

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Análisis bioinformático de la especificidad de las
secuencias de aminoácidos de la LH murina y canina
candidatas para inmunocontracepción**

Proyecto de Investigación

Sharon Antonella Reinoso González

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 08 de julio de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Análisis bioinformático de la especificidad de las secuencias de aminoácidos de la LH murina y canina candidatas para inmuncontracepción

Sharon Antonella Reinoso González

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Pedro Manuel Aponte García, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 08 de julio de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Sharon Antonella Reinoso González

Código: 00123503

Cédula de Identidad: 1400919294

Lugar y fecha: Quito, 08 de julio de 2019

DEDICATORIA

En reciprocidad al apoyo, dedicación, sacrificio, amor y comprensión recibidos. Dedico este trabajo a mis padres y abuelitos, puesto que sus palabras de aliento han sido claves en concluir mi carrera universitaria, sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Sé que este logro y alegría lo compartimos juntos.

AGRADECIMIENTOS

Mi eterna gratitud a Dios por cuidarme, protegerme y alentarme con sus promesas en mis momentos cuando pensaba que las batallas eran mayores que mis fuerzas.

A mis queridos padres por ser esa fuente de apoyo, por creer en mí, por brindarme su amor, por respaldarme en todo y ser mis mejores aliados en cada momento.

A mi hermano Jessiel y mi tía Nadia, por su apoyo, por tener la paciencia de escucharme en mis momentos difíciles, sin ustedes todo esto hubiese sido más difícil. Mil gracias de corazón.

Mi gratitud a Pedro Aponte, como director de este proyecto, gracias infinitas por sus conocimientos, su paciencia, dedicación, y todo el apoyo brindado.

Y aprendí que en la vida tengo que ser agradecida con mis compañeras y amigos, que me animaron, impulsaron y ayudaron en lo que ellos pudieron. Gracias: Erika Villacreses, Christina Álvarez, María del Cisne González, Pamela Chanco y Manolo Morocho.

RESUMEN

La sobrepoblación canina ha aumentado drásticamente en la última década, dentro de la cual una gran parte no recibe un cuidado responsable, por lo cual se convierte en un problema social no solo para el Ecuador sino para el mundo entero. Ante esta problemática varias estrategias contraceptivas se han diseñado y probado como la esterilización quirúrgica, la castración tradicional y la castración química. Cada de uno de estos métodos tienen ventajas y desventajas, sin embargo, en el contexto del Ecuador estos no son asequibles para toda la población. Por lo tanto, considerando la biología reproductiva animal, en especial la del macho, que está guiada por el sistema endócrino, se seleccionó a la hormona luteinizante (LH) como clave para la espermatogénesis. Por lo cual a través de bioinformática se evaluó la factibilidad del diseño de una vacuna anti-LH. Para esto dicha vacuna debe ser capaz de generar una respuesta inmune contra la proteína diana (LH). No obstante, dado a que algunas las proteínas tienen similitud en cuanto a su estructura primaria, se analizó la especificidad de secuencias de aminoácidos (epítomos) de la LH de tal forma que no se generen reacciones cruzadas en los organismos humano, canino y murino. Para esto se empleó bases de datos y programas como Dali server, UniProt, Protein BLAST, MEGA7 y Clustal Omega, de donde se identificó que existen cuatro reacciones cruzadas con la subunidad beta de coriagonadotropina 3 humana, la persefina canina, el factor de crecimiento endotelial vascular D y la norrina humanos. Únicamente con la subunidad beta de coriagonadotropina 3 humana es más probable la reactividad cruzada, debido a que la secuencia de aminoácidos es bastante similar a la de la LH y está documentada. Por ello es que se requiere emplear un modelo murino para probar la especificidad de la vacuna, de tal forma que se pueda evaluar si es que la espermatogénesis se inhibe y existen o no efectos adversos en otros órganos y tejidos no dianas mediante análisis inmunohisquímicos e histológicos.

Palabras clave: sobrepoblación canina, LH, espermatogénesis, especificidad, reacción cruzada, bioinformática

ABSTRACT

Canine overpopulation has increased dramatically in the last decade, a great portion of them do not receive responsible care so it becomes a social problem not only for Ecuador but for the entire world. Given this problem several contraceptive strategies have been designed and tested, such as surgical sterilization, traditional castration and chemical castration. Each one of these methods has advantages and disadvantages; however, in the context of Ecuador they are not available to the entire population. Therefore, considering the animal reproductive biology, especially that of the males, which is guided by the endocrine system, the luteinizing hormone (LH) has been selected as the key for spermatogenesis. Therefore, the feasibility of designing an anti-LH vaccine was evaluated through bioinformatics. For this, said vaccine must be able to generate an immune response against the target protein (LH). However, given that some proteins have similarity in their primary structure, the specificity of amino acid sequences (epitopes) of LH was analyzed in such a way that no cross-reactions are generated in human, canine and murine organisms. For this, databases and programs such as Dali server, UniProt, Protein BLAST, MEGA7 and Clustal Omega were used, from which it was identified that there are four cross reactions with the beta subunit of human Choriogonadotropin 3, canine persephin, the vascular endothelial growth factor and the human norrin. Only with the beta subunit of human Choriogonadotropin 3, cross-reactivity is more likely because the amino acid sequence is quite similar to that of LH and is documented. Therefore, it is necessary to use a murine model to test the specificity of the vaccine, in such a way that it is possible to evaluate whether the spermatogenesis is inhibited and whether there are adverse effects in other non-target organs and tissue through immunohistochemical and histological analysis.

Key words: canine overpopulation, LH, spermatogenesis, specificity, cross-reaction, bioinformatics.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Eje hipotálamo: hipófisis y gónadas	11
1.1.1. Anatomía del hipotálamo y la hipófisis	11
1.1.2. Anatomía del testículo	14
1.1.3. Espermatogénesis	15
1.1.4. Panorama hormonal: las gonadotropinas	16
1.2. Hormona luteinizante, LH	17
1.2.1. Estructura y funciones de la LH	17
1.2.2. El papel de la LH en la espermatogénesis	19
1.3. Usos de las hormonas en el control de la reproducción sexual.....	20
1.4. ¿Por qué controlar la reproducción sexual en animales como los caninos?	21
1.5. Alternativas para controlar la sobrepoblación canina.....	22
1.6. Las vacunas contraceptivas.....	23
1.7. El sistema inmunológico en respuesta a las vacunas	25
1.8. Factibilidad del diseño de una vacuna análoga a la LH.....	26
1.9. Etapas del desarrollo de una vacuna peptídica	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo general.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. ÁREA DE ESTUDIO	32
5. MATERIALES	32
5.1. Dali server.....	32
5.2. Microsoft Excel.....	33
5.3. UniProt.....	33
5.4. Protein BLAST de NCBI.....	34
5.5. MEGA7.....	35
5.6. Clustal Omega.....	35
6. MÉTODOS	36
6.1. Búsqueda de proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de <i>C. lupus familiaris</i> y <i>M. musculus</i> en Dali server.....	36
6.2. Recuperación de secuencias de las proteínas (PDB ID) en UniProt.....	36
6.3. Búsqueda de códigos de acceso de proteínas humanas en Uniprot para obtener secuencias en formato FASTA	37

6.4.	Protein BLAST de las secuencias de proteínas humanas contra las proteínas de <i>C. lupus familiaris</i> y <i>M. musculus</i>	37
6.5.	Alineación múltiple de secuencias procedentes de Protein BLAST contra proteínas humanas	38
6.5.1.	Alineación múltiple de secuencias de proteínas y construcción de árboles filogenéticos en MEGA7	38
6.5.2.	Alineación múltiple de secuencias de proteínas y construcción de árboles filogenéticos en Clustal Omega	38
6.6.	Alineación de secuencias de proteínas obtenidas mediante alineaciones en MEGA7 y Clustal Omega con los epítomos de la LH de perro y la LH de ratón	39
7.	RESULTADOS	39
7.1.	Comparación de las estructuras 3D de la LH canina y murina en Dali server	39
7.1.1.	Resultados de la comparación entre LH canina con la base de datos de proteínas humanas de Dali server	39
7.1.2.	Resultados de la comparación entre LH murina con la base de datos de proteínas humanada de Dali server.....	40
7.2.	Identificación de códigos de proteínas de <i>Homo sapiens</i> en UniProtKB (UniProt).....	41
7.2.1.	Selección de Mnemonic Code (X) de proteínas de <i>H. sapiens</i> que fueron similares a la LH de <i>C. lupus familiaris</i>	41
7.2.2.	Selección de Mnemonic Code (X) de proteínas de <i>H. sapiens</i> que fueron similares a la LH de <i>C. lupus familiaris</i>	41
7.3.	Agrupación de proteínas humanas relacionadas con las proteínas de <i>C. lupus familiaris</i> y <i>M. musculus</i>	41
7.3.1.	Agrupación de proteínas de <i>H. sapiens</i> con proteínas de <i>C. lupus familiaris</i>	41
7.3.2.	Agrupación de proteínas de <i>H. sapiens</i> con las proteínas de <i>M. musculus</i>	42
7.4.	Identificación de reacciones cruzadas entre las proteínas.....	42
7.4.1.	Reacciones cruzadas entre las proteínas de <i>H. sapiens</i> y <i>C. lupus familiaris</i>	42
7.4.2.	Reacciones cruzadas entre las proteínas de <i>H. sapiens</i> y <i>M. musculus</i>	43
8.	DISCUSIÓN	43
8.1.	Perspectivas a futuro	55
9.	CONCLUSIONES	55
10.	RECOMENDACIONES	56
11.	BIBLIOGRAFÍA	58
12.	TABLAS	76
13.	FIGURAS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de <i>C. lupus familiaris</i>	76
Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de <i>M. musculus</i>	84
Tabla 3. Identificadores Mnemonic para las proteínas humanas similares a la LH de <i>C. lupus familiaris</i>	94
Tabla 4. Identificadores Mnemonic de las proteínas humanas similares a la LH de <i>M. musculus</i>	95
Tabla 5. Fragmentos candidatos como epítomos extraídos de la secuencia de aminoácidos de la LH.....	95
Tabla 6. Reacciones cruzadas para las proteínas de <i>H. sapiens</i> y <i>C. lupus familiaris</i>	96
Tabla 7. Reacciones cruzadas para las proteínas de <i>H. sapiens</i> y <i>M. musculus</i>	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de desarrollo de la metodología de determinación de la especificidad del péptido análogo a la LH.....	96
Figura 2. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor joining de proteínas de <i>C. lupus familiaris</i> similares a la proteína humana Q5T4W7.....	97
Figura 3. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor joining de proteínas de <i>M. musculus</i> similares a la proteína humana O43915.....	98
Figura 4. Árbol filogenético obtenido a través del método de Neighbor joining de la proteína humana de entrada Q5TW7 con las proteínas de <i>C. lupus familiaris</i> y sus respectivos epítomos.....	99
Figura 5. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor joining de la proteína humana de entrada O43915 con las proteínas de <i>M. musculus</i> y sus epítomos correspondientes.....	99

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Eje hipotálamo: hipófisis y gónadas

1.1.1. *Anatomía del hipotálamo y la hipófisis*

El sistema endocrino (SE) surgió a partir de la evolución unicelular hacia organismos multicelulares, donde el medio de comunicación han sido las señales químicas que regulan y coordinan varias funciones orgánicas (Chedrese, 2009). Tras las investigaciones relacionadas a estas señales químicas apareció la endocrinología, centrada en el estudio del sistema endócrino que involucra a las glándulas que secretan hormonas en el espacio intersticial y el sistema circulatorio, las cuales estarán involucradas con las funciones metabólicas y bioquímicas de las células (Escrivá, Carbajal & Mendaza, 2002; Chedrese, 2009). Aunque las hormonas secretadas tienen incidencia en el sistema nervioso, el sistema endocrino es controlado por el sistema nervioso de manera directa e indirecta. Por ello es que las glándulas endócrinas al secretar hormonas y moléculas de señalización extracelular son capaces de interactuar con los receptores de los órganos diana. Tras este reconocimiento se da lugar a reacciones de síntesis, la movilización de los mensajeros intracelulares que inciden en la expresión de los genes y las respuestas biológicas (Chedrese, 2009).

El SE conformado por las glándulas endócrinas involucra al hipotálamo, tiroides, paratiroides; las glándula pituitaria, glándula pineal y suprarrenales; los islotes pancreáticos de Langerhans y las gónadas, entre otras (Hiller-Sturmhöfel, 1998). La mayoría de estas glándulas están relacionadas con el sistema reproductor directa o indirectamente y se regulan por el mismo SE (Papadimitriou & Priftis, 2009). Por otra parte, el hipotálamo y la hipófisis o glándula pituitaria integran una red que regula la secreción de varias glándulas y hormonas, y a la vez permiten la conexión entre el SE y el sistema nervioso central (Brandan, Llanos, Reyes, & Rodríguez, 2011). Esta red

neuroendocrina tras recibir cambios produce señales específicas que controlan y regulan la síntesis de las hormonas (Papadimitriou & Priftis, 2009).

Dentro de los mecanismos de regulación hormonal están la retroalimentación negativa, en el cual la hormona secretada por una glándula indica a la glándula productora que reduzca su actividad. En cambio en la retroalimentación positiva, la hormona que es producida por la glándula diana indica a la glándula productora que incremente la secreción de la hormona. Este mecanismo simple de retroalimentación positiva y negativa es llevado a cabo por el eje hipofisario hipotalámico para la regulación de la actividad gonadal (Fink, 1997).

El hipotálamo controla la síntesis hormonal y se ubica dorsal a la glándula pituitaria, en la región del cerebro ventral que envuelve a la parte inferior del tercer ventrículo. En el plano sagital este órgano va desde el quiasma óptico, la lámina terminal y la comisura anterior hasta el pedúnculo cerebral y la fosa interpeduncular en sentido caudal (Thomas, Kapoor, & Naik, 2015). Estructuralmente está integrado por cuerpos neuronales o núcleos y dividido en tres zonas como la zona supraóptica o anterior localizada arriba del quiasma óptico y conformado por los núcleos paraventricular y supraóptico, de donde se desprenden los axones que forman el haz hipotálamo-hipofisario. La siguiente zona conocida como tuberal o media está constituida por los núcleos ventromedial, arcuato y dorsomedial; cuyos axones se proyectan hacia los capilares donde aparece el tallo hipofisario. Finalmente, la zona mamilar o posterior está conformada por los núcleos de la amígdala, que forman parte del sistema límbico (memoria y emociones). Al hipotálamo llegan y salen nervios por vías aferentes y eferentes que permite la conexión de varias regiones cerebrales y con otros órganos, y al mismo tiempo regula autónoma, neuroendocrina y homeostáticamente (Brandan, Llanos, Reyes, & Rodríguez, 2011).

Por lo tanto, el hipotálamo es el centro donde se integra el desarrollo endógeno, los mensajes del entorno, el comportamiento y las señales corporales para producir respuestas endócrinas tardías y respuestas autonómicas tempranas. El hipotálamo no solo coordina la liberación de las ocho principales hormonas por la hipófisis, sino que también regula la temperatura, la reproducción y el comportamiento sexual, el control de la ingesta diaria de agua y alimentos (Papadimitriou & Priftis, 2009). El control de la actividad hormonal de la hipófisis es regulada por el hipotálamo por medio de factores de liberación (RH) y los factores de inhibición (IF) a través del sistema porta hipotalamohipofisario (Brandan, Llanos, Reyes, & Rodríguez, 2011).

Cuando las neuronas hipotalámicas sintetizan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) de forma pulsátil, seguidamente se va a secretar en mayor proporción la LH (hormona luteinizante) y menormente FSH (hormona folículo estimulante). Estas gonadotropinas van hacia los receptores de las gónadas, donde van a regular la síntesis de las hormonas esteroides como los andrógenos en los machos y los hombres y los estrógenos en las hembras y las mujeres (Maggi, 2016).

La regulación de la espermatogénesis está dada por un eje hormonal denominado como el eje hipotalámico-hipofisario-testicular que inicia con la liberación de la GnRH (Cheng & Mruk, 2017). Para esto las neuronas de GnRH en el hipotálamo tienen receptores específicos que son estimulados por la kisspeptina liberada por las neuronas de kisspeptina cercanas al hipotálamo (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018; Clarke, Dhillon, & Jayasena, 2015). Posteriormente, la GnRH va a inducir a la liberación de la LH y la FSH desde la glándula pituitaria. Estas dos hormonas luego tendrán efectos en las células de Leydig y de Sertoli de los testículos debido a sus receptores y posteriormente dando paso a la espermatogénesis (Cheng & Mruk, 2017).

1.1.2. Anatomía del testículo

Los testículos son las gónadas masculinas que poseen componentes endocrinos y exocrinos, rodeados de una cápsula y alojados en las bolsas testiculares o escroto. Los testículos durante su desarrollo bajan por los canales inguinales hasta situarse dentro del escroto, que integra un conjunto de envolturas de piel y fascias (membranas) situadas entre el perineo y la región inguinal. Estos son órganos elipsoides sólidos y de volumen variable, sin embargo, en las especies domésticas como los perros y gatos, los testículos son bastante pequeños (Dyce, Sack, & Wensing, 2015)

Dentro del escroto cada testículo está suspendido por el cordón espermático integrado por el conducto deferente, los nervios y los vasos sanguíneos dentro del revestimiento doble del peritoneo. El exterior del testículo tiene un recubrimiento peritoneal que cubre a la túnica albugínea (cápsula) y las ramas grandes de la vena y la arteria testiculares van por el interior de la cápsula, de la cual salen las trabéculas y los septos que van a dividir el parénquima testicular en lóbulos. Este parénquima tiene túbulos seminíferos y entre éstos, tejido intersticial formado por las células intersticiales o de Leydig y conteniendo vasos linfáticos y sanguíneos (Liguori et al., 2011).

Las células de Leydig cumplen con la función endócrina en los testículos por lo que producen la principal hormona androgénica esteroidea, la testosterona, por medio del estímulo de la LH. En los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis, en la cual forman parte las células de Sertoli o sustentaculares que proveen de nutrientes y sostén a las células germinales gracias a que producen factores de crecimiento y hormonas, entre estas últimas la inhibina y activina. Estos factores son reguladores endócrinos que permiten la síntesis y liberación de la FSH, aunque previamente mediados por el hipotálamo (Weinbauer, Luetjens, Simoni, & Nieschlag, 2010). Las células de los túbulos en su conjunto conforman el epitelio seminífero. Los túbulos seminíferos

desembocan en una red dentro del testículo (rete testis) que drena los espermatozoides fuera del testículo por pequeños conductos eferentes que atraviesan la cápsula y se unen a la cabeza del epidídimo (Dyce, Sack, & Wensing, 2015).

1.1.3. *Espermatogénesis*

La espermatogénesis es el proceso en el cual las espermatogonias se diferencian para formar espermatozoides en los testículos (Russell, Ettlín, Hikim, & Clegg, 1990). El sitio de desarrollo de la espermatogénesis es el epitelio del túbulo seminífero, donde se encuentran las células de Sertoli y las células germinales en diferentes estadios de desarrollo y proporciones (Cheng & Mrunk, 2017). Este epitelio seminífero se divide en dos compartimientos denominados compartimientos funcionales apicales y basales por la barrera hematotesticular. Las fases de la espermatogénesis como la meiosis I y II y el desarrollo de espermátide posmeiótico tienen lugar detrás de dicha barrera y por lo tanto, son excluidos del sistema inmunitario (Cheng & Mruk, 2012). Además, considerando el contexto hormonal que regula la espermatogénesis, las fases que ocurren en el túbulo seminífero testicular son reguladas por la testosterona generada por la esteroidogénesis realizada por las células de Leydig del intersticio testicular (Cheng & Mruk, 2017).

El proceso de producción de espermatozoides consta de cuatro eventos celulares, siendo el primero la renovación espermatogonial por medio de la mitosis y la diferenciación de las espermatogonias en espermatocitos, mismas que tienen lugar en el compartimiento basal del epitelio seminífero. En la segunda fase los espermatocitos pasan por la meiosis I y II, dando como resultado a las espermátidas haploides. El tercer evento es la diferenciación a través de la espermiogénesis que permite que las espermátidas pasen a ser espermatozoides. Finalmente el cuarto evento es la liberación de espermatozoides maduros que se da por la espermiación. Estos tres últimos eventos de división celular ocurren en el compartimiento apical detrás de la barrera hematotesticular. Pese a que estas

fases son generales entre los mamíferos, la espermatogénesis a detalle varía en el número de estadios, por ejemplo, para los humanos, los ratones y las ratas hay 6, 12 y 14 estadios con un ciclo de duración de 16, 8.6 y 12.9 días, respectivamente (Cheng & Mruk, 2017).

Adicionalmente, es necesario que existan células de reserva para que en cada túbulo se inicie la espermatogénesis. Existe diferentes tipos de espermatogonias como las de diferenciación, las proliferativas y de células madre, siendo las dos últimas no diferenciadas. Las células madre espermatogoniales son resistentes a cambios adversos y generalmente están disponibles cuando no existen más tipos celulares germinales para repoblar los túbulos seminíferos. Por lo tanto, si estas células madre son destruidas completamente la capacidad espermatológica se ve afectada permanentemente (Russell, Ettlín, Hikim, & Clegg, 1990).

1.1.4. *Panorama hormonal: las gonadotropinas*

Las hormonas hipofisarias denominadas hormona folículo estimulante (Folitropina, FSH), la hormona luteinizante (Lutropina, LH) y la hormona gonadotropina coriónica (Coriogonadotropina, hCG), son conocidas como hormonas gonadotrópicas por sus consecuencias en las células gonadales, y las funciones reproductoras en diferentes especies de mamíferos (González, 2004). Las hormonas TSH (hormona estimulante de la tiroides), la FSH, la LH y la hCG son de naturaleza glicoproteica y estructuralmente presentan heterodímeros de dos subunidades, α y β (Matsui et al., 1991). La subunidad α es compartida entre estas hormonas por presentar una secuencia de aminoácidos idéntica, mientras que la subunidad β determina la especificidad funcional de cada hormona (Matsui et al., 1991; Brandan, Llanos, Tannuri, Horak, & Rodríguez, 2014).

Tanto la LH como la FSH son producidas y liberadas por la hipófisis anterior y viajan por la sangre hasta llegar a los órganos diana (gónadas). Estas hormonas van a fomentar tanto la maduración de las gónadas como la esteroidogénesis, que permitirá la

capacitación para la reproducción. La FSH en las hembras hará que los folículos que albergan a los óvulos inmaduros se desarrollen y crezcan (Orlowski & Sarao, 2018). En los machos, la FSH es la promotora de las fases iniciales de la espermatogénesis mientras que la LH promueve la secreción de los andrógenos que son imprescindibles para la fase de espermiogénesis y espermiación, a la vez que permiten el desarrollo y mantenimiento del fenotipo masculino y la función reproductiva en general (Prieto & Velázquez, 2002; Patrão, Silva, & Avellar, 2009).

Por su parte, la LH en las hembras provoca que el folículo se rompa, se genere la ovulación, el folículo que contenía a los ovocitos se luteinice y dé lugar al cuerpo lúteo, para que este libere progesterona, importante en la gestación; no obstante, si no ocurre la fecundación del óvulo, el cuerpo lúteo se reducirá progresivamente hasta que no se secrete la progesterona, pero se favorecerá un nuevo ciclo reproductivo (Prieto & Velázquez, 2002). Tanto la síntesis como la secreción de la LH y la FSH están bajo la regulación de la GnRH, que permite conectar el sistema nervioso con el endócrino gracias a señales externas como las de las hormonas esteroideas. Para la liberación de la LH está implicado el nucleótido cAMP con la GnRH estimulada, así como también el calcio intracelular que participa como mensajero que contribuye a secreción de la LH en la adenohipofisis (Prieto & Velázquez, 2002).

1.2. Hormona luteinizante, LH

1.2.1. Estructura y funciones de la LH

La hormona luteinizante o LH es miembro la familia de las hormonas glicoproteicas. Está constituida por un complejo no covalente compuesto por unas subunidades polipeptídicas glicosiladas conocidas como α y β (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018). La subunidad α es compartida por dichas hormonas, no obstante, la subunidad β

es diferente para cada hormona y otorga la funcionalidad biológica y especificidad para unirse al receptor (Wolf, Appleby, Hjerrild, Baker, & Talmadge, 1987).

Luego de la traducción y mediante glicosilación y el nivel de esta, las hormonas se modifican para llevar a cabo acciones fisiológicas específicas (Arey & López, 2011). Esta glicoproteína tiene un peso de 28 kDa aproximadamente, y varía según los oligosacáridos agregados y la especie. Asimismo, los carbohidratos que contiene cada subunidad tienen ubicaciones específicas que determinan la actividad biológica, al igual que la depuración metabólica de la hormona. Con respecto a la síntesis, las células hipofisarias conocidas como gonadotropos son las encargadas de sintetizar a la LH gracias al estímulo de la GnRH, un decapeptido de secreción pulsátil. Como consecuencia la LH se secreta también de manera pulsátil y selectiva, pero regulado según el aumento de la concentración de calcio intracelular (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018).

Por otro lado, la LH tiene efectos en el ovario que inicia en el desarrollo fetal femenino donde las células germinales primitivas ováricas pasan por meiosis, pero se detienen en la profase de la meiosis I. Cada uno de los ovocitos pasa por la foliculogénesis, pero seguidamente entran en reposo. Sin embargo, en la etapa fetal los rumiantes y primates, y en las primeras 2 semanas tras el nacimiento de los roedores, los folículos primordiales suelen activarse y pasan a ser folículos primarios. Luego los ovocitos están envueltos por las células de la teca y las células de la granulosa (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018).

Cuando el folículo se rompe y se libera el ovocito se conoce que ha ocurrido la ovulación. A continuación las células de la granulosa junto con las de la teca se diferencian para formar el cuerpo lúteo, por lo que esta fase es llamada lútea. Si no se ha dado la fecundación del óvulo, el cuerpo lúteo muere e inicia la luteólisis. Por lo tanto, durante el ciclo ovárico con sus fases folicular, ovulación, lútea y luteólisis, la LH es

esencial para completar dicho ciclo debido a que estimula la producción de andrógenos, la ovulación y el paso de células productoras de estrógeno a células productoras de progesterona (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018; Atwood & Vadakkadath Meethal, 2016).

1.2.2. El papel de la LH en la espermatogénesis

A nivel de las gónadas masculinas, las células de Sertoli y las célula de Leydig son esenciales para la espermatogénesis, pero el funcionamiento y actividad está dado por las gonadotropinas FSH y LH (Ulloa-Aguirre & Lira-Albarrán, 2016). La LH a diferencia de la FSH, es imprescindible para la formación y liberación de espermatozoides (Huhtaniemi, 2018).

La LH actúa en los testículos por medio de su unión a su receptor en las células de Leydig, que estimula la síntesis de testosterona. La esteroidogénesis inicia con la movilización del colesterol almacenado en la membrana mitocondrial externa hacia la membrana interna (Casarini, Santi, Marshall, & Simoni, 2018). Posteriormente, la enzima asociada al citocromo P450 va a excluir la cadena lateral del colesterol formando la pregnenolona, mientras que la proteína STAR va a mediar la velocidad de la esteroidogénesis (Tsuchiyaa et al., 2003)

Por otro lado, para conocer y elucidar el rol de la LH y su receptor, se empleó ratones knockout machos en los que se mutó al gen del receptor de la LH (LHR). Aquí se vio que la inactivación completa del LHR causó pseudohermafroditismo y diferenciación sexual masculina ausente. En contraste, en las hembras las manifestaciones en el desarrollo fueron más leves y presentaron infertilidad anovulatoria (Huhtaniemi, Zhang, Kero, Hämäläinen, & Poutanen, 2002).

En un estudio posterior se inactivó la subunidad β de la LH en ratones y para establecer una mejor comparación también se indujo a la pérdida de función de la FSH

(Ma, Dong, Matzuk, & Kumar, 2004). Los ratones en su posterior desarrollo mostraron defectos en el crecimiento y las gónadas, que desencadenaban a infertilidad. Los síntomas que presentaron fueron un menor tamaño de los testículos y las células de Leydig con hipoplasia. Asimismo, los genes eran incapaces de codificar adecuadamente enzimas para la ruta de síntesis de los esteroides y por ende niveles de testosterona bajaron. Consecuentemente, la espermatogénesis sufrió un bloqueo en la fase redonda de las espermatidas, por lo que ya no había espermatidas alargadas ni espermatozoides. En cambio, las hembras sufrieron de hipogonadismo y niveles muy bajos de progesterona y estradiol. Pese a esto, los niveles de FSH no fueron anormales en este modelo animal. Sin embargo, es factible inducir nuevamente la capacidad de respuesta de la LH mediante el suministro de gonadotropina coriónica humana exógena, por lo que este es un proceso reversible (Ma, Dong, Matzuk, & Kumar, 2004).

1.3. Usos de las hormonas en el control de la reproducción sexual

Como se conoce el sistema reproductivo está bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis y las hormonas esteroideas secretadas que ejercen su función en los órganos reproductivos. Por ello es que se han realizado investigaciones sobre cómo inmunoneutralizar a las hormonas clave (Norris & Carr, 2013). Principalmente la hormona GnRH ha sido foco de estudio como una forma de control de la esteroidogénesis y consecuentemente la espermatogénesis y la ovogénesis. El control de los niveles de la gonadotropina ha tenido varias aplicaciones que van desde la medicina humana hasta la veterinaria (Bliss, Navratil, Xie, & Roberson, 2010). Esta última ha servido para controlar la capacidad reproductiva en mascotas y diferentes especies domésticas y silvestres. Asimismo, esto se ha presentado como una alternativa a la castración quirúrgica en machos que es realizada no solo para evitar el comportamiento sexual y/o agresivo, impedir que la carne cambie o contraiga cualidades organolépticas no deseadas, debido a

las feromonas como ocurre con los cerdos (Bilskis, Sutkeviciene, Riskeviciene, Januskauskas, & Zilinskas, 2012).

Por lo tanto, los eventos reproductivos se han intervenido por medio de hormonas, principalmente progestina. En la actualidad los progestágenos sintéticos continúan funcionando como métodos de emergencia, ya que actúan espesando el moco en el útero y la vagina. No obstante, su uso se recomienda únicamente para evitar camadas no deseadas si el animal cuenta con un dueño que le supervise. También se ha desarrollado nuevos productos inyectables basados en progestinas, pero la administración prolongada ha tenido efectos adversos en la salud sexual de las hembras por lo que su uso no es ampliamente recomendado (Alliance for the Contraception in Cats & Dogs, 2013). En vista de esto se han desarrollado y elaborado vacunas dirigidas a bloquear la función de la GnRH, las mismas que han sido de gran utilidad actualmente (Sáenz, 2012). Entonces, el objetivo se ha centrado en el desarrollo de vacunas con acción inmunoesterilizante, aunque no solo dirigida contra la GnRH, sino probar con más opciones como la FSH y LH (Norris & Carr, 2013).

1.4. ¿Por qué controlar la reproducción sexual en animales como los caninos?

En la actualidad los animales de compañía constituyen una forma de tener contacto con el reino animal. Por lo mismo, la tenencia o la adopción y el cuidado de las mascotas se han convertido en aspectos esenciales que muestran la responsabilidad personal y el respeto por la vida. En este último siglo el cuidado de las mascotas ha aumentado debido a que ha tenido mayor receptividad en la población (Acero, 2017). A nivel mundial se estima que existen 700 millones de perros, de los cuales en un rango de <10% hasta un 37% no tiene dueño tanto en zonas urbanas como rurales (Meslin & Beyene, 2015).

Al mismo tiempo, el crecimiento descontrolado de los animales tiene efectos negativos en salud pública; conlleva problemas socioeconómicos y a un bienestar animal

precario, que sobre todo afecta a los países en vías de desarrollo (Salamanca, Polo, & Vargas, 2011). Por esta situación es fundamental conocer y comprender la demografía de los perros domésticos y de aquellos que deambulan libremente para controlar el crecimiento de la población y las enfermedades exclusivas de los caninos y las zoonosis transmitidas (Morters et al., 2014).

1.5. Alternativas para controlar la sobrepoblación canina

Hace ya tiempo atrás se considera que el control de la reproducción es el medio que permite controlar el crecimiento demográfico de los caninos (Meslin & Beyene, 2015). Por ende la esterilización quirúrgica y la castración se han considerado por varios años como la panacea a la problemática, no obstante, la falta de responsabilidad por parte de los dueños y la asequibilidad en algunos casos han impedido que se reduzca y controle la sobrepoblación canina. Como consecuencia el número de animales no deseados ha incrementa drásticamente haciendo que el sistema de administración para la esterilización quirúrgica y castración colapse, ya que no alcanza a cubrir la demanda. Por lo tanto, se requiere de métodos contraceptivos adicionales, aunque la eutanasia no es una opción por ser un método inhumano (Nolen, 2007).

Un método alternativo a la esterilización quirúrgica es la castración química, siendo la inmunocastración a través de la vacunación de análogos a las gonadotropinas una de las mejores alternativas (Tataje, 2014). La inmunocastración evita el deterioro sexual y de los órganos reproductivos de los animales, más no así otros métodos químicos como los progestágenos y los agentes esclerosantes, debido a los efectos secundarios negativos en los órganos reproductores (Tataje, 2014; Heyrman et al., 2019). Igualmente, la inmunocastración tiene la ventaja de no ser dolorosa como los métodos quirúrgicos, puesto que en algunas ocasiones por los costos no siempre se usa anestesia o la cantidad suficiente; también se somete a estrés al animal. Además, en base a las revisiones sobre

la inmunocastración se encontró que este tipo de vacunas ya está siendo bastante empleada en países como Brasil, Nueva Zelanda y Australia debido a que resulta económica y no requiere una revacunación en algunos casos (Mancini, Menozzi, & Arfini, 2017).

1.6. Las vacunas contraceptivas

Las vacunas contraceptivas permiten tener una respuesta inmune humoral y/o celular ante los antígenos inoculados en el organismo. Estas vacunas en general según su diseño se clasifican como inhibidoras de la producción de gametos, donde juegan un papel importante hormonas como la GnRH, la FSH y la LH. Otro tipo de vacunas está dirigida contra la función de los gametos, por lo que se emplean antígenos como los de la zona pelúcida (ZP). En general, las vacunas contraceptivas presentan ventajas atractivas debido a que su producción es sencilla, económica, de fácil aplicación, bastante segura, presenta menos errores en el funcionamiento y evita el uso de hormonas exógenas o dispositivos que suelen tener efectos secundarios. En vista de esto, las vacunas contraceptivas son una propuesta interesante y accesible no solo para los países desarrollados sino para los países en vías de desarrollo también (Lekhwani, Vaswani, Ghalaut, Shanker, & Singh, 2014).

En vista de esto a partir de 1992, se desarrolló por el Centro Nacional de Investigación de la Vida Silvestre del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (NWRC) un proyecto de investigación y desarrollo enfocado en el control reproductivo de especies silvestres. Principalmente se consideró a los ciervos de cola blanca por tener una excesiva población, causar daños públicos y de la propiedad privada. Estas investigaciones conllevaron al método contraceptivo basado en una vacuna con componentes de la ZP porcina. Posteriormente, se desarrollaron vacunas que tenían como antígeno a la GnRH,

ya que su acción no solo se limita a las hembras y a una sola especie (Miller, Fagerstone, & Eckery, 2013).

Al final, la vacuna denominada GonaCon fue capaz de suprimir la secreción de hormonas esteroideas, la ausencia del estrógeno y de la espermatogénesis con solo una aplicación en la mayoría de los casos. GonaCon fue construida basándose en la molécula GnRH acoplada en la proteína transportadora, KLH, más un adyuvante de aceite mineral con *Mycobacterium avium*. Sin embargo, con la experimentación y los años se han ido mejorando las vacunas (Miller, Fagerstone, & Eckery, 2013).

Debido a que existen diversas alternativas en cuanto a la neutralización de las gonadotropinas que impiden la producción de espermatogénesis y los ovocitos, se ha considerado que la inmunoneutralización de la FSH es esencial para impedir el desarrollo en este caso de los folículos ováricos en la ovulación y los túbulos seminíferos y posteriormente la espermatogénesis (Gupta, Shrestha, & Minhas, 2014).

La administración de anticuerpos anti-FSH en *Macaca radiata* del género masculino hizo que la espermatogénesis tenga lugar en una mínima proporción que al final desencadenó infertilidad. En cambio, en los ratones machos la eliminación de los receptores FSH provocó un hipogonadismo. No obstante, la inmunización con FSH ovina a monos machos Rhesus inhibió con bastante éxito la espermatogénesis, sin causar afectación a los órganos reproductores o a los niveles de testosterona en la sangre. Considerando que la LH es importante en la esteroidogénesis en ambos sexos, se inmunizó activamente con la subunidad β de la LH ovina a las hembras Rhesus (Gupta, Shrestha, & Minhas, 2014). Esto ocasionó un decrecimiento de los niveles de progesterona en la fase lútea del ciclo ovárico; pese a esto los efectos de la infertilidad pueden ser revertidos mediante la administración de acetato de medroxiprogesterona (Thau & Sundaram, 1980). Adicionalmente, el bloqueo del receptor de la LH parece tener

un gran potencial para inhibir la espermatogénesis hasta en un 75% y reducir los niveles de testosterona en los ratones machos, por lo que se considera como una buena opción para una vacuna contraceptiva (Gupta, Shrestha, & Minhas, 2014) .

1.7. El sistema inmunológico en respuesta a las vacunas

Las vacunas actuales tienen una aplicación subcutánea o intramuscular y su acción posteriormente va a depender de la interacción con el sistema inmunológico. Por lo mismo es que se considera la reacción desencadenada en el lugar de la inyección (procesamiento del antígeno por células macrofágicas) y la ruta hacia los ganglios linfáticos (presentación del antígeno e interacción con linfocitos). A continuación esto conlleva al reconocimiento del antígeno por los linfocitos B y T, que más tarde ocasionará una proliferación, maduración y diferenciación de células para luego pasar a la etapa efectora, donde se da una generación de anticuerpos específicos para el antígeno reconocido y de células T efectoras. Adicionalmente, tiene lugar una memoria inmunológica que permitirá tener una rápida respuesta inmunológica ante la exposición futura al antígeno (Siegrist & Lambert, 2016).

Debido a que la mayoría de las vacunas está enfocada en el desarrollo de anticuerpos, existen algunos otros mecanismos involucrados como la unión a los sitios activos enzimáticos de moléculas, toxinas, entre otros, para evitar su acción. Esto puede tener lugar también por medio de la acción de la cascada de reacciones del complemento que da inicio a la opsonización y fagocitosis por los neutrófilos y macrófagos. Estos mecanismos funcionan para microorganismos o patógenos extracelulares que ingresan al cuerpo, mientras que para el reconocimiento de los antígenos de las vacunas como las proteínas es fundamental el reconocimiento por los receptores de las células B, al igual que la interacción dentro de los nódulos linfáticos de las células T y B (Clem, 2011).

1.8. Factibilidad del diseño de una vacuna análoga a la LH

En las investigaciones previas y en el desarrollo de vacunas antigonadotropinas, se conoce que el diseño de una vacuna análoga a la LH es posible principalmente por los recursos como la inmunoinformática que aunque es un campo nuevo, es bastante prometedor ya que permite la predicción de epítomos que son esenciales para desencadenar una respuesta inmune en el organismo. Además, el uso de enfoques computacionales ahorra recursos económicos, debido a que se dispone de bases de datos y softwares de acceso libre que permite tener predicciones bastante similares a las técnicas experimentales. Al mismo tiempo minimiza el tiempo de investigación, pues se omite diversos procedimientos de laboratorio; pero se tiene la ventaja de que el enfoque *in silico* guía con un alto nivel de confianza el trabajo experimental y facilita la obtención del resultado deseado (Alam, Ali, Ahamad, Malik, & Ishra). Finalmente, las técnicas bioinformáticas permiten reducir considerablemente el número de animales de experimentación, mejorando de esta manera el bienestar animal en el ámbito del trabajo científico.

1.9. Etapas del desarrollo de una vacuna peptídica

Gracias al uso actual de la inmunoinformática para el diseño de vacunas y considerando que estas deben causar una respuesta inmune, el análisis parte por la recuperación de las secuencias de interés; en este contexto un péptido o proteína que puede ser obtenido de repositorios como UniProt, Protein-NCBI, entre otros (Alam, Ali, Ahamad, Malik, & Ishra, 2016). En este caso las secuencias de interés corresponden a la hormona luteinizante de diferentes especies como perro, ratón, humano y rata, para posteriormente determinar los epítomos que formarán parte de la vacuna multi-epítomo contra la LH (Aponte, Cubas Céspedes, & Méndez, 2019).

Subsiguientemente las secuencias de aminoácidos se someten a varios métodos analíticos que permiten conocer la estructura, función, características y evolución (Alam, Ali, Ahamad, Malik, & Ishra, 2016). Para esto por medio del software MEGA7 se alinean las secuencias de LH de las especies mencionadas, donde se identifica en base a las mutaciones la divergencia evolutiva, al igual que las secuencias conservadas entre ellas (Aponte, Cubas Céspedes, & Méndez, 2019; Alam, Ali, Ahamad, Malik, & Ishra, 2016). Además, se realiza una predicción de los epítomos lineales de las células B para determinar si habrá interacciones entre estos linfocitos y con los epítomos del antígeno (LH) de tal forma que se desencadene una respuesta inmunitaria. Por ello, para determinar la efectividad de los fragmentos de los epítomos de la LH, se inicia con la predicción de estos por medio de la base de datos IEDB y BepiPred que arrojará a partir de las secuencias de los antígenos la predicción de los epítomos de las células B (Jespersen, Peters, Nielsen, & Marcatili, 2017). Finalmente para la validación de los resultados con respecto a los epítomos se emplea ABCPred, un servidor de predicción de epítomos basado en una red neuronal artificial (Aponte, Cubas Céspedes, & Méndez, 2019).

Además, para el modelado de la LH o su estructura 3D se emplean programas como I-Tasser y Phyre2. Por un lado, Phyre2 permite evaluar la estructura secundaria de los epítomos y conocer si existen otras proteínas parecidas. Este análisis permite determinar si la futura vacuna podrá tener reacciones secundarias en el organismo al ser inoculada. Al mismo tiempo, por medio de Dali server se obtienen los códigos de las proteínas similares a la LH de perro y ratón con las proteínas humanas. Los códigos de las proteínas humanas son leídos en Uniprot, del cual se obtiene la secuencia de aminoácidos que permiten hacer un Protein BLAST. Por medio de esto se muestran varias proteínas tanto de perro como de ratón que son similares a la secuencia problema. Posteriormente por medio de MEGA7 se alinean todas las secuencias para identificar más tarde mediante

árboles filogenéticos a aquellas secuencias que presentan mayor similitud en términos evolutivos. De estas proteínas similares, las nuevas alineaciones con los epítomos permiten comprobar si habrá reacciones cruzadas o no (Aponte, Cubas Céspedes, & Méndez, 2019). Una reacción cruzada podría generar un ataque inmunológico a otras proteínas diferentes al blanco de la vacuna y que pudieran ser de importancia fisiológica para el animal.

Como siguiente paso las predicciones de alergenicidad mediante AlgPred permiten de acuerdo a su base de datos conocer los alérgenos y no alérgenos según la similitud con los epítomos. Por otra parte, en ANTIGENpro se predice la antigenicidad de los epítomos para establecer por medio de SVM si la proteína en cuestión (LH) es o no antigénica. Finalmente, ExPASy-ProtParam ayuda a establecer las propiedades fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos que será empleada en la vacuna, de tal forma que se pueda garantizar que el péptido no se degrade durante el ensamblado del conjugado (Aponte, Cubas Céspedes, & Méndez, 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Analizar la especificidad antigénica de secuencias de aminoácidos de la hormona lutenizante (LH) de *Mus musculus* y *Canis lupus familiaris*.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar las estructuras 3D de la LH canina y murina contra proteínas humanas en Dali server.
- Cruzar referencias de las estructuras terciarias de proteínas humanas a su estructura primaria en UniProt.

- Encontrar secuencias proteicas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* similares a las secuencias proteicas de *H. sapiens*.
- Realizar alineamientos múltiples secuencias de aminoácidos de *H. sapiens*, *C. lupus familiaris* y *M. musculus*.
- Agrupar a las proteínas humanas, caninas y murinas en base a la similitud de los aminoácidos mediante el método de Neighbor joining.
- Predecir la reactividad cruzada entre proteínas humanas, murinas y caninas según su agrupación por el método de Neighbor joining.

3. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador no se cuenta con datos demográficos de la población canina, sin embargo, en el Distrito Metropolitano de Quito (DMQ) hasta el año 2017 se estimó que existían aproximadamente 450.000 animales, de los cuales un tercio fueron abandonados o nunca tuvieron dueño; alrededor de 150.000 se consideraron como deambulantes con propietario y los 150.000 animales restantes fueron los únicos que recibían un cuidado responsable por parte de sus dueños y no vagaban por las calles (Castellanos, 2018). Posteriormente, en el censo del 2018 en el DMQ se encontró que en promedio existe un perro abandonado por cada 22 personas, pero en las parroquias urbanas el radio fue menor que en las parroquias rurales (de la Torre, Figueroa, Cárdenas, Sampedro, & Grijalva-Rosero, 2019). Por otra parte, en el país en general se presentan las condiciones de hábitat y el entorno apropiado para la reproducción de los animales sea a lo largo del año, lo cual ha favorecido que en la última década se incremente el número de perros sin dueño, trayendo consecuencias negativas sobre todo a los sectores socialmente convulsos, que es donde se concentran la mayoría de estos animales (Barba, 2017).

Debido al crecimiento poblacional canino descontrolado se genera una rápida propagación de enfermedades de transmisión sexual, parasitarias y zoonóticas propias de

esta especie. Igualmente, por las peleas entre ellos y ladridos causan temor; promueven la suciedad o al menos existe la percepción de que ensucian las calles al ir escarbando entre la basura y de allí el desprendimiento de malos olores y proliferación de enfermedades por vectores. Los perros pueden morder a los humanos, causar accidentes viales por la inadaptación social y generar repercusiones económicas. Por tales motivos los caninos se convierten en incordio para la ciudadanía (Alliance for the Contraception in Cats & Dogs, 2015; Barba, 2017).

En todo sentido el bienestar animal se ve afectado, pues no tienen una alimentación adecuada, están enfermos, lesionados o lastimados, son agredidos o maltratados por ser animales que viven en la calle. A esto se suma la matanza inhumana por envenenamiento y la electrocución por ser medios baratos y rápidos (Morters et al., 2014). Este tipo de actos conllevan a más sufrimiento animal, incluso se mata a perros que deambulan pero tienen un dueño, que genera una reacción de rechazo y denuncia. Al final la problemática debe ser tratada por los gobiernos, sin embargo, trae repercusiones debido a que se requiere mayores inversiones y costos relacionados a la implementación de campañas de control de reproducción animal, sistemas de cuidado, creación de hospitales veterinarios públicos, entre otros (Oña, 2016). Desde otra perspectiva el maltrato animal y las prácticas inhumadas de control generan una mala reputación a nivel internacional para un país así como el reconocimiento si se controla la problemática (Alliance for the Contraception in Cats & Dogs, 2015).

Como una forma de mitigar el crecimiento demográfico canino, muchos métodos de anticoncepción han sido probados, idealmente los que tienen efecto permanente e irreversible como la esterilización quirúrgica y la castración. Existen los métodos anticonceptivos temporales por medio de vacunas e implantes, aunque la esterilización química ha llegado a lograr efectos en la infertilidad permanentemente (Max, Jurka,

Dobrzynski, & Rijsselaere, 2015). Cualquiera de los métodos, pese a que constituyen alternativas para controlar la sobrepoblación animal, presenta complicaciones y desventajas relacionadas a factores como el uso de una técnica quirúrgica inapropiada, complicaciones postquirúrgicas como hemorragias, infecciones, incontinencia urinaria, granulomas; en la castración, además se tiene hinchazón escrotal y moretones (De Cramer & May, 2015).

En la búsqueda de agentes y métodos menos invasivos y más seguros que la castración y la esterilización quirúrgica, el uso de antagonistas de hormonas relacionadas con la fertilidad ha sido una excelente opción. En la castración química mayormente se usa antagonistas de la GnRH, donde más de 2000 análogos fueron desarrollados y sintetizados, sin embargo, la duración, la potencia del antagonista y la dosis de tratamiento varían entre uno análogo y otro (Morsink, 2009). De estos antagonistas la deslorelina es uno de los más usados, pero este tipo de implantes no es asequible para todo el público y tiene una supresión parcial y variable de las actividades sexuales fisiológicas, ya que en machos de diferentes especies se ha visto que los niveles de testosterona permanecen constantes e incluso aumentan (Grosset, Peters, Peron, Figuéra, & Navarro, 2012).

Por otra parte, la supresión de la LH mediante una vacuna es una alternativa viable en la inmunocostrucción, ya que esta hormona está relacionada con la funcionalidad del sistema reproductor maduro, como lo son liberación de espermatozoides y la ovulación (Golan, Biran, & Levavi-Sivan, 2014). Además, la administración de esta vacuna anticonceptiva podría prevenir la maduración sexual (Mora et al., 2017). Adicionalmente, la administración de esta vacuna en un modelo animal pequeño como el ratón es segura, por ser el mamífero más usado en la investigación médica gracias a que es de fácil cuidado; el tiempo generacional es rápido, a la vez tiene un alto desempeño reproductivo

(Hernández, 2006). Asimismo, este mamífero tiene gonadotropinas que presentan características similares a las de otras especies domésticas y primates, lo que lo hace un modelo adecuado para la fisiología reproductiva (Kumar, 2005; Mullen, Cooke, & Crow, 2013). Igualmente, los resultados de la reacción inmunológica del organismo pueden ser evaluados sin mayor complicación a consecuencia de la estimulación de anticuerpos contra el péptido reproductor endógeno, por lo que estos estudios en ratones pueden dar paso a pruebas en caninos (Mora et al., 2017).

4. ÁREA DE ESTUDIO

Los estudios y análisis para el presente trabajo se realizaron en el Departamento de Ingeniería Química, dentro del Grupo de Química Computacional y Teórica (QCT-USFQ) de la Universidad San Francisco de Quito.

5. MATERIALES

5.1. Dali server

Dali server (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali>) es un servidor en línea que permite el análisis comparativo de proteínas mediante sus estructuras en 3D. Este tipo de comparación puede identificar muchas más similitudes biológicamente importantes entre las proteínas, pero no así si solo se comparara las secuencias de aminoácidos. El servidor asume que existe continuidad evolutiva en la función y la estructura proteínica, que permite interferir sobre las funciones de proteínas poco conocidas o descubiertas hace poco (Holm & Laakso, 2016).

Por otro lado, las comparaciones estructurales se realizan por medio de la búsqueda en Protein Data Bank (PDB), que permite consultar la estructura interés con PDB y con esto se obtienen como resultados todas las estructuras similares. Por su parte, la comparación por pares permite comparar la estructura de interés con otras estructuras

especificadas por el usuario. En las comparaciones de estructura contra todas las proteínas se obtiene como resultados un dendograma que permite la subcategorización de las proteínas; también se tiene una matriz de similitud a nivel estructural y finalmente a través del conjunto de estructura indicadas se devuelve una proyección a escala multidimensional (Holm & Laakso, 2016).

5.2. Microsoft Excel

Esta aplicación de hojas de cálculo es compatible para la descargar los códigos PDB de las proteínas obtenidos tras la búsqueda realizada en Dali server. A la vez aquí se puede ordenar a las proteínas según su nivel de relevancia, para posteriormente poder buscar estos códigos PDB en Uniprot.

5.3. UniProt

UniProt (<https://www.uniprot.org/>) es una base de datos gratuita de secuencias de proteínas y anotaciones de funcionalidad que se actualiza cada tres semanas. Aquí se incluye información derivada de estudios de investigación con respecto a la funcionalidad biológica de las proteínas (The UniProt Consortium, 2007). Entre las principales actividades que se pueden realizar están la curación manual de secuencias de proteínas haciendo uso de análisis computacionales y la provisión de archivos de secuencias (Suzek, Huang, McGarvey, Mazumder, & Wu, 2007; Apweiler et al., 2014). Para esto UniProt se basa en UniProt Knowledgebase (UniProtKB), donde se realizan anotaciones en base a información de literatura y un análisis computacional. También se provee información sobre la estructura, función, interacciones, sitios y dominios importantes biológicamente, expresión de la proteína en el desarrollo, especificidad, isoforma y enfermedades asociadas, entre otros (Suzek, Huang, McGarvey, Mazumder, & Wu, 2007).

Otro de sus componentes, UniRef, provee conjuntos o clústeres jerárquicos de las secuencias de UniProtKB y registros seleccionados de UniProt Archive, con lo cual la cobertura y la identidad de la secuencia llega a ser desde 100%, 90% y 50%, sin embargo, las secuencias redundantes no son tomadas en cuenta (Suzek, Huang, McGarvey, Mazumder, & Wu, 2007). Por otra parte, UniProt archive (UniParc) contiene toda la información con respecto a las secuencias de nuevas proteínas y la historia de todas las secuencias de las proteínas. UniParc al estar asociado con otras bases de datos como EMBL Bank, GenBank, IPI, PDB, PRF, DDBJ, etc. provee de una mayor cobertura en las secuencias. En cambio, UniMES (base de datos de secuencias metagenómicas y ambientales) posee datos de secuencias de nucleótidos de GOS, por lo que contiene mayormente información genómica de los microorganismos oceánicos y a la vez ayuda a predecir sobre las proteínas. Esta información está integrada UniParc y presentada en formato FASTA y al mismo tiempo tiene acceso a otros recursos analíticos (The UniProt Consortium, 2007).

5.4. Protein BLAST de NCBI

BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) forma parte del servidor de NCBI y es una de las herramientas más usadas en biología molecular para comparar secuencias de nucleótidos y aminoácidos. En este caso Protein BLAST permite la consulta de proteínas ingresadas en una base de datos de proteínas y posteriormente se realizan alineaciones de las secuencias. Las proteínas por ser de naturaleza modular y tener dominios funcionales que se repiten en sí mismas y en otras proteínas de diferentes especies, el algoritmo BLAST permite encontrar estos dominios, es decir, la similitud entre las secuencias. Esta similitud permite conocer que tan buena es la alineación y si la secuencia de entrada tiene relación biológica con las secuencias encontradas o esto únicamente se debe al azar. Para esto se tiene una puntuación de bits que indica qué tan

buena es la alineación. Igualmente mediante estadística se obtiene un valor E o esperado para cada par de las alineaciones (query to hit), donde menor sea el valor es menos probable que la similitud sea por casualidad (Madden, s. f).

5.5. MEGA7

MEGA7 es un software de Análisis de Genética Evolutiva Molecular para el análisis de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Posee métodos y herramientas para la filogenómica y filomedicina gracias a que cuenta con un sistema avanzado para la creación de árboles de tiempo junto con la predicción de eventos de duplicación de genes (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Para esto el programa cuenta con métodos de estimación de distancias evolutivas, diversidad genética dentro y entre grupos, cálculo de la secuencia molecular y los árboles filogenéticos se infieren bajo criterios de evolución mínima, máxima parsimonia, UPGMA y Neighbor joining. En MEGA se suben archivos de texto ASCII básicos donde se incluyen las secuencias de nucleótidos o aminoácidos, datos de árboles filogenéticos o de distancias evolutivas. Dado a que los archivos ASCII tienen la terminación .TXT deben cambiarse a la extensión .MEG o .FAS para el procesamiento en el software (Tamura et al., 2011).

5.6. Clustal Omega

Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) es un programa de alineación de múltiples secuencias de nucleótidos o aminoácidos de forma rápida, completa y precisa. La alineación basada en las secuencias homólogas o en la homología de los residuos de nucleótidos/aminoácidos de distintas secuencias se ordena por columnas. El procedimiento de alineación es fundamental en bioinformática para el posterior análisis filogenético como la construcción de árboles filogenéticos, la comparación de genes y proteínas homólogas (Sievers & Higgins, 2014). La rapidez y precisión con la que trabaja el programa se debe a que usa el algoritmo mBed y Hhalign,

es decir, un alineador oculto de Markov que no solo reduce el tiempo sino también la complejidad de cálculo del árbol guía (Sievers & Higgins, 2013).

6. MÉTODOS

6.1. Búsqueda de proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* en Dali server

Se ingresó en el siguiente enlace de Dali server (<http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/dali>), se introdujo los archivos en formato PDB de las estructuras 3D de la LH tanto *C. lupus familiaris* y *M. musculus* y se estableció un análisis comparativo con proteínas humanas. Posteriormente, se ingresó un correo electrónico al cual llegó un enlace con los resultados de las proteínas similares. Tras abrir dicho enlace se obtuvo todos los resultados de las proteínas humanas similares a la LH canina y murina y se procedió a descargar como archivo de texto en WordPad. Sin embargo, para una mejor visualización de los resultados del emparejamiento de las proteínas, el archivo se abrió en Microsoft Excel correspondiente a dos archivos de las proteínas humanas similares a la LH de perro y a la LH de ratón. Aquí los resultados se mostraron en filas, pero fueron ordenados en columnas para identificar cada categoría como PDB ID, Chain, Description, etc. como se presenta en las Tablas 1 y 2.

6.2. Recuperación de secuencias de las proteínas (PDB ID) en UniProt

Se accedió a la base de datos de UniProt (<https://www.uniprot.org/>) y se escogió la opción Retrieve/ID mapping debido a que permite ingresar uno o una lista de identificadores como PDB IDs, obtenidos anteriormente en Dali server. Aquí se ingresaron todos los códigos PDB de los archivos de Microsoft Excel para las LH de perro y ratón contra las proteínas humanas, pero considerando que la recuperación de estos códigos iba a hacerse en UniProtKB, puesto que se buscaba recopilar información funcional y estructural de las proteínas.

A continuación se abrió en UniProt una ventana con los resultados de las proteínas humanas con respecto a los códigos PDB introducidos. Aquí se comparó los PDB ID y las cadenas (Chain) de los archivos de Microsoft Excel con sus respectivos identificadores de entrada encontrados por UniProt; aquellos que coincidieron se seleccionaron y se descargaron en formato Excel. Dentro de los archivos de Microsoft Excel se generaron dos tablas respectivamente, que contenían los PDB ID con sus respectivos códigos de acceso para las proteínas humanas en Uniprot.

6.3. Búsqueda de códigos de acceso de proteínas humanas en Uniprot para obtener secuencias en formato FASTA

En UniProtKB se introdujo cada uno de los códigos de acceso de las proteínas humanas obtenidas y ordenadas en los archivos de Microsoft Excel. A continuación se seleccionó la pestaña “Sequence” y se obtuvo la secuencia correspondiente en formato FASTA. Este mismo procedimiento se realizó para las proteínas humanas que hicieron match (emparejamiento) con la LH canina y LH de ratón.

6.4. Protein BLAST de las secuencias de proteínas humanas contra las proteínas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus*

Se accedió a Protein BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se ingresó cada una de las secuencias FASTA (secuencias de proteínas humanas) recuperadas en UniProt. Como la base de datos para la búsqueda y alineación de las secuencias de aminoácidos se seleccionó “Non-redundant protein sequences” para establecer la comparación entre organismos *C. lupus familiaris* y *M. musculus*. Se procedió con la pestaña BLAST y luego de un momento se desplegaron todas las alineaciones significativas con respecto a la “secuencia query”, las mismas que se descargaron en formato FASTA.

6.5. Alineación múltiple de secuencias procedentes de Protein BLAST contra proteínas humanas

6.5.1. Alineación múltiple de secuencias de proteínas y construcción de árboles filogenéticos en MEGA7

El archivo en formato FASTA de cada uno de los resultados obtenidos en Protein BLAST junto con la secuencias FASTA de UniProt se abrieron en el software MEGA7. Aquí se seleccionó la pestaña “Alignment” y consecuentemente “Alignment by ClustalW” que permitió el alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas. Luego el resultado de las alineaciones de aminoácidos se guardó con la terminación .maxx y este archivo fue exportado para la construcción de árboles filogenéticos basados en el método de Neighbor-Joining. Luego de esto, ciertas proteínas obtenidas de Protein BLAST se agruparon con la secuencia query dentro de un mismo clúster, por lo que estas se seleccionaron dentro de un nuevo archivo FASTA.

6.5.2. Alineación múltiple de secuencias de proteínas y construcción de árboles filogenéticos en Clustal Omega

En MEGA7 no se pudo realizar todas alineaciones múltiples de secuencias, debido a que no se pudo calcular todas las distancias por pares. Por lo tanto, se usó el programa en línea Clustal Omega. Aquí se cargó cada uno de los archivos en formato FASTA que contenían las secuencias de las proteínas descargadas de Protein BLAST y la secuencia query. La alineación de secuencias múltiples se realizó mediante ClustalW y se agregó un correo electrónico para recibir los resultados, donde se mostraba la alineación de las secuencias de aminoácidos y un árbol filogenético que contenía varios clústeres de proteínas. A partir del grupo de proteínas que contenía a la secuencia query se elaboró un archivo FASTA que fue usado posteriormente.

6.6. Alineación de secuencias de proteínas obtenidas mediante alineaciones en MEGA7 y Clustal Omega con los epítomos de la LH de perro y la LH de ratón

A cada uno de los nuevos archivos FASTA elaborados mediante clusterización se les agregó las secuencias de los epítomos de la LH de perro y la LH de ratones respectivamente indicadas en la sección de resultados. Se procedió con las alineaciones de las secuencias de aminoácidos en MEGA7 y Clustal Omega, donde posteriormente el método de agrupamiento fue Neighbor joining para la elaboración de árboles filogenéticos. Igualmente, a estos árboles se incluyó las siguientes opciones de filogenia: el formato del árbol en base a matrices de distancia, corrección de distancias y exclusión de los gaps. Tras obtener los árboles filogenéticos se identificó a las proteínas que se unieron en un mismo clúster con uno o más epítomos presentados en la Tabla 5. Consecutivamente se clasificó estos resultados en tablas donde se especificó a las proteínas tanto humanas, caninas y murinas con los epítomos de las dos últimas especies con los que hubo similitud en la secuencia de aminoácidos.

7. RESULTADOS

7.1. Comparación de las estructuras 3D de la LH canina y murina en Dali server

7.1.1. Resultados de la comparación entre LH canina con la base de datos de proteínas humanas de Dali server

Tras introducir en Dali server el archivo PDB con la estructura 3D de la LH canina se obtuvieron 176 hits luego de la comparación con las proteínas humanas que estuvieron disponibles durante el mes de noviembre del 2018. En la Tabla 1 se encuentran los resultados de este análisis comparativo, donde cada proteína que mostró un porcentaje de identidad entre 12 y 66% con la proteína de entrada. Adicionalmente, cada una de estas proteínas fue identificada con un PDB ID así como la cadena peptídica (Chain) con la que

se presenta similitud, de tal forma que no haya confusión para identificarlas posteriormente. Asimismo, se indica la longitud de la alineación (lali) de las proteínas con la LH de *C. lupus familiaris*, donde se observó que esta longitud difiere entre proteínas debido a que pertenecen a diferentes grupos. Sin embargo, individualmente cada alineación usó completamente o la mayor parte de los residuos (nres). Además, el Z score para cada proteína fue desde 14,8 hasta 2,1 y desviación cuadrática media (rmsd) para las 176 proteínas estuvo en un rango de 0,9 hasta 4,4.

7.1.2. Resultados de la comparación entre LH murina con la base de datos de proteínas humanada de Dali server

Al ingresar el archivo PDB de la estructura 3D de la LH murina en Dali server se consiguieron 217 hits para la comparación con las proteínas humanas disponibles durante el mes de noviembre del 2018. Estos resultados procedentes de análisis comparativo se presentan en la Tabla 2, donde cada proteína tiene su respectivo identificador (PDB ID) y la cadena peptídica (Chain) con la que hubo similitud. Las 217 proteína humanas tuvieron una identidad (% ID) de 12 a 64% con la LH de *M. musculus* y también durante la alineación se usó la mayor cantidad o todos los residuos (nres). Con respecto a la longitud de los alineamientos (lali) individuales, tuvieron diferentes longitudes debido a que no todas coincidieron entre los aminoácidos con la LH de *M. musculus*. No obstante, las alineaciones de aminoácidos en su mayoría fueron adecuadas debido a que gran parte de los valores de rmsd estaban entre 1,2 y >4, pero unas pocas proteínas tuvieron puntuaciones entre 4 hasta 4,3. En los valores Z, las proteínas obtuvieron puntajes desde 2,3 hasta 14,3, aunque la mayor parte de estas tuvieron un Z score superior a 4.

7.2. Identificación de códigos de proteínas de *Homo sapiens* en UniProtKB (UniProt)

7.2.1. Selección de Mnemonic Code (X) de proteínas de *H. sapiens* que fueron similares a la LH de *C. lupus familiaris*

Los 176 identificadores PDB con sus respectivas cadenas obtenidos en Dali server se buscaron en UniProtKB, de donde 69 de los PDB ID correspondieron a 13 proteínas de *H. sapiens* que se recuperaron en UniProtKB. Estos resultados se presentan en la Tabla 3, en la que se encuentran los PDB ID de cada proteína relevante extraída de Dali server y las proteínas humanas correspondientes con su Mnemonic Code (X) de UniProtKB.

7.2.2. Selección de Mnemonic Code (X) de proteínas de *H. sapiens* que fueron similares a la LH de *C. lupus familiaris*

De los 217 identificadores PDB con sus cadenas correspondientes obtenidos en Dali server que se ingresaron en UniProtKB, 61 PDB ID se recuperaron con 11 proteínas de *H. sapiens*. Como se observa en la Tabla 4, para cada PDB ID de Dali server o el conjunto de estos existe una proteína human recuperada e identificada con un Mnemonic Code (X) de UniProtKB.

7.3. Agrupación de proteínas humanas relacionadas con las proteínas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus*

7.3.1. Agrupación de proteínas de *H. sapiens* con proteínas de *C. lupus familiaris*

Luego de que se introdujeron individualmente 20 secuencias query de *H. sapiens*, cuyos identificadores se presentan en la Tabla 3, contra *C. lupus familiaris* en Protein BLAST, se obtuvieron 20 archivos formato FASTA de los cuales, tras alineaciones múltiples en MEGA7 y Clustal Omega posteriormente se logró obtener 20 árboles filogenéticos, de los cuales se identificó cada clado en el que la secuencia query se agrupó

con las proteínas de perro como se visualiza en la Figura 2. A partir de cada clado o grupo de proteínas se generaron 20 archivos en formato FASTA con las secuencias de los fragmentos de los epítomos extraídos de la LH canina indicados en la Tabla 5.

7.3.2. Agrupación de proteínas de *H. sapiens* con las proteínas de *M. musculus*

Tras de ingresar individualmente 11 secuencias query de *H. sapiens*, con códigos indicados en la Tabla 4, contra *M. musculus* en Protein BLAST se descargaron 11 archivos formato FASTA. A partir de estos archivos se obtuvieron 11 alineaciones múltiples de aminoácidos en MEGA7 y Clustal Omega que sirvieron para desarrollar 11 árboles filogenéticos que agruparon por clados a la secuencia query con las proteínas de ratón como se presenta en la Figura 3. A partir de cada clado o grupo proteínas relacionadas se realizaron 11 archivos en formato FASTA con las secuencias de los fragmentos de los epítomos extraídos de la LH murina indicado en la Tabla 5.

7.4. Identificación de reacciones cruzadas entre las proteínas

7.4.1. Reacciones cruzadas entre las proteínas de *H. sapiens* y *C. lupus familiaris*

La construcción de árboles filogenéticos de proteínas humanas y de perro con los epítomos de la LH canina, como se presenta en la Figura 4, permitió identificar a las proteínas con las que puede haber reacciones cruzadas por medio de la vacuna anti LH dado a que se encontró alguno de los epítomos dentro de dichas proteínas, mismos que se indican en la Tabla 6. Se encontró que la proteína P0DN86 correspondiente a *H. sapiens* posee como epítomo específico al denominado como 4, cuya secuencia se indica en la Tabla 5. Igualmente, se detectó que la proteína F6XSY4 de *C. lupus familiaris* presentó como epítomo a 1, el cual también es específico para a la LH canina.

7.4.2. Reacciones cruzadas entre las proteínas de *H. sapiens* y *M. musculus*

Los árboles filogenéticos de proteínas humanas y de ratón con los epítomos de la LH murina (Tabla 5) como el que se expone en la Figura 5 indican una posible reacción cruzada debido a estas proteínas están agrupadas en el mismo clado que uno de los epítomos. De estos análisis se encontró que con las proteínas humanas O43915 y Q00604 existe la posibilidad de reacciones cruzadas, debido a que se agruparon en el mismo clúster que el epítomo 4 como se expone en la Tabla 7.

8. DISCUSIÓN

Desde que inició el desarrollo de las vacunas la especificidad y la eficacia han sido factores críticos a estudiar para garantizar que la vacuna cumpla con la función de inducir una inmunidad específica en el organismo (Arnon & Van Regenmortel, 1992). Por lo tanto, la especificidad permite determinar hasta qué grado y qué capacidad tiene el sistema inmunitario para discriminar entre diferentes epítomos (Fairlie-Clarke, Shuker, & Graham, 2008). Puesto que la relación entre un epítomo y un paratope no es exclusiva, pueden tener lugar reacciones cruzadas, es decir, una ausencia de la discriminación por parte del sistema inmunológico (Frank 2002; Fairlie-Clarke, Suker, & Graham, 2008). Por lo mismo, una vacuna puede generar reacciones contra otras moléculas diferentes antigénicamente. De estas, la reactividad compartida se desencadena cuando un anticuerpo reconoce al mismo epítomo en dos proteínas multideterminantes relacionadas (Arnon & Van Regenmortel, 1992). Sin embargo, la reactividad cruzada verdadera se desarrolla cuando un anticuerpo reacciona con un epítomo diferente, pero estructuralmente relacionado con el epítomo del antígeno diana (Frank, 2002).

En el contexto del presente trabajo, el análisis bioinformático permite determinar si el péptido anti LH que integra a la vacuna contraceptiva para murinos y potencialmente para caninos, es lo suficientemente específica como para bloquear a la hormona

luteinizante cuando se libera naturalmente en el organismo. Además, la especificidad permite elucidar la posibilidad de que la vacuna induzca a reacciones cruzadas con otros tipos de proteínas relacionadas que se encuentran en el organismo y por ende los anticuerpos contra estos péptidos (Fairlie-Clarke, Shuker, & Graham, 2008). Ante esto, los resultados obtenidos indicaron que los epítomos del polipéptido anti LH de la vacuna es bastante específico, puesto que con la mayoría de las proteínas diferentes de la LH no habrá reacciones cruzadas. Al mismo tiempo al ser esta vacuna aplicada primeramente en ratones, no se detectó ninguna reacción cruzada con las demás proteínas de este animal.

Para el análisis de la especificidad molecular de la vacuna anti LH, se empleó softwares y bases de datos bioinformáticos que permitieron primeramente en Dali server la búsqueda en la base de datos PDB de proteínas humanas que fueran estructuralmente similares a las estructuras 3D de la hormona luteinizante de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* que fueron introducidas como entrada. Estas comparaciones se hicieron contra las proteínas humanas debido a que la base de datos para esta especie contiene una vasta información de las estructuras proteínicas de este organismo (Holm, Kääriäinen, Wilton, & Plewczynski, 2006). Este método de búsqueda permite obtener las proteínas con mayor similitud por medio de análisis comparativos entre estructura y su respectiva alineación estructural; sin embargo, esto no se podría lograr si es que se emplea exclusivamente el método de búsqueda de secuencias de aminoácidos (Holm & Rosenström, 2010).

La búsqueda en esta base de datos genera como resultado principal una lista comprendida por todas las proteínas estructuralmente cercanas, en este caso esto se observa en las tablas señaladas en la sección de resultados. Cada una de estas tablas tiene 176 y 217 identificadores de Protein Data Bank de las proteínas humanas relacionadas con la LH canina y murina respectivamente. También aquí se incluye las puntuaciones Z que permiten determinar la cantidad de similitud estructural que existe entre las proteínas.

Con respecto a las puntuaciones Z, se logró identificar 13 proteínas con puntuaciones superiores a 8, lo que indica que dichas proteínas tuvieron superposiciones estructurales muy buenas con la LH canina (Holm, Kääriäinen, Wilton, & Plewczynski, 2006). Para las 163 proteínas restantes, las puntuaciones Z fueron inferiores a 8, pero superiores a 2 por lo que estas presentaron similitudes topológicas con la LH. Por otro lado, ninguna de las proteínas tuvo puntuaciones no significativas, es decir, menores a 2 (Holm, Kääriäinen, Wilton, & Plewczynski, 2006).

Se encontró que de las 217 proteínas humanas, 13 tuvieron muy buenas superposiciones estructurales con la LH murina, pero 204 proteínas solamente presentaron similitudes topológicas. Pese a que los resultados muestran que todas las proteínas humanas deben ser consideradas como similares estructural y topológicamente a las LH de perro y ratón, se tiene que considerar que las proteínas tienen pliegues convergentes y divergentes que son específicos de la familia a la que pertenecen (Lichtarge & Sowa, 2002). Igualmente, una gran parte de las proteínas que se encuentran en PDB son hipotéticas, por lo que tienen una función no conocida (Laskowski, Watson, & Thornton, 2005). Por estas razones se tiene que realizar una inspección manual de los resultados por otros métodos como la construcción de familias de proteínas (Landau et al., 2005).

Por otro lado, la información que proporciona Dali respecto a las secuencias y las estructuras de las proteínas es importante para complementar la información sobre las funciones y características de la proteína, al igual que la similitud y la homología con las proteínas de entrada. No obstante, recopilar y clasificar esta información con respecto a secuencia y estructura de las proteínas resulta complejo, sobre todo en la interpretación de las estructuras 3D o tridimensionales, por lo que UniProtKB provee referencias

cruzadas con PDB. Aquí se asigna un código o identificador UniProtKB específico según la cadena proteínica de PDB (David & Yip, 2008).

Si bien se conoce que la estructura tridimensional proporciona información sobre la función de la proteína, la estructura primaria constituida por aminoácidos permite un análisis más sencillo y rápido, incluyendo sugerencias sobre la funcionalidad de la proteína (Martin, 2005). Por lo tanto, UniProtKB permite recuperar información sobre la estructura primaria de cada uno de los identificadores PDB (Martin, 2005) correspondientes a una cadena específica que conforma a la proteína, indicados en los resultados. Entonces, a partir de la búsqueda en UniProtKB se construyeron tablas de las proteínas humanas en su estructura primaria con sus respectivos códigos. Estos códigos permitieron acceder a la secuencia de aminoácidos que en lo posterior sirvió como secuencia query para compararla con proteínas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* en Protein BLAST. El uso de BLAST se incluyó como enfoque práctico y comparativo para las evaluaciones de seguridad de una vacuna, puesto que permite la comparación de secuencias primarias con las que ya se puede encontrar un buen porcentaje de identidad entre los aminoácidos (Goodman, 2006).

Considerando lo anterior y que cada secuencia extraída de UniProt podía ser similar a otras proteínas de perro y ratón, se utilizó la base de datos no redundante tal como “nr” de BLAST. Esto también debido a que se buscaba encontrar proteínas homólogas, pese a que estas podrían ser remotas. Asimismo, el tamaño de las bases de datos de proteínas ha crecido por lo que muchas de las nuevas secuencias pueden ser similares e incluso casi idénticas a las secuencias de proteínas ya conocidas como las del humano (Li, Jaroszewski, & Godzik, 2002).

Ventajosamente o no NCBI por medio de nrdb, ha eliminado las secuencias idénticas, pero en BLAST cada hit puede contener una gran cantidad de proteínas difíciles de tratar

por lo que se requiere emplear métodos de clusterización para poder extraer únicamente las proteínas más parecidas (Suzuki, Kakuta, Ishida, & Akiyama, 2014; Ma, Chirn, Cai, Szustakowski, & Nirmala, 2005). Por lo mismo, al colocar como entrada en Protein BLAST cada una de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los Mnemonic codes de proteínas humanas, se obtuvo una gran cantidad de proteínas parecidas a las secuencias queries. Además, los valores de E en general de las alineaciones para cada entrada al ser inferiores a 0,1 y 0,05 se consideraron como significativos y por ende también las proteínas se estimaron como de importancia biológica (Syngai, Barman, Bharali, & Dey, 2013).

Por tener gran cantidad de proteínas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* relacionadas con las proteínas humanas, el agrupamiento de proteínas permitió elaborar grupos significativos de las proteínas más similares para analizarlas posteriormente con los epítomos. Para esto se partió de la alineación de secuencias múltiples de los tres organismos. Esto se realizó debido a que los métodos de alineación de secuencias lineales como las de los aminoácidos ayudan a tener una buena predicción de la reactividad cruzada entre proteínas alergénicas (Negi & Braun, 2017). Posteriormente a la alineación de secuencias como método para el agrupamiento de las secuencias de aminoácidos se empleó Neighbor joining. Este método emplea un algoritmo que se basa en una matriz de distancia que se genera por medio de las puntuaciones de las alineaciones por pares de las secuencias de aminoácidos, pero estas puntuaciones previamente fueron calculadas a través de ClustalW, un método adecuado en este caso particular (Gascuel & Steel, 2006). Por otra parte, el agrupamiento de las proteínas mediante árboles filogenéticos debe tener características como la estabilidad y la robustez para poder distinguir y comparar a las proteínas agrupadas de la porción de proteínas no agrupadas (Zaslavsky, Ciufu, Fedorov, & Tatusova, 2016). Igualmente, los algoritmos de agrupamiento permiten conocer la

homología debido a que las secuencias tienen un origen ancestral común y a la vez es posible predecir la historia evolutiva y las implicaciones biológicas asociadas. Además, con las proteínas desconocidas, la agrupación de proteínas ayuda a la anotación funcional (Halder, Chatterjee, Nasipuri, Plewczynski, & Basu, 2018).

Pese a las ventajas que provee la clusterización o el agrupamiento, en el presente trabajo el objetivo de haber agrupado a las proteínas de *C. lupus familiaris* y *M. musculus* dentro de un mismo clado con cada una de las proteínas de *H. sapiens* fue seleccionar a las proteínas que en la actualidad tienen gran similitud y algunas alta identidad con respecto a la estructura primaria. Ello se tiene que considerar pues se ha visto que en las especies animales con relaciones filogenéticas muy cercanas, sus proteínas homólogas tienden a dar paso a reactividad cruzada (Restani, Beretta, Fiocchi, Ballabio, & Galli, 2002). Esto se debe a que la especificidad de los anticuerpos es dependiente de la composición única de aminoácidos del epítipo, en este caso de los epítipos de LH. No obstante, si es que existen otras proteínas de diferentes fuentes con secuencias iguales o identidad estructural a la de la proteína diana, los anticuerpos pueden reaccionar de forma cruzada (Negi & Braun, 2017).

Tras el primer análisis mediante la alineación de secuencias y Neighbor joining se obtuvo 20 agrupaciones de proteínas humanas y caninas y 11 agrupaciones de proteínas humanas y murinas. Estos resultados demuestran que las proteínas de los tres organismos están muy relacionadas a nivel de secuencia de aminoácidos y podrían tener una estructura similar (Goodman, 2006). Para determinar si esta estrecha relación a nivel de secuencias tendrá incidencia en la reactividad cruzada de los anticuerpos, a cada grupo de proteínas se les agregó las secuencias de los epítipos de las células B presentadas en la sección de resultados. Nuevamente, las alineaciones de secuencia y posteriormente la

construcción de árboles filogenéticos se hicieron para identificar la especificidad del antígeno peptídico en la estructura de la LH (Rahman et al., 2015).

Se elaboraron 31 árboles filogenéticos, en los que se identificó que la proteína XP_022262862.1 y el epítipo 1 de las células B para la LH canina tienen una identidad de aminoácidos. Lo mismo ocurrió con la proteína O43915 y el epítipo 4 de las células para la LH murina, indicando regiones reactivas que tienden a originar reacciones cruzadas (Rahman et al., 2015). En el presente trabajo se describe a cada una de las proteínas de humano, ratón y perro, diferentes a la LH murina y canina con las que puede haber una reacción no deseada de los anticuerpos. Adicionalmente, en los resultados se indica la localización celular de estas proteínas, ya que en este caso para que sean accesibles para el sistema inmunológico deben localizarse externamente a la célula (secreciones) o estar en la superficie celular, más no ubicadas intracelularmente donde el sistema inmunitario no les podrá detectar o en regiones excluidas del sistema inmunitario (Flower, Macdonald, Ramakrishnan, Davies, & Doytchinova, 2010).

La subunidad β de la coriogonadotropina 3 (P0DN86) o hCG de *H. sapiens* presenta una posible reactividad cruzada, debido a que comparte aminoácidos con el epítipo 5 de las células B para la LH canina. P0DN86 tiene una puntuación 5 de 5 de anotación en UniProtKB, por lo que tiene evidencia *in silico* de su existencia (UniProtKB, 2019). Por ser una proteína secretada al igual que la LH, es bastante accesible para que los anticuerpos neutralizantes se le unan (Flower, Macdonald, Ramakrishnan, Davies, & Doytchinova, 2010). La hCG es una hormona compuesta por dos subunidades α y β , donde la subunidad alfa es compartida por las otras glicoproteínas como la LH, FSH y TSH. Por su parte, la subunidad β de estas hormonas difiere, pues confiere la especificidad biológica y la unión específica a su receptor. Dentro de las funciones que desempeña la

hCG está el mantenimiento de la gestación gracias a su estimulación sobre la síntesis de esteroides (progesterona) junto con la adaptación materna (Nwaboubi et al., 2017).

Ya que los resultados mostraron que para la LH canina y la hCG existe el mismo epítipo, por lo tanto, existen pequeñas regiones de aminoácidos idénticos entre estas glicoproteínas. Se conoce que las subunidades β de la LH y la hCG difieren en 24 aminoácidos (Stenman, Tiitinen, Alfthan, & Valmu, 2006). La homología entre las subunidades β de estas hormonas es entre 80 y 85% por lo que los anticuerpos LH reconocen a la hCG y viceversa (Nwaboubi et al., 2017; Stenman, Tiitinen, Alfthan, & Valmu, 2006). Incluso la hCG se une con alta afinidad a los receptores de la LH en la superficie de células diana como las células de Leydig, en las que estimula la biosíntesis de testosterona con el fin de mantener la fertilidad en animales machos (Daufu, 1998; Shinjo, Shiraishi, & Matsuyama, 2013). Por ello es que Kobayashi et al., (2014) demostraron que la aplicación en bajas dosis de hCG en perros infértiles logró mejorar la disfunción espermatogénica, ya que los niveles de testosterona intratesticular se restauraron. No obstante, la aplicación de altas dosis de hCG indujo en los perros al desarrollo de anticuerpos anti hCG; así también en los individuos sanos se generó una supresión negativa de esta glicoproteína (Kobayashi, Hori, & Kawakami, 2014). Por lo tanto, existe evidencia de que con la hCG podría darse una reactividad cruzada a través del uso de la vacuna anti-LH que lleve como determinante antigénico al epítipo 5.

La proteína persefina o PSPN (F6XSY4) de *C. lupus familiaris*, tiene una puntuación de anotación 1 de 5 en UniProtKB, indicando que su anotación fue básica, es decir, la evidencia de la existencia de esta proteína fue inferida de la homología con otras proteínas (UniProtKB, 2019). En base a los resultados de agrupamiento de secuencias proteínicas y de los epítipos, se infiere se podría generar una reacción cruzada con la persefina debido a que dentro de su secuencia de aminoácidos se encuentran también los que corresponden

al epítopo 1 de las células B para la LH canina. PSPN es una proteína secretada al igual que la LH, pero pertenece a la familia del factor neurotrófico derivado de la glia de la superfamilia TGF- β (factor de crecimiento transformante β) (Lindahl et al., 2001). La persefina promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas (Sidorova et al., 2010), por lo que en experimentos *in vitro* con ratones se vio que la PSPN suscitaba la supervivencia de las neuronas motoras embrionarias (Milbrandt et al., 1998). En estudios y experimentos realizados en tejidos de ratón y humano, se encontró que la persefina y su receptor GFRA4 tienen una expresión baja en la en la tiroides, las glándulas suprarrenales, los músculos, los testículos y el bazo de los recién nacidos, pero ya no preponderante en el cerebro (Lindahl et al., 2001; Lindfors, Lindahl, Rossi, Saarna, & Airaksinen, 2006).

A nivel de secuencia primaria, la PSPN comparte una identidad entre 38 y 46% de los aminoácidos con la neurturina, artemin y los miembros de la familia GDNF. La PSPN humana en su estado maduro tiene un 87, 89, 80 y 81% de aminoácidos iguales a la persefina de perro, vaca, rata y ratón, respectivamente (Vargas-Leal, 2003). Pese a que las persefinas canina y humana tienen el 87% de los mismos aminoácidos, no es posible inferir con certeza sobre si este tipo de proteína podría salir o no afectada realmente por el uso de la vacuna anti LH. No obstante, en el estudio realizado por Akerud et al. (2002) se encontró que GDNF, otro factor neurotrófico, promovía con mayor importancia que PSPN la supervivencia de las neuronas TH-ir. Al mismo tiempo, la eliminación o supresión de algunos de los factores sugirió que no afectaba a la supervivencia de las neuronas, incluso no contribuía a la eliminación de estas (Friedman, 2012). Considerando lo anterior, no existe un riesgo significativo ligado a bloquear estos factores de crecimiento. Además, las proteínas como los anticuerpos anti LH son incapaces de atravesar la barra hematoencefálica y circular por las regiones del cerebro donde están

estas proteínas, de tal forma a que se induzca a enfermedades neurodegenerativas (Friedman, 2012).

A fin de evaluar la posibilidad de reactividad cruzadas entre las proteínas humanas y de ratón dado los cuatro epítomos determinados para la LH murina, se realizó la alineación de las secuencias correspondientes y su relación filogenética. En este trabajo se muestra que el factor de crecimiento vascular endotelial D o VEGF-D (O43915) y la norrina (Q00604) de *H. sapiens* pueden ser el blanco de una reacción cruzada, pues presentan similitud con los aminoácidos del epítomo 4 de las células B para la LH canina. En primer lugar, VEGF-D es una glicoproteína secretada de la familia VEGF, mediadora de la angiogénesis y linfangiogénesis. Este factor está implicado en el crecimiento de las células endoteliales, pues estimula la proliferación y la migración (Leppanen et al., 2010). Durante la embriogénesis puede incidir en la formación de los sistemas linfáticos y vasculares venosos. En el estadio adulto, la glicoproteína permite la conservación del endotelio linfático diferenciado (Achen et al., 1998).

La acción del VEGF-D se lleva a cabo a través de los receptores de quinasas en el endotelio, VEGFR-2 y VEGFR-3 (Achen et al., 1998). Por las funciones que cumple el VEGF, Hwang et al., (2007) encontraron que la hipoxia aumentaba el efecto estimulador de VEGF y hCG en las células de Leydig de ratones TM3, lo cual incidía en la esteroidogénesis de la testosterona (Hwang, Wang, Tseng, Yu, & Wang, 2007). No obstante, los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 también están presentes en las células de Leydig humanas, igualmente, la secreción de VEGF no solo está presente las células de Leydig y de Sertoli (Ergün, Kiliç, Fiedler, & Mukhopadhyay, 1997). Ntemou et al., (2019) evaluaron su efecto en los xenotrasplantes de tejido testicular en humanos prepuberales. Aquí el VEGF funcionó como un regulador de supervivencia espermatogonial y posteriormente, promovió la proliferación celular. Por otra parte, Lee

at al., (2007) eliminaron el VEGF de las células hematopoyéticas maduras y endoteliales en los ratones transgénicos (VEGF^{-/-}) y vieron que presentaron insuficiencia en el sistema cardiovascular, lo que ocasionaba microinfartos, hemorragias, constricción vascular y ruptura celular en los animales. De acuerdo a estos estudios, la neutralización del VEGF-D por medio de anticuerpos anti-LH es positivo, al menos en cuanto a la posibilidad de reactividad cruzada con este factor y su posible contribución a la inhibición de la esteroidogénesis en las células de Leydig; aunque por otra parte, se podría bloquear la homeostasis vascular de otras células endoteliales, lo cual resultaría negativo para el organismo (Lee et al., 2007).

La última reactividad cruzada podría tener lugar con la norrina humana o NDP (Q00604); esta es una proteína con una anotación 5 de 5 en UniProtKB debido a que existe evidencia *in silico* para su determinación (UniProtKB, 2019). Esta proteína secretada reguladora forma parte del sistema de señalización de la retina, donde contribuye con la angiogénesis vascular a lo largo del desarrollo. La NDP cumple funciones de protección y mantenimiento de las neuronas de la retina a lo largo de la vida (Ohlman & Tamm, 20012; Ye et al., 2009). Además, la proteína se expresa en la glía de Bergmann del cerebelo y en los astrocitos cerebrales, pero su función específica no se ha determinado a detalle (Ye, Smallwood, & Nathans, 2011). Así también por medio de Northern blot y RT-PCR, en los tejidos de los ratones adultos se evidenció que el ARNm de la norrina se expresaba en los testículos y epidídimo, el tímpano y el útero (Ohlman & Tamm, 20012; Hsieh et al., 2005). Aunque no se tienen datos que revelen la acción y la localización específicas de la norrina en estos tejidos, la expresión puede ser debida a la falta de anticuerpos apropiados (Ohlmann & Tamm, 2012).

La norrina humana tiene un 100% de identidad con los aminoácidos de la norrina de los macacos Rhesus, mientras que con el ratón, perro, bovino, pollo, las identidades son

de 94, 96, 95 y 90%, respectivamente. Esta proteína humana no solo muestra similitud en los aminoácidos de otras norrinas, sino que también con otras proteínas que tienen un dominio rico en cisteína como el factor de von Willebrand, importante en la cascada de coagulación de la sangre (Ohlmann & Tamm, 2012). Incluso en su estructura terciaria se forma un nudo de cisteína idéntico a las proteínas de mucina extracelulares, los factores de la superfamilia compuesta por TGF- β y factor de crecimiento neurogénico (NGF). Adicionalmente, en esta superfamilia se encuentran las glicoproteínas como la LH (Dufau, 1998). En vista de la similitud en ciertas regiones entre la norrina y la LH, es posible una reacción cruzada, ya que tendría lugar la neutralización de la norrina por parte de los anticuerpos. Los efectos de la posible inhibición de la proteína se limitarían a los tejidos fuera del sistema ocular, debido a que la barrera sangre-ocular controla la funcionalidad de las células del sistema inmunitario (Taylor, 2016).

En general, los resultados obtenidos mediante la alineación de secuencias y clusterización por el método de Neighbor joining indican que existen cuatro proteínas pertenecientes a *H. sapiens* y *C. lupus familiaris* que se agrupan en el mismo clado con los epítomos de las células B tanto para al LH canina y murina. El hecho de que exista una similitud e identidad entre las secuencias de aminoácidos entre la proteína diana, sobre todo los epítomos, y las proteínas NDP, PSPN, VEGF-D y la subunidad β de la coriogonadotropina 3, sugiere que es probable que se genere una reactividad cruzada que provocará la neutralización de estas. Pese a que el análisis de la estructura primaria de las proteínas y los epítomos provee información y sugerencias útiles sobre la reactividad cruzada, este es un enfoque primario (David & Yip, 2008). Sin embargo, la comprensión completa y los mecanismos de reconocimiento molecular se facilitan por medio del análisis de la estructura tridimensional de las proteínas. Esto es debido a que para que se desencadene una reacción cruzada no solo es necesario que las proteínas analizadas

tengan alta identidad en sus aminoácidos sino que también muestren un pliegue 3D parecido y estén expuestas a las células inmunes (Negi & Braun, 2017).

8.1. Perspectivas a futuro

Como perspectivas a futuro se realizará el ensamblaje del conjugado que integra al péptido anti-LH, la proteína transportadora y al adyuvante. Posteriormente, se vacunará a ratones machos prepuberales y adultos y por medio de análisis inmunohistoquímicos e histológicos se evaluará la inhibición o no de la espermatogénesis y la seguridad de la vacuna.

9. CONCLUSIONES

El análisis de la especificidad de la vacuna anti-LH canina y murina permite conocer si dicha vacuna inducirá exclusivamente a inmunidad contra la proteína diana, LH, dentro del organismo. Para esto, las bases de datos y los softwares bioinformáticos permitieron el análisis de la reactividad cruzada con las proteínas de los organismos como el humano, el perro y el ratón, pero que estructuralmente son similares a la LH canina y murina. Debido que se obtuvieron muchos hits con identificadores PDB, el cruce de referencias en UniProtKB facilitó agrupar y seleccionar a las proteínas humanas más relacionadas, e igualmente, permitió la recuperación de las secuencias de aminoácidos que fueron empleadas como entradas en Protein BLAST. No obstante, cada entrada devolvió una gran cantidad de secuencias, por lo que se recurrió al método de clusterización como Neighbor joining.

Aunque Neighbor joining es un método bastante generalizado y rápido, su eficiencia es solamente aceptable con respecto a la topología del árbol. Las principales limitaciones para agrupar en clados a las proteínas y a los epítomos fueron las diferencias de tamaños de las secuencias de aminoácidos y también la introducción de gaps luego del

alineamiento. Introducir parámetros como la corrección de distancias y exclusión de los gaps mejoraron el agrupamiento mediante árboles filogenéticos.

De estos análisis bioinformáticos las posibles reacciones cruzadas que generaría la vacuna anti-LH serían contra la subunidad beta de coriogonadotropina 3 humana, la persefina canina, el factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D) y la norrina, estos dos últimos de humano. Sin embargo, la reactividad cruzada más probable se podría dar contra la subunidad beta de coriogonadotropina 3 humana, ya que en existe sustento en la literatura.

Por otro lado, la predicción de las reacciones cruzadas como primer enfoque fue bastante aceptable, no obstante, las bases de datos no contienen información suficiente sobre las secuencias primaria y terciaria de las proteínas de todos los organismos. Igualmente, se vio que algunas de las proteínas sobre las que se hizo el análisis tenían una anotación 1 de 5; además, en todos los casos no se puede asegurar la precisión de las secuencias de aminoácidos. Por lo tanto, las pruebas de la vacuna en ratones permitirán en lo posterior revisar los órganos y tejidos que potencialmente podrían ser afectados.

10. RECOMENDACIONES

- Para superar las limitaciones que tiene la construcción de los árboles filogenéticos de las proteínas y los epítomos mediante Neighbor joining, se recomienda emplear Neighbor Joining Plus (NJ+), puesto que no solo mejora la topología del árbol filogenético sino que también permite determinar las mutaciones de secuencia en pares.
- Incluir más estrategias de filtrado de datos para limitar el conjunto de proteínas que se tienen que analizar.
- Emplear más métodos computacionales para comparar y validar los resultados de reactividad cruzada.

- Realizar la parte experimental con animales como los ratones para determinar si la vacuna anti-LH es lo suficientemente específica como para inducir una respuesta inmunológica contra la LH del organismo.
- Incluir otros análisis como el de la estructura 3D de las proteínas para garantizar la especificidad mediante un segundo enfoque.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acero, M. (2017). *La Relación Humano-Animal de Compañía como un fenómeno sociocultural. Perspectivas para la salud pública (Tesis doctoral)*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Achen, M.-G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.-F., . . . Stacker, S.-A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 548–553. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.548>
- Alam, A., Ali, S., Ahamad, S., Malik, M.-Z., & Ishra, R. (2016). From ZikV genome to vaccine: in silico approach for the epitope-based peptide vaccine against Zika virus envelope glycoprotein. *Immunology*, 149(4), 386-399. <https://doi.org/10.1111/imm.12656>
- Alliance for the Contraception in Cats & Dogs. (Febrero de 2013). *Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats*. <https://www.acc-d.org/docs/default-source/Resource-Library-Docs/accd-e-book.pdf?sfvrsn=0>
- Aponte, P., Cubas Céspedes, C., & Méndez, M.-Á. (2019). Immunoinformatic design for the development of a contraceptive multi-epitope subunit vaccine. *International work-conference on Bioinformatics and biomedical engineering*, 181-192.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.-H., Barker, W.-C., Boeckmann, B., Ferro, S., . . . Yeh, L. (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D115-D119.

- Arey, B., & López, F. (2011). Are circulating gonadotropin isoforms naturally occurring biased agonists? Basic and therapeutic implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic*, 12(4), 275–288. <https://doi.org/10.1007/s11154-011-9188-y>
- Arnon, R., & Van Regenmortel, M.-H. (1992). Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *The FASEB Journal*, 6(14), 3265–3274.
- Atwood, C.-S., & Vadakkadath-Meethal, S. (2016). The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 430, 33-48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.039>
- Barba, E. (2017). *Estimación poblacional de perros callejeros en 20 sectores censales del sur de Quito por medio de un muestreo censal con el método de captura y recuperación (Tesis de grado)*. Quito: Universidad de las Américas.
- Bilskis, R., Sutkeviciene, N., Riskeviciene, V., Januskauskas, A., & Zilinskas, H. (2012). Effect of active immunization against GnRH on testosterone concentration, libido and sperm quality in mature AI boars. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-33>
- Brandan, N., Llanos, I., Reyes, J., & Rodríguez, A. (2011). *Hormonas Hipotalámicas e Hipofisarias*. Recuperado el 20 de Mayo de 2019, de <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hhh.pdf>
- Brandan, N., Llanos, I., Tannuri, H., & Rodríguez, A. (2014). *Hormonas Tiroideas*. Recuperado el 22 de Mayo de 2019, de [https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hormona%20tiroidea%202014\(1\).pdf](https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/hormona%20tiroidea%202014(1).pdf)

- Casarini, L., Santi, D., Marshall, G.-R., & Simoni, M. (2018). Luteinizing Hormone (LH) ☆. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 2, 142-148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64299-X>
- Castellanos, G. (5 de Febrero de 2018). *El interés en la esterilización de las mascotas aumenta en Quito*. Recuperado el 20 de Mayo de 2019, de <https://www.elcomercio.com/tendencias/aumento-interes-esterilizacion-mascotas-quito.html>
- Chedrese, P. (Ed.). (2009). *Reproductive endocrinology: a molecular approach*. Berlín: Springer Science & Business Media.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2012). The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16-64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2017). Spermatogenesis, Mammals. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07191-0>
- Clarke, H., Dhillon, W. S., & Jayasena, C. N. (2015). Comprehensive Review on Kisspeptin and Its Role in Reproductive Disorders. *Endocrinology and Metabolism*, 30(2), 124. <https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.2.124>
- Clem, A. S. (2011). Fundamentals of vaccine immunology. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3(1), 73. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>
- Daufu, M. L. (1998). THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR. *Annual Review of Physiology*, 60(1), 461-496. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.461>
- David, F. P., & Yip, Y. L. (2008). SMap: A new UniProt-PDB mapping resource for the curation of structural-related information in the UniProt/Swiss-Prot

Knowledgebase. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 391. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-391>

De Cramer, K., & May, K. (2015). *A Review of Sterilisation Practices in Dogs and Cat and Impact on the Individual Animal*. Recuperado el 7 de Junio de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/3578/72e3ae0e76470f91af7137865a96188cc636.pdf>

De la Torre, S., Figueroa, C., Cárdenas, M., Sampedro, C., & Grijalva-Rosero, J. (2019). *Resultados del I Censo Ciudadano de Perros Abandonados en Quito*. Recuperado el 3 de Junio de 2019, de http://www.usfq.edu.ec/programas_academicos/colegios/cociba/Documents/vinculacion/informe_resultados_i_censo_de_perros_abandonados_dmq.pdf

Dufau, M. L. (1998). The Luteinizing Hormone Receptor . *Annual Review of Physiology* , 60, 461–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.60.1.461>

Dyce, K. M., Sack, W. O., & Wensing, C. J. (2015). *Anatomía veterinaria* (Cuarta ed.). Manual Moderno.

Ergün, S., Kiliç, N., Fiedler, W., & Mukhopadhyay, A. (1997). Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 131(1), 9–20. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(97\)00082-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(97)00082-8)

Escrivá, J. J., Carbajal, J. A., & Mendaza, M. (2002). En Gamundo Planas MC, *Farmacia Hospitalaria – TOMO II* (pág. 878). Madrid: SEFH. Recuperado el 19 de mayo de 2019, de <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo2/CAP05.pdf>

- Fairlie-Clarke, K. J., Shuker, D. M., & Graham, A. L. (2008). Why do adaptive immune responses cross-react? *Evolutionary Applications*, 2(1), 122–131. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2008.00052.x>
- Fink, G. (1997). Mechanisms of Negative and Positive Feedback of Steroids in the Hypothalamic–Pituitary System. *Principles of Medical Biology* 10, 29-100. [https://doi.org/10.1016/S1569-2582\(97\)80029-3](https://doi.org/10.1016/S1569-2582(97)80029-3)
- Flower, D. R., Macdonald, I. K., Ramakrishnan, K., Davies, M. N., & Doytchinova, I. A. (2010). Computer aided selection of candidate vaccine antigens. *Immunome Research*, 6 (Suppl 2), S1. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-s2-s1>
- Frank, S. A. (2002). *Immunology and evolution of infectious disease*. Princeton: Princeton University Press.
- Friedman, W. (2012). Growth Factors. En *Basic Neurochemistry* (pp. 546-557). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00029-8>
- Gascuel, O., & Steel, M. (2006). Neighbor-Joining Revealed. *Molecular Biology and Evolution*, 23(11), 1997–2000. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl072>
- Golan, M., Biran, J., & Levavi-Sivan, B. (2014). A novel model for development, organization, and function of gonadotropes in fish pituitary. *Frontiers in Endocrinology*, 5(182). <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00182>
- González, E. (2004). *Papel de la Hormona Luteinizante en Pacientes Mayores de 34 años con Estimulación Folicular Múltiple para Fertilización In Vitro: Primeros Resultados (Tesis doctoral)*. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.

- Goodman, R. E. (2006). Practical and predictive bioinformatics methods for the identification of potentially cross-reactive protein matches. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(7), 655–660. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500277>
- Grosset, C., Peters, S., Peron, F., Figuéra, J., & Navarro, C. (2012). Contraceptive effect and potential side-effects of deslorelin acetate implants in rats (*Rattus norvegicus*): preliminary observations. . *The Canadian Journal of Veterinary Research* , 76(3), 209-214.
- Gupta, S. K., Shrestha, A., & Minhas, V. (2014). Milestones in contraceptive vaccines development and hurdles in their application. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(4), 911–925. <https://doi.org/10.4161/hv.27202>
- Halder, A. K., Chatterjee, P., Nasipuri, M., Plewczynski, D., & Basu, S. (2018). 3gClust: Human Protein Cluster Analysis. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1109/tcbb.2018.2840996>
- Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2(3), 252-256. Recuperado el 20 de Mayo de 2019, de <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>
- Heyrman, E., Kowalski, E., Millet, S., Tuytens, F. A. B., Ampe, B., Janssens, S., . . . Aluwé, M. (2019). Monitoring of behavior, sex hormones and boar taint compounds during the vaccination program for immunocastration in three sire lines. *Research in Veterinary Science*, 124, Pages 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.04.010>
- Hiller-Sturmhöfel, S. (1998). The Endocrine System. *Research World*, 22(3), 12.

- Holm, L., & Laakso, L. M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W351-W355. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw357>
- Holm, L., & Rosenstrom, P. (2010). Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, *38*(suppl_2), W545–W549. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq366>
- Holm, L., Kääriäinen, S., Wilton, C., & Plewczynski, D. (2006). Using Dali for Structural Comparison of Proteins. *Current Protocols in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0505s14>
- Hsieh, M., Boerboom, D., Shimada, M., Lo, Y., Parlow, A. F., Luhmann, U. F. O., ... Richards, J. S. (2005). Mice Null for Frizzled4 (*Fzd4*^{-/-}) Are Infertile and Exhibit Impaired Corpora Lutea Formation and Function1. *Biology of Reproduction*, *73*(6), 1135-1146. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.042739>
- Huhtaniemi, I., Zhang, F. P., Kero, J., Hamalainen, T., & Poutanen, M. (2002). Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *187*(1-2), 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00698-0](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00698-0)
- Huhtaniemi, I. (2018). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Hormonal regulation of spermatogenesis: mutant mice challenging old paradigms. *European Journal of Endocrinology*, *179*(3), R143-R150. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0396>
- Hwang, G.-S., Wang, S. W., Tseng, W. M., Yu, C. H., & Wang, P. S. (2007). Effect of hypoxia on the release of vascular endothelial growth factor and testosterone in mouse TM3 Leydig cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*(6), E1763–E1769. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00611.2006>

- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(Web Server issue), W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Kobayashi, M., Hori, T., & Kawakami, E. (2014). Efficacy of Low-Dose Human Chorionic Gonadotropin Therapy in Dogs with Spermatogenic Dysfunction: A Preliminary Study. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(5), E44–E47. <https://doi.org/10.1111/rda.12366>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, T. R. (2005). Kumar, T. R. (2005). What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction*, 130(3), 293–302. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00660>
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glase, F., Martz, E., Pupko, T., & Ben-Tal, N. (2005). ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W299–W302. <https://doi.org/10.1093/nar/gki370>
- Laskowski, R. A., Watson, J. D., & Thornton, J. A. (2005). ProFunc: a server for predicting protein function from 3D structure. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W89–W93. <https://doi.org/10.1093/nar/gki414>
- Lee, S., Chen, T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., . . . Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*, 130(4), 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.054>

- Lekhwani, S., Vaswani, N., Ghalaut, V.-S., Shanker, V., & Singh, R. (2014). Immunocontraceptives: How far from reality? *Adv Biomed Res*, 3(247). <https://doi.org/10.4103/2277-9175.146369>
- Leppanen, V. M., Jeltsch, M., Anisimov, A., Tvorogov, D., Aho, K., Kalkkinen, N., . . . Alitalo, K. (2010). Structural determinants of vascular endothelial growth factor-D receptor binding and specificity. *Blood*, 117(5), 1507-1515. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301549>
- Liguori, G., Olandini, G., Napoli, R., Mazzon, G., Petrovic, M., & Trombetta, C. (2011). Anatomy of the Scrotum. En M. Bertolotto & C. Trombetta (Eds.), *Scrotal Pathology* (pp. 27-34). https://doi.org/10.1007/174_2011_170
- Li, W., Jaroszewski, L., & Godzik, A. (2002). Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein database. *Bioinformatics*, 18(1), 77-82. Recuperado el 27 de Junio de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/a413/02997f42a6ad5b8fab6050f422e5c67f0d2b.pdf>
- Lichtarge, O., & Sowa, M. E. (2002). Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions. *Evolutionary predictions of binding surfaces and interactions*, 12(1), 21-27. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00284-1](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00284-1)
- Lindahl, M., Poteryaev, D., Yu, L., Arumäe, U., Timmusk, T., Bongarzone, I., . . . Saarma, M. (2001). Human Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Receptor $\alpha 4$ Is the Receptor Persephin and Is Predominantly Expressed in Normal and Malignant Thyroid Medullary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), 9344–9351. <https://doi.org/10.1074/jbc.m008279200>

- Lindfors, P. H., Lindahl, M., Rossi, J., Saarma, M., & Airaksinen, M. S. (2006). Ablation of Persephin Receptor Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Receptor $\alpha 4$ Impairs Thyroid Calcitonin Production in Young Mice. *Endocrinology*, *147*(5), 2237-2244. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1620>
- Ma, Q., Chirn, G. W., Cai, R., Szustakowski, J. D., & Nirmala, N. (2005). Clustering protein sequences with a novel metric transformed from sequence similarity scores and sequence alignments with neural networks. *BMC Bioinformatics*, *6*(1), 242. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-242>
- Ma, X., Dong, Y., Matzuk, M.-M., & Kumar, T.-R. (2004). Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(49), 17294–17299. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404743101>
- Madden, T. (s. f). The BLAST Sequence Analysis Tool. En *The NCBI Handbook*. Recuperado el 29 de Junio de 2019, de https://www.unmc.edu/bsbc/docs/NCBI_blast.pdf
- Maggi, R. (2016). Physiology of Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh): Beyond the Control of Reproductive Functions. *MOJ Anatomy & Physiology*, *2*(5). <https://doi.org/10.15406/mojap.2016.02.00063>
- Mancini, M. C., Menozzi, D., & Arfini, F. (2017). Immunocastration: Economic implications for the pork supply chain and consumer perception. An assessment of existing research. *Livestock Science*, *203*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.06.012>
- Martin, A. C. R. (2005). Mapping PDB chains to UniProtKB entries. *Bioinformatics*, *21*(23), 4297–4301. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti694>

- Matsui, T., Sugino, H., Miura, M., Bousfield, G., Ward, D., Titani, K., & Mizuochi, T. (1991). β -Subunits of equine chorionic gonadotropin and lutenizing hormone with an identical amino acid sequence have different asparagine-linked oligosaccharide chains. *iochemical and Biophysical Research Communications*, , 174(2), 940-945. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91509-B](https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91509-B)
- Max, A., Jurka, P., Dobrzynski, A., & Rijsselaere, T. (2015). Non-surgical contraception in male dogs and cats. *Acta Sci. Pol. Zootechnica*, 14(1), 3-14.
- Meslin, F. X., & Beyene, T. (2015). *El manejo humanitario de la población canina*. Recuperado el 2 de Mayo de 2019, de World Animal Protection: https://www.worldanimalprotection.cr/sites/default/files/cr_files/manejohumanitariopoblacioncanina.pdf
- Miller, L. A., Fagerstone, K. A., & Eckery, D. C. (2013). TWENTY YEARS OF IMMUNOCONTRACEPTIVE RESEARCH: LESSONS LEARNED. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 44(4s), S84–S96. <https://doi.org/10.1638/1042-7260-44.4s.s84>
- Mora, D. S., Salman, D. M., Myrick, C. A., Rhyan, J. C., Miller, L. A., Sætre, E. M., & Eckery, D. C. (2017). Evaluation of antibody response to an adjuvanted haptent-protein vaccine as a potential inhibitor of sexual maturation for farmed Atlantic salmon. *Fish & Shellfish Immunology*, 71, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.038>
- Morsink, D. (2009). *Behavioural changes after treatment with GnRH implants in male dogs; the behavioural effects of a reversible chemical castration. In comparison: a literature review of the behavioural effects of surgical castration in male dogs (Doctoral thesis)*. Utrecht: Utrecht University.

- Morters, M. K., McKinley, T. J., Restif, O., Conlan, A. J. K., Cleaveland, S., Hampson, K., . . . Wood, J. L.-N. (2014). The demography of free-roaming dog populations and applications to disease and population control. *Journal of Applied Ecology*, *51*(4), 1096–1106. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12279>
- 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. En *Gonadotropin* (págs. 155-180). <https://doi.org/10.5772/48681>
- Negi, S. S., & Braun, W. (2017). Cross-React: a new structural bioinformatics method for predicting allergen cross-reactivity. *Bioinformatics*, *btw767*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw767>
- Nolen, R. S. (15 de Enero de 2007). *Nonsurgical alternatives explored as possible answer to dog and cat overpopulation*. Recuperado el 29 de Mayo de 2019, de AVMA: <https://www.avma.org/News/JAVMANews/Pages/070115a.aspx?mode=full>
- Norris, D. O., & Carr, J. A. (2013). Vertebrate Endocrinology . En D.O. Norris, & J. A. Carr, *Chapter 10 - The Endocrinology of Mammalian Reproduction* (Quinta ed.). Academic Press .
- Ntemou, E., Kadam, P., Van Laere, S., Van Saen, D., Vicini, E., & Goossens, E. (2019). Effect of recombinant human vascular endothelial growth factor (VEGF-165) on testis tissue xenotransplants from prepubertal boys: A three-case study. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.02.012>
- Nwabuobi, C., Arlier, S., Schatz, F., Guzeloglu-Kayisli, O., Lockwood, C., & Kayisli, U. (2017). hCG: Biological Functions and Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2037. <https://doi.org/10.3390/ijms18102037>

- Ohlmann, A., & Tamm, E. (2012). Norrin: Molecular and functional properties of an angiogenic and neuroprotective growth factor. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 243-257. <https://doi.org/10.1101/gad.228544.113>
- Oña, M. (2016). *La Tenencia Irresponsable de Animales de Compañía (perros y gatos) en el Sector de Quitumbe, Atenta el Derecho de la Población a Vivir en un Ambiente Sano* (Tesis de grado). Quito: Universidad Central del Ecuador. Recuperado el 5 de Junio de 2019, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7428/1/T-UCE-001>
- Orlowski, M., & Sarao, M. S. (s. f.). Physiology, Follicle Stimulating Hormone. *Follicle Stimulating Hormone*, 6.
- Papadimitriou, A., & Priftis, K. N. (2009). Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 265-271. <https://doi.org/10.1159/000216184>
- Patrão, M., Silva, E., & Avellar, M. (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 8, 934-945. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000800006>.
- Pavlopoulos, G. (2017). How to cluster protein sequences: tools, tips and commands. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*, 5(5), 58-160. <https://doi.org/10.15406/mojpb.2017.05.00174>
- Prieto, B., & Velázquez, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de la gonadotropinas. . *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 45 (6), 252-257. Recuperado el 22 de Mayo de 2019, de <http://www.revistas.unam.mx/index.php/rfm/article/view/12695>

- Pkerud, P., Holm, P., Castelobranco, G., Sousa, K., Rodriguez, F., & Arenas, E. (2002). Persephin-Overexpressing Neural Stem Cells Regulate the Function of Nigral Dopaminergic Neurons and Prevent Their Degeneration in a Model of Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 21(2), 205-222. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1171>
- Rahman, K., Chowdhury, E., Poudel, A., Ruettger, A., Konrad, S., & Kaltenboeck, B. (2015). Defining Species-Specific Immunodominant B Cell Epitopes for Molecular Serology of Chlamydia Species. *Clin Vaccine Immunol*, 22, 539–552. <https://doi.org/10.1128/CVI.00102-15>
- Restani, P., Beretta, B., Fiocchi, A., Ballabio, C., & Galli, C. L. (2002). Cross-reactivity between mammalian proteins. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 89(6), 11–15. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)62116-3](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)62116-3)
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P., & Clegg, E. D. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis* (Primera ed.). Cache River Press.
- Sáenz, L. (2012). *Protein for the immunocastration for mammals*. 13/262,265.
- Salamanca, C. A., Polo, L. J., & Vargas, J. (2011). Sobre población canina y felina: tendencias y nuevas perspectivas. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 58(1), 45-53. Recuperado el 6 de Junio de 2019, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v58n1/v58n1a05.pdf>
- Shinjo, E., Shiraishi, K., & Matsuyama, H. (2013). The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology*, 1(6), 929–935. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00141.x>

- Sidorova, Y. A., Mätlik, K., Paveliev, M., Lindahl, M., Piranen, E., Milbrandt, J., . . . Bespalov, M. M. (2010). Persephin signaling through GFR α 1: The potential for the treatment of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Neuroscience*.
- Siegrist, C. A., & Lambert, P. H. (2016). Chapter 2: How Vaccines Work. En *The Vaccine Book* (págs. 33-42). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802174-3.00002-3>
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2013). Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. *Multiple Sequence Alignment Methods*, 105–116. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, 48, 3.13.1-3.13.16. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0313s48>
- Stenman, U. H., Tiitinen, A., Alfthan, H., & Valmu, L. (2006). The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Human Reproduction Update*, 12(6), 769–784 . <https://doi.org/10.1093/humupd/dml029>
- Suzek, B., Huang, H., McGarvey, P., Mazumder, R., & Wu, C. (2007). UniRef: comprehensive and non-redundant UniProt reference clusters. *Bioinformatics*, 23(10), 1282-1288. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm098>
- Suzuki, S., Kakuta, M., Ishida, T., & Akiyama, Y. (2014). Faster sequence homology searches by clustering subsequences. *Bioinformatics*, 31(8), 1183–1190. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu780>
- Syngai, G., Barman, P., Bharali, R., & Dey, S. (2013). BLAST: An introductory tool for students to Bioinformatics Applications. *Keanean Journal of Science*, 2, 67-76.
- Recuperado el 18 de Junio de 2019, de

https://www.researchgate.net/publication/267332265_BLAST_An_introduutory_tool_for_students_to_Bioinformatics_Applications

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution*. Recuperado el 6 de Junio de 2019, de <https://www.megasoftware.net/manual.pdf>
- Tataje, T. (2014). *Evaluación en campo de la castración química en perros usando gluconato de zinc*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Recuperado el 10 de Junio de 2019, de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4146/Tataje_at.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Taylor, A. W. (2016). Ocular Immune Privilege and Transplantation. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00037>
- The UniProt Consortium. (2007). The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 36(Database), D190–D195. doi:10.1093/nar/gkm895
- Thau, R. B., & Sundaram, K. (1980). The Mechanism of Action of an Antifertility Vaccine in the Rhesus Monkey: Reversal of the Effects of Antisera to the β -Subunit of Ovine Luteinizing Hormone by Medroxyprogesterone Acetate*. *Fertility and Sterility*, 33(3), 317-320. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)44601-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)44601-7)
- Thomas, N., Kapoor, N., & Naik, D. (2015). *Chapter 55: Hypothalamus and Hypothalamic Disorders, Hypothalamus and Hypothalamic Disorders*. Recuperado el 21 de Mayo de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/299436898_55_Chapter_Hypothalamu

s_and_Hypothalamic_Disorders_HYPOTHALAMUS_AND_HYPOTHALAMI
C_DISORDERS_ANATOMY_AND_DEVELOPMENT_OF_THE_HYPOTHA
LAMUS_Gross_Anatomy/citations

- Tsuchiyaa, M., Inouea, K., Matsudaa, H., Nakamuraa, K., Mizutanib, T., Miyamotob, K., & Minegishi, T. (2003). Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and LH receptor in MA-10 cells. *Life Sciences*, 73(22), 2855-2863. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00698-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00698-2)
- Ulloa-Aguirre, A., & Lira-Albarrán, S. (2016). Clinical Applications of Gonadotropins in the Male. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 143, 121-174. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.08.003>
- UniProtKB. (5 de Junio de 2019). *UniProtKB - F6XSY4 (F6XSY4_CANLF)*. <https://www.uniprot.org/uniprot/F6XSY4>
- UniProtKB. (8 de Mayo de 2019). *UniProtKB - P0DN86 (CGB3_HUMAN)*. Recuperado el 13 de Junio de 2019, de <https://www.uniprot.org/uniprot/P0DN86>
- UniProtKB. (5 de Junio de 2019). *UniProtKB - Q00604 (NDP_HUMAN)*. Recuperado el 30 de Junio de 2019, de <https://www.uniprot.org/uniprot/Q00604>
- Vargas-Leal, V. (2003). *Expression and function of GDNF family ligands and their receptors by human immune cells (Tesis doctoral)*. Ludwig-Maximilians-Universität, Múnich. Recuperado 29 de Junio de 2019, de https://edoc.ub.uni-muenchen.de/2292/1/Vargas_Vivian.pdf
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function. En E. Nieschlag, H. M. Behre, & S. Nieschlag (Eds.), *Andrology* (pp. 11-59). https://doi.org/10.1007/978-3-540-78355-8_2

- Wolf, D. L., Appleby, V. L., Hjerrild, K., Baker, A. R., & Talmadge, K. (1987). Nucleic acid and amino acid sequences of dog beta LH: comparison to rat, cow and human beta LH. *Acids Research*, *15*(24), 10602–10602. <https://doi.org/10.1093/nar/15.24.10602>
- Ye, X., Smallwood, P., & Nathans, J. (2011). Expression of the Norrie disease gene (Ndp) in developing and adult mouse eye, ear, and brain. *Gene Expression Patterns*, *11*(1-2), 151–155. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.10.007>
- Ye, X., Wang, Y., Cahill, H., Yu, M., Badea, T., Smallwood, P., . . . Nathans, J. (2009). Norrin, Frizzled-4, and Lrp5 Signaling in Endothelial Cells Controls a Genetic Program for Retinal Vascularization. *Cell*, *139*(2), 285–298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.047>
- Zaslavsky, L., Ciufu, S., Fedorov, B., & Tatusova, T. (2016). Clustering analysis of proteins from microbial genomes at multiple levels of resolution. *BMC Bioinformatics*, *17*, S8. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1112-8>

12. TABLAS

Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
1	1hcn	B	14,8	0,9	110	110	65	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
2	1hrp	B	13,5	1,1	110	110	65	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
3	1qfw	B	12	2,2	109	110	66	MOLECULE: GONADOTROPIN ALPHA SUBUNIT;
4	1fl7	D	10,5	2,7	105	106	33	MOLECULE: FOLLICLE STIMULATING PROTEIN ALPHA CHAIN;
5	1fl7	B	10,5	2,3	106	107	33	MOLECULE: FOLLICLE STIMULATING PROTEIN ALPHA CHAIN;
6	4ay9	E	10,2	2,6	106	107	33	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
7	4ay9	B	10,2	2,5	106	107	33	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
8	4ay9	H	10,2	2,5	106	107	33	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
9	4mqw	H	10,2	2,8	106	108	33	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
10	4mqw	B	10,1	2,8	107	109	33	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
11	4mqw	E	10,1	2,5	105	108	35	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
12	1xwd	B	10	2,4	104	105	34	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES ALPHA CHAIN;
13	1xwd	E	9,6	2,2	104	105	36	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES ALPHA CHAIN;
14	5bq8	D	6,9	3,3	87	102	16	MOLECULE: NORRIN;
15	5bq8	A	6,8	2,7	86	104	16	MOLECULE: NORRIN;
16	5bpu	D	6,6	2,6	84	102	17	MOLECULE: NORRIN;
17	5bqb	A	6,6	2,5	82	99	17	MOLECULE: NORRIN;
18	5bpu	F	6,5	2,4	82	99	17	MOLECULE: NORRIN;
19	5bpu	C	6,5	2,8	86	103	16	MOLECULE: NORRIN;
20	5bqe	B	6,5	3,1	86	101	16	MOLECULE: NORRIN;
21	5bpu	E	6,5	2,6	83	100	14	MOLECULE: NORRIN;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
22	4x1j	A	6,4	2,8	82	83	18	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
23	5bqc	A	6,4	2,6	83	100	17	MOLECULE: FRIZZLED-4;
24	5bqb	B	6,4	2,5	81	98	17	MOLECULE: NORRIN;
25	5bq8	C	6,4	2,5	82	99	17	MOLECULE: NORRIN;
26	5bqb	C	6,4	2,6	81	98	17	MOLECULE: NORRIN;
27	5bqe	A	6,4	2,9	88	101	16	MOLECULE: NORRIN;
28	5cl1	A	6,3	2,9	85	472	16	MOLECULE: MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC PROTEIN,NORRIN;
29	5bq8	B	6,3	2,3	80	97	18	MOLECULE: NORRIN;
30	5bpu	A	6,2	3,2	91	111	15	MOLECULE: NORRIN;
31	4my2	A	6,2	2,6	88	474	16	MOLECULE: MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC PROTEIN, NORRIN FUSIO
32	4x1j	B	6,1	3,3	86	94	20	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
33	5bqb	D	6	2,6	81	98	17	MOLECULE: NORRIN;
34	4nt5	A	5,9	3,2	85	93	18	MOLECULE: VON WILLEBRAND FACTOR;
35	4yu8	A	5,9	2	68	72	22	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
36	5bpu	B	5,9	2,7	83	99	17	MOLECULE: NORRIN;
37	3qtk	F	5,8	2,9	80	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
38	1mkg	A	5,8	2,8	77	94	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
39	1mjv	B	5,8	3	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
40	2fjh	W	5,8	3	80	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
41	1mjv	A	5,8	3	79	96	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
42	1mkg	C	5,8	2,6	77	94	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
43	5hhd	B	5,7	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
44	1qty	V	5,7	2,9	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
45	3bdy	V	5,7	3,2	80	95	18	MOLECULE: FAB FRAGMENT -HEAVY CHAIN;
46	1qty	S	5,7	3	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
47	3qtk	D	5,7	3,2	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
48	2x1w	D	5,7	2,9	78	99	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
49	1mkg	B	5,7	3	78	94	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
50	5hhc	B	5,7	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
51	5t89	V	5,7	3,1	80	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
52	2gnn	C	5,6	3	77	90	22	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
53	3qtk	E	5,6	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
54	3v6b	A	5,6	3	78	94	19	MOLECULE: VEGF-E;
55	1vpf	A	5,6	2,9	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
56	2qr0	V	5,6	3	80	97	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
57	1qty	W	5,6	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
58	5o4e	F	5,6	3	78	95	18	MOLECULE: IMMUNOGLOBULIN GAMMA-1 HEAVY CHAIN;
59	1qty	R	5,6	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
60	3qtk	B	5,6	3,1	79	97	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
61	3qtk	A	5,6	3,1	81	96	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
62	3s1k	V	5,6	3	78	95	18	MOLECULE: Z-DOMAIN;
63	1tzh	V	5,6	3	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
64	1vpf	B	5,6	3	79	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
65	2qr0	D	5,6	3,2	81	97	17	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
66	1vpf	D	5,6	3	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
67	1mkg	D	5,6	3,1	78	94	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
68	2qr0	P	5,6	3	80	97	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
69	1vpp	W	5,6	3,4	78	90	18	MOLECULE: PROTEIN (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR);
70	2x1w	C	5,6	3	78	97	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
71	2fjg	V	5,6	3,1	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
72	1tzi	V	5,6	3,1	79	97	19	MOLECULE: FAB YADS2 LIGHT CHAIN;
73	2gnn	A	5,6	3	77	92	21	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
74	2fjh	V	5,6	3,1	78	98	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
75	2qr0	J	5,6	3	80	97	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
76	5t89	W	5,6	3,2	80	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
77	1cz8	W	5,5	3,1	79	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
78	1wq8	A	5,5	3,4	81	100	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR TOXIN;
79	4zff	C	5,5	3,2	80	96	18	MOLECULE: FRAGMENT ANTIGEN BINDING (FAB) 5A12 HEAVY CHAIN;
80	3p9w	E	5,5	2,8	76	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
81	2gnn	B	5,5	2,7	79	95	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
82	5fv1	V	5,5	3,1	77	94	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
83	1cz8	V	5,5	3,3	80	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
84	4gls	E	5,5	3,1	77	95	19	MOLECULE: D- VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A;
85	5hhd	A	5,5	3,1	77	95	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
86	5o4e	E	5,5	3	78	95	18	MOLECULE: IMMUNOGLOBULIN GAMMA-1 HEAVY CHAIN;
87	3p9w	A	5,5	3,2	78	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
88	4qaf	C	5,5	2,8	78	96	19	MOLECULE: LIPOCALIN-1;
89	4zff	D	5,5	3,2	80	99	18	MOLECULE: FRAGMENT ANTIGEN BINDING (FAB) 5A12 HEAVY CHAIN;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
90	1flt	W	5,5	3,1	80	98	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
91	4gls	F	5,5	3	76	95	20	MOLECULE: D- VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A;
92	1flt	V	5,5	3,1	77	95	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
93	3s1k	W	5,5	2,9	77	93	19	MOLECULE: Z-DOMAIN;
94	4qci	C	5,5	2,6	74	92	12	MOLECULE: ANTI-PDGF-BB ANTIBODY - LIGHT CHAIN;
95	4hqu	A	5,5	2,2	71	95	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
96	2qr0	C	5,5	2,9	78	95	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
97	1vpf	C	5,5	2,9	76	94	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
98	2fjg	W	5,5	3	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
99	2qr0	O	5,5	3,1	79	95	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
100	3s1b	V	5,5	3,3	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
101	2vpf	C	5,5	2,9	77	93	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
102	4gln	F	5,5	3,2	78	95	19	MOLECULE: D-RFX001;
103	1bj1	V	5,5	3,3	79	94	18	MOLECULE: FAB FRAGMENT;
104	3p9w	C	5,5	3,1	79	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
105	2qr0	U	5,5	2,9	78	95	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
106	2vpf	E	5,5	3,2	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
107	3v2a	A	5,5	3	78	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR2
108	1bj1	W	5,5	3,3	79	94	18	MOLECULE: FAB FRAGMENT;
109	3qtk	C	5,5	3,2	76	96	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
110	1wq9	B	5,5	3,2	78	96	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
111	2vpf	A	5,5	3,1	77	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
112	2qr0	I	5,5	2,9	78	95	18	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
113	2xv7	A	5,4	2,9	77	104	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR D;
114	1fzv	B	5,4	2,9	77	100	19	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR;
115	4hqx	A	5,4	2,3	72	95	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
116	2x1w	B	5,4	2,9	77	98	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
117	4qaf	D	5,4	2,9	77	95	18	MOLECULE: LIPOCALIN-1;
118	4wpb	A	5,4	3	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
119	4gln	E	5,4	2,4	74	95	19	MOLECULE: D-RFX001;
120	4kzn	A	5,4	3,4	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
121	3mjk	Y	5,4	2,8	74	129	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
122	1pdg	A	5,4	2,7	76	87	12	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
123	3p9w	G	5,4	3,2	76	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
124	2vpf	H	5,4	3,2	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
125	1fzv	A	5,4	2,9	77	100	19	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR;
126	3mjk	F	5,4	3	74	125	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
127	1vpp	V	5,4	3,3	77	96	19	MOLECULE: PROTEIN (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR);
128	2x1w	A	5,4	2,9	76	98	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
129	3mjg	A	5,4	2,6	75	97	12	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
130	1kat	V	5,3	3,2	80	99	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
131	5fv2	W	5,3	3,1	79	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
132	5fv1	W	5,3	3,3	80	100	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
133	4qci	D	5,3	2,6	75	96	12	MOLECULE: ANTI-PDGF-BB ANTIBODY - LIGHT CHAIN;
134	1rv6	V	5,3	3,2	80	94	16	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF);
135	4wpb	B	5,3	3	78	93	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
136	2vpf	D	5,3	2,9	74	95	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
137	2vpf	F	5,3	3,2	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
138	5fv2	V	5,3	3,3	78	96	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
139	2x1x	E	5,3	3	78	103	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
140	2vpf	B	5,3	3,2	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
141	1kat	W	5,3	3,2	80	99	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
142	1tzh	W	5,3	3	76	94	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
143	2xac	A	5,2	3,3	79	99	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
144	2xac	B	5,2	3,3	79	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
145	5fv2	X	5,2	3,5	79	97	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
146	1mkk	B	5,2	3,4	78	94	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
147	3mjk	B	5,2	3	73	124	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
148	1pdg	B	5,2	2,2	68	83	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
149	3mjk	X	5,2	2,7	71	121	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
150	1pdg	C	5,2	2,1	69	86	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
151	1wq9	A	5,2	3,4	79	96	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
152	1rv6	W	5,2	3,2	79	95	16	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF);
153	3mjk	E	5,1	2,7	72	122	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
154	5aej	C	5,1	3,8	86	113	16	MOLECULE: GREMLIN-1;
155	1mkk	A	5,1	3,5	77	93	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
156	3mjg	B	5,1	2,8	75	101	12	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
157	3mjk	A	5	2,8	70	129	16	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
158	4ay9	G	4,9	2,9	71	88	17	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;

Continuación Tabla 1. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *C. lupus familiaris*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
159	1hcn	A	4,8	2,9	70	85	16	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
160	4ay9	D	4,8	2,9	71	89	17	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
161	2vwe	B	4,8	3,5	75	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
162	4bsk	C	4,8	2,8	72	98	21	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR3
163	3fub	D	4,7	3,7	84	103	19	MOLECULE: GDNF FAMILY RECEPTOR ALPHA-1;
164	5hk5	E	4,7	2,9	80	128	19	MOLECULE: GREMLIN-2;
165	1hrp	A	4,7	2,9	69	86	16	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
166	1xwd	D	4,7	3,5	72	87	15	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES ALPHA CHAIN;
167	5hk5	F	4,6	3	80	129	19	MOLECULE: GREMLIN-2;
168	1qfw	A	4,6	3,2	71	87	15	MOLECULE: GONADOTROPIN ALPHA SUBUNIT;
169	1agq	A	4,4	2,9	72	91	17	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
170	2vwe	A	4,4	3,3	71	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
171	5mr4	A	4,2	3,2	78	98	21	MOLECULE: NEURTURIN;
172	2ask	A	4,1	4,2	75	101	19	MOLECULE: ARTEMIN;
173	1agq	B	4,1	3,4	76	96	16	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
174	5vt2	A	3,6	3,4	76	108	24	MOLECULE: GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 15;
175	4mid	A	3,4	3,4	72	105	18	MOLECULE: AB204 ACTIVIN A/BMP2 CHIMERA;
176	5aej	A	2,1	4,4	80	114	14	MOLECULE: GREMLIN-1;

Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
1	1hcn	B	14,3	1,2	110	110	64	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
2	1hrp	B	13,2	1,6	110	110	62	MOLECULE: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN;
3	1qfw	B	11,7	2,1	109	110	64	MOLECULE: GONADOTROPIN ALPHA SUBUNIT;
4	1fl7	B	10,5	2,1	107	107	37	MOLECULE: FOLLICLE STIMULATING PROTEIN ALPHA CHAIN;
5	1fl7	D	10,5	2,5	106	106	38	MOLECULE: FOLLICLE STIMULATING PROTEIN ALPHA CHAIN;
6	4ay9	B	10,2	2,3	107	107	37	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
7	4ay9	E	10,2	2,2	106	107	38	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
8	4ay9	H	10,2	2,2	106	107	38	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
9	4mqw	H	10,1	2,4	105	108	36	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
10	4mqw	E	10,1	2,1	105	108	38	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
11	4mqw	B	10,1	2,3	107	109	37	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES, ALPHA POLYPEPTIDE;
12	1xwd	B	10	2,2	104	105	37	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES ALPHA CHAIN;
13	1xwd	E	9,7	2	104	105	39	MOLECULE: GLYCOPROTEIN HORMONES ALPHA CHAIN;
14	5bq8	D	6,9	2,4	84	102	15	MOLECULE: NORRIN;
15	5bq8	A	6,8	2,5	86	104	16	MOLECULE: NORRIN;
16	5bpu	D	6,7	2,7	86	102	17	MOLECULE: NORRIN;
17	5cl1	B	6,7	2,7	88	470	16	MOLECULE: MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC PROTEIN,NORRIN;
18	5bqe	B	6,7	2,9	89	101	16	MOLECULE: NORRIN;
19	5bqc	A	6,6	2,7	86	100	17	MOLECULE: FRIZZLED-4;
20	5bpu	E	6,6	3,2	86	100	16	MOLECULE: NORRIN;
21	5bpu	F	6,6	2,3	82	99	17	MOLECULE: NORRIN;
22	5bq8	C	6,6	2,6	83	99	17	MOLECULE: NORRIN;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
23	4x1j	A	6,6	2,6	83	83	19	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
24	5bqb	A	6,6	2,4	82	99	17	MOLECULE: NORRIN;
25	5bpu	C	6,6	3,3	89	103	16	MOLECULE: NORRIN;
26	5bqb	C	6,5	2,5	81	98	17	MOLECULE: NORRIN;
27	5bqe	A	6,5	2,8	87	101	16	MOLECULE: NORRIN;
28	5bq8	B	6,5	2,5	83	97	17	MOLECULE: NORRIN;
29	5bqb	B	6,5	2,4	81	98	17	MOLECULE: NORRIN;
30	5c11	A	6,5	3	89	472	17	MOLECULE: MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC PROTEIN,NORRIN;
31	4x1j	B	6,4	3	85	94	21	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
32	5bpu	A	6,3	3	92	111	16	MOLECULE: NORRIN;
33	4my2	A	6,3	3,7	95	474	15	MOLECULE: MALTOSE-BINDING PERIPLASMIC PROTEIN, NORRIN FUSIO
34	4nt5	A	6,1	3	83	93	19	MOLECULE: VON WILLEBRAND FACTOR;
35	5bqb	D	6,1	2,7	82	98	17	MOLECULE: NORRIN;
36	5bpu	B	6,1	2,7	87	99	16	MOLECULE: NORRIN;
37	1mjv	B	5,9	3	80	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
38	2fjh	W	5,9	3	81	97	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
39	4yu8	A	5,9	1,8	67	72	24	MOLECULE: NEUROBLASTOMA SUPPRESSOR OF TUMORIGENICITY 1;
40	1mkg	A	5,9	2,6	79	94	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
41	1mkg	C	5,9	2,6	79	94	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
42	1mkg	B	5,8	3	79	94	14	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
43	1qty	S	5,8	3,1	81	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
44	1mjv	A	5,8	3,3	80	96	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
45	1qty	W	5,8	3,1	80	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
46	1qty	V	5,8	3	80	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
47	3qtk	F	5,8	2,9	80	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
48	3qtk	D	5,7	3,1	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
49	5hhd	B	5,7	3,1	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
50	5fv1	V	5,7	3,3	81	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
51	2qr0	D	5,7	3,2	83	97	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
52	3bdy	V	5,7	3,1	81	95	16	MOLECULE: FAB FRAGMENT -HEAVY CHAIN;
53	2x1w	D	5,7	2,9	79	99	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
54	3qtk	B	5,7	3,3	82	97	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
55	5t89	V	5,7	3	79	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
56	3qtk	A	5,7	3,2	82	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
57	6bft	C	5,7	3,2	79	94	16	MOLECULE: AVASTIN LIGHT CHAIN FAB FRAGMENT MUTANT;
58	1vpp	W	5,7	3,5	79	90	16	MOLECULE: PROTEIN (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR);
59	1qty	R	5,7	3,1	80	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
60	1tzi	V	5,7	3,3	83	97	16	MOLECULE: FAB YADS2 LIGHT CHAIN;
61	3qtk	C	5,7	3,2	81	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
62	2qr0	I	5,7	3,1	81	95	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
63	5o4e	E	5,7	3,1	79	95	16	MOLECULE: IMMUNOGLOBULIN GAMMA-1 HEAVY CHAIN;
64	3s1k	V	5,7	3,1	81	95	16	MOLECULE: Z-DOMAIN;
65	5hhc	B	5,7	3,1	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
66	1mkg	D	5,7	3,2	79	94	14	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
67	2qr0	P	5,7	3,2	82	97	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
68	2x1w	C	5,7	3	80	97	20	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
69	5o4e	F	5,7	2,8	79	95	18	MOLECULE: IMMUNOGLOBULIN GAMMA-1 HEAVY CHAIN;
70	2qr0	J	5,7	3,2	83	97	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
71	2qr0	V	5,7	3,2	82	97	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
72	2gmn	C	5,6	3	77	90	21	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
73	4qaf	C	5,6	2,8	81	96	17	MOLECULE: LIPOCALIN-1;
74	5hhc	A	5,6	3,1	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
75	2qr0	U	5,6	3,1	81	95	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
76	1cz8	V	5,6	3,2	82	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
77	3s1k	W	5,6	2,7	76	93	18	MOLECULE: Z-DOMAIN;
78	5t89	W	5,6	3,1	80	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
79	2gmn	A	5,6	3,3	81	92	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
80	2fjg	V	5,6	3,3	81	95	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
81	1flt	V	5,6	3,1	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
82	4gls	E	5,6	3,1	79	95	16	MOLECULE: D- VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A;
83	2vpf	A	5,6	3,2	81	97	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
84	4zff	C	5,6	3,3	82	96	16	MOLECULE: FRAGMENT ANTIGEN BINDING (FAB) 5A12 HEAVY CHAIN;
85	2vpf	D	5,6	3	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
86	2qr0	C	5,6	3,1	81	95	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
87	6bft	G	5,6	3,2	79	95	16	MOLECULE: AVASTIN LIGHT CHAIN FAB FRAGMENT MUTANT;
88	1bj1	W	5,6	3,2	79	94	16	MOLECULE: FAB FRAGMENT;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
89	2fjh	V	5,6	3	81	98	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
90	2vpf	C	5,6	3	78	93	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
91	1bjl	V	5,6	3,2	80	94	16	MOLECULE: FAB FRAGMENT;
92	4gls	F	5,6	3	78	95	17	MOLECULE: D- VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-A;
93	4gln	E	5,6	3,1	80	95	16	MOLECULE: D-RFX001;
94	4gln	F	5,6	2,8	77	95	18	MOLECULE: D-RFX001;
95	4jph	C	5,6	3,4	89	101	17	MOLECULE: GREMLIN-2;
96	2fjg	W	5,6	3,2	80	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
97	1vpf	B	5,6	2,7	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
98	3v2a	A	5,6	3,4	82	95	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2;
99	1vpf	A	5,6	2,9	79	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
100	5hhd	A	5,6	3,2	80	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
101	2qr0	O	5,6	3,1	80	95	16	MOLECULE: FAB-FRAGMENT LIGHT CHAIN;
102	1vpf	D	5,6	3	79	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
103	1cz8	W	5,6	3,2	82	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
104	3qtk	E	5,6	2,9	79	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
105	4jph	D	5,6	3,4	85	111	20	MOLECULE: GREMLIN-2;
106	1fzv	B	5,5	3,3	80	100	20	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR;
107	3p9w	C	5,5	3,2	80	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
108	1vpf	C	5,5	2,7	78	94	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
109	1fzv	A	5,5	3,3	80	100	20	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR;
110	3p9w	A	5,5	2,9	78	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
111	1tzh	V	5,5	2,8	75	94	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
112	6d3o	A	5,5	3,4	80	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
113	4wpb	A	5,5	3,1	81	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
114	1tzh	W	5,5	3	79	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
115	1wq8	A	5,5	3,5	83	100	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR TOXIN;
116	3p9w	E	5,5	2,7	77	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
117	4qaf	D	5,5	2,7	78	95	18	MOLECULE: LIPOCALIN-1;
118	6d3o	B	5,5	2,8	77	95	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
119	2x1w	B	5,5	2,9	78	98	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
120	2vpf	E	5,5	2,8	77	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
121	2gnn	B	5,5	3,1	81	95	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
122	2x1w	A	5,5	2,8	77	98	21	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
123	1flt	W	5,5	3,3	83	98	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
124	4kzn	A	5,5	3,4	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
125	3s1b	V	5,5	3,2	80	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
126	1wq9	B	5,5	3,2	79	96	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
127	5aej	D	5,5	4,4	86	114	16	MOLECULE: GREMLIN-1;
128	4jph	B	5,5	3,2	86	111	17	MOLECULE: GREMLIN-2;
129	2xv7	A	5,4	2,9	78	104	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR D;
130	5fv1	W	5,4	3,5	82	100	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
131	2x1x	E	5,4	3,2	79	103	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR C;
132	4hqu	A	5,4	2,7	74	95	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
133	1kat	W	5,4	3,3	82	99	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
134	2gmn	D	5,4	3,1	79	93	19	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR HOMOLOG;
135	2vpf	F	5,4	3,3	80	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
136	1rv6	V	5,4	3,2	81	94	17	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF);
137	1wq9	A	5,4	3,6	78	96	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
138	5fv2	V	5,4	3,3	79	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
139	3p9w	G	5,4	3,1	78	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
140	1kat	V	5,4	3,3	82	99	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
141	5fv2	X	5,4	3,3	80	97	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
142	5fv2	W	5,4	3	79	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
143	2vpf	H	5,4	3,3	79	94	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
144	4zff	D	5,4	2,8	78	99	18	MOLECULE: FRAGMENT ANTIGEN BINDING (FAB) 5A12 HEAVY CHAIN;
145	2c7w	A	5,4	3,5	80	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B PRECURSOR;
146	2vpf	G	5,4	3,2	79	95	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
147	4qci	C	5,4	2,6	75	92	13	MOLECULE: ANTI-PDGF-BB ANTIBODY - LIGHT CHAIN;
148	5aej	A	5,4	4,3	86	114	19	MOLECULE: GREMLIN-1;
149	1pdg	C	5,4	3,4	76	86	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
150	4hqx	A	5,3	2,6	73	95	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
151	1rv6	W	5,3	3,5	80	95	19	MOLECULE: PLACENTA GROWTH FACTOR (PLGF);
152	2vpf	B	5,3	3,3	80	96	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR;
153	1vpp	V	5,3	3,5	78	96	18	MOLECULE: PROTEIN (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR);
154	4wpb	B	5,3	2,9	77	93	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
155	3v6b	A	5,3	2,9	76	94	21	MOLECULE: VEGF-E;
156	3mjk	F	5,3	3,2	79	125	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
157	4jph	A	5,3	4,1	88	115	17	MOLECULE: GREMLIN-2;
158	2xac	B	5,2	3,4	76	97	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
159	2xac	A	5,2	3,7	80	99	18	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
160	3mjg	A	5,2	3,1	76	97	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
161	2vwe	A	5,2	3,8	80	97	16	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
162	5aej	C	5,2	4	85	113	19	MOLECULE: GREMLIN-1;
163	3mjk	Y	5,2	3,1	77	129	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
164	4qci	D	5,2	2,6	74	96	14	MOLECULE: ANTI-PDGF-BB ANTIBODY - LIGHT CHAIN;
165	1pdg	A	5,2	3,3	79	87	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
166	1pdg	B	5,1	2,4	71	83	14	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR BB;
167	1mkk	B	5,1	3,3	77	94	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
168	2vwe	B	5,1	3,7	78	97	15	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B;
169	5hk5	H	5,1	3,5	84	119	19	MOLECULE: GREMLIN-2;
170	2c7w	B	5	3,3	78	95	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR B PRECURSOR;
171	3mjk	B	5	3,2	75	124	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
172	1mkk	A	5	3,4	77	93	17	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR A;
173	3mjk	X	5	2,8	71	121	15	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
174	3mjg	B	4,9	3,6	76	101	13	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT B;
175	5hk5	G	4,9	3,5	84	129	20	MOLECULE: GREMLIN-2;
176	5hk5	E	4,9	3,5	87	128	20	MOLECULE: GREMLIN-2;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
177	3fub	D	4,8	3,9	85	103	15	MOLECULE: GDNF FAMILY RECEPTOR ALPHA-1;
178	3mjk	A	4,8	2,7	69	129	16	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
179	5hk5	F	4,8	3,4	83	129	20	MOLECULE: GREMLIN-2;
180	4bsk	C	4,8	2,9	73	98	21	MOLECULE: VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 3;
181	3mjk	E	4,8	3,3	73	122	16	MOLECULE: PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SUBUNIT A;
182	5aej	B	4,7	4	85	113	19	MOLECULE: GREMLIN-1;
183	5nmz	A	4,7	4,1	83	101	20	MOLECULE: NEURTURIN;
184	1agq	C	4,6	2,8	72	91	17	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
185	5nmz	C	4,6	4	83	101	20	MOLECULE: NEURTURIN;
186	5mr5	B	4,4	3,8	78	98	19	MOLECULE: NEURTURIN;
187	5mr9	B	4,4	3,6	81	101	19	MOLECULE: NEURTURIN;
188	1agq	A	4,3	3,1	73	91	16	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
189	2v5e	B	4,3	4,2	83	101	16	MOLECULE: GDNF FAMILY RECEPTOR ALPHA-1;
190	5mr5	A	4,3	3,6	78	98	21	MOLECULE: NEURTURIN;
191	5nmz	B	4,3	3,9	80	99	20	MOLECULE: NEURTURIN;
192	5mr9	A	4,3	3,4	79	99	20	MOLECULE: NEURTURIN;
193	3fub	B	4,3	3,1	76	92	16	MOLECULE: GDNF FAMILY RECEPTOR ALPHA-1;
194	5nmz	D	4,3	3,5	75	99	20	MOLECULE: NEURTURIN;
195	5mr4	A	4,1	3,5	79	98	20	MOLECULE: NEURTURIN;
196	5vz4	A	4,1	3,9	81	108	17	MOLECULE: GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 15;
197	2gh0	D	4,1	4	75	99	17	MOLECULE: ARTEMIN;
198	5mr4	B	4,1	3,7	79	98	19	MOLECULE: NEURTURIN;

Continuación Tabla 2. Proteínas humanas similares a la hormona luteinizante (LH) de *M. musculus*.

N°	PDB ID	Chain	Z	rmsd	lali	nres	% ID	PDB Description
199	2ask	B	4,1	3,8	75	101	17	MOLECULE: ARTEMIN;
200	1agq	D	4,1	3,6	77	95	16	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
201	2ask	A	4	4,3	75	101	20	MOLECULE: ARTEMIN;
202	1agq	B	4	4	77	96	17	MOLECULE: GLIAL CELL-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR;
203	5vz3	A	4	3,6	80	108	18	MOLECULE: GROWTH/DIFFERENTIATION FACTOR 15;
204	4ux8	D	3,9	3,5	76	93	16	MOLECULE: PROTO-ONCOGENE TYROSINE-PROTEIN KINASE RECEPTOR R
205	4ux8	F	3,9	3,5	76	93	16	MOLECULE: PROTO-ONCOGENE TYROSINE-PROTEIN KINASE RECEPTOR R
206	2gh0	C	3,9	3,7	74	100	18	MOLECULE: ARTEMIN;
207	2gyr	F	3,7	3,5	71	97	18	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
208	2gyr	E	3,7	3,6	74	97	18	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
209	2gyr	B	3,6	3,3	69	97	19	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
210	2gyr	A	3,6	3,5	71	97	18	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
211	2gyz	A	3,5	3,5	69	97	19	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN ISOFORM 3;
212	2gyr	C	3,5	3,7	68	97	22	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
213	2gyr	D	3,5	3,5	70	97	19	MOLECULE: NEUROTROPHIC FACTOR ARTEMIN, ISOFORM 3;
214	5ffo	H	2,8	4,2	72	325	15	MOLECULE: INTEGRIN ALPHA-V;
215	2k8p	A	2,7	5,3	84	189	19	MOLECULE: SCLEROSTIN;
216	1jpy	A	2,5	5,8	73	121	15	MOLECULE: INTERLEUKIN 17F;
217	5aoq	M	2,3	3,5	65	88	17	MOLECULE: TORSO;

Tabla 3. Identificadores Mnemonic para las proteínas humanas similares a la LH de *C. lupus familiaris*.

PDB ID de Proteínas Humanas de Dali server	Mnemonic Code (X) de UniProtKB
1hcn, 1hrp, 1qfw	P0DN86
1hcn, 1hrp, 1qfw, 1fl7, 4ay9, 4mqw, 1xwd	P01215
1fl7, 4ay9, 4mqw, 1xwd	P01225
5bq8, 5bpu, 5bqb, 5bqe, 5bqc, 5cl1, 4my2	Q00604
4nt5	P04275
4x1j, 4yu8	P41271
2xv7	O43915
3mjk	P04085
4qci, 4hqu, 4hqx, 1pdg, 3mjg	P01127
1fzv, 1rv6	P49763
3qtk, 1mkg, 1mjv, 2fjh, 5hhd, 1qty, 3bdy, 5hhc, 5t89, 1vpf, 2qr0, 5o4e, 3s1k, 1tzh, 1vpp, 1tzi, 1cz8, 4zff, 3p9w, 5fv1, 4gls, 4qaf, 1flt, 3s1b, 2vpf, 4gln, 1bj1, 3v2a, 4wpb, 4kzn, 1kat, 5fv2, 1mkk	P15692
5aej	O60565
2xac, 2vwe	P49765
2x1w, 2x1x, 4bsk	P49767
3fub	P39905
5mr4	Q99748
2ask	Q5T4W7
5vt2	Q99988
4mid	P08476
4mid	P12643

Tabla 4. Identificadores Mnemonic de las proteínas humanas similares a la LH de *M. musculus*.

PDB ID de Dali server	Mnemonic Code (X) de UniProtKB
1hcn, 1hrp, 1qfw, 1xul	P0DN86
1fl7, 1xwd, 4ay9, 4mqw,	P01225
4x1j, 4yu8	P41271
4my2, 5bpu, 5bq8, 5bqb, 5bqc, 5bqe, 5cl1	Q00604
1ao3, 1atz, 1auq, 1fe8, 1fns, 1ijb, 1ijk, 1m10, 1oak, 1sq0, 1u0n, 1uex, 2adf, 2mhp, 2mhq, 3gxb, 3hxo, 3hxq, 3ppv, 3ppw, 3ppx, 3ppy, 3zqk, 4c29, 4c2a, 4c2b, 4dmu, 4nt5, 5bv8	P04275
1fzv, 1rv6	P49763
2xv7	O43915
3mjk	P04085
2v5e, 3fub, 4ux8	P39905
2ask, 2gh0, 2gyr, 2gyz	Q5T4W7
1jpy, 3jvf, 5n92, 5nan	Q96PD4

Tabla 5. Fragmentos candidatos como epítomos extraídos de la secuencia de aminoácidos de la LH.

Organismo	Epítomo	Ubicación
<i>C. lupus familiaris</i>	VWASRGPLRP (1)	18;27
	NATLAAENEAC (2)	33;43
	AALPPVPQPVCT (3)	67;78
	LPGCPPGVDPMVS (4)	89;101
	CRLSNSDCGGPRAQSLAC (5)	113;130
<i>M. musculus</i>	VWASRGPLRPLCRPVNATLAAENEF (1)	18;42
	AALPPVPQPVCT (2)	67;78
	RLPGCPPGVDPPIVS (3)	88;101
	CRLSSSDCGGPRTQPMACDLP (4)	113;133

Fuente: Aponte, Cubas Céspedes & Méndez, 2019.

Tabla 6. Reacciones cruzadas para las proteínas de *H. sapiens* y *C. lupus familiaris*.

Proteína	Mnemonic Code (X)	Organismo	Localización celular	Epítipo específico
Choriogonadotropin subunit beta 3	P0DN86	<i>Homo sapiens</i>	Región extracelular o secretada	5
XP_022262862.1 persephin	F6XSY4	<i>Canis lupus familiaris</i>	Secretada	1

Tabla 7. Reacciones cruzadas para las proteínas de *H. sapiens* y *M. musculus*.

Proteína	Mnemonic Code (X)	Organismo	Localización celular	Epítipo específico
Vascular endothelial growth factor D	O43915	<i>Homo sapiens</i>	Región extracelular o secretada	4
Human norrin	Q00604	<i>Homo sapiens</i>	Secretada	4

13. FIGURAS

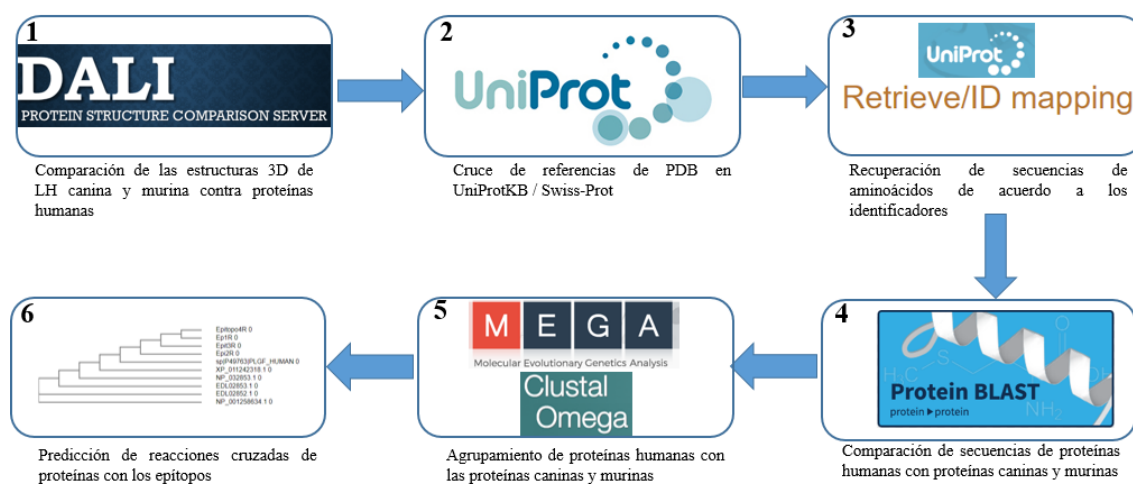


Figura 1. Esquema de desarrollo de la metodología de determinación de la especificidad del péptido análogo a la LH. En cada uno de los cuadros azules se resume la secuencia de pasos seguidos para determinar las reacciones cruzadas que podrían tener lugar en el organismo, debido al uso de los epítipos indicados en la Tabla 5 que pueden ser también específicos para proteínas diferentes a la LH.

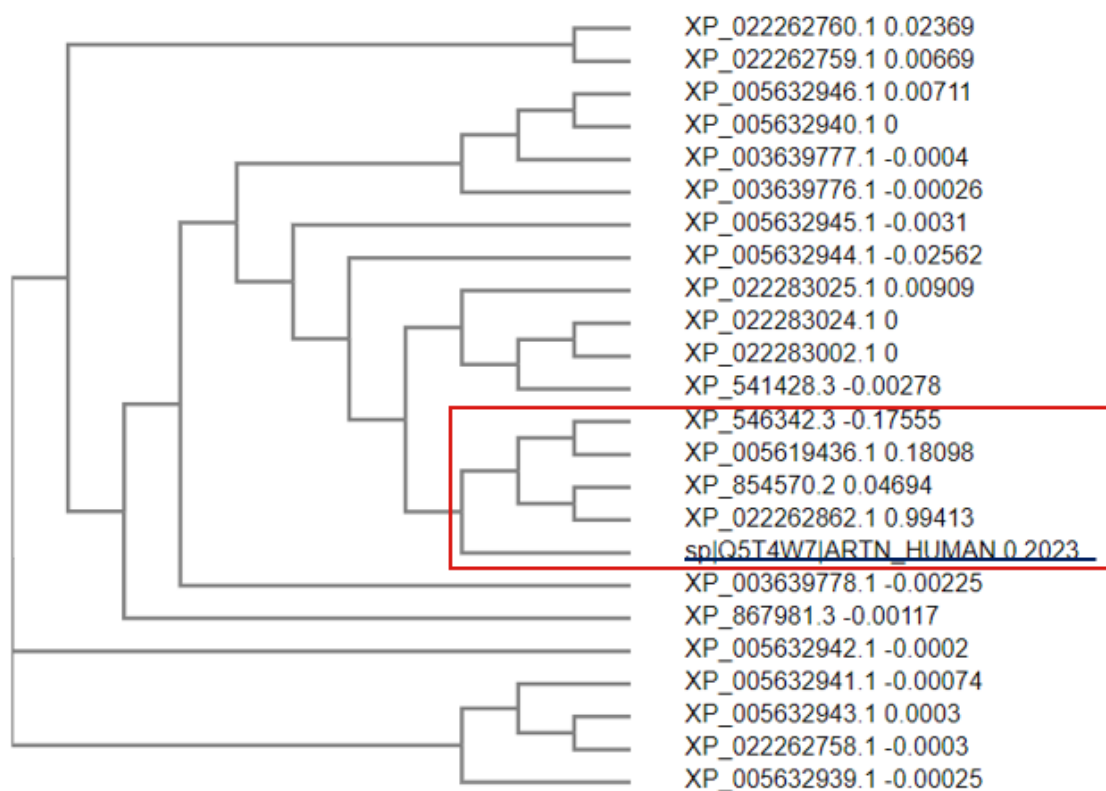


Figura 2. Árbol filogenético obtenido mediante el método de Neighbor joining de proteínas de *C. lupus familiaris* similares a la proteína humana Q5T4W7. El rectángulo rojo presenta la agrupación por clado de las proteínas de *C. lupus familiaris* relacionadas con la proteína humana Q5T4W7 (artemin).

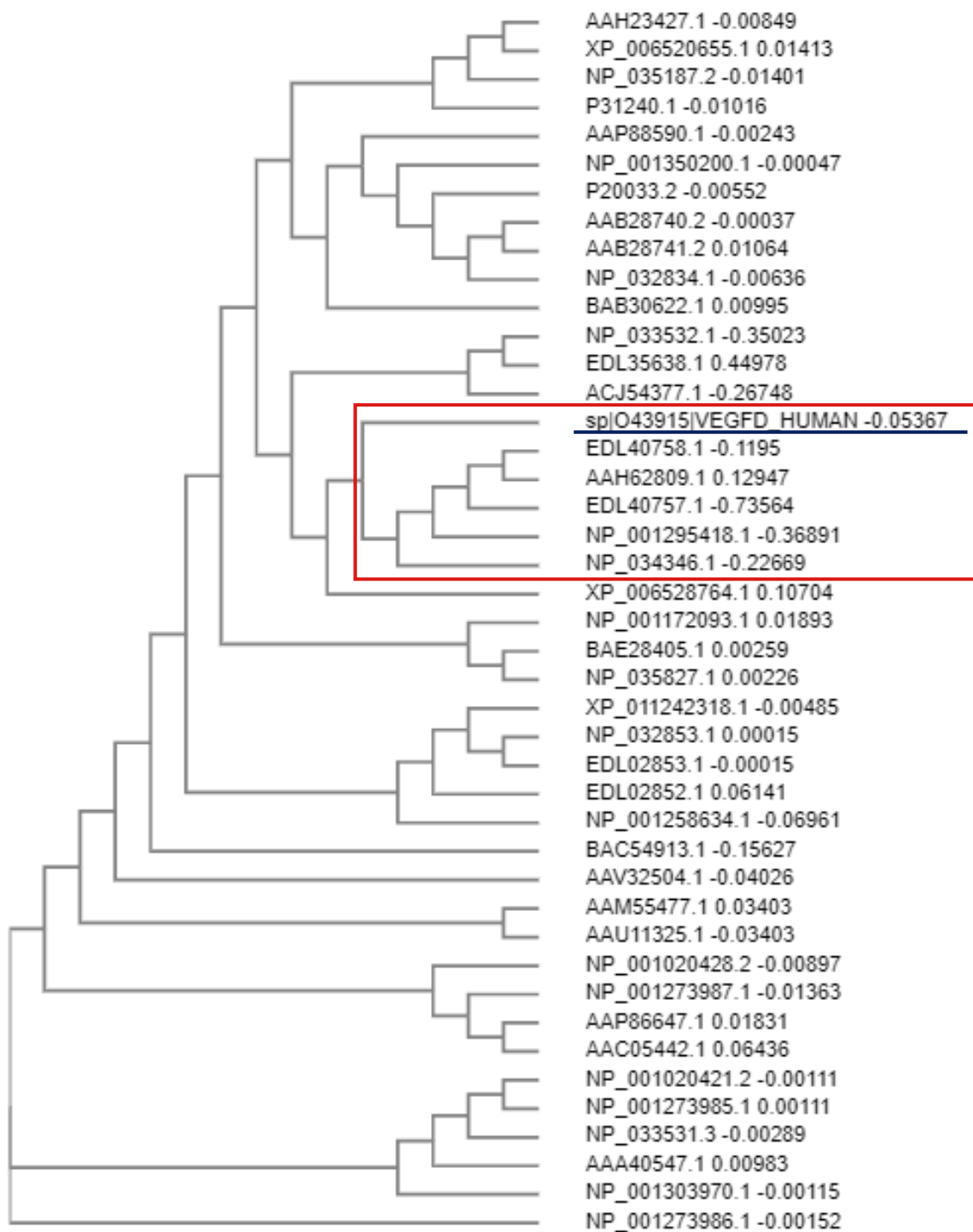


Figura 3. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor joining de proteínas de *M. musculus* similares a la proteína humana O43915. El rectángulo rojo indica el agrupamiento por clusterización de las proteínas de *M. musculus* relacionadas con la proteína humana O43915 (vascular endothelial growth factor D).



Figura 4. Árbol filogenético obtenido a través del método de Neighbor joining de la proteína humana de entrada Q5TW7 con las proteínas de *C. lupus familiaris* y sus respectivos epítomos. El rectángulo rojo representa la proteína XP_022262862.1 (persephin) de *C. lupus familiaris* que se agrupa en el mismo clado que el epítomo 1 obtenido de la secuencia de aminoácidos de la LH canina.

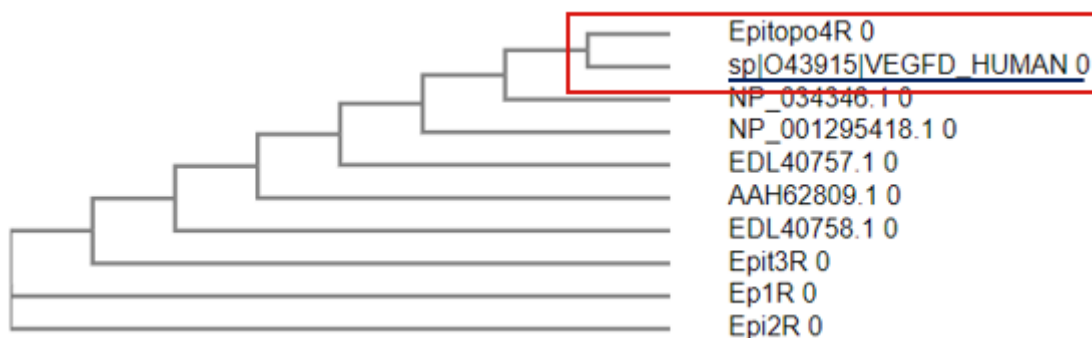


Figura 5. Árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor joining de la proteína humana de entrada O43915 con las proteínas de *M. musculus* y sus epítomos correspondientes. En el rectángulo rojo se encuentra el clado que agrupa a la proteína O43915 (vascular endotelial growth factor D) y al epítomo 4 extraído de la secuencia de aminoácidos de la LH murina.