR. Construcción p2 - GnRHR-exr - p30 - His en el vector pET 11a. Se evaluaron todas las colonias encontradas. Carriles 1 y 13: MPM pBR 322 Hind Digest. Carriles 2 a 23: amplicones en peso esperado de 243 bp. Carril 24: control negativo de la mezcla de reacción.

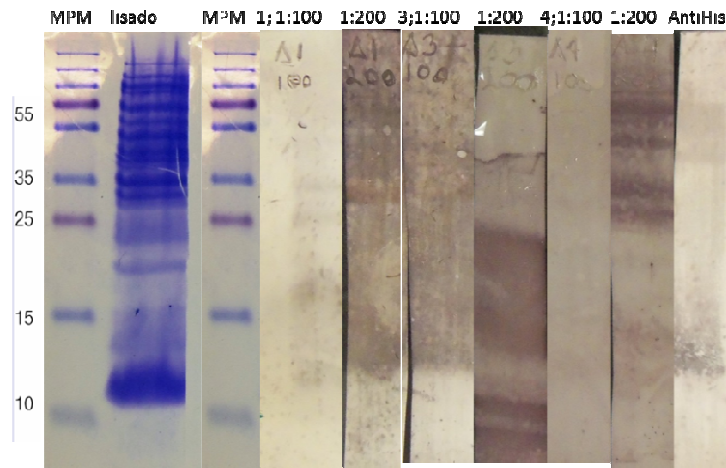


Ilustración 3-1 Western blot. Confrontación de sueros del grupo p2-GnRHR-exr con el cultivo bacteriano de inducción de la proteína p2 - GnRHR - exr - p30 - His. Arriba de cada carril se muestra el elemento confrontado y la dilución realizada. MPM Fermentas Protein Ladder #SM 1811. Anticuerpo Anti-His, dilución 1:300.

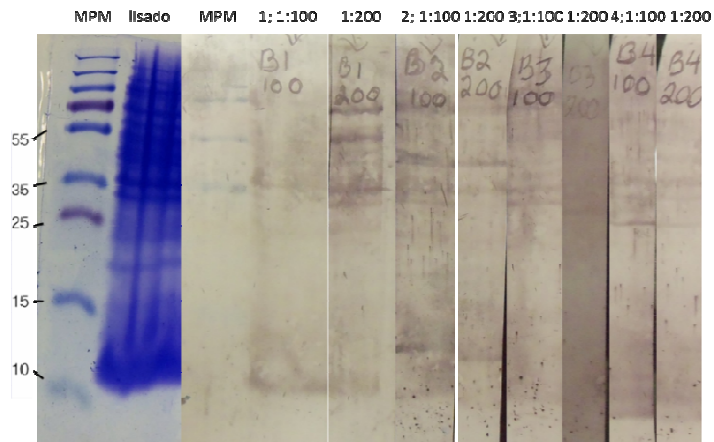


Ilustración 3-3 Western Blot. Confrontación de sueros del grupo GnRHR-exr – p30 con el cultivo bacteriano de inducción para la proteína p2 – GnRHR-exr – p30 – His. Encima de cada carril se muestra el elemento confrontado. MPM Fermentas Protein Ladder #SM1811. Los números previos a la dilución, señalan al animal de cuyo suero se confronta. Gloria, por las imágenes con sus leyendas en hojas separadas (no integradas al texto) para que no se desacomoden

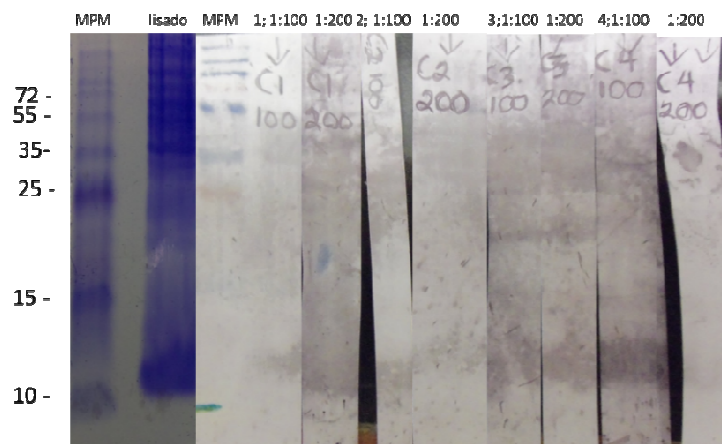


Ilustración 3-4 Confrontación de sueros del grupo p2- GnRHR-exr – p30 con el cultivo bacteriano de inducción para la proteína p2 – GnRHR-exr – p30 – His. Encima de cada carril se muestra el elemento confrontado. MPM Fermentas Protein Ladder #SM1811. Los números previos a la dilución, señalan al animal de cuyo suero se confronta.

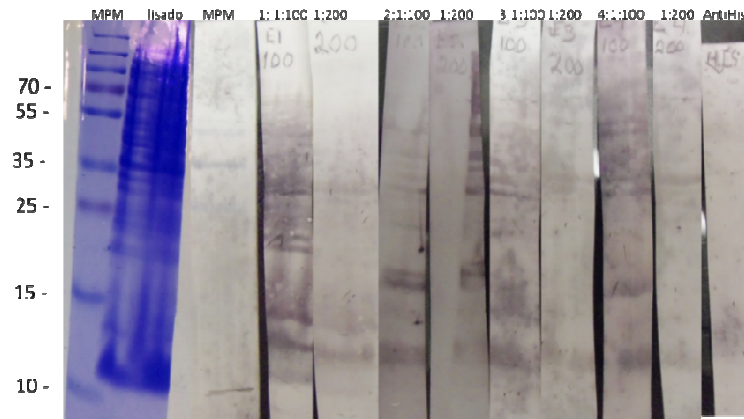


Ilustración 3-5 Westernblot. Confrontación de sueros del grupo control (PBS) con el cultivo bacteriano de inducción para la proteína p2 – GnRHR-exr – p30 – His. Encima de cada carril se muestra el elemento confrontado. MPM Fermentas Protein Ladder #SM1811. Los números previos a la dilución, señalan al animal de cuyo suero se confronta. Anticuerpo anti His.

4. Discusión

En este estudio logramos generar cuatro construcciones adecuadas para la inmunización por ADN. Las construcciones incluyeron la primera región extracelular del receptor de GnRH combinado con epítomos inmunogénicos derivados del toxoide tetánico, para la inmuoesterilización de animales ferales. Cada constructo se logró clonar en un vector de expresión de mamíferos valiéndose de un sistema bacteriano para su expansión, obteniendo cantidades suficientes para la inmunización de los animales del estudio, utilizando 100 µg de ADN libre de endotoxinas para cada inoculación. La inmunización contra el receptor de GnRH a través de la vacuna genómica descrita no produjo cambios significativos en el porcentaje de túbulos seminíferos con lumen o con espermatozoides en conejos entre 11 y 20 semanas de edad. Sin embargo, solo el 58.9 % y 47.6% de túbulos seminíferos del grupo control contenían lumen o espermatozoides respectivamente, lo que nos indica que al final del estudio los animales aún eran sexualmente inmaduros (García - Tomás M., 2009), y por lo tanto no estaban en las condiciones ideales para la evaluación inicial de la vacuna génica.

El efecto de la inmunización en la interrupción de la madurez sexual se evaluó, en este estudio, a través de la medición de testosterona sérica total y el desarrollo de los túbulos seminíferos, cuantificando la proporción de estos con presencia de luz o espermatozoides. Las concentraciones de testosterona no difirieron entre el grupo control y los grupos inmunizados contra el receptor de GnRH. Endocrinológicamente, la secreción de testosterona es la consecuencia del estímulo de la hormona luteinizante (LH) sobre las células de Leydig (Stocco DM, 2006), y la LH es secretada a su vez por la acción de GnRH sobre su receptor hipofisario (Bing Y., 2003), siendo esta última molécula blanco de los inmunógenos diseñados en el presente proyecto. Diversos estudios miden el éxito de vacunas anticonceptivas a través de la determinación de testosterona sanguínea (Ferro VA, 2004) (Janett F., 2012) (Robbins S.C., 2004) (Walker J., 2007), encontrando una menor concentración de este esteroide en los individuos inmunizados posterior a la vacunación. Robbins et al. (2004) en cachorros de gato doméstico y Jannet (2012) en becerros reportan una reducción en las concentraciones de testosterona en aquellos animales que generaron una respuesta inmune contra GnRH. Entonces, tuvimos la oportunidad de medir las concentraciones de testosterona durante desarrollo de nuestros grupos al acercarse a la pubertad y comparar en dos momentos durante su desarrollo, esperando encontrar una menor concentración y variación de testosterona al final del ensayo en los animales inmunizados. Sin embargo, las concentraciones de testosterona no difirieron entre grupos pero estuvieron dentro de los niveles (1 a 5 ng/ml) reportados para la raza Nueva Zelanda (Moor y Younglai, 1975). Paralelamente, se dio seguimiento al peso y ejes testiculares longitudinal y transversal. Las tres variables mostraron aumento respecto a la medición previa hasta finalizar el ensayo (datos no mostrados) y al comparar cada variable al final del ensayo se demostró que no hubo diferencia significativa entre el peso total de los animales, ni en las mediciones testiculares atribuibles a la (Ferro VA, 2004) Ferro (2004) utilizó ratas y ratones púberes para la inoculación de vacunas contraceptivas, tomando como una de sus variables a medir el eje transversal testicular y (Janett et al. (2012) hace una medición similar con la circunferencia escrotal en becerros, dada la disposición pendulante de las gónadas del bovino,

con el mismo fin. Ambos estudios revelan disminución en las dimensiones macroscópicas testiculares en comparación con sus controles al final de sus respectivos estudios, y resultados igualmente disminuidos para la presencia de lumen, espermatozoides y concentración de testosterona. Al sacrificar a los conejos nuevamente medimos los testículos y encontramos que el epidídimo y una almohadilla grasa están adheridas a un polo del testículo y no pueden ser distinguidos del testículo cuando se hace la medición transescrotal (datos no presentados). Por lo que pensamos que para esta especie la medición de los testículos no es tan precisa como para especies con escroto pendulante.

La evaluación histológica de los testículos arrojó resultados acorde con la concentración de testosterona, ya que se observó la misma proporción de túbulos seminíferos con espermatozoides o lumen entre grupos tratados y control, concluyendo que todos los animales del estudio manifestaron el mismo grado de desarrollo sexual. La presencia de lumen en el interior del túbulo seminífero, así como la estratificación del epitelio germinal, es un signo de inicio de la pubertad, con el consecuente inicio de espermatogénesis (García - Tomás M., 2009) (Avelar G.F., 2010) (Russell L.D., 1989). García – Tomás (2009) describe la proporción de túbulos seminíferos con lumen en su interior a diferentes edades desde el nacimiento hasta la edad adulta del conejo, siendo los adultos (a las 33 semanas de edad), animales con un lumen desarrollado en por lo menos 64.8% de los túbulos seminíferos en cortes transversales y de estos 52.4 % de estos con presencia de espermatozoides. Ferro VA, (2004), Khan M.A.H., (2007), Janett F., (2012) y Robbins S.C., (2004) entre otros investigadores han utilizado la presencia de espermatozoides en el túbulo seminífero como una variable para medir la eficacia de vacunas contraceptivas. Ellos reportan que la vacunación contraceptiva disminuyó la concentración de testosterona, y ausencia en el desarrollo de lumen en el túbulo seminífero; y cuando el estudio inicia con animales adultos con túbulos seminífero ya desarrollado la ausencia de espermatozoides. Ferro et al., (2004) hace una comparación entre especies con una vacuna dirigida contra GnRH, donde observan que los animales que no generan anticuerpos manifiestan desarrollo testicular normal, mientras que aquellos que responden, manifiestan azoospermia.

El presente estudio inició la inmunización en conejos pre púber y fueron sacrificados a las 20 semanas de edad, siendo todavía púberes según García - Tomás M. (2009), quien considera conejos púberes a animales entre 14 y 24 semanas y maduros a partir de las 25 semanas de edad.

Después de los resultados obtenidos proponemos que una estrategia más simple para evaluar el efecto de la inoculación de nuevos inmunógenos sobre la función sexual puede ser el uso de animales adultos (Ferro VA, 2004) (Walker J., 2007).

La secuencia de la vacuna genómica debe ser incorporada a la célula para que la proteína que servirá como antígeno se produzca. En nuestro estudio la producción endógena del péptido recombinante como antígeno no se pudo confirmar con las metodologías realizadas. Sin embargo, la presencia del fragmento a expresar dentro del vector se confirmó mediante PCR de punto final aunque no fue posible la secuenciación del mismo. La detección de la proteína en el cultivo bacteriano en condiciones desnaturizantes fue detectada por un anticuerpo comercial diseñado contra la etiqueta de histidinas (Harris J.D., 1999) (Aminian A., 2007) (Srivastava M., 1999) (Khan

MA, 2008). Sin embargo, dado a que la marca de esta banda no fue clara pensamos que es necesario confirmar la secuencia del vector de expresión y posteriormente confirmar la producción de la proteína.

La falla para encontrar la proteína expresada en los cultivos bacterianos no se puede asumir como un fracaso en la transfección y expresión en los animales de estudio ya que se utilizaron vectores diferentes para cada objetivo (pCI-neo como vector de expresión en mamíferos y pET-11a para la expresión bacteriana). La eficacia de expresión del vector en cultivos de mamíferos no se cuantificó en este ensayo, se asumió la expresión sostenida del antígeno en los animales inoculados, pero sería importante comprobar el intervalo de expresión y la localización de la proteína producida para tener certeza de que los individuos transfectados estuvieron en contacto con el antígeno.

Los datos acerca de la eficacia de expresión, cuantificación de la proteína expresada e intervalo de expresión se puede realizar en cultivos celulares mamíferos (Harris J.D., 1999) (Densmore C.L., 2000) (Masotti A., 2009) (Choudhury S., 2009) para tener una idea aproximada del tiempo y concentración a la que estaría expuesto el animal transfectado al antígeno de interés. Con la metodología utilizada, se puede alcanzar hasta 85 % de expresión en las células transfectadas. Diversos autores (Kaptein et al, (2008) (Choudhury S., 2009), (Harris J.D., 1999) (Khan M.A.H., 2007) (Williams B.B., 2008)) reportan un protocolo de inmunización que incluye en el diseño del DNA, además de la secuencia de la molécula de interés, de una molécula luminiscente como reportera (Ni J, et al., 2009)) de la producción exitosa del antígeno que puede de una manera no intrusiva demostrar la incorporación de la vacuna y la producción de la proteína de interés. En nuestros ensayos se controló la cantidad de ADN inoculado, el sitio de inoculación y se asumió que la transfección ocurriría dado a que la inoculación de ADN plasmídico (ADNp) desnudo ha demostrado ser suficiente para insertarse en el tejido inoculado. Adicionalmente, se realizó electroporación en el sitio de inoculación inmediatamente después de la inyección y esta estrategia ha demostrado mejorar hasta 20 veces la expresión de la proteína transfectada en las células inoculadas in vitro e in vivo (Medi B.M., 2005) (Herweijer H., 2003) (Masotti A., 2009).

Al final de este proyecto se lograron 4 construcciones de ADN plasmídico para expresión en células mamíferas, confirmadas por secuenciación automática que contienen la primera asa del receptor de GnRH canino y epítomos inmunogénicos reportados como eficaces para generar respuesta inmune específica. Estandarizar la tasa de expresión de dichos vectores y aumentar u obtener la proteína a través de estos vectores en cultivos celulares para su purificación posterior y uso como antígeno directo en individuos y como antígeno para evaluación serológica, permitirá corroborar los resultados arrojados en el presente documento, o bien refutarlos. Obtener la secuencia de bases de la construcción clonada en el vector de expresión bacteriana y estandarizar el método de expresión, es una propuesta que debe de considerarse como un método más simple para obtener proteínas recombinantes y en mayor escala que aquellos sistemas basados en cultivo de células mamíferas con el fin de comparar la inoculación de proteínas recombinantes y ADN plasmídico.

ANEXO 1

Análisis bioinformático para la construcción de vacunas de ADN contra el primer dominio extracelular del receptor de GnRH canino flanqueado por epítomos del toxoide tetánico

El análisis bioinformático arrojó una secuencia de 99 bases para el fragmento de GnRHR-exr. Considerando los sitios de corte para endonucleasas de restricción añadidos a cada iniciador, el amplicón generado constó de 116 bp. La construcción con el epítomo p2 precediendo al GnRHR-exr (p2 – GnRHR-exr) generó amplicones de 161 bp; la construcción con GnRHR-exr seguida por la secuencia del epítomo p30 (GnRHR-exr-p30) generó amplicones de 179 bp y la construcción con ambo epítomos, p2 – GnRHR-exr – p30, amplicones de 224 bp. El Cuadro complementario 1 reporta la secuencia de bases de los iniciadores diseñados para generar las construcciones.

Cuadro complementario 1 Secuencia de Iniciadores para Clonar en GnRHR – exr y los Epítomos Fusionados al Mismo

Nombre del Iniciador	Secuencia de bases (3' a 5')
GnRHR-exr-F (delantero)	TTCTAGA ATG GCA AGC GCC TCC CTG AAC
GnRHR-exr-R (reverso)	TTCTAGA TTA AGA TAA GGT CAG GGT GGG GAG
P2GnRHR-F (delantero)	TTCTAGA ATGCAGTATATAAAAGCAAATTCTAAATTTATAGGTATA ACT GAA ATGGCAAGCGCCTCTCCTGAAC
P30GnRHR-R (reverso)	CTCCCCA CCCTGACCTTATCTGGGTTAATAATTTTACCGTTAGCTTTTG GTTGAGGGTTCCTAAAGTATCTGCTAGTCATTTAGAATAATCTAGAA

Secuenciación del plásmido GnRHR-exr/pGEM – T

La Ilustración complementaria 1 muestra la pantalla del electroferograma correspondiente a la reacción de secuenciación del vector pGEM-T/GnRHR-exr y la Ilustración complementaria 2 el alineamiento de la secuencia obtenida comparada con la secuencia de referencia en la base de información genética GenBank. La lectura de secuencia en el vector de clonación corresponde al 100% con la secuencia reportada previamente.

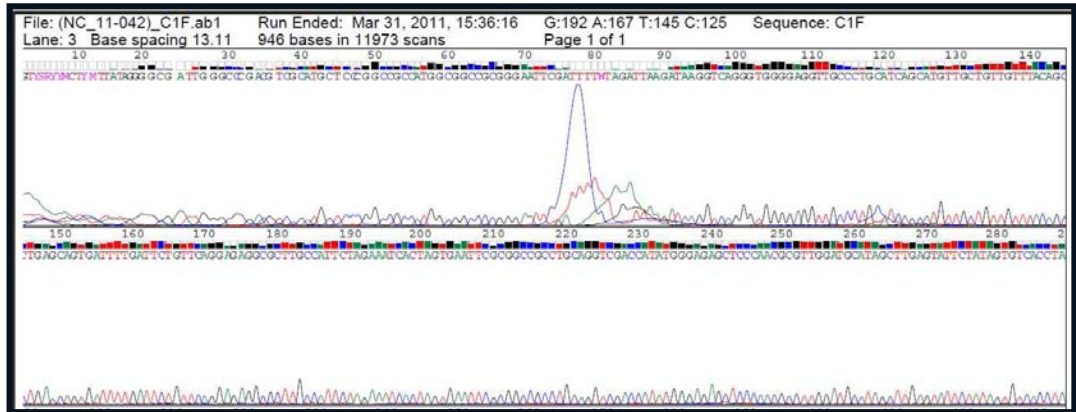


Ilustración complementaria 1. Electroferograma generado por la lectura del plásmido pGEM-T/GnRHR-exr. Las ondas uniformes muestran la correspondencia de cada base según el color de éstas.

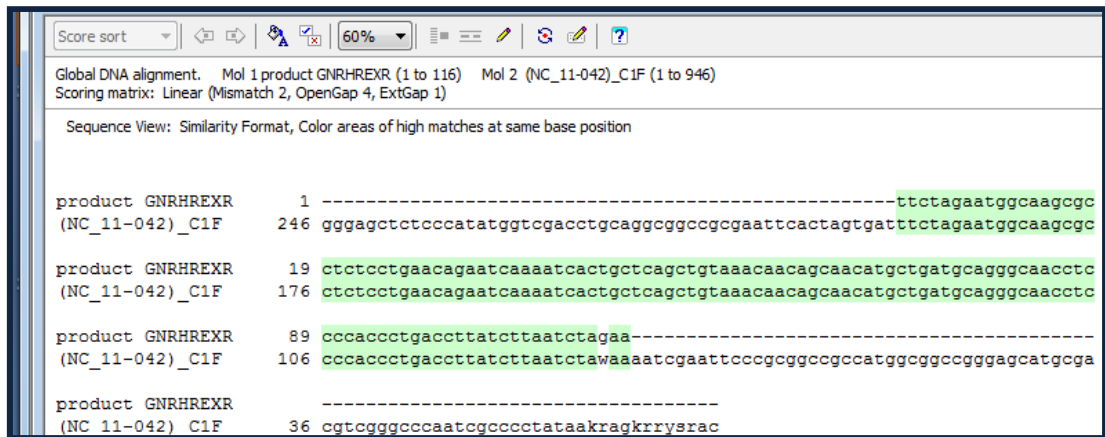


Ilustración complementaria 2. Comparación de la secuencia obtenida por la reacción de secuenciación del plásmido pGEM-T/GnRHR-exr con la secuencia reportada previamente en el banco de información genética GenBank mostrando 100 % de homología .

Secuenciación de ADN plasmídico en el vector de expresión en mamíferos pCI neo

La Ilustración complementaria 3 muestra el correcto alineamiento y homología al 100% de 2 clonas de la construcción GnRHR – exr / pCIneo secuenciadas con las secuencias virtuales de la región extracelular del receptor y una clonación virtual de dicha secuencia insertada en vector de expresión en mamíferos pCI neo. Se confirma la correcta clonación del fragmento de interés en el vector de expresión en mamíferos.



Ilustración complementaria 3. Comparación de secuencias dentro del marco abierto de lectura para la construcción GnRHR-exr – pCI neo. De arriba hacia abajo: Primera secuencia: clona virtual GnRHR-exr/pCI neo en dirección 3’- 5’; segunda y tercera secuencias: electroferogramas para dos clones de GnRHR-exr/pCI neo; cuarta secuencia: Secuencia virtual de GnRHR-exr. Las dos clones secuenciadas muestran homología entre sí y con las secuencias virtuales.

La Ilustración complementaria 4 muestra el alineamiento de una clona secuenciada y la comparación con la construcción virtual para la construcción p2-GnRHRexr/pCI neo. Se confirma correspondencia entre ambas secuencias.

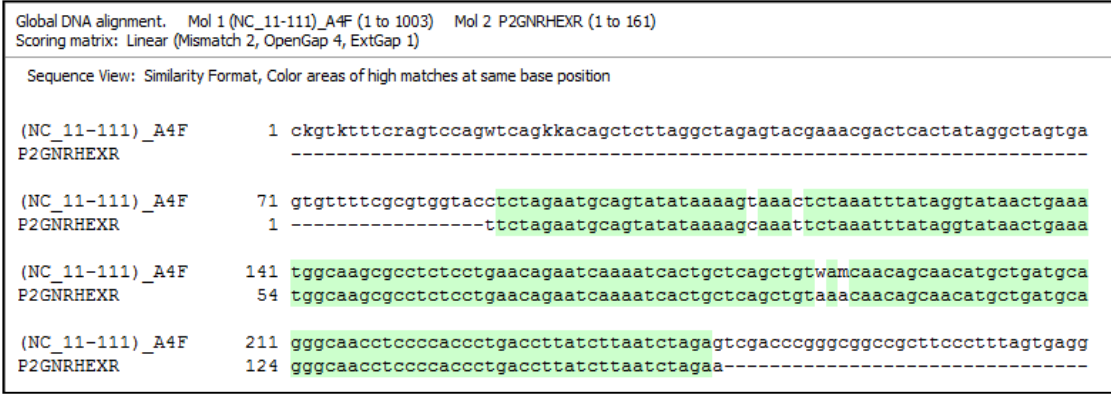


Ilustración complementaria 4. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción p2-GnRHRexr. Alineamiento de la secuencia obtenida en electroferograma con la secuencia virtual esperada. Se observa coincidencia entre secuencias a partir de la base 89 de la lectura obtenida hasta la base 247 de la misma.

La Ilustración complementaria 5 muestra el correcto alineamiento de la clona virtual con la secuencia obtenida de una clona que arrojó amplicones en la orientación positiva en la reacción de PCR punto final para la construcción GnRHRexr-p30/pCI neo. La homología es del 100%.

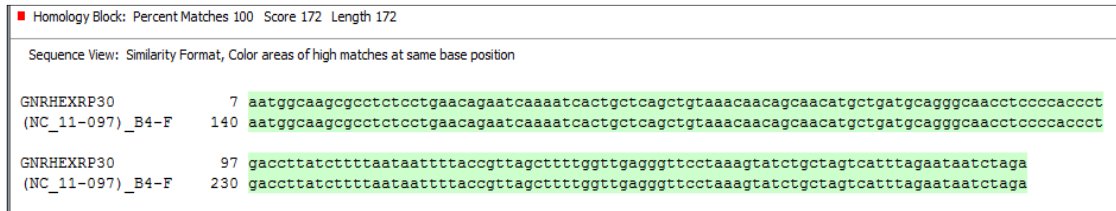


Ilustración complementaria 5. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción GnRHRexr-p30. Alineamiento de la secuencia obtenida en electroferograma con la secuencia virtual esperada. Fila superior: Clona virtual. Fila inferior: lectura de ADN plasmídico. Se observa coincidencia entre secuencias a partir de la base 140 de la lectura obtenida hasta la base 311 de la misma.

La Ilustración complementaria 6 muestra el correcto alineamiento de la clona virtual con la secuencia obtenida de una clona que arrojó amplicones en la orientación positiva en la reacción de PCR punto final para la construcción p2-GnRHRexr-p30/pCI neo. La homología entre secuencias es del 100%.

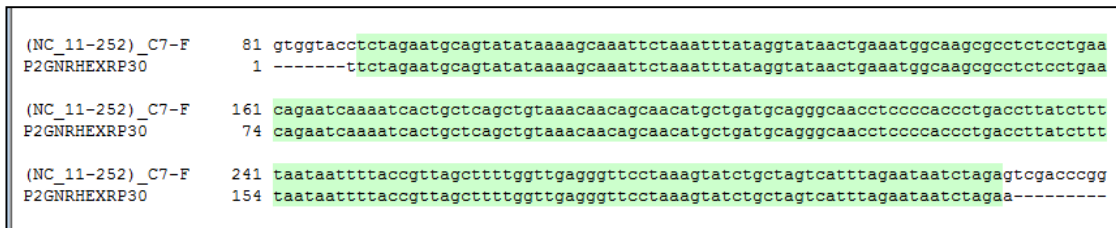


Ilustración complementaria 6. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura en el vector de expresión en mamíferos pCI neo para la construcción p2-GnRHRexr-p30. Secuencia en la fila superior: Lectura de ADN plasmídico. Fila inferior: Secuencia virtual esperada. Se observa coincidencia entre secuencias a partir de la base 89 de la lectura obtenida hasta la base 310 de la misma.

ANEXO 2

Detalles del trabajo de biología molecular para la construcción de la vacuna génica contra el receptor de GnRH canino flanqueado por epítopos del toxoide tetánico

La Ilustración complementaria 7 muestra la electroforesis que confirma la presencia de ADN genómico obtenido a partir de leucocitos sanguíneos caninos. La concentración de ADN obtenida fue de 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$ con una pureza de 1.71. A partir de este ADN se inició la amplificación de la primera región extracelular del receptor de GnRH.

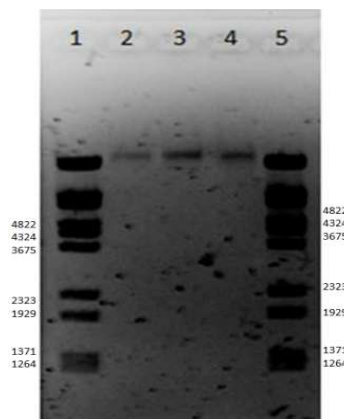


Ilustración complementaria 7. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1%: extracción de ADN genómico. Carriles 1 y 5: Marcador de peso molecular $\lambda\text{BSte II Hind}$ digest. Carriles 2, a 4: ADN de alto peso molecular.

Amplificación del fragmento GnRHR-exr mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final

Después de realizar una evaluación de gradiente de temperaturas de alineamiento, las temperaturas ideales de amplificación se reportan en el Cuadro complementario 2. La Ilustración complementaria 8 muestra la amplificación del fragmento GnRHR-exr.

Cuadro complementario 2 Condiciones de Temperatura Para Amplificar el Fragmento GnRHR-exr

Desnaturalización inicial (°C / Min)	Desnaturalización (°C / seg)	Alineamiento (°C / seg)	Amplificación (°C / seg)	Ciclos de Amplificación	Extensión final (°C/min)
94 / 5	94 / 30	58 / 30	72 / 30	30	72 / 15

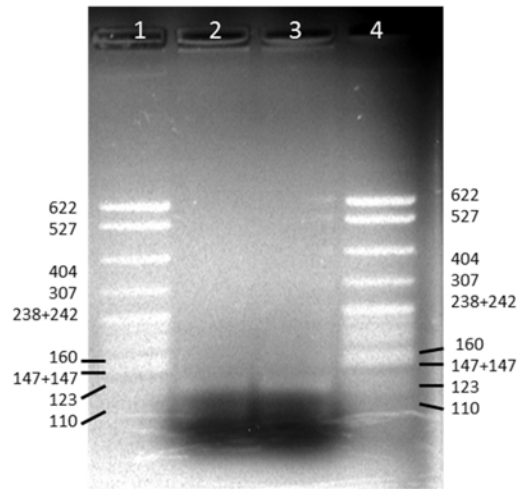


Ilustración complementaria 8 . Análisis electroforético en gel de agarosa al 3.5 %. Amplificación del fragmento GnRHR - exr

Clonación del fragmento GnRHR-exr en un vector de clonación T

La Ilustración complementaria 9 muestra la amplificación de GnRHR-exr a partir de las colonias de *E. coli* DH5 α positivas por el marcador de color negativo a galactosidasa (colonias blancas), donde se encontraron fragmentos de aproximadamente 116bp.

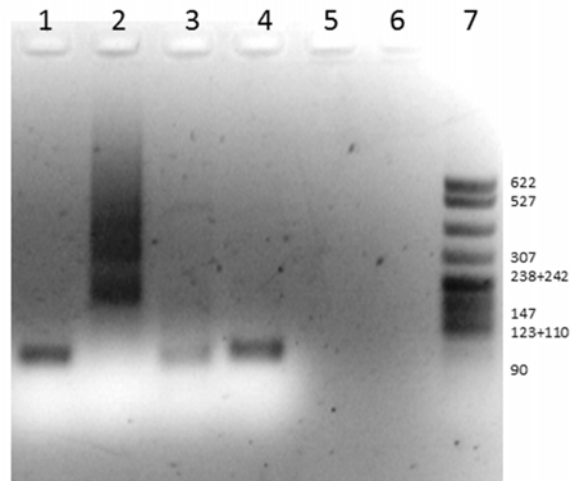


Ilustración complementaria 9. Análisis electroforético de productos de PCR en gel de agarosa al 3%: amplicones correspondientes al fragmento GnRHR-exr. Carriles 1 y 7: MPM PBR 322 MspI. Carriles 1, 3 y 4 amplicones en el peso esperado; carriles 2 y 5 reacciones sin amplicones; carril 6: control negativo de la mezcla de reacción.

La ilustración complementaria 10 muestra el ADN plasmídico a partir de una mini preparación de ADN de 9 ml. Se observaron plásmidos en diferentes configuraciones a lo largo de cada carril.

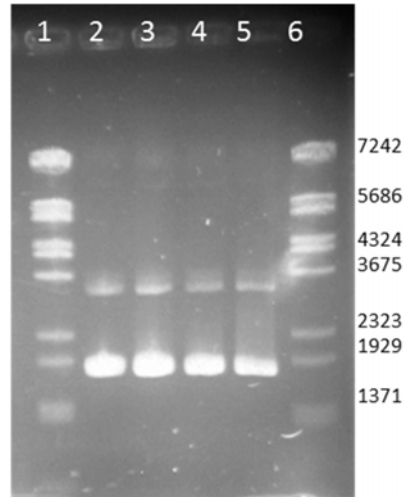


Ilustración complementaria 10. Análisis electroforético en gel de agarosa 1%. Recuperación de plásmidos. Clona GnRHR -exr / pGEM T. Marcador de peso molecular λ BSte II Hind digest.

Amplificación de clonas con los epítomos p2 y p30 en 3 configuraciones diferentes mediante PCR Punto Final

Después de realizar una evaluación de gradiente de temperaturas de alineamiento, las temperaturas ideales de amplificación para cada construcción se reportan en el Cuadro complementario 3. La ilustración complementaria 11 muestra los amplicones de cada una de las construcciones a la temperatura de alineación adecuada para cada construcción.

Cuadro complementario 3 Condiciones de temperatura para la amplificación de fragmentos de cada construcción con los epítomos p2 y p30 del toxoide tetánico

Construcción	Desnaturalización inicial (°C / Min)	Desnaturalización (°C / seg)	Alineamiento (°C / seg)	Amplificación (°C / seg)	Ciclos	Extensión final (°C/min)
p2-GnRHRexr	94 / 5	94 / 30	70 / 30	72 / 30	30	72 / 15
GnRHRexr-p30	94 / 5	94 / 30	65 / 30	72 / 30	30	72 / 15
p2-GnRHRexr-p30	94 / 5	94 / 30	68 / 30	72 / 30	30	72 / 15

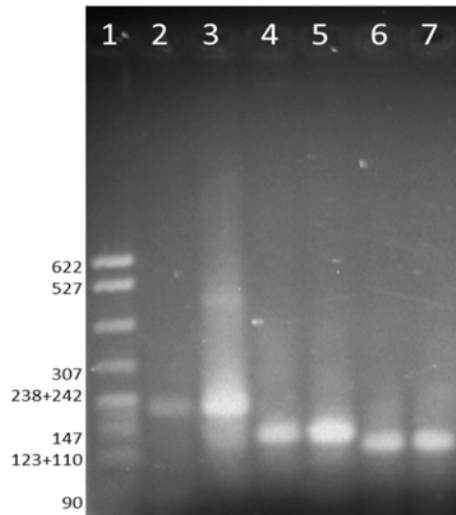


Ilustración complementaria 11. Análisis electroforético de productos de PCR en gel de agarosa al 3%. Carril 1: MPM pBR 322 MspI digest; carriles 2 y 3: amplicón p2-GnRHReXr-p30 (224bp); carriles 4 y 5: amplicón GnRHReXr-p30 (179bp); carriles 6 y 7: amplicón p2-GnRHReXr (161bp). Se observan bandas en los pesos esperados correspondientes a cada construcción.

Clonación de cada construcción en un vector de clonación T

La ilustración complementaria 12 muestra los productos de PCR obtenidos a partir de la evaluación de colonias de bacterias transformadas con el vector pGEM-T/p2-GnRHReXr. Los amplicones corresponden con el peso esperado de 161 bp.

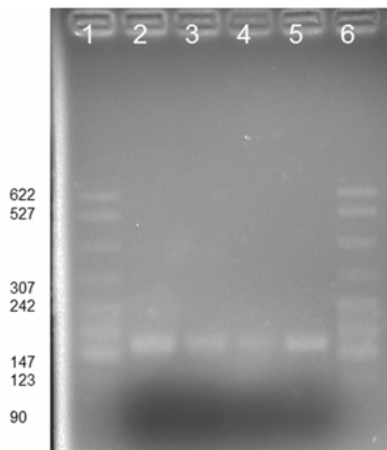


Ilustración complementaria 12 Análisis electroforético de colonias recombinantes en gel de agarosa al 3%. Carriles 1 y 6: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 5: amplicones de colonias transformadas con el plásmido pGEM-T/p2-GnRHReXr. Las muestras en los carriles 2 a 5 muestran amplicones en el peso esperado para el fragmento (161bp).

La ilustración complementaria 13 muestra los productos de PCR de colonias de bacterias transformadas con el vector pGEM-T/GnRHReXr-p30. Los amplicones corresponden con el peso esperado de 179 bp.

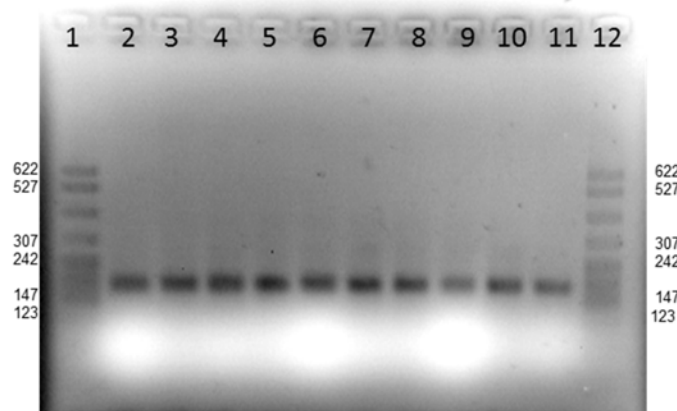


Ilustración complementaria 13. Análisis electroforético de colonias recombinantes en gel de agarosa al 3%. Carriles 1 y 12: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 11: amplicones de colonias recombinantes transformadas con el plásmido pGEM-T/GnRHRexr-p30.

La ilustración complementaria 14 muestra los productos de PCR obtenidos de la evaluación de bacterias transformadas con el vector pGEM-T/p2-GnRHRexr-p30. Los amplicones corresponden con el peso esperado de 224 bp.

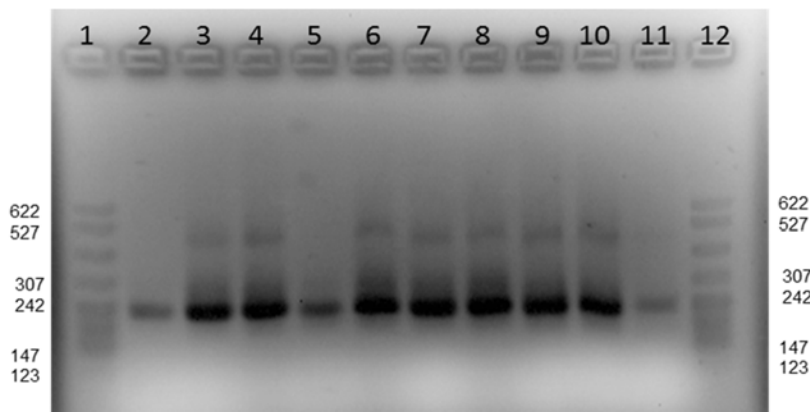


Ilustración complementaria 14 Análisis electroforético de colonias recombinantes en gel de agarosa al 3%. Carriles 1 y 12: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 11: amplicones de colonias recombinantes transformadas con el plásmido pGEM-T/p2-GnRHRexr-p30.

La ilustración complementaria 15 muestra la recuperación de ADN plasmídico a partir de mini preparaciones de ADN de 9 ml. Se observaron plásmidos en diferentes configuraciones a lo largo

de cada carril para cada una de las construcciones, ya que cada construcción tiene pesos diferentes.

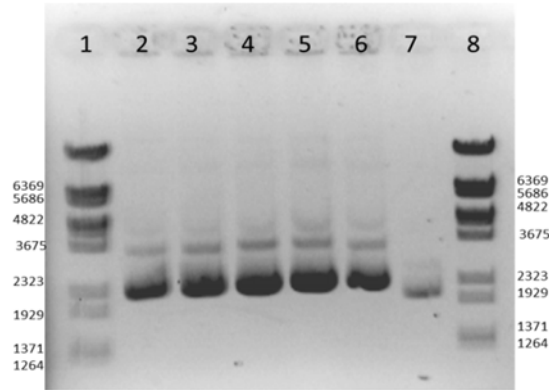


Ilustración complementaria 15. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1%. Recuperación de ADN plasmídico a partir de mini preparaciones de ADN. Carriles 1 y 8: MPM λ BSte II Hind digest. Carriles 2 y 3: Extracciones de la construcción pGEM-T/p2-GnRHRExr; carriles 4 y 5: extracciones de la construcción pGEM-T/GnRHRExr-p30; carriles 6 y 7: extracción de la construcción pGEM-T/p2-GnRHRExr-p30.

Movilización de Clonas al Vector de Expresión en Mamíferos

La ilustración complementaria 16 muestra la evaluación de digestión de los plásmidos pGEM-T con cada construcción. Una vez observados los plásmidos linearizados, se asume que los fragmentos de interés se han liberado.

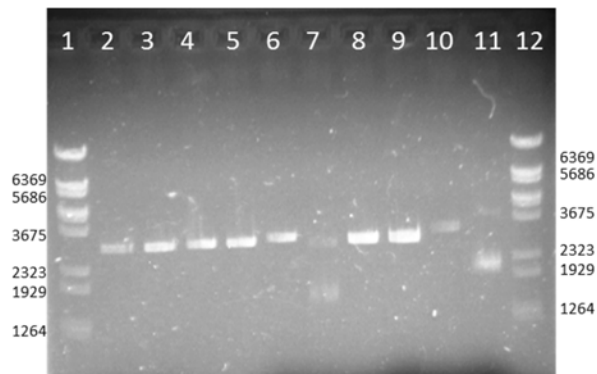


Ilustración complementaria 16 Electroforesis de digestiones del vector pGEM-T con las construcciones para cada vacuna de ADN, con la endonucleasa de restricción XbaI en gel de agarosa 1%. Carriles 1 y 12: MPM λ BSte II Hind digest. Carriles 2 y 3: plásmido pGEM-T/p2-GnRHRExr; carriles 4 y 5: plásmido pGEM-T/GnRHRExr-p30; carriles 6 y 7: plásmido pGEM-T/p2-GnRHRExr-p30; carriles 8 y 9: plásmido pGEM-T/GnRHRExr; carril 10: Plásmido pGEM-T linearizado (control positivo); carril 11: control (clona en plásmido pGEM-T sin digerir).

La ilustración complementaria 17 muestra el fragmento GnRHR-exr liberado después de la reacción de restricción. El fragmento se recuperó para insertarlo en el vector de expresión en mamíferos.

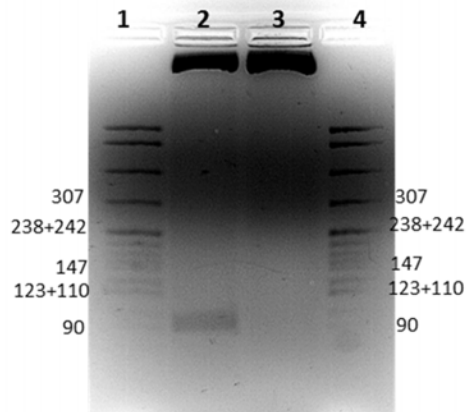


Ilustración complementaria 17. Análisis electroforético de recuperación de fragmentos liberados del vector pGEM-T, con las construcción GnRHR-exr en Gel de agarosa 3.5%. Carriles 1 y 4: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 y 3: plásmido pGEM-T/GnRHR-exr.

La ilustración complementaria 18 muestra los fragmentos liberados a partir de las reacciones de restricción para de los plásmidos pGEM-T con las construcciones p2-GnRHRexr y GnRHRexr-p30. A pesar de la diferencia en peso, se recuperaron para insertarlos al vector de expresión en mamíferos y confirmar su secuencia posteriormente.

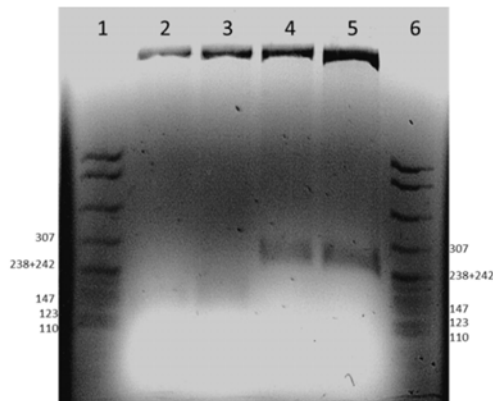


Ilustración complementaria 18 Análisis electroforético en gel de agarosa al 3% para la recuperación de fragmentos liberados del vector pGEM-T, con las construcciones p2- GnRHR-exr y GnRHR-p30. Carriles 1 y 6: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 y 3: construcción p2-GnRHRexr. El fragmento esperado es de 161bp. Las bandas observadas coinciden con el peso esperado. Carriles 4 y 5: construcción GnRHR-p30. El peso esperado de los fragmentos liberados es de 179bp.

La ilustración complementaria 19 muestra los fragmentos liberados a partir de las reacciones de restricción para el plásmido pGEM-T con la construcción p2-GnRHRexr –p30. La fotografía muestra en los carriles 4 y 5, dos bandas del peso esperado (224 bp), se recuperaron para insertarlas al vector de expresión en mamíferos para confirmar su secuencia.

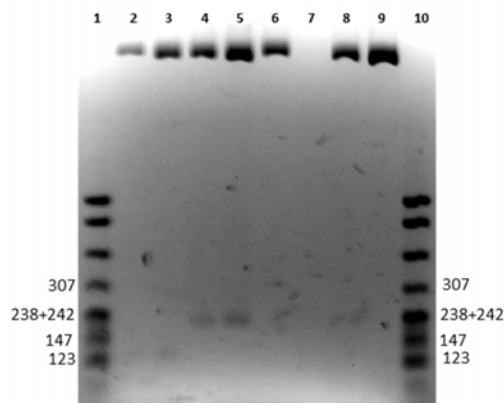


Ilustración complementaria 19 Análisis electroforético en gel de agarosa al 3%: recuperación de fragmentos liberados del vector pGEM-T, construcción p2-GnRHRexr-p30. Carriles 1 y 10: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 9: construcción p2-GnRHRexr-p30. El fragmento esperado es de 224bp. Las bandas observadas en los carriles 4 y 5 coinciden con el peso esperado.

Evaluación de clonas recombinantes en el vector de expresión en mamíferos pCI neo

La ilustración complementaria 20 muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a GnRHR-exr. Se evaluaron todas las colonias obtenidas de la reacción de transformación bacteriana.

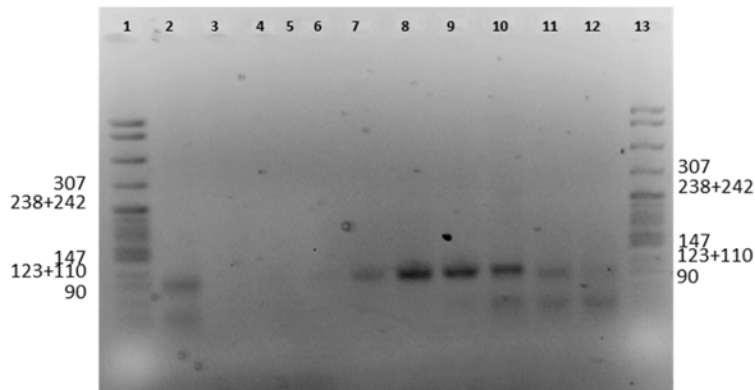


Ilustración complementaria 20 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5%: productos de PCR para la construcción GnRHR-exr – pCI neo. Carriles 1 y 13: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 13: amplicones. Carriles 1 a 6 y 12 no se observan amplicones. Carriles 7 a 11: se observan bandas en el peso esperado.

La ilustración complementaria 21 muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a la construcción p2-GnRHRexr. Se evaluaron todas las colonias obtenidas de la reacción de transformación.

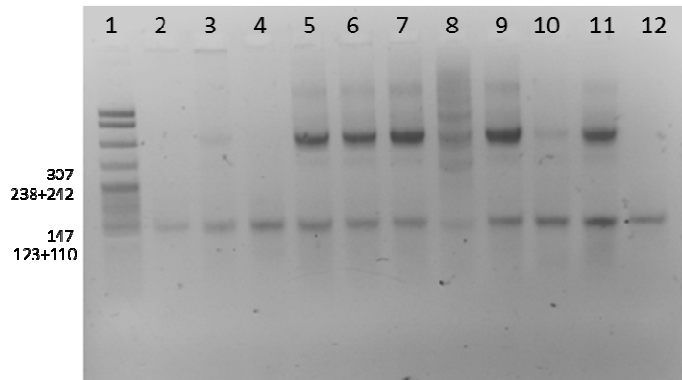


Ilustración complementaria 21 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5%: productos de PCR para la construcción p2-GnRHRexr en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carril 1: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 12: productos de Se esperan fragmentos de 152 bp. Todos los carriles muestran amplicones en el peso esperado. Los carriles 5 a 11 muestran además bandas inespecíficas.

La ilustración complementaria 22 muestra la amplificación de fragmentos correspondientes a la construcción GnRHRexr-p30. Se evaluaron todas las colonias obtenidas de la reacción de transformación.

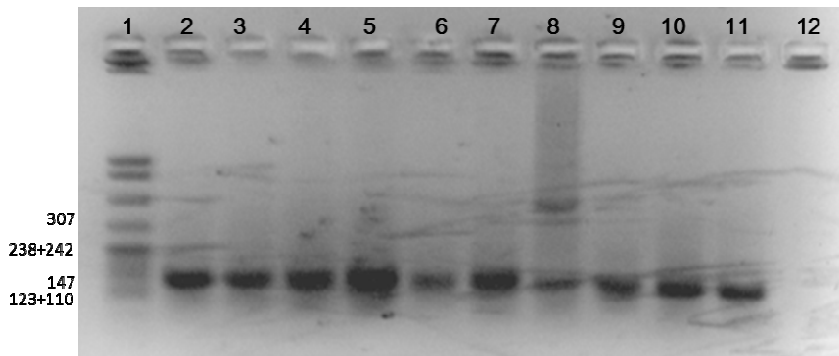


Ilustración complementaria 22 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5%. De productos de PCR para la construcción GnRHRexr-p30 en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carril 1: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 11: productos de PCR. Carril 12: control negativo de la mezcla de reacción. En los carriles 2 a 11 se observan amplicones que coinciden con el peso esperado de 179bp. La clona evaluada en el carril 8 muestra además una amplificación inespecífica de mayor peso.

La ilustración complementaria 23 muestra amplicones correspondientes a la construcción p2-GnrHRexr-p30. Se evaluaron todas las colonias obtenidas de la reacción de transformación.

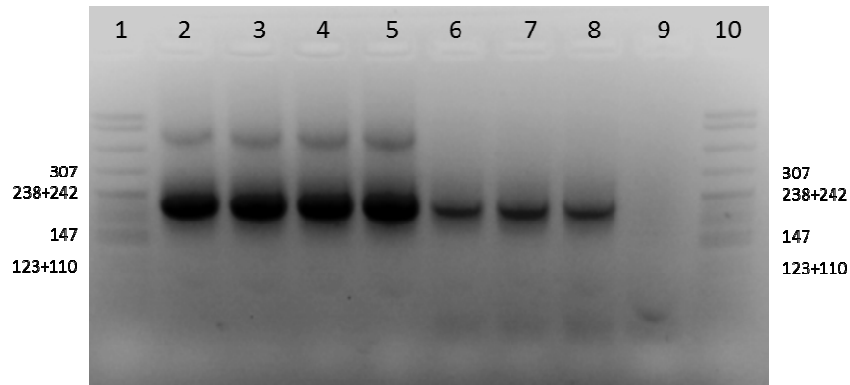


Ilustración complementaria 23 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5%: productos de PCR para la construcción p2- GnRHR-exr -p30- pCI neo. Carriles 1 y 10: MPM pBR 322 MspI digest. Carriles 2 a 8: productos de PCR. En los carriles 2 a 5 se observan amplicones en el peso esperado de 224 bp y otros amplificados inespecíficos. Los carriles 6 a 8 muestran amplicones únicamente en el peso esperado. Carril 9: control negativo de la mezcla de reacción.

La ilustración complementaria 24 muestra extracciones de ADN plasmídico correspondiente a la construcción GnRHR/pCI neo.

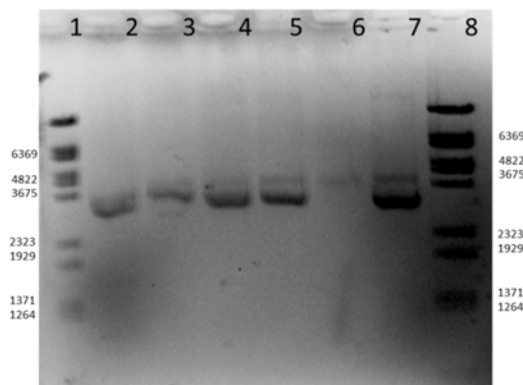


Ilustración complementaria 24 Análisis electroforético en gel de agarosa al 1%: extracción de ADN plasmídico GnRHR-exr en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carriles 1 y 8: MPM λ BStE II Hind digest. Carriles 2 a 7: extracción de ADN a partir de plásmido.

La ilustración complementaria 25 muestra extracciones de ADN plasmídico correspondiente a la construcción p2-GnRHRexr / pCI neo.

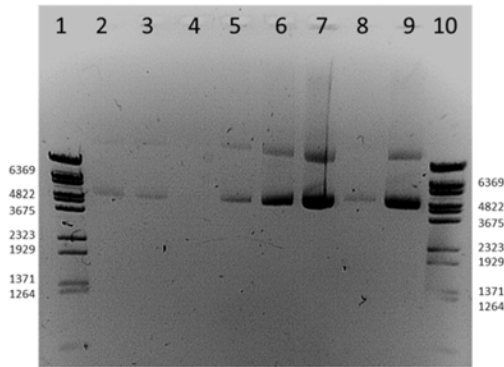


Ilustración complementaria 25 Análisis electroforético en gel de agarosa 1%: extracción de ADN plasmídico. Construcción p2-GnRHRexr en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carriles 1 y 10: MPM λ BStE II Hind digest. Carriles 2 a 9: extracción de ADN a partir de plásmido.

La ilustración complementaria 26 muestra extracciones de ADN plasmídico correspondientes a la construcción GnRHRexr-p30/pCI neo.

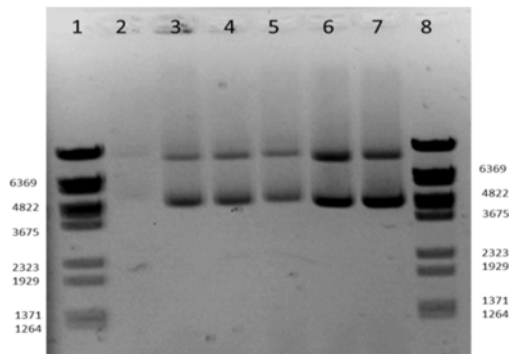


Ilustración complementaria 26 Análisis electroforético en gel de agarosa 1%. Extracción de ADN plasmídico para la construcción GnRHRexr-p30 en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carriles 1 y 8: MPM λ BStE II Hind digest. Carriles 2 a 7: extracción de ADN a partir de plásmido.

La ilustración complementaria 27 muestra extracciones de ADN plasmídico correspondientes a la construcción p2-GnRHRexr-p30/pCI neo.

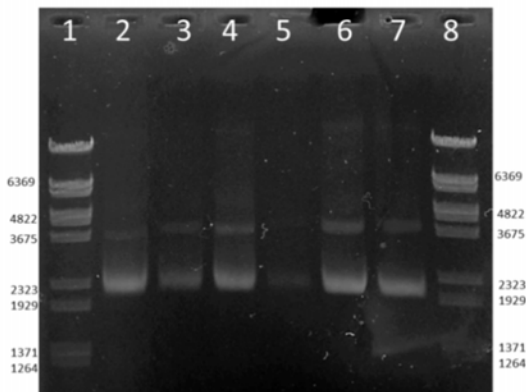


Ilustración complementaria 27 Análisis electroforético en gel de agarosa 1%: extracción de ADN plasmídico para la construcción p2-GnRHRexr-p30 en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carriles 1 y 8: MPM λ BStE II Hind digest. Carriles 2 a 7: extracción de ADN a partir de plásmido.

La ilustración complementaria 28 muestra los amplicones obtenidos de la evaluación de orientación de secuencia dentro del marco de lectura para la clona GnRHR-exr/pCI neo.

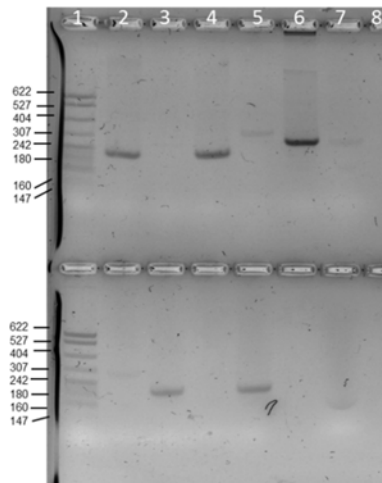


Ilustración complementaria 28. Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5 %: productos de PCR. Evaluación de orientación de las clonas dentro del marco de lectura para la construcción GnRHR-exr- pCI neo. Fila superior: orientación correcta; se esperan bandas de 212 bp. Fila inferior: orientación incorrecta. Carril 1: MPM pBR 322 Hind digest. Carriles 2 y 4: orientación positiva. Carriles 5, 6 y 7: amplicones más pesados; no se consideran adecuados. Carriles 3 y 4: orientación incorrecta. Carril 8: control negativo de reactivos en la mezcla de reacción. Se utilizó el ADN de las clonas 2 y 4 para secuenciar.

La ilustración complementaria 29 muestra la evaluación de la extracción de ADN libre de endotoxinas para la clona GnRHR-exr/pCI neo. El carril 4 muestra bandas de ADN que sugieren que la capacidad de captura de ADN de la columna se rebasó.

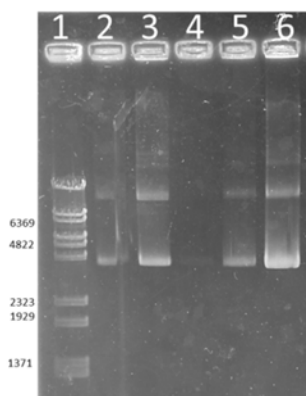


Ilustración complementaria 29 Electroforesis en gel de agarosa 1%: purificación de ADN plasmídico libre de endotoxinas. Construcción GnRHR-exr/pCI neo. Carril 1: MPM λ BSte II Hind digest. Carril 2: lisado de cultivo bacteriano. Carril 3: recuperación de ADN después de filtrar. Carril 4: Solución de lavado de columna de retención. Carril 5: Elusión de ADN de la columna. 6: ADN plasmídico libre de endotoxinas concentrado.

La ilustración complementaria 30 muestra la evaluación de orientación dentro del marco de lectura para la clona p2-GnRHRexr/pCI neo. El fragmento esperado para la orientación adecuada

es de menor tamaño porque el iniciador para alinearse en el extremo 3' cae dentro de la secuencia del receptor y no del epítipo p2.

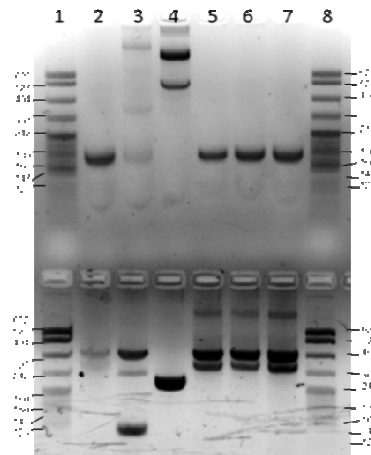


Ilustración complementaria 30 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5 %: productos de PCR para la orientación de clonas dentro del marco de lectura de la construcción p2-GnRHRexr/pCIneo. Fila superior: orientación correcta; se esperan bandas de 167 bp. Fila inferior: orientación incorrecta; se esperan 212 bp. Carriles 1 y 8: MPM pBR 322 Hind digest. Carriles 2, 5, 6 y 7 muestran amplicones en el peso y orientación positiva. Carriles 3 y 4: amplicones inespecíficos. Las clonas 2, 5, 6 y 7 se secuenciaron.

La ilustración complementaria 31 muestra la evaluación de la extracción de ADN libre de endotoxinas para la clona p2-GnRHRexr/pCI neo.

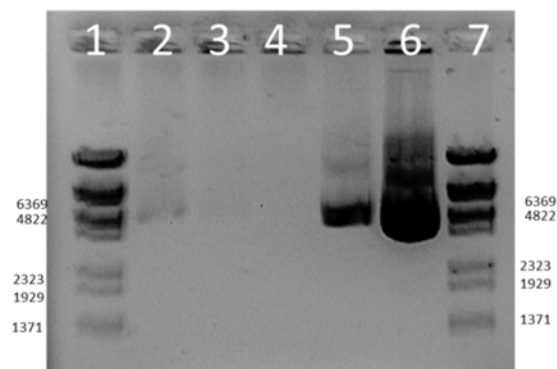


Ilustración complementaria 31 Electroforesis en gel de agarosa 1%. Evaluación de la Purificación de ADN plasmídico libre de endotoxinas. Construcción p2-GnRHRexr en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carril 1: MPM λ BStE II Hind digest. Carril 2: lisado de cultivo bacteriano. Carril 3: recuperación de ADN después de filtrar. Carril 4: Solución de lavado de columna de retención. Carril 5: Elusión de ADN de la columna. 6: ADN plasmídico libre de endotoxinas concentrado. En el carril 4 se aprecian bandas de ADN que sugieren que la capacidad de captura de la columna se rebasó.

La ilustración complementaria 32 muestra la evaluación de orientación de secuencia dentro del marco de lectura para la clona GnRHRexr-p30/pCI neo. A pesar de que los amplicones obtenidos se muestran ligeramente por arriba del peso esperado de 220 bp, se tomaron las clonas que arrojaron estos fragmentos para secuenciar.

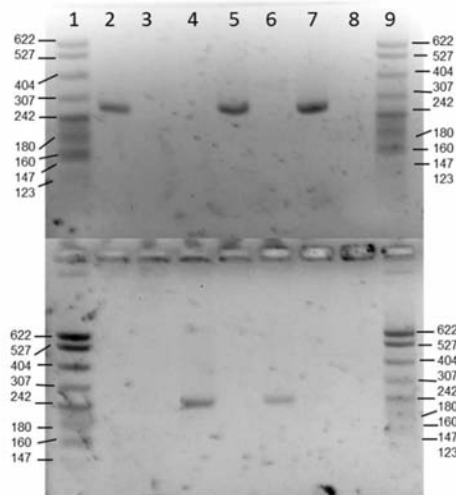


Ilustración complementaria 32 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5 %: orientación dentro del marco de lectura para la construcción GnRHRexr-p30/pCI neo. Fila superior: orientación correcta. Fila inferior: orientación incorrecta. Se esperan bandas de 220 bp. Carriles 1 y 9: MPM pBR 322 Hind digest. Carriles 2, 5 y 7: amplicones en el peso esperado en la orientación positiva. Carril 3: no se obtuvieron amplicones. Carriles 4 y 6: amplicones en el sentido inverso. Carril 8: control negativo de la mezcla de reacción.

La ilustración complementaria 33 muestra la evaluación de la extracción de ADN libre de endotoxinas para la clona de la construcción GnRHRexr-p30/pCI neo.

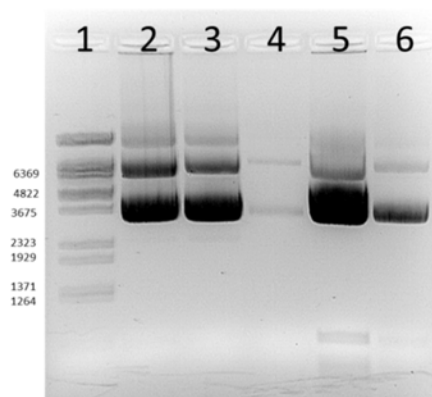


Ilustración complementaria 33 Electroforesis en gel de agarosa 1%: purificación de ADN plasmídico libre de endotoxinas. Construcción GnRHRexr-p30/pCI neo. Carril 1: MPM λ BStE II Hind digest. Carril 2: lisado de cultivo bacteriano. Carril 3: recuperación de ADN después de filtrar. Carril 4: Solución de lavado de columna de retención. Carril 5: Elusión de ADN de la columna. 6: Concentración de ADN plasmídico libre de endotoxinas. En el carril 4 se aprecian bandas de ADN que sugieren que la capacidad de captura de ADN de la columna se rebasó.

La ilustración complementaria 34 muestra los amplicones obtenidos de la evaluación de orientación de secuencia dentro del marco de lectura para la clona p2-GnRHRexr-p30/pCI neo.

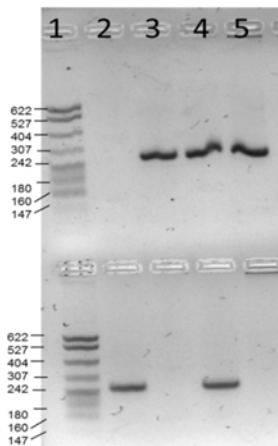


Ilustración complementaria 34 Análisis electroforético en gel de agarosa 3.5 %: productos de PCR para la evaluación de orientación de las clonas para la construcción p2-GnRHRexr-p30/pCI neo. Fila superior: orientación correcta. Fila inferior: orientación incorrecta. Se esperan bandas de 263 bp. Carril 1: MPM pBR 322 Hind digest. Carriles 2 y 4 amplicones en el peso esperado en la orientación inversa. Carriles 3, 4 y 5: amplicones en la orientación correcta. Sólo se utilizaron los plásmidos de las clonas 3 y 5 para secuenciar ya que el plásmido de la clona 4 mostró amplicones en el peso esperado en ambas orientaciones.

La ilustración complementaria 35 muestra la evaluación de la extracción de ADN libre de endotoxinas para la construcción p2-GnRHRexr-p30/pCI neo.

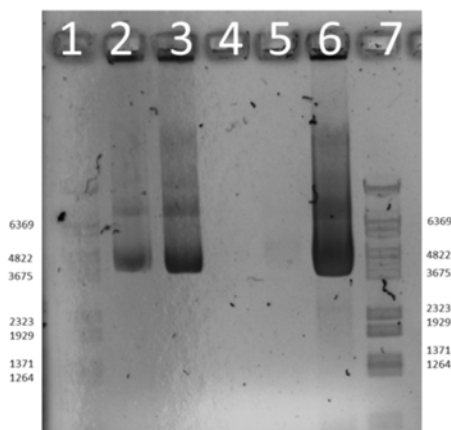


Ilustración complementaria 35 Evaluación de la purificación de ADN plasmídico libre de endotoxinas. Construcción p2-GnRHRexr-p30 en el vector de expresión en mamíferos pCI neo. Carriles 1 y 7: MPM λ BStE II Hind digest. Carril 2: lisado de cultivo bacteriano. Carril 3: recuperación de ADN después de filtrar. Carril 4: Solución de lavado de columna de retención. Carril 5: Elusión de ADN de la columna. 6: Concentración de ADN plasmídico libre de endotoxinas. Gel de agarosa 1%.

ANEXO 3

Detalles del trabajo de biología molecular para la clonación de la secuencia p2 – GnRHRexr-p30 – His en el vector de expresión bacteriana pET 11, expresión proteica y confrontación de sueros con la proteína recombinante

La ilustración complementaria 36 muestra los amplicones obtenidos para la construcción p2-GnRHRexr-p30-His a partir de la construcción p2-GnRHRexr-p30/pCIneo.

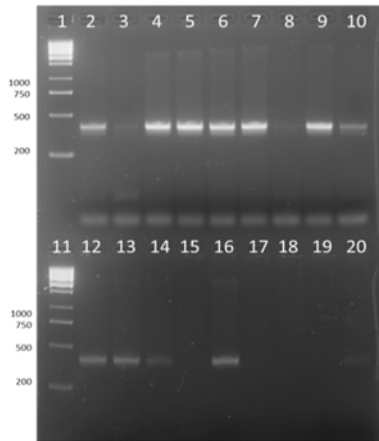


Ilustración complementaria 36 Análisis electroforético en gel de agarosa al 3 %: productos de PCR para obtener el fragmento p2 – GnRHR-exr – p30 – His. Se esperan bandas de 243 bp. Carriles 1 a 4: amplicones inespecíficos. Carriles 5 y 6: amplicones en el peso esperado. Carril 7: MPM pBR 322 Hind digest.

La ilustración complementaria 37 muestra el amplicón de la construcción p2-GnRHRexr-p30-His recuperado a partir de la purificación de productos de PCR de gel de agarosa.

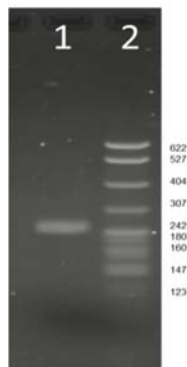


Ilustración complementaria 37 Análisis electroforético en gel de agarosa al 3 %: productos de PCR purificados de geles de agarosa para el fragmento p2 – GnRHR-exr – p30 – His. El peso esperado es de 243 bp. Carriles 1: banda en el peso esperado. Carril 2: MPM pBR 322 Hind digest.

La ilustración complementaria 38 muestra la evaluación de clonas recombinantes en el vector de clonación pTZ 57 R/T.

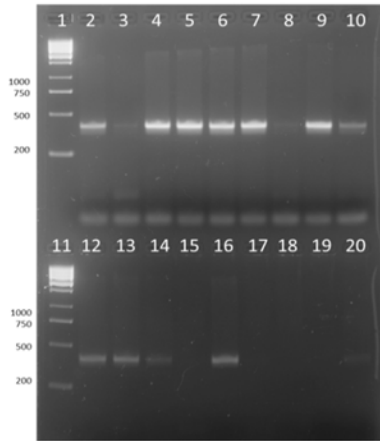


Ilustración complementaria 38 Análisis electroforético en gel de agarosa 3 %: productos de PCR de clonas recombinantes para la construcción p2 – GnRHR-exr – p30 – His/pTZ 57 R/T. El peso esperado es de 371 bp. Se evaluaron 20 clonas; los amplicones observados corresponden al peso esperado. Carriles 1 y 11: MPM 1kb Gene Ruler 1kb DNA ladder, Fermentas.

La ilustración complementaria 39 muestra el análisis electroforético de la recuperación de ADN plasmídico correspondiente a las clonas recombinantes para p2 –GnRHR-exr – p30 –His / pTZ 57 R/T.

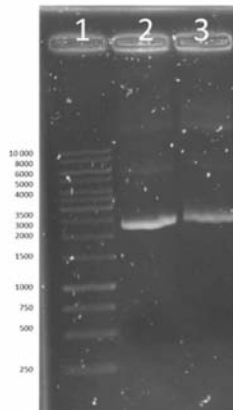


Ilustración complementaria 39. Análisis electroforético en gel de agarosa 1 %: Recuperación de ADN plasmídico de la clona p2 – GnRHR-exr – p30 – His/pTZ 57 R/T. Carril 1: MPM 1kb Gene Ruler 1kb DNA ladder, Fermentas. Carriles 2 y 3: ADN plasmídico de dos clonas con la construcción p2 – GnRHR-exr – p30 – His/pTZ 57 R/T.

El Cuadro complementario 4 muestra la cuantificación de ADN plasmídico realizada por espectrofotometría.

**Cuadro complementario 4 Determinación de la Concentración y Pureza de ADN Plasmídico.
Clona p2-GnRHR-exr-p30 His en el vector PTZ 57 R/T**

ADN*		Pureza	
Absorbancia (260 nm)	Concentración de ADN (µg/ml)	Absorbancia (280 nm)	Pureza (Abs 260nm / Abs 280nm)
0.054	1.78	0.073	1.77

El protocolo de doble digestión para liberar el fragmento p2 – GnRHR-exr – exr – p30 – His del vector de clonación T se resume en el Cuadro complementario 5.

Cuadro complementario 5 Protocolo de doble digestión para obtener el fragmento P2-GnRHRexr-P30His clonado en el vector PTZ 57 R/T

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
ADN plasmídico	1.78 µg/µl	700 µg
Bam HI	50 u/µl	1 u/µg
NdeI	20 u/µl	1 u/µg
Buffer de restricción	10 X	1 X
BSA	100 X	1
Agua		Cbp 120 µl

La ilustración complementaria 40 muestra el plásmido con la construcción p2 – GnRHR-exr – p30 – His / pTZ 57 R/T linearizado después del proceso de restricción.

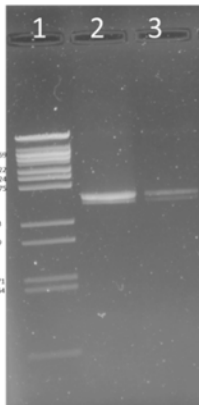


Ilustración complementaria 40. Análisis electroforético en gel agarosa al 1 %: reacción de restricción. Carril 1: MPM λ BStE II Hind digest. Carriles 2 y 3: Vector pTZ 57 R/T con la construcción p2 – GnRHR-exr – p30 – His. En ambos carriles se observa una sola banda del peso aproximado del vector (2886 bp), sugeriendo de que el fragmento clonado en el vector ha sido liberado.

La ilustración complementaria 41 muestra la recuperación del fragmento liberado a partir de la reacción de restricción de la construcción p2 – GnRHR-exr – p30 – His del vector pTZ 57 R/T. Y el Cuadro complementario 6 el protocolo de ligación al vector de expresión bacteriana.

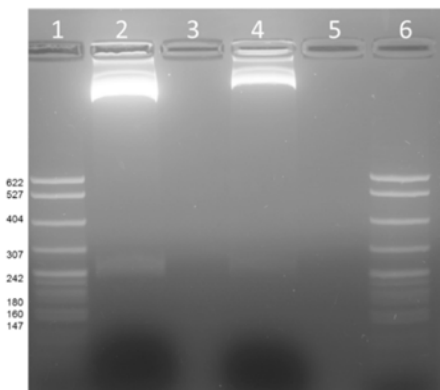


Ilustración complementaria 41 Análisis electroforético en gel de agarosa al 3 %: recuperación de fragmentos liberados de reacciones de restricción. Carriles 1 y 3: MPM pBR 322 Hind digest. Carriles 2 y 4: banda correspondiente con el peso del fragmento p2 – GnRHR-exr – p30 – His de 242 bp. Carriles 3 y 5: vacío.

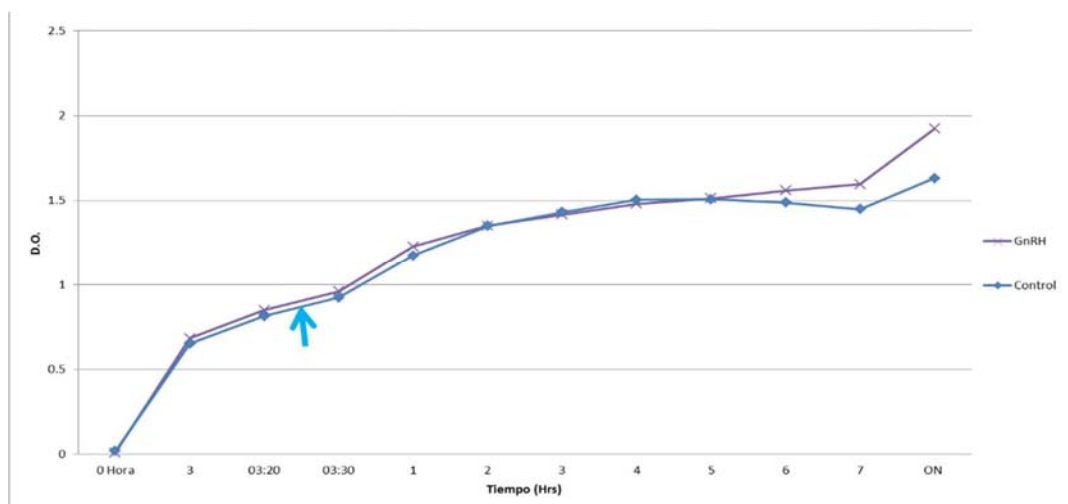
Cuadro complementario 6 Protocolo de Ligación en el vector pET 11a

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final
ADN del vector	50 ng/ μ l	100 ng
T4 DNA ligasa	1 u/ μ l	1 u
ADN construcción		100 ng
Buffer de ligación	10 X	1 X
Agua		Cbp 20 μ l

Inducción de proteínas

La gráfica complementaria 1 muestra el crecimiento del cultivo bacteriano para la inducción de la proteína recombinantes p2 – GnRHR – exr – p30 – His, contra un control. Se tomaron alícuotas cada hora después de la inducción hasta la séptima hora y posteriormente una más después de toda la noche. Se muestra la curva de crecimiento del cultivo hasta alcanzar una OD de 1. La flecha indica el momento de inducción con IPTG.

Gráfica complementaria 1 Ensayo de Inducción de Proteínas Recombinantes



El Cuadro complementario 7 resume el protocolo utilizado para generar los geles de acrilamida utilizados para la electroforesis de proteínas.

Cuadro complementario 7 Preparación de geles de acrilamida al 15 % ⁷²

Reactivo	Gel Concentrador	Gel Resolvedor
Agua bidestilada	3 ml	6.08 ml
SDS 10%	50 µl	150 µl
Tris pH 8.8 1.5M		3.75 ml
Tris pH 6.8 1 M	1.26 ml	
Acrilamida 30%	0.66 ml	4.95 ml
Per sulfato de amonio 10%	25 µl	75 µl
TEMED	5 µl	7.5 µl
Volumen final	5 ml	15 ml

Análisis electroforético de inducción de proteínas

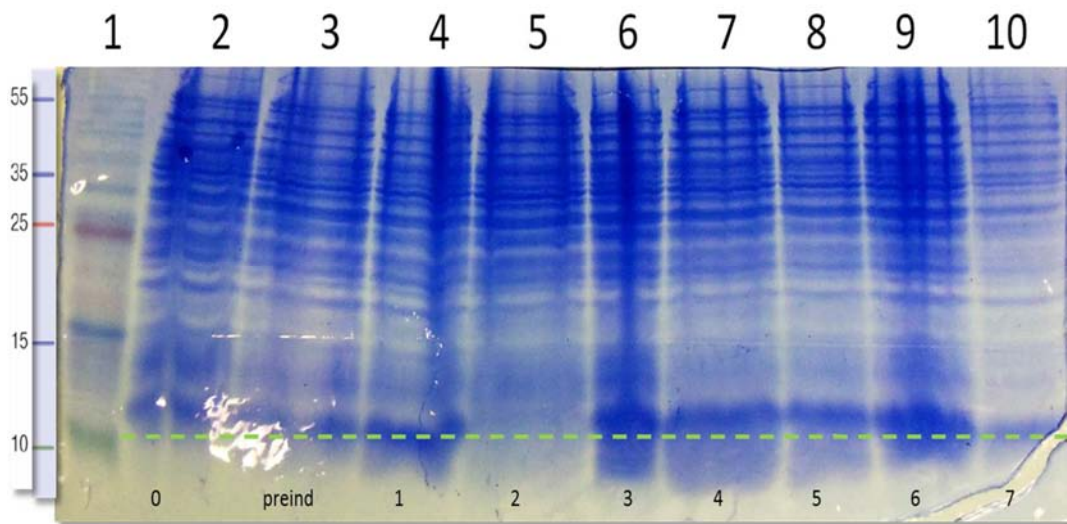
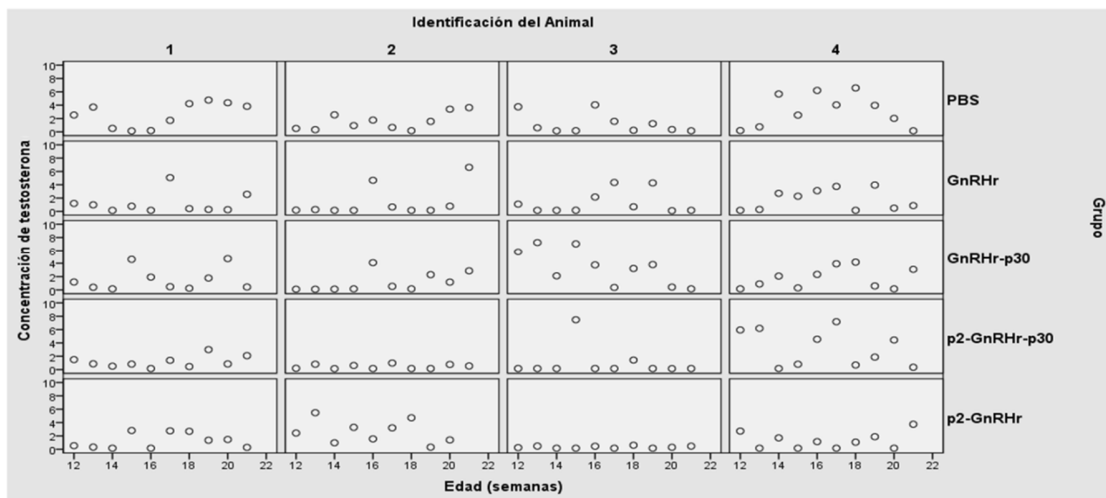


Ilustración complementaria 42 Expresión de proteínas recombinantes. Se muestra las alícuotas correspondientes al ensayo de inducción de proteínas. Carril 1: MPM Fermentas Protein Ladder #SM1811. Carril 2: inicio de expansión, carril 3, alícuota 3 horas post expansión, carril 4 alícuota post inducción (1 hora post inducción) carriles 5 a 10: alícuotas post inducción tomadas con intervalo de 1 hora. Gel acrilamida 15%.

Anexo 4 Concentración de testosterona por grupo e individuo

La Gráfica complementaria 2 reporta la concentración de testosterona sérica por individuo y grupo a lo largo del ensayo.

Gráfica complementaria 2 Concentración individual de testosterona total por grupo



Anexo 5 Evaluación de cortes histológicos

La Ilustración complementaria 10 ejemplifica los cortes histológicos evaluados por grupo para determinar la presencia de lumen o de espermatozoides.

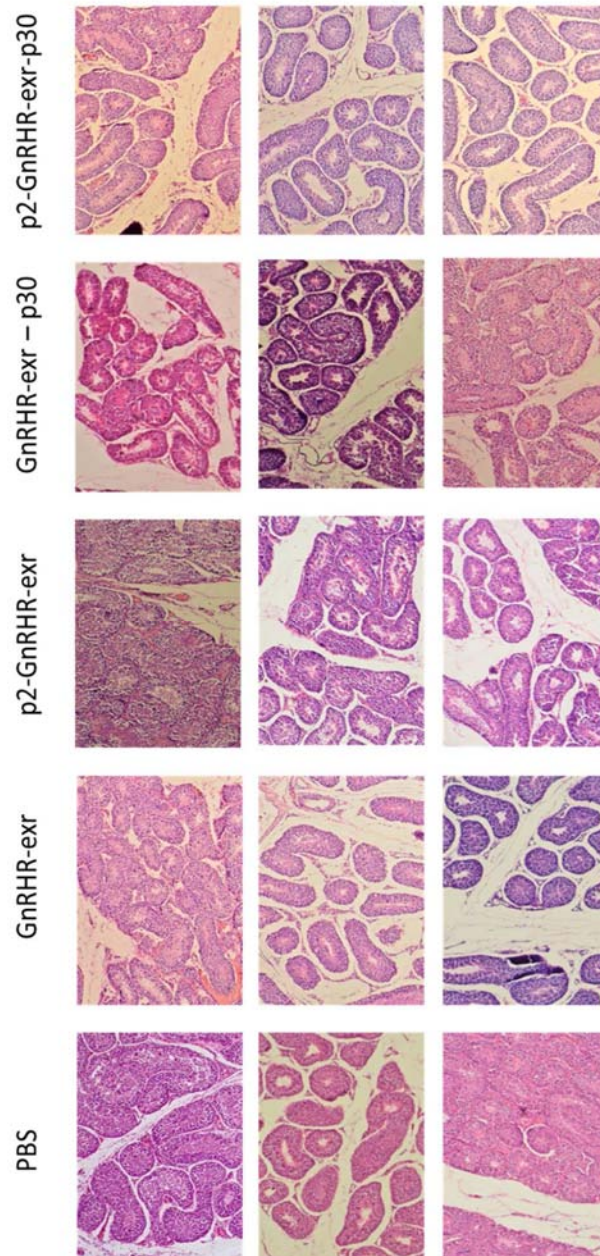


Ilustración complementaria 10

5. Bibliografía

- ¹ Ahlers MJ. Fecal 20-oxo-pregnane concentrations in free ranging African elephants (*Loxodonta africana*) treated with porcine zona pellucida vaccine. *Theriogenology* 78 (2012) 77-85.
- ² Samoylova T, Cochran AM, Samoylov AM, Schmera B, Breiteneicher AH, Ditchkoff SS, Petrenko VA, Cox NR. Phage display allows identification of a zona pellucida – binding peptides with species – specific properties: Novel approach for development of contraceptive vaccines for wildlife. *Journal of Biotechnology* 162; 2-3 (2012) 311-318.
- ³ McLaughlin E., Aitken R. Is There a Role for Immunocontraception? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 335 (2011) 78 – 88.
- ⁴ Bradley MP. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *Journal of Biotechnology* 73 (1999) 91-101.
- ⁵ Fayerer-Hosken RA. Immunocontrol in dogs. *Reproduction Science* 60-61 (2000) 365-373.
- ⁶ Jagadish N, Rana R, Mishra D, Garg M, Selvi R, Suri A. Characterization of immune response in mice to plasmid DNA encoding human sperm associated antigen 9 (SPAG9). *Vaccine* 24 (2006) 3695-3703.
- ⁷ Honggang et al. Immunization of male mice with B-cell epitopes in transmembrane domains of CatSper1 inhibits fertility. *Fertility and Sterility* Vol 97, No.2, February 2012. Doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.043
- ⁸ Bender SC, Bergman DL, Wenning KM, Miller LA. No adverse effects of simultaneous vaccination with the immunocontraceptive GonaCon™ and a commercial rabies vaccine on rabies virus neutralizing antibody production in dogs. *Vaccine* 27 (2009) 7210 – 7213.
- ⁹ Sad S, Chauhan VS, Arunan K, Raghupathy R. Synthetic Gonadotrophin – releasing hormone (GnRH) vaccines incorporating GnRH and synthetic T – helper epitopes. *Vaccine* 11 (1993) 1145 – 1150.
- ¹⁰ Levy JL, Mansour M, Crawford C, Pohajdak B, Brown RG. Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology* 63 (2005) 1334 – 1341.
- ¹¹ Srivastava N, Santhanam R, Sheela P, Mukund S, Thakral SS, Malik BS, Gupta SK. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli* – expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction* 123 (2002) 847 – 857.
- ¹² Ellerman DA, Busso D, Maldera JA, Cuasnicú PS. Immunocontraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. *Fertility and Sterility* 89 (2008) 199 – 205.
- ¹³ Nikolovski S, Lloyd M, Harvey N. Overcoming innate host resistance to vaccination: Employing a genetically distinct strain of murine cytomegalovirus avoids vector-mediated resistance to virally vectored immunocontraception. *Vaccine* 27 (2009) 5226-5232.
- ¹⁴ Serrano H, García Suárez MD. Alteraciones en ovarios de perras pro inmunización activa contra proteínas de ovocito de cerdo. *Revetmex* Vol 32, #003; 221 – 224.
- ¹⁵ Rangarajan PN. DNA Vaccines. *Resonance* (2002) 25 – 34.
- ¹⁶ Rao AJ. Contraceptive Vaccines: current status and problems in mass application. *Current Science*, Vol 100, #5. 10. March 2011.
- ¹⁷ Purswell BJ, Kolster KA, Immunocontraception in companion animals. *Theriogenology* 66 (2006) 510-513.
- ¹⁸ Dalla Villa P., et al. Free roaming dog control among OIE-member country. *PREVETMED* (2010). Artículo en prensa.
- ¹⁹ Kirkpatrick JF, Rowan A, Lamberski N, Wallace R, Frank K, Lyda R. The practical side of immunocontraception: zona proteins and wildlife. *Journal of Reproductive Immunology*. 83 (2009) 151-157.
- ²⁰ Tasker L. Internal document: guidance for WSPA staff and member societies: Non-surgical methods for controlling the reproduction of dogs and cats.
- ²¹ Asamblea Legislativa del Distrito Federal, IV Legislatura. Artículo 4, fracción XXXVIII, Ley de Protección a los Animales del Distrito Federal. 26 de febrero, 2002.

-
- ²² Secretaría de Salud. Programa de Acción: Rabia. Secretaría de Salud, 2001. 1ª Edición. México.
- ²³ Pérez M. La sobrepoblación de perros no domiciliados: un problema social vinculado con la difícil tarea de educar. *Temas de Ciencia y tecnología*; enero-abril 2009. PP.: 45-48.
- ²⁴ Martínez MA. Atención médica de niños con lesiones por mordedura de perro. *Bol Hosp Infan Edo Son* 17 (1): 10-12.
- ²⁵ Secretaría de Salud; Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Programa de Acción Específico 2007 – 2012: Rabia y otras Zoonosis. 2008, México.
- ²⁶ Ortega – Pacheco A. La sobrepoblación canina: un problema con repercusiones potenciales para la salud humana. *Rev Biomed* 2001; 12:290 - 291.
- ²⁷ Chedrese PJ. Introduction to the molecular organization of the endocrine/reproductive system. En *Reproductive Endocrinology: A molecular approach*. Editorial Springer Science; 2009. New York, USA. Pp: 3 – 11.
- ²⁸ Teresaka T, Otsuka F, Tsukamoto N, Nakamura E, Inagaki K, Toma K, Ogura – Ochi K, Gildewell – Kenney C, Lawson M, Makino H. Mutual Interaction of Kisspeptin, Estrogen and Bone Morphogenetic Protein 4 activity in GnRH regulation by GT1-7 Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 381 (2013) 8 – 15.
- ²⁹ Chowdhury I, Ridaran R. GnRH-GnRH Capítulo 13: Receptor System in the Mammalian Female Reproductive Tract. En Chedrese Pedro J. *Reproductive Endocrinology, a Molecular Approach*. Springer Science + Business Media, New York, EUA 2009. Pp: 131 – 136.
- ³⁰ Reichler IM, Welle M, Sattler U, Jöchle W, Roos M, Hubler M, Barth A, Arnold S. Comparative quantitative assessment of GnRH – and LH – receptor mRNA expression in the urinary tract of sexually intact and spayed female dogs. *Theriogenology* 67 (2007) 1134 – 1142.
- ³¹ Bing Yao, WeiQuan H, YuFeng H, YingXia C, YongMei W, HongJun L, RuoLei P, Lei W, RongQin Z. A study on the localization and distribution of GnRH and its receptor in rat submaxillary glands by immunohistochemical in situ hybridization and RT-PCR. *Life Sciences* 72 (2003) 2895 – 2904.
- ³² *Canis lupus familiaris* gonadotropin – releasing hormone receptor (GNRHR) Gene. Consultado por última vez el 21 de mayo, 2013. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=403718.
- ³³ *Canis lupus familiaris* gonadotropin – releasing hormone receptor (GNRHR), mRNA. Consultado por última vez el 20 de mayo, 2013. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001003121.
- ³⁴ Gonadotropin – releasing hormone receptor (*Canis lupus familiaris*). NCBI Reference sequence: NP_001003121.1. Visitado por última vez el 21 de mayo, 2013. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001003121.1
- ³⁵ Cui J, Smith RG, Mount GR, Lo J. Identification of Phe313 of the Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) receptor as a site critical for the binding of nonpeptide GnRH antagonists. *Molec Endol* 14 (2000) 5: 670 – 681.
- ³⁶ Ruf F, Fink MY, Sealson SC. Structure of the GnRH receptor – stimulated signaling network: insights from genomics. *Frontiers of Neuroendocrinology* 24 (2003) 181 – 199.
- ³⁷ Kah O, Lethimonier C., Somoza G., Guilgur LG., Vaillant C., Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical comparative and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology*. 153 (2007) 346 – 364.
- ³⁸ Zheng W, yang J, Jiang Q, He J, Halvorson LM. Liver receptor homologue – 1 regulates gonadotrope function. *Journal of Molecular Endocrinology* (2007) 38, 207 – 219.
- ³⁹ Bing Y, WeiQuan H, YuFeng H, YingXia C, YongMei W, HongJun L, RuoLei P, Lei W, RongQin Z. a study on the localization and distribution of GnRH and its receptor in rat submaxillary glands by immunohistochemical, in situ hybridization and RT-PCR. *Life Sciences* 72 (2003) 2895 – 2904.
- ⁴⁰ Sengupta A, Chakrabarti N, Sridaran R. Presence of immunoreactive Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) and Its Receptor (GNRHR) in Rat Ovary During Pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*. 75 (2008) 6: 1031-1044.

-
- ⁴¹ Jung-Hye Choi, Blake Gils C., Auersperg N, Leung CKP. Immunolocalization of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Type I GnRH Receptor during Follicular Development in the Human Ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (11) 2006; 4562 – 4570.
- ⁴² Ponglowhapan S., Church D.B., Scaramuzzi R.J., Khleid M. Luteinizing hormone and follicle – stimulating hormone receptors and their transcribed genes (mRNA) are present in the lower urinary tract of intact male and female dogs. *Theriogenology* 67 (207) 353 – 366.
- ⁴³ Bahk JY, Hyun JS, Lee H, Kim MO, Cho GJ, Lee BH, Choi WS. Expression of gonadotropin – releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor mRNA in prostate cancer cells and effect of GnRH on the proliferation of prostate cancer cells. *Urol Res* (1998) 26: 259 – 264.
- ⁴⁴ Sofikitis N., Giotitsas N., Tsounapi P., Baltogiannis D., Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 109 (2008) 323-330.
- ⁴⁵ Mesquita M, Fritsch M. Gametogenesis; capítulo 3. En: Galina C, Valencia J. *Reproducción de Animales Domésticos*. 3ª Edición; Limusa; 2008. México D.F. Pp: 43-57.
- ⁴⁶ Ferro VA, Khan MAH, McAdam D, Colston A, Aughey E, Mullen AB, Waterston MM, Harvey MJA. Efficacy of an anti – fertility vaccine based on mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH – I) – a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004 (101); 73 – 86.
- ⁴⁷ Janett F, Gerig T, Tschuor AC, Amatayakul – Chantler S, Walker J, Howard R, Bollwein H, and Thun R. Vaccination against gonadotropin – releasing factor (GnRF) with Bopriva significantly decreases testicular development, serum testosterone levels and physical activity in pubertal bulls. *Theriogenology*. 2012 (78); 182 – 188.
- ⁴⁸ Robbins SC, Jelinski MD, Stotish RL. Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). *Journal of Reproductive Immunology*. 2004 (64); 107 – 119.
- ⁴⁹ Walker J, Ghosh S, Pagnon J, Colantoni C, Newbold A, Zeng W, Jackson DC. Totally synthetic peptide – based immunocontraceptive vaccines show activity in dogs of different breeds. *Vaccine*. 2007 (25); 7111 – 7119.
- ⁵⁰ Densmore CL, Orson FM, Xu B, Kinsey BM, Waldrep C, Hua P, Bhogal B, Knight V. Aerosol delivery of robust polyethylenimine – DNA complexes for gene therapy and genetic immunization. *Molecular Therapy*. 2000 (1); 180 – 188.
- ⁵¹ Kay MA. State of the art gene based therapies: the road ahead. *Nature Reviews*. 2011, (12); 316-328.
- ⁵² Masotti A., Mossa G., Cametti C., Ortaggi G., Bianco A., Del Grosso N., Malizia D., Esposito C. Comparison of different commercially available cationic liposome – lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009 (68), 136 – 144.
- ⁵³ Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. Review. *Gene Therapy*. 2003 (10), 453 – 458.
- ⁵⁴ Ni J, Nolte B, Vandermeulen G, Preat V, Scherman D, Schirr, Acher V, Fournier P. Ear Pinna: A Privileged DNA Electroporation Site for Inducing Strong Th1 Immune Responses. *The Open Cancer Immunology Journal*. 2009 (2); 18 – 30.
- ⁵⁵ Brüggemann et al. The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America*. 2003, 100, 3, 1316-1321.
- ⁵⁶ Keitel Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1₁₉) and T helper epitopes of tetanus toxoid.
- ⁵⁷ Valmori D, Pessi A, Bianchi E, Corradin G. Human Universally Antigenic Tetanus Toxin T cell epitopes as carriers for human vaccination. *Journal of Immunology*. 1992 (149)2: 712-721.
- ⁵⁸ Williams B, Wall M, Yu R, Williams B, Bertoncello I, Kershaw M, Mantamadiotis T, Haber M, Norris M, Gautam A, Darcy P, Ramsay R. Induction of T-cell mediated immunity using a c-Myb DNA vaccine in a mouse model of colon cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008 (57) 11: 1635-1345.

-
- ⁵⁹ Khan MA, Ogita K., Ferro V.A., Kumasawa K., Tsutsui T., Kimura T. Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH – I) and T – helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. *Vaccine*. 2008 (26) 1365 – 1374.
- ⁶⁰ Boyle JS, Lew AM, An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics*. 1995;11(1):8.
- ⁶¹ Medi B.M., Hoselton S., Marepalli R.B., and Singh J. Skin targeted DNA vaccine delivery using electroporation in rabbits I: Efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005 (294) 53 – 63.
- ⁶² Avelar GF, Oliveira CFA, et al. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenology* 2010 (74) 11-23.
- ⁶³ Russell LD, Bartke A, Goh JC. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy* 1989; (184) 179- 189
- ⁶⁴ García -Tomas M. Sánchez J, et. Al. Postnatal sexual developement of testis and epididymis in the rabbit: Growth and maturity patterns of macroscopic and microscopic markers. *Theriogenology* 2009 (71) 292-301.
- ⁶⁵ García - Tomás M., Sánchez J., et al. Post-natal sexual developement of testis ad epididymis in the rabbit: Variability and relationships among macroscopic and microscopic markers. *Animal Reproduction Science* 2009 (110) 347-355.
- ⁶⁶ Ferro V., Khan M., McAdam D., et al. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on Mammalian Gonadotrophin Releasing Hormone (GnRH – I) – histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004 (101) 73 – 86.
- ⁶⁷ Harris J.D., Seid C.A., Fontenot G.K., Liu H.F. Expression and purification of recombinant Human Zona Pellucida Proteins. *Protein Expression and Purification* 1999 (16) 298 – 307.
- ⁶⁸ Aminian A., Sivam S., Lee C.W., Halperin S.A., Lee S.F. expression and purification of a trivalent pertussis toxin – diphtheria toxin – tetanus fusion protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*; 2007 (51) 170 – 178.
- ⁶⁹ Srivastava M., Nayak J., Mehrotra V., Kaul R., Sheela P., Gupta S.K., Panda A.K. High level expression in *Escherichia coli* and purification of immunoreactive recombinant bonnet monkey zone pellucida glycoprotein – 3. *Process Biochemistry*. 1999 (35) 451 – 457.
- ⁷⁰ Calculadora de peso molecular disponible en <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>.
- ⁷¹ QIAexpress Ni-NTA Fast Star Handbook for purification and detection of recombinant 6xHis-tagged proteins. Julio 2011. QIAGEN.
- ⁷² Bio-Rad Handcasting Polyacrylamide Gels. Bulletin 6201. Consultado por última vez el 03/04/2014. Disponible en: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6201.pdf