



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REPRODUCCIÓN EQUINA

**PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL, A PARTIR DE LA
IDENTIFICACIÓN DE LA GONADOTROPINA CORIONICA EQUINA, CAPAZ DE
DETECTAR A LA GONADOTROPINA CORIÓICA DE BURRO**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**P R E S E N T A
MVZ ADRIANA RAFAELA DELGADO ROBLES**

No. de cuenta: 304180882

**COMITÉ TUTOR:
DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA - FMVZ
MC ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ - FMVZ
PhD SANDRA WILSHER - PMDCPS**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2019



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.



AGRADECIMIENTOS

CONACYT por el apoyo recibido a través del programa de Becas Nacionales del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Llevaré eternamente tu esencia como profesionista y actuaré según los valores que nos inculcaste, siempre tratando de retribuirte a través de mi servicio al país.

DRA. ANA MYRIAM BOETA ACOSTA gracias por darme la confianza de realizar mis estudios de posgrado en su equipo, por siempre esforzarse en capacitar profesionistas de calidad, por su disponibilidad, así como por la experiencia y conocimientos que nos comparte.

EQUIPO DE REPRODUCCIÓN EQUINA gracias por ayudar y apoyar este proyecto. Mari, Moni, Dani, Diana, Herme, Europa, Laura, Lauro, SS, TPs y estancias que siempre estuvieron dispuestos. Gracias Liz por ser mi compañera en este camino, por disfrutar y compartir éxitos y consolar muchas veces los fracasos. Gracias por compartir tu experiencia y por tu gran amistad.

DRA. ANITA gracias por su enorme paciencia, su cariño y su amistad. No sabe lo que me motivaron siempre sus palabras. Gracias por confiar en mí, en mis capacidades y en mi trabajo. Espero un día poder llegar a ser un poquito de lo que usted es.

DR. ALEJANDRO BENÍTEZ gracias por compartir tu tiempo, por tener la mejor disposición de resolver mis dudas y por tus muchos consejos. Eres un maravilloso ser humano y espero poder seguir aprendiendo de ti. Guardaré esos días, entre las horas, para siempre. Te quiero.

LABORATORIO DE INMUOFISIOLOGÍA Y PROTEÓMICA no solo fueron un excelente equipo de trabajo, sino que se convirtieron en mi familia. Puedo asegurar que su recuerdo será atesorado por mucho tiempo. Gracias amigos: Tzay, Itzelita, Mon, Aldo, Yahel, Héctor, Josué. Gracias Omar, por siempre hacer el esfuerzo de mantener nuestros túneles juntos, porque aprendí más de mí a través de tus ojos y sobre todo porque amo tu sinceridad, pero aborrezco tu cinismo.

A MI JURADO Que siempre se mostraron en la mejor disposición para retroalimentar con su experiencia este trabajo. Dr. Antonio, Dra. Ana María, Dr. Moisés, muchas gracias por todo el apoyo y por ser parte de mi formación en esta última etapa.

Este trabajo es producto del apoyo recibido por parte de los proyectos PAPIIT No. IN-226816 y No. IA-205016

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Este trabajo va dedicado a ustedes, porque gracias a su apoyo incondicional y motivación constante pude alcanzar una meta más, porque nunca me han dicho que no a nada y por el contrario, siempre han demostrado empatía y cariño hacia mis actos. Gracias por nunca dejar que me diera por vencida. Los amo!

A MARIANA Y ALEX

No puedo pensar en un mejor dúo que ustedes. Siempre les he expresado que son el mejor ejemplo que tengo de esfuerzo, pasión y perseverancia, tanto a nivel personal como profesional. Muchas gracias por siempre darme la oportunidad de desahogarme y de reflexionar a su lado. Agradezco a la vida tenerlos conmigo, de verdad, no sé qué haría sin ustedes.

A CELIA Y DIEGO

La distancia ha sido dura y tenerlos lejos en tantas facetas de mi vida ha sido difícil, pero siempre les estaré agradecida por el esfuerzo que hacen para nunca dejarme pensar que se olvidan de mí. Gracias porque pese a todo, nunca dejan de considerarme. Los quiero.

A ALMA Y EDUARDO

Nos han demostrado que no hay nada en este mundo que no se pueda lograr con esfuerzo y ganas. Gracias por todos los consejos y por todas las porras que siempre he recibido de su parte. Ojalá y pueda seguir aunque sea la mitad del camino que has recorrido hermana. Los quiero.

A MIS AMIGOS

A todas aquellas personas que a través de los años han estado acompañando mi ruta. Les agradezco infinitamente el haberme apoyado en todo, en siempre tener tiempo para escucharme y que nunca han dudado en brindarme su apoyo. Soy muy afortunada al tenerlos en mi vida.

“CAMBIAR EL MUNDO, AMIGO SANCHO, QUE NO ES LOCURA NI UTOPIÍA, SINO JUSTICIA...”

RESUMEN

Los équidos presentan una estrategia para la manutención de la gestación, con la acción luteogénica y luteotrópica de la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina coriónica de burro (dCG). La gonadotropina coriónica participa en la resurgencia del cuerpo lúteo primario, así como la formación de un cuerpo lúteo secundario y cuerpos lúteos accesorios, sin embargo, existen diferencias estructurales y funcionales entre las gonadotropinas presentes en las diferentes gestaciones équidas. Se ha estudiado la dinámica y el patrón de secreción de estas hormonas a través de su identificación en tejidos y suero, esto con ayuda de técnicas inmunodiagnósticas, como el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA, western blot (WB) o inmunohistoquímicas con la utilización de anticuerpos monoclonales para eCG, sin embargo, estos anticuerpos excluyen la detección de otras gonadotropinas équidas por lo que el objetivo de este trabajo fue la producción de anticuerpos capaces de detectar a la dCG en suero, para esto se utilizó como inmunógeno eCG comercial para la inoculación de conejos del cual se generó un anticuerpo anti eCG que detecto a la dCG por medio de la técnica de WB y ELISA. Posteriormente se aisló la banda sugerente a la subunidad β de la eCG por medio de un SDS-PAGE, para la producción de un anticuerpo anti eCG subunidad β , el cual fue específico para la detección de esta subunidad en suero de burras gestantes por medio de la técnica de WB. Por último se pre-purificó, a partir de suero de burras gestantes, la dCG para ser utilizada como inmunógeno, sin embargo, no se pudo aislar con la técnica de SDS-PAGE por la cantidad mínima que se obtenía en cada paso de la purificación, por lo que no se pudo producir un anticuerpo anti dCG. Podemos concluir que el anticuerpo producido anti eCG fue capaz de reconocer a la dCG y a la eCG en suero de burras y yeguas gestantes, que con la producción del anticuerpo anti eCG subunidad β , se observó que la técnica de aislamiento de la proteína deseada a partir de un SDS-PAGE es adecuada para aumentar la especificidad de los anticuerpos producidos, disminuyendo la detección de otras proteínas séricas y que la baja concentración de dCG en suero de burras gestantes, limitaron la utilización de las técnicas de pre-purificación y aislamiento por medio de un SDS-PAGE para la producción de un anticuerpo anti dCG.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE ÉQUIDOS	3
2.1.1. Hormonas glicoprotéicas	3
2.1.2. Gonadotropinas	4
2.1.3. Hormona folículo estimulante (FSH)	4
2.1.4. Hormona luteinizante (LH)	5
2.1.5. Gonadotropina coriónica equina (eCG)	5
2.1.6. Gonadotropina coriónica de burro (dCG)	6
2.1.7. Copas endometriales	6
2.1.8. Diferencia en la secreción de gonadotropina coriónica entre especies de équidos	8
2.2. DETECCIÓN DE LAS GONADOTROPINAS DE ÉQUIDOS	8
2.2.1. Producción de anticuerpos	9
2.3. INMUNOENSAYOS	9
2.3.1. Radioinmunoensayo (RIA)	10
2.3.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	10
2.3.3. Western blot (WB)	11
2.4. ELECTROFORESIS	11
2.4.1. Electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVO GENERAL	13
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
7. MATERIAL Y MÉTODOS	14
7.1. PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI eCG	15
7.1.1. Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)	15
7.1.2. Western Blot (WB)	15
7.1.3. Protocolo de inmunización con eCG comercial	17
7.1.4. Constatación de funcionalidad del anticuerpo policlonal anti eCG	18

7.1.4.1.	SDS-PAGE 10% y WB _____	18
7.1.4.2.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich _____	18
7.2.	PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI eCG SUBUNIDAD β _____	19
7.2.1.	Protocolo de inmunización con eCG subunidad β _____	19
7.2.2.	Constatación de funcionalidad del anticuerpo policlonal anti eCG subunidad β _____	20
7.2.2.1.	SDS-PAGE 10% y WB _____	20
7.3.	PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI dCG _____	20
7.3.1.	Protocolo de pre-purificación de la dCG en suero de burra gestante _____	20
7.3.1.1.	Inmunoprecipitación del suero _____	21
7.3.1.2.	Diálisis del suero _____	21
7.3.1.3.	Cuantificación de proteínas séricas _____	21
7.3.1.4.	Precipitación de proteínas de suero con sulfato de amonio _____	22
7.3.1.5.	Cromatografía de afinidad _____	22
7.3.1.6.	Cromatografía de intercambio catiónico _____	23
7.3.1.7.	Cromatografía de intercambio aniónico _____	24
8.	RESULTADOS _____	25
8.1.	PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL ANTI ECG Y ANTI eCG SUBUNIDAD β _____	25
8.1.1.	SDS-PAGE y WB de eCG comercial _____	25
8.1.2.	Títulos de anticuerpos producidos anti-eCG en el suero de conejo _____	26
8.2.	CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDAD DE ANTICUERPOS EN SUERO DE ÉQUIDOS _____	27
8.2.1.	Detección de la eCG y dCG en sueros de hembras gestantes por medio de WB y ELISA con anticuerpos anti eCG y eCG subunidad β _____	27
8.2.1.1.	SDS-PAGE y WB _____	27
8.2.1.2.	ELISA tipo sándwich _____	28
8.3.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO DE BURRA GESTANTE PARA LA PURIFICACIÓN DE LA dCG _____	31
8.3.1.	Cuantificación de proteínas séricas _____	31
8.3.2.	Precipitación de proteínas séricas con sulfato de amonio _____	31
8.3.3.	Cromatografía de afinidad _____	32

8.3.4. Cromatografía de intercambio catiónico	34
8.3.5. Cromatografía de intercambio aniónico	35
9. DISCUSIÓN	37
9.1. PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI ECG Y ANTI ECG SUBUNIDAD β	37
9.2. CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDAD DE ANTICUERPOS PRODUCIDOS PROBADOS EN LA DETECCIÓN DE ECG Y DCG EN SUEROS DE ÉQUIDOS	38
9.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO DE BURRA GESTANTE PARA LA PURIFICACIÓN DE LA dCG	39
10. CONCLUSIÓN	42
11. REFERENCIAS	43
12. ANEXOS	48

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA 1. SDS-PAGE 10% Y WB de eCG comercial	25
FIGURA 2. Medición de la respuesta inmune del conejo en relación a las inmunizaciones con eCG comercial	26
FIGURA 3. SDS-PAGE al 10% y WB de suero de burras gestantes previamente preparado para purificación de la dCG	27
FIGURA 4. WB de suero de burra enfrentado con anticuerpo anti eCG subunidad β	28
FIGURA 5. Detección de eCG con anti eCG 1/ 5, 000	28
FIGURA 6. Detección de dCG en suero de burra con anti eCG	29
FIGURA 7. Tendencia de secreción hormonal de suero de yeguas y burras gestantes del día 40 al 110 de gestación, expresado en densidades ópticas	30
FIGURA 8. WB de suero de burra gestante precipitado con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación	32
FIGURA 9. Cromatograma de suero de burra gestante al día 70 obtenida de una cromatografía de afinidad con una columna HiTrap Blue	33
FIGURA 10. WB de fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad con una columna HiTrap Blue	33
FIGURA 11. Cromatograma de suero de burra gestante al día 70 obtenida de una cromatografía de intercambio catiónico	34
FIGURA 12. SDS-PAGE al 10% y WB de fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio catiónico	35
FIGURA 13. Cromatograma de suero de burra gestante al día 70 obtenida de una cromatografía de intercambio aniónico	36
FIGURA 14. SDS-PAGE al 10% y WB de fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico	36

CUADRO 1. Cuantificación de proteínas en suero por medio de la técnica de Bradford, comparando concentración antes y después del tratamiento de pre purificación _____ **31**

PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO POLICLONAL, A PARTIR DE LA IDENTIFICACIÓN DE LA
GONADOTROPINA CORIONICA EQUINA, CAPAZ DE DETECTAR A LA GONADOTROPINA
CORIÓNICA DE BURRO

1. INTRODUCCIÓN

Los équidos presentan una estrategia fisiológica compleja para el mantenimiento la gestación temprana, con la acción luteogénica y luteotrópica de la gonadotropina coriónica equina (eCG) y la gonadotropina coriónica de burro (dCG).

La gonadotropina coriónica de équidos es una hormona de origen proteico, que pertenece al grupo de hormonas glicoprotéicas donde se encuentran también las gonadotropinas hipofisarias; hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH), todas ellas compuestas por una subunidad α , que es codificada por un gen común y una subunidad β , específica para cada glicoproteína. Ambas subunidades se encuentran unidas entre sí por un enlace no-covalente (Maurel *et al*, 1992).

En gestaciones de équidos, la gonadotropina coriónica participa activamente y de una manera regulada, favorece la revitalización del cuerpo lúteo primario así como la formación de un cuerpo lúteo secundario y cuerpos lúteos accesorios, sin embargo, existen diferencias estructurales y funcionales entre las gonadotropinas presentes en las diferentes gestaciones équidas. (Murphy *et al*, 1991).

Para comprender a fondo el efecto de las gonadotropinas coriónica en gestaciones de équidos, tanto gestaciones híbridas (Burro X Yegua= embrión mula, Caballo X Burra= embrión burdégano) como en gestaciones no híbridas (Caballo X Yegua, Burro X Burra), se ha estudiado la dinámica y el patrón de secreción de estas hormonas a través de su identificación en tejidos y suero, esto con ayuda de técnicas inmunodiagnósticas, entre las que destacan inmunoensayos, como lo son el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA por sus siglas en inglés, electroforesis, western blot (WB) o inmunohistoquímicas (Christakos, Bahl, 1979).

Estas técnicas utilizan anticuerpos, ya sean policlonales o monoclonales, los cuales, gracias a su especificidad y sensibilidad, han podido ampliar el conocimiento de la interacción que estas hormonas tienen en la fisiología de la gestación en équidos, (Stills, 2012) siendo la falta de anticuerpos específico por cada una de las especies de équidos, la mayor limitante que se tiene en la investigación de la fisiología de la gestación, por lo que el objetivo del presente trabajo fue producir un anticuerpo con la capacidad de detectar a la gonadotropina coriónica de burros en suero.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE ÉQUIDOS

Existe una amplia gama de hormonas las cuales, actuando individualmente o en interacción con otras, llevan a cabo el proceso de la reproducción. Estas se pueden dividir según su grupo estructural como lo son, esteroideas las cuales son derivadas de ácidos grasos; proteicas y polipeptídicas que están formadas por aminoácidos y glicoprotéicas, de origen proteico y con modificaciones postraduccionales que le dan una característica específica para su actividad biológica (Squires *et al*, 2003).

2.1.1 HORMONAS GLICOPROTÉICAS

Las hormonas glicoprotéicas tienen dos tipos de patrones de glicosilación; glicosilación unida a un grupo O, que es caracterizada por un carbohidrato N-acetilgalactosamina unido al grupo hidroxilo de un aminoácido, ya sea serina o treonina y una glicosilación con un carbohidrato N-acetilgalactosamina la cual está unida al grupo amida de asparagina. La extensión y el patrón de glicosilación le dan a la proteína diferencia de cargas, bioactividad y vida media (Leão y Esteves, 2014).

Las hormonas glicoprotéicas de estructura heterodimérica son moléculas complejas formadas por dos subunidades; α y β las cuales están unidas por un enlace de disulfuro. A pesar de que la estructura de la subunidad α es idéntica en todas las hormonas glicoprotéicas, el papel que esta subunidad juega en la interacción con el receptor, aún no se conoce totalmente. Se ha mencionado que la subunidad β , está directamente relacionada con el reconocimiento de los receptores (Pierces y Parson, 1981), sin embargo, es la hormona completa la que, una vez unida al receptor, induce una señal al interior de la célula activando receptores unidos a proteína G, en donde, a través de esta señalización, se ejerce la acción de la hormona (Jiang *et al* 2014).

2.1.2 GONADOTROPINAS

Dentro de este grupo de hormonas glicoprotéicas se encuentran las dos principales gonadotropinas de origen hipofisiario: LH, FSH y las de origen placentario: gonadotropina coriónica (GC) tanto humana (hCG) como equina (eCG) (Pierces y Parson, 1981; Jiang *et al* 2014).

Estas hormonas interactúan con la célula blanco por medio de un receptor que se encuentra presente en la membrana celular. Mientras que en équidos la FSH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) tienen receptores específicos (Jiang *et al*, 2014) la LH y eGC comparten el receptor debido a su similitud estructural, sin embargo, en otras especies, la GC équidas son capaces de unirse a los receptores tanto de LH como de FSH (Chopineau *et al*, 1997).

La interacción de las gonadotropinas y otras hormonas reproductivas favorecen la función de un ovario normal (Ezcurra y Humaidan, 2014). La FSH y la LH juegan un papel importante en la función gonadal; ya que la LH en sinergia con FSH estimula el crecimiento folicular y la ovulación (Raju *et al*, 2013).

2.1.3 HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

La FSH equina está compuesta por 118 aminoácidos que cuentan con cuatro sitios de glicosilación, dos en la subunidad α (ASN52 y ASN78) y dos en la subunidad β (ASN7 y ASN24) los cuales, crea diversas isoformas con diferentes rangos de vida media (de 3 a 5 horas) y actividad biológica (Fukiji *et al*, 1978; Leão y Sandro, 2013).

La importancia biológica de esta hormona se encuentra en el reclutamiento y en el crecimiento de folículos antrales ya que junto con el estradiol estimulan la formación de la cavidad antral y la expresión de receptores para LH en las células de la granulosa en el folículo preovulatorio (Gigli *et al* 2006). La FSH también se encuentra involucrada en la estimulación de las células de la granulosa para la producción de inhibina y activina por medio de una actividad autocrina (Gigli *et al* 2006; Leão y Sandro, 2013).

2.1.4 HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

La subunidad β de la LH equina está formada por 149 aminoácidos. (Leão y Sandro, 2013), presentando un 30% de carbohidratos en su estructura, siendo el ácido siálico el principal, brindándole una vida media mayor, aproximadamente de 5 horas (Alexander e Irvine, 2011).

La función principal de la LH es reiniciar la meiosis en el folículo preovulatorio. Este proceso inicia durante la mitad de la etapa folicular, donde la LH estimula la producción de andrógenos en las células de la teca que a su vez promueven su aromatización para producir estrógenos en las células de la granulosa. Los estrógenos generan una retroalimentación positiva a la hipófisis aumentando la producción de LH lo que resulta en la ovulación (Choi y Smitz, 2014).

La LH también interviene en la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (CL), para el sostén de la gestación (Leão y Sandro, 2013; Choi y Smitz, 2014).

2.1.5 GONADOTROPINA CORIÓNICA EQUINA (eCG)

La eCG es una molécula de 60kDa, compuesta por una subunidad α la cual cuenta con 82 aminoácidos (Murphy Martinuk, 1991) que le confieren un peso molecular de 16.96kDa. Esta subunidad es común entre la LH, FSH y la TSH equina, ya que está codificada por un gen común (Murphy y Martinuk, 1991) lo que le da la característica de ser una subunidad altamente conservada, teniendo un 70-80% de homología con otras subunidades α de otros mamíferos (Murphy *et al*, 1991). Se sabe que el porcentaje de glicosilación de la subunidad α corresponde al 22% de su peso molecular (Murphy *et al*, 1991).

Por su parte, la subunidad β tiene un peso molecular de 43.72kDa y es codificada por el mismo gen que la LH equina (Murphy *et al*, 1991). Es la hormona glicoprotéica más glicosilada entre los mamíferos (Murphy *et al*, 1991) ya que contiene del 45% al 50% de carbohidratos, teniendo entre los principales galactosa, glucosamina y ácido siálico, correspondiendo a este último el 10% (Murphy *et al*, 1991; Müller *et al*, 2015) lo que le confiere una vida media de aproximadamente 6 días (Murphy *et al*, 1991; Mestre *et al*, 2011,). Si bien, se puede encontrar a la eCG circulante en suero, sin embargo, la presencia de esta hormona en orina es mínima, ya que es metabolizada y degradada antes de poder llegar a una filtración renal (Murphy *et al*, 1991).

La eCG tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la LH equina (Viktor *et al*, 1996) lo que hace que ambas hormonas se unan a un mismo receptor, sin embargo, la afinidad de la eCG por el receptor es mucho más bajo que la de LH debido a las diferencias en el patrón de glicosilación (Murphy *et al*, 1991).

La función de la eCG se enfoca en la estrategia fisiológica que los equinos tienen para la manutención de la gestación por medio del rescate del cuerpo lúteo primario y la generación de cuerpos lúteos suplementarios (Murphy, 2012) funcionando similar a la LH, mientras que en especies no equinas actúa como FSH estimulando el desarrollo folicular (Boeta y Zarco, 2012). La variación de la concentración de la eCG en suero se ha atribuido a factores genéticos, con influencias maternas y paternas (Murphy, 2012).

2.1.6 GONADOTROPINA CORIÓNICA DE BURRO (dCG)

Se sabe que la eCG y la dCG son hormonas similares tanto en actividad, como en características fisicoquímicas (Aggarwal *et al*, 1980) esto debido a su alta homología de sus estructuras de aminoácidos (subunidad α con 92% de identidad, subunidad β con 93% de identidad) (Chopineau *et al*, 1997).

La dCG es secretada por burras gestantes. Pertenece al grupo de hormonas glicoprotéicas, teniendo reportado la presencia de 85 a 146 aminoácidos en su molécula (Murphy *et al*, 1991) con alrededor del 31% de carbohidratos en su estructura, siendo un 6.8% de ácido siálico (Aggarwal *et al*, 1980; Leigh y Stewart, 1990) menor cantidad que la que se encuentra en la eCG y en la LH de burra (Murphy *et al*, 1991) por lo que la vida media de esta hormona es menor que la eCG (26 horas en rata, 6 días en el caballo) y quizá es más cercana a la vida media de la hCG (4 a 9 horas en la rata) (Aggarwal *et al*, 1980). La dCG tiene poca actividad de FSH ya que tiene mayor afinidad por receptores de LH (Aggarwal *et al*, 1980; Leigh y Stewart, 1990).

2.1.7 COPAS ENDOMETRIALES

El blastocisto équido tiene una capa única ectodermal que lo rodea la cual es llamada trofoblasto. Esta membrana mantiene el contacto de absorción de la placenta con el endometrio durante la gestación (Ginther, 1998) además de tener una función primordial en la formación de las copas endometriales.

Alrededor del día 25 post-ovulación, en la superficie del corion, entre el alantoides y el saco vitelino, se comienza a visualizar un engrosamiento anular conocido como cinturón coriónico (Allen, 2005).

Histológicamente, el cinturón coriónico se observa en sus primeros días como una serie de ondulaciones poco profundas en la zona del corión, que se profundizan durante los próximos 10 días para convertirse en crestas marcadas, esto debido a una rápida hiperplasia de las células del trofoblasto (Allen, 2000; Allen y Wilsher, 2009). Posteriormente las células del cinturón coriónico pasan por tres fases para su desarrollo. La primera fase consiste en una rápida proliferación celular. La segunda fase es la diferenciación de células uninucleadas del trofoblasto a células binucleadas que tienen la capacidad de secretar eCG o dCG. La última fase es aquella en donde las células adquieren un fenotipo invasivo que les permite la entrada al epitelio luminal del endometrio (Antczak *et al*, 2013; Mestre *et al*, 2008).

Una vez que las células del cinturón coriónico adquieren la característica invasiva, se comienzan a observar zonas engrosadas alrededor de la vesícula embrionaria en el endometrio grávido, esto se puede presentar entre el día 30 – 35. A estas zonas presentes en el endometrio se les conoce como copas endometriales (Allen, 2000). Para el día 50 – 60, estas copas endometriales se pueden observar como densas placas largas, las cuales se encuentran relacionadas histológicamente con las glándulas endometriales. Comienzan a degenerarse por una infiltración de leucocitos en el tejido que ataca y destruye la copa después del día 70 (Allen, 2001; Allen y Wilsher, 2009; Koets, 2011). Las copas se vuelven más pálidas debido al desprendimiento celular de la superficie luminal para que, entre el día 100 al 120, este completamente necrótica y posteriormente desaparezca (Allen, 2001; Antczak *et al* 2013; Koets, 2011).

Las copas endometriales son las responsables directas de la producción de gonadotropina coriónica de las diferentes gestaciones équidas, tanto intra-especie (Padre caballo X Madre Yegua; Padre Burro X Madre Burra) como inter-especie (Padre caballo X Madre Burra; Padre burro X Madre yegua) (Allen, 2002; Murphy, 2012).

2.1.8 DIFERENCIA EN LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINA CORIÓNICAS ENTRE ESPECIES DE ÉQUIDOS

La gonadotropina coriónica equina comienza a secretarse al día 35-38 post-ovulación, teniendo una concentración aproximada de 20 a 300 UI/ml, dependiendo del tipo de gestación. Alrededor del día 60-70, se observa su máxima concentración, disminuyendo gradualmente hasta el día 100-120 en donde desaparece completamente. Este patrón de secreción coincide con la presencia de las copas endometriales en el útero de la hembra (Allen *et al*, 1993; Allen, 2000; Allen *et al* 2002, Boeta y Zarco, 2012).

Algunos estudios han mostrado una diferencia en tamaño, producción y vida de las copas endometriales en gestaciones inter-específicas, en donde coincide que las gestaciones con padre equino tienen una mayor concentración de gonadotropinas que aquellas gestaciones donde el padre es burro oscilando entre: Yeguas 80-100 UI/ml, burras 100-300 UI/ml, que aquellas gestaciones con padre burro: Burras 40-100 UI/ml, yeguas 20-50 UI/ml (Allen y Short, 1995; Boeta y Zarco, 2012), por lo que se ha concluido que el efecto luteogénico y luteotrópico, patrón de secreción y actividad biológica podría estar correlacionada con el tipo de gestación (Boeta y Zarco, 2012).

2.2 DETECCIÓN DE LA GONADOTROPINA DE ÉQUIDOS

Desde que la eCG comenzó a ser estudiada se diseñaron diferentes técnicas diagnósticas con las que se pudiera detectar esta hormona a partir de suero de yeguas gestantes, siendo las técnicas de inmunoensayos las que facilitaron su estudio, por medio de la producción de anticuerpos capaces de reconocer a esta hormona.

2.2.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

La producción de anticuerpos resulta una estrategia para la realización de diversas metodologías, ya sea con la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales, que han sido empleados en muchos métodos diagnósticos como lo son ELISA, dot blot, western blot, inmunofluorescencias, entre otras (Pohanka, 2009)

Los anticuerpos monoclonales tienen alta especificidad que el anticuerpo policlonal, sin embargo, es precisamente la alta especificidad lo que limita la detección de variedades de antígenos deseables lo cual es una de sus mayores desventajas (Stills, 2012), aunado a que la producción de estos suele ser costoso y requerir personal especializado (Tian *et al*, 2018).

Por otra parte, los anticuerpos policlonales se obtienen de la inmunización de un animal con un antígeno y un adyuvante que causa una respuesta inmune que estimula la producción de diferentes clonas de linfocitos B, lo que resulta en la producción de anticuerpos capaces de reconocer diferentes zonas antigénicas (Leenaars *et al*, 1999). Al ser heterogéneos se unen a diferentes epítopes antigénicos (Stills, 2012) lo que amplía su capacidad de detección, sin embargo, al tener alta capacidad de detección, la especificidad reducida es su mayor desventaja (Tian *et al*, 2018). La producción de estos anticuerpos suele ser sencilla, sin embargo, es fundamental elegir adecuadamente algunos parámetros como la característica del inmunógeno (peso molecular, grado de pureza, naturaleza química), la dosis, la ruta y el calendario de la inmunización, así como elegir el adyuvante indicado para complementar la respuesta inmune para que la producción sea eficiente (Stills, 2012).

2.3 INMUNOENSAYOS

Algunos de los inmunoensayos utilizados para la detección de la gonadotropina coriónica se basan en la reacción antígeno-anticuerpo, que permite identificar a esta hormona en cualquier tipo de muestra biológica, principalmente de suero (Aydin, 2015; Tian *et al*, 2018). Entre las principales técnicas se encuentran: radioinmunoensayo (RIA) y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), western blot, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, dot blot, entre otras (Tian *et al*, 2018).

2.3.1 RADIOINMUNOENSAYO

Desarrollado por Yalow y Berson en 1959 esta técnica fue considerada el método clásico de inmunodiagnóstico por muchos años.

El fundamento de esta técnica se basa en la unión de un antígeno y un anticuerpo, sin embargo, este método requiere marcadores radioactivos como el I^{125} , P^{32} y C^{14} entre otros. Midiendo la radioactividad, es posible determinar las concentraciones de los antígenos o anticuerpos marcados, sin embargo, el uso de radiomarcadores restringe la aplicación en la detección práctica por los efectos que estos tienen contra la salud humana (Goldsmith, 1975; Tian *et al*, 2018).

Esta técnica fue utilizada en las primeras fases experimentales cuando se comenzaba a detectar a la eCG en suero, sin embargo, actualmente se considera obsoleta al no encontrar disponibilidad de anticuerpos anti eCG marcados.

2.3.2 ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS

El ELISA es un método simple y rápido basado en el reconocimiento de un anticuerpo con un antígeno. Existen diversos protocolos establecidos para realizar esta técnica como lo son el ELISA directo, indirecto, tipo sándwich, competitiva y directa competitiva (Tian *et al*, 2018).

En esta técnica el antígeno o el anticuerpo se adsorben en una fase sólida, sobre la cual se llevan a cabo las reacciones. Se utilizan anticuerpos conjugados a enzimas en donde estos conservan su capacidad de unión al antígeno, mientras que la enzima marcadora es capaz de generar una reacción colorimétrica capaz de ser cuantificada por medio de un espectrofotómetro (Gan *et al*, 2013; Aydin, 2015).

En años recientes, el ELISA ha sido utilizado en el análisis de proteínas y péptidos por su alta sensibilidad (Aydin, 2015), sin embargo, la ausencia de anticuerpos específicos para ciertos antígenos disminuye especificidad, aumentando la reacción cruzada con otros antígenos o uniones no específicas (Gan *et al*, 2013). En el caso de la detección de la eCG, el kit comercial trata de un ELISA tipo sándwich, donde el pozo viene previamente sensibilizado con un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un sitio antigénico único de la eCG, sin embargo, se sabe cada especie de équido presenta en la gestación su propia isoforma de gonadotropina y su propio patrón de secreción (Allen y Short, 1995) por lo que el uso de este kit para la detección de otras gonadotropinas équidas lo deja obsoleto.

2.3.3 WESTERN BLOT

El western blot es una técnica la cual permite identificar proteínas específicas que se encuentran en una mezcla compleja. Esta metodología combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia o ausencia de detergentes como el dodecilsulfato sódico (SDS) con las reacciones inmunoenzimáticas en fase sólida. En el primer paso las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación. Posteriormente, son electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF). El patrón que se obtiene sobre el papel es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Posteriormente se bloquean los sitios reactivos del papel que quedan libres, con alguna proteína que no interfiera y a continuación se hacen reaccionar con los anticuerpos, los cuales podrán unirse a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel.

La siguiente reacción que se efectúa corresponde a la interacción antígeno-anticuerpo que se pone de manifiesto al agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima como peroxidasa u otro conjugado, en el ensayo enzimático se agrega el sustrato y un cromógeno que precipite *in situ* para hacer visible la reacción (Carpio y Medina, 2011).

2.4 ELECTROFORESIS

Es una forma de separación de proteínas que actúa con base en la carga de las moléculas, las cuales migraran a través de una matriz, usualmente agarosa o acrilamida, bajo la aplicación de un campo eléctrico. La matriz de agarosa se utiliza comúnmente para la separación de moléculas grandes, como lo son los ácidos nucleicos, mientras que la poliacrilamida se utiliza más para la separación de proteínas (Jackowski y Shi, 1998; Ausuble *et al*, 2003).

Existen diferentes métodos de electroforesis para la resolución de las proteínas, dependiendo de las características que se quieran estudiar. La electroforesis unidimensional puede proporcionar información sobre el tamaño de las proteínas y su pureza, así como el número y el tamaño de las subunidades, mientras que los geles bidimensionales tienen dos fases. La primera corresponde a la separación de la proteína por enfoque isoeléctrico, en donde la movilidad de esta a través de una tira de pH inmovilizado, se verá detenida al encontrar su punto isoeléctrico.

La segunda fase corresponde a una electroforesis en presencia de SDS, correspondiendo el mismo fundamento que en la electroforesis unidimensional. Este tipo de electroforesis no solo brinda información acerca del tamaño de las proteínas, sino que también nos da un indicio de la carga de esta (Ausuble *et al*, 2003), sin embargo, la electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es la técnica más utilizada (Gallagher, 2018)

2.4.1 ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO

Esta electroforesis se considera como desnaturizante, ya que presenta el detergente aniónico SDS, el cual tiene una interacción fuerte con las proteínas provocando su desnaturalización, haciéndolas perder su conformación tridimensional y dejando únicamente una estructura lineal de aminoácidos (Kumar, 2018; Walker, 2009).

Por otro lado, la poliacrilamida que está hecha por la polimerización de monómeros de acrilamida, forma micro poros conforme a su concentración, lo que provoca que, durante la migración de las proteínas, el tamaño del poro impida la migración dejándolas estacionadas (Gallagher, 2018) separando a las proteínas por peso, forma y tamaño (Gallagher, 2018).

3. JUSTIFICACIÓN

La generación de un anticuerpo con la capacidad de detectar la gonadotropina coriónica en suero de burras, permitirá conocer las concentraciones de gonadotropinas en gestación para que a futuro se puedan comparar los patrones de secreción entre los équidos, ampliando la información acerca de la biología de la reproducción en estas especies.

4. HIPÓTESIS

Los anticuerpos producidos serán capaces de detectar a la gonadotropina coriónica en suero de burras gestantes.

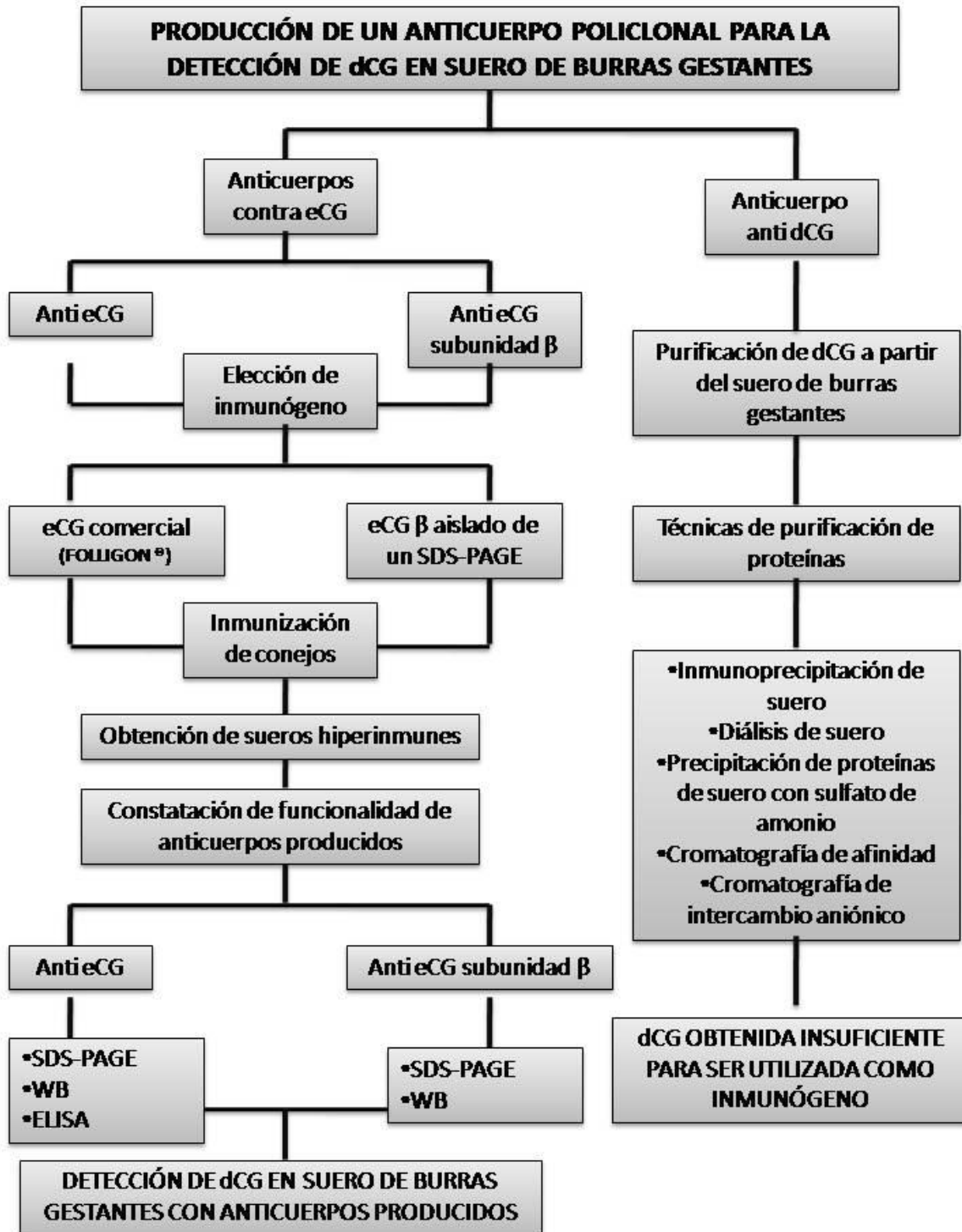
5. OBJETIVO GENERAL

Identificar y aislar la eCG y dCG, por medio de la técnica SDS-PAGE y métodos de purificación protéica, para la producción de anticuerpos policlonales.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir un anticuerpo policlonal anti-eCG, por medio de la inoculación de eCG comercial
- Producir un anticuerpo policlonal anti-eCG subunidad β por medio del aislamiento de esta subunidad en un SDS-PAGE
- Pre purificar a la dCG de suero de burras gestantes, por medio de técnicas de purificación de proteínas, para producir un anticuerpo anti-dCG

7. MATERIAL Y MÉTODOS



7.1 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI eCG

7.1.1 GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

El primer paso para la producción de un anticuerpo anti eCG fue elegir el inmunógeno, al cual se le debía comprobar el grado de pureza por medio de un SDS-PAGE y WB.

Se utilizó el producto comercial FOLLIGON® de INTERVET, el cual está constituido por un liofilizado de eCG purificada de suero de yegua gestante, con una concentración de 1,000 UI/5ml (1UI= 100 ng) la cual se visualizó por medio de un gel de electroforesis.

Se preparó un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato al 10% (Anexo) el cual se colocó en la cámara de electroforesis, llenando la cámara con buffer de corrida (Run buffer™, Bio-Rad®) hasta cubrir el soporte del gel. A cada pozo se le agregó 15µg de eCG comercial mezclado con buffer de Laemmli en una proporción 1:3. Se utilizaron 3 µl de marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Bio-Rad®). Por cada electroforesis se realizaron los geles por duplicado. La electroforesis se dejó correr durante 120 minutos, dejando migrar las proteínas a lo largo del gel, utilizando 15 miliamperes constantes (mA) por gel y Voltaje (V) con una variabilidad de 200 a 300V.

Para la tinción de proteínas en gel, se utilizó azul de Coomassie (PhastaGel® Blue R Sigma-Aldrich), agregando 25ml por gel, manteniéndolo en agitación constante durante 40 minutos. Ya teñido el gel, se eliminó la tinción y se agregaron 25ml de solución desteñidora (Anexo) haciendo recambios cada 15 minutos de esta solución hasta visualizar las bandas de proteína de manera definida, tratando de identificar una banda de entre 20 a 25 kDa y 40 a 43 kDa, reportada como la subunidad α y la subunidad β de la eCG, respectivamente.

7.1.2 WESTERN BLOT

Se realizó la técnica de Western Blot esto por medio de la transferencia húmeda de las proteínas aisladas del gel de poliacrilamida hacía una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P® Merck) previamente hidratada con metanol.

Se colocaron los componentes de la transferencia dentro del casete, con la finalidad de dejar en contacto directo el gel de electroforesis con la membrana de PVDF. EL casete fue colocado dentro del soporte de la cámara, no sin antes verificar que entre el gel y la membrana no quedarán burbuja que evitara la migración de las proteínas. Una vez colocado el soporte de transferencia dentro de la cámara, se agregó el buffer de transferencia hasta cubrir el casete (Anexo).

La transferencia se llevó a cabo con 100 V constantes y mili amperaje variable, sin exceder los 250 mA, durante 70 minutos.

Pasados los 70 minutos, se separó la membrana y se tiñó con rojo de Ponceau (Ponceau S Solution® Merck) para corroborar la correcta transferencia, evidenciando las bandas de las proteínas sobre la membrana de PVDF. Una vez comprobada la transferencia, se destiñó la membrana con buffer de fosfatos 1X pH 7.4 (PBS 1X) (Anexo) por medio de lavados continuos, con intervalos de 5 minutos y en agitación continua hasta dejar de observar color.

Desteñida completamente la membrana, se continuó con el bloqueo, utilizando una solución con leche descremada al 5% (Anexo). Se agregaron 10ml y se dejó incubar a temperatura ambiente, en agitación constante, durante 1 hora. Pasada la hora, se realizaron 3 lavados de PBS 1X pH 7.4, con una duración de 5 minutos cada uno.

Retirado el excedente y eliminado por completo los rastros de solución de bloqueo, se continuó con la adición del anticuerpo primario, el cual se trató de un anticuerpo policlonal, anti LH ovina subunidad β , que tiene la capacidad de detectar a eCG. Se utilizó en una dilución de 1/10,000, a 4°C, dejándolo incubar durante toda la noche.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron tres lavados con PBS 1X, de 5 minutos cada uno, en agitación constante, esto con el fin de eliminar los restos del anticuerpo primario y poder continuar con la adición del anticuerpo secundario.

El anticuerpo secundario, que fue un anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa de rábano picante HRP (Rabbit IgG, SIGMA), se preparó a un factor de dilución 1/10,000 diluido en leche descremada al 5%, dejándolo incubar a temperatura ambiente y en agitación constante, durante 1 hora para después continuar con el protocolo de lavado: los primeros tres lavados fueron realizados con PBS 1X, después se continuaron con 10 lavados de PBS 1X- Tween al 0.1% (ANEXO) y los tres últimos se realizaron con PBS 1X. Terminado los lavados correspondientes, se continuó con el revelado por medio de la técnica de quimioluminiscencia (Luminata™ Crescendo Western HRP substrate, Millipore) en películas radiográficas (Amersham™ Hiperfilm™ ECL, GE).

7.1.3 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN CON eCG COMERCIAL

Se utilizó una coneja SPF, de raza Nueva Zelanda, de 3 meses de edad y de aproximadamente 5 Kilogramos (Kg), clínicamente sana.

Antes de la primera inoculación, se tomaron 2 ml de muestra sanguínea, por medio de una venopunción de la vena central de la oreja. Estos muestreos se llevaron a cabo en todas las inmunizaciones con el fin de monitorear la producción de anticuerpo en el suero de la coneja. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C para obtener el suero que posteriormente se fraccionó en volúmenes de 200µl para almacenar en congelación a -20°C.

Para la primera inmunización, se utilizaron 100 µg de eCG comercial (Folligon® Intervet). Se reconstituyó el liofilizado con 500 µl de agua destilada y se diluyó con 500 µl de adyuvante completo de Freund (Freund's Adjuvant complete, SIGMA) en una proporción 1:1. Esta mezcla se homogenizó hasta el punto de hacer notoria una emulsión, la cual se administró de manera subcutánea.

La segunda y la tercera inmunización se realizaron con 100µg eCG reconstituida con 500µl de agua destilada, agregando 500µl de adyuvante incompleto de Freund (Freund's Adjuvant incomplete, SIGMA), mientras que en la cuarta y quinta inmunización, únicamente se inocularon 100µg eCG reconstituida con 500µl de agua destilada (Drenckhahn *et al*, 1993). Estas inmunizaciones se realizaron con un intervalo de 15 días entre cada una.

Para la obtención del suero hiperinmune obtenido a través del protocolo de inmunización, se realizó un sangrado en blanco por medio de una punción cardiaca, con la coneja previamente anestesiada con Tiletamina/ Zolazepam (Zoletil® 50, Virbac) a una dosis de 3 mg/Kg (Carpenter, 2013). La sangre obtenida fue centrifugada a 4,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C para separar el suero. Se fraccionó en volúmenes de 1.5ml y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su uso.

7.1.4 CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDAD DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI eCG

La eficacia de los anticuerpos se evaluó mediante WB y ELISA.

7.1.4.1 SDS-PAGE 10% Y WB

Se utilizaron muestras de burras gestantes al día 70, agregando a cada pozo 10µl de suero y corriendo la electroforesis con las mismas constantes previamente establecidas. Para el WB se utilizó el anti eCG a una dilución de 1/5,000, incubando durante 1 hora. El anticuerpo secundario fue un anti IgG de conejo HRP (Rabbit IgG, SIGMA), se preparó con un factor de dilución 1/10,000 diluido en leche descremada al 5%, dejándolo incubar a temperatura ambiente, en agitación constante, durante 1 hora para después continuar con el protocolo de lavado y revelado descrito anteriormente.

7.1.4.2 ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) TIPO SANDWICH

Los anticuerpos fueron titulados con diferentes concentraciones de eCG comercial comenzando con 1µg hasta llegar a 0.03µg, acoplado estas concentraciones de proteína en placas de ELISA de fuerte adsorción (MaxiSorp™) por triplicado, agregando 50µl por pozo.

En el caso de la sensibilización con suero, fueron agregados 50µl de pool de sueros de burras gestantes al día 70 y para la comparación de la tendencia de secreción de eCG y dCG, se utilizaron suero de burras y yeguas gestantes de los días 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 110 de gestación.

Se dejó incubando durante 18 horas en refrigeración a 4°C. Terminando este periodo, se realizaron 3 lavados con solución de lavado (ANEXO) para continuar con el bloqueo utilizando albumina sérica bovina (BSA) (Bovine Serum Albumin, SIGMA) al 1%, colocando 100µl por pozo, dejando incubar durante 1 hora a 37°C. Posterior a este bloqueo, se volvieron a realizar 3 lavados con solución de lavado y se continuó con el anticuerpo primario probando el anticuerpo anti eCG con un factor de dilución de 1/10, 000, 1/5, 000 y 1/1,000, colocando 50µl por pozo. Se incubó durante 2 horas a 37°C y pasadas las 2 horas, se agregó el anticuerpo secundario, utilizando un anticuerpo anti IgG conejo HRP (Rabbit IgG, SIGMA) con un factor de dilución de 1/10, 000 colocando 50µl por pozo, el cual se incubó durante 2 horas a 37°C. Se lavó la placa nuevamente con solución de lavado y se agregaron 100µl de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) a cada pozo (ANEXO) que se dejó actuar durante 15 minutos a 37°C, para después agregar 50µl de solución de parada (ANEXO) a cada pozo para leerlo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm.

7.2 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI eCG SUBUNIDAD β

7.2.1 PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN CON eCG SUBUNIDAD β

Para este protocolo se realizó un SDS-PAGE al 10% donde a cada pozo se le agregó 15µg de eCG comercial. La electroforesis fue teñida con azul de Coomassie y se agregó solución desteñidora para quitar los restos de la tinción y poder identificar la banda de proteína de 43 kDa sugerente a la subunidad β de la eCG (Murphy *et al*, 1991). A cada gel se le dieron 3 lavados con PBS 1X pH 7.4 cada 5 minutos, esto para retirar el excedente de ácido acético.

Identificada la banda, se cortó por medio de un bisturí estéril, teniendo precaución de delimitar el área. Ya aislada la banda, se comenzaron a realizar cortes finos, hasta dejar pequeñas partículas a las cuales se les agregaron 10µl de agua destilada para después homogeneizar.

Posteriormente, se preparó una emulsión con el gel y adyuvante, que fue utilizado para la inmunización de las conejas, usando el mismo protocolo antes descrito.

7.2.2 CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDAD DEL ANTICUERPO POLICLONAL ANTI eCG β

7.2.2.1 SDS-PAGE 10% Y WB

Obtenido el anticuerpo, se utilizó una muestra de burra gestante al día 70 a la cual se le realizó un SDS-PGE, agregando 10 μ l de suero a cada pozo, corriendo la electroforesis con las mismas constantes previamente establecidas. Para el WB se utilizó el anti eCG subunidad β a 1/5,000 incubando durante 1 hora. El anticuerpo secundario fue un anti IgG de conejo HRP (Rabbit IgG, SIGMA), se preparó con un factor de dilución 1/10,000 diluido en leche descremada al 5%, dejándolo incubar a temperatura ambiente, en agitación constante, durante 1 hora para después continuar con el protocolo de lavado y revelado descrito anteriormente.

7.3 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANTI dCG

7.3.1 PROTOCOLO DE PRE-PURIFICACIÓN DE LA dCG EN SUERO DE BURRA GESTANTE

El monitoreo de las hembras gestantes y la obtención de las muestras sanguíneas se llevó a cabo en la Clínica de Reproducción Equina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicada en el municipio de Tequisquiapan, Querétaro, que forma parte del complejo del centro de enseñanza, investigación y extensión en producción animal en altiplano (CEIEPAA).

Se trabajó con 8 burras y yeguas gestantes, con una edad entre 5 y 10 años, clínicamente sanas, de raza criolla y con una condición corporal de 3 a 3.5 en escala de 1 a 5.

El monitoreo de la gestación se llevó a cabo 3 veces por semana, a partir del diagnóstico positivo de la gestación, por medio de palpación transrectal y ultrasonografía, hasta alcanzar el día 35 en donde se comenzó el muestreo sanguíneo, 3 veces por semana, hasta el día 120 de gestación.

Este muestreo se realizó por medio de una venopunción yugular obteniendo en dos tubos, con gel activador de suero, 10ml de sangre completa. Cada tubo se dejó reposar aproximadamente 1 hora y posteriormente se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos para separar el suero. Se separaron los sueros de cada hembra en 2 tubos de 1.5ml y en tubos de polipropileno de 5ml, para mantener el suero en congelación a -20°C hasta su uso.

7.3.1.1 INMUNOPRECIPITACIÓN DEL SUERO

El suero fue sometido a una inmunoprecipitación con el fin de retirar el exceso de inmunoglobulinas tipo G (IgG) por medio de esferas de sefarosa unidas a proteína A (Affi-Gel Proteína A™, Bio Rad). Para este procedimiento se colocó 1ml de suero del día 70 de burra gestante con 20 µl de Affi-gel Proteína A. Esta mezcla se dejó en agitación constante, a una temperatura de 4°C, durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 6,000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se dializó.

7.3.1.2 DIÁLISIS DEL SUERO

La diálisis del sobrenadante de la precipitación se realizó con el objetivo de separar proteínas séricas pequeñas así como facilitar la formación de micelas de lipoproteínas.

Para este procedimiento se tomó el sobrenadante que resultó de la centrifugación y se colocó dentro de bolsas de diálisis de 4 centímetros, formada por una membrana de celulosa que tiene un volumen de 1.1 ml/cm, para proteínas menores de 3.5 kDa (Spectra/Por® #3). Para esto, la bolsa de diálisis se hirvió con 500ml de agua destilada dentro de un vaso de precipitado, quitándole de esta manera, las trazas de glicerina, favoreciendo su hidratación. Con un hilo cáñamo se ató un extremo de la bolsa y se colocó el total del sobrenadante obtenido de la inmunoprecipitación, para posteriormente atar el otro extremo. La bolsa de diálisis con la muestra de suero se dejó en agitación constante, en agua destilada, a 4°C, durante toda la noche.

7.3.1.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS

Debido a que el suero se considera una mezcla compleja de proteínas, se decidió evaluar la disminución de estas en el suero previamente inmunoprecipitado y dializado, por medio de la técnica de Bradford en placa. Para esto se utilizó BSA (Protein standard BSA, SIGMA) para realizar una curva estándar que nos permitiera cuantificar concentraciones de 20µg, 15µg, 10µg, 5µg y 2µg.

Esta curva se colocó en una placa de fondo plano de 96 pozos en donde a cada pozo se le agregó 10µl de la muestra y se completó con 200µl de reactivo de Bradford 200µl (Quick Start™ Bradford ProteinAssay, Bio Rad), esto se realizó por triplicado.

Se homogenizó el contenido y después de 5 minutos se llevó a leer a un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda. Esta técnica se realizó antes de todas las cromatografías.

7.3.1.4 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUERO CON SULFATO DE AMONIO

La precipitación de proteínas del suero con sulfato de amonio se realizó con la intención de realizar una separación selectiva de las proteínas por medio de la adición de sales, para hacer un aislamiento de acuerdo a las características de solubilidad de las proteínas de interés.

Se probaron diferentes porcentajes de saturación: 20%, 40%, 60%, 80%. Para esto se preparó un stock de sulfato de amonio (ANEXO). Se le agregó 80, 60, 40 y 20 μ l de suero de burra gestante, respectivamente, para dejarlo interactuando con el sulfato de amonio toda la noche.

Pasando el tiempo de interacción, se centrifugó la mezcla a 14, 000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, obteniendo pellets y sobrenadante de cada uno de los diferentes porcentajes de saturación. Al pellet de cada tubo, se le agregó 500 μ l de PBS 1X para su reconstitución mientras que el sobrenadante se utilizó completo.

Ya preparado los sobrenadantes y los pellets, se prosiguió con la diálisis, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito.

Ya dializadas las muestras, se realizó una segunda centrifugación a 10,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Al sobrenadante y el pellet se les realizó un SDS-PAGE y un WB para detectar la presencia de la dCG en las muestras precipitadas.

7.3.1.5 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Al no obtener resultados favorables con la precipitación con sulfato de amonio, se continuó trabajando con suero inmunoprecipitado y dializado para seguir disminuyendo la carga proteica de este.

Se utilizaron diferentes tipos de cromatografía líquida rápida de proteínas con el uso del sistema ÄKTA FPLC comenzando con una columna de afinidad (HiTrap Blue HP™, 1ml, GE).

Se equilibró la columna en el sistema ÄKTA FPLC con 5 volúmenes de columna (CV) de buffer de unión (BB) el cual está compuesto por 50 mM de KH₂PO₄ en un pH de 7 (ANEXO). Posteriormente se inyectó la muestra, con un rango de flujo de 1 ml/min, añadiendo 1 ml de suero previamente tratado (inmunoprecipitado y dializado) y homogenizado con 4 ml de BB, esto con el fin de que las proteínas que tiene afinidad con los componentes de la columna, en este caso la albúmina, se quedaran pegadas y aquellas proteínas que no tienen afinidad por la columna, en este caso la subunidad β de la dCG, saliera en las fracciones que no tuvieron interacción con la columna. Ya que la muestra fue inyectada, se dejaron pasar otros 5 CV de BB para posteriormente comenzar la elusión, con un gradiente lineal de 0 a 100%, esto dejando pasar 10 CV de buffer de elución (EB), el cual está formado por 50 mM de KH₂PO₄ y 1.5M de KCl con un pH de 7 (ANEXO), esto con el fin de despegar aquellas proteínas que sí tuvieron interacción con la columna. Se obtuvieron fracciones de 1.5 ml cada una, las cuales se resolvieron en un SDS-PAGE al 10% para posteriormente verificar la presencia de la dCG subunidad β , una banda de 43 kDa aproximadamente (Murphy *et al*, 1991), por medio de un western blot.

7.3.1.6 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIONICO

Con el suero tratado de burra gestante, se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico, utilizando la columna HiTrap Cation Exchange chromatography column™, GE, en el sistema ÄKTA FPLC. Con 5 CV de BB se equilibró el sistema. Este BB está compuesto por 50 mM de acetato de sodio, pH 5. Después se inyectó al sistema 1ml de suero tratado y mezclado con 4 ml de BB. Ya que la muestra se inyectó, con un rango de flujo de 1 ml/min, se pasaron otros 5 CV de BB para continuar con la elusión el cual se realizó en un gradiente lineal de 0 a 100%, dejando pasar 10 CV de EB compuesto por 50 mM de acetato de sodio y 1M de NaCl, pH 5. (ANEXO)

Se obtuvieron fracciones de 1.5 ml cada una, las cuales se resolvieron en un SDS-PAGE al 10% para posteriormente identificar la dCG subunidad β por medio de un western blot.

7.3.1.7 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

A partir del suero con tratamiento previo, se realizó la cromatografía de intercambio aniónico. Se utilizó la columna HiTrap Capto Q anion Exchange chromatography column™, GE en el sistema ÄKTA FPLC con 5 CV de BB el cual está compuesto por 20mM Tris-HCL con pH 8.5 (ANEXO). Posteriormente se inyectó la muestra formada por 1ml de suero previamente tratado y homogenizado con 4 ml de BB. Ya que la muestra fue inyectada, con un rango de flujo de 1ml/min, se pasaron otros 5 CV de BB para posteriormente comenzar la elusión, con un gradiente lineal de 0 a 100%, esto dejando pasar 10 CV de EB, el cual está formado por 1M de NaCL (ANEXO). Se obtuvieron fracciones de 1.5 ml cada una, las cuales se resolvieron en un SDS-PAGE al 10% para posteriormente identificar la dCG subunidad β por medio de un western blot.

8. RESULTADOS

8.1.1 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUEPRO POLICLONAL ANTI-eCG

8.1.2 SDS-PAGE Y WB DE eCG COMERCIAL

Se pudo observar en la electroforesis de la eCG comercial teñidas con azul de Coomasie, 4 bandas evidentes, entre la que se encontraba una banda franca en un peso aproximado de 40 kDa (FIGURA1) lo que sugiere la presencia de la subunidad β de la eCG. Se prosiguió a enfrentarlo al anticuerpo anti LH subunidad β ovina para corroborar el reconocimiento de la subunidad β en la eCG (FIGURA1) observando señal de quimioluminiscencia en una banda de aproximadamente 43 kDa. Por lo que se decidió utilizar este producto, para la producción del anticuerpo anti-eCG y anti-eCG subunidad β , así como para control positivo de los ensayos posteriores.

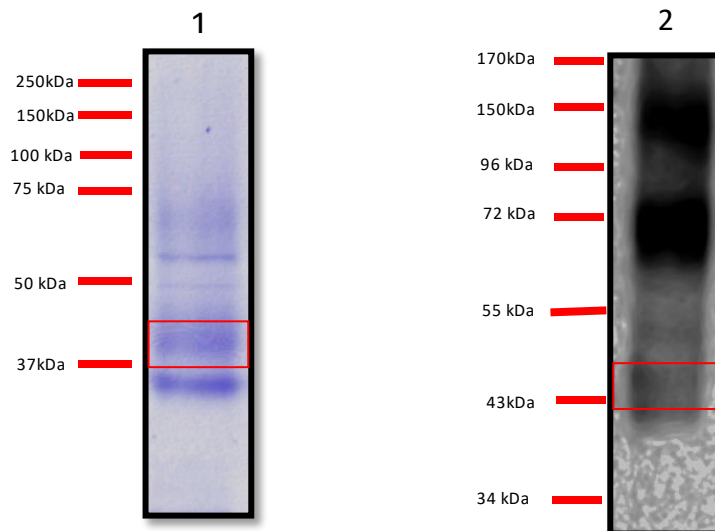


Figura 1. SDS-PAGE 10% (1) y WB (2) de la eCG comercial, donde se observa la presencia de bandas francas a partir de un peso molecular de 75 kDa, siendo la banda de 43 kDa evidente, tanto en el gel como en el WB, sugiriendo la presencia de la subunidad β de la hormona.

8.1.2 TÍTULOS DE ANTICUERPOS PRODUCIDOS ANTI-ECG EN EL SUERO DE CONEJO

Para el monitoreo de la producción de anticuerpo anti-eCG, la técnica de ELISA demostró un aumento en las densidades ópticas (OD) sugerentes a la presencia de anticuerpos contra la hormona (FIGURA 2).

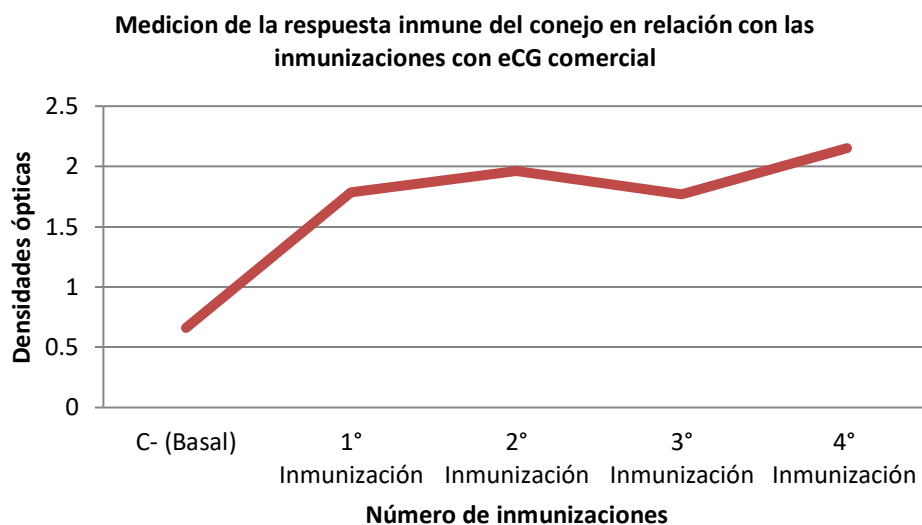


Figura 2. Incremento de los títulos de anticuerpos producidos, durante las 4 inmunizaciones realizadas.

8.2 CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDA DE ANTICUERPOS EN SUERO DE ÉQUIDOS

8.2.1 DETECCIÓN DE LA eCG Y dCG EN SUEROS DE HEMBRAS GESTANTES POR MEDIO WB Y ELISA CON ANTICUERPOS ANTI-eCG Y ANTI- eCG SUBUNIDAD β

8.2.1.1 SDS-PAGE Y WB

En el gel de electroforesis de suero del día 70 de burras gestantes se observó la misma banda sugerente a la subunidad β de la hormona en 43kDa, confirmando la presencia de la hormona por medio del WB, utilizando el anticuerpo anti eCG (FIGURA 3).

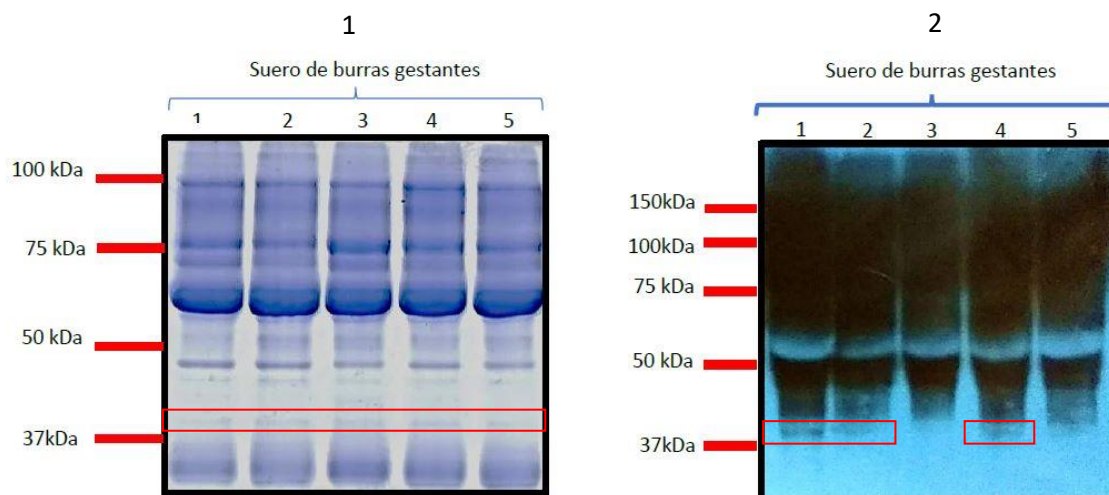


Figura 3. SDS- PAGE al 10% (1) y WB (2) de sueros de burras (cada carril corresponde a una burra) al día 70 de gestación, previamente tratado con inmunoprecipitación y diálisis, en donde se observa una carga importante de proteínas sérica, teniendo en la línea 1, 2 y 4 del WB, una banda con peso sugerente a la de la dCG.

Para probar la eficiencia del anti eCG subunidad β , se realizó un WB utilizando el suero de burra número 1, la cual tuvo una mayor detección de dCG en suero. Se pudo detectar una banda de un peso aproximado de 40kDa, confirmando la presencia de la subunidad β en el suero de burras y la adecuada detección de la subunidad por parte del anticuerpo producido (FIGURA 4).

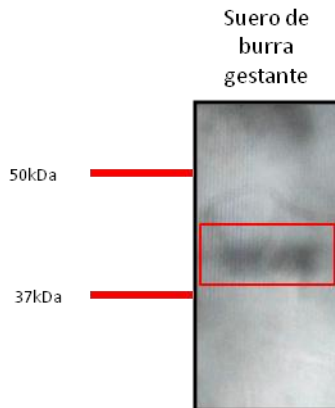


Figura 4. WB de suero de burra gestante enfrentado con anticuerpo anti eCG subunidad β donde se observa una banda franca en un peso aproximado de 40kDa, sugerente a la subunidad β de la dCG.

8.2.1.2 ELISA TIPO SANDWICH

Se comenzó determinando el factor de dilución, el cual mostró una detección adecuada de la eCG comercial, donde se observó que el factor de dilución 1/5,000 daba señal hasta con 0.003 μg de eCG comercial, por lo cual se decidió dejar esa dilución para manejar el anticuerpo anti eCG (FIGURA 5).

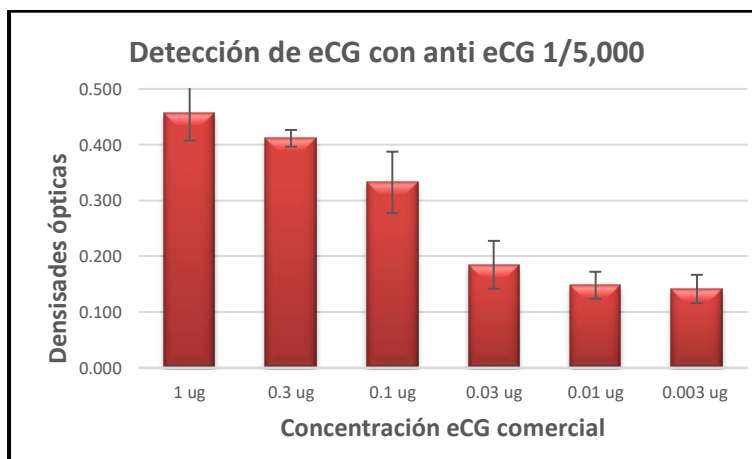


Figura 5. Con el factor de dilución 1/5,000 del anticuerpo anti eCG se tuvo la capacidad de detectar hasta 0.003ug de gonadotropina coriónica equina comercial

De igual forma se observó que el anticuerpo anti eCG seguía reconociendo a la hormona en suero del día 70 de burra gestante, con una dilución de hasta 1/ 1, 000, 000, lo que indicó que el anticuerpo anti eCG tenía alta sensibilidad (FIGURA 6).

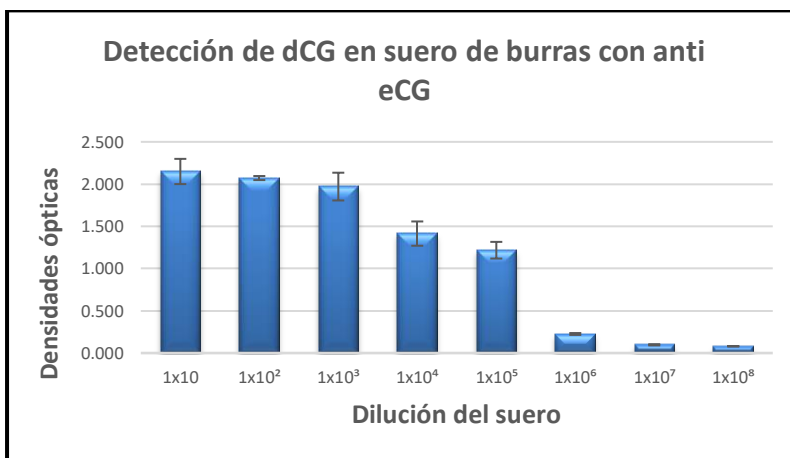
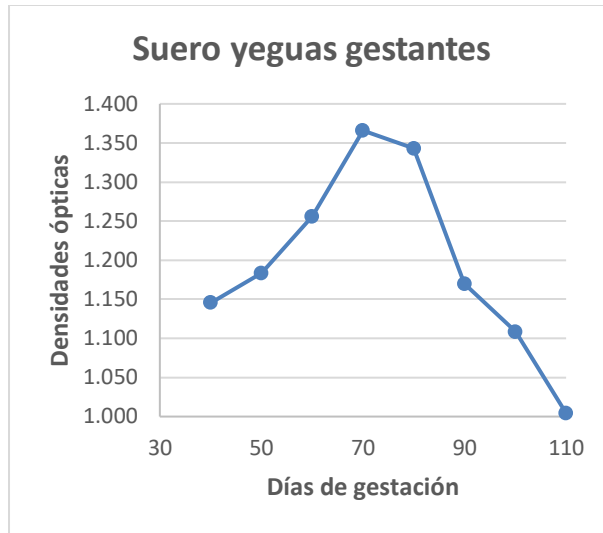


Figura 6. El anticuerpo anti eCG pudo detectar las dCG con una dilución sérica de hasta 1/1, 000, 000, reflejando una buena sensibilidad en la técnica de ELISA.

Posteriormente y de acuerdo con los resultados obtenidos, se utilizó el anticuerpo anti eCG a la dilución ya estandarizada, con pool de suero de yeguas y de burras gestantes durante diferentes días de gestación para garantizar el reconocimiento tanto de la eCG como de la dCG y poder observar el patrón de secreción de la hormona. Se pudo observar que la tendencia de secreción de la eCG y dCG fue similar entre ambas gestaciones con un pico de producción en el día 70 de gestación (FIGURA 7).

1



2

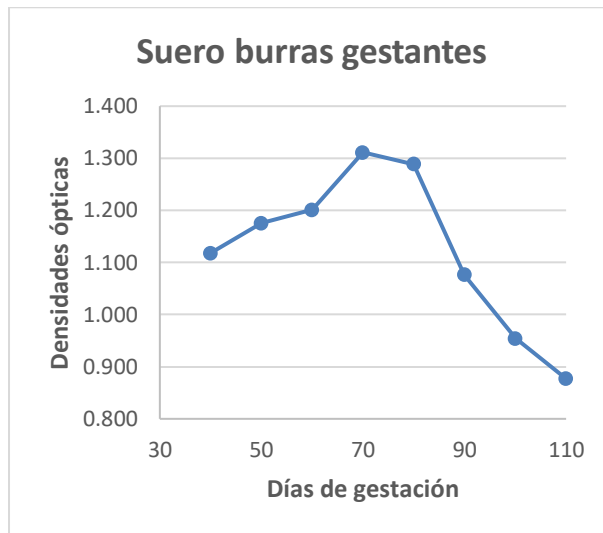


Figura 7. Densidades ópticas de la tendencia de secreción hormonal obtenido de suero de yeguas (1) y burras (2) gestantes entre los días 40 y 110 de gestación, detectando a la dCG con él anticuerpo anti eCG.

8.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO DE BURRA GESTANTE PARA LA PURIFICACIÓN DE LA dCG

8.3.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS

En el proceso de pre purificación con la técnica de inmunoprecipitación y diálisis, se observó que la concentración de proteína por microlitro disminuyó. Las cuantificaciones del Bradford mostraron resultados de 6.59 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con suero tratado mientras que la concentración de suero completo demostró una concentración de 16.192 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (CUADRO 1), por lo que la disminución de proteínas inespecíficas fue satisfactorio con las técnicas previas.

Cuadro 1. Diferencia en la carga proteica entre el suero tratado con inmunoprecipitación y dializado comparada con la carga proteica del suero completo, demostrando la eficiencia del tratamiento previo para reducir concentración de otras proteínas séricas.

Concentración de proteína en suero completo en μg	Concentración de proteína en suero tratado en μg
16.19	6.59

8.3.2 PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICAS CON SULFATO DE AMONIO

En el caso de la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, se pudo ver en las diferentes concentraciones de saturación, bandas distribuidas en el SDS-PAGE las cuales, al ser enfrentadas al WB (FIGURA 8), en ningún porcentaje de saturación se pudo observar una banda sugerente a la dCG, por lo que quedó descartada esta técnica para la purificación de la hormona.

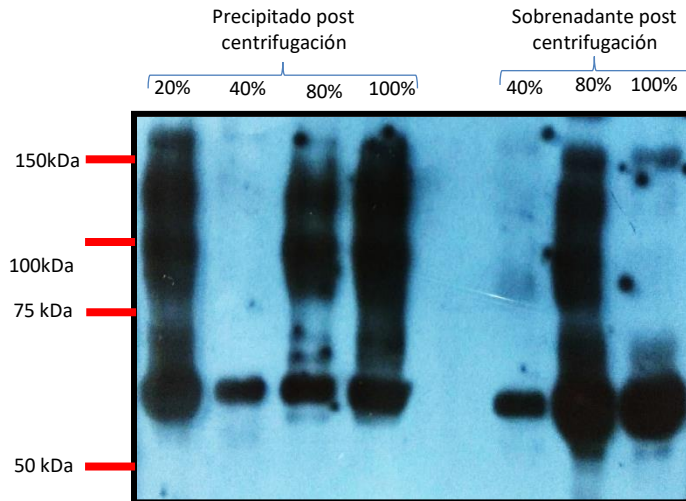


Figura 8. WB de muestra de suero de burra gestante al día 70 con diferentes concentraciones de saturación para la precipitación con sulfato de amonio donde no se observa una banda en el peso sugerente a la dCG.

8.3.3 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (HiTrap Blue HP 1ml)

En esta cromatografía fueron evidentes dos picos de detección de proteína, el primero fue de aquellas proteínas que no tuvieron interacción con la columna, y el segundo pico de aquellas proteínas que tenían afinidad con la matriz y que fueron eluidas (FIGURA 9) siendo notorio un pico más prominente en aquellas fracciones eluidas, sugiriendo la presencia de albumina. En el WB no se observó la presencia de la dCG en ninguna de las fracciones (FIGURA 10).

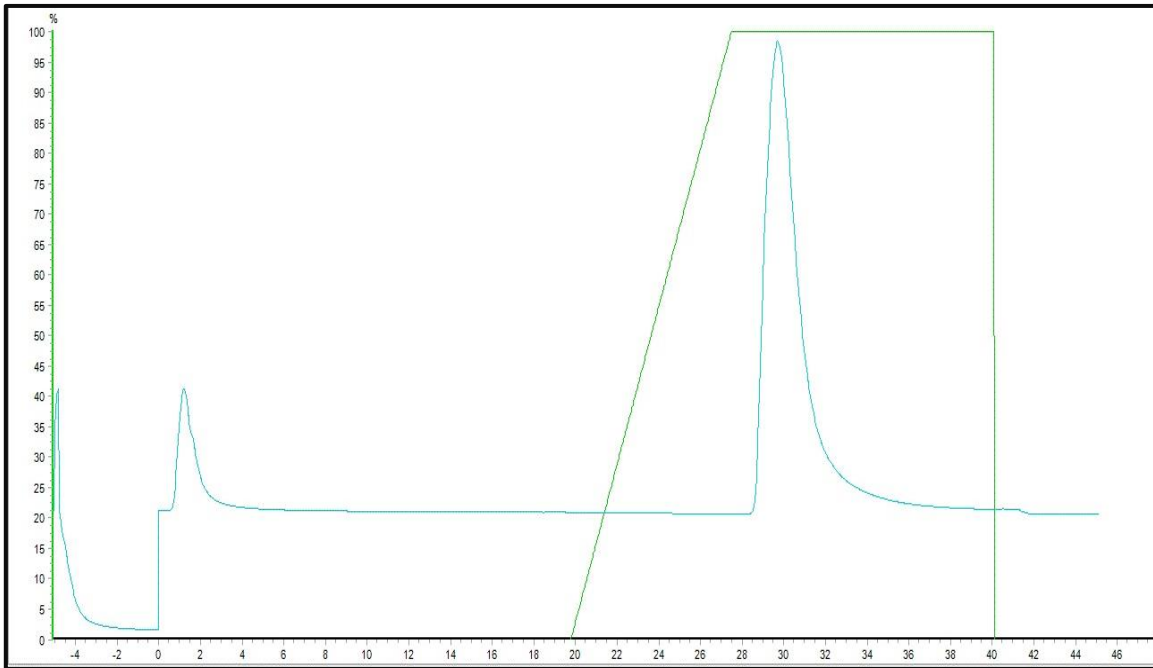


Figura 9. Cromatografía de afinidad de suero tratado de burra gestante al día 70. En el cromatograma se pudieron observar dos picos, uno en la primera fase del fraccionamiento y el segundo y más evidente en las fracciones eluidas. Eje X: Porcentaje de detección de proteínas por UV; eje Y: tiempo transcurrido en la cromatografía.

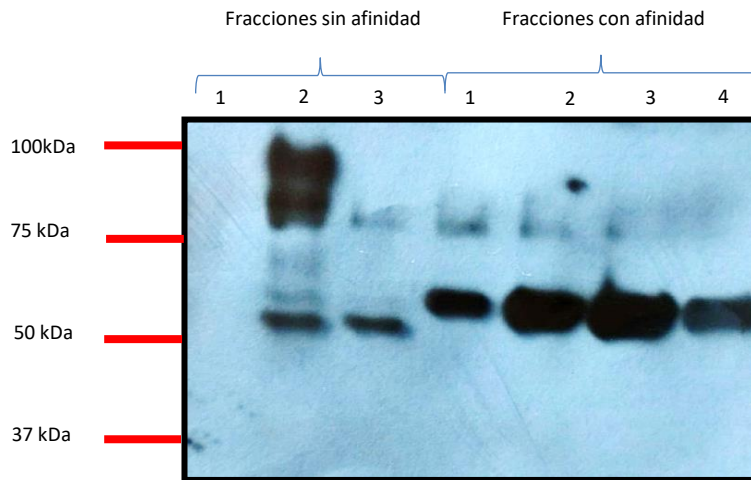


Figura 10. WB de fracciones obtenidas a través de la cromatografía de afinidad con la columna HiTrap Blue HP, en donde se muestra alto contenido proteico en las fracciones que tuvieron afinidad con la columna, sugerentes a la albúmina sérica, sin embargo, en ninguna fracción se observan bandas sugerentes a la dCG.

8.3.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

En la cromatografía de intercambio catiónico la mayor cantidad de proteína se detectó en las primeras fracciones, las cuales son aquellas que no tuvieron interacción con la columna. La cantidad de proteínas obtenidas en las fracciones eluidas fueron menores, por lo que se asume que las proteínas que interactuaron con la columna fueron pocas (FIGURA 11).

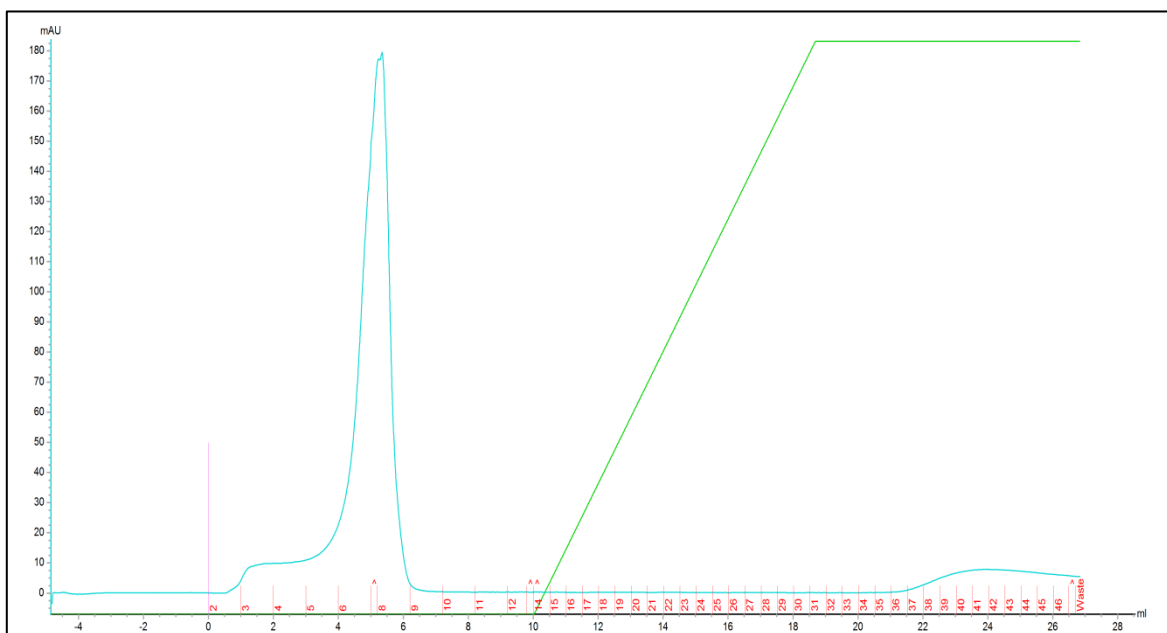


Figura 11. Cromatografía de intercambio catiónico de suero de burra gestante al día 70 tratado. En el cromatograma se pudieron observar dos lecturas, en la primera fase del fraccionamiento un pico muy evidente y la segunda una lectura muy tenue en fracciones eluidas. Eje X: Porcentaje de detección de proteínas por UV; eje Y: tiempo transcurrido en la cromatografía.

Con las fracciones obtenidas se realizó un SDS-PAGE al 10% y un WB en donde no se observaron bandas en el peso reportado de la dCG, por lo que se descartó esta técnica de cromatografía para la purificación de la dCG y se continuó con la cromatografía de intercambio aniónico (FIGURA 12).

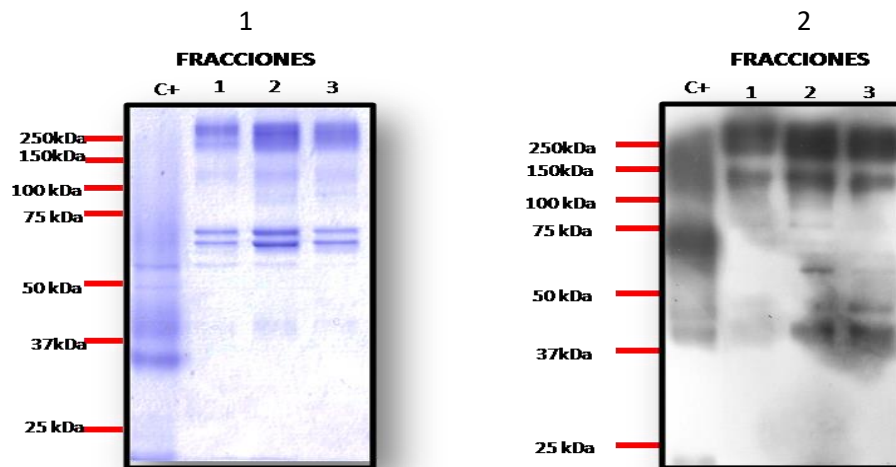


Figura 12. SDS-PAGE al 10% (1) y WB (2) de fracciones obtenidas en la primera fase de la cromatografía de intercambio catiónico. No es evidente la banda de 43 kDa en ninguna de las 2 técnicas.

8.3.5 CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Se observaron dos lecturas de detección de proteína. El primero fue en la fase de inyección, las cuales no interactuaron con la columna y tuvieron carga positiva. (FIGURA 13). En el SDS-PAGE de estas fracciones se pudieron observar algunas bandas tenues en diferentes pesos moleculares, pero no se encontró una banda franca en el peso de 43kDa en donde se había podido visualizar a la subunidad β de la dCG. (FIGURA 14), sin embargo, en la técnica de WB se pudo detectar señal intensa de bandas de peso sugerente a la dCG, por lo que se pudo deducir que se encontraba en la primera fracción de la cromatografía (FIGURA 14).

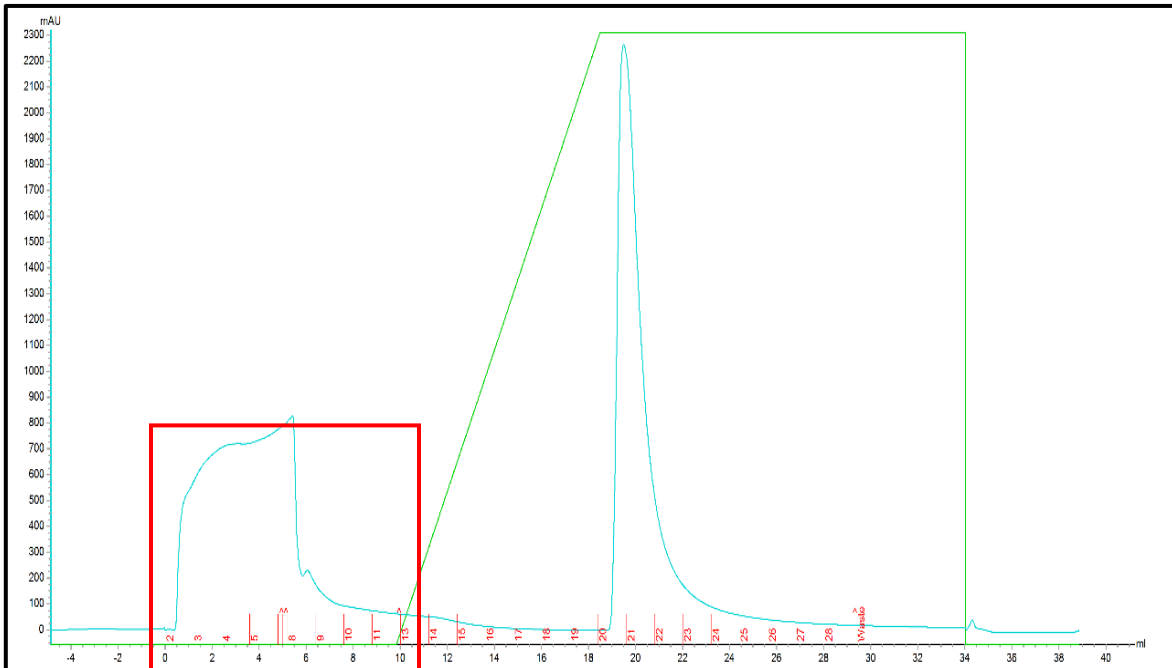


Figura 13. Cromatografía de intercambio aniónico de suero de burra gestante al día 70 tratado. En el cromatograma se pudieron observar dos lecturas, en la primera fase del fraccionamiento y la segunda y más evidente en las fracciones eluidas. Eje X: Porcentaje de detección de proteínas por UV; eje Y: tiempo transcurrido en la cromatografía.

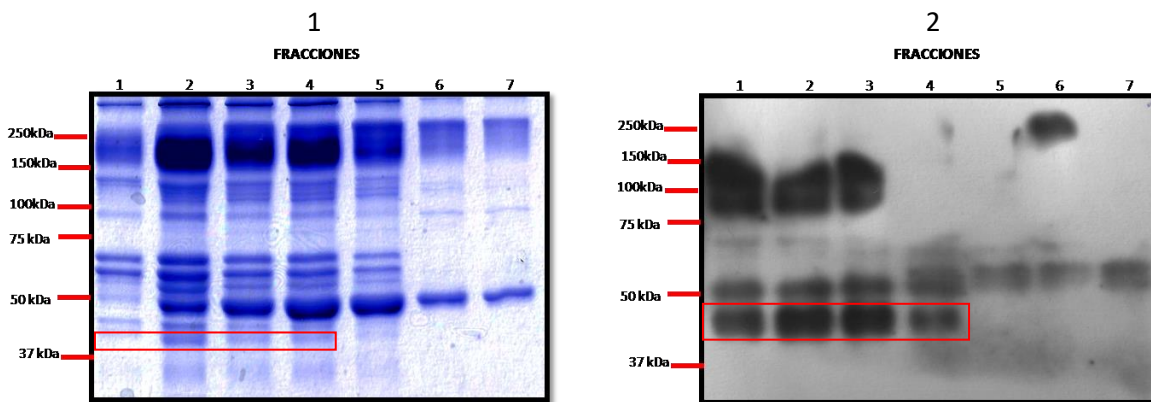


Figura 14. SDS-PAGE al 10% (1) y WB (2) de fracciones obtenidas en la primera fase de la cromatografía de intercambio aniónico. A pesar que en el gel de electroforesis no es evidente la presencia de una banda en el peso sugerente a la dCG, en el WB hubo señal suficiente para confirmar la presencia de la hormona en la primera fase de la cromatografía

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se produjeron, por medio de inmunización de eCG a conejos, dos anticuerpos: un anti eCG y un anti eCG subunidad β , estos con la capacidad de detectar a la gonadotropina coriónica de burra, por medio de las técnicas de Western Blot y ELISA.

9.1 PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO ANIT eCG Y ANTI eCG SUBUNUDAD β

Se pudo determinar, por medio de un SDS-PAGE y un WB, que el grado de pureza del Folligon® no era total, ya que en ambas técnicas se observó una distribución de bandas en diferentes pesos moleculares, a pesar que se esperaban únicamente dos bandas correspondientes a la subunidad α y β , sin embargo, entre las que se detectaron se identificó una en un peso molecular aproximado de 43kDa que coincide con el peso molecular de la subunidad β (FIGURA 1) reportada por Christakos Y Bahl en 1979. Debido a que el origen de la eCG comercial es de suero de yeguas gestantes, existen diversos métodos de purificación de la gonadotropina coriónica los cuales se enfocan en disminuir la cantidad de proteínas séricas y no precisamente de aislar a la hormona, por lo que no existe un protocolo establecido de purificación donde esta hormona obtenga un grado de pureza mayor al 90% (Drenckhahn *et al*,1993; Müller, et al, 2007,) sin embargo, a pesar de que la eCG comercial, en este caso el FOLLIGON®, no es completamente puro, es suficiente para utilizarlo de inmunógeno, ya que se pudo observar un incremento en los anticuerpos producidos en la coneja que reconocieron a la eCG comercial (FIGURA 2).

Debido a que no se pudo purificar la dCG de una manera completa, la validación de los anticuerpos no se llevo a cabo de acuerdo a las variables requeridas, por lo que queda como prospectiva dentro de la línea de investigación.

Se pudo corroborar que la técnica del aislamiento de la proteína por medio de un SDS-PAGE arrojó buenos resultados observando un aumento de la especificidad del anticuerpo anti eCG subunidad β , ya que al no tener una proteína con una pureza alta, esta técnica facilitó el aislamiento de la proteína deseada, sin tener que inocular otras proteínas. Descrita anteriormente por Tracy *et al*, en 1983 y Drenckhahn *et al* en 1993, esta técnica es económica y sencilla, pudiendo ser una estrategia adecuada para la producción de anticuerpos capaces de detectar hormonas de origen proteico.

9.2 CONSTATACIÓN DE FUNCIONALIDAD DE ANTICUERPOS PRODUCIDOS PROBADOS EN LA DETECCIÓN DE eCG y dCG EN SUEROS DE ÉQUIDOS

En la electroforesis de las cinco muestras de suero de burras gestantes se observó una banda de aproximadamente 40 KDa sugerente a la subunidad β de la gonadotropina. En el WB se utilizó el anticuerpo anti eCG, detectando señal en la banda de 40 kDa, más evidente en la muestra 1 y 4 (FIGURA 3). Similar fue la banda detectada en el WB de suero de burra gestante donde se utilizó el anticuerpo anti eCG subunidad β , observando banda en el peso aproximado de 40 kDa, sugerente a la subunidad β de la dCG, en donde se demostró la especificidad del anticuerpo producido al dar señal en una sola banda de la muestra. La detección se realizó por burra, por medio de la técnica de WB (Figura 3), observando que algunas de ellas reflejaban mayor cantidad de hormona en el día 70 de gestación que otras, demostrando que las concentraciones de gonadotropina dependen tanto de la especie de équido como del individuo, coincidiendo con lo antes reportado por el equipo del Dr. Allen en el 2002. También se ha mencionado que existen hembras con mayor concentración de GC y mayor desarrollo de copas endometriales que otras hembras, aun siendo de la misma especie (Allen *et al*, 1993).

La técnica de ELISA previamente estandarizada, utilizando el anticuerpo anti eCG, detectó eCG y dCG en gestaciones de burras y yeguas, demostrando un patrón de secreción previamente descrito por Allen en sus diferentes estudios (Allen *et al*, 1993; Allen *et al*, 1995; Allen *et al*, 2002) coincidiendo en un incremento de estas hormonas desde el día 40, teniendo un pico de máxima producción en el día 70 y disminuyendo hasta el día 110 de gestación. De acuerdo a las densidades ópticas (OD) (FIGURA 7) se pudo determinar que las gestaciones de yeguas tienen mayores densidades ópticas que las gestaciones de burra, lo que coincide con lo reportado (Stewart y Allen, 1981; Allen *et al*, 1993; Allen *et al*, 2001), en donde la concentración de eCG es mayor en comparación con la dCG esto debido a que la formación normal de las copas endometriales en burras es menor que las formadas en gestaciones de caballo, esto ocasionado por la poca invasión que el trofoblasto desarrolla hacia el endometrio de la madre, así como también por la reacción inmune en contra de las copas endometriales, específicamente por células del trofoblasto de origen paterno, causado por el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I), que acelera el rechazo inmunológico contra los antígenos paternos (Clegg *et al*, 1954; Koets, 2011; Wilsher *et al*, 2011,).

Las concentraciones reportadas en la literatura se encuentran en un rango de 90 a 140 UI en gestaciones equinas y de 40 a 60 UI en gestaciones de burras (Allen *et al*, 1995) sin embargo, en el caso de la ELISA indirecta no se determinaron las concentraciones de dCG ya que no existe un estándar de esta hormona que contenga una concentración conocida que nos permita comparar la medición de la dCG en suero, por lo que únicamente se pudo detectar la dCG por medio de WB.

9.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO DE BURRA GESTANTE PARA LA PURIFICACIÓN DE LA dCG

El suero es una muestra compleja de proteínas, en donde las más abundantes son albúmina e inmunoglobulinas tipo G (IgG), correspondiendo a un 70% de proteínas totales (Sullivan *et al*, 2005) por lo cual, la preparación de la muestra de suero de burra gestante por las diferentes técnicas era indispensable para asegurar una adecuada pre purificación de la dCG.

Utilizando la técnica de inmunoprecipitación y precipitación de proteínas con sulfato de amonio, se disminuyeron las IgG's presentes en el suero de burras gestantes (Björck y Kronvall, 1984; Wingfield, 1998; Sharifi *et al*, 2014,) y aunado a la técnica de diálisis (Zumstein *et al*, 2001), la cantidad de proteínas detectadas por medio de la técnica de Bradford, demostró una pérdida de más de la mitad de proteínas inespecíficas, presentes en la muestra original (CUADRO 1).

En la cromatografía de afinidad con la columna HiTrap Blue HP de 1ml® (FIGURA 9), el segundo pico observado demostró la separación de la albúmina presente en el suero que se detectó en los eluatos por medio de la técnica de WB en donde se observaron bandas francas de un peso aproximado a 60 kDa sugerentes a esta proteína. Esta técnica está recomendada para retirar albumina del suero (Squires *et al*, 2003), esto con el propósito que en la pre purificación de la hormona, exista la menor presencia de otras proteínas séricas, sin embargo, de acuerdo a las concentraciones bajas de dCG en suero (Aggarwal *et al*, 1980), no se pudo detectar esta hormona, en el WB, en ninguna de las fracciones.

De igual forma, en la cromatografía de intercambio aniónico se observó la presencia de proteína en las primeras fracciones obtenidas, sin observar picos (FIGURA 11). Debido a la muestra completa de suero y a la gran cantidad de proteínas que este tiene, se ha reportado una falla en la separación de la eCG, por una retención débil a la columna con buffers con pH básicos, esto por la presencia alta de ácido siálico de la eCG y por la asociación que otras glicoproteínas tienen entre sí, el cual exhibe propiedades físicas modificadas (González *et al*, 1998).

En las primeras fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico utilizando suero de burra gestante, se pudo distinguir la dCG, identificando bandas francas en un peso aproximado de 43 kDa (FIGURA 12). Este tipo de cromatografía ha sido utilizada como una técnica de prepurificación de eCG (González *et al*, 1998; Müller *et al*, 2007) sin embargo, en el caso de la dCG es la cromatografía de intercambio catiónico la que está reportada (Aggarwal *et al*, 1980) por lo que la presencia de bandas en las primeras fracciones nos indica que esta técnica puede ser utilizada de igual manera para la separación de la dCG, utilizando la metodología descrita.

En trabajos anteriores, fue la actividad biológica la que determinó la cantidad de dCG obtenida en la precipitación del suero y en las cromatografías (Aggarwal *et al*, 1980, Leigh *et al*, 1990), sin embargo, en el presente trabajo no se determinó actividad biológica, únicamente se detectó la hormona en las fracciones, por lo que no se obtuvieron valores que reflejaran la cantidad de hormona obtenida.

Se tiene reportado que, para la inmunización de conejos para la producción de anticuerpos policlonales, se debe de utilizar como mínimo 10µg de proteína (Harold *et al*, 2012), sin embargo, se determinó que la presencia de la banda sugerente a la dCG en suero de burras observada en el SDS-PAGE (FIGURA 14) no demostraba ser cantidad suficiente para ser utilizada en la inmunización (Aggarwal *et al*, 1980) por lo que únicamente se realizó la inmunización de las conejas para la producción de los anticuerpos anti eCG, utilizando proteína pura, y anti eCG subunidad β utilizando la banda sugerente a esta subunidad, observada en el SDS-PAGE del Folligon®.

Ya que la tecnología utilizada actualmente para la purificación de estas gonadotropinas se basa en principios descubiertos hace 70 años, se encuentran reducidas las alternativas para realizar este procedimiento (Sharifi *et al*, 2014) por lo que es indispensable buscar otras técnicas de purificación que mantengan las características conformacionales y funcionales de estas gonadotropinas (González *et al*, 1998) para que a partir de eso, se pueda continuar la investigación y ampliar la información acerca de estas hormonas y su interacción en la fisiología de la gestación en équidos.

10. CONCLUSIÓN

El anticuerpo producido anti eCG fue capaz de reconocer a la en suero de burras gestantes.

Con la producción del anticuerpo anti eCG subunidad β , se observó que la técnica de aislamiento de la proteína deseada a partir de un SDS-PAGE es adecuada para aumentar la especificidad de los anticuerpos producidos, disminuyendo la detección de otras proteínas séricas.

La baja concentración de dCG en suero de burras gestantes, limitaron la utilización de las técnicas de pre-purificación y aislamiento por medio de un SDS-PAGE para la producción de un anticuerpo anti dCG.

11. REFERENCIAS

Aggarwal B. B., Farmer W. S., Papkoff H., Stewart F., Allen W. R., Purification and characterization of donkey chorionic gonadotropin, *Journal of Endocrinology*, 1980, 85: 449-455.

Alexander L. S., Irvine G. H. C., *Equine Reproduction*, capítulo 168: FSH y LH, pp: 1619-1630, 2° edición, editorial Wiley-Blackwell, 2011.

Allen R. W., Skidmore A. J., Stewart F., Antczak F. D., Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids, *Journal of reproduction and fertility*, 1993, 97: 55-60.

Allen R. W., The physiology of early pregnancy in the mare, *Proceedings of the annual convention of the AAEP*, 2000, 46: 338- 354.

Allen R. W., Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy, *Reproduction*, 2001, 121: 513-527.

Allen R. W., Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare, *Animal reproduction*, 2005, 4: 209-223.

Allen W. R., Short R., Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes, *Journal of heredity*, 1995, 88: 384- 392.

Allen R. W., Wilsher S., A review of implantation and early placentation in the mare, *Placenta*, 2009, 30:1005-1015.

Allen R. W. Wilsher S., Stewart F., Ousey J., Fowden A., The influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. II. Endocrinology of pregnancy, *Journal of endocrinology*, 2002, 172: 237-246.

Antczak D. F., Mestre N. A., Wilsher S., Allen W. R., The equine endometrial cup reaction: a fetomaternal signal of significance, *Annual review of animal biosciences*, 2013, 1:8.1-8.24.

Ausubel M. F., Brent R., Kingston E. R., Moore D. D., Seidman G. J., Smith A. J., Struhl K., *Current protocols in molecular biology*, editorial John Wiley & Sons, Inc, 2003.

Aydin S., A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides Journal*, 2015, 72: 4-15.

Björck L., Kronvall G., Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent, *The journal of immunology*, 1984, 133: 969-974.

Boeta M., Zarco L., Luteogenic and luteotropic effects of eCG during pregnancy in the mare, *Animal Reproduction Science*, 2012, 130: 57-62.

Carpenter W. James, *Exotic Animal Formulary*, capítulo 9: Conejos, pp: 563, 4° edición, editorial, Elsevier, 2013.

Christakos S., Bahl P. O., Pregnant Mare Serum Gonadotropin, *The journal of biology chemistry*, 1979, 25: 4256-4261.

Choi J., Smitz J., Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 383: 203-213.

Chopineau M., Martinat N., Troispoux C., Marichatou H., Combarous Y., Stewart F., Guillou F., Expression of horse and donkey LH in COS-7 cells: evidence for low FSH activity in donkey LH compared with horse LH, *Journal of endocrinology*, 1997, 153: 371-377.

Clegg T. M., Boda M. J., Cole H. H., The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin, *The endocrine society*, 1954, 54: 448-463.

Drenckhahn D., Jöns T., Schmitz F., Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides, *Methods in Cell Biology*, 1993, 37: 7-56.

Ezcurra D., Humaidan P., A review of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropina when used in assisted reproductive technology, 2014, 95:1-12.

Fujiki Y., Rathnam P., Saxena B.B., Amino acid sequence of the β -subunit of the follicle – stimulating hormone from equine pituitary glands, *The journal of biological chemistry*, 1978, 10: 5363-5368.

Gallagher S. R., One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins, *current protocols in protein science*, 2012. 10.1.1-10.1.44.

Gan S. D., Patel K. R., Enzyme immunoassay ad enzyme-linjed immunosorbent assay, Jorunal of investigative dermatology, 2013, 133: 1-3.

Gigli I., Russo A., Agüero A., Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos, In Vet, 2006, 8:183-204.

Ginther O. J., Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus, AAEP Proceedings, 1998, 44: 73- 104.

Godsmith J. S., Radioimmunoassay: Review of basic principles, Seminars in nuclear medicine, Nueva York, USA, 1975, 5: 125- 152
Murphy D. B., Martinuk D. S., Equine chorionic gonadotropin, Endocrine Reviews, 1991, 12: 27- 44.

González G., Castro B., Massaldi H., Extraction of equine chorionic gonadotropin from pregnant mares plasma by direct adsorption on chromatographic media, biotechnology Biogen, 1998, 57: 22-25.

Jackowski G., Shi Q, Hames D. B., Gel electrophoresis of proteins, 3° edition, editorial PAS, 1998.

Jiang X., Dias A. J., He X, Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: Insights to signaling, Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 382: 424-451.

Koets, A. P., The equine endometrial cup reaction: a review, Veterinary Quarterly, 2011, 17:1, 21-29.

Kumar M., Singh R., Meena A., Partidar B. S., Prasad R., Chhabra S. K., Bansal S. K., An improved 2-dimensionl gel electrophoresis method for resolving human erythrocyte membrane proteins, Proteomics insihts, 2018, 8: 1-7.

Leão F. B. R., Esteves C. S., Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech, Clinics review, 2014, 69:279-293.

Leenaars M. A. P. P., Hendriksen M. F. C., Leeuw A. W., Carat F., Delahaut P., Fischer R., Halder M., Hanly C., Hartinger J., Hau J., Lindblad B. E., Nicklas W., Outschoorn M. I., Stewart-Tull S. E. D., The production of polyclonal antibodies in laboratory animal, ATLA, 1999, 27: 79-102.

Leigh A. E. S., Stewart F., Partial cDNA sequence for the donkey chorionic gonadotropin- β subunit suggest evolution from an ancestral LH- β , Journal of molecular endocrinology, 1990, 4: 143-150.

Maurel M. C., Ban E., Bidart J. M., Combarrous Y., Immunochemical study of equine chorionic gonadotropin (eCG/PMSG): antigenic determinants on α and β subunits, *Biochemical and Biophysical*, 1993, 1159: 74-80.

Medina Y., Carpio J. Producción de Anticuerpos Monoclonales. Memorias del XV Taller Internacional de Producción de Anticuerpos Monoclonales Contra Agentes Infecciosos y Otras Moléculas:17 al 28octubre2011, Ciudad de México, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, 2011: 53-67.

Mestre A. M., Bacon J. S., Costa C. C., Leadbeater C. J., Noronha E. L, Stewart F., Antczal F. D., Modeling trophoblast differentiation using equine chorionic girdle vesicles, *Placenta*, 2008, 29: 158-169.

Mestre A. M., Douglas F., W. R. Allen, *Equine reproduction*, capítulo 172, pp: 1648-1664, 2° edición, editorial Wiley-Blackwell, 2011.

Müller C., Heidenreich E., Franzreb M., Purification of equine chorionic gonadotropina (eCG) using magnetic ion exchange adsorbents in combination with high-gradient magnetic separation, *American institute of chemical engineers*, 2015, 31:78-89.

Murphy D. B., *Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool*, *Animal reproduction*, 2012, 3:223-230.

Pierce J. G., Parsons F. T., *Glycoprotein hormones: structure and function*, *Annual Reviews, Biological chemistry*, 1981, 50:465-495.

Pohanka Miroslav, *Monoclonal and polyclonal antibodies production -preparation of potent biorecognition element*, *Applied biomedicine*, 2009, 7: 115-121.

Raju R. A. G., Deendayal M., Gunasheela D., Gutgutia R., Haripriya G., Govindarjan M., Patel H. N., Patki S. A., *Luteinizing hormone and follicles stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation*, *Journal of human reproductive science*, 2013, 6:227-234.

Sharifi A. M., Kohram H., Shahneh Z. A., Zolfagharian, Kiasari A. B., Hedayati M., *Production and purification of equine chorionic gonadotropin hormone using polyclonal antibody*, *Journal biotech*, 2014, 12: 1-5.

Squires J. E., *Applied Animal Endocrinology*, Editorial CABI, Pp: 5-7, 2003.

Stewart F., Allen R. W., Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins, *Journal of reproduction of fertility*, 1981, 62: 527-536.

Stills F. Harold, Polyclonal antibody production, *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster and other rodents*, capítulo 11, pp 259-273, 2012.

Sullivan G., Russell S., Brzeski H., Somiari I. R., Shriver D. C., *The proteomics protocols handbook*, Capítulo 6, pp 49:54, Editorial Humana Press, 2005.

Tian W., Wang L., Lei H., Sun Y., Xiao Z., Antibody production and application for immunoassay development of environmental hormones: a review, *Chemical and biological technologies in agriculture*, 2018, 5:5.

Tracy P. R., Katzmann A. J., Kimlinger K. T., Hurst A. G., Young S. D., Developmental of monoclonal antibodies to proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Immunological methods*, 1983, 65: 97-107.

Viktor Y., Butnev R., Gotschall R. R., Baker L. V., Moore T. W., Bousfield R. G., Negative influence of o-linked oligosaccharides of high molecular weight equine chorionic gonadotropin on its luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptor-binding activities, *endocrinology* 1996, 137: 2530-2542.

Walker M. J., SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins, *The protein protocols handbook*, chapter 20, pp171-177, 3ª edición, editorial Humana Press, 2009.

Wingfield P., Protein precipitation using ammonium sulfate, *current protocols in protein science*, 1998.

Zumstein L., Titus A. J., Andrew M. S., Dialysis and concentration of protein solutions, *Current protocols in toxicology*, 2001.

12. ANEXOS

1.- PREPARACIÓN DE GEL DE POLIACRILAMIDA

Gel separador 10%

Para preparar	5 ml	10 ml
H ₂ O	2.0 ml	4.0 ml
30% Acrylamide mix	1.7 ml	3.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	2.5 ml
10% SDS	0.05 ml	0.1 ml
10% APS	0.05 ml	0.1 ml
TEMED	0.002 ml	0.004 ml

Gel concentrador

Para preparar	1 ml	2 ml
H ₂ O	0.68 ml	1.4 ml
30% Acrylamide mix	0.17 ml	0.33 ml
0.5 M Tris HCl (pH 6.8)	0.13 ml	0.25 ml
10% SDS	0.01 ml	0.02 ml
10% APS	0.01 ml	0.02 ml
TEMED	0.001 ml	0.002 ml

2.- SOLUCIÓN DESTEÑIDORA

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	50ml
Metanol	150ml
Agua destilada	80ml

3.- BUFFER DE TRANSFERENCIA

Reactivo	Cantidad
Tris base	4.8 g
Glicina	23 g
Metanol	320ml
SDS al 10%	100 μ l
Agua destilada	1.6 L

4.- PBS 10X, pH 7.4

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	87.7 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	150ml
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	13 g
Agua destilada	1L

PBS 1X, pH 7.4

Reactivo	Cantidad
PBS 10X	100ml
Agua destilada	900ml

5.- SOLUCIÓN DE BLOQUEO 5% (para preparar 10ml)

Reactivo	Cantidad
Leche en polvo descremada	0.5g
PBS 1X	9.5ml

6.- PBS-TWEEN 20 (0.1%)

Reactivo	Cantidad
Tween 20	1ml
PBS 1X pH 7.4	Cbp 1L

7.- SOLUCIÓN DE LAVADO PARA ELISA

Reactivo	Cantidad
PBS 1X	1L
Tween 20	500µl

8.- TMB ELISA

Reactivo	Cantidad
TMB	0.0025g
DMSO	250µl

Reactivo	Cantidad
Solución de citratos	12.5ml
TMB + DMSO	125µl
Peróxido de Hidrógeno 30%	2.5 µl

9.- SOLUCIÓN DE STOP PARA ELISA

Reactivo	Cantidad
Ácido hidrofúrico	5.20ml
NaOH 5.0 N	1.2ml
Agua desionizada	1 L

Ajustar pH a 4 con NaOH 5N

10.- SULFATO DE AMONIO SATURACIÓN 100%

Reactivo	Cantidad
Sulfato de amonio	380 g
Agua desionizada	500ml

11.-BINDING BUFFER COLUMNNA HITRAP BLUE

Reactivo	Cantidad
Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄ 50mM)	1.36 g
Agua desionizada	200ml

Ajustar pH a 7

12.- ELUTION BUFFER COLUMNNA HITRAP BLUEHP

Reactivo	Cantidad
Fosfato de Potasio monobásico (KH₂PO₄ 50mM)	1.36 g
Cloruro de Potasio (KCl 1.5M)	0.022 g
Agua desionizada	200ml

13.- BINDING BUFFER COLUMNNA INTERCAMBIO CATIONICO COLUMNNA CAPTO S

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio 50 mM	3.40 g
Agua desionizada	500ml

Calibrar pH a 5

14.-ELUTION BUFFER COLUMNA INTERCAMBIO CATIONICO COLUMNA CAPTO S

Reactivo	Cantidad
Acetato de sodio 50 mM	3.4 g
Cloruro de Sodio (NaCl 1M)	1.46 g
Agua desionizada	500ml

Calibrar pH a 5

15.- BINDING BUFFER COLUMNA INTERCAMBIO ANIONICO COLUMNA CAPTO Q

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 0.05M	3.94 g
EDTA 0.01M	1.86 g
Agua desionizada	500ml

Calibrar pH a 8.5

16.- ELUTION BUFFER COLUMNA INTERCAMBIO ANIONICO COLUMNA CAPTO Q

Reactivo	Cantidad
Tris-HCl 0.05M	3.94 g
Cloruro de Sodio (NaCl 1M)	11.68 g
Agua desionizada	200ml

Calibrar pH a 8