



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**INMUNIZACIÓN ACTIVA CONTRA INHIBINA SOBRE LA RESPUESTA
REPRODUCTIVA EN RATONES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

JUAN GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR

DR. CARLOS LUNA PALOMERA

CO-DIRECTOR

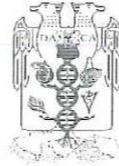
M.C. J. ARMANDO AGUILAR CABRALES

VILLAHERMOSA TABASCO, 31 DE MARZO DE 2017



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS TERMINALES

Asunto: Autorización de Impresión de
Trabajo Recepcional bajo la
Modalidad de: Tesis.

Fecha: 22 de marzo de 2017.

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON,
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
P R E S E N T E.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (la) **C. Juan González González**, con **matrícula 141C13052**, egresado(a) de la Licenciatura de **Medicina Veterinaria y Zootecnia**, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, Titulado: **"Inmunización activa contra inhibina sobre la respuesta reproductiva en ratones"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno.
Archivo
DR.RFB/MC.AMA

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNIVERSIDAD DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25 de la carr. fed. 195, tramo Villahermosa-Teapa
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México
Tel. (+52 993) 3581500-Ext. 6614
Correo electrónico: terminalesdaca@gmail.com

www.ujat.mx

www.facebook.com/ujat.mx | www.twitter.com/ujat | www.youtube.com/UJATmx

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de grado denominada **"Inmunización activa contra inhibina sobre la respuesta reproductiva en ratones"** de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la red abierta de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa Tabasco, a los 27 días del mes de Marzo del año 2017.

AUTORIZO



Juan González González

DEDICATORIA

A **Dios** por haberme guiado hasta este momento; a pesar de las caídas que tuve durante el camino me ayudó a levantarme y terminar un proyecto de vida.

A mi madre **Hilaria González Guerrero**, que gracias a ella fue posible alcanzar una meta más en la vida. Por su gran apoyo y esfuerzo que hizo para mi formación personal y profesional; no tengo palabras para expresar mi agradecimiento por todo lo que ha hecho en mi vida, "te amo mucho mamá"

A mis hermanos **Joaquín, Guillermo** y su familia que siempre me estuvieron apoyando en este proyecto de vida.

Irene, Ambrosio, Hilario, Cipriano, Belem, José Luis y a toda su familia, muchas gracias por su apoyo.

Carolina Hernández y Pedro González que Dios los tenga con él.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios**, por guiarme durante este camino, las oportunidades que me dio y haberme dejado llegar hasta este momento, por haberme dado fortaleza de siempre seguir adelante y amor a mi carrera de Médico Veterinario Zootecnista.

Gracias a mi madre **Hilaria González Guerrero** por siempre haber estado conmigo en este sueño que se termino de realizar, por darme todo el apoyo que necesite, por darme siempre todos esos ánimos de superación

A mi padre **Pedro González Anastasio** por haberme ayudado en mis inicios de estudio.

A mis hermanos:

Joaquín Ortiz González, Guillermo Ortiz González e Hilario Hernández González quienes me ayudaron mucho tiempo económicamente durante mi carrera y haber creído en mi; a **María Belem Ortiz González, Carolina Hernández González y Ambrosio Ortiz González** los cuales siempre estuvieron enseñándome y teniéndome la suficiente paciencia en mis inicios de primaria; **Irene Ortiz González** por brindarme su apoyo durante mis estudios en secundaria y también para **Cipriano González Guerrero, José. Luis Ortiz González** que de una u otra manera estuvieron en algún momento durante mi vida de estudiante

A las personas que estuvieron conmigo en el camino durante mi carrera universitaria:

La señora **Mari Carmen** su esposo el señor **Narciso** y sus hijos Oscar y Nancy quienes me brindaron su gran amistad y cariño cuando inicie mi carrera profesional.

A la M.V.Z **Cynthia Olivia Retureta González** por haberme dado su amistad, cariño, amor y apoyo en mi carrera; por darme siempre esos ánimos de tu si puedes, ya verás que pronto lo lograras.

Al Sr. Efraín Ayala Bandera que me brindo su amistad y su casa cuando estuve estudiando la secundaria, muchas gracias.

A la Sr. Rita González Valencia y su hijo José Fernando por ayudarme en momentos difíciles, brindarme su apoyo, amistad y cariño; muchas gracias por todo y un agradecimiento enorme.

A la Sr. Sabina López Hernández que me dio su cariño y amistad, por haberme ayudado muchas veces en las tareas de la escuela, un total agradecimiento.

También un agradecimiento especial para mis compañeras y amigas M.V.Z Valeria García Ignacio y M.V.Z Areli Velázquez Pérez; muchas gracias por brindarme su apoyo durante este proyecto de tesis.

Un agradecimiento especial para el Hermano **Miguel Ángel** de Juchitán Oaxaca.

No se me podía olvidar un gran agradecimiento muy especial para mis asesores Dr. **Carlos Luna Palomera** y el M.C. **Julio Armando Aguilar Cabrales**, quienes me estuvieron ayudando y apoyando mucho para terminar este proyecto.

A la comisión revisora: M.M. Gerardo Guillermo Vera y Cuspintera, M.C. Gabriela Garduza Arias, M.C. William Méndez y a la M.C. Iris Antonina.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por el financiamiento del proyecto UJAT-2014-IA-14 Evaluación del sistema prime boost en la inmunización activa con una vacuna de ADN contra Inhibina sobre la respuesta ovárica en ratas y ovejas, mediante el cual fue el posible realizar éstos estudios y el otorgamiento de una beca para esta tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVO GENERAL	4
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Cepas y estirpes de ratones de laboratorio	5
4.2. Fisiología y características del ciclo estral del ratón	6
4.3 Determinación del ciclo estral mediante citología vaginal.....	8
4.3.1 Toma de muestra.	8
4.3.2 Células que se observan en el frotis	8
4.4 Factores y control neuroendócrino que influyen la fertilidad del ratón	9
4.5 Función de la inhibina en el control de la tasa de ovulación y fertilidad..	10
4.6 Efectos de la inmunización contra inhibina sobre la tasa de ovulación ..	11
4.8 Sistemas Prime Boost en la inducción de la respuesta inmune.....	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Ubicación	14
5.2. Material Biológico	14
5.3 Alimentación	14
5.4 Manipulación y sujeción de los ratones hembra	15
5.5 Diseño experimental y tratamientos.....	15
5.6 Determinación de las etapas del ciclo estral por citología vaginal	17
5.7 Toma de muestra sanguínea y determinación títulos de anticuerpos.....	18

5.8 Evaluación de la camada.....	18
5.9 Análisis estadístico	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1. Citología del ciclo estral.....	19
6.2. Títulos de anticuerpos contra la cadena alfa de inhibina	22
6.3 Fertilidad, tamaño y peso de la camada	22
7. DISCUSIÓN	24
7.1. Etapas del ciclo estral.....	24
7.2 Títulos de anticuerpos.....	24
7.3 Fertilidad, tamaño y peso de camada.....	24
8 CONCLUSIONES	26
9 LITERATURA CITADA.....	27
ANEXO 1.....	34

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los ratones.....	5
Cuadro 2. Calendario de manejo y aplicación de vacunas en ratones hembras con plásmido de inhibina ADN (INHA ADN) más péptido recombinante de INHA y las control SS.....	16
Cuadro 3. Clasificación de las etapas del ciclo estral en los ratones hembra.....	17
Cuadro 4. Hembras que pasaron en diferentes etapas del ciclo estral del 9 al 13 de Noviembre.....	19
Cuadro 5. Relación de títulos de anticuerpos positivos/negativos, obtenidos en ratones inmunizados con 100 µg de una vacuna de ADN contra INHA y 100 µg péptido recombinante.....	22
Cuadro 6. Respuestas de ratones hembras a la inmunización activa mediante una vacuna de ADN contra INHA y su péptido recombinante.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de la citología vaginal y hormonas que intervienen en la regulación del ciclo estral en ratones.....	7
Figura 2. Alojamiento para las ratones en cajas de polietileno con bebederos y alimentos a libertad.....	14
Figura 3. Método de sujeción para manejo del ratón.....	15
Figura 4. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de proestro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción de células nucleadas.....	20
Figura 5. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de estro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción de células sin núcleo.....	20
Figura 6. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de metaestro a distintos aumentos. Nótese las características de leucocitos y de células sin núcleo.....	21
Figura 7. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de diestro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción células nucleadas, leucocitos y menor proporción células sin núcleo.....	21

RESUMEN

Para evaluar la antigenicidad de una vacuna de ADN contra la cadena alfa de Inhibina (INHA), se inoculó IM a un grupo de ratones Balb/c (INHA, n=9) 100 microgramos del plásmido de INHA, y 14 d después se inoculó IM 100 microgramos del péptido recombinante. El grupo control (n=8) recibió solución salina (SS). Se evaluó el tamaño de camada y los niveles de anticuerpo por ELISA. La fertilidad de los ratones fue similar entre INHA (67%) y control (60%). El tamaño de camada en INHA (8.67) fue mayor ($P<0.05$) al control (4.33). Se encontraron títulos de anticuerpo en 2.89 veces ($P<0.05$) en ratones inmunizados contra INHA comparados con el control. Se encontró que la vacuna de ADN contra INHA es capaz de inducir inmunidad contra la cadena alfa de INHA en ratones incrementando el tamaño de camada, sin un efecto negativo aparente en la fertilidad. Esta vacuna tiene la potencialización para incremento de la tasa de ovulación y tamaño de camada en animales de laboratorio, y podría tener el mismo efecto en animales domésticos.

1. INTRODUCCIÓN

Los protocolos tradicionales de ovulación múltiple (OM) y transferencia de embriones (TE) en animales domésticos, incluyen el uso del factor liberador de gonadotropinas (GnRH), o el empleo de la hormona folículo estimulante (FSH), gonadotropina coriónica humana (hCG) y gonadotropina coriónica equina (eCG) con respuestas ováricas y calidad embrionaria satisfactorias (Bó *et al.*, 2008; Forcada *et al.*, 2011). Sin embargo, estos tratamientos llegan a representar más del 50% de los costos de producción de un embrión (Bolívar *et al.*, 2008; Ruvuna *et al.*, 1992).

Un área de creciente interés es el desarrollo de métodos alternativos que contribuyen a incrementar la tasa ovulatoria en animales domésticos. Entre ellos se encuentra el uso de factores que regulan la foliculogénesis, tal como la inmunización contra la cadena alfa de inhibina (INHA) (Mao *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2008), lo cual permitiría que los niveles de FSH endógenos se incrementen induciendo ovulaciones múltiples (Sasaki, *et al.* 2006; Han *et al.*, 2014). Esto es posible mediante la inmunización activa administrando un antígeno específico, donde el individuo bajo experimentación responde desarrollando una respuesta humoral inmune (Tizar, 2009) contra la INHA, provocando el incremento en la liberación de FSH (Xia y Schneyer, 2010), lo que finalmente resulta en lo que se conoce como superovulación u ovulación múltiple.

Las vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) son producidas como estrategias en inmunoterapia específica para tratamientos de diversas enfermedades (Bonura y Colombo, 2011; Lee *et al.*, 2011), para dirigir inmunización activa contra componentes proteicos específicos de agentes infecciosos (Lodmell *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2000) o componentes proteicos específicos en sistemas de regulación endócrina (Han *et al.*, 2008, Han *et al.*, 2014).

Los roedores son modelos para el estudio del bloqueo inmunológico de factores ligados a la fertilidad y existen antecedentes que incluyen el bloqueo de secuencias específicas contra la INHA usando un péptido recombinante (32

aminoácidos (aa) con títulos de anticuerpo del 65% después del segundo refuerzo (Han *et al.*, 2008). De acuerdo a Han *et al.*, (2008), la respuesta reproductiva incluye el incremento en el número de folículos y tamaño de camada.

Recientemente en México se ha desarrollado una vacuna de ADN (péptido maduro de INHA con 105 aa) para inducir una respuesta específica contra INHA e inducir superovulación en ovejas, pero aún sin resultados claros (Luna, 2013; Grimaldo, 2013; Tinal y García, 2014).

La estrategia de inmunización prime boost basada en ADN de plásmido recombinante surgió en los años 1990's, como una metodología segura para inducir inmunidad en células B y T, larga y duradera. Pudiendo utilizarse por las vías nasal, subcutánea e intramuscular (Jackson *et al.*, 2014), sin afectar el ciclo estral normal.

Con la finalidad de mejorar la respuesta inmune de la vacuna de ADN y el péptido recombinante de la INHA modificada con los epítomos P2 y P30 de la toxina tetánica desarrollada en México, en el presente trabajo de investigación se propone usar un esquema de inmunización tipo prime-boost . Bajo este esquema se espera inducir títulos de anticuerpos y un efecto positivo sobre la fertilidad y tamaño de camada en ratones.

2. HIPÓTESIS

El uso de una vacuna de ADN y su antígeno recombinante, bajo un esquema prime boost, inducirá la respuesta inmune contra la cadena alfa de INHA, incrementando la actividad folicular, la tasa ovulatoria y el tamaño de camada en ratones.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune activa contra la INHA bajo un esquema prime boost empleando una vacuna de ADN y el antígeno recombinante de INHA, sobre los niveles de anticuerpos, el ciclo estral, fertilidad, tamaño y peso de camada en ratones.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las etapas del ciclo estral mediante fenotipos celulares vaginales en ratones hembra inmunizados activamente mediante un esquema prime-boost con vacunas de ADN y antígeno recombinante contra INHA.
- Determinar los títulos de anticuerpos contra INHA, en ratones inmunizados activamente mediante un esquema prime-boost con vacunas de ADN y antígeno recombinante con la prueba de ELISA.
- Evaluar la fertilidad, el tamaño y peso de la camada en ratones inmunizados activamente mediante bajo un esquema prime-boost con vacunas de ADN y antígeno recombinante contra INHA.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

El desarrollo y evaluación de sistemas de inmunización permiten modificar los sistemas fisiológicos de importancia en medicina veterinaria y producción animal. Para ellos actualmente hay disponible cepas y extirpes de ratones de laboratorio, que son usados en experimentación con la finalidad de generar conocimiento fisiológico del sistema en su estado natural. Esto aplica para ejemplo algunas hormonas y factores reguladores que intervienen en el crecimiento folicular, procesos de ovulación, la fisiología y características del ciclo estral, así como los factores y control neurológico que influyen en la fertilidad.

4.1 Cepas y estirpes de ratones de laboratorio

El ratón (*Mus musculus*) es una de las especies animales más empleadas en investigaciones biomédicas (Olivares, 2015). Su amplia variabilidad genética ha llevado a la producción de varias cepas, muchas de ellas empleadas en experimentos de laboratorio (Cuadro 1).

Algunas características lo han hecho idóneo para tal fin, entre las cuales se cuenta su prolificidad, lo cual permite establecer grandes colonias.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los ratones	
Phylum	<i>Chordata</i>
Subphylum	<i>Craniata</i>
Clase	<i>Mammalia</i>
Subclase	<i>Theria</i>
Infraclase	<i>Eutheria</i>
Orden	<i>Rodentia</i>
Suborden	<i>Miomorfa</i>
Familia	<i>Muridae</i>
Genero	<i>Mus</i>
Especie	<i>Musculus</i>

Olivares, 2015.

En base a esta característica es usada en experimentos en genética, embriología y nutrición. Otras investigaciones más se hacen en cáncer con cepas especializadas para tal fin. Otra característica que favorece su empleo como modelo es su fácil manejo y alimentación, lo cual lo hace económicamente redituable (Olivares, 2015; Heldrich y Nicklas 2012).

Olivares (2015) menciona que entre las cepas de ratones más empleadas se pueden destacar:

- a) Ratones Swiss y NMR1: estirpes utilizadas en farmacología y toxicología.
- b) Ratones BALB/c: cepa utilizada en la producción de anticuerpos.
- c) Ratones C57BL6, C3H: cepas consanguíneas empleadas como base (wild type) en líneas modificadas genéticamente.
- d) Ratones inmunosuprimidos (Swiss +/nu y BALB/c A-nude): atímicos y con un sistema inmunitario deficiente. Esta propiedad les hace susceptibles a cualquier tipo de enfermedad de una manera natural o inducida experimentalmente. Se utilizan en inmunología en estudios de regulación de la respuesta inmunitaria, como modelos de deficiencia linfocito de origen tímico o en la producción de anticuerpos monoclonales.
- e) Ratones con mutaciones inducidas, animales transgénicos.

4.2. Fisiología y características del ciclo estral del ratón

El ciclo estral del ratón se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y el comienzo del siguiente. Su duración es variable, siendo en las hembras de rata y ratón de cuatro a cinco días. Intervienen las mismas hormonas y factores reguladores del crecimiento y ovulación, y hormonas que intervienen en la caracterización del ciclo estral (McLean *et al.*, 2012), como se pueden observar en la Figura 1

Sin embargo, la identificación de las etapas del ciclo estral del ratón están relacionadas a características en fenotipos celulares, las cuales se describen a continuación:

El **proestro** tiene una duración de 12 horas, caracterizado por labios vulvares ligeramente hinchados y vagina seca. Cuando se realiza frotis vaginal se observa gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos (Figura 1). En esta etapa puede ocurrir calor sexual (puede haber aceptación del macho).

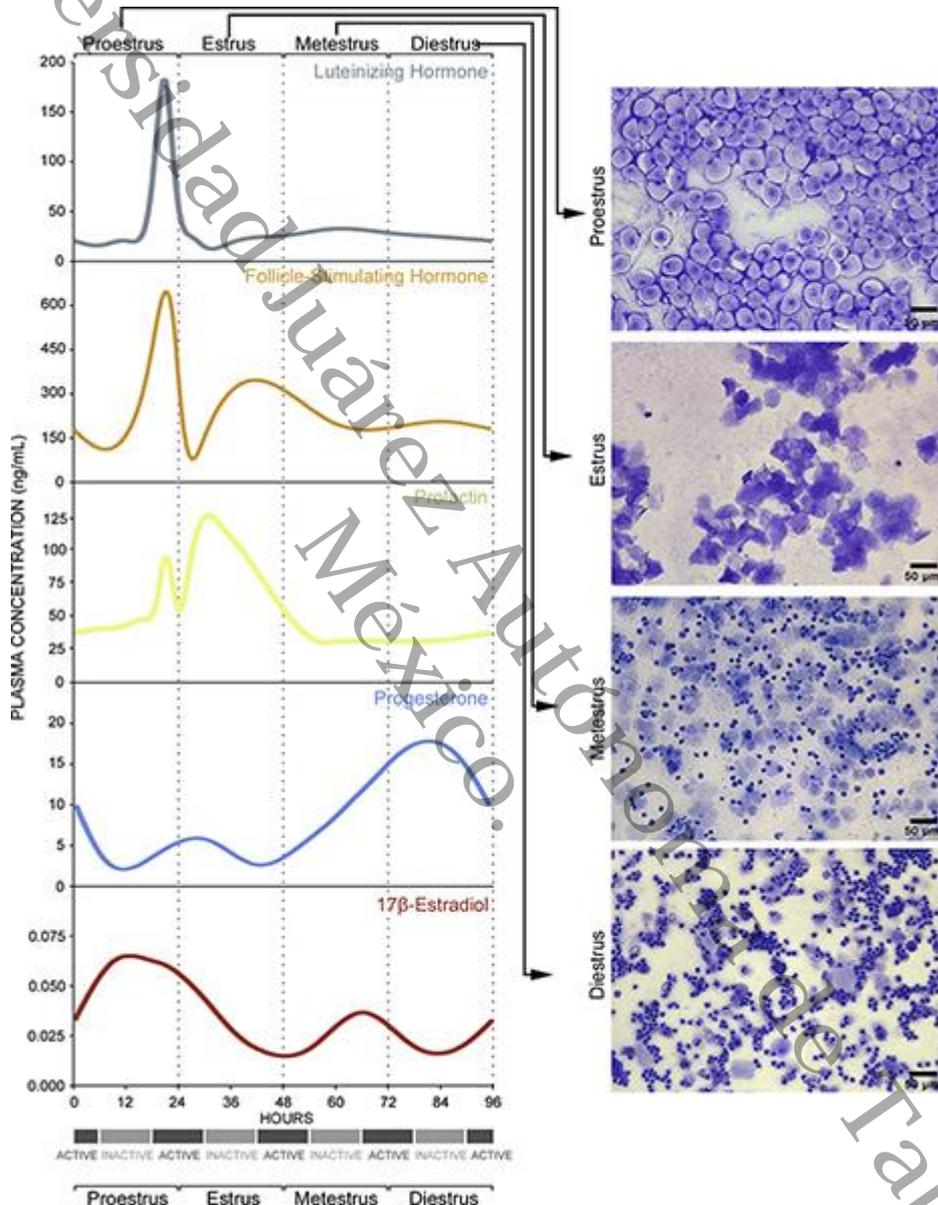


Figura 1. Características de la citología vaginal y hormonas que intervienen en la regulación del ciclo estral en ratones. Tomado de McLean *et al.*, 2012.

El **estro** tiene una duración de 12 horas, caracterizado por labios vulvares hinchados y vagina seca. Cuando se realiza frotis vaginal se observa gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas

sin núcleo visible) y pocas células nucleadas (Figura 1). En esta etapa hay calor sexual, hay aceptación del macho con copula.

El **metaestro** tiene una duración de 21 horas, caracterizado por labios vulvares ligeramente hinchados y una masa caseinosa en la vagina. Cuando se realiza un frotis vaginal se observa buena cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas (Figura 1). En esta etapa hay ovulación y no hay calor sexual (no hay aceptación del macho).

El **diestro** tiene una duración de 65 horas, caracterizado por labios vulvares normales (no hinchados o engrosados) y mucosa vaginal húmeda. Cuando se realiza frotis vaginal se observa gran cantidad de leucocitos, pocas células queratinizadas y a veces, algunas células nucleadas (Figura 1). En esta etapa no hay aceptación del macho (De la Cruz Rosa *et al.*, 1998).

4.3 Determinación del ciclo estral mediante citología vaginal

La citología vaginal, generalmente en combinación con análisis hormonales, puede proporcionar información valiosa a cerca del estado del ciclo ovárico.

Para la evaluación de la citología vaginal se hace mediante la prueba de Papanicolaou (Cowell *et al.*, 2009), la cual consiste en obtener muestras de las células introduciendo un bastoncillo de algodón en la vagina en dirección craneal. Cuando no hay descarga vaginal, el algodón del bastoncillo se puede humedecer con suero salino estéril para evitar molestias.

4.3.1 Toma de muestra. El bastoncillo se debe dirigir en dirección craneodorsal al entrar al vestíbulo vaginal, para evitar la fosa clitoriana; el epitelio queratinizado, habitualmente presente en la fosa, podría conducir a una interpretación errónea. Una vez que se encuentra craneal al orificio uretral, se raspa suavemente la pared vaginal. A continuación se transfieren las células a una lámina portaobjetos, haciendo rodar suavemente el bastoncillo y ejerciendo una presión mínima, para evitar la rotura de las células (Latimer *et al.*, 2005). La preparación se deja secar al aire antes de teñirla. Las tinciones rápidas, proporcionan un buen detalle morfológico.

4.3.2 Células que se observan en el frotis. Las células que se encuentran en el frotis vaginal son las basales (de la capa más profunda del epitelio

estratificado) y estas son el origen de todos los tipos de células epiteliales observadas en un frotis, se describen como células pequeñas con núcleos redondos y una relación núcleo a citoplasma elevado.

Las células parabasales son células redondas pequeñas, con núcleos vesiculares redondos y una pequeña cantidad de citoplasma y células superficiales, éstas son las más grandes que se ven en el frotis vaginal, son células muertas, cuyos núcleos se vuelven picnóticos (reducción del tamaño del núcleo) y se desvanecen, generalmente progresando hacia formas anuladas, su citoplasma es abundante, angular y plagado. El proceso de degeneración de las células del epitelio escamoso estratificado, para convertirse en células grandes, planas y muertas, se denomina cornificación (Latimer *et al.*, 2005; Cowell *et al.*, 2009).

4.4 Factores y control neuroendocrino que influyen la fertilidad del ratón

La actividad reproductiva de los animales suele presentar un modelo cíclico modulado por diversos factores tanto externos (temperatura, disponibilidad de alimento, entre otros) como internos (ritmos endógenos, cantidad de vitelos a depositar en los ovocitos, etc.). Esta actividad reproductiva es regulada por el sistema endócrino (Rodríguez, *et al.*, 1993). Otro factor importante al reproducir las ratas es el efecto Bruce que consiste en el bloqueo de la preñez en la etapa previa a la implantación si la hembra es expuesta a un macho extraño o a sus feromonas. Si la hembra es separada del macho con el que se apareo inmediatamente después de la cópula y después de 6 horas retorna con el mismo macho, el bloqueo se produce como si se tratara de un macho extraño (Geréz *et al.*, 2015).

Los preparativos para la crianza se inician tras recibir unas señales del medio ambiente, que son transformados en señales endocrinas. Estas señales son duración e intensidad de luz (fotoperiodo) y a veces la temperatura, visión, sonido, olor del sexo opuesto, estado nutricional del animal, cortejo y el despliegue de atenciones, entre otras. Estas circunstancias ambientales actúan como estímulos exteroceptivos que estimulan cierta transmisión nerviosa hacia el hipotálamo, el cual controla endócrinamente a la hipófisis. Esta última

produce a su vez la FSH y LH, hormonas que regulan la función ovárica y por tanto la reproducción (Rodríguez *et al.*, 1993).

4.5 Función de la inhibina en el control de la tasa de ovulación y fertilidad

El origen de las inhibinas, activinas y otras proteínas relacionadas estructuralmente como la hormona anti-Mülleriana, las proteínas morfogénicas de hueso (BMPs) y el factor de crecimiento y diferenciación (TGF) se han asignado a la superfamilia del factor- β de crecimiento transformante (TGF- β) (Chang *et al.*, 2002; Hafez y Hafez 2002).

La activina e inhibina son complejos de proteínas estrechamente relacionados que tienen efectos biológicos casi opuestos; (Asashima M, *et al.* 1990) la activina estimula la biosíntesis y secreción de FSH y participa en la regulación del ciclo estral. Las activinas, de igual manera son homodímeros compuestos por la subunidad β A (activina A), la subunidad β B (activina B) o heterodímeros compuestos por la subunidad β A y β B (activina AB). La inhibina es un heterodímero consistente de una subunidad α común, la cual puede estar ligada a una subunidad β A (Inhibina A) o a una subunidad β B (inhibina B) a través de puentes disulfuro (Miyamoto *et al.*, 1985; Mason *et al.*, 1985). La principal función de la inhibina A (INHA) es modular la producción de FSH en la pituitaria, la maduración folicular y esteroidogénesis (Knight 1996; de Kretser *et al.* 2002).

Esto es posible debido a que la INHA disminuye el número de receptores de GnRH en las células de la pituitaria (Wang *et al.*, 1991). Se ha establecido que la INHA, ejerce su acción compitiendo con la activina por los receptores ActII y ActI a través de los cuales se translocan al núcleo estimulando la transcripción de FSH. Sin embargo, la proteína ligadora de inhibina (InhBP) producida en los gonadotropos, al unirse con la subunidad B, permite a la inhibina unirse con mayor afinidad por los receptores tipo ActI. Por otro lado, los betaglicanos le permiten a la subunidad α de la inhibina ligarse con mayor afinidad a los receptores Act II (Risbridger *et al.*, 2001).

4.6 Efectos de la inmunización contra inhibina sobre la tasa de ovulación

Se han hecho diferentes esfuerzos para realizar la inmunización contra la INHA, utilizando **péptidos sintéticos** y **recombinantes**, así como **vacunas contra ADN**, todos ellos enfocados a lograr incrementar la tasa ovulatoria que eventualmente podría mejorar la obtención de ovocitos o en su caso de embriones en los animales sometidos al efecto de esta tecnología.

Estas observaciones muestran que la INHA es un regulador negativo de síntesis de FSH y su inactivación puede llevar a estados de superovulación. A continuación se describen algunos resultados más relevantes obtenidos con los diferentes tipos de inmunógenos desarrollados.

4.7.1 Péptidos sintéticos contra Inhibina. La estrategia de inactivación selectiva contra inhibina deberá estar dirigida a la subunidad α , pero no la subunidad β , de lo contrario se neutralizaría las dos formas de inhibina conocida (de Krester *et al.*, 2002). Esta inactivación o bloqueo puede ser alcanzada por medios inmunológicos.

Existen evidencias que la inducción de inmunidad contra la cadena alfa de la INHA lleva a un aumento en la foliculogénesis. Para esto se han empleado inmunógenos desarrollados con base en péptidos sintéticos a partir de secuencias cortas N-terminal de la subunidad α de la inhibina bovina, porcina, ovina y humana, conjugada con proteínas acarreadoras las que llevan a inducir una respuesta inmune.

Estos esquemas reportan buenas respuestas en el incremento en los niveles de FSH y la tasa ovulatoria (entre 150 y 330%) en ovejas y cabras (Wrathall *et al.*, 1992; Tannetta *et al.*, 1998; D'Alessandro *et al.*, 1999; Medan *et al.*, 2003), vacas (Glencross *et al.*, 1994; Morris *et al.*, 1993; Medan *et al.*, 2006), cerdas (King *et al.*, 1993), entre otros; sin embargo, la disponibilidad de péptidos sintéticos es limitada, su síntesis es costosa y las respuestas inducidas son muy variables.

4.7.2 Péptidos recombinantes. Otra alternativa exitosa ha sido la generación de INHA como proteína recombinante a través de la clonación en vectores de

expresión de fragmentos cortos N-terminal o la secuencia completa del péptido maduro aminoácidos (aa) del 165 al 300 de la subunidad α de inhibina. Experimentos de inmunización con INHA recombinante, empleando adyuvantes, han mostrado incrementos en los niveles de FSH y tasa de ovulación de 135 a 300% en ovinos (Forage *et al.* 1987; Padilla *et al.*, 2007), bovinos (Medan *et al.*, 2004) y porcinos (Brown *et al.*, 1990). La respuesta a la inmunización contra la INHA en ratas, bovinos, porcinos, ovinos, cabras, yeguas entre otros, han logrado, incrementos significativos en los niveles de FSH y la tasa de ovulación. En general, las proteínas recombinantes son pobres inmunógenos, requiere repetidas inmunizaciones y el empleo de adyuvantes.

4.7.3 Vacunas de ADN. Otro recurso de inmunización son las vacunas de ADN que se han empleado en inmunoterapia específica para dirigir respuestas inmune contra antígenos de agentes infecciosos o células cancerosas (Lodmell *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2000; Bonura y Colombo, 2011; Lee *et al.*, 2011). Estas vacunas consisten en plásmidos en los cuales previamente se clonan secuencias de genes, los cuales expresan el antígenos de interés bajo el control de un promotor constitutivo fuerte. Estos plásmidos se inyectan a tejidos y de alguna manera llegan al núcleo celular en donde se expresan produciendo el antígeno. Las vacunas de ADN son relativamente fáciles de producir con la capacidad de inducir una fuerte y duradera respuesta inmune humoral y celular (Garmory *et al.*, 2005).

El empleo de una vacuna de ADN que expresa la secuencia de los primeros 32 aa del péptido maduro de INHA produjo en ovejas un 42% de individuos con títulos de anticuerpos contra INHA y 39% de partos gemelares, con respecto al control (Han *et al.*, 2008).

La producción de anticuerpos permitiría usarlos bajo esquemas de inmunización pasiva generando anticuerpos contra INHA. Así hay estudios que han mostrado la efectividad de la administración de antisuero de INHA en incrementar los niveles de FSH induciendo ovulación múltiple (Mann *et al.* 1993). Muy probablemente la inmunización pasiva contra INHA puede ser un recurso de bajo costo en protocolos de superovulación.

4.8 Sistemas Prime Boost en la inducción de la respuesta inmune

Se ha observado que la administración de dosis repetidas de una vacuna conformada por un único vector es efectiva para incrementar los títulos de anticuerpos generados (dosis homólogas). Sin embargo, este tipo de estrategia resulta ineficiente para aumentar respuestas celulares, debido a que la respuesta inmune preexistente frente al vector evita una eficiente presentación de los antígenos (Gherardi y Esteban, 2005).

Para resolver esta limitación, en los últimos años se ha aplicado un esquema de inmunización capaz de potenciar la respuesta celular, basada en dosis seriadas, expresando el mismo antígeno desde distintos vectores (dosis heterólogas). Esta estrategia es conocida ampliamente por su designación en inglés "prime-boost" y fue en un principio utilizada para generar respuesta de células CD8+ frente a malaria, inmunizando primeramente con un vector basado en el virus influenza y luego administrando el antígeno en una segunda dosis desde un vector basado en el virus Vaccinia (Li *et al.*, 1993).

Actualmente, ésta es una de las estrategias más utilizadas en el campo del desarrollo de vacunas para VIH/sida, donde se puede encontrar combinación de vectores de ADN, como *prime*, y refuerzos o *boost* con vectores recombinantes (Shephard *et al.*, 2008; Bakari *et al.*, 2011). Este mismo principio se usará para inducir una respuesta inmune contra INHA en roedores.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Producción, Cuidado y Experimentación Animal (UPCEA) ubicado en la División Académica de Ciencias de la Salud (DACS) de la UJAT. Entre los meses de octubre de 2015 a abril de 2016.

5.2. Material Biológico

Se utilizaron 16 ratones hembras sexualmente maduras con 7 - 8 semanas de edad, de la línea genética Balb/c alojadas en 2 grupos (n=8 por grupo). Los ratones fueron alojadas grupalmente en cajas de polietileno (Figura 2) que contenían una cama de viruta esterilizada, la cama se cambiaba cada 8 días, el agua fue purificada bajo rayos gamma, bajo ambiente controlado con 12 horas de luz al día, temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y humedad relativa de $60 \pm 5\%$.

5.3 Alimentación

Los ratones fueron alimentados a libertad con alimento comercial (LabDiet 5008 Formulab Diet) con un contenido de proteína cruda mínimo de 23.0 %; grasa cruda mínimo de 6.5%; fibra cruda máximo de 4.0 %; cenizas máximo de 8.0% y humedad máxima de 12.0%. El alimento fue tratado con rayos gamma para que llegue libre de patógenos a los animales. Los ratones no fueron tratados previamente con ningún medicamento, a fin de evitar alguna alteración en los resultados.



Figura 2. Alojamiento para las ratones en cajas de polietileno con bebederos y alimentos a libertad.

5.4 Manipulación y sujeción de los ratones hembra

Para trasladarlos de una caja a otra se sujetaron de la cola y con cuidado se introdujeron en la caja que le corresponda.

Los métodos de sujeción deben de permitir la libre respiración y evitar oprimir demasiado el cuello y otras regiones para una libre circulación de aire o sangre

Para examinarlos por más tiempo los ratones se llevaron a una superficie rugosa contra la que pueda ejercer resistencia, luego se tomaron por la piel de la base del cuello con los dedos índice y anular, se giro 90° y sujetó de la cola entre el dedo meñique y la palma de la mano o entre el cuarto y quinto dedo, y desde esta posición se pudo manipular con mayor facilidad (como se ilustra en la Figura 3).



Figura 3. Métodos de sujeción para manejo de los ratones

5.5 Diseño experimental y tratamientos

Los ratones fueron asignados a dos tratamientos bajo un diseño completamente al azar como se describen a continuación:

Tratamiento 1 (n=8). El día 0 se aplicó vía intramuscular 100 µg de la vacuna de ADN con polietilenamina (PEI) como adyuvante (INHA ADN). El primer refuerzo o boost se aplicó vía intramuscular 14 días después con 100 µg del antígeno recombinante en adyuvante Montanide (INHA rec). Después del primer parto a los ratones se les dio un segundo refuerzo con las mismas dosis vacúnales (100 µg de INHA ADN + 100 µg de INHA rec).

Los inmunogenos empleados en los ratones, fueron desarrollados y producidos en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM. La primera consiste en una vacuna de ADN que tiene clonado el segmento del gen que codifica para el péptido maduro (305 pb) de la INHA en el vector de expresión

pCIneo (Promega) expresando las secuencias de aa 165 al 300, la cual fue modificada adicionando la secuencia de epítomos inmunomoduladores (P2 y P30 del toxoide tetánico). Para esta vacuna se empleó PEI como adyuvante.

El segundo, es un antígeno recombinante de INHA producido con el vector de expresión pET11a en *E. coli*, purificado por cromatografía de afinidad con agarosa Ni. Este antígeno se administró con el adyuvante Montanide ISA 71 VG™ (Seppic SA, Francia).

Tratamiento 2 o control (SS) (n=8). El día 0 se aplicó un volumen de solución salina similar al del tratamiento 1. El día 14 se aplicó una segunda dosis de solución salina (ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Calendario de manejo y aplicación de vacunas en ratones hembras con plásmido de inhibina ADN (INHA ADN) más péptido recombinante de INHA y las control SS.

Semana	Día	Tratamiento 1 n=8	Control (SS) n=8
-2	0	Citología vaginal	Citología vaginal
0	0	Inmunización intramuscular con 100 µg de vacuna INHA ADN	Aplicación de SS vía intramuscular
14	14	Inmunización intramuscular con 100 µg de péptido de INHA recombinante	Aplicación de SS vía intramuscular
Después del 1er parto		Refuerzo con 100 µg vacunas	Aplicación de SS vía intramuscular

5.6 Determinación de las etapas del ciclo estral por citología vaginal

Previo a la asignación de los ratones hembras a los tratamientos, se realizó un muestreo citológico de mucosa vaginal para comprobar que los ratones estuvieran ciclando (sexualmente activas) y como segundo paso diagnosticar la etapa del ciclo estral en que se encontraban.

Durante dos ciclos estrales se tomaron muestras de la mucosa vaginal cada 12 o 24 h (a las 8:00 am), usando hisopos de algodón impregnados con solución salina fisiológica estéril. Con la muestra se hizo extensión en el portaobjetos de cada ratón y posteriormente se fijó mediante un hemocolorante comercial (hemocolorante Diff Quick®). Las tinciones fueron observadas al microscopio bajo los objetivos de 10x, 40x y 100x para determinar los fenotipos celulares y definir a que etapa del ciclo estral correspondían (Cuadro 3).

Para lo anterior, se realizó un registro fotográfico con una cámara digital montada al microscopio. Las muestras vaginales fueron caracterizadas de acuerdo al tipo celular dominante en cada etapa del ciclo estral (Rodríguez, 1993) (ver Cuadro 3 y Figuras 1, 4 al 7).

Cuadro 3. Clasificación de las etapas del ciclo estral en los ratones hembra y fenotipo celular.				
	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Duración en horas	12	8-12	21	65
Fenotipo celular vaginal	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas y pocos leucocitos	Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas sin núcleo visible) y pocas células nucleadas	Buena cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales queratinizadas	Gran cantidad de leucocitos, pocas células queratinizadas y algunas células nucleadas

5.7 Toma de muestra sanguínea y determinación títulos de anticuerpos

Cuatro días después del apareamiento se sacrificaron por decapitación tres ratones de cada tratamiento, atendiendo las normas internacionales y la NOM-062-ZOO-1999. Las hembras restantes de cada tratamiento o grupo después del parto también fueron sacrificadas por decapitación y se tomaron muestras sanguíneas. En cada caso la sangre se recuperó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 5 min. Los sueros fueron almacenados a -20° C hasta la determinación de los niveles de anticuerpos, los cuales se determinaron por ELISA usando antígeno dializado y no dializado.

El procedimiento empleado para la realización de ELISA se describe a en el Anexo 1. El promedio de las densidades ópticas observadas en el grupo control fueron tomadas como la base. La diferencia en los títulos de anticuerpos de los ratones tratados con las vacunas de INHA se calcularon con base a la relación entre sus DO con respecto al grupo control como sigue:

$$\text{Títulos de Anticuerpo} = \frac{\text{DO promedio del grupo tratado}}{\text{DO promedio del grupo control}}$$

5.8 Evaluación de la camada

Con un marcador permanente las ratonas se identificaron en la cola, y cada semana se remarcaron. Al parto se registró el tamaño y peso de la camada (Bascula Citizen® modelo CT 602 con sensibilidad de 0.01 g), así como el número de crías vivas y muertas. Se evaluaron 2 partos consecutivos en las hembras que no fueron sacrificadas.

5.9 Análisis estadístico

En el caso de las frotis del Papanicolaou, se realizó una descripción fotográfica de las etapas del ciclo estral monitoreadas y comparadas con las reportadas en la literatura.

Los títulos de anticuerpos (%) evaluados por ELISA fueron evaluados mediante un análisis de varianza por el procedimiento GLM de SAS.

Las variables evaluadas fueron fertilidad, tamaño y peso de la camada. Los resultados en las variables se compararon por una prueba T mediante el procedimiento T de SAS.

6. RESULTADOS

Los resultados obtenidos de la citología de las distintas etapas del ciclo estral encontradas en los ratones bajo experimentación, así como los títulos de anticuerpos obtenidos, fertilidad, tamaño y peso de la camada se presentan a continuación.

6.1. Citología del ciclo estral

De las 16 hembras muestreadas, en 2 de ellas no se presentaron las características bien definidas de la etapa de ciclo estral que correspondía. En el Cuadro 4 se puede observar la cantidad de hembras que pasaron en diferentes etapas durante un ciclo estral completo (5 días).

Cuadro 4. Hembras que pasaron en diferentes etapas del ciclo estral del 9 al 13 de Noviembre

Etapas	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Hembras pasantes	13	13	6	15

Las distintas etapas del ciclo estral se caracterizaron por una presentación histológica bien diferenciadas (Figura 4 y 5). A continuación se presentan las fotografías tomadas en el microscopio a diferentes aumentos, con las características de las diferentes etapas del ciclo estral previo a la aplicación de la vacuna contra INHA.

En el proestro (Figura 4) se pueden apreciar con distintos aumentos (10X, 40X y 100X) las células nucleadas características de esta etapa, también se destaca la ausencia de leucocitos.

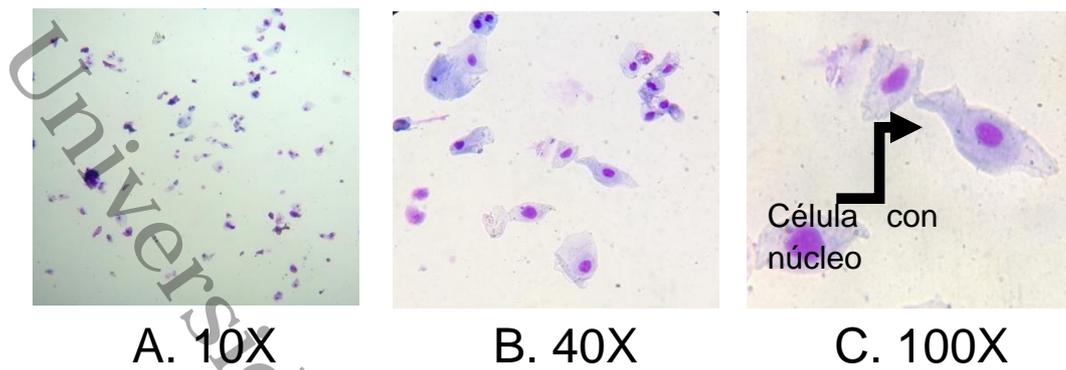


Figura 4. Micrografía de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de proestro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción de células nucleadas.

En el estro (Figura 5) se pueden apreciar con distintos aumentos (10, 40X y 100X) las células sin núcleo y una ausencia de leucocitos características de dicha etapa.

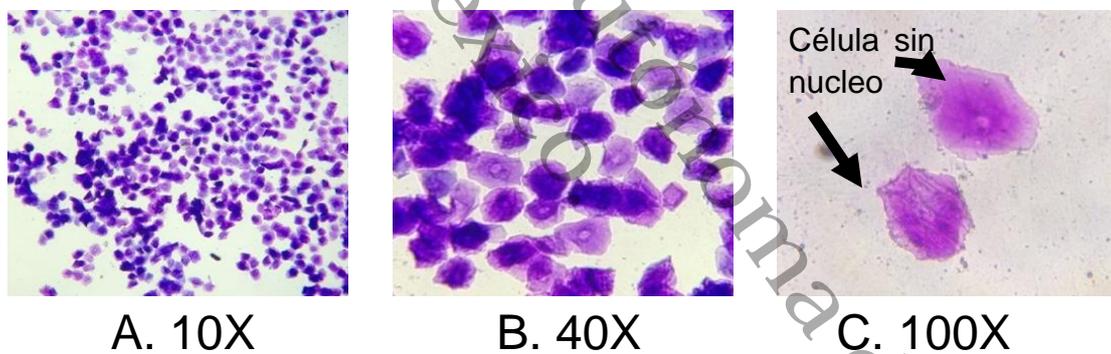


Figura 5. Micrografía de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de estro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción de células sin núcleo

En el metaestro (Figura 6) se aprecia con distintos aumentos (10X, 40X y 100X) las células sin núcleo y la presencia de leucocitos características de dicha etapa.

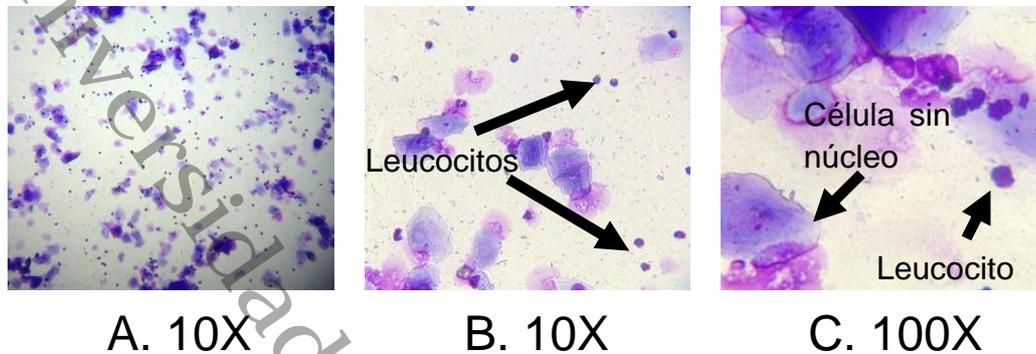


Figura 6. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de metaestro a distintos aumentos. Nótese las características de leucocitos y de células sin núcleo

En el diestro (Figura 7) se pueden apreciar con distintos aumentos (10X, 40X y 100X) las células con núcleo, muy pocas sin núcleo y presencia de leucocitos, características de esta etapa.

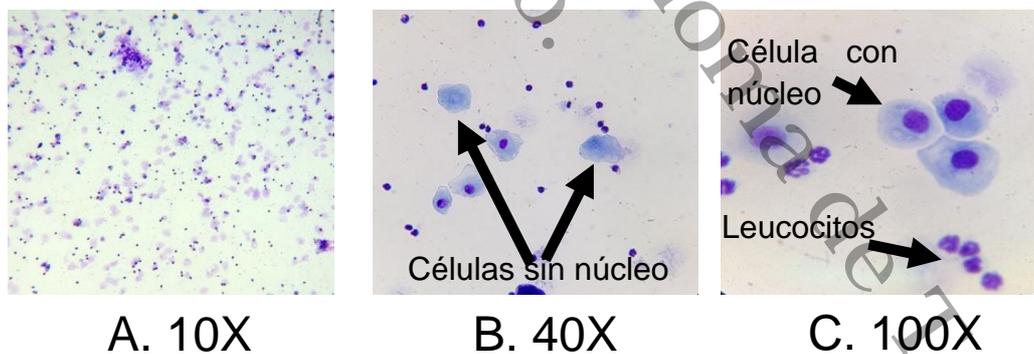


Figura 7. Micrografías de frotis vaginal de ratones hembras en la etapa de diestro a distintos aumentos. Nótese las características de mayor proporción células nucleadas, leucocitos y menor proporción células sin núcleo.

6.2. Títulos de anticuerpos contra la cadena alfa de inhibina

Las pruebas de ELISA se realizaron con dos tipos de antígenos de inhibina, a saber: inhibina dializada y no dializada en diluciones de 1:10 y 1:20, respectivamente. Los resultados de los títulos promedio de anticuerpos se presentan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Relación de títulos de anticuerpos positivos/negativos, obtenidos en ratones inmunizados con 100 µg de una vacuna de ADN contra INHA y 100 µg péptido recombinante.

Variable	Relación entre títulos de anticuerpos P/N	Valor de Probabilidad
Antígeno contra inhibina dializada	2.89	0.05
Antígeno contra inhibina no dializada	3.90	0.02
Promedio	3.39	0.007

P (títulos de anticuerpos positivos) = Ratones hembras inmunizados con 100 µg de ADN plásmido + 100 µg del péptido recombinante. N (control) = Ratones inoculados con solución salina.

Los ratones vacunados presentaron títulos elevados de anticuerpos contra INHA y son estadísticamente diferentes, respecto a los controles.

6.3 Fertilidad, tamaño y peso de la camada

En el Cuadro 6 se presentan los resultados de los partos, la fertilidad, tamaño y peso de la camada de ratones.

Se encontró que cuando a los ratones hembras, se le aplicó la vacuna de 100 µg de ADN plásmido + 100 µg del péptido recombinante, en promedio, tanto el tamaño de la camada como los pesos de la misma son estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) comparadas a las control.

Cuadro 6. Respuestas de ratones hembras a la inmunización activa mediante una vacuna de ADN contra INHA y su péptido recombinante

Variable	Tratamiento		Valor de Probabilidad
	100 µg de ADN plásmido + 100 µg del péptido recombinante	Control	
Fertilidad	67% (4/6)*	60% (3/5)*	>0.05
Tamaño de camada	8.67 ± 0.88**	4.33 ± 1.67**	<0.05
Peso de camada (g)	16.57 ± 2.53	6.59 ± 2.53	<0.05

* Número de ratones. **Desviación Estándar.

P<0.05 Diferencias estadísticas significativas con un alfa igual o menor a 0.05

7. DISCUSIÓN

7.1. Etapas del ciclo estral

De acuerdo a la citología vaginal realizada, se encontró que 100% de las hembras presentaban ciclos estrales normales. Con base en los frotis realizados y los fenotipos celulares encontrados correspondían en un 90% de los casos con las descripciones reportadas en la literatura (De la Cruz Rosa *et al.*, 1998; Cowell *et al.*, 2009).

La citología vaginal practicada en la etapa de proestro corresponde con la mayor proporción de células nucleadas y ausencia de leucocitos. En la etapa de estro corresponde con una mayor proporción de células sin núcleo y sin presencia de leucocitos. En el metaestro la mayor proporción corresponde a células sin núcleo y menor proporción de leucocitos. Finalmente, en el diestro las proporciones son equilibradas entre células con núcleo y leucocitos, además de la presencia de células sin núcleo en menor proporción a las anteriores. Los resultados encontrados corresponden con un 90% con lo reportado por De la Cruz Rosa *et al.* (1998) y Cowell *et al.* (2009) debido a que ellos usan fase temprana y una madura del proestro.

7.2 Títulos de anticuerpos

Los títulos de anticuerpo en los ratones hembras de control fueron considerada la base. Sin embargo, los inmunizados contra INHA resultaron con títulos de anticuerpo elevados con un promedio de 3.39 veces más con relación a los controles lo cual concuerda con reportes de autores que han usado vacunas de ADN (Han *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2014).

7.3 Fertilidad, tamaño y peso de camada

La fertilidad, entendida como el número de hembras que concibieron y registraron un parto, no fue afectada por el tratamiento de la vacuna INHA ADN o INHA rec; lo que está de acuerdo con otros autores (Han *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2014).

En esta primera etapa bajo un esquema de experimentación prime boost, la vacuna contra INHA en combinación con su antígeno, es capaz de incrementar el tamaño de camada cerca de un 100%. Estos resultados son superiores a los

reportados con Han *et al.* (2008) quienes reportan incrementos en tamaño de camada en un 16.5% en ratas. En otro estudio con vacunas de ADN, Han *et al.* (2014) reportan incrementos en tamaño de camada en solo 7.3%.

La diferencia principal entre la vacuna desarrollada en México radica en los siguientes aspectos:

- a) La totalidad del péptido recombinante utilizado en este estudio es de 105 aa vs 31 aa, reportados en la literatura (Han *et al.*, 2008).
- b) La adición de péptidos inmunomoduladores del toxoide tetánico
- c) El tipo de adyuvante utilizado en este trabajo fue el Montanide
- d) El esquema de vacunación prime boost que combina la vacuna de ADN y el antígeno de INHA recombinante, actúan aumentando la cantidad de ovulaciones, lo cual puede ser debido al bloqueo contra INHA, permitiendo que la activina promueva la producción y expresión de FSH, al competir por los receptores Act II (Xia y Schneyer, 2009).

Las vacunas de ADN contra proteínas específicas y diversos agentes infecciosos (parásitos, bacterias, virus) han ganado reconocimiento, desde que se comprobó que las vacunas de ADN pueden promover la expresión de proteínas recombinantes *in vivo* y significativa respuesta humoral y celular (Niess *et al.*, 2005). Una de las limitantes que han tenido ya que requieren múltiples aplicaciones y altas dosis para su funcionamiento, lo cual lo puede hacer impráctico (Han *et al.*, 2014). Sin embargo, su producción puede ser fácilmente expandida a bajo costo y no requiere una cadena fría para su mantenimiento o dispositivos especiales para su aplicación (Han *et al.*, 2014).

8 CONCLUSIONES

Las etapas del ciclo estral se pueden observar microscópicamente definidas cuando se utiliza de forma adecuada la técnica de Papanicolaou.

Se demostró que hay un aumento en los títulos de anticuerpo al aplicar la vacuna contra INHA en ratones hembra mediante el esquema prime-boost.

Hubo un incremento del tamaño de camada cerca de un 100%, lo cual puede ser al bloqueo contra INHA, permitiendo que la activina promueva la producción y expresión de FSH.

El empleo de la vacuna de ADN contra INHA y su antígeno recombinante generó títulos de anticuerpos contra INHA en ratones hembras Balb/c e incrementó el tamaño, por lo que es posible que esta respuesta pueda multiplicarse en otras especies como ratas y ovejas.

La aplicación mediante sistemas prime boost y uso de adyuvantes mejoradores de la respuesta inmune le dará viabilidad a la vacuna de INHA ADN (105-300) para su potencial uso en futuros procedimientos experimentales y en producción animal.

9 LITERATURA CITADA

- Asashima M, Nakano H, Shimada KK, Kei I, Shibai H and Ueno N. 1990. Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Archives of Developmental Biology* 198 (6): 330-335.
- Bakari M, Aboud S, Nilsson C, *et al.* 2011. Broad and potent immune responses to a low dose intradermal HIV-1 DNA boosted with HIV-1 recombinant MVA among healthy adults in Tanzania. *Vaccine*. 29 (46): 8417-28.
- Bó GA, Guerrero DC and Adams GP. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*. 69(1):81-7.
- Bolivar PA y Maldonado-Estrada JG. 2008. Análisis de costos de esquemas de transferencia de embriones bovinos utilizados en Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 21: 351-364.
- Bonura A and Colombo P. 2011. Novel strategies for the development of a vaccine for Parietaria allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 24(2):297-304.
- Brown RW, Hungerford JW, Greenwood PE, Bloor RJ, Evans DF, Tsonis CG and Forage RG. 1990. Immunization against recombinant bovine inhibin a- subunit caused increased ovulation rates in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 90 199-205.
- Chang H, Brown CW and Matzuk MM. 2002. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocr Rev*. 23: 787-823.
- Cowell Rick L, Tyler Ronald D, Meinkoth James H and DeNicola Dennis B. 2009. Diagnostic Citology and hematology of the cat and dog: Edición en español de la tercera edición de la obra original en inglés: Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato. Tercera edición. Editorial Elsevier Mosby. 375.
- D'Alessandro A, Martemucci G and Laffaldano N. 1999. Active immunization with a synthetic fragment of pig inhibin a-subunit increases ovulation rate

- and embryo production in superovulated ewes but season affects its efficiency. *J. Reprod. Fertil.* 115:185-191.
- de Kretser D.M, Hedger M.P, Loveland K.L, and Phillips D.J. 2002. Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum. Reprod. Update.* 8 (6): 529-541.
- De la Cruz Rosa R y Pasaro Rosario. 1998. Control endocrino del ciclo reproductivo en la rata: una experiencia docente utilizando un método de cateterización citológica. 1998. Departamento de fisiología y biología animal. Universidad de Sevilla. *Revista de enseñanza universitaria Extraordinario.* :545-554
- Forage R.G, Brown R.W, Oliver K.J, Atrache B.T, Devine P.L, Hudson G.C, Goss N.H, Bertram K.C, Tolstoshev P, Robertson D.M, de Kretser D.M, Doughton B, Burger H.G. and Findlay J.K. 1987. Immunization against an inhibin subunit produced by recombinant DNA techniques results in increased ovulation rate in sheep. *J. Endocr.* 114: R1-R4
- Forcada F, Ait Amer-Meziane M, Abecia JA, Maurel MC, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T, Asenjo B, Vázquez MI and Casao A. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology.* 75(4):769-76.
- Garmory HS, Perkins SD, Phillpotts RJ and Titball RW. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliver Rev.* 57: 1343-1361.
- Geréz G. Gullace P F y Federico A. 2015. Reproducción en animales de laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires. 6:7
- Gherardi MM y Esteban M. 2005. Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J Gen Virol* 2005; 86: 2925-36.
- Glencross R.G, Bleach E.C, Wood S.C and Knight P.G. 1994. Active immunization of heifers against inhibin: effects on plasma concentrations of gonadotrophins, steroids and ovarian follicular dynamics during prostaglandin synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100: 599-605.

- Grimaldo Viesca E, Luna Palomera C y Chay Canul A. 2013. Respuesta ovarica en ovejas de pelo inmunizadas con una vacuna conta inhibina. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México.
- Hafez E S E y Hafez B. 2002. Reproduccion e inseminacion artificial en animales. Septima edicion. Editorial Mc Graw Hil.
- Han L, Mao D.G, Zhang D.K, Liang A.X, Fang M, Muhammad Moaeen-ud-Din and Yang L.G. 2008. Development and evaluation of a novel DNA vaccine expressing inhibin a (1–32) fragment for improving the fertility in rats and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 109:251-265.
- Han, L., Zhen, Y.-H., Liang, A.-X., Zhang, J., Riaz, H., Xiong, J.-J., Guo, A.-Z., Yang, L.-G., 2014. Oral vaccination with inhibin DNA delivered using attenuated *Salmonella choleraesuis* for improving reproductive traits in mice. *J. Basic Microbiol.* 54: 962-968.
- Heldrich, H J and Nicklas W. 2012. Chapter 4.1.Housing and maintenance. In: *The Laboratory Mouse*. Hedrich H.J. Editor. Second edition. Elsevier, Italy.
- Jackson RJ, Boyle DB y Ranasinghe C. 2014. *Methods Mol Biol. Progresses in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies.* 1143:61-90. doi: 10.1007/978-1-4939-0410-5_5
- King B.F, Britt J. H, Esbenshade K. L, Flowers W. L, Sesti L. A, Martin T. L and J. J. 1993. Ovulatory and endocrine responses after active immunization of gilts against a synthetic fragment of bovine inhibin. *J Anim Sci* 1993. 71:975-982.
- Knight P.G. 1996. Roles of inhibins, activins and follistatin in the female reproductive system. *Front. Neuroendocrin.* 17:476-509.
- Latimer Kenneth S, Mahaffey Edward A y Prasse Keith W. 2005. *Patología clínica veterinaria.* 4º Edicion. Editorial Duncan & Prasse´s. Pag. 402-403
- Lee IH, Park JB, Cheong M, Choi YS, Park D and Sin JI. 2011. Antitumor Therapeutic and Antimetastatic Activity of Electroporation-Delivered

- Human Papillomavirus 16 E7 DNA Vaccines: A Possible Mechanism for Enhanced Tumor Control. *DNA Cell Biol.* In Press
- Li S, Rodrigues M, Rodriguez D, *et al.* 1993. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5214-8.
- Lodmell DL, Ray NB, Ulrich J.T and Ewalt LC. 2000. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL®). *Vaccine* 18: 1059-1066.
- Luna-Palomera C. 2013. Aplicación de biotecnologías moleculares en la reproducción animal. En memorias del IX del Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el trópico. Villahermosa, Tabasco.
- McLean A.C., Valenzuela N., Fai S, and Bennett S.A.L. 2012. Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. *Journal of Visualized Experiments*. DOI: 10.3791/4389
- Mann GE, Campbell BK, McNeilly AS and Baird DT. 1993. Follicular development and ovarian hormone secretion following passive immunization of ewes against inhibin or oestradiol. *J Endocrinol.* 136:225-33.
- Mao D.G, Yang L.G, Ye R and Jiang X.P. 2003. Effect of inhibin α (1-32) gene immunization on the follicular development and reproductive hormone in rats. *Agric. Sci. China.* 2:337-343.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S-Y., GuiUemin, R., Niall, H. & Seeburg, P.H. 1985. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor β . *Nature, Lond.* 318: 659-663.
- Medan M.S, Akagi S, Kaneko H, Watanabe G, Tsonis C.G and Taya K. 2004. Effects of re-immunization of heifers against inhibin on hormonal profiles and ovulation rate. *Reproduction* 128, 475-482.

- Medan M.S, Takedom T, Aoyagi Y, Konishi M, Yazawa S, Watanabe G and Taya K. 2006. The effect of active immunization against inhibin on gonadotropin secretions and follicular dynamics during the estrous in cows. *J. Reprod. Dev.* 52, 107-113.
- Medan M.S, Watanabe G, Sasaki K, Nagura Y, Sakaime H, Fujita M, Sharawy S and Taya K, 2003. Ovarian and hormonal response of female goats to active immunization against inhibin. *J. Endocrinol.* 177, 287-294.
- Miyamoto, K., Y. Hasegawa, M. Fukuda, M. Nomura, M. Igarashi, K. Kangawa, and H. Matsuo. 1985. Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32 kDaltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 396.
- Morris DG, McDermott MG, Diskin MG, Morrison CA, Swift PJ and Sreenan JM. 1993. Effect of immunization against synthetic peptide sequences of bovine inhibin α -subunit on ovulation rate and twin-calving rate in heifers *Journal of Reproduction and Fertility* 97: 255-261
- Niess, J.H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L. *et al.*, 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 307: 254-258.
- Olivares Guerrero A. 2015. Curso introductorio al manejo de los animales de laboratorio el raton (mus *músculus*). Universidad Juarez Autonoma de Tabasco. Division Académica de Ciencias de la Salud. Unidad de producción, cuidado y experimentación animal U.P.C.E.A - D.A.C.S.
- Padilla G, Knight P.G and Holtz W. 2007. Superovulation and embryo collection in nulliparous Boer goat does immunized against a recombinant ovine α -subunit inhibin. *Small. Ruminant. Res.* 74: 159-164.
- Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Sétien A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézières E, Aubert M, Cliquet F and Tordo N. 2000. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 18:479-486.
- Risbridger G.P, Schmitt J.F and Robertson D.M. 2001. Activins and Inhibins in Endocrine and Other Tumors. *Endocrine Reviews.* 22(6): 836-858.

- Rodríguez J, Martínez López F. J, García Riera P, Mendiola P, Francisco Marín J, De Costa J, Belmonte C, Pérez Llama F, Antonio Madrid J, Dolores Hernández M, García Rodenas C, Cáscales A. I, López Jiménez J. A, Porto F, Rueda F, Echeverría G, Ruda C, Penalva A, Conejero J y Martínez M. 1993. Manual de clases prácticas de Fisiología animal. Universidad de Murcia. Ed. J. de Costa, J.A. Madrid y S. Zamora.
- Ruvuna F, Taylor JF, Walter JP, Turner JW and Thallman RM. 1992. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: II. Economic evaluation of steer production. *J Anim Sci.* 70(4):1084-90.
- Sasaki K., M.S. Medan, G. Watanabe, S. Sharawy and K. Taya. 2006. Immunization of goat against inhibin increased follicular development and ovulation rate. *J. Reprod. Dev.* 52: 543-550.
- Shephard E, Burgers WA, Van Harmelen JH, *et al.* 2008. A multigene HIV type 1 subtype C modified vaccinia Ankara (MVA) vaccine efficiently boosts immune responses to a DNA vaccine in mice. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 24: 207-17.
- Tannetta DS, Feist SA, Bleach ECL, Groom NP, Evans LW and Knight PG. 1998. Effects of active immunization of sheep against an amino terminal peptide of the inhibin ac subunit on intrafollicular levels of activin A, inhibin A and follistatin. *J. Endocrinol.* 157:157-168.
- Tinal Ortiz S y García Soberano L P. 2014. Respuesta inmune, tasa ovulatoria y calidad de embriones en ovejas Pelibuey y Black Belly tratadas con vacuna de ADN contra inhibina. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México.
- Tizar I.R. 2009 *Introducción a la Inmunología Veterinaria.* Versión en español de la octava edición de la obra original en inglés, Editorial Elsevier.
- Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF and Weinberg RA. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell* 67:797-805.
- Wrathall JHM, McLeod BJ, Glencross RG and Knight PG. 1992. Effects of active immunization against a synthetic peptide sequence of the inhibin

asubunit on plasma gonadotrophin concentrations, ovulation rate and lambing rate in ewes J. Reprod. Fert. 95:175-182.

Xia Y y Schneyer A. L. 2009. The Biology Of Activin: Recent Advances In Structure, Regulation And Function. The Journal of Endocrinology. 202(1): 1–12. <http://doi.org/10.1677/JOE-08-0549>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ANEXO 1

Soluciones y materiales para prueba de ELISA

- a) Buffer de carbonatos 1X; carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6
- b) Buffer de lavado 10X; cloruro de sodio 1.25 M, 250 mM tris-HCl pH 7.9, Tween-20 1%.
- c) Buffer de bloqueo 1X; leche descremada 2%, en Buffer de lavado 1X.
- d) Solución reveladora; Preparar ácido cítrico 0.1 M pH 4.5 y citrato de sodio 0.1 M pH 4.5. Por placa se mezclan 5 mL del ácido cítrico 0.1M y 5 mL de citrato de sodio 0.1M, se agregan 200µl de una solución de 5 µg de orto-fenilen-diamina (OPD), 20 µL de peróxido de hidrogeno al 30%.
- e) Solución de frenado; ácido sulfúrico 2N.
- f) Vial con 5 ug de OPD (*o-phenyldiamine dihydrochloride*). vial de 200µl por 10ml/placa.
- g) 2° Anticuerpo. Anti IgG de la especie adecuada acoplado a peroxidasa.
- h) Suero control positivo y suero control negativo.

Procedimiento para la prueba de ELISA para el diagnóstico de anticuerpos

- a) Sensibilizar una placa (Maxisorb, Nunc, No catalogo 442404) con el antígeno a probar a una dilución que va de 1:100 a 1:400 (de acuerdo a la titulación previa del antígeno) en buffer de carbonatos 1X, colocando 100 µL de de esta dilución por pozo.
- b) Dejar incubando a 4°C toda la noche.
- c) Pasado el tiempo de incubación se lavo la placa (300ul/pozo) por 5 min, 4 veces con buffer de lavado 1X.
- d) Bloquear la placa por 1 hora a 37° C colocando a cada pozo 100 µL de buffer de bloqueo.

- e) Lavar la placa (300 ul/pozo) por 5 min, 4 veces con buffer de lavado 1X.
- f) Diluir el suero en buffer de bloqueo (1:10) y colocar 100 µL/ pozo. Para esto se puede agregar a cada pozo 90 µl de solución de bloqueo y después 10 µl del suero problema.
- g) Incubar la placa por 1 hora a 37° C.
- h) Repetir el paso 3 de lavado.
- i) Incubar con el 2° anticuerpo (anti-IgG de la especie adecuada) acoplado a peroxidasa (HRP) diluyendo en buffer de bloqueo (1:1000 hasta 1:5,000) por 1 hora a 37 °C.
- j) Repetir el paso 3 de lavado.
- k) Se coloco 100 µl/pozo de solución reveladora y esperar aproximadamente 5 minutos e inmediatamente parar la reacción con 50 µL a cada pozo de solución de frenado y leer a 590 nm en un lector de ELISA. Es posible no parar la reacción y leer a 450 nm.

La calidad del revelado se evaluó con la prueba de máxima densidad óptica (MDO), realizándolo de la siguiente manera: Se colocaron 100 microlitros de la solución reveladora en las 8 filas de la placa por duplicado. Se agregó 100 microlitros de la solución de segundo anticuerpo a una dilución de 1:1500 realizando diluciones dobles seriadas.

Interpretación

Se calcula la densidad óptica de corte de positivos y negativos que corresponde entre el 47% y 52% (DO47 y DO52) de unión mediante las siguientes fórmulas:

$$DO47 = (0.53 \times DO \text{ CN}) + (0.47 \times DO \text{ CP})$$

$$DO52 = (0.48 \times DO \text{ CN}) + (0.52 \times DO \text{ CP})$$

Donde: DO CN fue el promedio de densidades ópticas del duplicado del suero control negativo y DO CP fue el promedio de densidades ópticas para el duplicado del suero control positivo.

Toda muestra con valor de DO inferior al valor obtenido para DO47 es considerada negativa. Toda muestra con DO superior al valor DO52 es considerada positiva. Las muestras que resultaron con valor de DO entre DO47 y DO52 se consideraron sospechosas y para lo cual se repitió la prueba.

Anticuerpo acoplado peroxidasa anti IgG conejo Cabra SIGMA Cat. A-0545 1ml Anti-Rabbit IgG (whole molecule)- peroxidase, antibody produced in goat.

Anticuerpo acoplado a peroxidasa anti IgG Cerdo cabra Cat. Jackson Immuno Research Laboratories 114-035-003 2ml Peroxidase-conjugated affine Pure goat anti-swine IgG (H+L)

OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride) Cat. SIGMA P1526-10G

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Inmunización activa contra inhibina sobre la respuesta reproductiva en ratones

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.ar Internet	175 palabras — 2%
2	nova_scientia.delasalle.edu.mx Internet	155 palabras — 2%
3	www.coursehero.com Internet	128 palabras — 2%
4	ojs.alpa.uv Internet	71 palabras — 1%
5	docplayer.es Internet	61 palabras — 1%
6	www.pasteur.co Internet	28 palabras — < 1%
7	a3laboratorio.co Internet	27 palabras — < 1%
8	hdl.handle.net Internet	26 palabras — < 1%
9	archivostransparencia.ujat.mx Internet	24 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.