



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: Expresión recombinante de la hormona folículo estimulante
(FSH) bovina en glándulas mamarias de cabras transformadas**

AUTORA: BAUTISTA VEGA, VALERIA MONSERRAT

DIRECTORA: DRA. RAMOS GÓMEZ, THELVIA ISABEL, M.Sc.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) BOVINA EN GLÁNDULAS MAMARIAS DE CABRAS TRANSFORMADAS**” fue realizado por la señorita *Bautista Vega, Valeria Monserrat* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente..

Sangolquí, 17 de Enero de 2019



Dra. Thelvia Ramos

DIRECTORA

C.C 1753960028



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Bautista Vega, Valeria Monserrat*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *Expresión recombinante de la hormona folículo estimulante (FSH) bovina en glándulas mamarias de cabras transformadas* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz

Sangolquí, 17 de Enero de 2019

Valeria Bautista

VALERIA MONSERRAT BAUTISTA VEGA

C.C. 1722628946



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EXCEPCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, *Bautista Vega, Valeria Monserrat*, autor del trabajo de titulación: *Expresión recombinante de la hormona foliculo estimulante (FSH) bovina en glándulas mamarias de cabras transformadas* adjunto al presente remito mi solicitud que fue presentada al señor Tcrn. Enrique Abel Morales Moncayo, Vicerrector de Docencia Subrogante de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en la que consta la autorización para la no publicación temporal en el Repositorio Institucional del trabajo de titulación antes mencionado, razón por la cual se publicará dentro de 2 años.

Sangolquí, 17 de Enero de 2019

Valeria Bautista

VALERIA MONSERRAT BAUTISTA VEGA

C.C. 1722628946

DEDICATORIA

A mi familia, que con su amor y apoyo incondicional me ayudaron a alcanzar esta meta, que han sido la base de mi formación personal y profesional, quienes me han enseñado a luchar y salir victoriosa ante diversas adversidades.

Valeria Monserrat Bautista Vega

AGRADECIMIENTO

A mi familia por ser mi fortaleza en todo momento.

A mis amigos, por todas las vivencias, ocurrencias y cariño.

A mi directora de tesis, la Dra. Thelvia Ramos por ser una guía personal y profesional, permitiéndome desarrollar mis habilidades académicas y científicas.

Al Profesor Jorge Toledo, por abrirme las puertas y permitirme trabajar en su laboratorio, por ser una guía para la culminación de esta investigación.

A la Dra. Silvana Jiménez y Dra. Catherine Meza por transmitirme sus conocimientos, ser un apoyo y siempre tener una respuesta ante cualquier inquietud.

Al Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción por la apertura de sus instalaciones y permitirme llevar a cabo esta investigación.

Finalmente, a todos quienes han permanecido a mi lado a pesar del tiempo y la distancia.

Valeria Monserrat Bautista Vega

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
EXCEPCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema y antecedentes	1
1.2 Justificación del problema.....	6
1.3 Objetivos del proyecto	9
1.3.1 Objetivo general	9
1.3.2 Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO 2 MARCO TEÓRICO.....	10
1.1. Hormona folículo estimulante (FSH)	10

1.2.	Ciclo estral bovino	12
1.3.	Tecnología de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET).....	13
1.3.1.	Superovulación.....	14
1.4.	Vectores adenovirales	16
1.5.	Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	18
1.5.1.	Glándula mamaria como sistema de expresión de proteínas recombinantes .	19
1.6.	Purificación de proteínas.....	20
1.6.1.	Etiquetas de histidina	21
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA		22
1.	Generación de los adenovirus recombinantes	22
1.1.	Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6	23
1.2.	Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb	24
1.3.	Transformación de bacterias electrocompetentes	25
1.4.	Generación de los plásmidos recombinantes por recombinación homóloga .	26
1.5.	Transfección de plásmidos recombinantes adenovirales	27
2.	Amplificación de los virus recombinantes adenovirales (AdFSH-ST6 y AdFSH)	29
3.	Titulación de los vectores adenovirales	29
4.	Expresión de las variantes de FSH bovina en células SiHa	29
5.	Expresión de las variantes de FSH bovina en glándula mamaria de cabra	30
6.	Identificación de proteínas	31
6.1.	Precipitación de proteínas	31

6.2.	Extracción de suero de leche	31
6.3.	SDS-PAGE.....	31
6.4.	Electro transferencia de proteínas	32
6.5.	Inmuno identificación de proteínas	32
7.	Análisis del patrón de glicosilación y actividad folículo estimulante.	33
CAPÍTULO 4 RESULTADOS		34
1.	Generación de los adenovirus recombinantes	34
1.1.	Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6	35
1.2.	Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb	38
1.3.	Generación de plásmidos recombinantes por recombinación homóloga.	41
1.4.	Transfección de plásmidos recombinantes adenovirales.	46
2.	Amplificación de los vectores adenovirales AdFSHb-ST6 y AdFSHb	48
3.	Expresión de las variantes de FSH bovina en células SiHa	50
4.	Expresión de las variantes de FSH bovina en glándula mamaria de cabra	53
5.	Análisis del patrón de glicosilación y actividad folículo estimulante	54
CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN.....		57
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES		67
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA		69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción esquemática del patrón de secreción hormonal en el ciclo estral bovino..	13
Figura 2. Esquema del sistema AdEasy.....	18
Figura 3. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb-ST6.	35
Figura 4. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb-ST6.	36
Figura 5. Evaluación de transformantes con el plásmido pAdTrack FSHb-ST6.....	37
Figura 6. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb.	38
Figura 7. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb	39
Figura 8. Evaluación de transformantes con el plásmido pAdTrack FSHb.....	40
Figura 9. Linealización plásmidos pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb.	42
Figura 10. Plásmidos recombinantes pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb	43
Figura 11. Evaluación de recombinantes pAd Track FSHb-ST6.....	44
Figura 12. Evaluación de recombinantes pAdTrack FSHb.....	45
Figura 13. Análisis de restricción de plásmidos recombinantes	47
Figura 14. Generación de vectores adenovirales	48
Figura 15. Amplificación de AdFSH-ST6 y AdFSH en la línea celular HEK-293 A	49
Figura 16. Cultivo de células SiHa transducidas con AdFSH-ST6 y AdFSH.	51
Figura 17. Análisis de la expresión de FSHb-ST6 y FSHb en la línea celular SiHa transducidas con AdFSHb-ST6 y AdFSHb.....	52
Figura 18. Análisis de la expresión de FSHb-ST6 y FSHb en glándula mamaria de cabras transducidas con AdFSHb-ST6 y AdFSHb.....	54
Figura 19. Análisis de la purificación de FSHb con IMAC Sepharose High Performance	55

ABREVIATURAS

FSH	Hormona folículo estimulante (siglas en inglés)
ST6GAL1	Enzima β -galactósido- α 2,6-sialiltransferasa
ET	Transferencia de embriones (siglas en inglés)
AI	Inseminación artificial (siglas en inglés)
IVF	Fertilización <i>in vitro</i> (siglas en inglés)
LH	Hormona luteinizante (siglas en inglés)
eCG	Gonadotropina coriónica equina (siglas en inglés)
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (siglas en inglés)
hCG	Gonadotropina coriónica humana (siglas en inglés)
Asn	Asparagina
Thr	Treonina
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (siglas en inglés)
P4	Progesterona
E2	Estradiol
PGF	Prostaglandina F ₂ α
PVP	Polivinilpirrolidona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ad5	Adenovirus humano serotipo 5
E3	Región temprana 3 del Ad5
E1	Región temprana 1 del Ad5
CMV	Promotor de citomegalovirus
HEK-293 A	Células epiteliales de riñón embrionario humano que expresan constitutivamente el activador transcripcional E1 del Adenovirus humano serotipo 5

SiHa	Línea celular de carcinoma cérvico uterino
IMAC	Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (siglas en inglés)
UFC	Unidades formadoras de color
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Suero fetal bovino (siglas en inglés)
MOI	Multiplicidad de infección (siglas en inglés)
VP	Partículas virales (siglas en inglés)
IU	Unidades internacionales (siglas en inglés)
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico (siglas en inglés)
CMP-Neu5Ac	Ácido N-Acetilneuramínico Citidina Monofosfato
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (siglas en inglés)
AAV	Virus adeno-asociados (siglas en inglés)
HSV-1	Virus del herpes simple tipo 1 (siglas en inglés)
CAR	Receptor coxsackie adenovirus (siglas en inglés)

RESUMEN

La hormona folículo estimulante (FSH) bovina es principalmente usada para los tratamientos de superovulación. Se utiliza para que varios folículos subordinados puedan alcanzar un estado dominante a la vez y así, las vacas tratadas puedan liberar hasta diez o más óvulos en cada celo, disminuyendo el intervalo generacional y aumentando la producción de ganado. Las hormonas disponibles en el mercado actual son obtenidas en su mayoría a partir de extractos de hipófisis de ganado porcino y ovino, y a pesar de que son ampliamente utilizadas, se han reportado varios aspectos negativos, implicando altos riesgos de contaminación con patógenos, contaminación con otras hormonas que interfieren los procesos de fertilización asistida y variaciones importantes entre cada lote de producción. En este proyecto, se obtuvo una variante de FSH bovina, para uso en superovulación de vacas apta para reproducción. La secuencia de la enzima β -galactósido- α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1) fue incorporada al plásmido de expresión, lo que permitirá mantener la bioactividad de la FSH en circulación por un tiempo prolongado, a diferencia de la FSH nativa, simplificando los protocolos de administración, disminuyendo las dosis diarias a administrarse y facilitando el manejo en campo de los animales. Se utilizó la glándula mamaria de cabras para la expresión de la variante de FSH bovina mediante un vector adenoviral, permitiendo que la hormona sea secretada en leche.

PALABRAS CLAVE:

- FSH BOVINA
- ADENOVIRUS
- LECHE

ABSTRACT

Bovine follicle stimulating hormone (FSH) is the hormone mainly used for superovulation treatments. It is used so that several subordinate follicles can reach a dominant state at the same time and thus, treated cows can release up to ten or more ovules in each heat, decreasing the generational interval and increasing livestock production. The hormones available in the current market are obtained mostly from pituitary extracts of swine and sheep, and although they are widely used, several negative aspects have been reported, implying high risks of contamination with pathogens, contamination with other hormones that interfere with assisted fertilization processes and important variations between each production batch. In this project, a variant of bovine FSH has been obtained, for use in superovulation protocols of cows suitable for reproduction. The enzyme sequence β -galactoside- α 2,6-sialyltransferase (ST6GAL1) has been incorporated into the expression plasmid; these structural modifications will allow to maintain the FSH bioactivity in circulation for a long time, unlike the native FSH, simplifying the administration protocols, decreasing the daily doses to be administered and facilitating the field management of the animals. The mammary gland of transformed goats was used for the expression of the bovine FSH variant by means of an adenoviral expression vector, allowing the hormone to be secreted in milk.

KEY WORDS:

- BOVINE FSH
- ADENOVIRUS
- MILK

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema y antecedentes

El sector ganadero ha experimentado cambios a un ritmo muy acelerado en los últimos años debido a una mayor demanda de alimentos, lo que ocurre en los países en desarrollo principalmente por el crecimiento de la población (FAO, 2019). En estos países el consumo anual per cápita de carne y leche se ha doblado entre 1980 y 2015 (Desilver, 2016). Específicamente en Ecuador, se tiene un consumo per cápita de 11 kilogramos de productos del ganado vacuno, incrementando con los años (Barahona & Beillard, 2015). En este contexto, la creciente demanda por alimentos derivados de animales ha llevado a grandes aumentos en la producción ganadera, apoyada por importantes innovaciones tecnológicas.

Una de las estrategias para aumentar la producción y lograr un mejoramiento genético del ganado vacuno es el cruce con especies introducidas. Sin embargo, con esta estrategia, es necesaria la implementación de buenas prácticas para el manejo adaptativo de los bovinos como respuesta a las variaciones del clima para evitar consecuencias en la producción (Ecopar, 2013). Existen otros efectos negativos que pueden darse con los animales introducidos como la presencia de patógenos endémicos, además de los altos costos de transportación (Seidel & Seidel, 2004).

Por estos antecedentes, otra forma de lograr el incremento de la producción del ganado es mediante fertilización asistida, con el uso de biotecnologías reproductivas, resultando un mayor número de individuos en un menor tiempo. Dentro de las técnicas que se han desarrollado se encuentra la inseminación artificial (AI), la transferencia de embriones (ET), la manipulación de la fertilización y la producción de embriones *in vitro* (IVF) y las técnicas de multiplicación (clonación) para la aplicación de transgénesis. En los últimos años, se ha utilizado ET ya que, a comparación con las otras técnicas, los resultados se logran en un menor tiempo. Además, esta tecnología permite crear programas de producción más eficientes y de menor costo, con menos logística de transporte y un muy bajo riesgo de transmisión de enfermedades (Hopper, 2014).

ET es una técnica en la cual se extraen uno o más embriones del tracto reproductivo de una vaca donante y su posterior transferencia al lumen del oviducto o útero de hembras receptoras (Genzebu, 2015a). Se aplica para obtener un número máximo de embriones de un animal genéticamente superior en el menor tiempo posible y así maximizar el potencial genético en un rebaño obteniendo hembras o sementales de élite (Patel et al., 2018). Para esta estrategia se deben llevar a cabo diferentes pasos como selección de una vaca donadora, superovulación, inseminación, colección y evaluación de embriones, selección y preparación de hembras receptoras, transferencia de embriones y, finalmente evaluación de los resultados del trasplante de embriones (Hopper, 2014).

Dentro de los pasos previamente descritos se encuentra la superovulación, un tratamiento hormonal que emula los procesos reproductivos normales e induce el crecimiento folicular permitiendo recuperar un mayor número de ovocitos en la hembra bovina donante (C. Luo et al., 2011), siendo un procedimiento clave para maximizar la cantidad de embriones fertilizados con alta capacidad de producir preñez (Reuben J. Mapletoft & Bó, 2015). El principio básico de la superovulación es estimular el desarrollo folicular mediante la administración exógena de hormonas e inducir ovulación de varios folículos simultáneamente (Crowe & Mullen, 2013), las gonadotropinas utilizadas incluyen la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), extraídas de la glándula pituitaria de cerdos y ovejas (M. Hesser, Morris, & Gibbons, 2011), además de la gonadotropina coriónica equina (eCG), producida por las copas endometriales de yeguas preñadas (De Rensis & Lopez-Gatius, 2014).

La hormona más utilizada en la superovulación de ganado bovino es la FSH y, dado que proviene de la pituitaria de animales, puede estar contaminada con trazas de otras hormonas, lo que lleva a variaciones en la calidad y cantidad de los ovocitos. Varios autores mostraron que los productos de FSH con niveles bajos de LH mejoran la tasa de ovulación, la tasa de fertilización y la calidad de los embriones (Donaldson, 1985; Ferr, Bogliotti, Chitwood, Kjelland, & Ross, 2016). Kelly y colaboradores (1997) evaluaron el patrón de crecimiento folicular y el rendimiento de los embriones en el ganado bovino después de la superovulación con dos preparaciones de FSH comerciales que difieren en el contenido de LH (Serovet, FSH: LH relación 1: 1 y Vetrepharm, LH baja). Se observó un mayor número de ovulaciones en las vacas tratadas con Serovet (LH alta) en

comparación con Vetrepharm (LH baja), pero este aumento se debió principalmente a un mayor número de óvulos no fertilizados y embriones degenerados no aptos para la transferencia. Por lo tanto, la FSH con alta pureza o contenido reducido de LH se ha convertido en el método de elección de uso comercial para la producción de vacas superovulatorias.

Por otro lado, se ha visto que el uso repetido de hormonas exógenas para inducir la superovulación en diferentes especies podría inducir una respuesta inmune humoral (Carvalho et al., 2014), lo que fue evidenciado en un estudio en el que después de la superovulación con eCG, el ganado bovino presentó una respuesta inmune humoral en dosis repetidas (Baruselli et al., 2011), haciendo que estos tratamientos sean ineficaces con el tiempo debido a la producción de anticuerpos neutralizantes, reduciendo así la respuesta superestimulante.

Se comenzó a usar eCG como un tratamiento superovulatorio en vacas (M. W. Hesser, Morris, & Gibbons, 2011) debido a su larga vida media de 40 horas y una persistencia en circulación de hasta 10 días, siendo necesaria una dosis única para la respuesta superovulatoria (Sharif et al., 2014). Su persistencia en circulación se debe a la gran cantidad de sitios de glicosilaciones en su estructura, siendo la glucoproteína más glicosilada, cubriendo el 45% de su peso molecular (Murphy, 2012). Existen varios problemas asociados también con la acción prolongada de la eCG, incluida la estimulación continua de los ovarios, los folículos sin ovulación, los perfiles endocrinos anormales y la reducción de la calidad de los embriones (Ararooti, Niasari-Naslaji, Razavi, & Panahi, 2017). Además, se ha establecido claramente una mejor respuesta

superovulatoria después del tratamiento con FSH comparado con eCG (Boland, Goulding, & Roche, 1991). Por otro lado, debido al alto peso molecular de eCG, las vacas tratadas con esta molécula presentan un mayor porcentaje de quistes ováricos (40%) en relación con el tratamiento de FSH (8%) (Añazco & Vinueza, 2017). La causa principal de pérdidas económicas y problemas reproductivos son atribuidos a la presencia de estos quistes, además de causar perfiles hormonales anormales y baja calidad embrionaria (Capallejas & Rodríguez, 2009).

Dado que la vida media de la FSH es corta, siendo solo de 5 horas (Bó & Mapletoft, 2014), se la debe administrar dos veces al día, teniendo limitaciones en campo incluido el manejo excesivo de vacas donantes causando estrés y una respuesta superovulatoria disminuida (Genzebu, 2015b).

Debido a estos problemas, como la variabilidad, los efectos inmunogénicos y las formulaciones inconvenientes, deben buscarse otras alternativas para producir hormonas de superovulación a mayor escala, que sean seguras para el ganado y a un menor costo.

Con estos antecedentes, hemos propuesto desarrollar la FSH bovina recombinante para utilizarlo como tratamiento de superovulación bovino. La FSH recombinante, al ser un producto puro, se eliminarán los problemas debido al uso de hormonas exógenas. Además, proponemos añadir modificaciones postraduccionales para que la FSH bovina presente una mayor bioactividad en circulación y así disminuir las dosis a administrarse en el ganado bovino.

1.2 Justificación del problema

Por reproducción natural, una vaca tiene la capacidad de gestar un ternero por año, llegando a producir un promedio de ocho a diez terneros en su vida. Con un régimen hormonal adecuado de superovulación, las vacas tratadas pueden liberar hasta diez óvulos en cada ciclo estral con un promedio de cinco embriones transferibles (Troxel, 2012), disminuyendo el intervalo generacional y aumentando el potencial genético y la producción del ganado (Andino, 2014). Este rendimiento se logra mediante el estímulo del crecimiento folicular y la ovulación mediante la administración de hormonas y la posterior recolección y transferencia de embriones (Vettical, 2015).

La tecnología de ADN recombinante ha permitido construir una variedad de análogos hormonales con distintas características biológicas (Ali & Moustafa M, 2016). Se ha verificado que la construcción de FSH recombinante reduce la variación observada en los diferentes tipos de FSH derivadas de hipófisis (M. W. Hesser et al., 2011; Looney & Pryor, 2012). Con la FSH recombinante bovina se evitan los posibles riesgos de inmunogenicidad, además de resultar en un producto con mayor pureza y menor variabilidad en relación con hormonas extraídas de otros animales. Por lo tanto, se buscan diferentes tipos de estrategias para producirla por vía recombinante para así asegurar la pureza y consistencia de sus propiedades bioquímicas y biológicas.

Hoy en día, existen numerosos sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes a gran escala, los cuales incluyen expresión en bacterias *E. coli*, expresión en células

de insecto mediada por baculovirus, levaduras y varios sistemas en mamíferos (Khan, 2013). Pese a ello, los mamíferos tienen una capacidad superior para producir proteínas biológicamente activas y de menor costo (Houdebine, 2009). Además, estos sistemas de expresión son usados para la producción de proteínas recombinantes cuando son necesarias modificaciones postraduccionales complejas para su bioactividad (Brinchmann, Patel, Pinto, & Iversen, 2018), como es el caso de la FSH, con varios sitios de N-glicosilaciones, los cuales aumentan la solubilidad y la estabilidad de las proteínas, facilitan el plegamiento adecuado de proteínas, la carga apropiada, la formación de puentes disulfuro y la cinética enzimática (M. W. Hesser et al., 2011).

La glándula mamaria se ha considerado como el órgano de elección para expresar proteínas recombinantes en animales debido a que la leche se recolecta fácilmente en grandes cantidades, por lo que es catalogada como el mejor biorreactor disponible (Wang, Zhao, Bai, Fan, & Liu, 2013). Además, la leche representa una fuente de materia prima, no procesada, segura, abundante, renovable y fácil de obtener (Moura, Melo, & Freitas, 2011).

Varios investigadores recomiendan a cabras como sistemas de expresión debido a que las proteínas recombinantes son estables, muy eficientes y de alta pureza (Maksimenko, Deykin, Khodarovich, & Georgiev, 2013). Según Moura et al. (2011), las cabras han representado un modelo excelente como biorreactor de proteínas recombinantes, ya que su producción y costos operativos son significativamente más fáciles de manejar en comparación con el ganado vacuno, sin contar que varios investigadores utilizan la transducción adenoviral de esta glándula como

medio de producción rápida y simple de proteínas recombinantes en leche de cabra (J. R. Toledo et al., 2008, 2006).

Con lo expuesto anteriormente, el objetivo de este proyecto es expresar variantes recombinantes de FSH bovina en glándula mamaria de cabras transformadas, una de las cuales contiene la secuencia de la enzima β -galactósido- α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1) que confiere un patrón de glicosilación mayor que la hormona de tipo nativa, otorgando a la hormona una mayor vida media. Cabe mencionar que no hay informes en la literatura relacionados con la expresión de la hormona recombinante FSH bovina en leche de ganado. Además, las modificaciones estructurales que confiere la enzima ST6GAL1 no ha sido utilizada previamente como estrategia para el aumento de la vida media de la FSH bovina.

La FSH-ST6 de alta pureza, eficiencia y estabilidad podrá ser utilizada en el ganado vacuno para la obtención de un mayor número de óvulos y la subsecuente producción de embriones de una vaca seleccionada y así disminuir el tiempo generacional y aumentar el potencial genético de sus crías. Con esto, se logrará un aumento en la producción y calidad del ganado vacuno.

1.3 Objetivos del proyecto

1.3.1 Objetivo general

Expresar la hormona recombinante folículo estimulante (FSH) bovina en glándulas mamarias de cabras transformadas.

1.3.2 Objetivos específicos

Generar un vector adenoviral a partir de un diseño molecular previamente generado para una variante recombinante de la FSH bovina.

Desarrollar la FSH bovina en leche de cabras transformadas mediante el uso del vector adenoviral previamente desarrollado.

Evaluar el patrón de glicosilación y la actividad folículo estimulante de la hormona en modelos murinos.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

1.1. Hormona folículo estimulante (FSH)

La hormona folículo estimulante (FSH), producida por la glándula pituitaria anterior, es una glicoproteína que desempeña un papel importante en los procesos reproductivos (a Ulloa-Aguirre, Timossi, Damián-Matsumura, & Dias, 1999) en vertebrados (De Loof et al., 2001). Cuando ocurre la liberación desde la pituitaria anterior, la FSH actúa en células de la granulosa del ovario y en las células de Sertoli (Touyz, Jiang, & Ram Sairam, 2000), estimulando la foliculogénesis y la esteroidogénesis en el ovario y la espermatogénesis en el testículo (Santi, Potì, Simoni, & Casarini, 2018). La FSH, al igual que otras hormonas glicoproteínicas, consiste en dos cadenas polipeptídicas (subunidades α y β), asociadas no covalentemente. La subunidad α , codificada por un solo gen, es idéntica en la secuencia de aminoácidos en todas las gonadotropinas dentro de una especie particular (M. Mullen, Cooke, & Crow, 2013), mientras que la especificidad biológica de estas hormonas surge de la subunidad β que, según el tipo de gonadotropina, está codificada por un gen diferente (FSH β , LH β o CG β) (Cahoreau, Klett, & Combarous, 2015). La subunidad α de la hormona folículo estimulante bovina presenta cinco puentes de disulfuro intracadena, mientras que la subunidad β , que contiene 12 residuos de cisteína (M. P. Mullen, Cooke, & Crow, 2013), presenta seis puentes de disulfuro (Qian et al., 2009).

Ambas subunidades presentan modificaciones postraduccionales como glicosilaciones en la cual, mono u oligosacáridos son transferidos de moléculas donadoras a proteínas nacientes mediante enzimas denominadas glicosiltransferasas (Corfield, 2017). La adición de glicanos es importante para el ensamblaje, integridad y secreción de las subunidades α y β (a Ulloa-Aguirre et al., 1999). En la FSH están presentes dos tipos de glicosilaciones, N-glicosilaciones y O-glicosilaciones. Sin embargo, los predominantes son del tipo N (M. Mullen et al., 2013), teniendo dos sitios potenciales de N-glicosilación en las subunidades alfa y beta del tipo Asn-Xaa-Thr (T Rajendra Kumar, 2014). En la FSH bovina, estos oligosacáridos unidos a N se encuentran en las posiciones N56 y N82 de la subunidad α y N7 y N24 de la subunidad β . Los carbohidratos ligados a Asn sialilados predominan en la FSH bovina (M. P. Mullen et al., 2013).

La vida media biológica de la FSH bovina se ha estimado en 5 horas o menos (Monniaux, Chupin, & Saumande, 1983). Se ha elucidado que la exposición de residuos de galactosa en oligosacáridos, debido a la falta de glicosilación, aumenta su aclaramiento (a Ulloa-Aguirre et al., 1999) debido a una endocitosis mediada por receptores de asialo-glicoproteínas de hepatocitos (Springer & Dowdy, 2018). Este número de residuos de galactosa expuestos es importante para dilucidar la vida media de la FSH (a Ulloa-Aguirre et al., 1999). Algunos estudios informaron que la FSH con menos sialilaciones tiene una mayor actividad de unión al receptor y bioactividad *in vitro* que la FSH sialilada (Aggarwal & Papkoff, 1981; A Ulloa-Aguirre & Timossi, 1998). Sin embargo, la bioactividad *in vivo* de la FSH ácida es 20 veces más alta que la FSH básica (De Leeuw et al., 1996). Con esto, se ha demostrado que el ácido siálico juega un papel importante para

prevenir la rápida eliminación de la FSH de la circulación y no es crítico para la unión del receptor (M. P. Mullen et al., 2013).

1.2. Ciclo estral bovino

El ciclo estral o ciclo reproductivo está regulado por diferentes hormonas: la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que es secretada por el hipotálamo, estimula la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH) por las células gonadotrópicas de la adenohipofisis (Kadokawa, Pandey, Nahar, Nakamura, & Rudolf, 2014); además, por progesterona (P4), estradiol (E2) e inhibinas en los ovarios; y prostaglandina F2 α (PGF) en el útero (Rahman, 2008). En el ganado bovino, el ciclo estral dura de 18 a 24 días en el que se presentan dos fases: la fase lútea (14-18 días) y la fase folicular (4-6 días) (Forde et al., 2011; Tomac, Cekinović, & Arapović, 2011). En la fase lútea, el cuerpo lúteo, formado a partir del folículo ovulado colapsado, se desarrolla a partir de la pared folicular y produce predominantemente progesterona estimulada por los pulsos de LH (Tomac et al., 2011). Durante la fase folicular, se produce la maduración final y la ovulación del folículo ovulatorio. Además, los niveles de progesterona disminuyen significativamente debido a la disminución de la función del cuerpo lúteo (Forde et al., 2011).

Durante todo el ciclo se presentan dos o tres olas de crecimiento folicular (Figura 1), para vacas lecheras y vacas de res, respectivamente, en las que se produce la aparición de una cohorte de 5-20 folículos estimulados por el aumento de las concentraciones de FSH. Luego, la selección y el dominio de un folículo se produce debido a la secreción de inhibinas y estradiol (E2) por la

creciente cohorte que disminuye las concentraciones de FSH (Scully, Evans, Duffy, & Crowe, 2014). Esta disminución de FSH conduce a la regresión de los folículos subordinados (R J Mapletoft & Bó, 2013).

El conocimiento del ciclo estral es muy importante cuando se descubren nuevas técnicas para obtener un aumento en la producción ganadera.

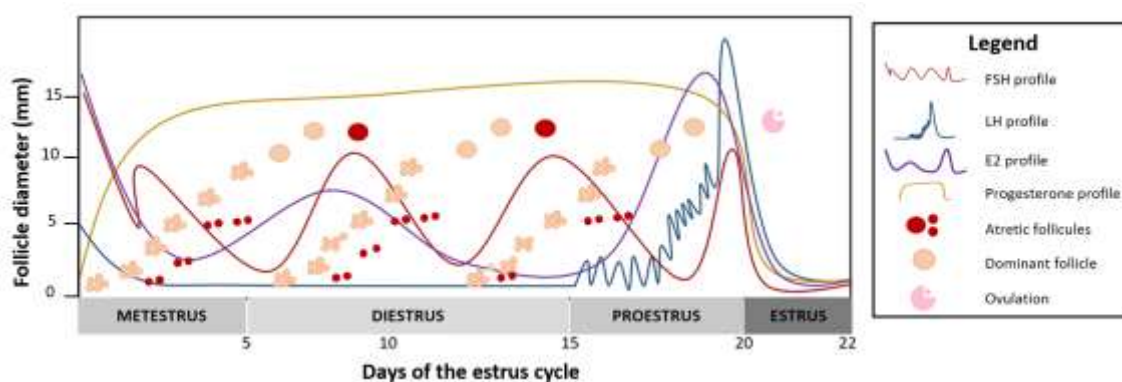


Figura 1. Descripción esquemática del patrón de secreción hormonal en el ciclo estral bovino.

Nota: Secreción de la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), estradiol (E2) y progesterona. Olas de crecimiento folicular.

1.3. Tecnología de ovulación múltiple y transferencia de embriones (MOET)

La transferencia de embriones (ET) es una técnica en la que uno o más embriones se extraen del tracto reproductivo de una hembra donante y luego se transfieren a la luz del oviducto o útero de una o más hembras receptoras (Genzebu, 2015a). Se aplica para obtener un máximo número de embriones de un animal genéticamente superior en el menor tiempo posible y así maximizar el potencial genético en un rebaño obteniendo hembras o sementales de élite (Patel et al., 2018). Para

la ET, se deben realizar diferentes pasos como: selección de una vaca donante, superovulación, inseminación, recolección y evaluación de embriones, selección y preparación de hembras receptoras, transferencia de embriones y, finalmente, evaluación de trasplantes de embriones (Hopper, 2014).

1.3.1. Superovulación

La superovulación es un tratamiento hormonal que induce el crecimiento folicular y permite la recuperación de un mayor número de ovocitos en la hembra bovina donadora (C. Luo et al., 2011), siendo un procedimiento clave para maximizar el número de embriones viables con una alta capacidad para producir preñez (Reuben J. Mapletoft & Bó, 2015). El principio básico de la superovulación es estimular el desarrollo folicular mediante tratamiento hormonal e inducir la ovulación de varios folículos simultáneamente (Crowe & Mullen, 2013). Además, mediante la reproducción natural, una vaca puede criar un ternero por año, alcanzando un promedio de ocho a diez terneros en toda su vida. Con un régimen hormonal adecuado de superovulación, las vacas tratadas pueden liberar hasta diez o más óvulos en cada celo, disminuyendo el intervalo generacional e incrementando el potencial genético y la producción de ganado (Andino, 2014).

La superovulación se puede lograr mediante la aplicación de hormonas gonadotropinas (M. Hesser et al., 2011), que permiten emular los procesos reproductivos naturales para aumentar la eficiencia reproductiva. Las gonadotropinas más utilizadas en la reproducción del ganado incluyen la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), extraídas de la glándula pituitaria de cerdos y ovejas (M. Hesser et al., 2011), además de la gonadotropina coriónica equina

(eCG), producida por las copas endometriales de yeguas preñadas (De Rensis & Lopez-Gatius, 2014). En los tratamientos de superovulación, la FSH exógena, obtenida de pituitarias de porcinos y ovinos (M. W. Hesser et al., 2011), se utiliza para rescatar los folículos subordinados de la regresión para que también puedan alcanzar un estado dominante (R J Mapletoft, Guerra, Dias, Singh, & Adams, 2015).

El protocolo más común para la superovulación incluye una ovulación inducida por GnRH del folículo persistente y la emergencia de la onda folicular. Luego, la super estimulación comienza con la administración de FSH exógena dos veces al día por cuatro días con dosis decrecientes (Reuben J. Mapletoft & Bó, 2014). Esta administración de FSH dos veces al día, debido a su corta vida media, da lugar a varios problemas en el campo, incluido el manejo excesivo de vacas donantes causando estrés y una disminución de la respuesta superovulatoria (Genzebu, 2015b).

Recientemente, se han desarrollado varios tratamientos alternativos para tratar de evitar estos problemas, por ejemplo, la aplicación de formulaciones de FSH de liberación lenta (Bó & Mapletoft, 2014). Por ejemplo, mezclando FSH con polivinilpirrolidona (PVP) que mantiene una alta concentración de FSH en la sangre, suficiente para estimular el desarrollo de múltiples folículos (Vongpralub, 2013). Sin embargo, este tratamiento ha tenido resultados variables al no poder inducir la superovulación en algunos casos (Callejas et al., 2005). Otra alternativa es el uso de hialuronano, un glicosaminoglicano, usado en una solución al 2% para diluir FSH. Sin embargo, presenta los mismos resultados que la dosis tradicional de FSH de dos días. Además, resulta difícil mezclar FSH con hialuronano debido a su estado viscoso conduciendo a problemas en el campo y

una solución más diluida disminuye su efectividad (Bó, Rogan, & Mapletoft, 2018). Otra alternativa es el uso de gel de hidróxido de aluminio, un adyuvante, para inducir la superovulación en el ganado vacuno (Kimura, 2016). Sin embargo, el uso de adyuvantes podría causar el desarrollo de anticuerpos contra FSH (Bó et al., 2018).

1.4. Vectores adenovirales

Los adenovirus son virus sin envoltura con un genoma de ADN bicatenario lineal (Davison, Benko, & Harrach, 2003), que abarca una longitud de 26-46 kb. Su nucleocápside consiste en 252 proteínas en forma de tres tipos principales: fibra, pentón y hexón (Ghebremedhin, 2014). Los vectores adenovirales más usados son derivados de los serotipos 2 y 5 de adenovirus humanos (J. Luo et al., 2007). El adenovirus humano serotipo 5 (Ad5), con un genoma de 36 kb contiene dos regiones usadas frecuentemente para la inserción de ADN foráneo. Estas regiones son la región temprana 3 (E3), la cual codifica productos que contrarrestan los mecanismos de defensa del huésped; y la región E1, la cual es esencial para la replicación viral (Kovesdi & Hedley, 2010).

Cuando ambas regiones son delecionadas, los vectores tienen la capacidad de proporcionar espacio para grandes casetes alternativos de expresión génica de hasta 7,5 Kb (Small et al., 2014). Otra ventaja de usar adenovirus recombinantes es su capacidad de infectar la mayoría de los tipos celulares de mamíferos, además de que permite una alta expresión de la proteína recombinante, es bien tolerado, permitiendo una viabilidad de las células huésped de casi el 100 por ciento, permanece epicromosómico y no inactiva genes ni activa oncogenes (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zheng, et al., 2017).

El método más usado para generar vectores adenovirales es el sistema AdEasy, el cual se basa en la recombinación homóloga entre dos vectores de ADN. El gen de interés es insertado en un vector transportador que contiene secuencias del genoma adenoviral, además de una señal de empaquetamiento (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zheng, et al., 2017). El vector transportador más usado es el pAdTrack-CMV, el cual contiene tanto un promotor de citomegalovirus (CMV) como un casete de expresión de proteína verde fluorescente (GFP) para evaluar la eficacia de transducción de adenovirus (J. Luo et al., 2007). El otro vector usado en la recombinación homóloga es el vector pAdEasy1, que contiene el genoma adenoviral con delección en las regiones E1 y E3. Los plásmidos adenovirales recombinantes resultantes se linealizan y se usan para la producción de adenovirus en células empaquetadoras HEK-293 A (células epiteliales de riñón embrionario humano que expresan constitutivamente el activador transcripcional E1 del Ad5) (Figura 2) (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zheng, et al., 2017).

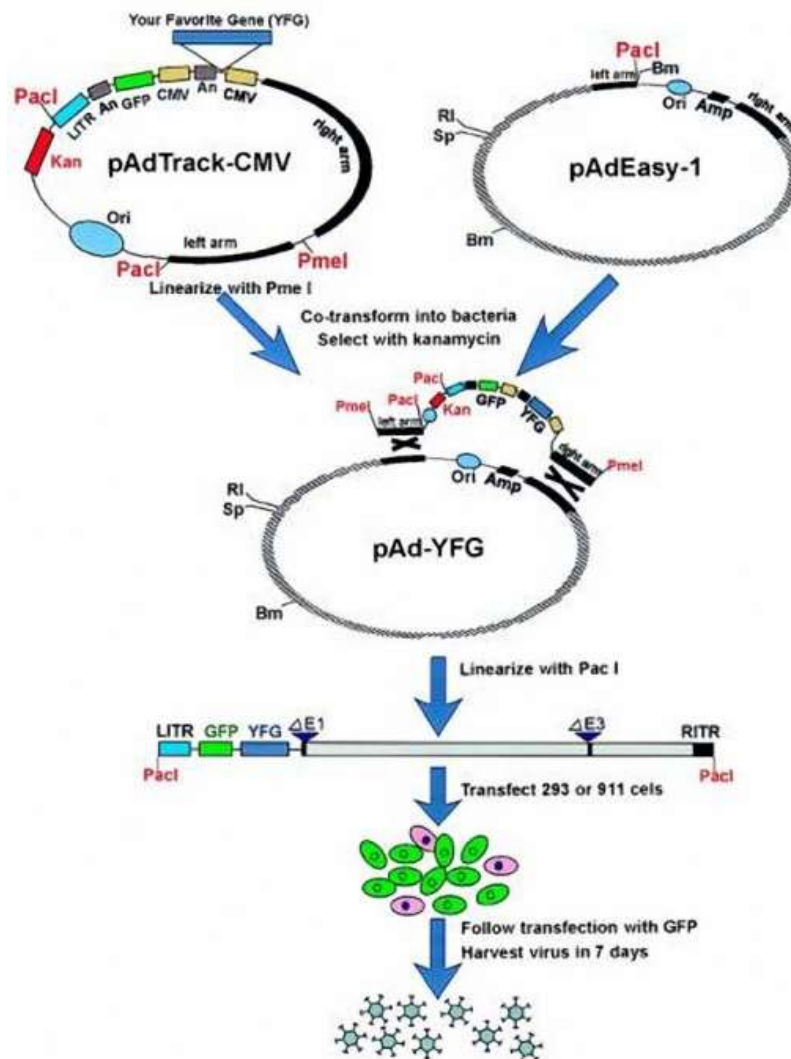


Figura 2. Esquema del sistema AdEasy. Fuente: (He et al., 1998).

1.5. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Los sistemas de expresión de proteínas recombinantes incluyen bacterias, levaduras, mamíferos, plantas o insectos (Demain & Vaishnav, 2009). Para seleccionar el sistema de expresión adecuado, se debe tomar en cuenta la aplicación de la proteína recombinante. Para

proteínas que no requieran modificaciones postraduccionales, se pueden utilizar sistemas de expresión procariotas (Rosano & Ceccarelli, 2014). Los sistemas de expresión que utilizan células de mamífero para proteínas recombinantes son elegidos para que exista un plegamiento de proteínas adecuado, modificaciones postraduccionales y correcto ensamblaje del producto, que son importantes para la actividad biológica completa (Khan, 2013).

Muchos laboratorios y compañías farmacéuticas han logrado producir una variedad de proteínas terapéuticas en mamíferos como sistemas de expresión, dentro de los cuales incluyen vacas, cerdos, ovejas, cabras y conejos (Dyck, Lacroix, Pothier, & Sirard, 2003; Rudolph, 1999). Estas proteínas recombinantes se producen a partir de fluidos corporales de animales, en leche, en clara de huevo, sangre, en orina y en plasma seminal (Wang et al., 2013). Varios investigadores han desarrollado la hormona recombinante FSH bovina en diferentes sistemas de expresión como en levaduras (Qian et al., 2009), en líneas celulares de mamíferos (Min et al., 2003; Wilson, Jones, Moore, Looney, & Bondioli, 1993), en células de insectos (van de Wiel, van Rijn, Meloen, & Moormann, 1998), en plantas (Dirnberger, Steinkellner, Abdennebi, Remy, & van de Wiel, 2001), en glándula mamaria de ratones (Greenberg et al., 1991) y glándula mamaria de conejos (Coulibaly et al., 2002).

1.5.1. Glándula mamaria como sistema de expresión de proteínas recombinantes

Los vectores adenovirales representan una herramienta poderosa para la transducción *in situ* de la glándula mamaria. De este modo, se pueden introducir múltiples copias o genes independientes en las células epiteliales mamarias mediante la infusión de vectores virales a través

del canal del pezón. Una vez que tiene lugar la modificación genética, la proteína recombinante se secreta en la leche (Montesino & Toledo, 2006), la cual representa una fuente de materia prima, no procesada, segura, abundante, renovable, y fácil de obtener (Moura et al., 2011), por lo que la glándula mamaria es considerada como el mejor biorreactor (Wang et al., 2013). La transfección de esta glándula ha sido una alternativa más rápida y menos costosa para dirigir la expresión de un gen de interés a las células epiteliales mamarias y que la proteína sea secretada a la leche, haciéndolo un proceso relativamente simple (J. Toledo et al., 2005).

1.6. Purificación de proteínas

Muchos de los sistemas de purificación de proteínas consisten en resinas, perlas de unión, columnas llenas con una resina específica y kits completos de purificación (Bird, 2011). Las etiquetas o tags de afinidad se usan ampliamente para la purificación de proteínas debido a su capacidad de aislar proteínas de alta pureza en un solo paso (Young, Britton, & Robinson, 2012).

La aplicación de etiquetas de afinidad facilita el aislamiento y purificación eficientes de una proteína de interés del sistema huésped. Las etiquetas de afinidad son epítomos que se funcionan como herramientas muy eficientes para la detección, caracterización y purificación de proteínas (Young et al., 2012). La técnica de marcado de epítomos añade una secuencia corta a una proteína de interés mediante técnicas de ADN recombinante que proporcionan un mecanismo de obtención del producto con elevada pureza (Derewenda, 2004). Además, estas etiquetas ayudan en la purificación sin afectar negativamente, en la mayor parte de los casos, a la actividad biológica o bioquímica de la proteína (Uhlen, Forsberg, Moks, Hartmanis, & Nilsson, 1992). Las etiquetas de

afinidad más utilizadas son polihistidina (His-tag), glutatión S-transferasa (GST-tag) y estreptavidina (strep-tag) (Zhao, Li, & Liang, 2013).

1.6.1. Etiquetas de histidina

Las etiquetas de afinidad de polihistidina (His-tag o His₆) son construcciones de poliaminoácidos, que usualmente consisten en seis residuos de histidina consecutivos, consideradas como las etiquetas de afinidad más utilizadas para purificar proteínas recombinantes (Kimple, Brill, & Pasker, 2013).

Para purificar proteínas con etiquetas de histidina, se utiliza la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC), que actúa aislando péptidos de unión a metales en función de la interacción entre la histidina, de carga negativa, y los iones de metal de transición, tales como Ni²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, los cuales se encuentran inmovilizados en una matriz (Loughran, Bree, & Walls, 2017).

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

El presente estudio fue realizado en conjunto la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE con la Universidad de Concepción (UdeC), con el fin de producir dos variantes recombinantes de la FSH bovina, una incluyendo la secuencia ST6GAL1.

El trabajo estuvo dirigido metodológicamente en dos fases: primero la obtención de plásmidos adenovirales recombinantes para la posterior construcción de adenovirus y la amplificación de dichos virus para la transducción *in vitro* de células e *in vivo* de glándula mamaria de cabras para obtener dos variantes de la hormona recombinante FSH bovina.

1. Generación de los adenovirus recombinantes

Para el primer objetivo fueron diseñados dos tipos de adenovirus recombinantes, uno con la secuencia de la FSHb y la secuencia ST6GAL1 y otro conteniendo únicamente FSHb. Para su construcción, se requieren dos plásmidos transportadores: pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb para la posterior recombinación homóloga con el plásmido comercial pAdEasy-1, conteniendo el genoma adenoviral, y la consecuente formación de los dos adenovirus recombinantes.

1.1. Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6

Este plásmido se construyó para que, en la recombinación homóloga, transporte la secuencia FSHb-ST6 al plásmido pAdEasy-1. El diseño del pAdTrack FSHb-ST6 fue basado en el plásmido pUC57 FSHb-ST6 previamente diseñado en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, UdeC. La construcción de este vector partió del plásmido comercial pUC57 al que fue añadido la secuencia FSHb-ST6.

El fragmento genómico conteniendo el cDNA de FSHb-ST6 presente en el vector pUC57 FSHb-ST6, previamente sintetizado, fue clonado en los sitios de restricción *Xho I/Bgl II* del vector transportador pAdTrack-CMV. Para ello se digirieron 20 µg de cada plásmido, las condiciones de reacción se establecieron de acuerdo con New England Biolabs® a 37 °C por 1,5 horas.

Una vez separados los fragmentos deseados, se extrajeron de gel las bandas correspondientes a la secuencia FSHb-ST6 (2648 bp) y al vector lineal pAdTrack-CMV (9044 bp), ambas digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 1% y las bandas fueron extraídas con el kit de purificación Thermo Scientific™ GeneJET Gel Extraction Kit (Anexo 1). Posteriormente, para evitar que el vector lineal pAdTrack-CMV vuelva a circularizarse, se realizó la defosforilación de sus extremos 5' con Antarctic Phosphatase de New England BioLabs®.

Finalmente, para formar el plásmido circular pAdTrack FSHb-ST6, la secuencia FSHb-ST6 fue ligada en el vector lineal previamente desfosforilado pAdTrack-CMV usando la enzima T4

DNA Ligasa de New England BioLabs[®]. Para esto, se ligaron 4 ug del vector lineal pAdTrack CMV (9044 bp) con 2,5 ug de la banda extraída en gel FSHb-ST6 (2648 bp), obteniéndose el plásmido pAdTrack FSHb-ST6 (11 667 bp).

1.2. Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb

Similar a la sección anterior, este plásmido fue diseñado para que transporte la secuencia FSHb al plásmido pAdEasy-1 en la recombinación homóloga. Para la construcción del pAdTrack FSHb, iniciamos del plásmido pAdTrack FSHb-ST6, eliminando la secuencia IRES-ST6 (1844 bp) con la enzima de restricción *XbaI*. Para ello, 20 µg del plásmido pAdTrack FSHb-ST6 fueron digeridos a 37 °C por 1,5 horas obteniéndose dos bandas, una correspondiente al plásmido lineal pAdTrack FSHb y otra banda de la secuencia IRES-ST6.

Para extraer la banda correspondiente al plásmido pAdTrack FSHb lineal (9823 bp) se corrió la solución de digestión en un gel de agarosa al 1% y se extrajo la banda a partir de gel con el kit de purificación Thermo Scientific[™] GeneJET Gel Extraction Kit (Anexo 1).

Finalmente, para retornar al plásmido pAdTrack FSHb a su conformación circular, se utilizó la enzima T4 DNA Ligasa de New England BioLabs^{® Inc} para ligar 4 ug del vector lineal pAdTrack FSHb, obteniéndose el plásmido circular pAdTrack FSHb (9823 bp).

1.3. Transformación de bacterias electrocompetentes

Con el fin de amplificar los plásmidos previamente diseñados (pAdTrack FSHb y pAdTrack FSHb-ST6), transformamos bacterias electrocompetentes *E. coli* con ambos plásmidos independientemente. Ambas transformaciones fueron realizadas de acuerdo al protocolo del MicroPulser™ Electroporator de BIO-RAD (Anexo 2). Las bacterias transformadas se sembraron en medio LB suplementado con kanamicina. Para obtener una mayor biomasa, las colonias resultantes de ambas transformaciones inoculadas en 15 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) fueron incubadas a 37 °C toda la noche con agitación. El ADN plasmídico de los cultivos resultantes fue purificado usando el QIAGEN Plasmid Mini Kit (Anexo 3).

Una vez aislados los plásmidos de las diferentes colonias resultantes, fue necesario seleccionar las que lograron transformarse con el plásmido de interés. Para seleccionar los transformantes positivos, conteniendo el plásmido pAdTrack FSHb-ST6, todas las muestras resultantes se digirieron con las enzimas de restricción *Xho I/Bgl II*; mientras que los transformantes positivos, conteniendo el plásmido pAdTrack FSHb, fueron validadas mediante cortes en los sitios de restricción *EcoRI* y *EcoRI/NdeI*. Elaboramos el screening con estas enzimas debido a que se encuentran dentro del mapa de restricción de ambos plásmidos. Además, nos apoyamos con el software SnapGene para el diseño de las digestiones enzimáticas. Finalmente, un transformante positivo fue elegido por cada plásmido.

Una vez confirmadas las muestras de bacterias transformadas con los dos plásmidos: pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb, éstas fueron amplificadas a una mayor escala en 300 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C toda la noche con agitación. El ADN plasmídico de cada cultivo amplificado resultante fue purificado usando el E.Z.N.A.[®] Plasmid DNA Midi Kit (Anexo 4).

1.4. Generación de los plásmidos recombinantes por recombinación homóloga

Para obtener los plásmidos recombinantes adenovirales pAdEasy FSHb y pAdEasy FSHb-ST6 se realizó una recombinación homóloga mediante una co-transformación de cada plásmido transportador (pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb) con el plásmido pAd-Easy-1 en la cepa BJ5183 de *E. coli*. Para esto, linealizamos 10 µg de pAdTrack-FSHb-ST6 y pAdTrack-FSHb con la enzima de restricción *Pme I* a 37 °C por 1,5 horas.

La co-transformación fue elaborada en una proporción de 1 µg de cada vector lineal (pAdTrack-FSHb-ST6 y pAdTrack-FSHb) con 100 ng de pAd-Easy-1 circular de acuerdo al protocolo del MicroPulser[™] Electroporator de BIO-RAD (Anexo 2). Las colonias resultantes de ambas co-transformaciones fueron inoculadas en 15 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C toda la noche con agitación. El ADN plasmídico de los cultivos resultantes fue purificado usando el QIAGEN Plasmid Mini Kit (Anexo 3).

Los transformantes positivos, conteniendo los plásmidos recombinantes pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb se confirmaron mediante cortes en el sitio de restricción *PacI*, como sugiere el manual AdEasy™ Vector System de Qbiogene.

Una vez elegido un recombinante positivo de cada variante, los plásmidos fueron aislados para su transferencia y propagación en células DH5 α , las cuales fueron transformadas con 1 μ L del plásmido aislado de cada recombinante usando el protocolo del MicroPulser™ Electroporator de BIO-RAD (Anexo 2). Para la amplificación de ambos plásmidos recombinantes, una colonia de cada transformación fue inoculada en 300 mL de medio LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) incubando a 37 °C toda la noche con agitación. Finalmente, el ADN plasmídico fue purificado usando el E.Z.N.A.® Plasmid DNA Midi Kit (Anexo 4), obteniendo los plásmidos recombinantes pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb. Estos plásmidos carecen de la región replicativa E1, por lo que es necesario complementar esta región para formar los adenovirus.

1.5. Transfección de plásmidos recombinantes adenovirales

Para formar los adenovirus recombinantes AdFSHb-ST6 y AdFSHb replicativos, se transfectaron los plásmidos recombinantes adenovirales (pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb), construidos en la sección anterior, en la línea celular de empaquetamiento HEK 293 A. Para esto, se linealizaron 25 μ g de cada plásmido adenoviral recombinante (pAdTrack-FSHb-ST6 y pAdTrack-FSHb) con la enzima de restricción *Pac I* y la digestión resultante de cada plásmido lineal fue precipitada con etanol (Anexo 5).

La transfección de cada ADN plasmídico recombinante lineal se realizó en la línea de empaquetamiento adenoviral HEK-293 A, previamente sembrada en frascos de cultivo T25 con una confluencia de ~70%, usando el reactivo de transfección Lipofectamine® 2000 de Invitrogen™, de acuerdo a las especificaciones del fabricante empleando medio de cultivo Gibco™ Opti-MEM™. La eficiencia de transfección fue monitoreada con la detección de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante observación directa del cultivo en el microscopio de fluorescencia Olympus IX-81. Los cultivos se mantuvieron en frascos de cultivo T25 durante 2 días. Al tercer día cada cultivo se pasó a un frasco de cultivo T75 mantenidos por 14 días más, hasta que las células despeguen. Durante todo el proceso, las células estuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con FBS 2,5%.

La presencia de partículas virales se hizo evidente por la formación de halos de lisis alrededor de las células fluorescentes. Posteriormente, las células recogidas en medio de cultivo DMEM sin FBS fueron lisadas por ciclos de congelación-descongelación a -20 °C y 37 °C, para obtener las partículas virales producidas por las células. Los virus recombinantes resultantes fueron denominados AdFSH-ST6 y AdFSH, respectivamente. El AdFSH contiene simultáneamente la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) y FSHb bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV). El AdFSH-ST6 contiene además la secuencia de la enzima ST6GAL1.

2. Amplificación de los virus recombinantes adenovirales (AdFSH-ST6 y AdFSH)

Para alcanzar los títulos virales necesarios para la transducción de glándula mamaria de cabras se amplificaron ambos virus recombinantes en la línea celular HEK-293A con una confluencia cercana al 80% infectadas a una multiplicidad de infección MOI de 5 (5 partículas virales para infectar una célula HEK 293 A). Tras 48 horas post-infección, los cultivos se desprendieron y las células recogidas en medio de cultivo DMEM sin FBS fueron lisadas por ciclos de congelación-descongelación a -20 °C y 37 °C, respectivamente con el fin de extraer las partículas virales intracelulares. El sobrenadante fue almacenado a -80 °C hasta su titulación y las infecciones subsecuentes con el pase viral previo hasta obtener títulos virales deseados para la transfección de glándula mamaria de cabra.

3. Titulación de los vectores adenovirales

Para la titulación de las muestras adenovirales utilizamos el método de unidades formadoras de color (UFC, basado en vectores portadores de GFP) (Anexo 6).

4. Expresión de las variantes de FSH bovina en células SiHa

Con el propósito de realizar un screening de la expresión de ambas variantes de la FSHb, infectamos células SiHa con los virus antes de llevar el ensayo a glándulas mamarias de cabras.

La expresión de las variantes recombinantes en células SiHa fue en placas de 150 mm con capacidad para 20×10^6 células. El cultivo amplificado hasta un 90% de confluencia fue inoculado con los virus a una multiplicidad de infección MOI de 25 (25 partículas virales para transfectar una célula SiHa), el cual fue determinado previamente en el laboratorio. Pasadas 8 horas, el medio de infección fue reemplazado por medio fresco sin FBS. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 48 horas, las proteínas fueron colectadas junto con el medio de cultivo y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su análisis.

5. Expresión de las variantes de FSH bovina en glándula mamaria de cabra

Para obtener ambas proteínas recombinantes FSHb-ST6 y FSHb utilizamos una cabra de raza Toggenburg de 1 año que estaba en lactancia natural como sistema de expresión y realizamos la transducción *in situ* de ambas glándulas mamarias. Cabe destacar que el manejo de animales se realizó de acuerdo con los lineamientos de bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción, teniendo en cuenta las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) según el National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research.

Antes de la infusión de los adenovirus, cada mitad de la ubre se lavó con PBS a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a través del canal del pezón, la solución se retiró mediante ordeño y la etapa de lavado fue repetida por dos veces más hasta que la solución eliminada sea clara. El volumen del vector adenoviral infundido fue variable de acuerdo con la capacidad de la ubre.

La glándula mamaria izquierda fue inoculada con una solución que contenía 2×10^8 VP/ml de AdFSH-ST6 mientras que la glándula mamaria derecha recibió 2×10^8 VP/ml de AdFSH. Veinticuatro horas después de la inoculación de adenovirus, las ubres fueron ordeñadas para eliminar la solución infundida. La recolección de leche comenzó 48 h después de la inoculación de los adenovirus, recolectándose diariamente durante 12 días.

6. Identificación de proteínas

6.1. Precipitación de proteínas

Para identificar las proteínas expresadas en medio de cultivo de SiHa, utilizamos la precipitación TCA-deoxicolato de sodio. Posterior a las 48 horas de infección, se colectó el medio de cultivo para ambas variantes y las proteínas precipitaron con ácido tricloroacético (TCA)-deoxicolato de sodio (Anexo 7).

6.2. Extracción de suero de leche

Para obtener el suero de leche y evaluar la presencia de proteínas, utilizamos un Tampón de separación (Anexo 8).

6.3. SDS-PAGE

Debido a que las variantes recombinantes fueron obtenidas en dos sistemas de expresión (SiHa y leche), las muestras se procesaron de diferente forma. Las muestras correspondientes al

medio de cultivo de SiHa tuvieron que ser precipitadas como se detalló anteriormente y las correspondientes a suero de leche desnaturalizamos directamente, sin precipitar.

Las proteínas recombinantes desnaturalizaron con un volumen de buffer de carga (Tris-Cl pH8 60 mM, β -mercaptoetanol 1%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10%) y calentadas a 95 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se cargaron 10 μ L de cada muestra en un gel de poliacrilamida desnaturalante al 10%. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V en buffer de corrida Tris-base 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% p/v por 2 horas.

6.4. Electro transferencia de proteínas

La transferencia a membranas de nitrocelulosa Hybond ECL Nitrocellulose (GE Healthcare, UK), se realizó una vez separadas las proteínas en SDS-PAGE, en el equipo de transferencia semi-seco Trans-Blot-Turbo (BioRad, EE. UU). El gel de poliacrilamida fue colocado sobre la membrana y se sometió a la acción de un campo eléctrico de corriente constante (300 mA) durante 30 min y a 25 V en solución tampón de transferencia.

6.5. Inmuno identificación de proteínas

Para la inmuno-identificación de las proteínas de interés, la membrana de nitrocelulosa electro-transferida se sumergió en solución de bloqueo (leche descremada 5%, TBS) durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con tampón TBS-Tween20 0,05%. La incubación fue con el anticuerpo primario anti-6xHis (Clontech, EE. UU) en dilución 1:5000 en solución de bloqueo

durante toda la noche a 4 °C en agitación. Se realizaron tres lavados de 15 minutos con solución TBS-Tween20 0,05%. Luego, se incubó con el anticuerpo secundario IgG de ratón conjugado al fluoróforo AlexaFluor® 790nm (Jackson Laboratory, EE.UU) en una dilución 1:10.000 en solución de bloqueo a TA en agitación durante 1,5 horas y se realizaron los pasos de lavado explicados previamente. La identificación de bandas inmuno-fluorescentes fue realizada en el equipo Odyssey (Li-cor, EE. UU.).

7. Análisis del patrón de glicosilación y actividad folículo estimulante.

Estos análisis realizaron con ambas proteínas purificadas. De manera que, se obtuvieron 180 mL de medio de cultivo de células SiHa transfectadas con cada virus recombinante y su purificación se llevó a cabo, aprovechando el tag de histidina presente en cada proteína, en el equipo AKTAprime plus con la matriz IMAC Sepharose High Performance siguiendo el protocolo previamente estandarizado del Anexo 9.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

El trabajo de investigación estuvo dirigido a la expresión de la hormona recombinante folículo estimulante (FSH) bovina en glándulas mamarias de cabras transformadas. Esta variante recombinante presentó una modificación en el patrón de glicosilación que permitirá el aumento de la bioactividad de la FSH en circulación.

Existieron dos ejes principales que tuvieron lugar en este trabajo para la expresión de ambas variantes de la FSHb; el primero, la construcción de dos adenovirus recombinantes, uno conteniendo la secuencia de FSHb y el otro con FSHb-ST6, que incluía la secuencia de la enzima ST6, que garantizaría a la FSH un tiempo de vida media mayor. El otro eje se centró en la transducción de modelos *in vitro* e *in vivo* con los adenovirus para evaluar la expresión de las proteínas recombinantes.

1. Generación de los adenovirus recombinantes

Inicialmente, fue necesario construir dos plásmidos transportadores (pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb), cuyo diseño se detalla a continuación. Primero describiremos los resultados referentes a la construcción, seguido de la transformación y amplificación de cada plásmido transportador.

1.1. Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6

Se construyó el plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6 conteniendo la secuencia de la enzima β -galactósido- α 2,6-sialiltransferasa (ST6) para conferir un patrón de glicosilación mayor a la FSH, otorgando a la hormona un tiempo de vida media mayor.

El plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6 fue diseñado tomando como base el plásmido pUC57 FSHb-ST6, el cual fue provisto por el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción. Para la elaboración del constructo se partió del plásmido comercial pUC57 (Anexo 1). Se aisló el fragmento FSHb-ST6 (2648 bp) del plásmido pUC57 FSHb-ST6 (carril 2, Figura 3A) usando las enzimas restricción *Xho*I/*Bgl*II. La secuencia FSHb-ST6 fue ligada en el vector lineal pAdTrack-CMV de 9044 bp (carril 5, Figura 3A). Como resultado de la ligación, se obtuvo el plásmido transportador pAdTrack FSHb-ST6 cuyo tamaño fue de 11667 bp (carril 2, Figura 3B).

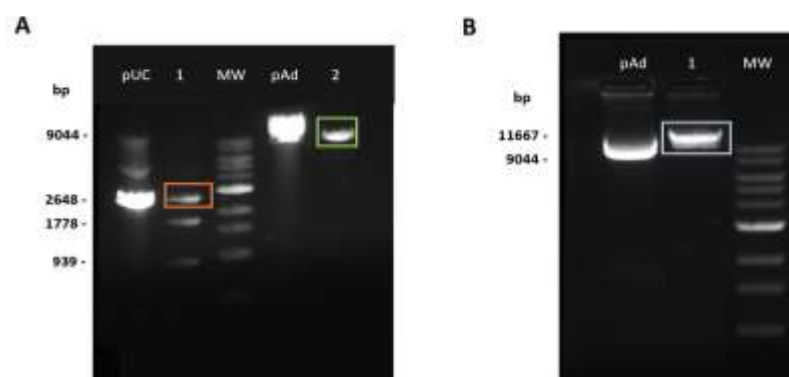


Figura 3. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb-ST6. Nota: **A.** Digestión enzimática de plásmidos pUC 57 FSH-ST6 y pAdTrack-CMV. **pUC:** pUC 57 FSH-ST6, **1:** pUC 57 FSH-ST6 digerido con *Xho*I/*Bgl*II/*Sca*I, **pAd:** vector pAdTrack CMV, **2:** vector pAdTrack CMV digerido con *Xho*I/*Bgl*II, **MW:** Marcador

Una vez construido el plásmido pAdTrack FSHb-ST6, éste fue amplificado en bacterias *E. coli* y como resultado de la transformación se obtuvieron 10 colonias. El ADN plasmídico de las 10 muestras fue chequeado con las enzimas de restricción *Xho I/Bgl II*. A su vez, se efectuó una simulación en el software SnapGene para establecer el diseño de la digestión enzimática del pAdTrack FSHb-ST6. Esta digestión resultó en dos bandas de 9019 bp y 2648 bp según el software (Figura 5A).

Como se observa en la Figura 5B, se obtienen los fragmentos esperados en todas las muestras, a excepción del plásmido aislado de la muestra 4 (carril 4), que presenta un patrón de migración electroforético incorrecto de acuerdo a la simulación en gel con el software SnapGene. Con esto, confirmamos que se obtuvieron 9 transformantes positivos de *E. coli* que contienen el plásmido pAdTrack FSHb-ST6 comprobado por digestión enzimática.

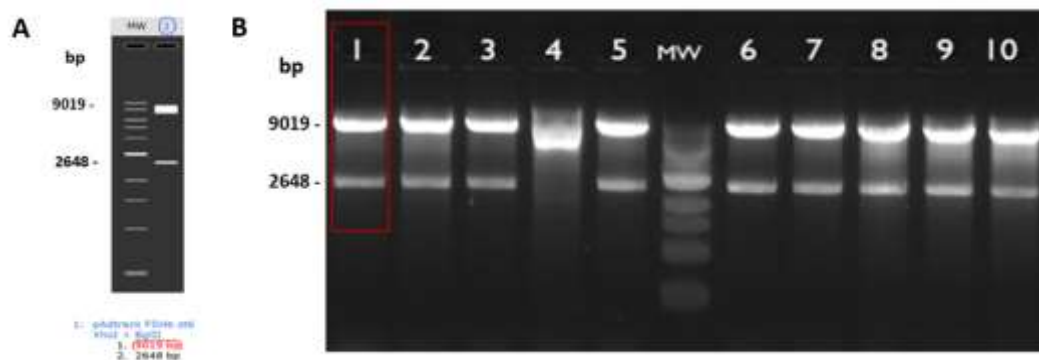


Figura 5. Evaluación de transformantes con el plásmido pAdTrack FSHb-ST6
 Nota: **A.** Simulación en gel de digestión enzimática del plásmido pAdTrack FSHb-ST6 cortado con *XhoI/BglII*. Software: SnapGene. **B.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, **1 a 10:** ADN plasmídico digerido con *XhoI/BglII*, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®),

Finalmente, el plásmido pAdTrack FSHb-ST6 de la muestra 1 (recuadro rojo, carril 1, Figura 5B) fue amplificado a escala masiva, obteniéndose una concentración de 800 ng/ μ L.

1.2. Construcción del plásmido transportador pAdTrack FSHb

El segundo vector transportador pAdTrack FSHb fue construido en base al plásmido pAdTrack FSHb-ST6 obtenido previamente en la sección anterior. Este vector transportador fue construido como control, al no presentar ninguna modificación postraduccional.

Para esta construcción, se eliminó el fragmento IRES-ST6 (1844 bp) del plásmido pAdTrack FSHb-ST6 (carril 2, Figura 6A) mediante digestión enzimática con la enzima *XbaI*, resultando el plásmido transportador pAdTrack FSHb cuyo tamaño fue de 9823 bp (Figura 6B).

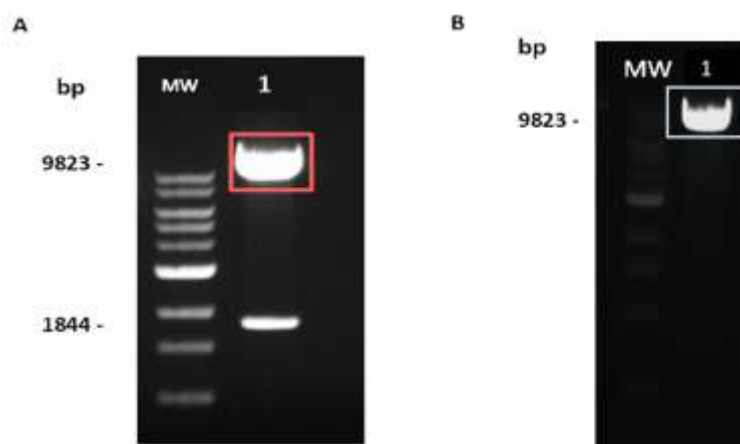


Figura 6. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb. Nota: **A.** Digestión enzimática del plásmido pAdTrack FSHb-ST6 con *XbaI*. Se obtienen dos fragmentos (9823 bp y 1844 bp), **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®). **B. 1:** Plásmido resultante: pAdTrack FSHb

En la Figura 7 se detallan los pasos realizados para el diseño del plásmido pAdTrack FSHb utilizando el programa SnapGene. La secuencia IRES-ST6 fue eliminada del pAdTrack FSHb-ST6 para formar el plásmido pAdTrack FSHb, cuyo tamaño fue de 9823 bp.

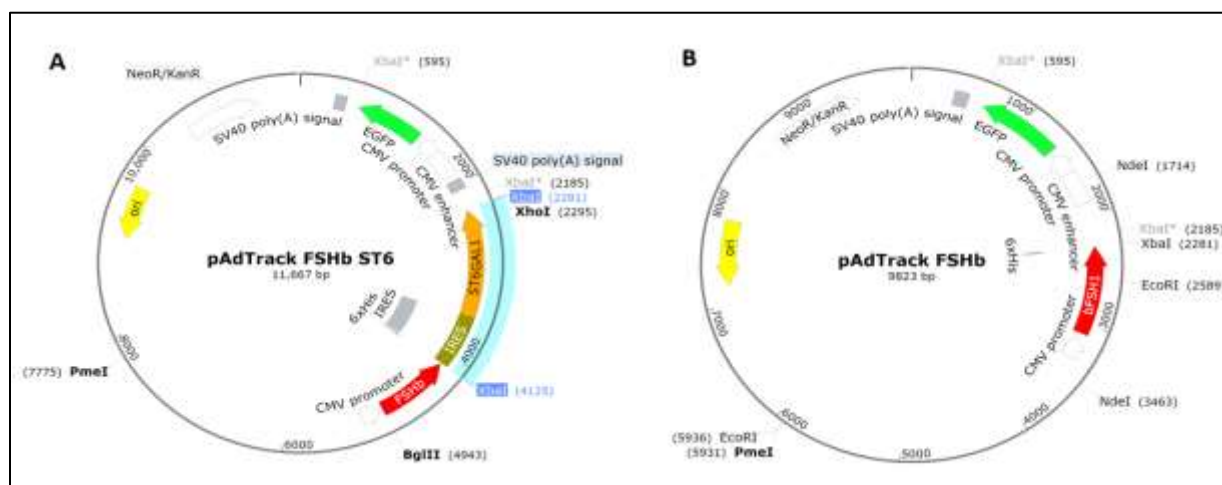


Figura 7. Pasos de clonación para la generación del plásmido pAdTrack FSHb. Software: SnapGene.

Nota: El fragmento genómico de 1844 bp correspondiente IRES-ST6 fue eliminado del plásmido pAdTrack FSHb-ST6 usando los sitios de restricción de XbaI (A). Como resultado de la ligación, se obtuvo el plásmido de 9823 pb denominado pAdTrack FSHb (B).

Además, para la amplificación del plásmido pAdTrack FSHb se transformaron bacterias *E. coli*. Como resultado de la transformación fueron seleccionadas 2 colonias cuyos ADN plasmídicos se purificaron para realizar un chequeo por restricción de la correcta construcción del plásmido pAdTrack FSHb. Se realizaron dos screening mediante digestiones enzimáticas, uno con la enzima *EcoRI* y el segundo con el conjunto de enzimas *EcoRI/NdeI*, las cuales están ubicadas en el mapa de restricción del plásmido.

De acuerdo al software SnapGene, la digestión del pAdTrack FSHb con la enzima *EcoRI* resultó en dos bandas de 6476 bp y 3347 bp (carril 2, Figura 8A). Y, la digestión con el conjunto

de enzimas *EcoRI/NdeI* forman 4 bandas de 5601 bp, 2473 bp, 875 bp y 874 bp (carril 3, Figura 8A). En la Figura 8B observamos que las 2 muestras presentaron patrones de bandas similares a lo simulado con el software. Esto comprueba que ambas muestras contenían el plásmido pAdTrack FSHb comprobado por digestión enzimática y que el plásmido fue construido correctamente.

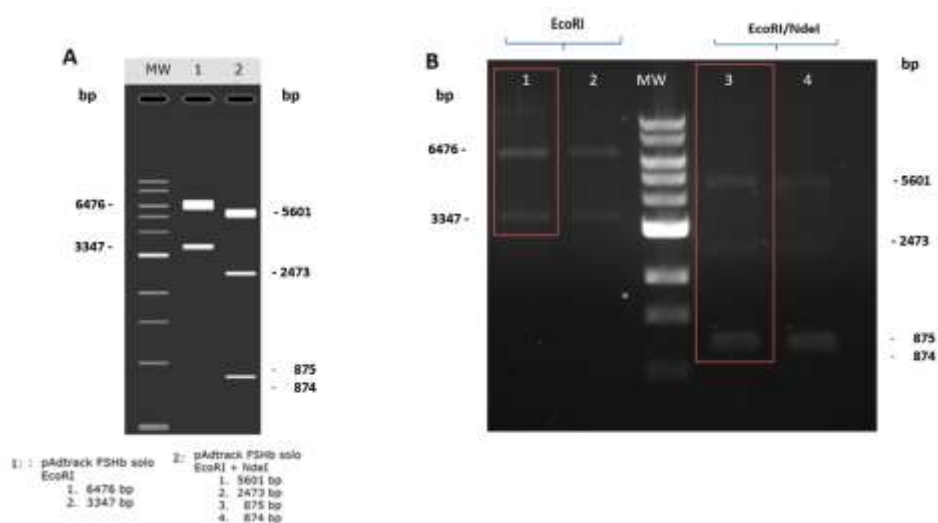


Figura 8. Evaluación de transformantes con el plásmido pAdTrack FSHb

Nota: **A.** Simulación en gel de digestión enzimática del plásmido pAdTrack FSHb **1:** pAdTrack FSHb digerido con *EcoRI*, **2:** pAdTrack FSHb digerido con *EcoRI/NdeI*. Software: SnapGene. **B.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1 y 2:** muestra 1 y 2 de ADN plasmídico digerido con *EcoRI*, **3 y 4:** muestra 1 y 2 de ADN plasmídico digerido con *EcoRI/NdeI*, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®).

Finalmente, el plásmido pAdTrack FSHb de la muestra 1 (recuadro rojo, carril 1 y 4, Figura 8B) fue amplificado a escala masiva, obteniéndose una concentración de 700 ng/μL del plásmido pAdTrack FSHb.

Los plásmidos transportadores obtenidos (pAd Track FSHb-ST6 y pAd Track FSHb) contenían parte del genoma del adenovirus humano serotipo 5 (Ad5), una señal de empaquetamiento (requerida para la producción viral en células mamíferas), un casete de expresión de GFP y las secuencias FSHb-ST6 o FSHb.

Una vez obtenidos los dos plásmidos transportadores pAd Track FSHb-ST6 y pAd Track FSHb, los resultados continuaron con la obtención de dos plásmidos recombinantes.

1.3. Generación de plásmidos recombinantes por recombinación homóloga.

Para garantizar la inserción de las secuencias FSHb y FSHb-ST6, provenientes de los plásmidos transportadores, en el pAdEasy-1 variante comercial fue necesaria realizar una recombinación homóloga.

El plásmido pAdEasy-1 contenía el genoma del Ad5 delecionado en los genes tempranos E1 y E3. La eliminación de estos dos genes virales creó un espacio para la inserción de ADN exógeno y eliminó la capacidad de auto-replicación de los adenovirus.

Para construir los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb, primero fueron linealizados ambos plásmidos transportadores pAdTrack FSHb-ST6 (11667 bp) y pAdTrack FSHb (9823 bp) (carriles 3, Figura 9A y B).

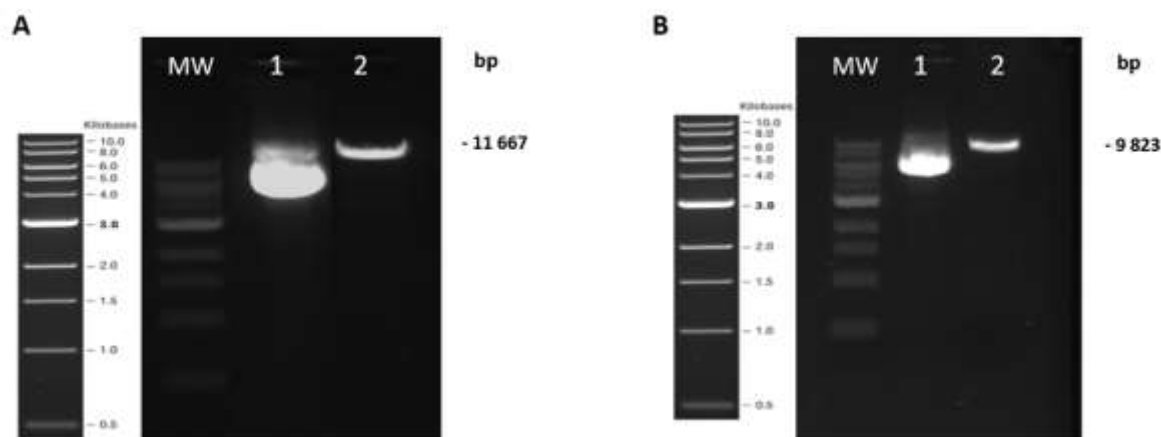


Figura 9. Linealización plásmidos pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb.

Nota: **A.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** vector pAdTrack FSHb-ST6 circular, **2:** vector pAdTrack FSHb-ST6 lineal, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®). **B.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** vector pAdTrack FSHb circular, **2:** vector pAdTrack FSHb, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®)

Consecutivamente, los plásmidos transportadores pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb lineales fueron co-transformados junto con el plásmido pAd-Easy-1 en bacterias *E. coli* BJ5183, en las cuales se dio la recombinación homóloga, obteniéndose los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb.

Cabe recalcar que el vector pAdEasy-1 tuvo un peso molecular aproximado de 33,5 kb, por lo que se estimó que los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb tenían un peso de aproximadamente 40 kb cada uno, tamaño aproximado en el manual AdEasy™ Vector System y comprobado en la Figura 10.

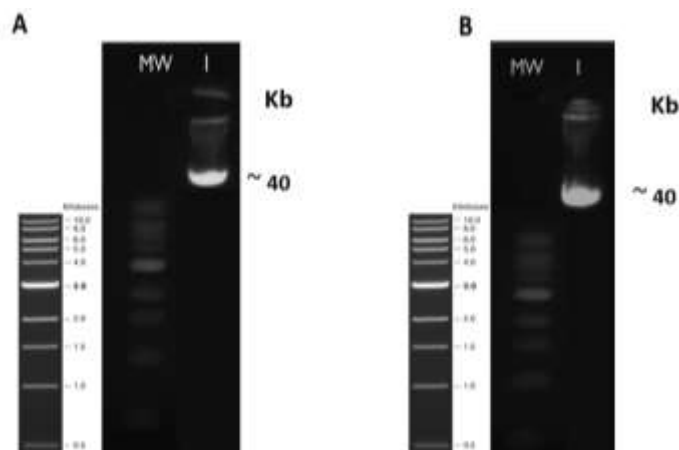


Figura 10. Plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb
 Nota: **A:** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** Plásmido recombinante pAdEasy FSHb-ST6, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®). **B:** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** Plásmido recombinante pAdEasy FSHb.

Después, se realizó un chequeo mediante digestión enzimática para comprobar la correcta construcción de los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb en las diferentes colonias bacterianas. Para el screening se utilizó la enzima *PacI* por recomendación del manual AdEasy™ Vector System. La digestión con *PacI* de los plásmidos recombinantes resulta en dos fragmentos según el manual AdEasy™, el uno de aproximadamente 35 kb y el otro de 3,5 kb a 4,5kb. Se esperaban estos fragmentos al evaluar los posibles recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb.

La Figura 11 corresponde con el screening de las colonias transformadas con el plásmido recombinante pAdEasy FSHb-ST6, en la cual se observó que se obtuvieron dos fragmentos de 35 kb y 4,5 kb de los plásmidos digeridos de las colonias 1 y 3 (carriles 1 y 3), lo que permitió catalogar

a estas muestras como transformantes positivos del plásmido recombinante pAdEasy FSHb-ST6, lo que no ocurrió con la muestra 2 (carril 3), ya que, además de los fragmentos que se obtienen normalmente de 35 kb y 4,5 kb, presentó una banda extra de aproximadamente 3 kb, no predicho en el manual AdEasyTM. El fragmento extra de 3kb pudo ser obtenido por una modificación del plásmido debido a recombinaciones no deseadas en la cepa BJ5183.

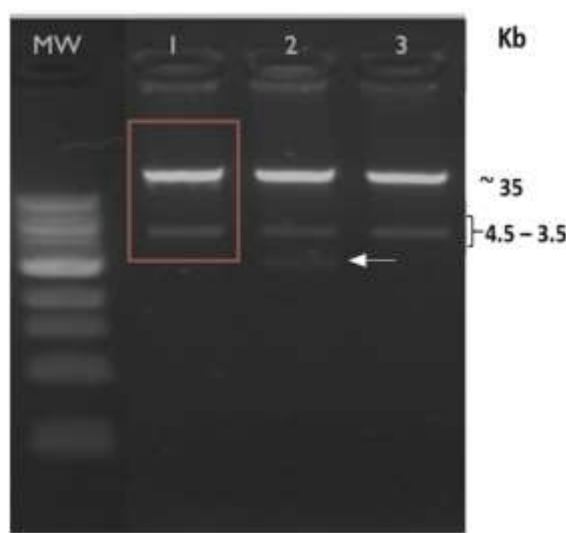


Figura 11. Evaluación de recombinantes pAdEasy FSHb-ST6

Nota: **1 a 3:** Plásmidos digeridos con Pac1, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®).

La Figura 12 corresponde a la evaluación de las colonias transformadas con el plásmido recombinante pAdEasy FSHb, se observa que los plásmidos aislados de las colonias 1 y 2 (carriles 2 y 3) fueron identificadas como recombinantes positivos ya que se obtuvieron dos fragmentos de 35 kb y 4,5 kb, no ocurriendo con las muestras 3 y 4 (carril 4 y 5), ya que, en ambos casos, el tamaño de la banda pequeña fue de aproximadamente 2,5 kb, no expuesto en el manual AdEasyTM.

El fragmento de 2,5 kb suponemos fue obtenido por una modificación del plásmido debido a recombinaciones no deseadas en la cepa BJ5183.

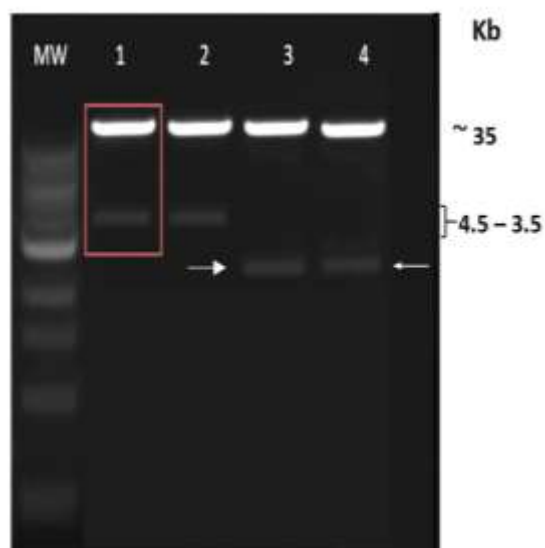


Figura 12. Evaluación de recombinantes pAdEasy FSHb

Nota: Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1 a 4:** Plásmidos digeridos con Pac1, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®).

Una vez que se confirmó la correcta construcción de los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb, se seleccionaron y fueron aislados de la cepa BJ5183 y propagados en otra cepa *E. coli* (DH5 α). La cepa DH5 α fue utilizada por su baja actividad de recombinación, logrando la amplificación masiva de los plásmidos recombinantes sin que sufran modificaciones no deseadas en su estructura, lo que podría haber ocurrido si los plásmidos permanecían en la cepa BJ5183.

Con la amplificación y purificación de ambos constructos pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb se obtuvieron concentraciones de 602,25 ng/ μ L y 750 ng/ μ L, respectivamente.

Definitivamente logramos con éxito los dos plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb que contienen: el genoma del Ad5 delecionado en la región E1 (útil en la replicación viral), la secuencia correspondiente a FSHb o FSHb-ST6, además de una señal de empaquetamiento para la transfección en células empaquetadoras. El trabajo de investigación continuó con la construcción de los adenovirus replicativos.

1.4. Transfección de plásmidos recombinantes adenovirales.

Para formar los adenovirus recombinantes, fue aprovechada la señal de empaquetamiento que contienen los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb. Además, la línea celular HEK 293 A provee la región E1 (ausente en plásmidos recombinantes) para formar los adenovirus recombinantes replicativos.

Primero, cada plásmido recombinante pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb fue digerido con la enzima de restricción *PacI*, obteniéndose dos fragmentos de 35 kb y 4,5 kb (carril 2, Figura 13A-B), lo cual sugiere la correcta digestión de los plásmidos recombinantes de acuerdo con el manual AdEasy™ Vector System, como se había explicado anteriormente.

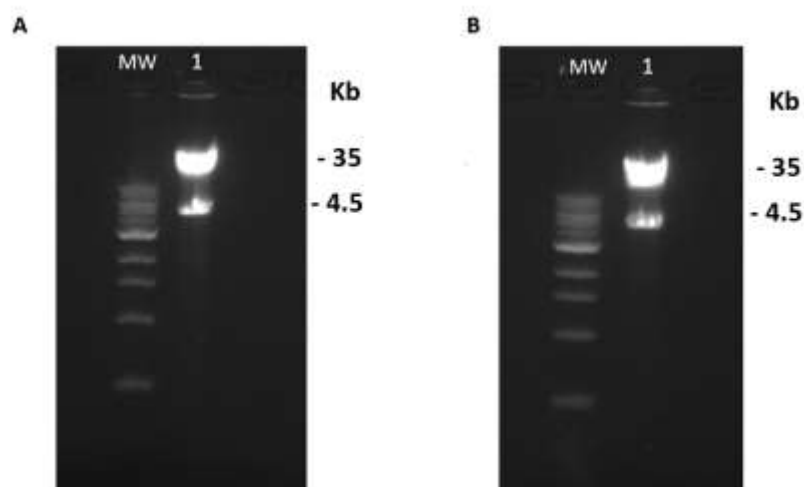


Figura 13. Análisis de restricción de plásmidos recombinantes pAdTrack FSHb-ST6 y pAdTrack FSHb con *PacI*.

Nota: **A.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** vector recombinante pAdTrack FSHb-ST6 lineal, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®). **B.** Fotografía de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1:** vector recombinante pAdTrack FSHb lineal, **MW:** Marcador de peso molecular, 1Kb (New England BioLabs®).

Para formar los adenovirus recombinantes se realizó la transfección de cada plásmido recombinante digerido (pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb) en la línea celular HEK-293 A. La eficiencia de transfección de los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb se monitoreó con la detección de GFP mediante observación directa del cultivo en el microscopio de fluorescencia (Figura 14A), en donde se observan células HEK-293A emitiendo fluorescencia verde debido al ingreso de los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb, los cuales contienen un casete de expresión para GFP.

La formación de halos de lisis alrededor de las células HEK 293 A fue un indicativo de la correcta formación de virus, lo que pudimos corroborar de 10-14 días post-transfección como se observa en la Figura 14B. Con este procedimiento, se logró la correcta formación de los adenovirus con capacidad de replicación AdFSH-ST6 y AdFSH, los cuales podrán replicarse en células mamíferas gracias a que ya cuentan con la región replicativa E1

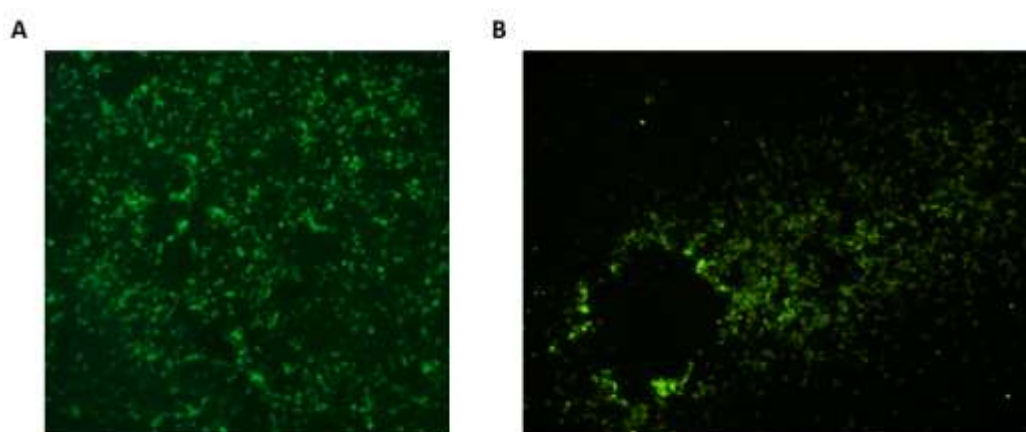


Figura 14. Generación de vectores adenovirales AdFSH-ST6 y AdFSH en la línea de empaquetamiento HEK-293A

Nota: **A:** Transfección del genoma adenoviral recombinante (AdFSH-ST6 y AdFSH) en la línea celular HEK-293 A.

B: Formación de halos de lisis. Microfotografías en campo oscuro con luz UV (40X).

2. Amplificación de los vectores adenovirales AdFSHb-ST6 y AdFSHb

Ambos adenovirus recombinantes AdFSHb-ST6 y AdFSHb fueron amplificados para disponer de la concentración suficiente y que sea posible transformar tanto células en cultivo como la glándula mamaria de cabra, la misma que, para ser transfectada necesita altos títulos virales.

Para la multiplicación de los adenovirus recombinantes AdFSHb-ST6 y AdFSHb fueron necesarios varios pases de infección en la línea celular HEK-293A, garantizando altos títulos virales.

Como se observa en la Figura 15 A y B existió un incremento en el efecto citopático y en la expresión de GFP a las 48 horas de transfección, lo que sugirió que los adenovirus recombinantes (AdFSHb-ST6 y AdFSHb) se multiplicaron correctamente en la línea celular HEK 293 A.

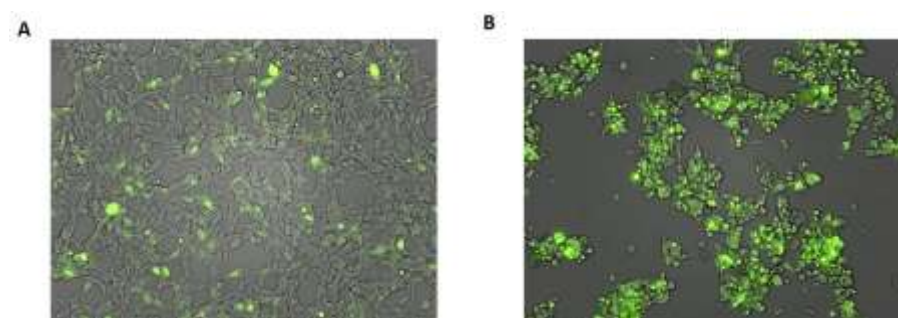


Figura 15. Amplificación de AdFSH-ST6 y AdFSH en la línea celular HEK-293 A
Nota: **A:** Amplificación 24 h post-infección. **B:** Amplificación 48 h post-infección.
Microfotografías en campo oscuro con luz UV (100X).

Los adenovirus recombinantes AdFSHb-ST6 y AdFSHb, al tener la capacidad de infectar células mamíferas, sirvieron como herramienta para la expresión de las proteínas FSHb y FSHb-ST6. Para lograr la expresión de FSHb y FSHb-ST6, se utilizaron células en cultivo y glándula mamaria de cabras. Estos resultados se detallan a continuación.

3. Expresión de las variantes de FSH bovina en células SiHa

Utilizamos la línea celular SiHa para realizar un screening de expresión de las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 mediante transducción de los adenovirus recombinantes AdFSHb-ST6 y AdFSHb en estas células. Esto fue posible ya que las células SiHa tienen la ventaja de expresar en su superficie celular los receptores coxsackie adenovirus (CAR) que permiten la transducción de adenovirus y así la expresión de genes exógenos.

El seguimiento del experimento se realizó observando la expresión de GFP y el efecto citopático en los cultivos SiHa transformados con los adenovirus recombinantes AdFSH-ST6 y AdFSH. Como se observa en la Figura 16, el efecto citopático incrementó en los cultivos a las 48 horas post-transducción (Figura 16C), indicando la correcta replicación de los adenovirus en células SiHa. Además, el aumento del color verde intenso a las 48 horas se correlaciona con elevados niveles de expresión de GFP intracelular. Esto indicó que la infección de células SiHa con los adenovirus recombinantes fue exitosa y que las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 podrían ser expresadas en cultivo junto con la proteína GFP.

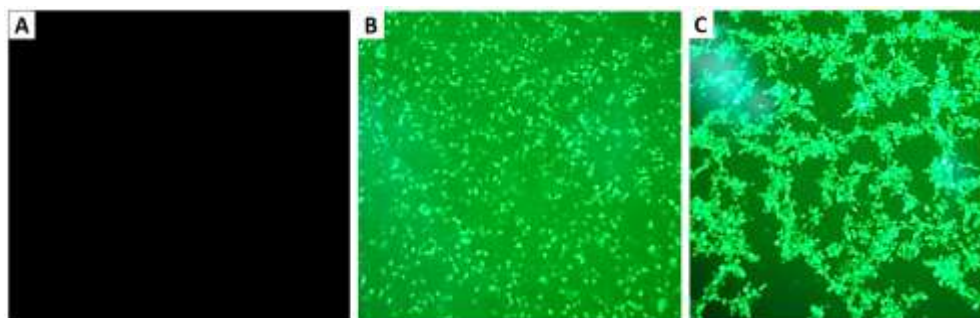


Figura 16. Cultivo de células SiHa transducidas con AdFSH-ST6 y AdFSH. Nota: **A:** Control de células SiHa sin transducir, **B:** Células SiHa 24 horas post transducción, **C:** Células SiHa 48 horas post transducción. Microfotografías en campo oscuro con luz UV (100X)

Finalmente, se requirió corroborar que las proteínas FSHb-ST6 y FSHb fueron efectivamente expresadas por las células SiHa en el medio de cultivo. En el diseño de ambas proteínas (FSHb-ST6 y FSHb) incluimos una tag de histidina, el mismo que fue utilizado para la inmunoidentificación de FSHb-ST6 y FSHb utilizando el marcaje con un anticuerpo anti-histidina (anti-6xHis).

En la Figura 17, se observó la presencia de ambos productos de 42 kDa expresados en células SiHa, tanto para la proteína recombinante FSHb (carril 3), como para FSHb-ST6 (carril 4). Además, como control positivo se utilizó una FSH humana previamente desarrollada en el laboratorio cuyo peso molecular es similar a la FSH bovina, de 42 kDa (carril 1).

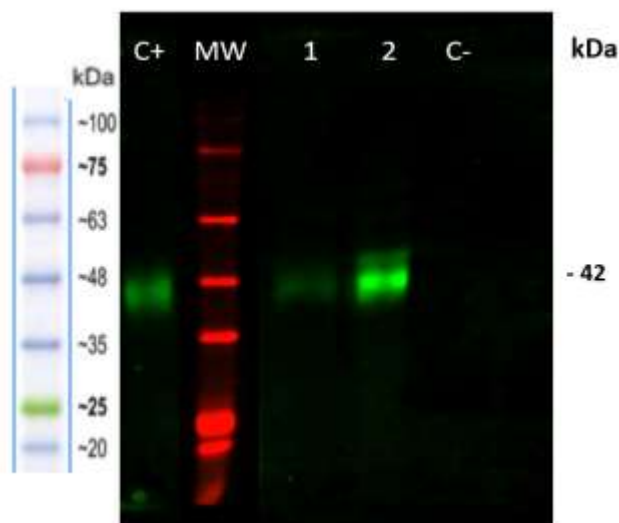


Figura 17. Análisis de la expresión de FSHb-ST6 y FSHb en la línea celular SiHa transducidas con AdFSHb-ST6 y AdFSHb.

Nota: Western blot, utilizando un anticuerpo anti-His en una dilución 1/5000, seguido de un anti-IgG de ratón en una dilución 1/10 000. **C+:** Control positivo FSH humana, **MW:** Marcador de peso molecular AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder (kDa), **1:** FSHb a partir de medio de cultivo de SiHa a las 48 horas, **2:** FSHb-ST6 a partir de medio de cultivo de SiHa a las 48 horas, **C-:** control negativo, medio de cultivo de células no transducidas.

Con este resultado, comprobamos que línea celular SiHa expresó con éxito proteínas mediante la transfección con adenovirus. Además, fue demostrado que las proteínas expresadas se trataban de las proteínas recombinantes FSHb-ST6 y FSHb debido al correcto marcaje con el anticuerpo anti-histidina además, la talla esperada de 42 kDa fue la correspondiente.

Una vez concluidos los experimentos *in vitro*, llevamos a cabo la expresión de las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 utilizando la glándula mamaria de cabra como biorreactor. Estos resultados se detallan en la siguiente sección.

4. Expresión de las variantes de FSH bovina en glándula mamaria de cabra

La transducción *in situ* del epitelio mamario con vectores adenovirales permitió obtener altas cantidades de proteínas recombinantes en leche. El análisis de la expresión de las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6, al igual que en la sección anterior, tomó ventaja del tag de histidina presentes en ambas proteínas.

Como se observa en el Western Blot de la Figura 18A (carriles 1-7), la expresión de la proteína FSHb-ST6, de aproximadamente 42 kDa, fue lograda satisfactoriamente, obteniéndose la FSHb-ST6 en leche a partir del siguiente día (D1) en que el virus AdFSHb-ST6 fue inoculado en la cabra.

Asimismo, en el Western Blot de la Figura 18B (carriles 1-7) observamos que la proteína FSHb, de aproximadamente 42 kDa, se obtuvo en leche a partir del siguiente día (D1) en que el virus AdFSHb fue inoculado en la cabra. Como control negativo en ambos ensayos se utilizó el suero de leche de glándula mamaria no transducida y como control positivo la FSH humana desarrollada previamente en el laboratorio, también de 42 kDa aproximadamente

También, evidenciamos que, la expresión de ambas proteínas FSHb y FSHb-ST6 (Figura 18A y B) disminuyó con el tiempo, sugiriendo una neutralización por anticuerpos anti-adenovirus producidos por la cabra. Lo cual impide la posterior reutilización de este sistema en ese animal.

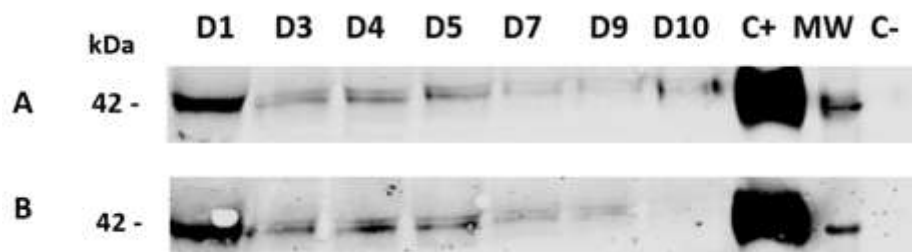


Figura 18. Análisis de la expresión de FSHb-ST6 y FSHb en glándula mamaria de cabras transducidas con AdFSHb-ST6 y AdFSHb.

Nota: Western blot, utilizando un anticuerpo anti-His en una dilución 1/5000, seguido de un anti-IgG de ratón en una dilución 1/10 000. **C+:** Control positivo FSH humana, **C-:** control negativo, suero de leche de glándula mamaria de cabra no transducida. **MW:** Marcador de peso molecular AccuRuler RGB Plus Prestained Protein Ladder (kDa). **A: D1-D10:** FSHb-ST6 a partir de suero de leche de días 1, 3, 4, 5, 7, 9 y 10, **B: D1-D10:** FSHb a partir de suero de leche de días 1, 3, 4, 5, 7, 9 y 10.

Una vez obtenidas las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6, los resultados fueron dirigidos a la purificación de ambas proteínas para los ensayos subsecuentes de análisis del patrón de glicosilación y actividad de las hormonas en un modelo animal.

5. Análisis del patrón de glicosilación y actividad folículo estimulante

Se llevó a cabo la purificación de las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 obtenidas en cultivo de células SiHa para eliminar otras proteínas producidas por las células que no eran de nuestro interés. Para lo cual, tomamos en cuenta la presencia del tag de histidina en ambas proteínas, por lo que, fue realizada con la matriz IMAC Sepharose High Performance cargada con Sulfato de níquel.

Iniciamos por la purificación de la proteína FSHb del medio de cultivo de SiHa, siendo el medio de cultivo la fracción inicial de purificación. Como resultado de la purificación se obtuvieron 4 fracciones: fracción no unida (denominada NB), fracción de equilibrio (denominada EQ), fracción de lavado (denominada W) y fracción de elución (denominada E). La fracción de elución es la cual contiene la proteína de interés después de la purificación.

En la Figura 19 se observó que la muestra de cultivo inicial de proteína FSHb quedó atrapada en la matriz de purificación y no se descargó en ninguna fracción ya sea fracción no unida, de equilibrio, de lavado, o de elución. Esto se constató debido a la presencia de proteína únicamente en la fracción inicial (carril 3) ya que en los demás carriles (4-7) no se detecta la presencia de proteína FSHb, por lo que, desafortunadamente, esta muestra se perdió.

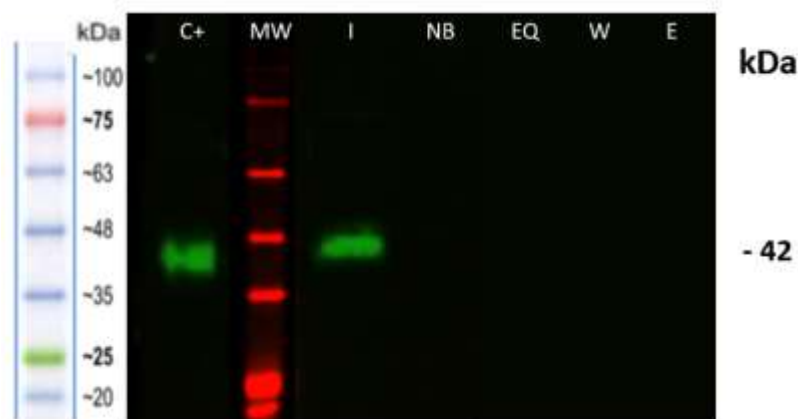


Figura 19. Análisis de la purificación de FSHb con la matriz IMAC Sepharose High Performance

Nota: Western blot de proteínas expresadas en cultivo celular SiHa, utilizando un anticuerpo anti-His en una dilución 1/5000, seguido de un anti-IgG de ratón en una dilución 1/10 000. **I:** fracción inicial, **NB:** fracción no unida, **EQ:** solución de equilibrio, **W:** solución de lavado, **E:** solución de elución.

Este método de purificación requiere posiblemente de otras condiciones para obtener las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 puras y con los resultados hasta aquí obtenidos pudimos confirmar que se expresaron por vía recombinante dos variantes de la hormona folículo estimulante (FSH) bovina, una de ellas conteniendo la secuencia de la sialiltransferasa ST6. Estas modificaciones en la estructura de la FSH son útiles para lograr un aumento en la bioactividad en circulación de la FSH bovina, reduciendo las dosis de administración y permitiendo un manejo más fácil de los animales. Además, se elimina el riesgo de contaminación con otras hormonas, logrando obtener la FSH bovina pura.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Varios investigadores han usado diferentes sistemas de expresión para producir hormonas puras recombinantes (Gifre, Arís, Bach, & Garcia-Fruitós, 2017). La producción de este tipo de proteínas ofrece una manera segura, eficiente y económica de superar la necesidad de productos biofarmacéuticos (Colman, 1998).

Específicamente, la expresión de la FSH bovina se ha llevado a cabo en varios sistemas de expresión como en levaduras (Qian et al., 2009; Samaddar, Catterall, & Dighe, 1997), líneas celulares de mamíferos (Min et al., 2003; Wilson et al., 1993), células de insectos (van de Wiel et al., 1998), plantas (Dirnberger et al., 2001), glándula mamaria de ratonas (Greenberg et al., 1991) y glándula mamaria de conejas (Coulibaly et al., 2002). La línea células de ovario de hámster chino (CHO) se ha elegido preferiblemente para producir proteínas recombinantes a nivel comercial, como es el caso de la FSH bovina. Sin embargo, Khodarovich (2013) concluye que el cultivo de células de mamíferos es caro debido al uso de medios de crecimiento y suplementos costosos, además de su lento crecimiento (Khodarovich, Goldman, Sadchikova, & Georgiev, 2013).

El desarrollo de proteínas en la leche de animales genera productos de alta calidad y rentables, preservando el bienestar animal (Castro, Toledo, Sánchez, & Rodríguez, 2010). Es por esta razón que se ha buscado desarrollar la FSH bovina recombinante en un sistema de expresión

de alto rendimiento, como lo es la glándula mamaria de cabra. Además, se ha incorporado una modificación que permitirá el aumento de la bioactividad en circulación, lo cual, ha sido una problemática sin resolverse.

Recientemente, la leche de cabra se ha utilizado por su mayor expresión de proteínas recombinantes (cientos de kilogramos por año) a diferencia de otros mamíferos pequeños como conejos o ratones que producen menores cantidades de proteínas recombinantes (kilogramos por año), como se ha visto en la investigación de Fan & Watanabe (2003). Adicionalmente, una cabra lactante puede producir hasta 600-800 L de leche por año en comparación con otros animales como el ratón que produce 0,0015 L, el conejo con 1-1,5 L y cerdos y ovejas que producen 200-400 L de leche. Cada litro de leche de cabra puede contener aproximadamente 5 g de proteína recombinante, llegando a producir 4 kg de proteína por año (Wang et al., 2013), a diferencia en conejos cuya producción es de 0,002 kg de proteína recombinante, y en cerdos y ovejas con una producción de 1,5 kg y 2,5 kg, respectivamente (Houdebine, 2009).

Se han desarrollado varias proteínas recombinantes en la leche de cabras no transgénicas, especialmente proteínas humanas como la antitrombina III, producida por Yang et al. (2009), la hormona de crecimiento, producida por Sanchez, Toledo, Rodriguez, & Castro (2004), la eritropoyetina (J. R. Toledo et al., 2006), entre otras proteínas (Moura et al., 2011). La transducción *in vivo* de la glándula mamaria ha sido presentada como una alternativa rápida y costo-efectiva para llevar a cabo la expresión de proteínas por las células epiteliales mamarias. Además, para

lograr la transducción *in vivo* se puede tomar ventaja de vectores adenovirales como herramientas para la expresión de genes exógenos (Sanchez et al., 2004).

Los adenovirus recombinantes representan una herramienta versátil para la transducción de la mayoría de tipos celulares y tejidos (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zeng, et al., 2017). Varias características han hecho de estos virus los vectores de elección para la entrega de transgenes. Por ejemplo, su estabilidad genética, su alta eficiencia de transducción, su facilidad de producción a larga escala (He et al., 1998) y la posibilidad de obtener altos títulos virales (1×10^{13} partículas/mL), a diferencia de otros vectores como virus adeno-asociados (AAV) (1×10^{11} partículas/mL), lentivirus (1×10^9 partículas/mL), virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) (1×10^9 partículas/mL) y baculovirus (2×10^8 partículas/mL) (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zeng, et al., 2017), lo que lo hace uno de los sistemas más eficientes.

Convencionalmente, se ha utilizado el adenovirus humano tipo 5 (Ad5) para la construcción de vectores adenovirales. Su genoma está organizado en genes tempranos (E1, E2a, E2b, E3 y E4), intermedios (IVA2, IX) y tardíos (L1, L2, L3, L4 y L5). La mayoría de los vectores adenovirales son construidos a partir del Ad5, en los cuales los genes E1 (que participa en la replicación del virus) y E3 (que participa en la modulación de la respuesta inmune de las células infectadas) son deletados (Sharon & Kamen, 2018). Las regiones E1 y E3 son reemplazados por un casete de hasta 7,5 kb logrando la expresión de genes exógenos (Wold, 2013). Dichos vectores además han

sido ampliamente utilizados como vacunas expresando proteínas antigénicas foráneas o aplicándolos como terapia génica (Deal, Pekosz, & Ketner, 2013), demostrando su gran eficiencia.

El método más usado para generar adenovirus recombinantes es el sistema AdEasyTM-Vector System, el cual se basa en la recombinación homóloga entre el vector pAdEasy-1, que contiene el genoma adenoviral delecionado en E1 y E3, y un vector “transportador” que contiene secuencias del genoma adenoviral y el casete de expresión que reemplaza a E1 como lo detallan Lee y colaboradores (2017). El sistema comercial AdEasyTM-Vector System ha demostrado ser un sistema robusto para la generación de adenovirus recombinantes y ha sido ampliamente utilizado como sistema de transferencia de genes exógenos en varios estudios (J. Luo et al., 2007; J. R. Toledo et al., 2008, 2006; Yang et al., 2009).

En el diseño del vector transportador pAdTrack FSHb-ST6 se incorporó un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), el cual ha sido reportado que permite la expresión de dos genes con alto rendimiento. En este caso, ambos genes (FSHb y ST6) dependen del mismo promotor CMV. El IRES permite el inicio de la transcripción cap-independiente del gen aguas abajo (FSHb), mientras que el inicio de la transcripción del gen aguas arriba es cap-dependiente (ST6), permitiendo la transcripción de ambos genes en un solo ARNm (Komar & Hatzoglou, 2011). Esta estrategia ha sido utilizada además por Yang (2009) para expresar la antitrombina humana junto con la proteína GFP, obteniendo una alta expresión de ambas proteínas.

La recombinación homóloga es un paso clave para la construcción de adenovirus recombinantes y se realiza en la cepa BJ5183 de *Escherichia coli*, gracias a la actividad de la proteína RecA, altamente eficiente en estas bacterias. Este paso es crítico y se debe tener en cultivo el menor tiempo posible debido a que la actividad RecA de las bacterias BJ5183 es alta y existe la posibilidad de que se produzcan recombinaciones no deseadas y que la estructura del plásmido recombinante se modifique (Lee, Bishop, Zhang, Yu, Farina, Yan, Zhao, Zeng, et al., 2017). Para evitar esto, una vez formados los plásmidos recombinantes, se los extrae de las células BJ5183 para amplificarlos en bacterias con recombinación homóloga deficiente. En esta investigación se utilizaron bacterias DH5 α para amplificar los plásmidos recombinantes. Yang y colaboradores (2009) también utilizaron bacterias DH5 α para propagar el plásmido recombinante pAd-hAT (antitrombina). Mientras que, Romualdo (2016) utilizó células *E. coli* TOP 10 para propagar un plásmido de expresión de la eritropoyetina humana (Romualdo & Rojas, 2016), siendo un resultado obtenido por este grupo de investigación.

Los plásmidos resultantes de la recombinación (pAdEasy-FSHb ST6 y pAdEasy-FSHb) se identificaron mediante análisis de restricción con la endonucleasa *PacI* (Figura 13), obteniendo fragmentos de 35 kb y 4,5kb, lo que coincidió con lo descrito en bibliografía (J. Luo et al., 2007). Este patrón de bandas indica, según el manual AdEasyTM Vector System de Qbiogene, que la recombinación se logró exitosamente entre los orígenes de replicación y los brazos derechos de ambos plásmidos recombinantes y el plásmido pAdEasy-1.

Posterior a la recombinación, se produce una molécula simple de ADN que codifica todos los genes necesarios para la producción de virus mediante la transfección en células empaquetadoras (HEK-293 A) (J. Luo et al., 2007), para lo cual, se usó el reactivo Lipofectamine® 2000. Los liposomas catiónicos se usan comúnmente como reactivo de transfección para facilitar el ingreso de DNA exógeno en las células (Hirko, Tang, & Hughes, 2003). Varios investigadores han usado el reactivo Lipofectamine® 2000 obteniendo transfecciones exitosas en células HEK-293 A para la construcción de adenovirus (Cardarelli et al., 2016; Romualdo & Rojas, 2016; J. R. Toledo et al., 2006).

Posterior a la transfección, la expresión de GFP fue visible luego de 24 horas post transfección en el 60-70% de las células, estimada cualitativamente, representando la fracción de las células que fueron transfectadas. Esta expresión no se desvaneció, y a los 10 días post-transfección empezaron a aparecer los halos de lisis (Figura 14). Los halos de lisis, según Luo y colaboradores (2007), son indicativos de que el vector viral comenzó a multiplicarse eficientemente en la línea de empaquetamiento.

La amplificación de los virus y la expresión de estas proteínas recombinantes toma ventaja del receptor coxsackie adenovirus (CAR) presente en la superficie basolateral de la mayoría de las células mamíferas (Castro et al., 2010). La cantidad de receptores CAR en células SiHa junto con el tropismo natural del adenovirus Ad5 por células mamíferas (Sharma, Li, Bangari, & Mittal, 2009), permitió la óptima transducción de este modelo celular. En la investigación de Benavente

(2018), se obtuvieron resultados favorables en la expresión de una variante del antígeno tumoral humano CA 125 de cáncer de ovario, utilizando también la línea celular SiHa. Adicionalmente, la expresión de FSH bovina no se ha reportado previamente en la línea celular SiHa.

Se ha reportado que, para la expresión de la eritropoyetina humana en la glándula mamaria de cabra, fue utilizada una concentración de 1×10^9 de VP/ml de adenovirus para la transducción de la glándula (J. R. Toledo et al., 2006). Por lo tanto, para la expresión de las proteínas FSHb y FSHb-ST6 en la leche de cabra, la amplificación de los adenovirus AdFSHb y AdFSH-ST6 en la línea de empaquetamiento HEK 293 A fue un paso muy importante para obtener altos títulos virales. Por otro lado, para la expresión de un candidato vacunal contra el virus de la fiebre porcina, los adenovirus fueron infundidos en la glándula mamaria a una concentración de 5×10^9 de VP/ml (J. R. Toledo et al., 2008). En otra investigación, en la cual expresan la antitrombina recombinante, Yang y colaboradores (2009) utilizaron una concentración de adenovirus de 1×10^{10} de VP/ml. Sin embargo, en este trabajo, para la expresión de FSHb y FSHb-ST6, utilizamos un título de 2×10^8 VP/ml de adenovirus, demostrando que es posible lograr la expresión de proteínas recombinantes aplicando una menor concentración de virus, optimizando tiempo y recursos.

Si bien obtuvimos con éxito ambas proteínas FSHb y FSHb-ST6 en leche de cabra, su expresión disminuyó con el tiempo; lo cual, ha sido observado también en la expresión de otras proteínas recombinantes usando la glándula mamaria de cabras (Russell et al., 2003; J. R. Toledo et al., 2006; Yang et al., 2009). En un estudio previo de Pasioka, Guerin, & Mitchell (1967) se

demostró la presencia de anticuerpos anti-adenovirus en la leche después de la infusión de adenovirus en glándulas mamarias de cabra. Estos anticuerpos por ende podrían contribuir a la disminución de la expresión de estas proteínas. Sin embargo, el potencial de este sistema se refleja en el alto rendimiento de la expresión de proteínas recombinantes por cada animal transfectado.

Desafortunadamente, la purificación de la proteína FSHb a partir de medio de cultivo celular de SiHa no fue exitosa con el protocolo previamente desarrollado ya que las proteínas se quedaron unidas a la matriz de purificación. En este caso se utilizó 200 mM de imidazol como solución de elución. En bibliografía se reporta que, para la elución de proteínas con tag de histidina se debe utilizar una concentración de al menos 200 mM de imidazol, como lo reportan Loughran, Bree, & Walls (2017) el cual, al ser un análogo de histidina eluye competitivamente los residuos de polihistidina unidos. Con estos antecedentes, se debería probar mayores concentraciones de imidazol para eluir la proteína de interés y apoyarnos en otro protocolo de purificación. Además, si altas concentraciones de imidazol no son adecuadas para la elución, el pH de la columna puede disminuirse para eluir la proteína recombinante. Al bajar el pH, el anillo de histidina se protona y la proteína etiquetada con histidina se desprende de la columna, como lo detallan Bornhorst & Falke (2000). Con este resultado desfavorable, no se pudo continuar con el análisis de glicosilación ni la actividad folículo estimulante.

En esta investigación se han añadido modificaciones en la estructura de la FSHb al incorporar la secuencia ST6GAL1. La enzima β -galactósido- α 2,6-sialiltransferasa (ST6GAL1)

transfiere ácido siálico con enlace $\alpha 2,6$ a la galactosa terminal de muchas glicoproteínas, incluyendo la FSH, estableciendo el patrón de glicosilación final (Kuhn et al., 2013). Se ha corroborado que esta adición de glicanos es importante para el ensamblaje, integridad, secreción y transducción de señales en las subunidades α y β de la FSH (Ulloa-Aguirre, Timossi, Damián-Matsumura, & Dias, 1999). Los glicanos pueden llevar diferentes tipos de modificaciones postraduccionales como fucosilaciones, sulfataciones y sialilaciones parciales o completas con enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ (Dalpathado et al., 2006). Sin embargo, la FSH producida naturalmente contiene glicanos con una mezcla de ácidos siálicos con enlaces $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ (Kumar, 2016).

Cabe destacar que la adición de glicanos no ha sido probada en la FSH bovina. Sin embargo, la adición de dos formas de ácido siálico ($\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$) se ha logrado en la FSH humana (Cottingham, Plaksin, & White, 2017), usando la línea celular Per.C6 (células de retina humana embrionaria) como sistema de expresión.

Previamente, se ha demostrado el rol de las glicosilaciones en la bioactividad en circulación de la FSH. En un estudio se evaluó el aclaramiento de dos variantes de FSH humana en ratas, una con un contenido mayor de ácido siálico, la cual mostró una tasa de aclaramiento menor (0.14 ml/min) a comparación de la FSH nativa (0.34 ml/min) (Alfredo Ulloa-Aguirre, Timossi, Barrios-de-Tomasi, Maldonado, & Nayudu, 2003). Como consecuencia, se ha visto que la exposición de residuos de galactosa en la FSH aumenta significativamente su tasa de aclaramiento del plasma. Así, las glicofomas de FSH más sialiladas circulan por un mayor tiempo que sus formas menos

acidas o menos sialiladas (a Ulloa-Aguirre et al., 1999). En otro estudio, trataron a corderos con dos preparaciones de FSH ovina, una purificada nativa y otra tratada con neuraminidasa. La hormona ácida o sialilada estimuló mejor la producción de estradiol y el crecimiento de los folículos estrogénicos que la hormona menos ácida (West et al., 2002).

El desarrollo de FSH sigue siendo un desafío en el mundo científico, muchos sistemas de expresión podrían probarse para obtener mejores rendimientos. Las variantes de FSH de alta pureza, eficiencia y estabilidad se pueden usar en el ganado para obtener un mayor número de óvulos y la posterior producción de embriones de una vaca seleccionada y así reducir el tiempo generacional y aumentar el potencial genético de su descendencia. La FSH bovina es de gran importancia en la producción de ganado con una alta implicación económica. El objetivo de la aplicación de FSH pura en los protocolos de superovulación es prevenir las variaciones en la calidad y cantidad de ovocitos. Además, que con las modificaciones en su estructura presente una mayor vida media en circulación.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la expresión de ambas proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 en glándula mamaria de cabra transformada, utilizando adenovirus recombinantes como herramientas de transducción de la glándula mamaria.
- Generamos vectores adenovirales conteniendo la secuencia de la FSH bovina, además incluimos la secuencia de la enzima ST6 para conferir un patrón de glicosilación mayor otorgando a la FSH una mayor bioactividad en circulación.
- La formación de los adenovirus recombinantes replicativos se llevó a cabo en la línea de empaquetamiento HEK 293A gracias a que las células complementan la región E1 (de replicación), ausente en plásmidos recombinantes.
- La expresión de las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 se logró además a nivel *in vitro* en células SiHa, aprovechando la expresión de receptores coxsackie adenovirus (CAR) que expresan estas células.
- Los resultados demuestran que la transducción del epitelio mamario de la cabra con un vector adenoviral es una alternativa viable para la producción de proteínas recombinantes en leche, siendo un método más eficiente a comparación del uso de líneas celulares.
- Este trabajo presenta una variante de la FSH bovina recombinante con opción a ser utilizada en los protocolos de superovulación del ganado vacuno para la obtención de un mayor

número de óvulos y así disminuir el tiempo generacional. Además, con la incorporación de la secuencia ST6, serán requeridas menos dosis de administración de la FSH debido a un aumento del tiempo de vida media.

RECOMENDACIONES

- Se podría añadir la secuencia de la enzima ST3GAL1 además de la ST6GAL1 para establecer un patrón de glicosilación mayor y más acercado a la hormona nativa.
- Aplicar el sistema de amplificación viral utilizando otras líneas celulares mucho más eficientes, como la línea celular PER.C6 derivada de células de retina embrionaria humana.
- Se podrían añadir más técnicas de screening como reacción de amplificación por PCR a los plásmidos recombinantes pAdEasy FSHb-ST6 y pAdEasy FSHb e identificar la presencia del gen de la FSH bovina en ambos casos y de la secuencia ST6.
- Estandarizar los protocolos de purificación para obtener las proteínas recombinantes FSHb y FSHb-ST6 libres de contaminantes.
- Realizar la validación del patrón de N-glicosilación para determinar el tipo de estructuras presentes en las proteínas.
- Una vez obtenidas las variantes de la FSH puras, se recomienda realizar ensayos en modelos murinos para medir la capacidad superovulatoria de las hormonas.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, B. B., & Papkoff, H. (1981). Relationship of sialic acid residues to in vitro biological and immunological activities of equine gonadotropins. *Biology of Reproduction*, 24(5), 1082–1087. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6791715>
- Ali, M., & Moustafa M, Z. (2016). Effectiveness of a recombinant human follicle stimulating hormone on the ovarian follicles, peripheral progesterone, estradiol-17 β , and pregnancy rate of dairy cows. *Veterinary World*, 9(7), 699–704. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.699-704>
- Añazco, J., & Vinueza, N. (2017). *Desarrollo de las estructuras ováricas en respuesta a la aplicación de dos gonadotropinas supeovulatorias en bovinos (PMSG y FSH-P)*. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/13423>
- Andino, P. (2014). *Evaluación de dos programas de superovulación en vacas lecheras*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Ararooti, T., Niasari-Naslaji, A., Razavi, K., & Panahi, F. (2017). Comparing three superovulation protocols in dromedary camels: FSH, eCG-FSH and hMG. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 18(4), 249–252. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5767630/>
- Baruselli, P. S., Ferreira, R. M., Sales, J. N., Gimenes, L. U., Sa Filho, M. F., Martins, C. M., ... Bo, G. A. (2011). Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76(9), 1583–1593.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.006>

Bird, C. (2011). Protein Purification Reagent Market Expands: Role in Biopharmaceutical, Diagnostic, and Basic Biomedical Research Increases Usage. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, 31, 14.

Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>

Bó, G. A., Rogan, D. R., & Mapletoft, R. J. (2018). Pursuit of a method for single administration of pFSH for superstimulation in cattle: What we have learned. *Theriogenology*, 112, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>

Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5–17. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90143-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90143-2)

Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). NIH Public Access. *Methods Enzymo*, 326, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>.Two-stage

Brinchmann, M. F., Patel, D. M., Pinto, N., & Iversen, M. H. (2018). Functional aspects of fish mucosal lectins—interaction with non-self. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051119>

Cahoreau, C., Klett, D., & Combarous, Y. (2015). Structure–Function Relationships of Glycoprotein Hormones and Their Subunits’ Ancestors. *Frontiers in Endocrinology*, 6, 26. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00026>

Callejas, S. S., Alberio, R., Cabodevila, J. A., Dulout, F., Aller, J., & Catalano, R. (2005). El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en

bovinos *. *Revista Argentina de Producción Animal*, 276(25), 63–73.

Capallejas, R. B., & Rodríguez, L. T. (2009). *Fisiología de la reproducción animal: con elementos de biotecnología*. Editorial Félix Varela. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=iTuxAQAACAAJ>

Cardarelli, F., Digiacomo, L., Marchini, C., Amici, A., Salomone, F., Fiume, G., ... Caracciolo, G. (2016). The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Scientific Reports*, 6(March), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25879>

Carvalho, P. D., Hackbart, K. S., Bender, R. W., Baez, G. M., Dresch, A. R., Guenther, J. N., ... Fricke, P. M. (2014). Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology*, 82(3), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.011>

Castro, F. O., Toledo, J. R., Sánchez, O., & Rodríguez, L. (2010). All roads lead to milk : Transgenic and non-transgenic approaches for expression of recombinant proteins in the mammary gland II . MAMMARY SPECIFIC EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS . THE CASE OF HUMAN EPO : NOT REALLY A “ PAVED ” WAY III . GLYCOSYLATION, 38(Supl 2), 615–626.

Colman, A. (1998). Production of therapeutic proteins in the milk of transgenic livestock. *Biochem Soc Symp*, 63, 141–147.

Corfield, A. (2017). Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and Cell Biology*, 147(2), 119–147. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1526-4>

- Cottingham, I., Plaksin, D., & White, R. (2017). Recombinant FSH including 2,3 and 2,6 sialylation.
- Coulibaly, S., Besenfelder, U., Miller, I., Zinovieva, N., Lassnig, C., Kotler, T., ... Brem, G. (2002). Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSH α /beta) produced in the milk of transgenic rabbits. *Mol Reprod Dev*, 63(3), 300–308. <https://doi.org/10.1002/mrd.90013>
- Crowe, M., & Mullen, M. (2013). *Regulation and Function of Gonadotropins Throughout the Bovine Oestrous Cycle*. (InTech, Ed.). <https://doi.org/10.5772/53870>
- Dalpathado, D. S., Irungu, J., Go, E. P., Butnev, V. Y., Norton, K., Bousfield, G. R., & Desaire, H. (2006). Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: Glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry*, 45(28), 8665–8673. <https://doi.org/10.1021/bi060435k>
- Davison, A. J., Benko, M., & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 84(Pt 11), 2895–2908. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19497-0>
- De Leeuw, R., Mulders, J., Voortman, G., Rombout, F., Damm, J., & Kloosterboer, L. (1996). Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). *Molecular Human Reproduction*, 2(5), 361–369. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.5.361>
- De Loof, A., Baggerman, G., Breuer, M., Claeys, I., Cerstiaens, A., Clynen, E., ... Vanden Broeck, J. (2001). Gonadotropins in insects: An overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 47(3), 129–138. <https://doi.org/10.1002/arch.1044>
- De Rensis, F., & Lopez-Gatius, F. (2014). Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: a review. *Reprod Domest Anim*, 49(2), 177–182.

<https://doi.org/10.1111/rda.12268>

Deal, C., Pekosz, A., & Ketner, G. (2013). Prospects for oral replicating adenovirus-vectored vaccines. *Vaccine*, *31*(32), 3236–3243. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.016>

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, *27*(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>

Derewenda, Z. S. (2004). The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods*, *34*(3), 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.024>

Desilver, D. (2016). How America's diet has changed over time. Retrieved from <http://www.pewresearch.org/fact-tank/2016/12/13/whats-on-your-table-how-americas-diet-has-changed-over-the-decades/>

Dirnberger, D., Steinkellner, H., Abdennebi, L., Remy, J. J., & van de Wiel, D. (2001). Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants. *Eur J Biochem*, *268*(16), 4570–4579.

Donaldson, L. E. (1985). LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow. *Theriogenology*, *23*(3), 441–447. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90016-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90016-0)

Dyck, M. K., Lacroix, D., Pothier, F., & Sirard, M. A. (2003). Making recombinant proteins in animals--different systems, different applications. *Trends Biotechnol*, *21*(9), 394–399. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(03\)00190-2](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(03)00190-2)

Fan, J., & Watanabe, T. (2003). Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models. *Pharmacol Ther*, *99*(3), 261–282.

FAO. (2019). Animal production | FAO | Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/animal-production/en/>

Ferr, L., Bogliotti, Y., Chitwood, J., Kjelland, M., & Ross, P. (2016). *234 HORMONAL FOLLICLE STIMULATION IN HOLSTEIN COWS FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION USING SPERM SORTED BY FLOW CYTOMETRY* (Vol. 28). <https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab234>

Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., & Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, *124*(3–4), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>

Genzebu, D. (2015a). A Review of Embryo Transfer Technology in Cattle. *Global Journal of Animal Scientific Research*, *2*(2), 120–126.

Genzebu, D. (2015b). A Review of Embryo Transfer Technology in Cattle.

Ghebremedhin, B. (2014). Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology & Immunology*, *4*(1), 26–33. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.4.2014.1.2>

Gifre, L., Arís, A., Bach, À., & Garcia-Fruitós, E. (2017). Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0654-4>

Greenberg, N. M., Anderson, J. W., Hsueh, A. J., Nishimori, K., Reeves, J. J., deAvila, D. M., ... Rosen, J. M. (1991). Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(19), 8327–8331. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52501/>

- He, T.-C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(5), 2509–2514. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2509>
- Hesser, M., Morris, J., & Gibbons, J. (2011). Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *46*, 933–942. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01767.x>
- Hesser, M. W., Morris, J. C., & Gibbons, J. R. (2011). Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation. *Reprod Domest Anim*, *46*(5), 933–942. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01767.x>
- Hirko, A., Tang, F., & Hughes, J. (2003). Cationic Lipid Vectors for Plasmid DNA Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(14), 1185–1193. <https://doi.org/10.2174/0929867033457412>
- Hopper, R. M. (2014). *Bovine Reproduction*. Wiley. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=XpM_BAAAQBAJ
- Houdebine, L. M. (2009). Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *32*(2), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.005>
- Kadokawa, H., Pandey, K., Nahar, A., Nakamura, U., & Rudolf, F. O. (2014). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors of cattle aggregate on the surface of gonadotrophs and are increased by elevated GnRH concentrations. *Anim Reprod Sci*, *150*(3–4), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.008>
- Khan, K. H. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced*

Pharmaceutical Bulletin, 3(2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>

Khodarovich, Y. M., Goldman, I. L., Sadchikova, E. R., & Georgiev, P. G. (2013). Expression of eukaryotic recombinant proteins and deriving them from the milk of transgenic animals. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(9), 711–722. <https://doi.org/10.1134/S0003683813090020>

Kimple, M. E., Brill, A. L., & Pasker, R. L. (2013). Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan ... [et Al.]*, 73, Unit-9.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73>

Kimura, K. (2016). Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *The Journal of Reproduction and Development*, 62(5), 423–429. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-066>

Komar, A. A., & Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: The war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle*, 10(2), 229–240. <https://doi.org/10.4161/cc.10.2.14472>

Kovesdi, I., & Hedley, S. J. (2010). Adenoviral Producer Cells. *Viruses*, 2(8), 1681–1703. <https://doi.org/10.3390/v2081681>

Kuhn, B., Benz, J., Greif, M., Engel, A. M., Sobek, H., & Rudolph, M. G. (2013). The structure of human -2,6-sialyltransferase reveals the binding mode of complex glycans. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(9), 1826–1838. <https://doi.org/10.1107/S0907444913015412>

Kumar, R. T. (2016). *Gonadotropins : from bench side to bedside*. Elsevier. Retrieved from <https://books.google.cl/books?id=vfxZCgAAQBAJ&pg=PA127&lpg=PA127&dq=fsh+α2,3+y+α2,6&source=bl&ots=cOqYWi2FpB&sig=P3nLifaKNJ9tDBKnzYcqOcuMItc&hl=es->

419&sa=X&ved=2ahUKEwiXqcX52ovfAhWlfZAKHartA2wQ6AEwAHoECAYQAQ#v=onepage&q=fsh α2%2C3 y α2%2C6&f=false

Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>

Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., ... He, T.-C. (2017). Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine. *Genes & Diseases*, 4(2), 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>

Looney, C., & Pryor, J. (2012). Novel bovine embryo transfer technologies in the United States. *Anim Reprod*, 9, 404–13.

Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2017). Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins. *Methods Mol Biol*, 1485, 275–303. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_14

Luo, C., Zuñiga, J., Edison, E., Palla, S., Dong, W., & Parker-Thornburg, J. (2011). Superovulation Strategies for 6 Commonly Used Mouse Strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 50(4), 471–478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3148645/>

Luo, J., Deng, Z.-L., Luo, X., Tang, N., Song, W.-X., Chen, J., ... He, T.-C. (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*, 2, 1236. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.135>

Maksimenko, O. G., Deykin, A. V., Khodarovich, Y. M., & Georgiev, P. G. (2013). Use of

- Transgenic Animals in Biotechnology: Prospects and Problems. *Acta Naturae*, 5(1), 33–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3612824/>
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2013). Innovative strategies for superovulation in cattle, 174–179.
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2014). Superovulation in Cattle. In *Bovine Reproduction* (pp. 696–702). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch75>
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2015). Superovulation in Cattle. In *Bovine Reproduction* (pp. 696–702). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118833971.ch75>
- Mapletoft, R. J., Guerra, A. G., Dias, F. C. F., Singh, J., & Adams, G. P. (2015). In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. *Anim. Reprod*, 12(3), 383–388. Retrieved from [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag383-388 \(AR747\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v12/v12n3/pag383-388 (AR747).pdf)
- Min, K. S., Kang, M. H., Yoon, J. T., Jin, H. J., Seong, H. H., Chang, Y. M., ... Chang, W. K. (2003). Production of Biological Active Single Chain Bovine LH and FSH. *Asian-Australas J Anim Sci*, 16(4), 498–503. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.498>
- Monniaux, D., Chupin, D., & Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19(1), 55–81. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90124-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90124-3)
- Montesino, R., & Toledo, J. (2006). *The mammary gland: Bioreactor for the production of recombinant proteins* (Vol. 23).

- Moura, R. R., Melo, L. M., & Freitas, V. J. de F. (2011). Production of recombinant proteins in milk of transgenic and non-transgenic goats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54, 927–938. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000500010&nrm=iso
- Mullen, M., Cooke, D., & Crow, M. (2013). Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species. *IntechOpen, Chapter 8*.
- Mullen, M. P., Cooke, D. J., & Crow, M. a. (2013). Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species. *Gonadotropin*, 155–180. <https://doi.org/10.5772/2918>
- Murphy, B. (2012). Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Animal Reproduction*, 223–230.
- Pasieka, A. E., Guerin, L. F., & Mitchell, C. A. (1967). Antibody production in milk serum after virus instillation of goat mammary gland. II. Biochemical isolation and purification of antibody to influenza virus. *Can J Microbiol*, 13(9), 1195–1201. <https://doi.org/10.1139/m67-164>
- Patel, D., Haque, N., Patel, G., Chaudhari, A., Madhavatar, M., Bhalakiya, N., ... Patel, P. (2018). Implication of Embryo Transfer Technology in Livestock Productivity. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(7), 1498–1510. Retrieved from ett
- Qian, W., Liu, Y., Zhang, C., Niu, Z., Song, H., & Qiu, B. (2009). Expression of bovine follicle-stimulating hormone subunits in a Hansenula polymorpha expression system increases the secretion and bioactivity in vivo. *Protein Expr Purif*, 68(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.07.008>

- Rahman, A. N. M. A. (2008). Hormonal Changes in the Uterus During Pregnancy - Lessons from the Ewe: A Review. *Journal of Agriculture & Rural Development*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.3329/jard.v4i1.761>
- Romualdo, E., & Rojas, S. (2016). " Expresión de una variante quimérica de eritropoyetina humana en la glándula mamaria como sistema productivo de proteínas recombinantes ".
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rudolph, N. S. (1999). Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol*, 17(9), 367–374.
- Russell, T. D., Fischer, A., Beeman, N. E., Freed, E. F., Neville, M. C., & Schaack, J. (2003). Transduction of the Mammary Epithelium with Adenovirus Vectors In Vivo. *J. Virol.*, 77(10), 5801–5809. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.10.5801-5809.2003>
- Samaddar, M., Catterall, J. F., & Dighe, R. R. (1997). Expression of biologically active beta subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 10(3), 345–355. <https://doi.org/10.1006/prev.1997.0745>
- Sanchez, O., Toledo, J. R., Rodriguez, M. P., & Castro, F. O. (2004). Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *J Biotechnol*, 114(1–2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.009>
- Santi, D., Potì, F., Simoni, M., & Casarini, L. (2018). Pharmacogenetics of G-protein-coupled receptors variants: FSH receptor and infertility treatment. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 32(2), 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.001>

- Scully, S., Evans, A. C. O., Duffy, P., & Crowe, M. A. (2014). Characterization of follicle and CL development in beef heifers using high resolution three-dimensional ultrasonography. *Theriogenology*, *81*(3), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.012>
- Sharif, M. A., Kohram, H., Zare Shahneh, A., Zolfagharian, H., Abedi Kiasari, B., & Hedayati, M. (2014). Production and Purification of Equine Chorionic Gonadotropin Hormone Using Polyclonal Antibody. *Iranian Journal of Biotechnology*, *12*(1), 30–34. <https://doi.org/10.5812/ijb.15137>
- Sharma, A., Li, X., Bangari, S., & Mittal, S. K. (2009). Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.010>
- Sharon, D., & Kamen, A. (2018). Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. *Biotechnology and Bioengineering*, *115*(1), 25–40. <https://doi.org/10.1002/bit.26461>
- Small, J. C., Kurupati, R. K., Zhou, X., Bian, A., Chi, E., Li, Y., ... Ertl, H. C. J. (2014). Construction and Characterization of E1- and E3-Deleted Adenovirus Vectors Expressing Two Antigens from Two Separate Expression Cassettes. *Human Gene Therapy*, *25*(4), 328–338. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.216>
- Springer, A. D., & Dowdy, S. F. (2018). Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics, *28*(3), 1–10. <https://doi.org/10.1089/nat.2018.0736>
- T Rajendra Kumar, J. S. D. (2014). Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants. *Journal of Glycomics & Lipidomics*, *04*(02), 1–10. <https://doi.org/10.4172/2153-0637.1000e117>
- Toledo, J. R., Sanchez, O., Montesino, R., Farnos, O., Rodriguez, M. P., Alfonso, P., ... Barrera,

- M. (2008). Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *J Biotechnol*, *133*(3), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.014>
- Toledo, J. R., Sanchez, O., Segui, R. M., Garcia, G., Montanez, M., Zamora, P. A., ... Cremata, J. A. (2006). High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J Biotechnol*, *123*(2), 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.019>
- Toledo, J., Ramos, O., Montesino, R., Fernandez, Y., A Cremata, J., & Rodríguez Moltó, M. P. (2005). *New procedure for production of biopharmaceutical proteins in the milk of non-transgenic animals* (Vol. 22).
- Tomac, J., Cekinović, D., & Arapović, J. (2011). Biology of the corpus luteum. *Periodicum Biologorum*, *113*(1), 43–49.
- Touyz, R. M., Jiang, L., & Ram Sairam, M. (2000). Follicle-Stimulating Hormone Mediated Calcium Signaling by the Alternatively Spliced Growth Factor Type I Receptor1. *Biology of Reproduction*, *62*(4), 1067–1074. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.1067>
- Uhlen, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., & Nilsson, B. (1992). Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, *3*(4), 363–369.
- Ulloa-Aguirre, a, Timossi, C., Damián-Matsumura, P., & Dias, J. a. (1999). Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine*, *11*(3), 205–215. <https://doi.org/10.1385/ENDO:11:3:205>
- Ulloa-Aguirre, A., & Timossi, C. (1998). Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update*, *4*(3), 260–283.

- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Barrios-de-Tomasi, J., Maldonado, A., & Nayudu, P. (2003). Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function of Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and in Vivo Models. *Biology of Reproduction*, *69*(2), 379–389. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016915>
- van de Wiel, D. F., van Rijn, P. A., Meloen, R. H., & Moormann, R. J. (1998). High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system. *J Mol Endocrinol*, *20*(1), 83–98.
- Vongpralub, T. (2013). Superstimulation of Follicular Growth in Thai Native Heifers by a Polyvinylpyrrolidone, *59*(2), 4–8.
- Wang, Y., Zhao, S., Bai, L., Fan, J., & Liu, E. (2013). Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. *BioMed Research International*, *2013*, 9. <https://doi.org/10.1155/2013/580463>
- West, C. R., Carlson, N. E., Lee, J. S., Mcneilly, A. S., Tejinder Sharma, P. A. L., Wen, Y. E., & Padmanabhan, V. (2002). Acidic mix of FSH isoforms are better facilitators of ovarian follicular maturation and E2 production than the less acidic. *Endocrinology*, *143*(1), 107–116. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8601>
- Wilson, J. M., Jones, A. L., Moore, K., Looney, C. R., & Bondioli, K. R. (1993). Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*, *33*(1), 71–82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90107-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90107-3)
- Wold, W. S. M. (2013). HHS Public Access. *Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy*, *13*(6), 421–433.
- Yang, H., Li, Q. W., Han, Z. S., Hu, J. H., Li, W. Y., & Liu, Z. Bin. (2009). Recombinant human

antithrombin expressed in the milk of non-transgenic goats exhibits high efficiency on rat DIC model. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 28(4), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s11239-009-0347-x>

Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>

Zhao, X., Li, G., & Liang, S. (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, 581093. <https://doi.org/10.1155/2013/581093>