



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**TESIS:
CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE UN
FRAGMENTO DEL GEN *SPACA1* DEL PERRO
DOMÉSTICO**

**QUE PRESENTA:
JOSÉ ADOLFO PARDO TOVAR**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESORES:
DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA
DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mis padres, por su amor, comprensión y cuidado, porque la educación que me dieron cultivó la esencia de mi persona. Los amo.

A Jocelyn, mi amor, mi mejor amiga, por llenar de felicidad cada instante y dar plenitud a mi vida. Te amo.

A mis hermanos, porque su cariño me mostró el valor de la familia que me acompaña. Siempre están en pensamientos.

A Emma y Roberto, por aceptarme y quererme como un miembro más de su familia.

A Gregorio, por siempre estar dispuesto a ayudarme con las exigencias de esta carrera.

A mis maestros y mentores, los MVZ's Laura Patricia Noé Martínez, Fabiola Esther Gómez Arroyo, Francisco Javier Basurto Alcántara y Antonio Verdugo Rodríguez. Porque han sido las personas más importantes en mi formación, pues me enseñaron el amor por el conocimiento, la investigación, la docencia y el trabajo, por ser mi modelo a seguir, tienen mi más grande admiración.

A Ana, Enrique, Isabel, Lázaro, Luis, Naomi, Ninnet, Raúl, Silvia, Víctor y Yadira; por su amistad y compañía, por hacer del laboratorio, el mejor lugar de trabajo.

A Eru, Luna, Yuna, Pucca, Soma, Momo, Nicky, Lucky, Shiva, Rayitas, Patachín, Duvalín y Terry. A todos los animales sin nombre que ayudaron en mi crecimiento como MVZ y como persona.

A todo aquel que en este pequeño trabajo encuentre, una pizca de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) 201516, así como por el Diplomado en Línea de Vacunología y el Diplomado en Línea de Infectología en Perros y Gatos.

A los miembros del honorable jurado:

MVZ Carlos Fernando Esquivel Lacroix	Presidente
MVZ Alfredo Castañeda Ramírez	Vocal
MVZ Hugo Horacio Montaldo Valdenegro	Secretario
MVZ Francisco Javier Basurto Alcántara	Suplente
MVZ Octavio Mejía Ponce	Suplente

A mis asesores, por sus consejos, por todo el apoyo, confianza y paciencia brindados.

Al Dr. Basurto, por compartir conmigo su noble sueño, por ayudarme a dar este pequeño paso para algún día lograr alcanzarlo.

Al Dr. Verdugo, por enseñarme el pensamiento crítico para aprender a ser una persona de ciencia.

Al M. en C. Lázaro Felipe Verdiguél Fernández, por su invaluable apoyo en el diseño experimental de esta tesis y su asesoría técnica.

Al Dr. Castañeda, por su minuciosa revisión de mi escrito.

A la M. en C. Diana Pérez Covarrubias y al personal de la Clínica Móvil para el Control Reproductivo de Perros y Gatos, por proporcionar las muestras necesarias para la elaboración de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Vacunología y Constatación de Productos Biológicos, por sus consejos y su apoyo.

A los integrantes del Laboratorio de Microbiología Molecular, por su contribución para la constante mejora de este trabajo.

CONTENIDO

Título	Página
Título.....	I
Dedicatorias.....	II
Agradecimientos.....	III
Contenido.....	IV
Cuadros.....	VI
Figuras.....	VII
Abreviaturas.....	IX
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Fertilización en mamíferos.....	2
Tolerancia inmunológica en las gónadas masculinas.....	5
Infertilidad e immunoanticoncepción.....	7
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 (SPACA1).....	11
Justificación.....	16
Hipótesis.....	17
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	19
Material y métodos.....	20
Adquisición de las muestras de tejido testicular canino.....	20
Extracción de ARN a partir de tejido.....	20
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)...	21
Clonación del gen <i>SPACA1</i> en un plásmido comercial y transformación en <i>Escherichia coli</i>	23
Secuenciación del gen <i>SPACA1</i>	24
Predicción de las propiedades estructurales y funcionales de SPACA1.....	24

Título	Página
Resultados.....	25
Extracción de ARN a partir de tejido.....	25
Alineamiento de las secuencias de SPACA1.....	26
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)...	29
Clonación del gen <i>SPACA1</i>	34
Secuenciación del gen <i>SPACA1</i>	38
Predicción de las características estructurales y funcionales de SPACA1.....	40
Discusión.....	49
Conclusiones.....	55
Prospectiva.....	56
Referencias.....	57
Anexo I: Alineamiento del gen <i>SPACA1</i> y del vector pJAPT16.....	63
Anexo II: Metodologías.....	66
Extracción de ARN.....	66
Retrotranscripción (RT).....	68
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	68
Purificación de ADN.....	69
Clonación.....	70
Generación y transformación de <i>E. coli</i> electrocompetentes y quimiocompetentes.....	71
Extracción de ADN plasmídico.....	74
Caracterización de clonas.....	76
Preparación de plásmidos para su envío a la unidad de secuenciación.....	77
Herramientas bioinformáticas.....	77

CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Porcentajes de identidad y coberturas de alineamiento entre las secuencias de aminoácidos predichas para la proteína SPACA1 del perro doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>), y las secuencias del ratón (<i>Mus musculus</i>), del cerdo (<i>Sus scrofa</i>) y del humano (<i>Homo sapiens</i>).....	27
2	Volumen y concentración de los reactivos empleados para la retrotranscripción con el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit®...	31
3	Volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación, mediante RT-PCR, de los genes <i>SPACA1</i> y <i>ACTB</i>	32
4	Condiciones del termociclador para la amplificación mediante RT-PCR del gen <i>ACTB</i>	32
5	Condiciones del termociclador para la amplificación mediante RT-PCR del gen <i>SPACA1</i>	32
6	Volumen de los reactivos empleados para la clonación del gen <i>SPACA1</i> en el vector pET101/D-TOPO®	36
7	Volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación mediante PCR del gen <i>SPACA1</i> clonado en el vector pJAPT16.....	36
8	Condiciones del termociclador para la amplificación mediante PCR del gen <i>SPACA1</i> clonado en el vector pJAPT16.....	36
9	Predicción de la localización, proceso biológico y función de la proteína SPACA1 en el perro doméstico, en el ratón, en el cerdo y en el humano...	40
10	Predicción de epítos lineales y regiones transmembranales en las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, del ratón, del cerdo y del humano.....	47
11	Epítos predichos para las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, del ratón, del cerdo, del humano y consenso de epítos.....	48

FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Reacción acrosomal y fusión de los gametos.....	4
2	Cronología del desarrollo del espermatozoide y del sistema inmune.....	5
3	Inducción de muerte celular mediada por Faslg.....	6
4	Distribución de la capa citoplasmática, regiones y membranas de la cabeza de espermatozoides falciformes.....	13
5	Predicción del patrón electroforético del marcador de tamaño molecular y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del ARN total extraído a partir de testículo de perro.....	25
6	Análisis filogenético de SPACA1.....	28
7	Diagrama del tamaño predicho para el amplicón de <i>SPACA1</i>	29
8	Alineamiento de los iniciadores del fragmento externo y del fragmento interno con la isoforma 3 del ADNc predicho para <i>SPACA1</i>	30
9	Predicción y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la RT-PCR del gen <i>SPACA1</i>	33
10	Predicción y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del amplicón digerido con la enzima <i>BsmI</i>	33
11	Diagrama de la clonación del gen <i>SPACA1</i> en el vector pET101/D-TOPO®.....	35
12	Mapa con la construcción del vector pJAPT16.....	35
13	Predicción y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la PCR del gen <i>SPACA1</i> clonado en el vector pJAPT16.....	37
14	Predicción y fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los vectores pET101/D-TOPO®, pJAPT16 y pJAPT16i digeridos con la enzima <i>BsmI</i>	37
15	Alineamiento de las secuencias de la cadena inversa y de la cadena directa del vector pJAPT16 con la isoforma 3 del ADNc predicho para el gen <i>SPACA1</i>	38

Figura	Título	Página
16	Alineamiento de las secuencias que codifican a las proteínas SPACA1 recombinante y nativa.....	39
17	Predicción de las secuencias de péptido señal en las proteínas SPACA1 del perro doméstico, del ratón, del cerdo y del humano.....	41
18	Predicción de la estructura secundaria de las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, del ratón, del cerdo y del humano.....	43
19	Predicción de la estructura terciaria de las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, del ratón, del cerdo y del humano.....	44
20	Comparación estructural entre el modelo cristalográfico de la proteína IZUMO1 humana y los modelos predichos para las proteínas SPACA1 recombinante y canina.....	45
21	Predicción de la estructura terciaria de la proteína IZUMO1 humana y comparación con su modelo cristalográfico.....	45

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
6X His	epítopo de polihistidina
° C	grado centígrado
A	adenina
AA	aminoácido
<i>ACTB</i>	beta actina (gen)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
<i>AmphipaSeek</i>	<i>Amphipathic In-Plane Membrane Anchors Prediction</i>
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ASB	albúmina de suero bovino
ATP	trifosfato de adenosina
b	base
<i>bla</i>	beta lactamasa (gen)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<i>BsmI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (tb. <i>Geobacillus stearothermophilus</i>), enzima de restricción I
C	citosina
cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
COACH	<i>Consensus Approach for Protein-Ligand Binding Site Prediction</i>
CSP	proteína de circumsporozoito
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

Abreviatura	Significado
ENR	envoltura nuclear redundante
ESG	<i>Extended Similarity Group Method for Automated Protein Function Prediction</i>
ESP	proteína espermática del segmento ecuatorial (tb. SP-ESP)
Fas	receptor Fas
Faslg	Fas ligando (superfamilia del factor de necrosis tumoral, miembro 6)
FSH	hormona folículo estimulante
G	guanina
g	gramo / gravedades
GenBank	<i>National Institutes of Health's genetic sequence database</i>
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
h	hora
I-TASSER	<i>Iterative Threading Assembly Refinement</i>
IZUMO1	proteína de fusión esperma-ovocito Izumo 1
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KCl	cloruro de potasio
KRP1	proteína relaciona con Kelch 1
<i>lacI</i>	represor lac (gen)
<i>lacO</i>	operador lac (gen)
LB	caldo de lisogenia / Luria-Bertani
LBtope	<i>Linear B-cell Epitope Prediction Server</i>
LH	hormona luteinizante
M	molar
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mg	miligramo
mg	miligramo
MgCl ₂	cloruro de magnesio
MgSO ₄	sulfato de magnesio
min	minuto

Abreviatura	Significado
ml	mililitro
mM	milimolar
M-MuLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
<i>Mva</i> 1269I	<i>Micrococcus varians</i> , enzima de restricción I (isoesquizómero de <i>BsmI</i>)
μg	microgramo
μl	microlitro
μM	micromolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio
NS5A	proteína no estructural 5A
ng	nanogramo
nm	nanómetro
pb	pares de bases
pBR322	plásmido Bolívar Rodríguez 322
pBR322 ori	origen de replicación del plásmido Bolívar Rodríguez 322
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	potencial de hidrógeno
PHYLOPFP	<i>Phylogenomics Based Protein Function Prediction Server</i>
<i>rop</i>	proteína de control de número de copias (gen)
RT	retrotranscriptasa
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
S	svedberg
s	segundo
SAMP14	proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 14 (tb. SPACA4)
SAMP32	proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 32 (tb. SPACA1)
SLLP-1	proteína espermática tipo lisozima (tb. SPACA3)
SP-10	proteína de vesícula acrosomal 1 (tb. SPACA2)
SP-ESP	proteína espermática del segmento ecuatorial (tb. ESP)

Abreviatura	Significado
<i>SPACA1</i>	proteína espermática asociada al acrosoma 1 (gen)
SPACA1	proteína espermática asociada al acrosoma 1 (tb. SAMP32)
SPACA2	proteína de vesícula acrosomal 1 (tb. SP-10)
SPACA3	proteína espermática asociada al acrosoma 1 (tb. SLLP-1)
SPACA4	proteína espermática asociada al acrosoma 1 (tb. SAMP14)
T	timina
T7	<i>Escherichia virus T7</i>
TAE	solución amortiguadora de tris, acetato y EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tb.	también
TM-align	<i>Protein Structure Alignment Algorithm Based on TM-score</i>
Tris-HCl	tris clorato
U	unidad / uracilo
V5	epítipo del virus de parainfluenza 5
X	isoforma / concentración
ZP	zona pelúcida

RESUMEN

Las vacunas anticonceptivas inducen una respuesta inmune adaptativa capaz de interrumpir la cascada de eventos necesarios para la fertilización. Los candidatos vacunales incluyen a aquellos antígenos accesibles para los anticuerpos ya sea, previo a la unión de los gametos, una vez ocurrida la reacción acrosomal, durante la fusión de las membranas o bien, durante la internación del espermatozoide. La inmunoanticoncepción presenta varias ventajas frente a los métodos anticonceptivos disponibles actualmente como son, bajo costo, alta especificidad, acción de larga duración, ausencia de efectos secundarios endocrinos o metabólicos y fácil aplicación, que prescinde del uso de implantes o de intervención quirúrgica.

Al considerar que actualmente no existen vacunas anticonceptivas comerciales para el perro doméstico que resulten eficaces durante periodos prolongados y que además carezcan de efectos adversos, además del hecho de que diversos estudios han demostrado que la proteína espermática asociada al acrosoma 1 (SPACA1) es una proteína inmunogénica, presente exclusivamente en el espermatozoide e indispensable tanto para la formación del acrosoma como para la fusión de los gametos; se propuso como objetivo de este trabajo amplificar, clonar y secuenciar un fragmento del gen *SPACA1*, con la finalidad de obtener ADN recombinante que permita el desarrollo de un inmunógeno experimental para el control de natalidad en perros.

Se obtuvo la secuencia del gen que codifica a la proteína espermática asociada al acrosoma 1 en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) y se publicó en el banco genómico con el número de acceso KY706613. También se estandarizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) para la amplificación de los 7 exones que integran al gen *SPACA1* del perro doméstico, así como de un control interno de amplificación. Se construyó el vector de expresión pJAPT16 mediante la clonación, en un plásmido comercial, del fragmento amplificado mediante RT-PCR del gen *SPACA1* y se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10 con el ADN recombinante.

Adicionalmente, se analizaron las secuencias que codifican a la proteína SPACA1 en diversas especies, mediante el uso de 11 herramientas bioinformáticas, para identificar sus características y funciones probables. Se determinó que, en el perro doméstico, SPACA1 carece de funciones enzimáticas aparentes y de péptido señal; presenta analogía estructural y funcional con la proteína IZUMO1 humana, la cual interviene en el reconocimiento, unión y fusión de los gametos; además, comparte diversos epítomos, así como un dominio transmembranal, con las proteínas SPACA1 del ratón, del cerdo y del humano. De acuerdo con la evidencia experimental reportada en trabajos de otros autores y con las predicciones computacionales generadas en este trabajo, se sugiere que un inmunógeno antiespermático basado en la proteína SPACA1 del perro doméstico podría controlar la natalidad en el perro, el ratón, el cerdo y el humano, al inhibir el proceso de fertilización en estas especies.

INTRODUCCIÓN

La comprensión del proceso de fertilización en mamíferos y de los mecanismos de inmunorregulación que intervienen en este proceso, puede contener la clave tanto para el tratamiento de la infertilidad, como para el control de la sobrepoblación.¹

Fertilización en mamíferos

En mamíferos, la fertilización es el proceso que involucra la unión del espermatozoide y del ovocito para dar lugar al cigoto, que a su vez se desarrolla para formar a un nuevo organismo genéticamente distinto.^{1,2} Sin embargo, los espermatozoides de mamíferos no son capaces de fertilizar al ovocito inmediatamente después de la eyaculación, antes deben llevar a cabo un proceso complejo en el tracto reproductor femenino denominado capacitación.^{3,4}

Un rasgo característico de la capacitación es que su duración es relativamente larga, pues varía desde aproximadamente una hora en el ratón, hasta casi seis horas en primates.^{3,4} Durante este periodo los espermatozoides deben sufrir cambios esenciales, en sus componentes intracelulares y en sus membranas, para poder fertilizar al ovocito *in vivo*. Como consecuencia de este proceso, los espermatozoides presentan patrones de motilidad flagelar únicos, exhiben respuestas particulares a estímulos externos y adquieren la capacidad para interactuar con el ovocito.¹

Una vez en el tracto reproductor femenino, los espermatozoides capacitados muestran un movimiento flagelar vigoroso conocido como hiperactivación, que les permite desplazarse hacia el ámpula del oviducto.¹ Posteriormente el espermatozoide lleva entra en contacto con la estructura extracelular que recubre al ovocito de los mamíferos, la zona pelúcida. Esta interacción desencadena la reacción acrosomal, durante la cual el espermatozoide libera enzimas que degradan a la zona pelúcida (Figura 1),^{1,5,6} probablemente en respuesta a

estímulos fisiológicos como el aumento en la concentración extracelular de calcio o de progesterona en el tracto reproductor femenino;^{4,7} aunque se ha demostrado que los eventos asociados a la capacitación espermática también pueden ser inducidos mediante la incubación *in vitro* de los espermatozoides en medios apropiados que incluyan bicarbonato, calcio y albúmina sérica.^{1,8}

Durante la reacción acrosomal la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana acrosomal externa, se expone la matriz acrosomal y se libera su contenido enzimático, por lo que la membrana acrosomal interna se convierte en la estructura que delimita a la cabeza del espermatozoide (Figura 1).⁹

La incorporación de la membrana acrosomal interna en la membrana plasmática del espermatozoide conlleva un reordenamiento de algunas de las proteínas presentes en la superficie del espermatozoide como PH-20 (proteína con actividad de hialuronidasa), IZUMO1 y SPACA1 (proteínas de unión y fusión de membranas).¹⁰⁻¹² Los cambios inducidos en las membranas de los espermatozoides que han llevado a cabo la reacción acrosomal son imprescindibles para la fertilización, ya que le confieren al espermatozoide la capacidad de unirse y de fusionarse con el ovocito.^{4,13}

La liberación del contenido acrosomal tiene como función adicional la formación de un canal de paso, necesario para la penetración de la zona pelúcida por el espermatozoide. Actualmente se sabe que la proteína espermática IZUMO1 y su receptor en el ovocito, JUNO, intervienen en la adhesión entre la membrana que recubre al segmento ecuatorial del espermatozoide y la membrana plasmática del ovocito (oolema) (Figura 1). Sin embargo, el mecanismo preciso que media la fusión de los gametos y la fertilización en mamíferos todavía no ha sido aclarado.^{9,10,14}

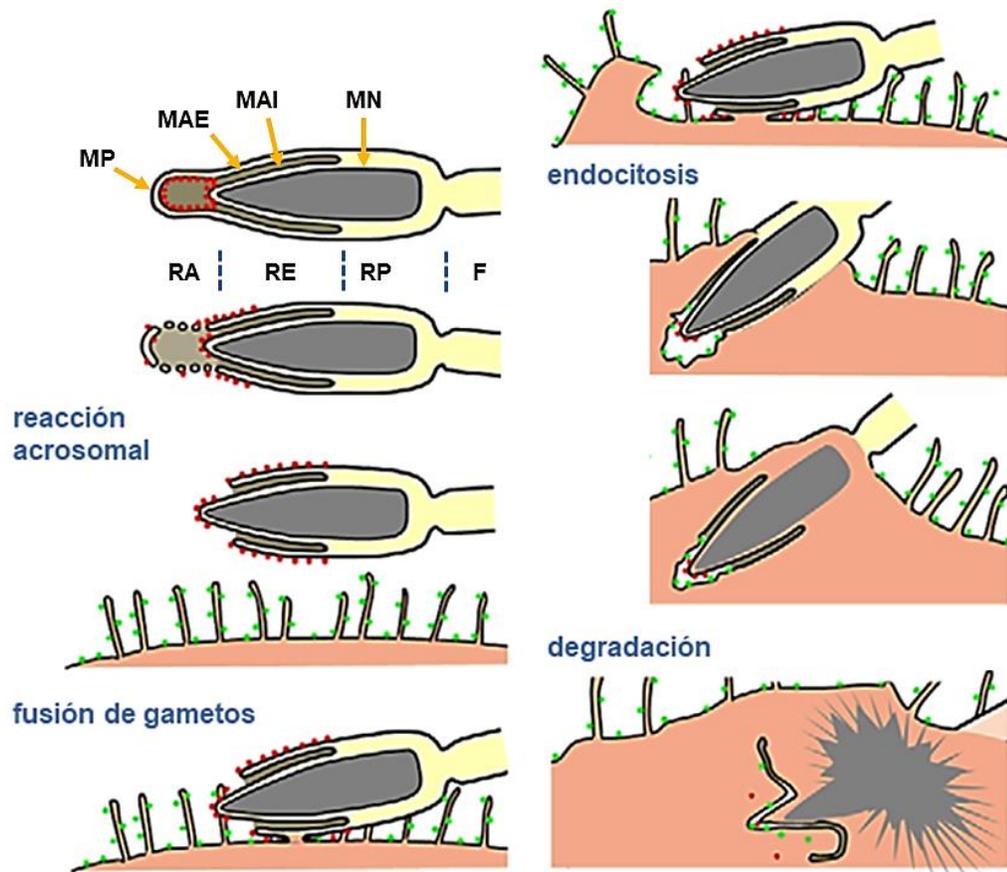


Figura 1 Reacción acrosomal y fusión de los gametos (modificado de Satouh 2012).¹⁵

El espermatozoide debe concluir la reacción acrosomal para poder penetrar la zona pelúcida y, posteriormente, fusionarse con el ovocito.¹⁶ Durante las primeras etapas de la reacción acrosomal, la membrana plasmática (MP) y la membrana acrosomal externa (MAE) se fusionan en múltiples puntos, lo que permite la liberación del contenido acrosomal.¹ Después de la reacción acrosomal, la región apical (RA) y la región ecuatorial (RE) de la cabeza del espermatozoide se encuentran cubiertas por lo que era previamente la membrana acrosomal interna (MAI), mientras que la membrana nuclear (MN) permanece intacta. La interacción entre la región ecuatorial de la cabeza espermática y la membrana plasmática del ovocito (olema), promueve la fusión de los gametos y la posterior formación del cigoto.¹⁶ La fusión inicia en la región ecuatorial del espermatozoide y continúa hacia la región postacrosomal (RP), mientras que el flagelo (F) queda excluido de la fusión de gametos. Los círculos en rojo representan a la proteína espermática de fusión (IZUMO1), mientras que los círculos en verde corresponden a su receptor en el ovocito (JUNO).¹⁵

Tolerancia inmunológica en las gónadas masculinas

El tracto reproductor masculino y especialmente, los gametos masculinos, representan un desafío importante para el sistema inmunológico debido a que los espermatozoides diferenciados aparecen por primera ocasión durante la madurez sexual, mucho tiempo después del establecimiento de la tolerancia inmunológica. Como consecuencia, las células espermatogénicas expresan moléculas específicas que tienen el potencial de ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune (Figura 2).^{1,17}

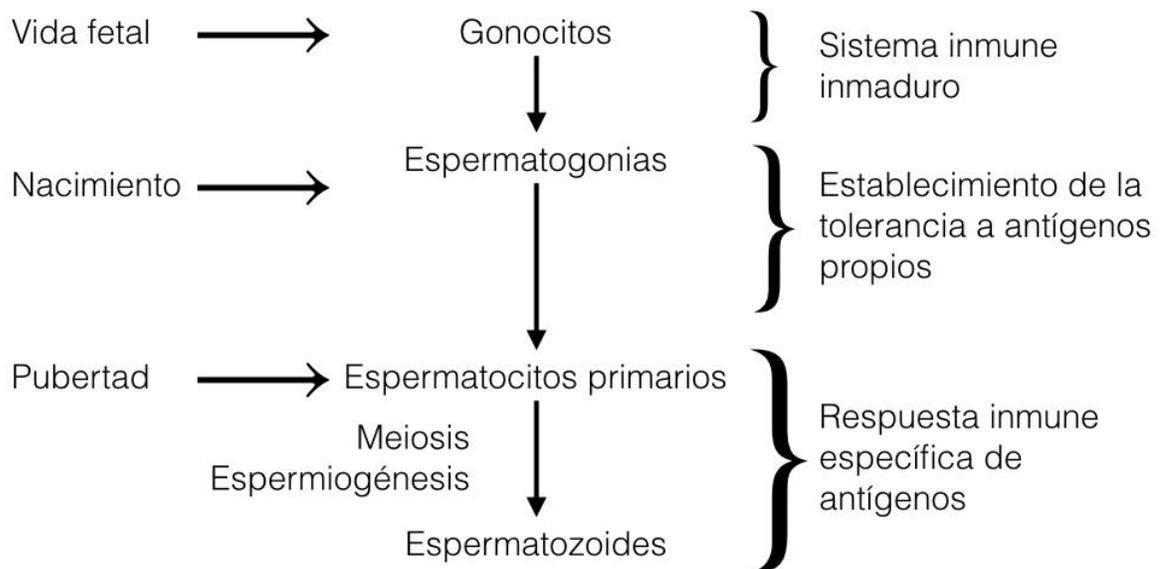


Figura 2 Cronología del desarrollo del espermatozoide y del sistema inmune (modificado de Hedger 2015).¹⁷

La mayoría de las células espermatogénicas no aparecen en el testículo hasta el inicio de la pubertad, mientras que la tolerancia a los antígenos propios se encuentra mayormente establecida en el momento del nacimiento. El desarrollo de los espermatozoides a partir de espermatogonias involucra procesos complejos de reorganización nuclear (meiosis) y diferenciación celular (espermiogénesis) que son únicos del testículo, por lo que existe un enorme potencial para que los antígenos espermatogénicos evadan los mecanismos convencionales de tolerancia.¹⁷

El testículo constituye un ambiente inmunológico único ya que los mecanismos de inmunorregulación e inmunosupresión que ahí existen, proveen protección a los antígenos locales durante la espermatogénesis.¹⁷ Esta regulación permite que la presencia de antígenos

provenientes de células diferenciadas, como el espermatozoide, sea inmunológicamente tolerada dentro del testículo, a pesar de que la administración de los mismos antígenos en otros sitios del cuerpo podría desencadenar una respuesta inflamatoria severa.¹⁸

Como parte de los mecanismos de tolerancia inmunológica que ocurren en el testículo de los mamíferos, se ha descrito que la proteína Fas ligando (Faslg) se encuentra presente en la superficie de los espermatozoides maduros¹⁹ y que esta proteína puede desencadenar la apoptosis de linfocitos mediante su unión con el receptor Fas (Fas) (Figura3).²⁰ Por esta razón, las células del sistema inmune que entran en contacto con el tracto reproductor masculino son funcionalmente modificadas para restringir su actividad proinflamatoria y proveen un ambiente inmunológicamente limitado, en el que las respuestas inmunes específicas contra los antígenos locales se encuentran estrechamente controladas.²¹

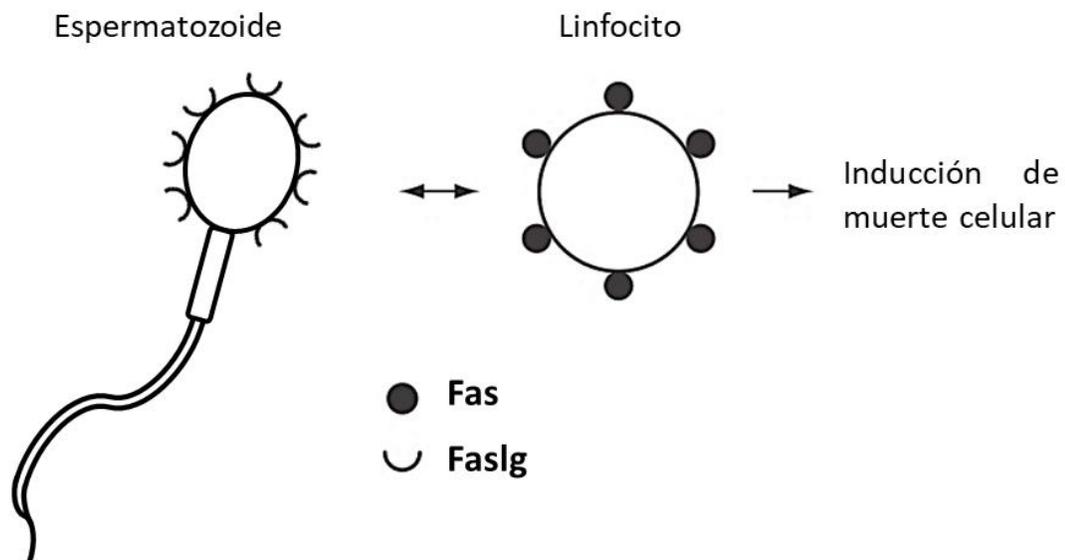


Figura 3 Inducción de muerte celular mediada por Faslg (modificado de Lydyard 2004).²² La interacción entre la proteína Fas ligando (Faslg) y el receptor Fas induce la apoptosis de linfocitos autorreactivos, cuando estos entran en contacto con las células de órganos inmunoprivilegiados como el testículo, el encéfalo o la cámara anterior del ojo.^{19,20,22}

Infertilidad e inmunoanticoncepción

En humanos, la infertilidad ocurre en el 20% de las parejas en edad reproductiva,²³ y aproximadamente la mitad de los casos están relacionados con problemas de infertilidad en machos.²⁴

Algunos de estos individuos poseen anticuerpos antiespermáticos en sangre y en secreciones del tracto reproductivo. Los anticuerpos antiespermáticos pueden influir en las etapas del proceso reproductivo previas a la fertilización, ya sea mediante la aglutinación o inmovilización de los espermatozoides o bien, al interferir en la interacción entre el espermatozoides y el ovocito.²³

Sin embargo, no todos los anticuerpos son capaces de inhibir la fertilización. Para que esto ocurra, es importante que los anticuerpos se unan al dominio funcional de antígenos involucrados en el proceso reproductivo,²⁵ como las proteínas presentes en la zona pelúcida del ovocito o en el segmento ecuatorial del acrosoma.^{12,15,26-33} De esta manera, el conocimiento detallado de la naturaleza de los antígenos que intervienen en el proceso de fertilización puede ser de utilidad en el desarrollo de vacunas anticonceptivas que permitan la regulación de la fertilidad en mamíferos.^{34,35}

La administración de vacunas anticonceptivas induce una respuesta inmune adaptativa que ocasiona infertilidad temporal,³⁶ mediante la producción de anticuerpos capaces de inhibir a las moléculas involucradas en cada una de las etapas del proceso reproductivo; como la síntesis de hormonas, producción de gametos, maduración folicular, ovulación, motilidad espermática, fusión de gametos, implantación y desarrollo del embrión.³⁷

Algunos métodos de inmunoanticoncepción presentan diversas ventajas frente a los métodos anticonceptivos disponibles actualmente como son: alta especificidad, acción de larga

duración, bajo costo, fácil aplicación que no requiere el uso de implantes ni de intervención quirúrgica, así como ausencia de efectos secundarios endocrinos o metabólicos (en la mayoría de los casos).³⁸ Aunque cabe mencionar que, como principal desventaja, la respuesta individual a las vacunas anticonceptivas es variable.³⁷

En términos generales, la inmunoanticoncepción puede emplearse a diferentes niveles:

1) Producción de gametos. La neutralización de cualquiera de las tres hormonas que intervienen en la producción de los gametos (GnRH, FSH y LH) puede impedir su unión a receptores y causar una falla en la concepción. Sin embargo, diversos factores dificultan el uso seguro de las vacunas anticonceptivas dirigidas contra hormonas reproductivas, entre ellos, su incapacidad para inducir azoospermia, la alteración en los niveles de hormonas reproductivas y la generación de efectos adversos como alopecia, atrofia prostática y pérdida de libido reportadas en especies como bovinos y cerdos.³⁸ También se ha demostrado que, en el ratón, la inactivación de los genes que codifican a la FSH y a su receptor no produce infertilidad. Por su parte, las vacunas contra GnRH requieren de múltiples aplicaciones y generan una respuesta inmune de corta duración, ya que la hormona no es reconocida como extraña por el sistema inmune.³⁹

2) Función de los gametos. Esta clase de vacunas anticonceptivas se enfocan en los antígenos de superficie del ovocito y del esperma. Al tener objetivos no hormonales su uso puede proveer una mayor seguridad con respecto a las vacunas anticonceptivas mencionadas previamente.³⁸

En hembras, la inmunoanticoncepción puede ocurrir mediante la producción de anticuerpos dirigidos contra antígenos gametogénicos, ya sea a nivel sistémico, o a nivel de mucosas del tracto reproductivo.⁴⁰

Las vacunas anticonceptivas basadas en antígenos de la zona pelúcida (ZP) pueden interferir con la producción normal de ovocitos, por lo que su uso se encuentra limitado a hembras.³⁸

Por otra parte, las vacunas basadas en proteínas espermáticas pueden ocasionar la producción de anticuerpos antiespermáticos tanto en machos como en hembras, debido a sus propiedades auto e isoantigénicas.⁴¹ Estas vacunas pueden inhibir la fertilización en el tracto reproductivo, al interferir en el movimiento o en la función de los espermatozoides.³⁸

Las vacunas de extracto de zona pelúcida porcina han sido utilizadas en varias especies (venados cola blanca, elefantes, caballos, focas y koalas), en las cuales promueven una infertilidad prolongada, aunque reversible;²⁸ sin embargo, en la perra producen infertilidad de corta duración, además de ooforitis y destrucción de los folículos ováricos (también son inefectivas en la gata).³⁹ Estos resultados han llevado a esfuerzos para identificar antígenos específicos caninos.

Los candidatos vacunales propuestos en la actualidad incluyen a aquellos antígenos que se encuentran accesibles para los anticuerpos durante unión inicial de los gametos, moléculas expuestas una vez ocurrida la reacción acrosomal, moléculas que median la fusión de las membranas de los gametos, así como los eventos subsecuentes de internación del espermatozoide.⁹ Los espermatozoides poseen antígenos de superficie únicos, específicos de tejido, inmunogénicos y que además son accesibles para los anticuerpos. La unión de anticuerpos específicos contra los antígenos gametogénicos puede inhibir la función de los gametos y comprometer la fertilización. Así, los antígenos derivados de los espermatozoides resultan moléculas interesantes para el desarrollo de vacunas anticonceptivas.⁴²

Las proteínas espermáticas expuestas después de la reacción acrosomal, e inmediatamente antes de la fertilización, cobran un especial interés como objetivos para la inmunoanticoncepción, debido a que no es necesario generar un alto título de anticuerpos

contra estos antígenos para lograr inhibir la función espermática.³⁰ Además, se sabe que los anticuerpos antiespermáticos pueden permanecer durante años en el organismo sin producir efectos adversos a la salud, a excepción de infertilidad.²⁵

Una alternativa propuesta recientemente para lograr una inmunoanticoncepción efectiva en animales, consiste en la administración parenteral de vectores derivados de virus adeno-asociados, los cuales codifican a anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos hormonales (como GnRH), o bien, contra antígenos gametogénicos (como ZP2).⁴³

Este enfoque, denominado “administración de genes mediada por vectores”, presenta la ventaja de generar infertilidad de larga duración (de hasta un año en ratones), además de que promueve una respuesta con poca variabilidad entre individuos ya que, a pesar de que la infertilidad se encuentra mediada por anticuerpos, la síntesis de estos anticuerpos ocurre de forma independiente al sistema inmune del individuo, en las células transducidas con el vector.⁴³

Un inconveniente de este método de inmunoanticoncepción, es que se debe mantener un umbral mínimo en el título de anticuerpos para generar y conservar la infertilidad. Por lo que el estado de enfermedad podría disminuir temporalmente el título de anticuerpos y ocasionar un retorno a la fertilidad.⁴³

Al brindar una solución a algunos de los desafíos mencionados para el diseño de vacunas anticonceptivas, este enfoque resulta prometedor. Sin embargo, la inmunoanticoncepción debida a la “administración de genes mediada por vectores” se encuentra en etapas tempranas,⁴⁴ por lo que aún es necesario ampliar el conocimiento en este tema y evaluar aspectos como, por ejemplo, qué resultados se obtendrían al utilizar objetivos antigénicos diferentes a los evaluados hasta el momento (GnRH y ZP2) e incluso, si sería posible

mantener el título de anticuerpos necesario para causar infertilidad en modelos animales diferentes al ratón.⁴³

En resumen, la selección de antígenos para el desarrollo de vacunas anticonceptivas se encuentra limitado por su especificidad, su participación en el proceso de fertilización y su potencial para inducir un elevado título de anticuerpos en el tracto genital.²³ También es importante señalar que los antígenos reconocidos por anticuerpos antiespermáticos pueden diferir entre individuos, así como entre anticuerpos circulantes y aquellos secretados en el tracto reproductor,⁴⁵ lo que supone un desafío adicional para el diseño de vacunas anticonceptivas.

Proteína espermática asociada al acrosoma 1 (SPACA1)

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso intrincado y rigurosamente regulado que involucra la diferenciación de espermatozoides maduros, a partir de células madre denominadas gametogonias.⁴⁶

La identificación de los genes requeridos para la espermatogénesis, el análisis del perfil de expresión genético en el testículo y la investigación de sus características y funciones, tienen gran importancia, no solo para lograr comprender el proceso de espermatogénesis, sino también para la prevención de la infertilidad ocasionada por desórdenes en este proceso y para el desarrollo de medicinas anticonceptivas.⁴⁷ Aunque actualmente se sabe que cerca del 4% del genoma del ratón está orientado a la transcripción de genes específicos del testículo,⁴⁸ solo se ha logrado identificar a una pequeña porción de los genes que se encuentran involucrados de manera directa en el proceso espermatogénico.^{49,50}

La proteína espermática asociada al acrosoma 1 (SPACA1), también conocida como proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 32 (SAMP32) porque posee una masa

aproximada de 32 kDa, fue identificada por primera vez en el año 2002 por Hao y colaboradores, a partir del análisis bidimensional de extractos proteicos de eyaculados humanos.²⁹ Es una proteína integral de membrana que se encuentra ubicada en el segmento ecuatorial del acrosoma (membrana que recubre la porción anterior del núcleo espermático en los mamíferos) (Figura 4);^{29,51} sitio en el cual ocurre la fusión de los gametos.⁵² Se encuentra codificada por el gen *SPACA1*, el cual cuenta con 3 isoformas predichas para su ARNm y se ubica en el cromosoma 12, en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*).⁵³ Esta proteína se encuentra en los gametos masculinos a partir del momento del desarrollo del acrosoma.²⁹ Si los espermatozoides no han llevado a cabo la reacción acrosomal, SPACA1 se localiza principalmente en la membrana acrosomal interna y en el segmento ecuatorial de la membrana acrosomal externa; mientras que en los espermatozoides con reacción acrosomal, la proteína se transloca hacia la región postacrosomal de la membrana plasmática.^{12,29}

De manera similar, como consecuencia de la reacción acrosomal, se han observado cambios en la distribución de otras proteínas espermáticas involucradas en el proceso de fertilización.^{12,15,54} Tal es el caso de las proteínas ecuatorina e IZUMO1,^{51,55-57} las cuales intervienen en la unión y fusión de los gametos, una vez que el espermatozoide atraviesa el espacio perivitelino.^{55,5}

El cambio en localización de SPACA1, desde el segmento ecuatorial hacia el segmento postacrosomal, ha sido empleado como indicador para determinar la incidencia de reacciones acrosomales verdaderas (por mecanismos fisiológicos) o falsas (por daño físico del acrosoma) en espermatozoides de cerdos. La presencia de proteínas SPACA1 de baja masa molecular (15 – 28 kDa) en la región postacrosomal se relaciona con la incidencia de reacciones acrosomales verdaderas,¹² ya que se especula que la existencia de proteínas

SPACA1 con diferentes masas moleculares podría deberse a su procesamiento proteolítico durante la reacción acrosomal.^{12,29}

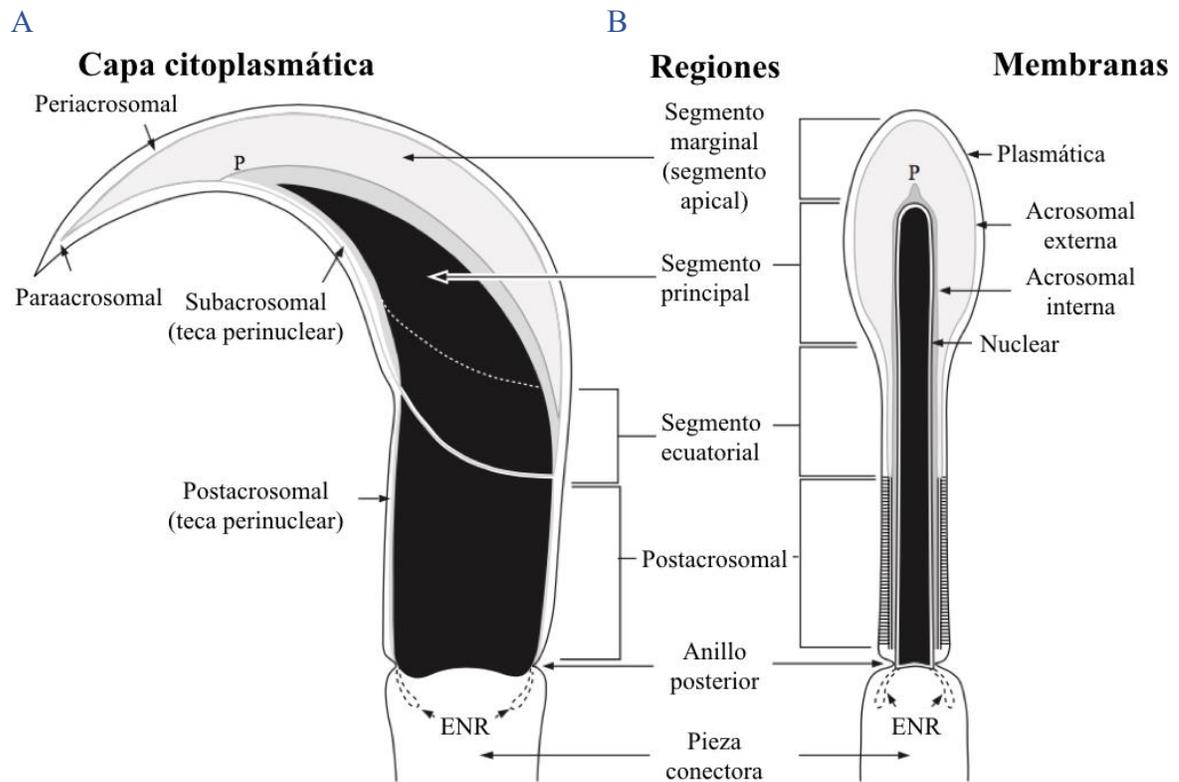


Figura 4 Distribución de la capa citoplasmática, regiones y membranas de la cabeza de espermatozoides falciformes. (A) Sección sagital (B) y frontal (modificado de Toshimori 2015).³³

La capa citoplasmática incluye a las capas paraacrosomal, subacrosomal y postacrosomal. Las regiones incluyen a los segmentos marginal (apical), principal y ecuatorial, así como a la región postacrosomal que abarca desde el margen posterior del acrosoma hasta el anillo posterior. La membrana plasmática circunda a todo el espermatozoide. Las membranas acrosomales externa e interna rodean a los componentes del acrosoma, mientras que la membrana nuclear delimita al núcleo. La envoltura nuclear redundante (ENR) se encuentra caudal al anillo posterior. El citoesqueleto subacrosomal se encuentra ubicado entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear. El citoesqueleto postacrosomal se ubica entre la membrana plasmática y la membrana nuclear. La teca perinuclear comprende a ambas estructuras del citoesqueleto.³³

La estructura de SPACA1 se desconoce actualmente, sin embargo, el análisis de la secuencia de esta proteína ha permitido identificar diversas características probables.^{29,31} En el extremo amino presenta un péptido señal y un sitio de escisión para el péptido señal, seguido por un

dominio homólogo al de la proteína CSP del género *Plasmodium*,²⁹ posteriormente presenta un dominio rico en cisteínas, un dominio de inmunoglobulina, un dominio transmembranal con un sitio de fosforilación de tirosina³¹ y finalmente, un dominio homólogo al de la proteína KRP1 de *Schizosaccharomyces pombe* en el extremo carboxilo.²⁹

La proteína CSP es el antígeno inmunodominante en los circunsporozoitos del agente causal de la malaria,⁵⁸ mientras que KRP1 pertenece a la familia de endopeptidasas unidas a membrana.⁵⁹ Aunque la importancia de estas homologías todavía no ha sido aclarada, es posible que SPACA1 presente un patrón de plegamiento similar al de CPS y al de KRP1.²⁹

Actualmente se sugiere que las proteínas espermáticas localizadas en el segmento ecuatorial podrían participar en el ensamblaje de complejos multimoleculares encargados de iniciar la fusión de membranas de los gametos⁵⁵ y que, como parte de este evento, SPACA1 podría estar involucrada en el procesamiento del acrosoma.⁴³

El bloqueo de genes involucrados en el desarrollo y maduración del espermatozoide se encuentra frecuentemente acompañado por infertilidad, debido a la presencia de malformaciones, en el acrosoma y en el núcleo, que interrumpen la función espermática.^{51,55}

La interrupción del gen *SPACA1* en ratones se asocia con la desaparición de la lámina nuclear, falla en la expansión del acrosoma durante la espermiogénesis, desaparición del acrosoma en espermatozoides maduros y con infertilidad, debida a la deformación de la cabeza espermática, situación similar a lo que ocurre en la globozoospermia.⁵¹ La globozoospermia es un síndrome de infertilidad descrito en humanos, ocasionado por defectos que se manifiestan durante la espermatogénesis.⁶⁰ Esta condición se caracteriza por la malformación o pérdida del acrosoma, acompañada de anormalidad en la forma del núcleo, así como del acomodo anormal de las mitocondrias espermáticas.⁶¹ Sin embargo, no se ha

logrado establecer una relación entre la globozoospermia y la presencia de mutaciones en el gen *SPACA1*.⁶²

Se ha demostrado que la administración intramuscular en hembras de macaco (*Macaca fascicularis*) de un inmunógeno basado en la proteína SPACA1 recombinante de origen humano, estimula producción de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína nativa, tanto en espermatozoides de macacos, como en espermatozoides humanos.³⁰

En resumen, la proteína espermática asociada al acrosoma 1 es un objetivo interesante para el diseño de vacunas anticonceptivas debido a que se expresa de manera específica en el espermatozoide y en consecuencia se encuentra ausente en células somáticas;²⁹ es esencial para el desarrollo acrosomal y para el proceso de fertilización;^{29,51} se encuentra asociada a problemas de infertilidad inmunomediada en humanos;²⁹ los anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante inhiben la fertilización *in vitro*;²⁹ es una proteína isoantigénica y xenoantigénica.^{29,30}

JUSTIFICACIÓN

Actualmente no existen vacunas anticonceptivas comerciales para el perro doméstico que resulten eficaces durante periodos prolongados y que además carezcan de efectos secundarios. Al considerar que SPACA1 es una proteína inmunogénica, presente exclusivamente en el esperma, indispensable para la formación del acrosoma y la fusión de los gametos; se propone realizar la clonación y secuenciación de un fragmento del gen *SPACA1*, con la finalidad de obtener ADN recombinante que permita el desarrollo un inmunógeno antiespermático.

HIPÓTESIS

La clonación de un fragmento del gen *SPACA1* en un plásmido y su secuenciación permitirán identificar a la región del gen que codifica a la proteína SPACA1 en el perro doméstico.

OBJETIVO GENERAL

Se amplificará, clonará y secuenciará un fragmento del gen *SPACAI* mediante técnicas moleculares para obtener ADN recombinante que permita el desarrollo de un inmunógeno antiespermático.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar los iniciadores y estandarizar las condiciones para la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa, de una región de la secuencia codificante del gen *SPACAI* del perro doméstico.
2. Clonar en un plásmido comercial al fragmento del gen *SPACAI* producido en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.
3. Obtener la secuencia del gen *SPACAI* clonado en el vector comercial y publicarla en el banco genómico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Adquisición de las muestras de tejido testicular canino

Las muestras de testículos caninos utilizadas en este trabajo fueron donadas por la Clínica Móvil para el Control Reproductivo de Perros y Gatos del Hospital Veterinario de Especialidades de la UNAM. Estas fueron obtenidas de forma aséptica a partir de pacientes orquiectomizados y conservadas a -70 °C hasta el momento de su procesamiento para la extracción de ARN.

Extracción de ARN a partir de tejido

La extracción de ARN total a partir de las muestras de testículo canino se realizó mediante el método de tiocianato de guanidina o con el reactivo TRIzol[®]. El protocolo empleado para el reactivo TRIzol[®] corresponde a una modificación del método descrito originalmente por el fabricante y se resume a continuación:

El procedimiento se realizó a 4 °C en campana de flujo laminar. Las muestras de testículo fueron descongeladas a temperatura ambiente y cortadas con bisturí hasta obtener fragmentos del parénquima de aproximadamente 0.5 cm³. Los fragmentos obtenidos fueron colocados de manera individual en tubos de microcentrífuga. Se agregó 1 ml de reactivo TRIzol[®] por cada 500 mg de tejido. La mezcla se homogeneizó por agitación durante 10 s con un equipo Vortex Mixer (modelo VM-1000) y se incubó a 4 °C durante 5 min. Se añadieron 200 µl de cloroformo, se homogeneizó por agitación durante 10 s y se incubó a 4 °C durante 5 min. Tras centrifugar a 4°C y 12,000 g durante 15 min, se transfirió el sobrenadante (ARN) a otro microtubo y se mezcló con 500 µl de isopropanol al 100%. La mezcla se homogeneizó por agitación durante 10 s y se incubó a 4 °C durante 5 min. Después de centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 20 min, se decantó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al

75%, el cual fue preparado previamente con agua tratada con DEPC. El sedimento se homogeneizó por agitación durante 10 s y posteriormente se centrifugó a 4 °C y 12,000 g durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se eliminó el exceso de etanol al dejar secar la pastilla de ARN durante 5 min con el microtubo destapado e invertido en posición vertical. El ARN total se suspendió en 50 µl de agua ultrapura (previamente tratada con DEPC), cuantificado y posteriormente almacenado a -70 °C, hasta el momento de la retrotranscripción. Se determinó la integridad y pureza del ARN total obtenido mediante espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

Para la retrotranscripción se siguió el protocolo descrito por el fabricante para el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit[®] con un volumen para la reacción ajustado a 20 µl, de los cuales se utilizaron: 2 µl de ARN total (<5 µg), 1 µl de Oligo(dT)₁₈ Primer (100 µM), 9 µl de agua ultrapura (previamente tratada con DEPC), 4 µl de 5X Reaction Buffer[®] [Tris-HCl (250 mM, pH 8.3), KCl (250 mM), MgCl₂ (20 mM), DTT[®] (50 mM)], 1 µl de RiboLock RNase Inhibitor[®] (20 U/µl), 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 1 µl de RevertAid M-MuLV RT[®] (200 U/reacción).

Una vez que se añadieron y homogeneizaron los reactivos en un microtubo libre de nucleasas con capacidad de 200 µl, se incubó la reacción en un termociclador a 42 °C durante 1 h y posteriormente se detuvo al calentar la mezcla a 70 °C durante 5 min. El ADNc obtenido fue cuantificado y posteriormente conservado a -70 °C hasta el momento de su uso en la reacción en cadena la polimerasa.

Se utilizó el programa *Primer-Basic Local Alignment Search Tool* (Primer-BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)⁶³ para el diseño de los iniciadores

empleados en la RT-PCR anidada, con base en la secuencia predicha para la isoforma 3 del ARNm del gen *SPACAI* del perro doméstico, encontrada en el GenBank^{®64} con el número de acceso XM_005627617.2 y el identificador de secuencia 928150440.⁶⁵ Se identificaron los marcos de lectura del templado mediante el uso de la plataforma Benchling^{®66} y se ajustó la longitud de la secuencia de los iniciadores mediante el programa Tm Calculator^{®67} para obtener temperaturas de alineamiento adecuadas. Se identificó un marco abierto de lectura con una longitud de 735 pb.

A continuación, se describen los dos pares de iniciadores diseñados para el gen *SPACAI*. Los iniciadores SPACAI F-e (5' CACCATGGTTCTCCAAGGCGCCCC 3') y SPACAI R-e (5' TGAGGCTTTCTCCCCCA 3'), flanquean un fragmento externo de 588 pb. Mientras que los iniciadores SPACAI F-i (5' CACCATGAGGCCAGACCAACAACCA 3') y SPACAI R-i (5' GAAAGACTTGACTGCCCCC 3'), flanquean un fragmento interno de 288 pb, el cual se utilizó como control interno de amplificación.

Como control positivo, se utilizaron los iniciadores reportados previamente por Nuncio-Limón para la amplificación mediante RT-PCR del gen *ACTB* del perro doméstico.⁶⁸ Los iniciadores de la cadena directa (5' GTGTGACGTTGACATCCGCA 3') e inversa (5' TCCACACAGAGTACTTGCGC 3'), flanquean un fragmento de 178 pb.

Se utilizó el equipo Select Bio Products (modelo Select Cycler II) para la PCR del gen *SPACAI*, la cual se ajustó a un volumen de 50 µl, de los cuales se utilizaron: 33 µl de agua ultrapura, 5 µl de 10 X *Pfu* PCR buffer[®] [Tris-HCl (200 mM, pH 8.8), (NH₄)₂SO₄ (100 mM), KCl (100 mM), Triton X-100[®] (1% v/v), ASB (1 mg/mL)], 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 1 µl de ADNc (50 pg – 1µg), 2.5 µl de iniciador directo (10 µM), 2.5 µl de iniciador inverso (10 µM), 1 µl de *Pfu* ADN polimerasa recombinante (2.5 U/reacción) y 4 µl de MgSO₄ (25 mM). Se utilizó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min y

posteriormente 30 ciclos con: desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 72 s. La extensión final se efectuó a 72 °C durante 5 min. La duración aproximada de la PCR estandarizada fue de 106 min. Para la amplificación del control positivo (*ACTB*) se utilizaron las mismas condiciones, a excepción de la temperatura de alineamiento, la cual fue de 53 °C.

Clonación del gen *SPACA1* en un plásmido comercial y transformación en *Escherichia coli*

Se utilizó el sistema QIAquick Gel Extraction Kit[®] para purificar el producto de la RT-PCR a ser clonado, el cual adquirió un tamaño de 595 pb debido a la incorporación de 7 nucleótidos presentes en el iniciador SPACA1 F-e (5' CACCATG... 3'). El fragmento amplificado del gen *SPACA1* se clonó en el vector pET101/D-TOPO[®] mediante el sistema Directional TOPO[®] con la metodología del fabricante. Se prepararon células de *E. coli* DH5 α [®] competentes y se transformaron mediante el método químico o de electroporación.^{69,70} El escrutinio de las colonias se realizó mediante su cultivo en placas de agar LB con ampicilina (50 μ g/ml) a 37 °C durante 14 h, seguido de la extracción del ADN plasmídico con el método de lisis alcalina⁶⁹ o con el sistema QIAprep Miniprep Kit[®], la detección del inserto mediante PCR y la digestión del ADN plasmídico con la enzima *BsmI* para determinar la presencia, tamaño y orientación del inserto. La PCR del gen *SPACA1* empleada durante el escrutinio de colonias se ajustó a un volumen final de 50 μ l, de los cuales se utilizaron: 40.75 μ l de agua ultrapura, 5 μ l de 10 X TopTaq PCR buffer[®] [Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂ (15 mM), estabilizadores, pH 8.7], 1 μ l de mezcla de dNTP (10 mM), 1 μ l de ADN plasmídico (<25 ng), 1 μ l de iniciador directo (10 μ M), 1 μ l de iniciador inverso (10 μ M) y 0.25 μ l de TopTaq ADN polimerasa recombinante (1.25 U/reacción). Se utilizó una desnaturalización inicial a

95 °C durante 5 min y posteriormente 30 ciclos con: desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. La extensión final se efectuó a 72 °C durante 5 min. La duración aproximada de la PCR estandarizada fue de 90 min. Para el control interno de amplificación se utilizaron las mismas condiciones.

Secuenciación del gen *SPACA1*

Una vez identificadas las clonas con una orientación adecuada del inserto, se purificaron los plásmidos con el sistema QIAprep Miniprep Kit® y se preparó cada muestra de plásmido para su secuenciación en un volumen de 16 µl, de los cuales se utilizaron: 15 µl de ADN plasmídico (<500 ng) y 1µl de iniciador T7 (10 µM) (directo o inverso). Se prepararon las muestras de los plásmidos para la secuenciación de ambas cadenas. Las muestras de plásmidos fueron secuenciadas por la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM mediante secuenciación automática en capilar basada en el método de terminación de cadenas con el sistema 3130xl Genetic Analyser.

Predicción de las propiedades estructurales y funcionales de *SPACA1*

Para la predicción de las características estructurales y funcionales de la proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 1 se utilizaron los siguientes programas: Benchling®,⁶⁶ Clustal Omega®,⁷¹ ESG®,⁷² PHYLOPP®,⁷³ SignalIP®,⁷⁴ MEGA®,⁷⁵ I-TASSER®,⁷⁶ TM-align®,⁷⁷ COACH®,⁷⁸ LBtope®,⁷⁹ y Amphipaseek®.⁸⁰

RESULTADOS

Extracción de ARN a partir de tejido

La Figura 5A muestra la predicción del patrón electroforético del marcador de tamaño molecular utilizado en todas las electroforesis de este trabajo (1 Kb Plus DNA Ladder[®]). Por su parte la Figura 5B corresponde a una fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del ARN total extraído a partir de testículo de perro por el método de tiocianato de guanidina con el reactivo TRIzol[®]. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría y se obtuvieron hasta 1.8 µg/µl con una relación de absorbancia 260 nm / 280 nm de 2.0, por lo que se consideró al ARN extraído como puro y, por lo tanto, adecuado para la retrotranscripción.

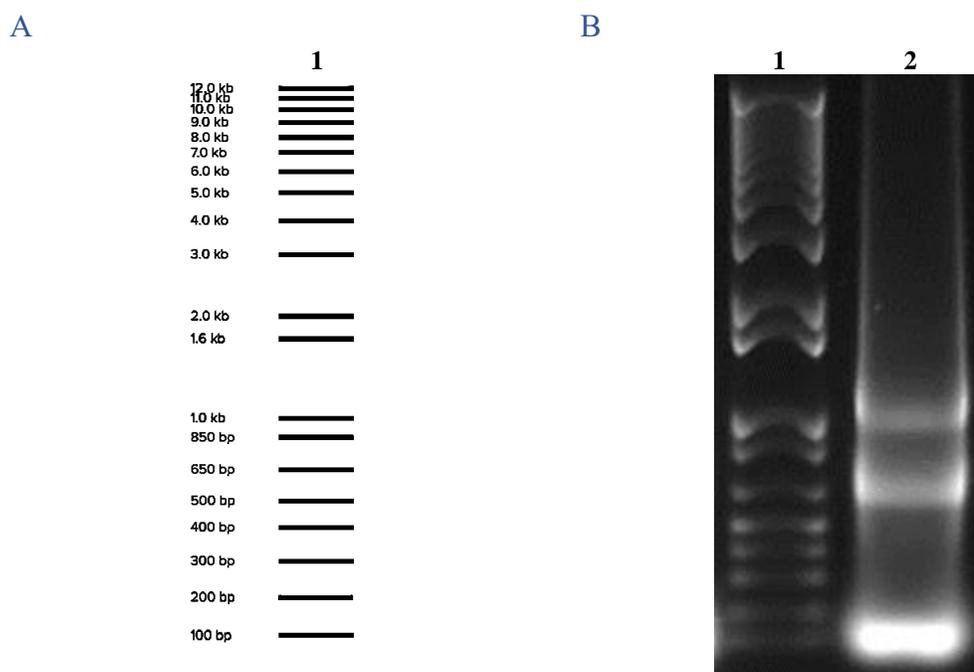


Figura 5 (A) Predicción del patrón electroforético del marcador de tamaño molecular (elaborado con Benchling^{®66}) y (B) fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del ARN total extraído a partir de testículo de perro.

1) 1 Kb Plus DNA Ladder[®] 2) ARN total (banda superior: ARNr 28S, banda intermedia: ARNr 18S, banda inferior: ARNr 5.8S y 5S).

Alineamiento de las secuencias de SPACA1

Para la selección de la variante transcripcional del gen *SPACA1* que fue amplificada, clonada y secuenciada en este trabajo, se consideraron las tres secuencias predichas en el banco genómico para la proteína SPACA1 del perro doméstico (*Canis lupus familiaris*); y se compararon los porcentajes de identidad y las coberturas de alineamiento de las secuencias reportadas en el ratón (*Mus musculus*), el cerdo (*Sus scrofa*) y el humano (*Homo sapiens*); especies en las cuales se ha establecido una relación entre *SPACA1* y la presencia de alteraciones en el fenotipo y en la capacidad de fertilización de los espermatozoides.^{12,50,51}

En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de identidad y las coberturas de alineamiento elaborados, mediante el programa BLAST[®],⁶³ para las secuencias mencionadas anteriormente. La secuencia predicha para la isoforma 3 de la proteína SPACA1 del perro doméstico presenta el mayor porcentaje de identidad con respecto a las secuencias reportadas en el ratón, en el cerdo y en el humano; por lo que fue elegida para el diseño de los iniciadores utilizados en la RT-PCR. Nótese que la secuencia reportada en el ratón tiene la mayor similitud con respecto a la variante transcripcional predicha en el perro doméstico.

La Figura 6 muestra el análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos que integran a la proteína SPACA1 en el perro doméstico, en el ratón, en el cerdo y en el humano. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante el programa Clustal Omega[®],⁷¹ mientras que el árbol filogenético se construyó con el programa MEGA7[®].⁷⁵ Nótese que, en el perro doméstico, la secuencia predicha para la isoforma 3 de SPACA1 presenta la menor distancia evolutiva inferida, con respecto a las secuencias reportadas en otras especies (ratón, cerdo y humano). Mientras que la distancia entre las isoformas 1 y 2 es prácticamente nula.

	Identidad (%)	Cobertura (%)
<i>A (Mus musculus)</i>		
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X3	84	73
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X2	84	67
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X1	82	76
<i>B (Sus scrofa)</i>		
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X3	83	78
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X1	80	100
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X2	75	100
<i>C (Homo sapiens)</i>		
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X3	80	76
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X1	75	100
Proteína espermática asociada al acrosoma 1 isoforma X2	70	100

Cuadro 1 Porcentajes de identidad y coberturas de alineamiento entre las secuencias de aminoácidos predichas para la proteína SPACA1 del perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), y las secuencias (A) del ratón (*Mus musculus*), (B) del cerdo (*Sus scrofa*) y (C) del humano (*Homo sapiens*) (elaborado con BLAST^{®63}).

Nótese que las secuencias de las isoformas 2 y 3 presentan el mismo porcentaje de identidad con respecto a la secuencia reportada en el ratón (84%), sin embargo, el porcentaje de cobertura del alineamiento es superior para la isoforma 3.

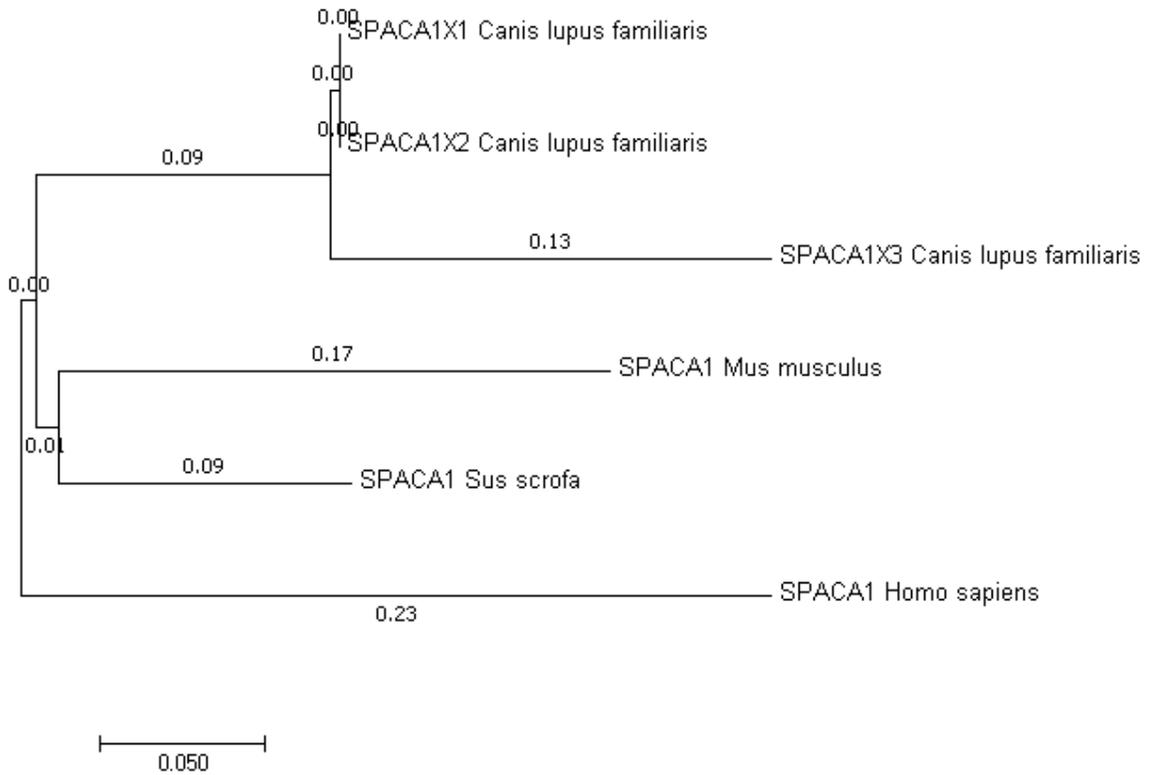


Figura 6 Análisis filogenético de SPACA1 (elaborado con MEGA7^{®75}).

El árbol filogenético se construyó con el método de mejor precisión (Jones-Taylor-Thornton⁸¹) y se representa a escala. Los valores estimados indican la longitud de cada rama y la distancia evolutiva inferida para las secuencias analizadas. En el perro doméstico, la secuencia predicha para la isoforma 3 de SPACA1 presenta la menor distancia evolutiva inferida, con respecto a las secuencias reportadas en las otras especies (ratón, cerdo y humano).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR)

En la Figura 7 se muestra un diagrama del tamaño predicho para el fragmento del gen *SPACA1* amplificado mediante RT-PCR, la posición de los de iniciadores y de la secuencia reconocida por la enzima *BsmI* (empleada posteriormente en el análisis de restricción).

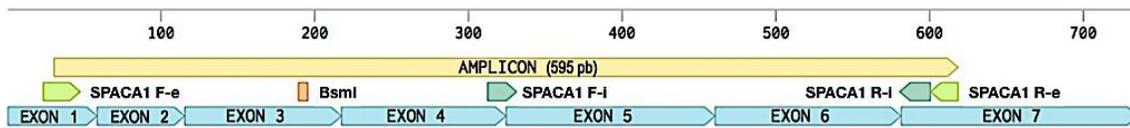


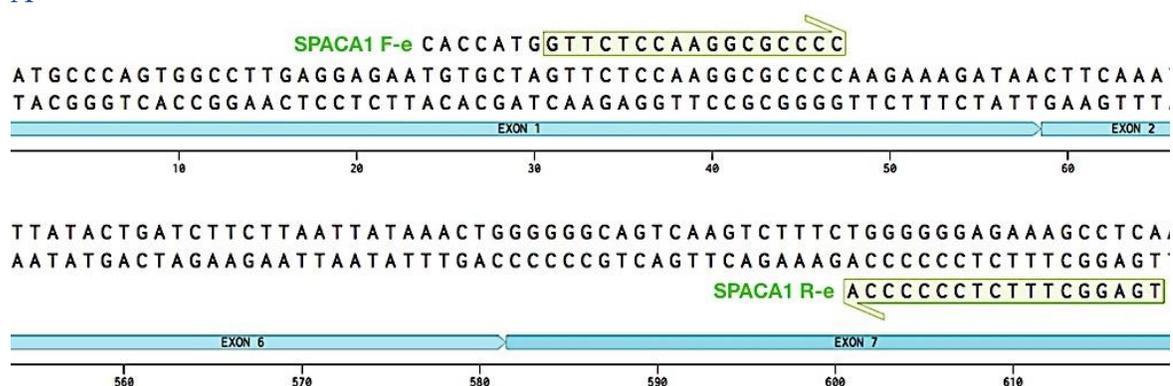
Figura 7 Diagrama del tamaño predicho para el amplicón de *SPACA1* (elaborado con Benchling^{®66}).

Los productos de la RT-PCR consisten en: un fragmento externo con un tamaño esperado de 595 pb que incluye a los 7 exones que componen al gen *SPACA1* y un fragmento interno con un tamaño de 295 pb que incluye a los exones 4 a 7. Los exones 1 a 7 se muestran en azul; el amplicón, en amarillo; los iniciadores externos, en verde claro; los iniciadores internos, en verde oscuro y el sitio de restricción reconocido por la enzima *BsmI*, en naranja.

Las secuencias de los iniciadores diseñados y su alineamiento con la secuencia blanco se presentan en la Figura 8A para el fragmento externo y en la Figura 8B para el fragmento interno, todos los iniciadores cuentan con la misma temperatura de alineamiento (63 °C). Los iniciadores *SPACA1 F-e* y *SPACA1 R-e* amplifican un fragmento externo de 595 pb (nucleótidos 31 a 619, exones 1 a 7) que incluye a todos exones que codifican a la proteína *SPACA1*. Nótese que el iniciador *SPACA1 F-e* presenta siete nucleótidos no alineados en su extremo 5' (secuencia 5' CACCATG 3') por lo que el tamaño esperado para el producto de la RT-PCR se incrementa de 588 pb a 595 pb. En el iniciador de la cadena directa se añadieron las secuencias 5' CACC 3' y 5' ATG 3' para permitir respectivamente, la clonación direccional en el vector pET101/D-TOPO[®] realizada en este trabajo y el inicio de la traducción de la proteína recombinante *SPACA1* del perro doméstico en futuros proyectos. Los iniciadores *SPACA1 F-i* y *SPACA1 R-i* amplifican un fragmento interno de 295 pb (nucleótidos 312 a 600, exones 4 a 7), el cual fue utilizado como un control interno de

amplificación en las reacciones de RT-PCR (anidadas). Los iniciadores SPACA1 F-i, SPACA1 R-i y SPACA1 R-e se alinean con las 3 variantes transcripcionales predichas para el gen *SPACA1* por lo que el control interno de amplificación podría ser detectado a partir de cualquiera de las isoformas predichas, mientras que el iniciador SPACA1 F-e se hibrida exclusivamente con la isoforma 3 y permite la amplificación específica de esta variante transcripcional, su clonación direccional y el inicio de su traducción.

A



B

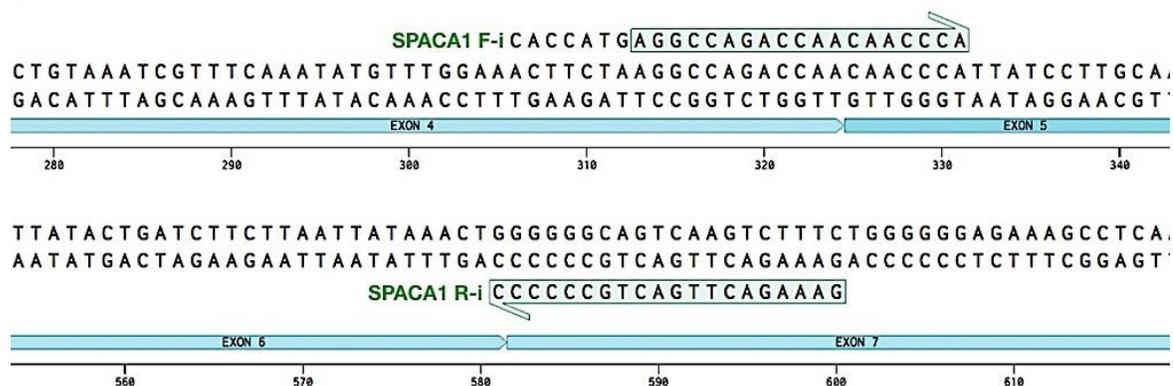


Figura 8 Alineamiento de los iniciadores del (A) fragmento externo y del (B) fragmento interno con la isoforma 3 del ADNc predicho para *SPACA1* (elaborado con Benchling^{®66}). (A) Los iniciadores SPACA1 F-e y SPACA1 R-e amplifican un fragmento externo de 595 pb (nucleótidos 31 a 619, exones 1 a 7) que incluye a los todos los exones de la proteína SPACA,1 así como a los 7 nucleótidos no hibridados que se añadieron en el extremo 5' del iniciador directo. (B) Los iniciadores SPACA1 F-i y SPACA1 R-i amplifican un fragmento interno de 295 pb (nucleótidos 312 a 600, exones 4 a 7), el cual fue utilizado como control interno de amplificación.

En el Cuadro 2 se muestra el orden, volumen y concentración de los reactivos utilizados para la síntesis del ADN complementario. Por otra parte, el Cuadro 3 muestra el orden, volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación con la enzima *Pfu* ADN polimerasa del control positivo (*ACTB*, 170 pb) (modificado de Nuncio-Limón 2013),⁶⁸ del control interno de amplificación (*SPACAI*, fragmento interno, 295 pb) y del fragmento externo del gen *SPACAI* (595 pb), mientras que las condiciones del termociclador requeridas para su amplificación se resumen en el Cuadro 4 para el gen *ACTB* (modificado de Nuncio-Limón 2013⁶⁸) y en el Cuadro 5 para el gen *SPACAI*.

La Figura 9 muestra la predicción y la fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la RT-PCR del gen *SPACAI*. La Figura 10 muestra la predicción y la fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del amplicón (*SPACAI*, fragmento externo, 595 pb), digerido con la enzima de restricción *BsmI* para verificar la secuencia del inserto previo a su purificación con el sistema QIAquick Gel Extraction Kit[®] y a su clonación en el vector pET101/D TOPO[®].

Reactivo	Volumen	Concentración
ARN total	2 uL	< 5 µg
Oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µL	100 µM
Agua libre de nucleasas	9 uL	-
5X Reaction Buffer [®]	4 µl	5X
RiboLock RNase Inhibitor [®]	1 µl	20 U/µl
Mezcla de dNTP	2 µl	10 mM
RevertAid M-MuLV RT [®]	1 µl	200 U/µl
Volumen total	20 µl	-

Cuadro 2 Volumen y concentración de los reactivos empleados para la retrotranscripción con el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit[®].

Resumen del orden, volumen y concentración de los reactivos empleados para la retrotranscripción. La reacción se incubó en termociclador a 42 °C durante 1 h y posteriormente se detuvo al calentar la mezcla a 70 °C durante 5 min.

Reactivo	Volumen	Concentración
Agua ultrapura	33 μ l	-
10X <i>Pfu</i> Buffer [®]	5 μ l	10X
Mezcla de dNTP	1 μ l	10 mM (c/u)
ADNc	1 μ l	-
Iniciador directo	2.5 μ l	10 μ M
Iniciador inverso	2.5 μ l	10 μ M
<i>Pfu</i> ADN polimerasa	1 μ l	2.5 U/reacción
MgSO ₄	4 μ l	25 mM
Volumen total	50 μ l	-

Cuadro 3 Volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación, mediante RT-PCR, de los genes *SPACAI* y *ACTB*.

Resumen del orden, volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación mediante RT-PCR de los genes *SPACAI* y *ACTB* con la enzima de alta fidelidad *Pfu* ADN polimerasa.

Gen	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>ACTB</i>	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
	Desnaturalización	95 °C	30 s	30
	Alineamiento	53 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	72 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	1

Cuadro 4 Condiciones del termociclador para la amplificación mediante RT-PCR del gen *ACTB* (modificado de Nuncio-Limón 2013).⁶⁸

Resumen de las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizados para la amplificación del gen *ACTB*.

Gen	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>SPACAI</i>	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
	Desnaturalización	95 °C	30 s	30
	Alineamiento	63 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	72 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	1

Cuadro 5 Condiciones del termociclador para la amplificación mediante RT-PCR del gen *SPACAI*.

Resumen de las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos utilizados para la amplificación del fragmento externo y del control interno de amplificación del gen *SPACAI*.

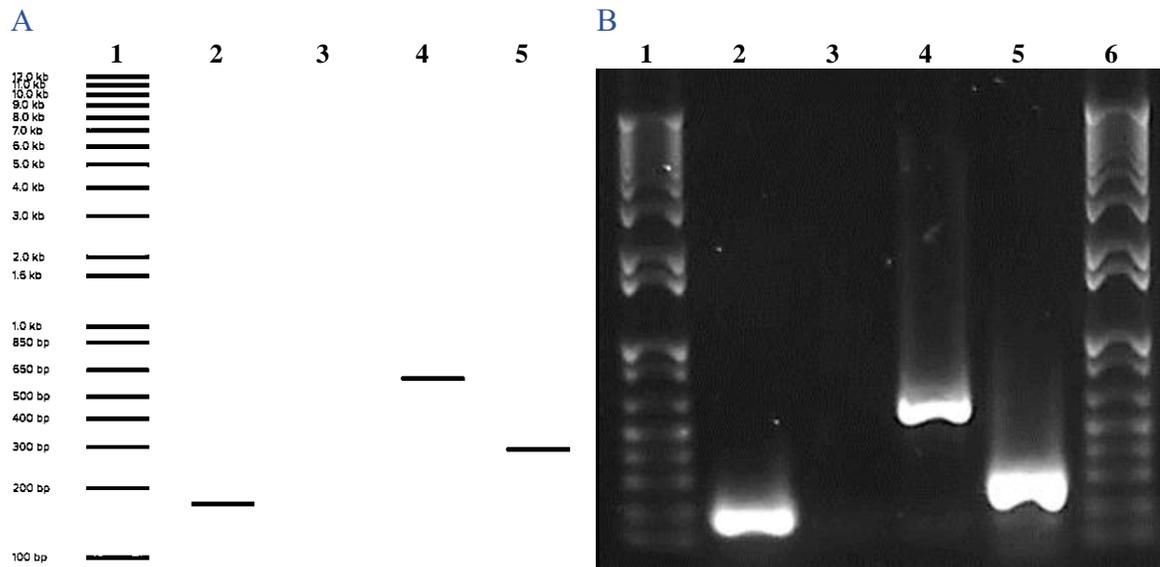


Figura 9 (A) Predicción (elaborada con Benchling^{®66}) y (B) fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la RT-PCR del gen *SPACAI*. 1) Kb Plus DNA Ladder[®] 2) control positivo (*ACTB*, 170 pb) 3) control negativo 4) *SPACAI* (fragmento externo, 595 pb) 5) *SPACAI* (fragmento interno, 295 pb) 6) 1 Kb Plus DNA Ladder[®].

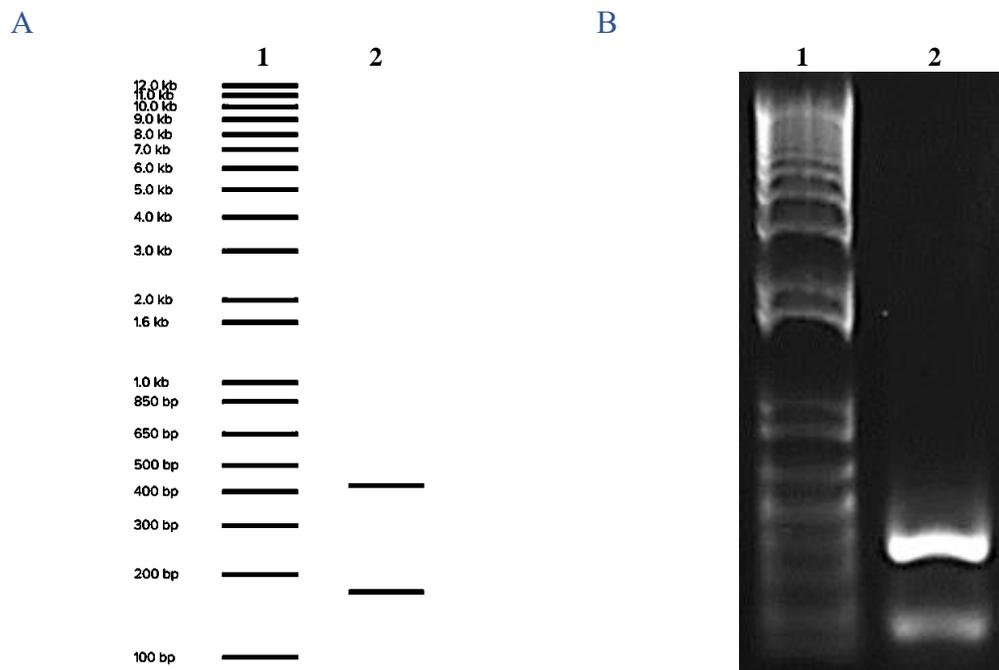


Figura 10 (A) Predicción (elaborada con Benchling^{®66}) y (B) fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético del amplicón digerido con la enzima *BsmI*. (A) 1) 1Kb Plus DNA Ladder[®] 2) *SPACAI* (fragmento externo, 423 pb y 172 pb).

Clonación del gen *SPACAI*

En la Figura 11 se muestra un diagrama con la secuencia 5' CCCTT 3' presente en ambos extremos del sitio de clonación del vector de expresión pET101/D TOPO[®], la cual permite la construcción del plásmido recombinante al ser reconocida por la enzima topoisomerasa; también se muestra el extremo cohesivo 5' GGTG 3' que facilita la clonación direccional del inserto debido a la complementariedad de bases que presenta con la secuencia añadida en el iniciador diseñado para la cadena directa (5' CACC 3'). La construcción y las características del vector pJAPT16, obtenido en este trabajo mediante la clonación de un fragmento del gen *SPACAI* en el vector de expresión pET101/D-TOPO[®], se muestran en la Figura 12. El orden, volumen y concentración de los reactivos utilizados para la clonación se muestran en el Cuadro 6.

Para la caracterización de clonas se verificó el crecimiento de las colonias en presencia de ampicilina, se extrajo el ADN plasmídico con el método de lisis alcalina⁶⁹ o con el sistema QIAprep Miniprep Kit[®], se detectó el inserto mediante PCR con *Taq* polimerasa y se analizó el patrón electroforético del ADN plasmídico digerido con la enzima *BsmI* para determinar la presencia, tamaño y orientación del inserto.

En el Cuadro 7 se muestra el orden, volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación mediante PCR del gen *SPACAI* clonado en el vector pJAPT16, mientras que las condiciones del termociclador requeridas para su amplificación se muestran en el Cuadro 8. La predicción y la fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la PCR amplificados a partir del plásmido se muestran en la Figura 13. Por otra parte, la predicción y la fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los vectores pET101/D-TOPO[®] (sin inserto), pJAPT16 (con

inserto adecuado) y pJAPT16i (con inserto invertido) digeridos con la enzima *BsmI* se muestran en la Figura 14.

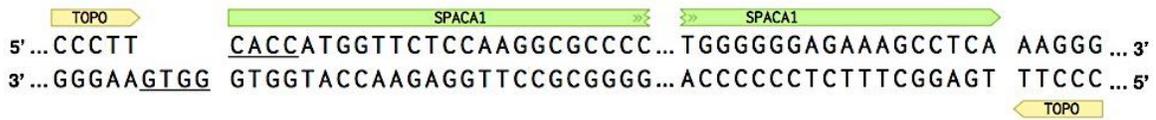


Figura 11 Diagrama de la clonación del gen *SPACA1* en el vector pET101/D-TOPO[®]. El vector pET 101/D-TOPO[®] cuenta con una topología lineal y un sitio de clonación TOPO. La clonación direccional del inserto se facilita debido a la complementariedad de bases entre el extremo no hibridado del plásmido (secuencia GTGG) y el extremo 5' del iniciador diseñado para la cadena directa del gen *SPACA1* (secuencia CACC).

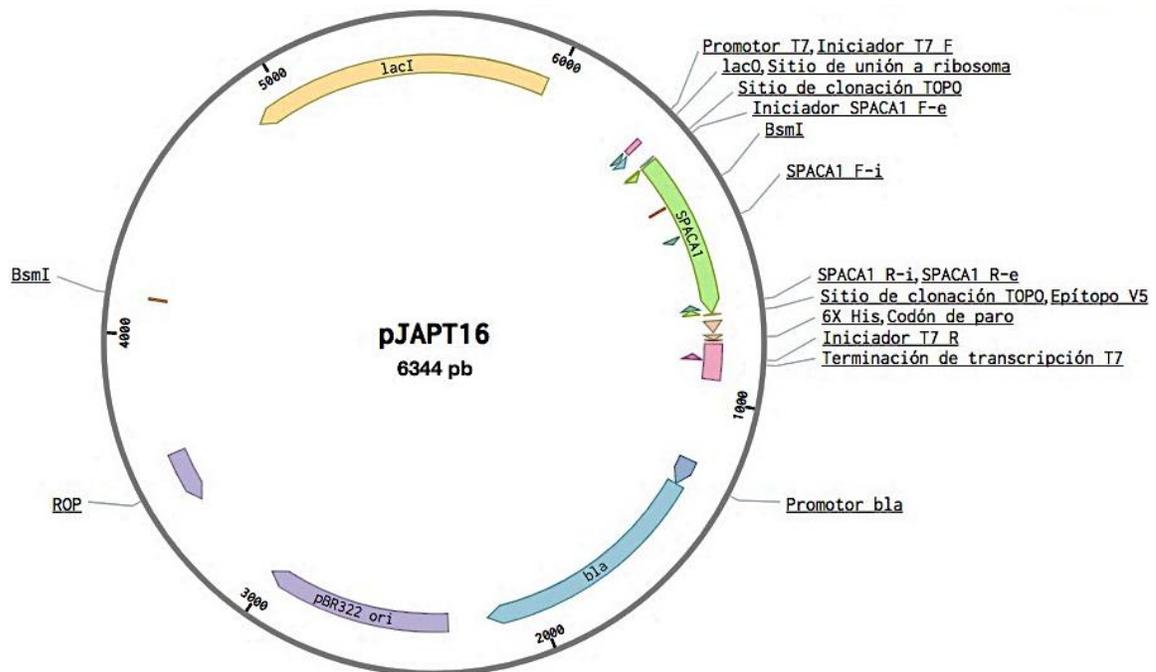


Figura 12 Mapa con la construcción del vector pJAPT16 (elaborado con Benchling^{®66}). El vector pJAPT16 se construyó mediante la clonación de una región de la secuencia codificante del gen *SPACA1* en el vector de expresión pET101/D-TOPO[®]. Contiene las secuencias del gen de resistencia a ampicilina *bla*, del origen de replicación pBR322, de la proteína reguladora *rop* y del represor *lacI*. En la proteína recombinante se integran las etiquetas de los epítomos V5 y 6x His. Presenta un codón de término (5' TGA 3') y una región de terminación de la transcripción. Los dos sitios de reconocidos por la enzima *BsmI* permiten construir un patrón de restricción que indica el tamaño del plásmido recombinante, así como el tamaño del inserto y su orientación con relación al vector, mientras que los iniciadores T7 permiten determinar la secuencia del inserto.

Reactivo	Volumen
Producto de PCR recién obtenido (inserto:vector de 0.5:1 a 2:1)	≤4 uL
Solución salina (diluida 1:4)	1 μL
Vector pET101/D-TOPO®	1 uL
Volumen total	6 μl

Cuadro 6 Volumen de los reactivos empleados para la clonación del gen *SPACAI* en el vector pET101/D-TOPO®.

Reactivo	Volumen	Concentración
Agua ultrapura	40.75 μl	-
TopTaq PCR Buffer®	5 μl	10X
Mezcla de dNTP	1 μl	10 mM (c/u)
ADN plasmídico	1 μl	<25 ng
Iniciador directo	1 μl	10 μM
Iniciador inverso	1 μl	10 μM
TopTaq DNA polymerase®	0.25 μl	1.25 U/reacción
Volumen total	50 μl	-

Cuadro 7 Volumen y concentración de los reactivos empleados para la amplificación mediante PCR del gen *SPACAI* clonado en el vector pJAPT16.

Gen	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<i>SPACAI</i>	Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	1
	Desnaturalización	95 °C	30 s	30
	Alineamiento	63 °C	30 s	
	Extensión	72 °C	30 s	
	Extensión final	72 °C	5 min	1

Cuadro 8 Condiciones del termociclador para la amplificación mediante PCR del gen *SPACAI* clonado en el vector pJAPT16.

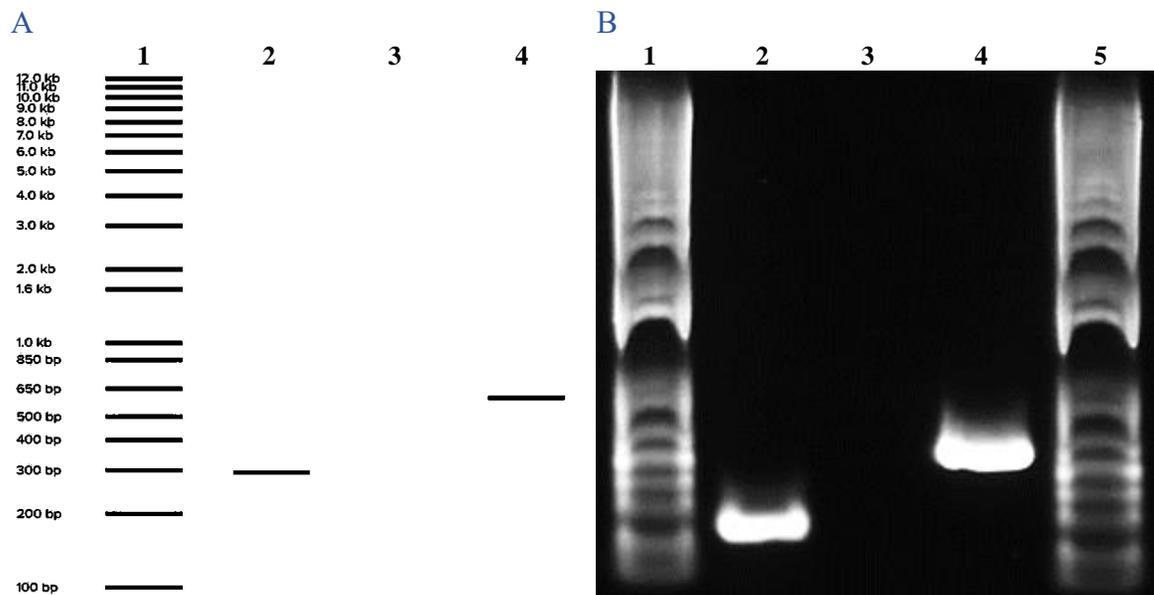


Figura 13 (A) Predicción (elaborada con Benchling^{®66}) y (B) fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los productos de la PCR del gen *SPACAI* clonado en el vector pJAPT16.

1) 1 Kb Plus DNA Ladder[®] 2) control interno de amplificación (*SPACAI*, 295 pb) 3) control negativo 4) *SPACAI* (595pb) 5) 1 Kb Plus DNA Ladder[®].

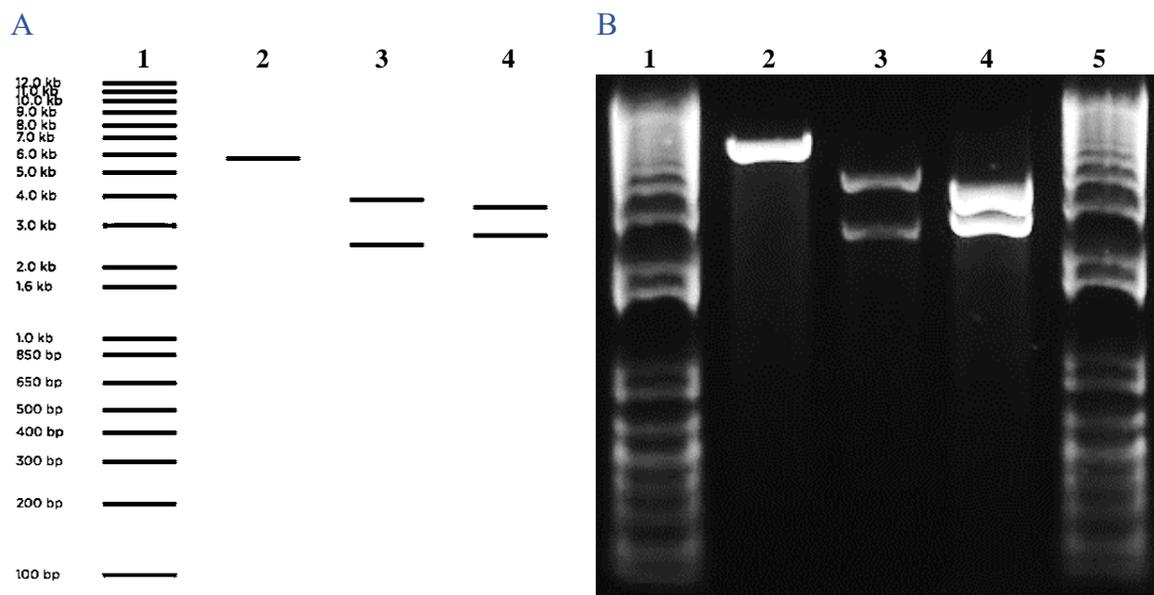


Figura 14 (A) Predicción (elaborada con Benchling^{®66}) y (B) fotografía del gel de agarosa al 1% en TAE con el patrón electroforético de los vectores pET101/D-TOPO[®], pJAPT16 y pJAPT16i digeridos con la enzima *BsmI*.

1) 1Kb Plus DNA Ladder[®] 2) pET101/D-TOPO[®] (5753 pb) 3) pJAPT16 (3855 pb y 2489 pb) 4) pJAPT16i (inserto invertido) (3604 pb y 2744 pb) 5) 1 Kb Plus DNA Ladder[®].

Secuenciación del gen *SPACAI*

Una vez identificadas las clonas cuyos plásmidos contaban con el tamaño y la orientación del inserto adecuados, se prepararon reacciones con el iniciador T7 (directo o inverso) y se enviaron en refrigeración a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM donde fueron procesadas en el equipo 3130xl Genetic Analyser,⁸² el cual se basa en la secuenciación automática en capilar con el método de Sanger.⁸³ En la Figura 15 se muestra el alineamiento de las secuencias de la cadena inversa y de la cadena directa del vector pJAPT16, los cuales presentan una identidad del 100% con respecto a la isoforma 3 del ADNc predicho para el gen *SPACAI*. En el Anexo I puede consultarse el alineamiento con las secuencias de nucleótidos completas.



Figura 15 Alineamiento de las secuencias de la cadena inversa (abajo) y de la cadena directa (al centro) del vector pJAPT16 con la isoforma 3 del ADNc predicho para el gen *SPACAI* (arriba) (elaborado en Benchling^{®66} con Clustal Omega^{®71}).

El fragmento del gen clonado en el vector pJAPT16 (exones 1 a 7, 591 pb, 197 AA) presenta una identidad del 100% y una cobertura de alineamiento del 80.4% con respecto a la secuencia predicha para el ADNc del gen *SPACAI* (exones 1 a 7, 735 b, 245 AA).

El vector pJAPT16 codifica a la proteína recombinante SPACAI1, la cual se encuentra integrada por una secuencia de 229 aminoácidos, de los cuales 200 AA son idénticos en la proteína nativa. La proteína recombinante cuenta con un peso molecular calculado de 25.46 kDa y un punto isoelectrico estimado de 8.08, además de tener una identidad del 81.6% con respecto a la proteína nativa, la cual se compone a su vez por una secuencia de 245 aminoácidos con un peso molecular calculado de 27.25 kDa y un punto isoelectrico estimado de 4.91. El alineamiento de las secuencias que codifican a las proteínas SPACAI

recombinante y nativa se muestra en la Figura 16. Nótese el incremento en el tamaño de la secuencia presente en el vector pJAPT16 (687 pb, 229 AA) debido a la incorporación de los epítotos V5 y 6x His, en comparación con la secuencia clonada en el vector pET101/D-TOPO® (591 pb, 197 AA). Asimismo, cabe resaltar que la región con menor similitud se encuentra en el extremo C-terminal de la secuencia, que corresponde a la región transmembranal de la proteína.²⁹

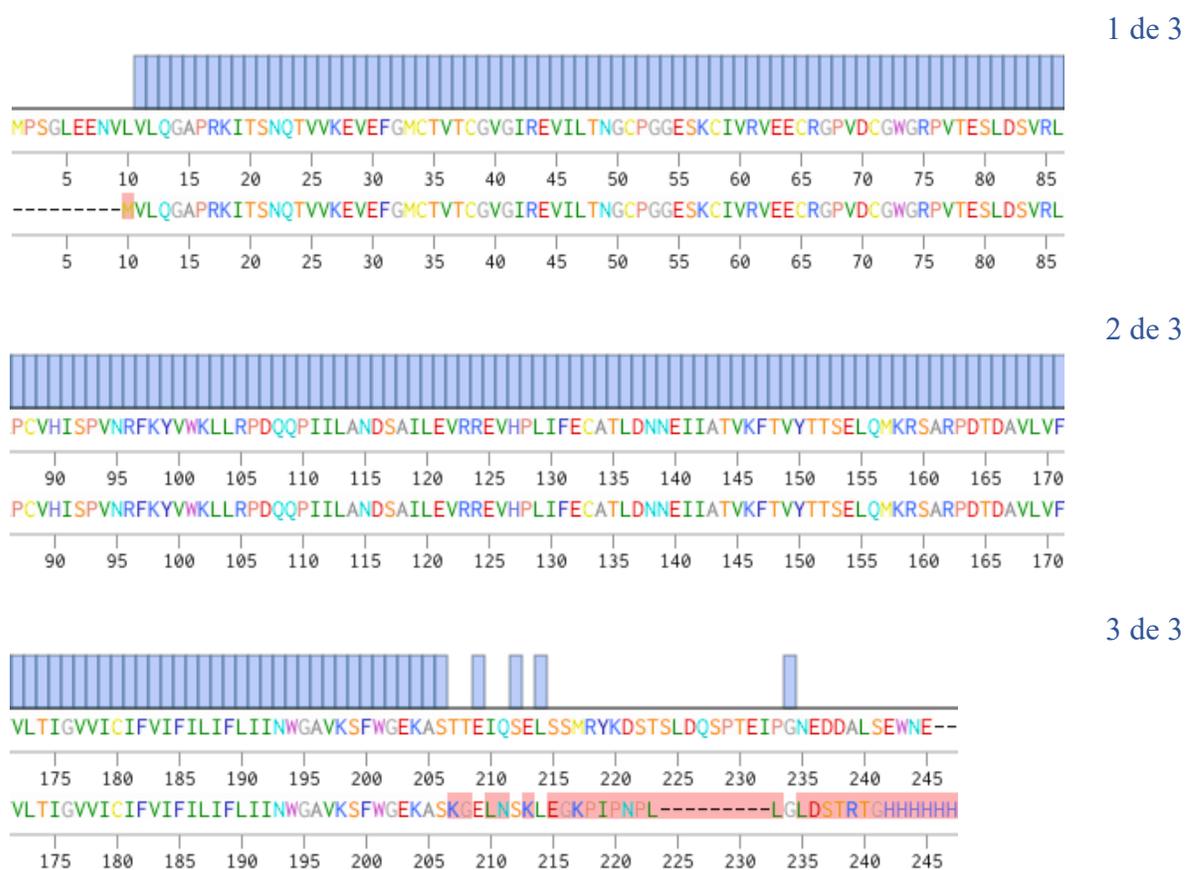


Figura 16 Alineamiento de las secuencias que codifican a las proteínas SPACA1 recombinante (abajo) y nativa (arriba) (elaborado en Benchling^{®66} con Clustal Omega^{®71}). La proteína SPACA1 recombinante (229 AA) presenta una identidad del 81.6% con respecto a la secuencia predicha para la isoforma 3 de la proteína SPACA1 nativa (245 AA). Las barras azules en la parte superior de las secuencias indican los aminoácidos alineados, mientras que los AA no alineados con la secuencia blanco se encuentran resaltados en rojo.

Predicción de las características estructurales y funcionales de SPACA1

Se utilizaron los programas informáticos Extended Similarity Group^{®72} y Phylogenomics based Protein Function Prediction^{®73} y para predecir la localización y función celular de la proteína SPACA1 en el perro doméstico, ratón, cerdo y humano a partir de las secuencias informadas en el GenBank⁶⁴. La predicción y su porcentaje de confianza por especie se muestran en el Cuadro 9. Se consideraron exclusivamente las predicciones con un porcentaje de confianza muy elevado (>70%). Adicionalmente se buscó determinar, mediante el uso del *software* SignalP 4.1^{®,74} la presencia o ausencia de péptido señal en las secuencias que codifican a la proteína SPACA1 en las especies mencionadas para inferir la posible vía de incorporación de la proteína en las membranas acrosomales y plasmática, los resultados de la predicción de péptido señal se muestran en la Figura 17.

	Confianza por especie (%)			
	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Homo sapiens</i>
Localización^a				
Membrana acrosomal	91.3	92.6	92.4	92.4
Componente integral de membrana	97.1	97.8	95.9	97
Proceso biológico^a				
Ensamblaje acrosomal	91.3	92.6	92.4	92.4
Función molecular^b				
Unión a ATP	100	90	100	100
Actividad de proteína quinasa	87	100	78	81
Unión a derivados de carbohidratos	83	75	83	83
Unión a moléculas pequeñas	77	73	70	82
Unión a proteínas	74	71	70	91

Cuadro 9 Predicción de la localización, proceso biológico y función de la proteína SPACA1 en el perro doméstico, en el ratón, en el cerdo y en el humano (elaborado con ^aESG^{®72} y ^bPHYLOPPF^{®73}).

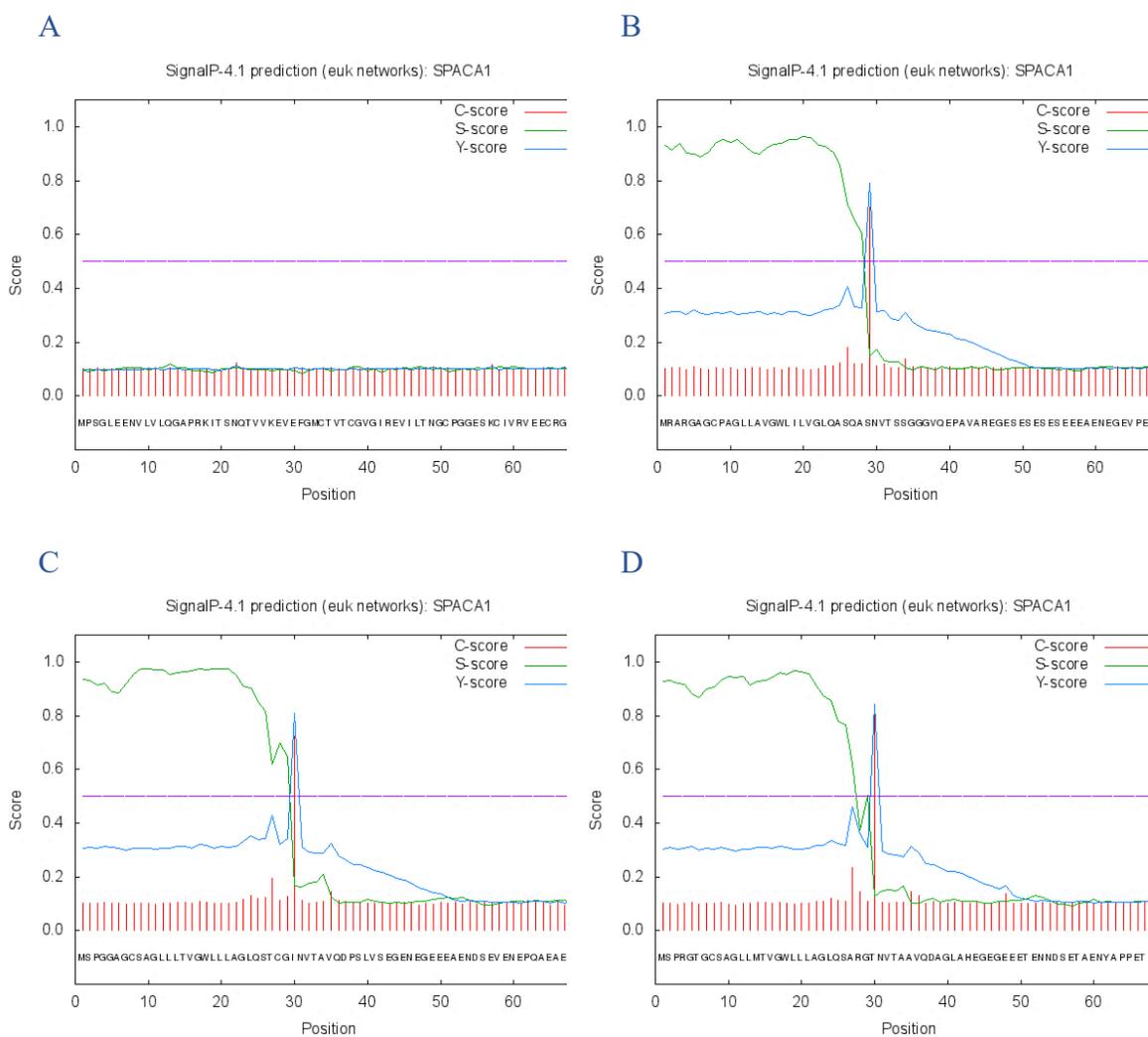


Figura 17 Predicción de las secuencias de péptido señal en las proteínas SPACA1 del (A) perro doméstico, (B) del ratón, (C) del cerdo y (D) del humano (elaborado con SignalP 4.1^{®74}).

El puntaje de escisión (*C-score*) se muestra en rojo; el de péptido señal (*S-score*), en verde; el de escisión combinado (*Y-score*), en azul y el de discriminación (*D-score*), en violeta. Nótese que la proteína SPACA1 del perro doméstico carece de péptido señal.

La predicción de los modelos estructurales de la proteína SPACA1 recombinante, del perro doméstico, ratón, cerdo y humano se realizó mediante el uso del *software* I-TASSER[®].⁷⁶ En las Figuras 18 y 19 se muestra, respectivamente, la predicción de las estructuras secundarias y terciarias de SPACA1. La proteína SPACA1 recombinante se compone por un 25.33% de

α -hélices; 29.69% de láminas- β y 44.98% de giros. Mientras que la composición de la proteína SPACA1 canina es del 26.53%, 29.80% y 43.61% respectivamente.

En la Figura 20 se muestra la comparación estructural, elaborada con el programa TM-align[®],⁷⁷ de las proteínas IZUMO1 humana y SPACA1 canina, mediante la cual se establece como probables análogos a ambas proteínas (confianza = 0.542). La comparación estructural entre la proteína IZUMO1 humana y las proteínas SPACA1 recombinante, del ratón, cerdo y humano generó resultados similares con una confianza respectiva de 0.525, 0.609, 0.544 y 0.531 (modelos no mostrados). Donde 0 es el valor más bajo y 1, el más alto (mayor similitud). Se consideran análogos estructurales cuando la confianza es ≥ 0.5 . Como referencia, la comparación estructural entre el modelo predicho de IZUMO1 (elaborado en este trabajo mediante I-TASSER^{®76}) y el modelo cristalográfico de IZUMO1 (obtenido por Aydin *et al.*⁸⁴), determina a ambas como análogos estructurales con una confianza = 0.643. Ambos modelos se muestran en la Figura 21.

También se realizó la predicción de posibles funciones enzimáticas mediante el programa COACH[®],⁷⁸ sin embargo, los resultados obtenidos fueron negativos para los modelos de SPACA1 recombinante, del perro doméstico, ratón, cerdo y humano, así como para la proteína IZUMO1 de origen humano, con una confianza máxima obtenida de 0.070, 0.065, 0.065, 0.065, 0.065 y 0.344 respectivamente (valores no mostrados). Tampoco se logró esclarecer la unión a posibles ligandos en ninguno de los casos. La confianza máxima obtenida fue de 0.07, 0.15, 0.08, 0.10, 0.07 y 0.07 respectivamente (valores no mostrados). Donde 0 es el valor más bajo y 1, el más alto (mayor confianza). Se considera la presencia de funciones enzimáticas o bien, de unión a ligandos cuando la confianza es ≥ 0.5 .

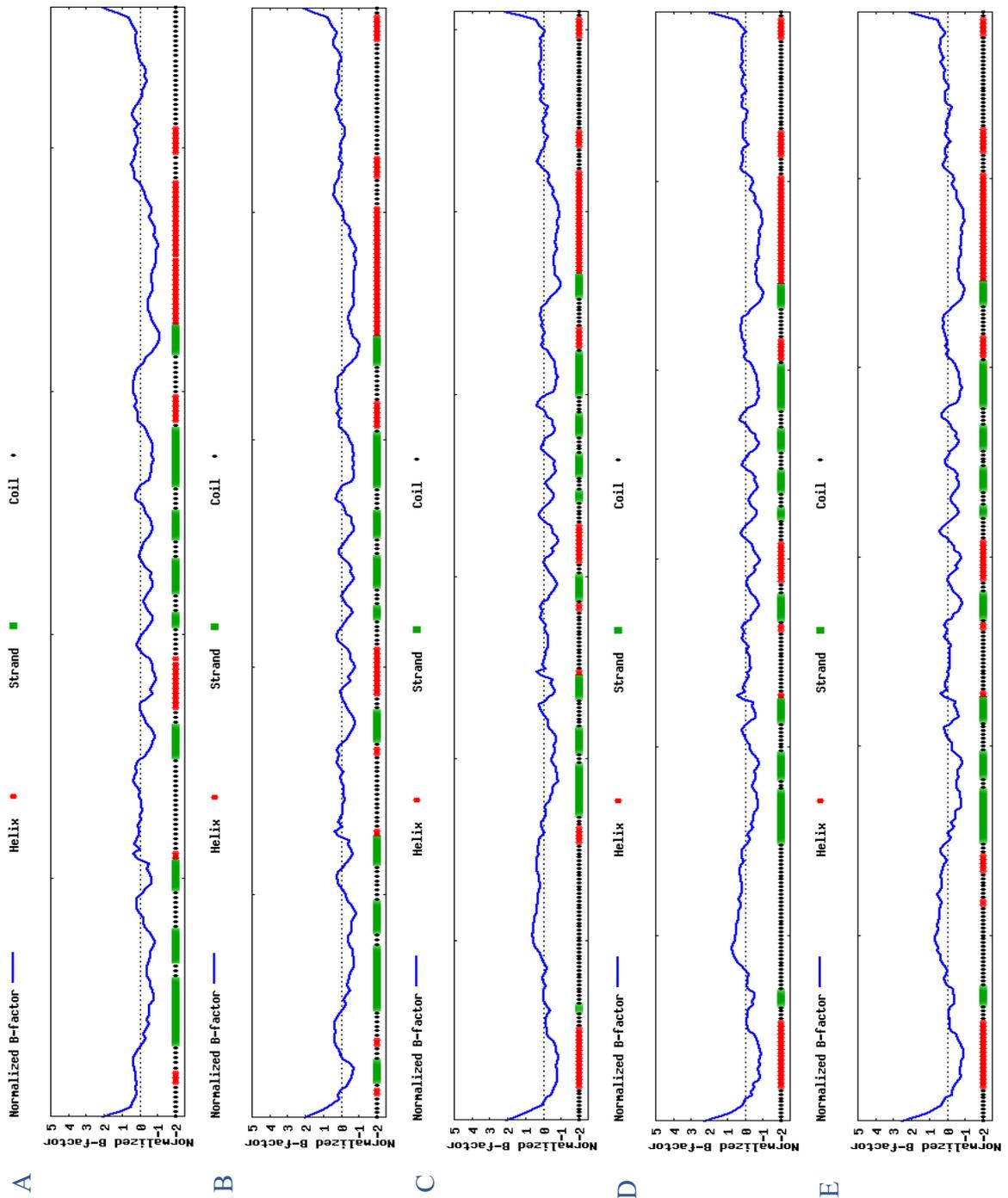


Figura 18 Predicción de la estructura secundaria de las proteínas SPACA1 (A) recombinante, (B) del perro doméstico, (C) del ratón, (D) del cerdo y (E) del humano (elaborado con I-TASSER^{®76}).

Las regiones correspondientes a α -hélices se muestran en rojo; las láminas- β , en verde; los giros, en negro; mientras que en azul se muestra el Factor B normalizado (grado de movilidad térmica inherente a los residuos o átomos de las regiones proteicas).

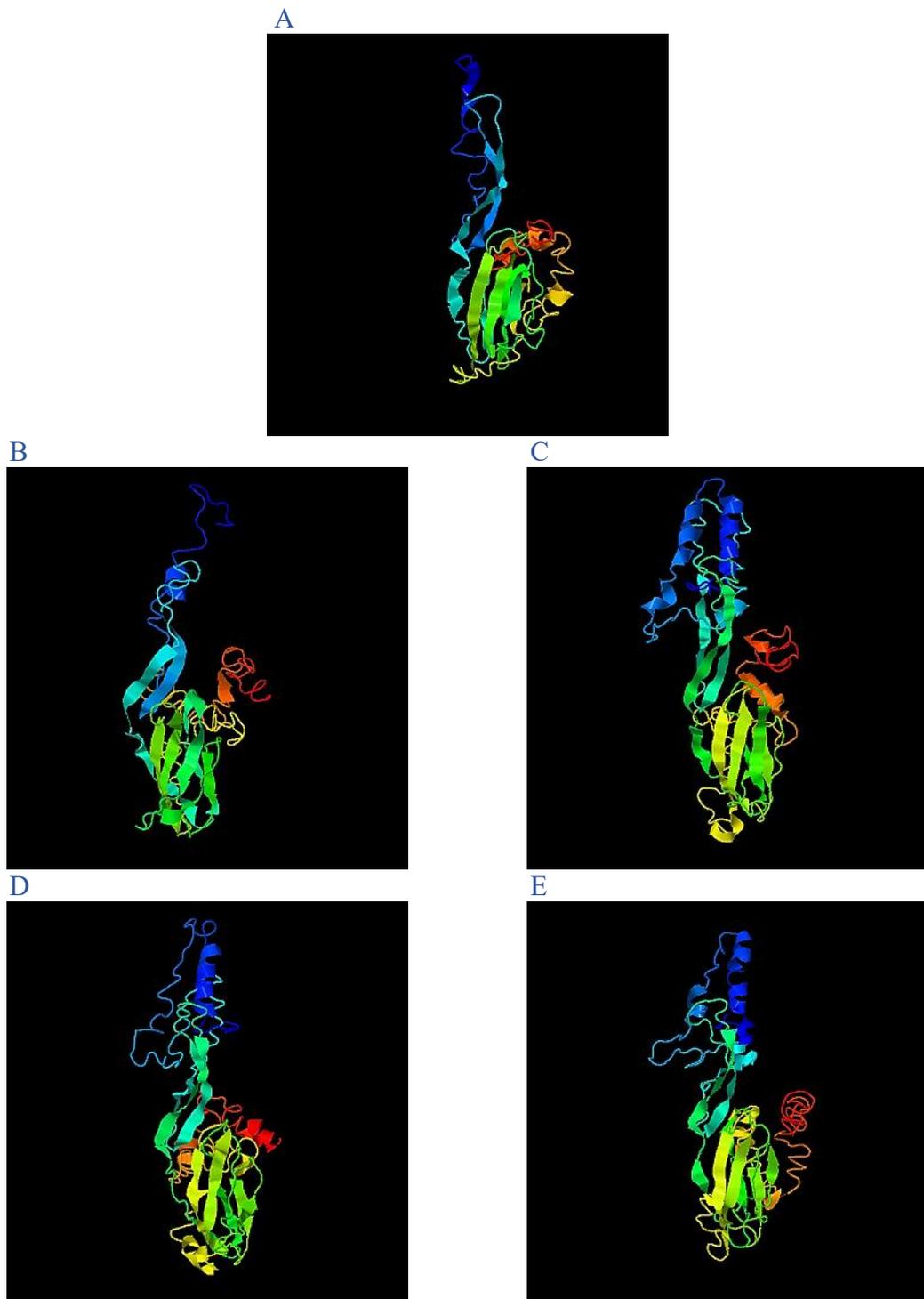


Figura 19 Predicción de la estructura terciaria de las proteínas SPACA1 (A) recombinante, (B) del perro doméstico, (C) del ratón, (D) del cerdo y (E) del humano (elaborado con I-TASSER^{®76}).

La confianza (C-score) para los modelos predichos es de -4.00, -3.94, -4.37, -4.25 y -4.51 respectivamente, donde -5 es el valor más bajo y 2, el valor más alto (mayor confianza).

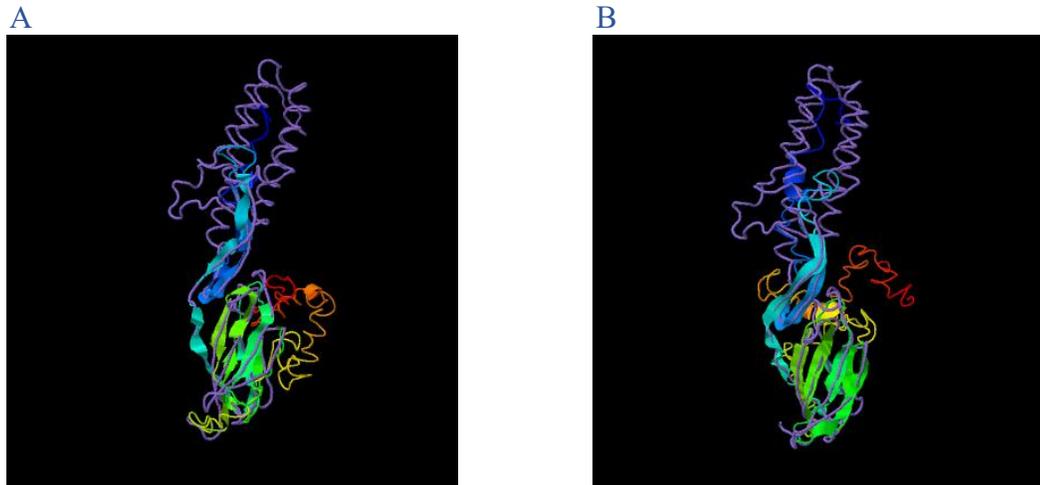


Figura 20 Comparación estructural entre el modelo cristalográfico de la proteína IZUMO1 humana (púrpura, obtenido por Aydin *et al.*⁸⁴) y los modelos predichos para las proteínas SPACA1 (A) recombinante y (B) canina (elaborados con I-TASSER^{®76}).

La similitud estructural (TM-score) de la proteína IZUMO1 humana con las proteínas SPACA1 recombinante y canina es de 0.525 y 0.542 respectivamente, donde 0 es el valor más bajo y 1, el valor más alto (mayor similitud). Se consideran análogos estructurales cuando el TM-score es ≥ 0.5 .

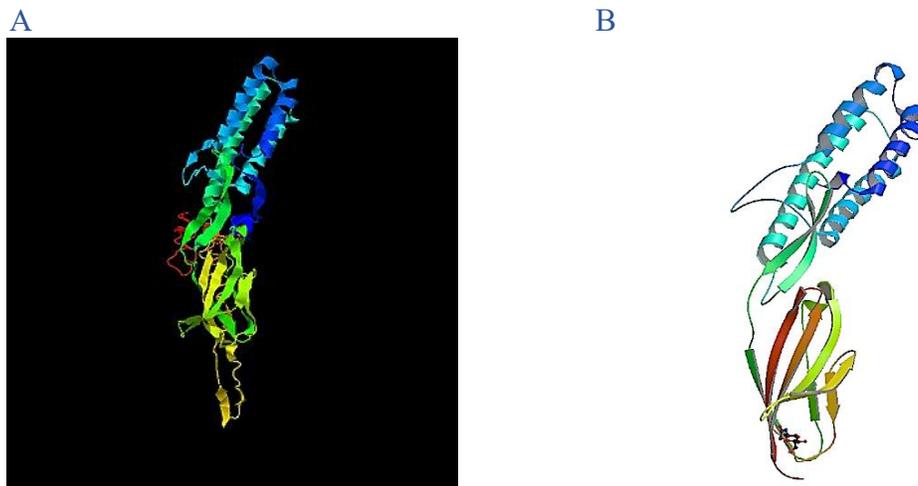


Figura 21 (A) Predicción de la estructura terciaria de la proteína IZUMO1 humana (elaborada con I-TASSER^{®76}) y comparación con su (B) modelo cristalográfico (obtenido por Aydin *et al.*⁸⁴).

Modelo cristalográfico utilizado para el alineamiento estructural entre las proteínas IZUMO1 y SPACA1. La confianza (C-score) del modelo predicho es de -1.96, donde -5 es el valor más bajo y 2, el valor más alto (mayor confianza).

En el Cuadro 10 se muestra la predicción, elaborada mediante el software LBtope^{®79} y AmphipaSeek^{®,80} de los probables epítomos lineales y dominios transmembranales de las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, ratón, cerdo y humano. Los valores predictivos estimados de los programas utilizados corresponden al 81%, en el caso de la determinación de epítomos y al 94%, en la identificación de dominios transmembranales. El consenso de las secuencias de los determinantes antigénicos identificados se muestra en el Cuadro 11.

A
MVLQGAPRKITSNQTVVKEVEFGMCTVTCGVGIREVILTNGCPGGESKCVRVEE
CRGPVDCGWGRPVTESLDSVRLPCVHISPVNRFKYVWKLRLPDQQPIILANDSAI
LEVRREVHPLIFECATLDNNEIATVKFTVYTTSELQMKRSARPD~~DAVLVFLTI~~
GVVICIFVIFILIFLIINWGAVKSF~~WGEKASKGELNSKLEGK~~PIPNPLLGLDSTRTG
HHHHHH

B
MPSGLEENVLVLQGAPRKITSNQTVVKEVEFGMCTVTCGVGIREVILTNGCPGG
ESKCVRVEECRGPVDCGWGRPVTESLDSVRLPCVHISPVNRFKYVWKLRLPDQ
QPIILANDSAILEVRREVHPLIFECATLDNNEIATVKFTVYTTSELQMKRSARPD
DAVLVFLTIGVVICIFVIFILIFLIINWGAVKSF~~WGEK~~ASTTEIQSELSSMRYKDST
SLDQSPTEIPGNEDDALSEWNE

C
MRARGAGCPAGLLAVGWLLVGLQASQASNVTS~~SSGGVQEP~~AVAREGESESES
ESEEEAENEGEVPESETTA~~EAD~~AEEVQNR~~TIVKEVEFGMCTVTCGVGIREVILT~~
NGCPGGESKCVRVEECRGPVDCGWGKPISENLD~~SARLSCVHISPENRFKYVWK~~
LLKPDQQPVILTNSAVLEITREIRPLAFECDTLDNNEMVASVKFTVYTTNELQM
RRSSRPD~~DAVLVFLTIGV~~IICIFVIFVLIFIINWAAVKSF~~WGS~~KTSATEIQSELSS
MRYKDSTSLDQSPDIPVHEDDALSEWNE

D
MSPGGAGCSAGLLLTVGWLLLAGLQSTCGINVTAVQDPSLVSEGENEGEEEAEN
DSEVENEPQAEAEQDVSNKTVVKEVEFGMCTVTCGVGIREVLLTNGCPGGESK
IVRVEECRGPVDCGWGKPISENLESVRLSCVHTSPVNRFKYVWLLRPNQQA
VILANDSAILEVQRETHPMAFQCETLDNNEIVATVKFTVYTTAELQMKRSSRPD
DAVLVFLTIGVIICIFVIFLIFIINWATVKDFWASKASTTEIQSELSSMRYKDSTSL
DQSPTEIPGHEDDALSEWNE

E
MSPRGTGCSAGLLMTVGWLLLAGLQSARGTNVTAAVQDAGLAHEGEGEEETE
NNDSETAENYAPPETEDVSNRN~~VVKEVEFGMCTVTCGIGVREVILTNGC~~PGGES
KCVRVEECRGPTDCGWGKPISESLESVRLACIHTSPLNRFKYMWKLRLRQDQ
QS IILVNDSAILEVRKESHPLAFECDTLDNNEIVATIKFTVYTTSELQMRSSLPATDA
ALIFVLTIGVIICVFIFLIFIINWAAVKAFWGAKASTPEVQSEQSSVRYKDSTSL
DQLPTEMPGEDDALSEWNE

Cuadro 10 Predicción de epítomos lineales y regiones transmembranales en las proteínas SPACA1 (A) recombinante, (B) del perro doméstico, (C) del ratón, (D) del cerdo y (E) del humano (elaborado con LBtope^{®79} y AmphipaSeek^{®80}).

Los epítomos probables se muestran en rojo, mientras que los posibles dominios transmembranales (cuya longitud promedio es de 21 AA) se encuentran subrayados. La confianza estimada de las predicciones es de 0.81 para los epítomos y de 0.94 para los dominios transmembranales, donde 0 es el valor más bajo y 1, el más alto (mayor confianza).

A	B	C	D	E	F
LTNGCPGG RVEECRGP YVWKLRLRPDQ TSELQMKRSAR	LTNGCPGG RVEECRGP YVWKLRLRPDQ TSELQMKRSAR	LTNGCPGG RVEECRGP YVWKLRLKPDQ TNELQMKRRSSR	LTNGCPGG RVEECRGP YVWRLLRPNQ TAELOMKRRSSR	LTNGCPGG RVEECRGP YMWKLLRQDQ TSSELQMKRRSS	LTNGCPGG RVEECRGP Y/W/LL/Q TS/ELQM/RS/

Cuadro 11 Epítomos predichos para las proteínas SPACA1 (A) recombinante, (B) del perro doméstico, (C) del ratón, (D) del cerdo, (E) del humano y (F) consenso de epítomos.

La proteína SPACA1 recombinante podría compartir 4 epítomos con las proteínas SPACA1 del perro doméstico, ratón, cerdo y humano. Los aminoácidos que difieren de la secuencia presente en la proteína recombinante se encuentran subrayados. Nótese que los epítomos LTNGCPGG y RVEECRGP se conservan en todas las especies, mientras que los otros epítomos presentan variaciones entre especies.

DISCUSIÓN

Se cumplió el objetivo del trabajo ya que se obtuvo la secuencia del gen *SPACAI*, el cual codifica a la proteína espermática asociada al acrosoma 1 del perro doméstico. Si se considera que aproximadamente el 90% de los genes (en el humano) tienen formas alternativas para sus ARNm y que un mismo gen puede codificar diversas proteínas, cada una con funciones distintas,⁸⁵ resulta evidente que la caracterización de las secuencias presentes en el ADNc es de suma importancia. Actualmente, la predicción *in silico* de exones presenta una exactitud cercana al 96% debido a problemas inherentes a los programas bioinformáticos empleados para la identificación de los marcos abiertos de lectura, o bien, por la presencia de mutaciones en las regiones de corte y empalme.^{86,87}

Se realizó el alineamiento entre la secuencia predicha en el banco genómico para el gen *SPACAI*⁸⁸ y el gen *SPACAI* clonado en el vector pJAPT16, mediante el uso del programa Clustal Omega[®].⁷¹ Se determinó que la secuencia clonada en el vector pJAPT16 presenta un 100% de identidad con respecto a la secuencia reportada en el banco genómico, por lo que la predicción computacional de los intrones y exones que integran al gen *SPACAI* del perro doméstico es exacta. La secuencia se publicó en el banco genómico con el número de acceso KY706613. Además, se utilizó el programa BLAST[®]⁶³ para comparar la secuencia que codifica a la proteína SPACA1 del perro doméstico con las secuencias reportadas del ratón, del cerdo y del humano, y se estableció una identidad del 84%, 83% y 80%, respectivamente.

El vector de expresión pJAPT16 se construyó para permitir el desarrollo de un inmunógeno antiespermático que podrá ser evaluado en futuros trabajos. El plásmido contiene como

principales características a las secuencias que codifican a: la proteína espermática asociada al acrosoma 1 del perro doméstico (*SPACA1*), el gen de resistencia a ampicilina (*bla*), el origen de replicación pBR322, la proteína reguladora Rop, el represor *lacI*, entre otros. También cuenta sitios de unión a ribosomas y regiones para los iniciadores de secuenciación T7, además de dos sitios restricción para *BsmI*, que permiten identificar el tamaño del plásmido recombinante y la orientación del inserto con relación al vector. En la proteína recombinante se integran los epítotos V5 y 6x His. El plásmido presenta el codón de término 5' TGA 3' así como una región de terminación de la transcripción.

Se diseñaron los iniciadores y se estandarizaron las condiciones necesarias para la amplificación mediante RT-PCR de un fragmento del gen *SPACA1* del perro doméstico y de un control interno de amplificación. Las regiones amplificadas consisten en: una secuencia de 595 pb, de las cuales 591 pb codifican a una de las variantes transcripcionales predichas para el gen *SPACA1* (isoforma 3), y otra secuencia de 295 pb, la cual se utilizó como control interno de amplificación debido a que podría ser detectada a partir de todas las variantes transcripcionales predichas para este gen (isoformas 1, 2 y 3).

Para reducir la introducción de errores en los productos amplificados que serán clonados, secuenciados y expresados resulta esencial el uso de ADN polimerasas de alta fidelidad.⁸⁹ En la PCR del gen *SPACA1* se empleó la *Pfu* ADN polimerasa debido a que presenta actividad exonucleasa 3' → 5', que le permite corregir la incorporación errónea de nucleótidos durante la síntesis del ADN.⁸⁹ Esto permite que exista una mayor confianza de que la secuencia clonada será idéntica a la secuencia nativa, ya que la enzima posee una tasa

de error hasta 10 veces menor en comparación con enzimas utilizadas convencionalmente, como la *Taq* ADN polimerasa. Además la *Pfu* ADN polimerasa genera amplicones con extremos romos,⁸⁹ los cuales son necesarios para la clonación del inserto en el vector pET101/D-TOPO®.

El análisis realizado con el programa SignalP®⁷⁴ sugiere que la proteína SPACA1 del perro doméstico carece de péptido señal, mientras que dicha secuencia está presente en las proteínas del ratón, del cerdo y del humano. La predicción del péptido señal en la proteína de origen humano concuerda con lo reportado por Hao y colaboradores,²⁹ sin embargo, la ausencia de péptido señal sugiere que, en el perro doméstico, pudiera llevarse a cabo un mecanismo distinto a la vía clásica para la translocación de la proteína hacia las membranas acrosomales y celular. Las células eucariontes producen proteínas secretorias que carecen de secuencias hidrofóbicas; estas proteínas son sintetizadas exclusivamente en el citosol y posteriormente son translocadas por proteínas transportadoras dependientes de ATP, las cuales residen en la membrana plasmática. Este sistema de translocación dependiente de ATP se encuentra altamente conservado y participa en la importación de proteínas hacia mitocondrias y cloroplastos.⁹⁰⁻⁹²

Se determinó la probable localización y función biológica de la proteína SPACA1 mediante el uso de los programas ESG®⁷² y PHYLOPP®.⁷³ La predicción de la función biológica de SPACA1 en el ensamblaje del acrosoma del espermatozoide del perro doméstico concuerda con lo reportado en ratones por Fujihara y colaboradores,⁵¹ sin embargo, no fue posible predecir su función molecular precisa. La predicción de la localización celular de SPACA1

como componente integral de membrana y del acrosoma, en el espermatozoide del perro doméstico, también coincide con lo informado en humanos por Hao y colaboradores.²⁹

Mediante el uso del programa AmphipaSeek^{®80} se identificó un probable dominio transmembranal conservado en la proteína SPACA1 de todas las especies evaluadas. La predicción del dominio transmembranal corresponde con lo reportado en humanos por Hao y colaboradores.²⁹ Las características de este dominio sugieren que SPACA1 podría tratarse de una proteína monotópica (“*monotopic*”) con un único dominio transmembranal, dispuesto de forma paralela a la membrana y cuya región de anclaje estaría integrada por una α -hélice hidrofóbica de aproximadamente 21 AA; características que han sido previamente descritas en proteínas de membrana como la NS5A de la familia *Flaviviridae*, la cual interviene en el ensamblaje de complejo de replicación viral.^{93,94}

Con el programa I-TASSER^{®76} se predijeron las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas SPACA1 del perro, del ratón, del cerdo y del humano, así como de la proteína recombinante codificada en el vector pJAPT16. Mediante el uso del programa TM-align^{®77} se compararon los modelos estructurales generados de SPACA1, con las estructuras reportadas en el banco de datos de proteínas (PDB),⁹⁵ tras lo cual se estableció que las proteínas SPACA1 e IZUMO1 son análogos estructurales y que, por lo tanto, pueden tener funciones similares.

Esta similitud concuerda con lo descrito por Inoue y colaboradores, ya que IZUMO1 es también una proteína de membrana responsable de la unión de los gametos,^{10,15,96} además de que ambas pertenecen a la misma superfamilia de inmunoglobulinas.³¹ También cabe

destacar que el bloqueo genético de *IZUMO1* ocasiona un 100% de infertilidad debido a la completa incapacidad de los espermatozoides para fusionarse con los ovocitos.⁹⁷ Además, se ha demostrado que los anticuerpos dirigidos contra *IZUMO1* son capaces de inhibir la fertilización tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁰ Las propiedades descritas anteriormente también han sido atribuidas a la proteína *SPACA1*,^{29,51,98} por lo que sus funciones, tal como la comparación estructural sugiere, pueden ser similares a las de *IZUMO1*.

A pesar de las similitudes descritas entre *SPACA1* e *IZUMO1*, se distinguen discrepancias importantes entre sus productos proteicos.

Se ha encontrado que ambas proteínas se encuentran presentes específicamente en el espermatozoide^{10,29} pero, mientras que *IZUMO1* mantiene una localización intracelular hasta el momento en que se lleva a cabo la reacción acrosomal,¹⁵ *SPACA1* puede ubicarse tanto a nivel intracelular (en las membranas acrosomales), como a nivel de la membrana plasmática, desde el momento de formación de las espermátides.^{12,29} De manera que la inhibición de la fertilización mediada por anticuerpos anti *SPACA1* podría llevarse a cabo con mayor eficiencia.

Naz y colaboradores evaluaron el potencial inmunoanticonceptivo en ratonas de péptidos derivados de *IZUMO1* de origen humano, los cuales ocasionaron una infertilidad temporal máxima del 53.4 %. Debido a que *IZUMO1* no se expone en la superficie celular hasta el momento de la reacción acrosomal se sugiere que, para ser efectivos, los anticuerpos dirigidos contra esta proteína tendrían estar presentes en un sitio y momento particular.⁹⁹

Por otra parte, Kurth y colaboradores evaluaron la respuesta inmune humoral en hembras de macaco contra un inmunógeno basado en proteínas espermáticas recombinantes de origen humano y determinaron que todos los individuos desarrollaron una respuesta inmune específica contra cada uno de los antígenos utilizados (SPACA1, SAMP14, SP-10, ESP y SLLP-1). Debido a que no se ha identificado un antígeno espermático predominante, se sugiere que la formulación de una vacuna anticonceptiva efectiva podría beneficiarse de la adición de varias proteínas recombinantes específicas de la superficie del espermatozoide.^{23,30}

Mediante el programa LBtope^{®79} se predijeron los probables epítomos de las proteínas SPACA1 recombinante, del perro doméstico, del ratón, del cerdo y del humano. La comparación de los epítomos predichos permitió identificar que los determinantes antigénicos localizados en la región extracelular la proteína SPACA1 de las especies evaluadas son similares a los de la proteína recombinante. Esto sugiere que el uso como potencial inmunógeno anticonceptivo de la proteína SPACA1 recombinante de origen canino, podría inhibir la fertilización no solo en el perro, sino también, posiblemente, en el ratón, en el cerdo y en el humano, por lo que se recomienda explorar esta posibilidad.

Conclusiones

1. Se estandarizó la técnica de RT-PCR necesaria para la amplificación de una región de la secuencia codificante del gen *SPACAI*, así como de un control interno de amplificación.
2. Se construyó el vector de expresión pJAPT16 mediante la clonación de un fragmento del gen *SPACAI* en un plásmido comercial.
3. Se prepararon y transformaron *E. coli* DH5 α con el ADN recombinante.
4. Se publicó en el banco genómico la secuencia del gen *SPACAI* clonada en el vector pJAPT16, con el número de acceso KY706613.
5. Se analizó la secuencia que codifica a la proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 1, para determinar sus características y funciones probables. Entre estas se encuentran que SPACAI:
 - a. Muestra analogía estructural y funcional con la proteína IZUMO1, pero difiere en su localización subcelular.
 - b. Carece de funciones enzimáticas aparentes en el perro, el ratón, el cerdo y el humano.
 - c. Presenta péptido señal en el ratón, en el cerdo y en el humano, pero carece de esta secuencia en el perro.
 - d. Comparte un dominio transmembranal y diversos epítomos, tanto en la proteína recombinante como en las proteínas de las especies evaluadas.
 - e. Podría inhibir la fertilización en el perro, así como en el ratón, el cerdo y el humano, al utilizarse como inmunógeno antiespermático.

PROSPECTIVA

1. Transformar células *E. coli* BL21 con el plásmido pJAPT16, inducir la expresión del gen *SPACAI*, purificar y detectar la proteína recombinante mediante Western Blot.
2. Clonar al gen *SPACAI* en un vector que permita su expresión en células eucariontes.
3. Amplificar, clonar, secuenciar e inducir la expresión de otros genes que codifiquen proteínas específicas de gametos para elaborar un inmunógeno anticonceptivo recombinante polivalente.
4. Evaluar la eficacia de las potenciales vacunas anticonceptivas recombinantes y de las vacunas anticonceptivas basadas en ADN, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Florman, H. M. et al. Chapter 4 – Fertilization in Mammals. en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 149–196 (2015). doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00004-1
2. Lackie, J. M. *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*. (Elsevier, 2007).
3. Austin, C. R. Principles of fertilization. *Proc. R. Soc. Med.* **67**, 925–927 (1974).
4. Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Academic Press, 2015).
5. Okabe, M. The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**, 4471–4479 (2013).
6. Gadella, B. M. Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **67**, 267–87 (2010).
7. Osman, R. A. et al. Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 828–833 (1989).
8. Tateno, H. et al. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, (2013).
9. Wassarman, P. M. Towards molecular mechanisms for gamete adhesion and fusion during mammalian fertilization. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 658–664 (1995).
10. Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. & Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234–238 (2005).
11. MYLES, D. G., KOPPEL, D. E., COWAN, A. E., PHELPS, B. M. & PRIMAKOFF, P. Rearrangement of Sperm Surface Antigens prior to Fertilization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **513**, 262–273 (1987).
12. Ogura, Y., Takagishi, Y. & Harayama, H. Changes in the distribution and molecular mass of boar sperm acrosome-associated 1 proteins during the acrosome reaction; their validity as indicators for occurrence of the true acrosome reaction. *Anim. Reprod. Sci.* **172**, 94–104 (2016).
13. AUSTIN, C. R. & BISHOP, M. W. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **149**, 241–8 (1958).
14. Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D. & Wright, G. J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**, (2014).
15. Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J. Cell Sci.* (2012). doi:10.1242/jcs.100867
16. Primakoff, P. & Myles, D. G. Cell–cell membrane fusion during mammalian fertilization. *FEBS Lett.* **581**, 2174–2180 (2007).
17. Hedger, M. P. et al. Chapter 19 – The Immunophysiology of Male Reproduction. en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 805–892 (2015). doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3
18. Dhindsa, D. S., Schumacher, G. F. B. & National Institutes of Health (U.S.). Reproductive Biology Study Section. *Immunological aspects of infertility and fertility regulation : proceedings of a workshop held on October 22-23, 1979 in St. Louis, Missouri*. (Elsevier/North Holland, 1980).
19. D'Alessio, A. et al. Testicular FasL is expressed by sperm cells. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **98**, 3316–21 (2001).
20. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355–65 (1997).
 21. Hedger, M. P. The Immunophysiology of Male Reproduction. en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 805–894 (Academic Press, 2015).
 22. Lydyard, P. M., Whelan, A. & Fanger, M. W. *Instant notes in immunology. Journal of Biological Education* (2004). doi:10.1136/pmj.76.898.525a
 23. Domagala, A. & Kurpisz, M. Identification of sperm immunoreactive antigens for immunocontraceptive purposes: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol. RB{&}E* **2**, 11 (2004).
 24. Nishimune, Y. & Tanaka, H. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes. *J. Androl.* **27**, 326–334 (2006).
 25. Bohring, C. & Krause, W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum. Reprod.* **18**, 915–924 (2003).
 26. Shrestha, A., Srichandan, S., Minhas, V., Panda, A. K. & Gupta, S. K. Canine zona pellucida glycoprotein-3: Up-scaled production, immunization strategy and its outcome on fertility. *Vaccine* **33**, 133–140 (2015).
 27. Howes, E., Pascall, J. C., Engel, W. & Jones, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.* **114**, 4127–36 (2001).
 28. Gupta, S. K. *et al.* Contraceptive vaccines based on the zona pellucida glycoproteins for dogs and other wildlife population management. *Am. J. Reprod. Immunol. (New York, N.Y. 1989)* **66**, 51–62 (2011).
 29. Hao, Z. *et al.* SAMP32, a testis-specific, isoantigenic sperm acrosomal membrane-associated protein. *Biol. Reprod.* **66**, (2002).
 30. Kurth, B. E. *et al.* Immunogenicity of a multi-component recombinant human acrosomal protein vaccine in female *Macaca fascicularis*. *J. Reprod. Immunol.* **77**, 126–141 (2008).
 31. Jones, R. *et al.* The Equatorial Subsegment in Mammalian Spermatozoa Is Enriched in Tyrosine Phosphorylated Proteins. **79**, 421–431 (2008).
 32. Inoue, N. *et al.* Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* (2013). doi:10.1242/dev.094854
 33. Toshimori, K. *et al.* Chapter 3 – The Spermatozoon. en *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 99–148 (2015). doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00003-X
 34. Bradley, M. P., Eade, J., Penhale, J. & Bird, P. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J. Biotechnol.* **73**, 91–101 (1999).
 35. Murdoch, W. J. Immunoregulation of mammalian fertility. *Life Sci.* **55**, 1871–1886 (1994).
 36. Kirkpatrick, J. F., Lyda, R. O. & Frank, K. M. Contraceptive Vaccines for Wildlife: A Review. *Am. J. Reprod. Immunol.* **66**, 40–50 (2011).
 37. Hay, B. A., Li, J. & Guo, M. Vectored gene delivery for lifetime animal contraception: Overview and hurdles to implementation. *Theriogenology* (2017). doi:10.1016/
 38. Kaur, K. & Prabha, V. Immunocontraceptives: new approaches to fertility control. *Biomed Res. Int.* **2014**, 868196 (2014).
 39. Moldave, K. & Rhodes, L. *Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats.*

- (Alliance for Contraception in Cats & Dogs (ACC&D), 2013).
40. Naz, R. K. Female genital tract immunity: distinct immunological challenges for vaccine development. *J. Reprod. Immunol.* **93**, 1–8 (2012).
 41. Naz, R. K. Antisperm contraceptive vaccines: where we are and where we are going? *Am. J. Reprod. Immunol. (New York, N.Y. 1989)* **66**, 5–12 (2011).
 42. Naz, R. K. Application of sperm antigens in immunocontraception. *Front. Biosci. A J. Virtual Libr.* **1**, e87–95 (1996).
 43. Li, J. *et al.* Vectored antibody gene delivery mediates long-term contraception. *Curr. Biol.* **25**, R820–R822 (2015).
 44. Kotterman, M. A., Chalberg, T. W. & Schaffer, D. V. Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **17**, 63–89 (2015).
 45. Auer, J., Senechal, H. & De Almeida, M. Sperm-associated and circulating IgA and IgG classes of antibodies recognise different antigens on the human sperm plasma membrane. *J. Reprod. Immunol.* **34**, 121–136 (1997).
 46. Berndston, W. E. Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review. *J. Anim. Sci.* **44**, 818–833 (1977).
 47. O’Flynn O’Brien, K. L., Varghese, A. C. & Agarwal, A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil. Steril.* **93**, 1–12 (2010).
 48. Chen, H., Yi, M., Sheng, Y., Cheng, H. & Zhou, R. A novel testis-enriched gene Spata33 is expressed during spermatogenesis. *PLoS One* **8**, e67882 (2013).
 49. Krausz, C. & Giachini, C. Genetic risk factors in male infertility. *Arch. Androl.* **53**, 125–133 (2007).
 50. Geng, Q. *et al.* A Novel Testis-Specific Gene, Ccdc136, Is Required for Acrosome Formation and Fertilization in Mice. *Reprod. Sci.* **23**, 1387–1396 (2016).
 51. Fujihara, Y. *et al.* SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* **139**, 3583–3589 (2012).
 52. Toshimori, K. The Spermatozoon. en *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction* 99–148 (Academic Press, 2015).
 53. NCBI. SPACA1 sperm acrosome associated 1 [*Canis lupus familiaris* (dog)]. (2017).
 54. Ferrer, M., Xu, W. & Oko, R. The composition, protein genesis and significance of the inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Res.* **349**, 733–748 (2012).
 55. Ito, C. & Toshimori, K. Acrosome markers of human sperm. *Anat. Sci. Int.* **91**, 128–142 (2016).
 56. Yoshida, K. *et al.* A model of the acrosome reaction progression via the acrosomal membrane-anchored protein equatorin. *Reproduction* **139**, 533–544 (2010).
 57. Kawano, N. *et al.* Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol. Reprod.* **83**, 359–369 (2010).
 58. Galinski, M. R. *et al.* The circumsporozoite gene of the plasmodium cynomolgi complex. *Cell* **48**, 311–319 (1987).
 59. Davey, J., Davis, K., Imai, Y., Yamamoto, M. & Matthews, G. Isolation and characterization of krp, a dibasic endopeptidase required for cell viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **13**, 5910–5921 (1994).
 60. Dam, A. H. D. M. *et al.* Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* **13**, 63–75

- (2007).
61. Battaglia, D. E., Koehler, J. K., Klein, N. A. & Tucker, M. J. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil. Steril.* **68**, 118–122 (1997).
 62. Chianese, C. *et al.* Comprehensive investigation in patients affected by sperm macrocephaly and globozoospermia. *Andrology* **3**, 203–212 (2015).
 63. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
 64. Benson, D. A. *et al.* GenBank. *Nucleic Acids Res.* **41**, D36--42 (2013).
 65. Pardo-Tovar, J. A., Basurto-Alcántara, F. J., Verdugo-Rodríguez, A. & Verdiguell-Fernández, L. F. Canis lupus familiaris sperm acrosome-associated 1 isoform X3 (SPACA1) - Nucleotide - NCBI. *GenBank* (2017). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ky706613>. (Consultado: 7a agosto 2017)
 66. Benchling, I. Benchling. (2016). Disponible en: <https://benchling.com/>.
 67. Thermo-Fisher. Tm Calculator. (2016).
 68. Nuncio-Limón, M. I. Uso de la Técnica de RT-PCR y Secuenciación Para la Detección del Virus Distemper Canino Vacunal en Muestras Clínicas. (UNAM, 2013).
 69. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).
 70. Renzette, N. Generation of Transformation Competent E. coli. en *Current Protocols in Microbiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
 71. Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 (2011).
 72. Chitale, M., Hawkins, T., Park, C. & Kihara, D. ESG: Extended similarity group method for automated protein function prediction. *Bioinformatics* (2009). doi:10.1093/bioinformatics/btp309
 73. Khan, I. K., Wei, Q., Chitale, M. & Kihara, D. PFP/ESG: Automated protein function prediction servers enhanced with Gene Ontology visualization tool. *Bioinformatics* (2015). doi:10.1093/bioinformatics/btu646
 74. Nielsen, H. Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol. Biol.* **1611**, 59–73 (2017).
 75. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* (2016). doi:10.1093/molbev/msw054
 76. Yang, J. & Zhang, Y. Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Curr. Protoc. Bioinformatics* (2015). doi:10.1002/0471250953.bi0508s52
 77. Zhang, Y. & Skolnick, J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* (2005). doi:10.1093/nar/gki524
 78. Yang, J., Roy, A. & Zhang, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* (2013). doi:10.1093/bioinformatics/btt447
 79. Singh, H., Ansari, H. R. & Raghava, G. P. S. Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0062216
 80. Sapay, N., Guermeur, Y. & Deléage, G. Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC*

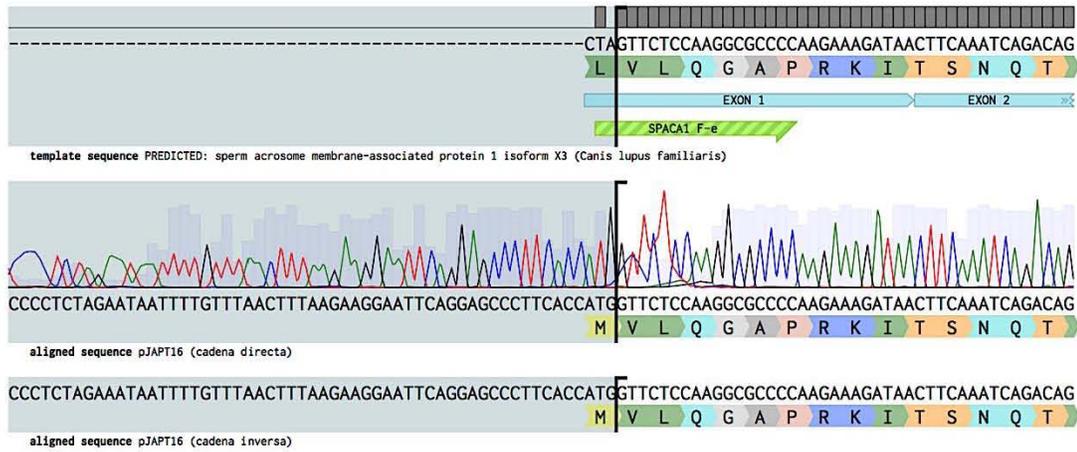
- Bioinformatics* (2006). doi:10.1186/1471-2105-7-255
81. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* (1992). doi:10.1093/bioinformatics/8.3.275
 82. Applied-Biosystems. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide. (2014).
 83. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1977). doi:10.1073/pnas.74.12.5463
 84. Aydin, H., Sultana, A., Li, S., Thavalingam, A. & Lee, J. E. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* **534**, 562–565 (2016).
 85. Yip, W., Amin, S. B. & Li, C. 10. Handbook of Statistical Bioinformatics. *Analysis* 193–223 (2011). doi:10.1007/978-3-642-16345-6
 86. Kurmangaliyev, Y. Z. & Gelfand, M. S. Computational analysis of splicing errors and mutations in human transcripts. *BMC Genomics* **9**, 13 (2008).
 87. Goel, N., Singh, S. & Aseri, T. C. A Review of Soft Computing Techniques for Gene Prediction. *ISRN Genomics* **2013**, 1–8 (2013).
 88. PREDICTED: Canis lupus familiaris sperm acrosome associated 1 (SPACA1), transcript variant X3, mRNA. (2015).
 89. Cline, J., Braman, J. C. & Hogrefe, H. H. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546–51 (1996).
 90. Hyde, S. C. *et al.* Structural model of ATP-binding proteing associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362–365 (1990).
 91. Kuchler, K. & Thorner, J. Membrane translocation of proteins without hydrophobic signal peptides. (1990).
 92. KUCHLER, K. & THORNER, J. Secretion of Peptides and Proteins Lacking Hydrophobic Signal Sequences: The Role of Adenosine Triphosphate-Driven Membrane Translocators*. *Endocr. Rev.* **13**, 499–514 (1992).
 93. Penin, F. *et al.* Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* **279**, 40835–43 (2004).
 94. Sapay, N. *et al.* NMR Structure and Molecular Dynamics of the In-Plane Membrane Anchor of Nonstructural Protein 5A from Bovine Viral Diarrhea Virus. doi:10.1021/bi0517685
 95. Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, Feng Z, Gilliland GL, Iype L, Jain S, Fagan P, Marvin J, Padilla D, Ravichandran V, Schneider B, Thanki N, Weissig H, Westbrook JD, Z. C. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* (2002).
 96. Inoue, N., Hagihara, Y., Wright, D., Suzuki, T. & Wada, I. Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm-egg fusion in mice. *Nat. Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms9858
 97. Inoue, N., Ikawa, M. & Okabe, M. The mechanism of sperm–egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian J. Androl.* **13**, 81–87 (2011).
 98. Ahmad, T. A., Eweida, A. E. & Sheweita, S. A. B-cell epitope mapping for the design of vaccines and effective diagnostics. *Trials Vaccinol.* **5**, 71–83 (2016).
 99. Naz, R. K. Immunocontraceptive effect of Izumo and enhancement by combination vaccination. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 336–344 (2008).
 100. Invitrogen. TRIZol Reagent User Guide. (2016).

101. Kingston, R. E., Chomczynski, P. & Sacchi, N. Guanidine Methods for Total RNA Preparation. en *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
102. P., Z. *Phenol-chloroform Extraction*. (WEILL CORNELL MEDICAL COLLEGE, 2017).
103. Haddad, F. & Baldwin, K. M. Reverse transcription of the ribonucleic acid: the first step in RT-PCR assay. *Methods Mol. Biol.* **630**, 261–270 (2010).
104. McLennan, A., Bates, A., White, M. & Turner, P. *BIOS Instant Notes in Molecular Biology*. (Taylor & Francis, 2005).
105. QIAGEN. QIAquick Spin Handbook. (2015).
106. NEB. Molecular Cloning: Technical Guide. (2016).

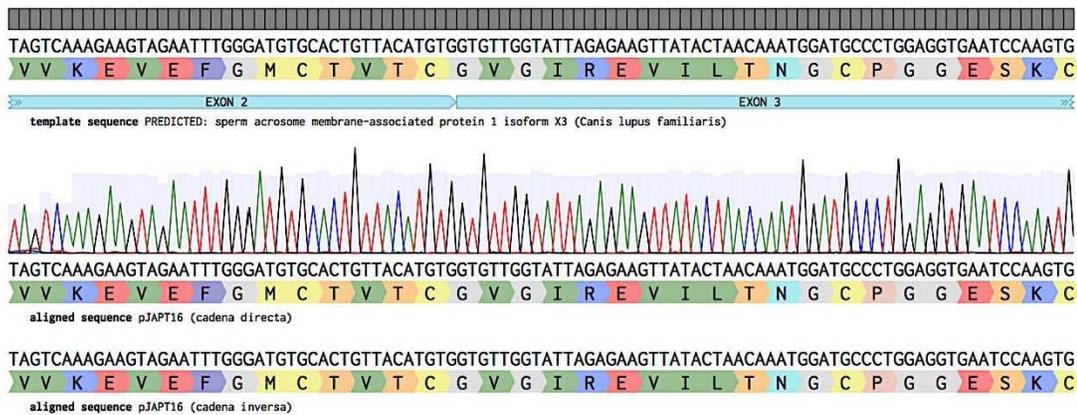
ANEXO I:

ALINEAMIENTO DEL GEN SPACA1 Y DEL VECTOR pJAPT16

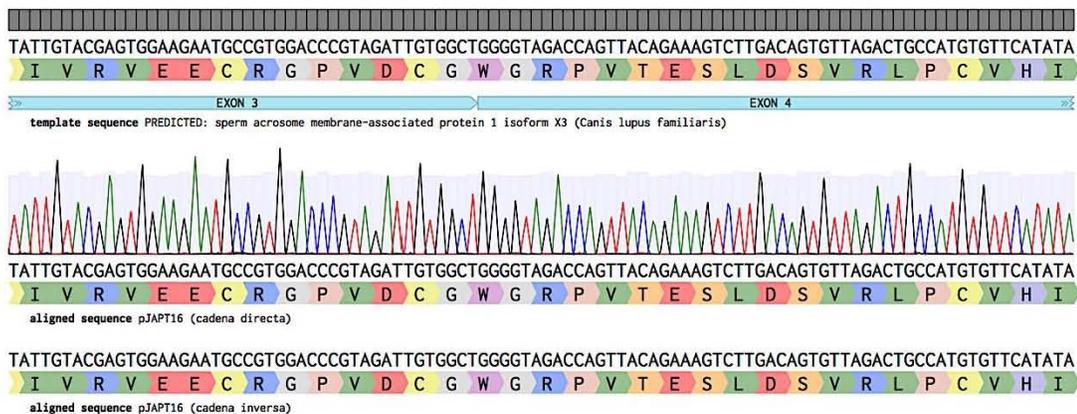
1 de 8

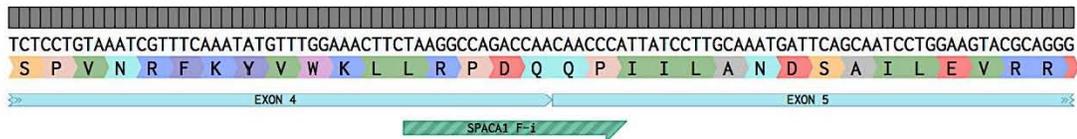


2 de 8

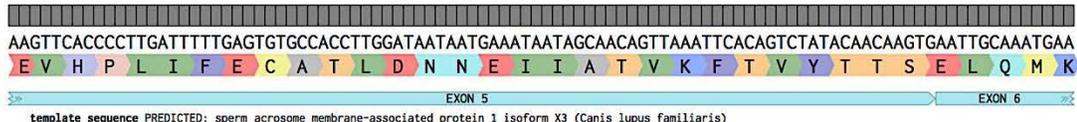
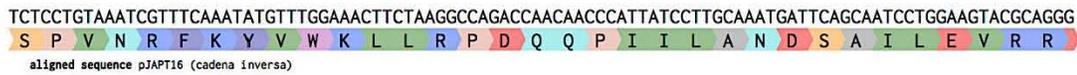
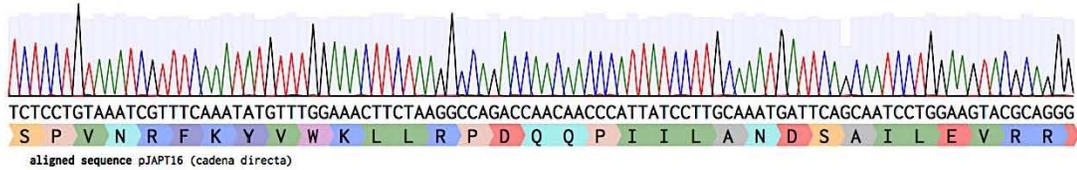


3 de 8

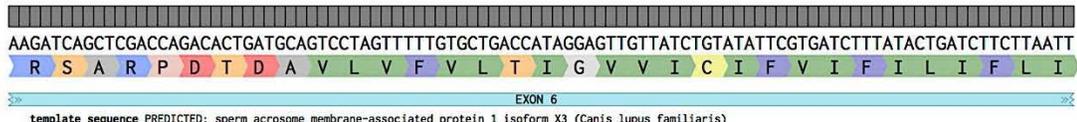
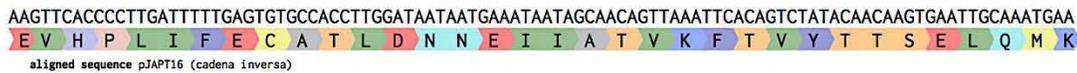
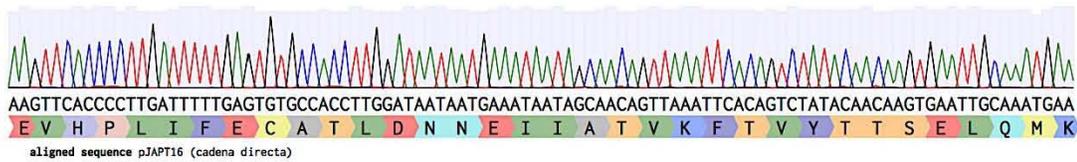




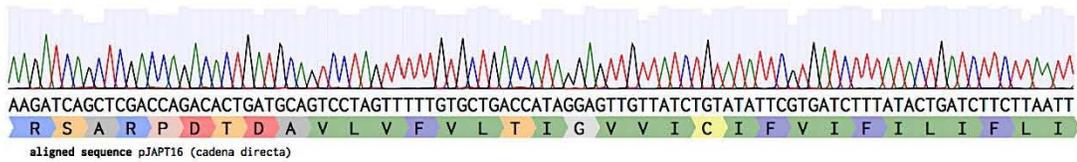
template sequence PREDICTED: sperm acrosome membrane-associated protein 1 isoform X3 (Canis lupus familiaris)

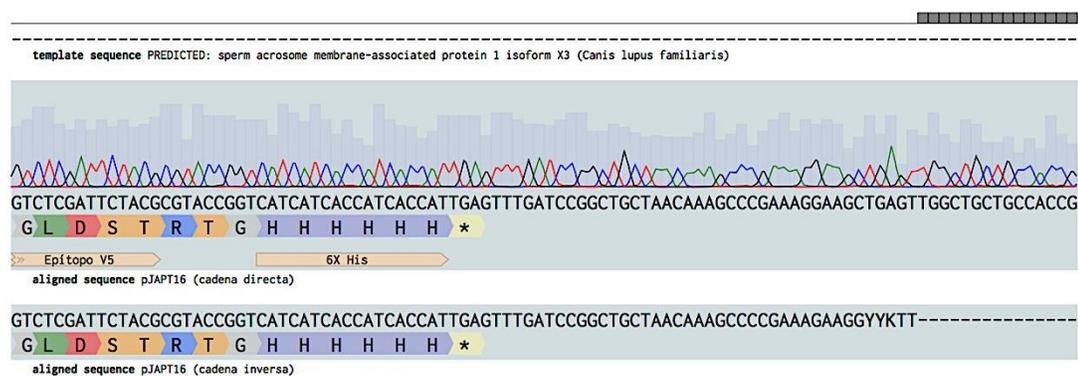
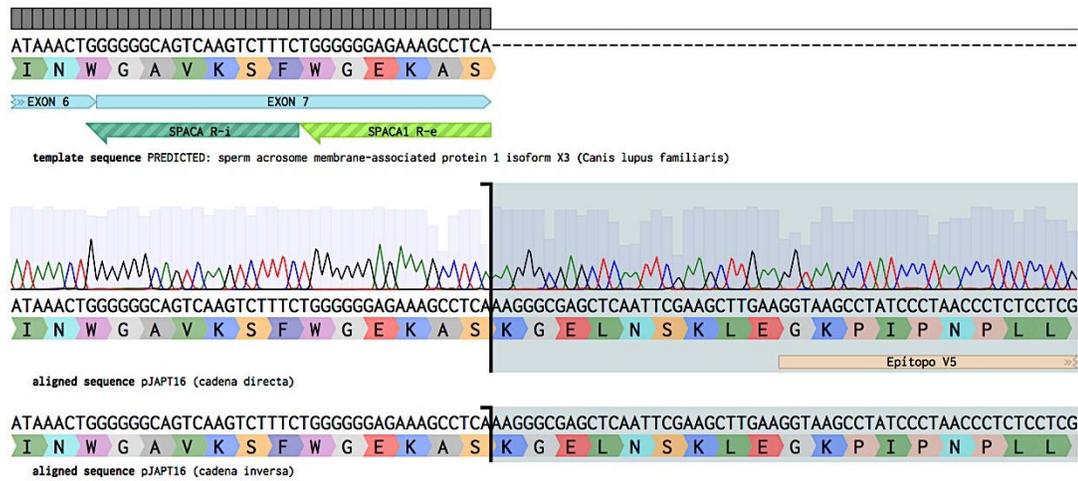


template sequence PREDICTED: sperm acrosome membrane-associated protein 1 isoform X3 (Canis lupus familiaris)



template sequence PREDICTED: sperm acrosome membrane-associated protein 1 isoform X3 (Canis lupus familiaris)





Alineamiento de las secuencias de la cadena inversa (abajo) y de la cadena directa (al centro) del vector pJAPT16 con la isoforma 3 del ADNc predicho para el gen *SPACA1* (arriba) (elaborado en Benchling^{®66} con Clustal Omega^{®71}).

El inserto clonado en el vector pJAPT16 presenta una identidad del 100% y una cobertura de alineamiento del 80.4 % con respecto a la secuencia predicha para la isoforma 3 del ADNc del gen *SPACA1*. Los exones 1 a 7 se muestran en azul; los iniciadores externos, en verde claro y los iniciadores internos, en verde oscuro. Nótese que el fragmento del gen *SPACA1* y los epítos (V5 y 6x His) se encuentran en el mismo marco abierto de lectura.

ANEXO II: METODOLOGÍAS

Extracción de ARN

La homogeneización de las muestras de células o tejidos en una solución ácida compuesta por fenol y tiocianato de guanidina ocasiona lisis celular y desnaturalización de proteínas (incluyendo nucleasas). Tras la adición de cloroformo y centrifugación de la muestra, los fragmentos pequeños de ADN (< 10 kb), los lípidos y la mayoría de las proteínas permanecen en el sedimento, mientras que los fragmentos grandes de ADN y algunas proteínas permanecen en la interfase, por su parte, el ARN se mantiene soluble en el sobrenadante. El ARN solubilizado se precipita con isopropanol, posteriormente se lava con etanol y finalmente se suspende en agua libre de nucleasas (agua tratada con DEPC).¹⁰⁰⁻¹⁰²

Procedimiento:

Fenol - tiocianato de guanidina - cloroformo (modificado de Sambrook 2001)⁶⁹

1. Descongelar a 4 °C y macerar las muestras de tejido o bien, centrifugar las muestras de sangre o células a 4 °C y 200 g durante 10 min.
2. Añadir 1 ml de solución desnaturante (tiocianato de guanidina (4 M), citrato de sodio (25 mM), lauril sarcosinato de sodio (0.5%), β-mercaptoetanol (0.1 M)) en tubos de microcentrífuga con capacidad de 2 ml (utilizar 2 tubos por cada muestra).
3. Transferir <0.5 cm³/ml de la muestra hacia los microtubos con la solución desnaturante, homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 5 min.
4. Añadir 0.1 ml de acetato de sodio (2 M, pH 4.0) y homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces.
5. Añadir 1 ml de fenol y homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces.
6. Añadir 0.2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) y homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces.
7. Homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 10 min.
8. Centrifugar a 4 °C y 12 000 g durante 15 min.
9. Transferir exclusivamente el sobrenadante (ARN) a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.

10. Añadir 0.5 ml de isopropanol al 100%, homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 5 min.
11. Centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 20 min.
12. Decantar el sobrenadante, lavar el sedimento (ARN) con 1 ml de etanol al 75% preparado con agua tratada libre de nucleasas y homogeneizar por agitación durante 10 s.
13. Centrifugar a 4 °C y 12 000 g durante 5 min.
14. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga en posición invertida (con la tapa abierta) para eliminar el excedente de etanol.
15. Suspender el sedimento (ARN) en 50 µl de agua libre de nucleasas (agua ultrapura tratada con DEPC). Almacenar a -70 °C hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa y/o espectrofotometría.

TRIZOL® (modificado)

1. Descongelar a 4 °C y macerar las muestras de tejido o bien, centrifugar las muestras de sangre o células a 4 °C y 200 g durante 10 min.
2. Añadir 1 ml de solución desnaturante monofásica de isotiocianato de guanidina y fenol en tubos de microcentrífuga con capacidad de 2 ml (utilizar 2 tubos por cada muestra).
3. Transferir $<0.5 \text{ cm}^3/\text{ml}$ de la muestra hacia los microtubos con la solución desnaturante, homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 5 min.
4. Añadir 0.2 ml de cloroformo, homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 5 min.
5. Centrifugar a 4 °C y 12 000 g durante 15 min.
6. Transferir exclusivamente el sobrenadante (ARN) a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml.
7. Añadir 0.5 ml de isopropanol al 100%, homogeneizar por agitación durante 10 s e incubar a 4 °C durante 5 min.
8. Centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 20 min.
9. Decantar el sobrenadante, lavar el sedimento (ARN) con 1 ml de etanol al 75% preparado con agua tratada libre de nucleasas y homogeneizar por agitación durante 10 s.
10. Centrifugar a 4 °C y 12 000 g durante 5 min.

11. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos de microcentrífuga en posición invertida (con la tapa abierta) para eliminar el excedente de etanol.
12. Suspender el sedimento (ARN) en 50 µl de agua libre de nucleasas (agua ultrapura tratada con DEPC). Almacenar a -70 °C hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa y/o espectrofotometría.

Retrotranscripción (RT)

Mediante el uso de un iniciador (específico de gen, oligo dT o aleatorios), la transcriptasa reversa sintetiza una cadena de ADN complementario al ARN de cadena sencilla. El ADN complementario puede ser posteriormente amplificado mediante PCR.¹⁰³

Procedimiento:

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit

1. Agregar los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas con capacidad de 200 µl (reacción ajustada a 20 µl):
2 µl de ARN total (<5 µg), 1 µl de Oligo(dT)₁₈ Primer (100 µM), 9 µl de agua ultrapura (previamente tratada con DEPC), 4 µl de 5X Reaction Buffer[®] [Tris-HCl (250 mM, pH 8.3), KCl (250 mM), MgCl₂ (20 mM), DTT[®] (50 mM)], 1 µl de RiboLock RNase Inhibitor[®] (20 U/µl), 2 µl de mezcla de dNTP (10 mM) y 1 µl de RevertAid M-MuLV RT[®] (200 U/reacción).
2. Homogeneizar la mezcla e incubar la reacción a 42 °C durante 1 h.
3. Detener la reacción al calentar la mezcla a 70 °C durante 5 min. Almacenar a -70 °C hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa permite amplificar una secuencia de ADN al utilizar un par de iniciadores (oligonucleótidos), cada uno complementario a uno de los extremos de la secuencia de ADN blanco (templado). Una ADN polimerasa termoestable extiende la secuencia delimitada por los iniciadores mediante ciclos de reacciones compuestos por tres

etapas: desnaturalización del templado, alineamiento de los iniciadores y extensión (polimerización) de las cadenas de ADN.¹⁰⁴

Procedimiento:

Gen *SPACAI*

1. Agregar los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrifuga libre de nucleasas con capacidad de 200 μ l (reacción ajustada a 50 μ l):
33 μ l de agua ultrapura, 5 μ l de 10 X *Pfu* PCR buffer[®] [Tris-HCl (200 mM, pH 8.8), (NH₄)₂SO₄ (100 mM), KCl (100 mM), Triton X-100[®] (1% v/v), ASB (1 mg/mL)], 1 μ l de mezcla de dNTP (10 mM), 1 μ l de ADNc (50 pg – 1 μ g), 2.5 μ l de iniciador directo (10 μ M), 2.5 μ l de iniciador inverso (10 μ M), 1 μ l de *Pfu* ADN polimerasa recombinante (2.5 U/reacción) y 4 μ l de MgSO₄ (25 mM).
2. Homogeneizar la mezcla e incubar la reacción en un termociclador con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min y posteriormente, 30 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 72 s; finalizar con una extensión a 72 °C durante 5 min. Almacenar a -20 °C ó -70 °C hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa.

Gen *ACTB* (modificado de Nuncio-Limón 2013)⁶⁸

1. Realizar el procedimiento descrito para el gen *SPACAI* con una temperatura de alineamiento de 53 °C. Almacenar a -20 °C ó -70 °C hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa.

Purificación de ADN

Si el ADN será purificado a partir de un gel, se añade un amortiguador para disolverlo. Posteriormente, el ADN es adsorbido por la membrana de sílice de la columna en presencia de altas concentraciones de sal, mientras que las impurezas son eliminadas con lavados sucesivos. Finalmente, el ADN purificado se eluye de la membrana con agua ultrapura o con hidrócluro de tris.¹⁰⁵

Procedimiento:

QIAquick Gel Extraction Kit®

1. Cuantificar el peso o volumen del ADN en gel o solución (≤ 400 mg/ μ l, ≤ 10 kb, ≤ 10 μ g).
2. Añadir 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de ADN (para geles de agarosa al $\geq 2\%$, añadir 6 volúmenes de buffer QG). Homogeneizar por agitación hasta que el gel se disuelva y verificar que la mezcla tenga un color amarillo, si se vuelve naranja o violeta añadir 10 μ l de acetato de sodio (3 M, pH 5.0) y homogeneizar por agitación durante 10 s (incubar la mezcla a 50 °C durante 10 min puede ayudar a disolver el gel).
3. Añadir 1 volumen de isopropanol y homogeneizar por agitación durante 10 s.
4. Colocar una columna de purificación en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y transferir el ADN solubilizado a la columna. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min y eliminar el volumen excedente.
5. Para lavar la muestra, añadir 750 μ l de buffer PE y esperar durante 5 min. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min y eliminar el volumen excedente.
6. Recortar y eliminar la tapa de un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas con capacidad de 1.5 ml y transferir la columna de centrifugación.
7. Para eluir el ADN, depositar 30-50 μ l de agua ultrapura o buffer EB (Tris-Cl (10 mM), pH 8.5) en el centro de la membrana y esperar durante 5 min. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min, transferir el volumen excedente a un tubo de microcentrífuga con capacidad de 200 μ l y descartar la columna.
8. Cuantificar el ADN mediante espectrofotometría y almacenarlo a -70 °C hasta su uso.

Clonación

Mediante el uso de enzimas como ligasas, topoisomerasas o recombinasas se une el ADN de interés con un vector, el cual contiene los componentes necesarios para su replicación en un huésped.¹⁰⁶

Procedimiento:

pET101/D-TOPO®

1. Agregar los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas con capacidad de 200 µl (reacción ajustada a 6 µl):
4 µl de producto de PCR recién obtenido (proporción inserto:vector desde 0.5:1 hasta 2:1), 1 µl de solución salina (competentes químicas) o 1 µl de solución salina diluida 1:4 (electrocompetentes) y 1 µl de vector TOPO®.
2. Homogeneizar gentilmente la mezcla e incubar la reacción a temperatura ambiente durante 30 min.
3. Colocar en hielo y proceder con la transformación (la reacción puede almacenarse a -20 °C durante la noche).

Generación y transformación de *E. coli* electrocompetentes y quimiocompetentes

En la transformación se mezclan bacterias electrocompetentes o quimiocompetentes con plásmidos en suspensión. La mezcla recibe una descarga eléctrica (electroporación) o un choque térmico (método químico) que facilita la introducción del ADN exógeno a la bacteria, mediado por un aumento en la permeabilidad de la membrana. La mezcla se incuba brevemente en un medio de crecimiento para permitir la recuperación de las bacterias (reparación de componentes celulares). Finalmente se seleccionan las bacterias transformadas al cultivarlas en placas que contienen marcadores como antibióticos o cromógenos. Todas las bacterias (clonas) que crecen en cada una de las diferentes colonias tienen el mismo genotipo debido a que se originan a partir del mismo individuo.^{104,106}

Procedimiento:

Generación de *E. coli* electrocompetentes (modificado de Sambrook 2001 y Renzette 2005)^{69,70}

1. Inocular una colonia de *E. coli* (2-3 mm de diámetro) en 50 ml de medio LB y cultivar a 37°C en agitación moderada (250 rpm) durante la noche (12 h).

2. Inocular 10 ml del cultivo en 2 matraces, cada uno con 1 volumen de 500 ml de medio LB. Incubar el cultivo a 37 °C en agitación vigorosa (300 rpm) y monitorear su crecimiento cada 20 min hasta que alcance una absorbancia de 0.35-0.4 (600 nm) (≈ 3 h).
3. Transferir el cultivo a un recipiente adecuado para centrifugación y enfriar en hielo durante 10 min. A partir de este paso las células deberán mantenerse a 4 °C.
4. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Decantar el sobrenadante, invertir el recipiente durante 1 min para eliminar los restos de medio y suspender la pastilla celular en 1 volumen de agua destilada helada.
5. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y suspender la pastilla celular en 0.5 volúmenes de agua destilada helada.
6. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y suspender la pastilla celular en 0.25 volúmenes de agua destilada helada.
7. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y suspender la pastilla celular en 0.25 volúmenes de glicerol al 10% helado.
8. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Eliminar el sobrenadante y suspender la pastilla celular en 1 ml de medio GYT helado o en 1ml de glicerol al 10% helado.
9. Separar las células en alícuotas de 40 μ l y congelar rápidamente con nitrógeno líquido, hielo seco o congelador mecánico y almacenar a -70 °C hasta su uso.

Generación de *E. coli* quimiocompetentes⁶⁹

1. Inocular una colonia de *E. coli* (2-3 mm de diámetro) en dos matraces, cada uno con 1 volumen de 100 ml de medio LB y cultivar a 37°C en agitación vigorosa (300 rpm) y monitorear su crecimiento cada 20 min hasta que alcance una absorbancia de 0.35-0.4 (600 nm) (≈ 3 h).
2. Transferir el cultivo a un recipiente adecuado para centrifugación y enfriar en hielo durante 10 min. A partir de este paso las células deberán mantenerse a 4 °C.
3. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Decantar el sobrenadante, invertir el recipiente durante 1 min para eliminar los restos de medio y suspender la pastilla celular en 30 ml de una solución helada de cloruro de magnesio y cloruro de calcio (80 mM MgCl₂, 20mM CaCl₂).

4. Centrifugar a 4 °C y 2700 g durante 10 min. Decantar el sobrenadante, invertir el recipiente durante 1 min para eliminar los restos de medio y suspender la pastilla celular en 4 ml de una solución helada de cloruro de calcio (100 mM CaCl₂).
5. Separar las células en alícuotas de 200 µl y congelar rápidamente con nitrógeno líquido, hielo seco o congelador mecánico y almacenar a -70 °C hasta su uso.

Transformación mediante electroporación⁶⁹

1. Calentar medio SOC a temperatura ambiente durante 30 min, calentar cajas de Petri que contengan agar LB con y sin el antibiótico necesario para la selección (50 µg/ml de ampicilina) a 37°C durante 30 min. Ajustar el electroporador a 2.5 kV, 25 µF y 200 Ω. Enfriar en hielo una cubeta de electroporación para cada transformación. Descongelar en hielo un vial de *E.coli* electrocompetentes para cada transformación y un vial del plásmido que se usará como control.
2. Mezclar gentilmente el producto de la reacción de clonación y las células electrocompetentes mediante movimientos circulares del tubo de microcentrífuga.
3. Transferir la mezcla a una cubeta de electroporación (con distancia entre electrodos de 0.1-0.2 cm) previamente enfriada y cerrarla, agitar ligeramente para asentar las células en el fondo, secar el hielo y agua presentes en el exterior de la cubeta y colocarla en el electroporador.
4. Accionar el pulso y monitorear la ausencia de formación de arco eléctrico.
5. Remover la cubeta del electroporador y agregar inmediatamente 800 µl de medio SOC o SOB. Transferir a un tubo para cultivo e incubar a 37 °C durante 45 min en agitación moderada (250 rpm).
6. Sembrar diferentes volúmenes del producto de la transformación en cajas de Petri con agar LB y antibiótico (por ejemplo: 500 µl, 250, µl y 50 µl) para asegurar el aislamiento de las clonas por lo menos en una de las cajas. Sembrar el volumen excedente en una caja con agar LB sin antibiótico como control. Incubar a 37 °C durante 12-16 h. Realizar el mismo procedimiento con el plásmido control.
7. Numerar las colonias para su posterior selección mediante cromógenos, PCR y mapeo de restricción. Calcular y registrar como referencia del procedimiento la eficiencia de

transformación obtenida (colonias transformadas / μg ADN) a partir de la reacción de clonación y del plásmido control.

Transformación química⁶⁹

1. Mezclar gentilmente el producto de la reacción de clonación y las células quimiocompetentes mediante movimientos circulares del tubo de microcentrífuga.
2. Colocar el tubo con la mezcla durante 90 s en un baño de agua precalentado a 42 °C. Transferir rápidamente el tubo a hielo durante 1-2 min. Retirar del hielo y agregar inmediatamente 800 μl de medio SOC o SOB e incubar a 37 °C durante 45 min en agitación ligera (50 rpm).
3. Sembrar diferentes volúmenes del producto de la transformación en cajas de Petri con agar LB y antibiótico (por ejemplo: 500 μl , 250, μl y 50 μl) para asegurar el aislamiento de las clonas por lo menos en una de las cajas. Sembrar el volumen excedente en una caja con agar LB sin antibiótico como control. Incubar a 37 °C durante 12-16 h. Realizar el mismo procedimiento con el plásmido control.
4. Numerar las colonias para su posterior selección mediante cromógenos, PCR y mapeo de restricción. Calcular y registrar como referencia del procedimiento la eficiencia de transformación obtenida (colonias transformadas / μg ADN) a partir de la reacción de clonación y del plásmido control.

Extracción de ADN plasmídico

Los plásmidos pueden aislarse para su manipulación o análisis mediante métodos como la minipreparación, en la cual una solución de lisis alcalina compuesta por el detergente dodecilsulfato sódico rompe la membrana celular, lisa a las bacterias, hidroliza al ARN, desnatura a la mayoría de las proteínas y al ADN (las cadenas de ADN plasmídico no se separan porque se encuentran topológicamente entrelazadas). La neutralización de la solución con acetato de potasio precipita a las proteínas, al ADN cromosomal y al detergente, mientras que el ADN plasmídico, el ARN y algunas proteínas se mantienen en solución. La purificación del ADN plasmídico se realiza mediante su extracción con una mezcla de fenol y cloroformo que desnatura y precipita a las proteínas o bien, mediante su adhesión

selectiva a resinas o membranas que permiten la eliminación de impurezas con lavados sucesivos, seguida por la elución y recuperación del ADN en presencia de agua.^{104,105}

Procedimiento:

Lisis alcalina⁶⁹

1. Inocular una colonia en 2 ml de medio LB, YT o TB (con el antibiótico de selección apropiado) y cultivar a 37 °C en agitación vigorosa (300 rpm) durante la noche (12 h).
2. Transferir 1.5 ml del cultivo a un tubo de microcentrifuga y almacenar el resto a 4 °C.
3. Centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 1 min. Decantar el sobrenadante, invertir el recipiente durante 1 min para eliminar los restos de medio y suspender la pastilla celular en 100 µl de solución de lisis alcalina I helada.
4. Añadir 200 µl de solución de lisis alcalina II recién preparada, homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces y colocar el tubo en hielo.
5. Añadir 150 µl de solución de lisis alcalina III, homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces y colocar el tubo en hielo durante 5 min.
6. Centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 5 min.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga, añadir un volumen equivalente de fenol-cloroformo y homogeneizar por agitación durante 10 s.
8. Centrifugar a 4 °C y velocidad máxima durante 2 min. Transferir el sobrenadante a otro tubo de microcentrifuga y almacenar a -20 °C ó -70 °C hasta su uso.

QIAprep[®] Miniprep (modificado)

1. Inocular una colonia en 2 ml de medio LB, YT o TB (con el antibiótico de selección apropiado) y cultivar a 37 °C en agitación vigorosa (300 rpm) durante la noche (12 h).
2. Centrifugar a velocidad máxima durante 30 s. Decantar el sobrenadante e invertir el recipiente durante 1 min para eliminar los restos de medio.
3. Suspender la pastilla celular en 250 µl de buffer P1.
4. Añadir 250 µl de buffer P2 y homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces.
5. Añadir 350 µl de buffer N3 y homogeneizar la mezcla al invertir el tubo 6 veces.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 min.

7. Transferir 800 μl del sobrenadante a una columna de purificación, centrifugar a velocidad máxima durante 30 s y eliminar el volumen excedente.
8. Añadir 500 μl de buffer PB, centrifugar a velocidad máxima durante 30 s y eliminar el volumen excedente.
9. Añadir 750 μl de buffer PE, centrifugar a velocidad máxima durante 30 s y eliminar el volumen excedente.
10. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min y eliminar el volumen excedente.
11. Colocar la columna de purificación en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
12. Añadir 50 μl de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ó 50 μl de agua ultrapura en el centro de la columna, eluir durante 1 min, centrifugar a velocidad máxima durante 1 min y almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Caracterización de clonas

Una vez que se identifica mediante PCR a las clonas que contienen el gen de interés, los plásmidos extraídos a partir de ellas son digeridos con enzimas de restricción. Esto permite la construcción de un diagrama denominado patrón de restricción que indica el tamaño de las moléculas recombinantes, así como el tamaño del inserto y su orientación con relación al vector.¹⁰⁴

Procedimiento:

Anza[®] 89 Mva1269I (isoesquizómero de *BsmI*) (modificado)

1. Agregar los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga libre de nucleasas con capacidad de 200 μl (reacción ajustada a 5 μl):
0.5 μl de Anza 10X Buffer[®] o Anza 10X Red Buffer[®], 4.25 μl de ADN (< 250 ng) y 0.25 μl de enzima Anza 89 Mva1269I[®].
2. Homogeneizar la mezcla e incubar la reacción a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Observar el resultado del procedimiento mediante electroforesis en gel de agarosa.

Preparación de plásmidos para su envío a la unidad de secuenciación

El método de Sanger⁸³ se basa en el uso de didesoxirribonucleótidos que carecen del grupo hidroxilo necesario para la extensión de las cadenas de ADN por la polimerasa. Se realizan cuatro reacciones, las cuales contienen desoxirribonucleótidos y también, un tipo de didesoxirribonucleótido diferente para cada reacción. Los didesoxirribonucleótidos actúan como terminadores de la reacción de extensión y generan cadenas incompletas de diferentes longitudes. La secuencia del ADN utilizado como templado (y por ende del producto proteico) se determina mediante el análisis del patrón electroforético de las cuatro reacciones.¹⁰⁴

Procedimiento:

Envío de muestras para secuenciación en capilar por el método de Sanger

1. Una vez purificado y cuantificado el ADN (absorbancia 260 nm / 280 nm \approx 1.8), identificar los 2 tubos de microcentrífuga libres de nucleasas con capacidad de 200 μ l que se utilizarán para cada muestra y agregar los siguientes volúmenes (reacciones ajustadas a 16 μ l):
2. 1 μ l de iniciador directo (10 μ M) y 15 μ l de plásmido purificado (\approx 100 ng/kb) en un tubo. 1 μ l de iniciador inverso (10 μ M) y 15 μ l de plásmido purificado (\approx 100 ng/kb) en el otro tubo.
3. Enviar las muestras en congelación o refrigeración para su secuenciación.

Herramientas bioinformáticas

A continuación, se describen los principales usos de las herramientas bioinformáticas empleadas en este trabajo para predecir las posibles características estructurales y funcionales de la proteína espermática asociada a la membrana acrosomal 1 (SPACA1).

Programa	Usos	Gratuito
AmphipaSeek ^{®80}	Predicción de regiones transmembranales.	Sí
Benchling ^{®66}	Análisis y modificación de secuencias, identificación de marcos abiertos de lectura, diseño de iniciadores y vectores, predicción de patrones electroforéticos de ácidos nucleicos, organización de experimentos y colaboración basada en la nube.	Sí
BLAST ^{®63}	Determinación de homología e identidad de secuencias, predicción de regiones codificantes y diseño de iniciadores.	Sí
COACH ^{®78}	Predicción de funciones enzimáticas	Sí
Clustal Omega ^{®71}	Alineamiento simultáneo de múltiples secuencias.	Sí
ESG ^{®72}	Predicción de localización y función biológica de proteínas.	Sí
I-TASSER ^{®76}	Predicción de estructuras proteicas.	Sí
LBtope ^{®79}	Predicción de epítomos proteicos de origen eucariote y procarionte.	Sí
MEGA ^{®75}	Elaboración de árboles filogenéticos.	Sí
NEB Tools [®]	Programas diversos para biología molecular.	Sí
PHYLOPP ^{®73}	Predicción de funciones moleculares de proteínas.	Sí
SignalIP ^{®74}	Predicción de péptido señal a partir de secuencias proteicas.	Sí
TM-align ^{®77}	Predicción de análogos proteicos.	Sí
Tm Calculator ^{®67}	Predicción de temperatura de alineamiento de iniciadores.	Sí
Vector NTI [®]	Análisis y modificación de secuencias, identificación de marcos abiertos de lectura, diseño de iniciadores y vectores.	No

Unipro UGENE®	Análisis y modificación de secuencias, identificación de marcos abiertos de lectura, diseño de iniciadores y vectores, predicción de patrones electroforéticos de ácidos nucleicos.	Sí
---------------	---	----