

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Efecto de una vacuna recombinante de secuencia de LH sobre la  
espermatogénesis adulta murina.**

**Silene Lorena Escalante Gordillo**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 04 de mayo de 2020

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Efecto de una vacuna recombinante de secuencia de LH sobre la  
espermatogénesis adulta murina.**

**Silene Lorena Escalante Gordillo**

**Nombre del profesor, Título académico**

Pedro Manuel Aponte, MV, PhD

Quito, 04 de mayo de 2020

## **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.

Nombre y apellidos: Silene Lorena Escalante Gordillo

Código: 00132024

Cédula de identidad: 1717573669

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

## RESUMEN

En la actualidad existen métodos anticonceptivos para animales machos que permiten alterar su funcionamiento reproductivo, obteniendo así una espermatogénesis inactiva. Uno de estos métodos es la esterilización que se realiza en animales machos, la cual consiste en realizar una intervención quirúrgica para que el animal no pueda reproducirse. Este método como los otros ya existentes resultan difíciles de realizar de manera masiva en poblaciones de perros callejeros. Este proyecto de investigación se realizó con el objetivo de realizar una vacuna recombinante anti – LH sintética que tenga la capacidad de suprimir la espermatogénesis adulta murina; específicamente de la especie *Mus musculus* albinos de linaje BALB/C. El péptido empleado en la síntesis de la vacuna recombinante anti – LH es homólogo para la especie *Canis lupus familiaris*, por lo cual el mismo puede ser utilizado en investigaciones futuras. En esta investigación se utilizaron 8 animales (machos adultos; edad 30 días), divididos en dos grupos. El primer grupo está formado de 4 ratones machos adultos, los mismo que fueron inoculados con la vacuna recombinante anti – LH, mientras que en el segundo grupo, también de 4 ratones, fueron inoculados únicamente con adyuvante más buffer. Después de dos meses los animales fueron sacrificados para la recolección de las muestras de tejido testicular, las cuales fueron utilizadas para realizar el análisis histológico. Los resultados que se obtuvieron en el proyecto no fueron los esperados debido a que en los dos grupos de animales de investigación se observó una espermatogénesis activa, evidenciada por la presencia de espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos. Se concluye que la vacuna recombinante anti – LH no suprime la espermatogénesis adulta murina de la especie *Mus musculus* albinos de linaje BALB/C.

Palabras claves: Anticonceptivos, *Mus musculus*, BALB/C, *Canis lupus familiaris*, vacuna recombinante anti – LH, espermatogénesis.

## ABSTRACT

Currently, there are contraceptive methods for male animals that allow altering their reproductive functioning, thus obtaining an inactive spermatogenesis. One of these methods is sterilisation, which is carried out on male animals and consists of a surgical intervention so that the animal cannot reproduce. This method, like the others already in existence, is difficult to carry out massively on stray dog populations. This research project was carried out with the aim of producing a recombinant synthetic anti-LH vaccine that has the capacity to suppress adult murine spermatogenesis, specifically of the albino *Mus musculus* species of the BALB/C lineage. The peptide used in the synthesis of the recombinant anti - LH vaccine is homologous to the species *Canis lupus familiaris*, so it can be used in future research. In this research, 8 animals (adult males; age 30 days), divided in two groups, were used. The first group consisted of 4 adult male mice, which were inoculated with recombinant LH vaccine, while the second group, also consisting of 4 mice, were inoculated with only adjuvant plus buffer. After two months the animals were slaughtered for the collection of testicular tissue samples, which were used for histological analysis. The results obtained in the project were not as expected because in the two groups of research animals an active spermatogenesis was observed, evidenced by the presence of spermatozoa in the light of the seminiferous tubules. It is concluded that the recombinant anti - LH vaccine does not suppress adult murine spermatogenesis of the species *Mus musculus* albinos of BALB/C lineage.

Key words: Contraceptives, *Mus musculus*, BALB/C, *Canis lupus familiaris*, recombinant LH vaccine, spermatogenesis

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
<b>Animales de estudio.....</b>	<b>11</b>
<b>Vacuna recombinante de secuencia anti - LH.....</b>	<b>11</b>
<b>Vacunación y monitoreo de los especímenes.....</b>	<b>12</b>
<b>Sacrificio de los especímenes .....</b>	<b>13</b>
<b>Disección de los especímenes.....</b>	<b>13</b>
<b>Análisis histológico .....</b>	<b>13</b>
Inclusión de órganos.....	13
Micrótomo.....	14
Remoción de parafina.....	15
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>21</b>
<b>ANEXO A: RESULTADOS DE LA HISTOLOGÍA TESTICULAR .....</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO B: FRECUENCIAS DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXO C: RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS .....</b>	<b>24</b>
<b>ANEXO D: ESPERMATOGÉNESIS ESPERADA VS ESPERMATOGÉNESIS OBTENIDA .</b>	<b>25</b>
<b>ANEXO E: ESPERMATOGÉNESIS ESPERADA VS ESPERMATOGÉNESIS OBTENIDA .</b>	<b>26</b>

## INTRODUCCIÓN

Los censos que se han realizado en Quito-Ecuador, en algunos proyectos de investigación han permitido establecer en el año 2018 que aproximadamente en la ciudad existe un perro callejero por cada veintidós habitantes ecuatorianos (Cadena, 2013). Según el Instituto de Estadísticas y Censos (INEC), en el Ecuador en el año 2018 existían 17.096.789 habitantes; en la ciudad de Quito 2.690.150 habitantes, y en la actualidad se estima un aproximado de 17.451.825 de ecuatorianos (Instituto de Estadísticas y Censos, 2020). Considerando la relación 22:1 y el valor de habitantes ecuatorianos, se deduce que en el 2018 en el Ecuador existían aproximadamente 777.127 perros callejeros, tomando en cuenta que la relación utilizada es únicamente del censo de perros callejeros realizado en el 2013 dentro del Distrito Metropolitano de Quito, por lo que el valor obtenido de perros callejeros es una ponderación. Utilizando la misma relación y el mismo criterio anterior, se determina que en la actualidad existirían aproximadamente 793.265 perros callejeros.

Las cifras aproximadas de perros callejeros son elevadas, por lo que el uso de métodos de concientización es fundamental para que estos animales no residan en las calles y así que no llegue a ocurrir una sobrepoblación de los mismos. Esto representa una problemática de salud pública, así como también un problema en el ecosistema tanto urbano como rural y en el bienestar de los mismos. Se habla de un problema de salud pública, puesto que los perros que se encuentran abandonados en las calles no tienen los mismos cuidados que aquellos que se encuentran en un hogar con un aseo adecuado, comida y un techo (Chávez, et al, 2019). El problema radica en que los perros de la calle, son fuentes de contaminación para el ser humano puesto que se encuentran en sitios de almacenamiento de basura, lugares poco higiénicos y contaminados, los mismo permanecen en contacto todo el tiempo con las



personas y otros animales del ecosistema que los rodean, transmitiendo enfermedades que se pueden evitar si estos estuvieron debidamente vacunados y tuvieran un control reproductivo para minimizar su procreación (Salamanca, et al, 2011).

Ante esta situación, en la actualidad existen diferentes métodos que pueden regular esta problemática social, los cuales permiten que exista un control reproductivo. Entre estos tenemos los métodos contraceptivos (anticonceptivos), de los cuales existen los métodos quirúrgicos y los métodos químicos (De Pedro, 2006).

Los métodos anticonceptivos quirúrgicos utilizados actualmente para los animales machos son permanentes e irreversibles, los mismos que imposibilitan su reproducción, sin embargo este método requiere de una intervención quirúrgica, que debe ser realizada por un profesional veterinario, por lo que tiene un costo monetario (Uribe, et al, 2018). Uno de los métodos quirúrgicos más utilizados en los perros es el proceso conocido como orquiectomía, el cual consiste en extirpar los testículos del animal macho. Con este procedimiento se garantiza que no se de la síntesis de los espermatozoides; este método tiene como ventajas, que el animal no se frustre sexualmente ya que su deseo sexual es nulo, así como la reducción de contraer problemas prostáticos y tumores futuros en los testículos. De igual forma este método permite tener un control en la reproducción del animal puesto que ya no posee el deseo de buscar pareja en las calles y de esta manera preñar a varias hembras (Dutan, 2018). Por otro lado, uno de los métodos más simples utilizados en los perros es la vasectomía. Este método consiste en extirpar el conducto deferente del aparato reproductor, que se encarga de transportar los espermatozoides hacia el exterior del animal; una de las ventajas de este procedimiento es que es rápido y simple para el médico veterinario por lo que se realiza en minutos, por otro lado su desventaja es que el animal permanece con una conducta activa de reproducción (Vivar, 2016).

Los métodos anticonceptivos químicos que existen para los animales machos utilizan hormonas sintéticas, las mismas que tienen la capacidad de interactuar con el organismo del animal; el sistema nervioso central tiene la capacidad de captar los altos niveles de estas hormonas y suprimir de manera inmediata el ciclo hormonal natural de los animales (Pelaez, et al, 2018). Uno de los métodos utilizados en los perros machos es la inyección intratesticular que permite administrar hormonas químicas y en ocasiones se adiciona sustancias irritantes, que tiene como objetivo realizar una alteración en la función de los conductos encargados del transporte de los espermatozoides, mediante el impedimento de su movilidad; este método es conocido como orquiectomía o vasectomía química (Viscasillas & Aranda, 2010).

Como podemos ver los métodos anticonceptivos nos muestran una solución real de cómo manejar la sobrepoblación de los perros callejeros en el Ecuador – Quito, pero los perros que se encuentran abandonados por las calles de la ciudad no tienen personas que se interesen en este problema, por lo que los animales no son llevados a que se les realicen estos procedimientos. En el Ecuador, hace aproximadamente tres años la Secretaria Metropolitana de Salud y Urbinimal inauguró la campaña de esterilización gratuita de animales, para que los dueños de las mascotas puedan realizar este procedimiento sin costo alguno y que exista una concientización sobre la sobrepoblación animal (Caiza, 2019); por otro lado, gestionar una campaña masiva para todos los perros callejeros de la capital, demandaría un alto costo económico, que difícilmente el gobierno podría asumir, no precisamente por falta de recursos económicos, sino porque esta problemática no sería considerada una prioridad (Caiza, 2019).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, este proyecto tiene el objetivo de realizar una vacuna recombinante de anti –LH que tenga la capacidad de impedir la espermatogénesis en ratones con el fin de ser probada posteriormente en perros adultos.

## MÉTODOS

### **Animales de estudio**

Se procedió a colocar 3 hembras y 2 machos de la especie *Mus musculus* procedentes de la ciudad de Guayaquil, en distintas cajas que se encontraban en el Bioterio del Instituto de Microbiología de la USFQ. El 24 de mayo se da inicio a la reproducción de los ratones hasta el 31 de mayo. La reproducción consiste en colocar 2 hembras con 1 macho en 1 caja de plástico, a continuación se rotularon todas las cajas. Una vez transcurrido el tiempo de reproducción se realizaron los cuidados respectivos de las hembras sin los machos, los cuales fueron: alimentación, limpieza y registro. Después de haber transcurrido 15 – 20 días aproximadamente, nacieron alrededor de 8 – 10 crías por cada uno de los ejemplares; después de dos semanas se realizó el destete y la separación de las crías por sexo en cajas de plástico modificadas.

Las cajas plásticas se adaptaron para las crías de la siguiente manera: se colocó en la tapa una malla con celdas de 1 cm aproximadamente para evitar que las crías se escapen. Posterior a esto se colocó en el interior de la caja 220 g de viruta, 2 recipientes (20 mL) para el alimento y 2 bebederos de plástico (80 mL). Para el experimento se utilizaron las crías machos; a continuación se colocó en una de las cajas modificadas 4 machos, los de experimentación y en otra caja se colocó 4 machos del grupo control.

En este experimento se controló la alimentación y el hábitat de los especímenes de experimentación (limpieza, cambio de la cama y registro de actividades).

### **Vacuna recombinante de secuencia anti – LH**

Para elaborar la vacuna anti – LH, se usó el conjugado correspondiente a un péptido sintético de 20 aminoácidos, replicando una porción de la secuencia LH, así también como una proteína inmunogénica vectora transportadora llamada KLH y el adyuvante incompleto de

Freund, el mismo que se procedió a preparar con la misma formulación de una vacuna anticonceptiva inyectable con la forma de emulsión que se le adiciona el conjugado de proteína. A continuación, se sometió el conjugado a gasificación con  $N^2$  (gas), el cual evita que los grupos sulfhídricos de las cisteínas de la proteína KLH y del péptido que deben reaccionar entre sí se oxiden. El tiempo de duración de esta reacción es de 3 horas aproximadamente, según las instrucciones del fabricante de la KLH. Posteriormente se mezcló el conjugado obtenido con el adyuvante en una relación volumétrica de 1:1, a continuación, se llevó la vacuna al vortex por 3 minutos para que ocurra la emulsificación de la misma; finalmente se colocó la vacuna en las jeringas de insulina para la inoculación de los animales experimentales (0,1 ml por animal, por vía subcutánea).

### **Vacunación y monitoreo de los especímenes**

Se procedió a escoger de manera aleatoria a 4 ratones machos de los 8 disponibles, a continuación, los 4 ratones seleccionados se colocaron en una caja (misma especificación de las anteriores cajas) para recibir la vacuna anti – LH y los otros 4 ratones se colocaron en otra nueva caja para recibir el adyuvante con el buffer (grupo control).

Se inoculó a los 4 especímenes del grupo experimental (vacuna), uno por uno, con una jeringa de insulina, a cada uno se le colocó 0.1 ml de la vacuna anti – LH; a continuación se tomo a cada ratón sujetándolo por el pliegue dorsal cutáneo y colocándolo sobre una superficie plana en posición decúbito ventral, después se lo inoculó de manera subcutánea en el pliegue dorsal más abajo de la posición de la nuca. Los otros 4 especímenes de la segunda caja (grupo control) fueron inoculados siguiendo el mismo protocolo anterior, a cada uno se le colocó 0.1 ml de adyuvante con buffer. Desde el 18 de julio hasta el 22 de octubre se realizó el monitoreo del experimento; se examinó diariamente a cada espécimen del grupo experimental, observando si los animales presentaban efectos adversos como cambios o

alteraciones en la zona testicular (hinchazón, enrojecimiento, disminución o aumento de los testículos), falta de ánimo e inapetencia, posterior a la vacunación de los mismos.

### **Sacrificio de los especímenes**

Dos meses después de la vacunación se procedió a sacrificar a los 4 ratones experimentales y a los 4 ratones del grupo control. Se utilizó un método químico para el sacrificio, en donde se colocó 0,2 ml del fármaco Euthanex a cada uno de los especímenes de la siguiente manera: se tomó a cada ratón del pliegue dorsal cutáneo de la nuca colocándolo en posición decúbito supino y se inyectó el fármaco de manera intraperitoneal esperando durante 5 minutos. Pasado este tiempo se realizó la comprobación del fallecimiento del animal mediante la examinación del latido del corazón y respuestas a estímulos dolorosos.

### **Disección de los especímenes**

Se realizó la disección de los 4 ratones experimentales y de los 4 ratones del grupo control. Se colocó a cada uno de los animales sobre una tabla limpia en posición ventral (decúbito supino) y se clavó con alfileres las extremidades de los mismos en la tabla, se realizó un corte en la parte caudal del abdomen con una tijera y se cortó la piel desde la parte caudal hasta la parte craneal del abdomen del animal, posterior a esto, con la ayuda de una pinza se sujetó la piel del animal para realizar la extracción de los testículos del mismo y colocarlos en un tubo Falcon de 10 ml de capacidad que contenía 8 ml de fijador Bouin.

Para preparar el fijador Bouin se procedió a colocar en una probeta de 100 ml de capacidad 70 ml de ácido pícrico saturado, seguido de 5 ml de ácido acético glacial y finalmente 25 ml de formaldehído al 37% v/v.

### **Análisis histológico**

#### **Inclusión de órganos.**

Una vez que los órganos fueron fijados por el Bouin durante 48 horas, se realizó la inclusión en parafina de los mismos mediante la deshidratación por medio de alcoholes en concentraciones crecientes. Primeramente se retiraron los órganos de la solución Bouin para cortarlos con un bisturí por la mitad y colocarlos en el cassette de inclusión. Cada cassette fue debidamente identificado con un lápiz de grafito; una vez realizado este proceso con cada uno de los cassettes se colocaron en un vaso de precipitación de 1000 ml y se lo lleno hasta cubrir los cassettes con etanol al 70% durante 15 minutos, después se descartó el etanol al 70% y se cubrieron los cassettes con etanol al 95% durante 40 minutos, posterior a esto se descartó el etanol al 95% y se cubrieron los cassettes con etanol al 100% durante 20 minutos, después se lavó 3 veces, posterior a esto se descartó el alcohol al 100% y se cubrieron los cassettes con el xilol 1 durante 10 minutos, después se descartó el xilol 1 y se cubrieron los cassettes con el xilol 2 durante 2 minutos y se lavó 2 veces, posterior a los dos lavados del xilol 2 se descartó el mismo y se cubrió los cassettes con el xilol:paraplast 2:1 durante 45 minutos, después se cubrieron los cassettes con Paraplast durante 1 hora 2 veces, procurando que el compuesto no se solidifique durante este periodo de tiempo con la ayuda de una estufa a 52 °C. Posteriormente se sacaron las muestras de los cassettes para ser incluidas en bloques de parafina, para lo cual se utilizó moldes histológicos de metal, finalmente se dejó reposar las muestras toda la noche a -18 °C para obtener una correcta solidificación de las mismas.

### **Micrótopo.**

Se llevaron las muestras con hielo (mantenerlas frías) al laboratorio de histología del COCIBA para realizar los cortes de 5 µm en el micrótopo de cada una de las muestras incluidas en parafina. Para este fin, se colocó cada muestra en el micrótopo, una por una, para realizar los cortes de las mismas; una vez obtenido el corte de la muestra, con la ayuda de una espátula se toma el corte de la muestra y se la colocó en un baño de flotación a una

temperatura de 41°C, después se toma un portaobjetos, previamente cubierto con polilisina, y se lo colocó en un ángulo de 45 ° de la muestra para que se pegue en el portaobjetos, finalmente se colocaron los portaobjetos en una bandeja a temperatura ambiente por al menos 12 horas.

### **Remoción de parafina.**

La remoción de parafina de las muestras, se da mediante lavados con xilol y alcoholes decrecientes. Se colocaron los portaobjetos en una cubeta de tinción (los portaobjetos de los extremos deben mostrar el tejido hacia el interior), a continuación se llenó la cubeta de tinción con xilol, 3 veces durante 3 minutos. Se llenó la cubeta con etanol al 100% durante 1 minuto, después se descartó el etanol al 100% y se llenó la cubeta con etanol al 95% durante un minuto, posteriormente se descartó el etanol al 95% y se llenó la cubeta con agua destilada para realizar 2 lavados, cada uno durante 3 minutos, después se realizó la tinción con Hematoxilina de Harris durante 15 segundos, retirando el excedente con un lavado de agua destilada, a continuación se realizó un lavado con agua de grifo a chorro pequeño durante 10 minutos para que el colorante se diferencie; posterior a esto, se realizó una deshidratación de las placas de la siguiente manera: se colocaron las placas en la cubeta y se cubrieron con etanol al 95% durante 1 minuto dos veces, a continuación se descartó el etanol al 95% y se colocó etanol al 100% durante 1 minuto dos veces, después se colocó xilol 1 durante 1 minuto, a continuación se descartó el xilol 1 y se colocó xilol 2 durante 1 minuto, posterior a esto, se colocó xilol 3 durante 1 minuto. Después se colocó dos gotas de medio de montaje sobre cada una de las placas y se puso con cuidado el cubreobjetos sobre cada una, se dejó que reposaran durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a observar en un microscopio óptico utilizando los objetivos 10x y 40x la morfología de los tejidos testiculares.

## RESULTADOS

En la presente sección se muestran los resultados de la parte experimental. Se utilizó la prueba estadística  $X^2$ , siendo esta prueba la que mejor se ajusta al diseño experimental planteado y a la hipótesis alternativa utilizada en el proyecto de investigación.

La histología de los especímenes experimentales (vacunados) y los pertenecientes al grupo control; muestran una espermatogénesis activa, la cual es evidente por la producción de espermatozoides que se encuentran en el túbulo seminífero (Figura 1).

La presencia de espermatogénesis en los individuos adultos de la especie *Mus musculus* ocurrió en ambos grupos experimentales (Tabla 1). Las frecuencias del efecto de la vacuna recombinante anti – LH, y del grupo control fueron similares (Tabla 1).

La tabla 2 presenta resultados similares, en términos de números absolutos de los animales utilizados.

Los resultados obtenidos en las tablas 1 y 2 se expresan en números absolutos esperados y obtenidos en la tabla 3.

La dispersión de la espermatogénesis obtenida se muestra con una línea continua de color turquesa, que indica que no existió ninguna variación entre el experimento vacuna y el experimento control (Figura 2). La dispersión de la espermatogénesis esperada se muestra con una curva de color violeta, lo que indica una variación entre el experimento vacuna y el experimento control (Figura 2). Adicionalmente la figura 2 enseña el número total de animales utilizados en el experimento control y el experimento vacuna.



## DISCUSIÓN

La vacuna recombinante anti – LH tienen una formulación de una vacuna contraceptiva inyectable en forma de emulsión; la vacuna utilizada en la fase de experimentación fue diseñada con el objetivo de suprimir la espermatogénesis adulta murina, así también como ser un método contraceptivo que nos permitiera controlar la reproducción de los animales. Con el análisis de los resultados, se puede observar que la acción de la vacuna no fue lo que se esperaba, debido a que existe una espermatogénesis activa en el grupo experimental y en el control, lo que indica que las células de Leydig tenían un funcionamiento normal en el organismo de los animales vacunados y de los controles. La actividad y el funcionamiento de estas células que permiten la producción de espermatozoides, se encuentra dirigida por las gonadotropinas, específicamente por la hormona luteinizante (LH), por este resultado obtenido la vacuna recombinante anti – LH no inactiva la gonadotropina LH, obteniendo un resultado diferente a lo esperado (Kumar, et al, 1997).

Una de las razones por las que la vacuna recombinante anti – LH no cumplió su función pudiera ser por el péptido utilizado, se debe recalcar que el mismo es una secuencia específica que fue escogida de la secuencia de la hormona luteinizante por técnicas bioinformáticas. Según estudios la hormona luteinizante tiene varias isoformas, esto quiere decir que la proteína LH puede presentar distintas formas que se dan durante el proceso de síntesis, debido a que esta proteína tienen cambios a nivel post – traduccional, generando así sus diferentes formas (Marelli, et al, 2013; Ortega, et al, 2016). Por lo que se pudo utilizar una isoforma de la proteína LH para la elaboración del péptido provocando así que la producción de los anticuerpos que debían inactivar la hormona LH, no lo hicieran debido a que los anticuerpos tuvieran una forma distinta a la hormona luteinizante producida en el

cuerpo de los animales dando como resultado una espermatogénesis activa en los animales vacunados puesto que la proteína LH endógena no fue inactivada.

Otro factor importante es el tamaño del péptido utilizado para la formulación de la vacuna recombinante anti – LH, puesto que el mismo solo estaba conformado por 20 aminoácidos, en donde la secuencia de los primeros 10 aminoácidos se repite para conformar así el total de los 20 aminoácidos, al final del mismo se encontraba un residuo de cisteína. Según investigaciones en las que se habla de la elaboración de vacunas, nos indican que es necesario utilizar más copias del péptido un ejemplo es lo que realizaron en el estudio de la vacuna contra el *Plasmodium vivax* en donde se utilizaron 28 péptidos de 20 aminoácidos pero estos se encontraban traslapados con 10 residuos cada uno de estos, obteniendo al final la totalidad de la proteína (Herrera, et al, 2005). El tamaño del péptido es un factor importante puesto que al ser una secuencia específica escogida de la proteína LH este puede ser procesado de manera inmediata mediante la respuesta innata del sistema inmune puesto que era muy pequeño, lo que imposibilitó que exista una respuesta humoral para que se de la formación de los anticuerpos que serían capaces de inactivar la hormona luteinizante y por deficiencia de la misma no se hubiera dado la formación de las células de Leydig que actúan en la producción de los espermatozoides (Tami, 1999).

Por último se consideró que el lugar en donde se encontraban los animales de investigación durante el periodo de monitoreo, el cual inició después de la inoculación de los animales con la vacuna recombinante anti – LH, les podría haber provocado estrés debido a que el área en donde se encontraban las cajas con los animales estaba compartida con otros animales del bioterio y existía un flujo de personas durante todo el día, las mismas que entran y salían. Según algunos estudios realizados el estrés de los animales puede generar alteraciones en el sistema inmune, el funcionamiento endocrino como también la función neuronal de los animales (Castellanos, et al, 2006). Por lo que se pudo ver afectada la

producción de la hormona luteinizante, así también como la respuesta humoral del sistema inmune, evitando la formación de anticuerpos en respuesta de la vacuna anti – LH inoculada a los animales (Sánchez, et al, 2007).

En un futuro se podría realizar un estudio utilizando un análogo de la hormona luteinizante con la ayuda de la investigación del análogo de GnRH para obtener resultados similares y poder bloquear tanto el GnRH como la proteína LH y tener resultados más prometedores en la supresión de la espermatogénesis animal. También se podrían crear los anticuerpos con la capacidad de inactivar la hormona luteinizante en el laboratorio para estos ser colocados en los especímenes de estudio y poder evaluar los efectos que los mismos tendrían ante este tratamiento. Utilizando como guía los estudios del laboratorio de fisiología y endocrinología animal de la Universidad de Concepción (Recabarren, et al, 2006) y los estudios del Instituto Nacional de Endocrinología de Cuba (Castellanos, et al, 2002).

## CONCLUSIONES

Como se observó los resultados obtenidos no fueron los esperados por lo que se concluye que este proyecto de investigación proporciona información valiosa, que puede ser utilizada en futuras investigaciones y así lograr que la vacuna recombinante anti – LH suprima la espermatogénesis animal en su totalidad. Se deben realizar más estudios del funcionamiento del péptido para asegurar la funcionalidad de la vacuna en el interior de los animales, así también como más investigaciones sobre la formulación de la misma para que esta tenga el efecto esperado en los animales de investigación y en un futuro pueda ser utilizada en la especie *Canis lupus familiaris* logrando así la obtención de una vacuna sintética capaz de suprimir la espermatogénesis animal en estas especies.

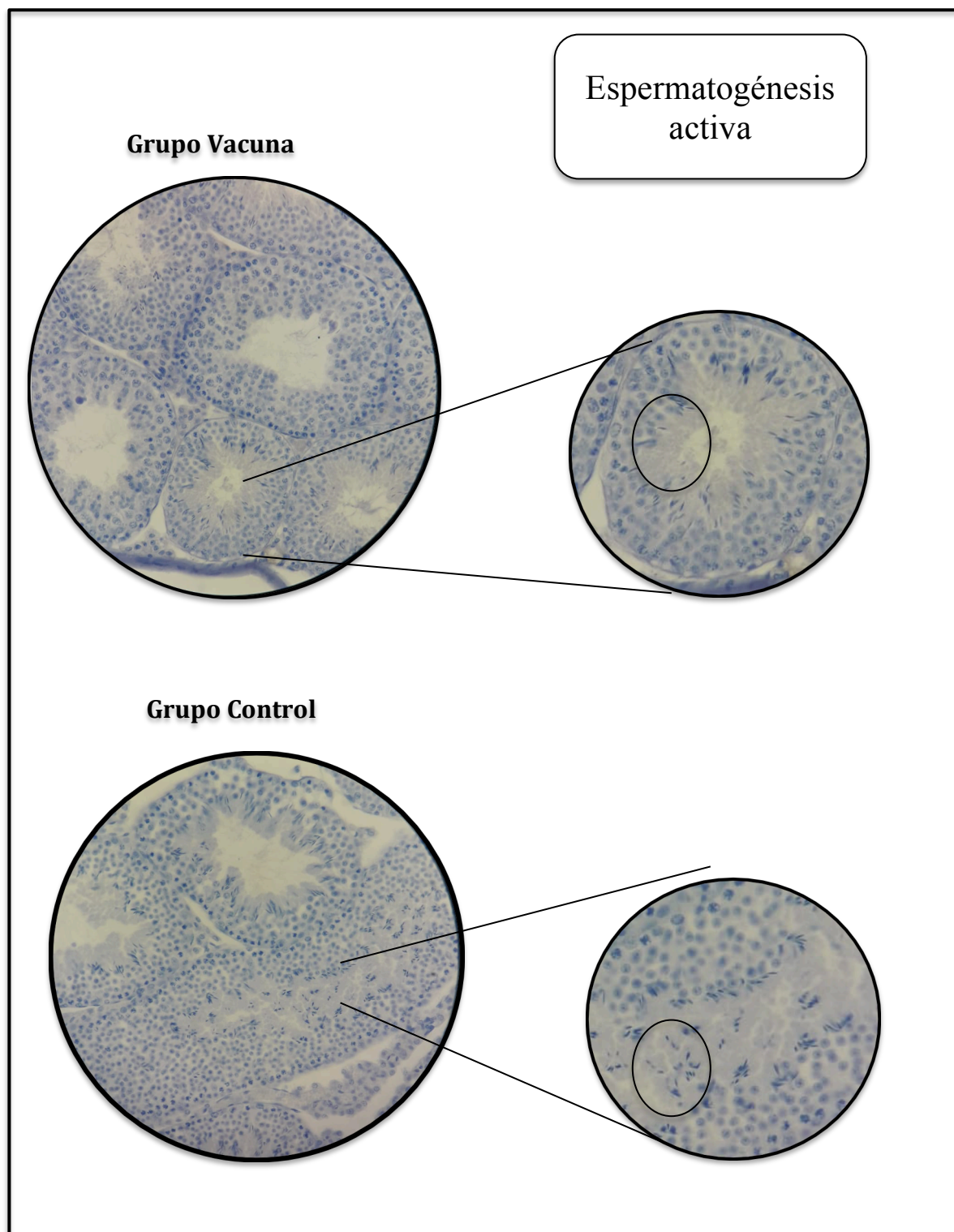
En la actualidad se sigue trabajando con este proyecto en busca de obtener los resultados esperados, así como también se están, realizando mejoras en la elaboración de la vacuna para la obtención de un producto recombinante, el cual utiliza un péptido que es específico, el mismo que se obtuvo de la secuencia de la hormona luteinizante.

Se espera en un futuro obtener resultados efectivos con la elaboración de esta vacuna recombinante anti – LH, para que pueda ser utilizada en los perros domésticos de la ciudad de Quito y que contribuya al control de la reproducción animal en esta ciudad, brindando así una solución efectiva para la sobrepoblación de estos animales que genera un problema de salud pública.

### Referencias bibliográficas

- Cadena, G. (2013). *Estudio para la estimación de la población de perros callejeros en Mercados Municipales del Distrito Metropolitano de Quito*. DMT. [Tesis no publicada]. Universidad San Francisco de Quito.
- Caiza, E. (2019, 27 de noviembre). *La clínica veterinaria municipal de Urbanimal cumple dos años de servicio*. El comercio. <https://www.elcomercio.com/tendencias/balance-aniversario-clinica-veterinaria-urbanimal.html>
- Castellanos, E., Arranz, M., Rodríguez, B., García, G., y González, R. (2002). Determinación de la hormona luteinizante (LH) en plasma por un método inmunoenzimático. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21 (1): 15-20. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v21n1/ibi03102.pdf>
- Castellanos, E., Sebazco, C., Fernández, M., y Pérez, P. (2006). Alteración de los niveles leucocitarios en ratones BALB/C sometidos a estrés. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25 (2):. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v25n2/ibi04206.pdf>
- Chávez, G., Clementi, G., Águila, C., y Ubilla, M. (2019). Determinación del estado de bienestar en perros callejeros de dos centros urbanos de Chile. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 38 (3), ...-.... [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications\\_%26\\_Documentation/docs/pdf/revue\\_plurithematique/2019/15052019-00147-ES\\_Chavez\\_ESP.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/revue_plurithematique/2019/15052019-00147-ES_Chavez_ESP.pdf)
- De Pedro, J. (2006). Anticoncepción en perros y gatos. *Elsevier*, Vol. 20. Núm. 6.: 70-72. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-anticoncepcion-perros-gatos-13089956>
- Dutan, J. (2018). *Comparación de la efectividad quirúrgica y posquirúrgica de tres técnicas de orquiectomía canina utilizadas en campañas de esterilización masiva en cuenca*. [Tesis magistral no publicada]. Universidad de Cuenca.
- Herrera, S., Victoria, L., Fernández, O., Bonelo, A., Perlaza, B., Zapata, C., Overgaaw, D., León, M., Galindo, E., Valencia, N., Acuña, L., Quintero, G., Restrepo, N., Vélez, J., Méndez, F., Villegas, A., Corrandin, G., y Arévalo-Herrera, M. (2005). Proceso para el desarrollo de una vacuna contra la fase hepática de *Plasmodium vivax*. *Colombia Médica*, Vol. 36 N° 1. <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v36n1/v36n1a1.pdf>
- Instituto de Estadísticas y Censos. (2020, abril). *Contador Poblacional*. Presidencia de la república del Ecuador, INEC. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas/>
- Kumar, T., Wang, Y., Lu, N. y col. (1997). La hormona estimulante del folículo es necesaria para la maduración del folículo ovárico, pero no para la fertilidad masculina. *Nat Genet* 15, 201-204. <https://www.nature.com/articles/ng0297-201>
- Marelli, B., Díaz, P., Amweg, A., Rey, F., Salvetti, N., y Ortega, H. (2013). Mecanismo de acción de las gonadotropinas sobre el ovario bovino y su participación en la enfermedad quística ovárica. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias*, 12 (1-2) <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/download/4543/6909/>
- Ortega, A., Olivares, A., Murcia, C., Díaz, D., González-Padilla, E., Montero, A., Gutiérrez, G., y Perera-Marín, G. (2016). Actividad biológica e inmunológica de las isoformas de carga de la hormona luteinizante bovina. *Rev Mex Cienc Pecu*, 7 (1): 29-51. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v7n1/2448-6698-rmcp-7-01-00029.pdf>
- Pelaez, M., Echevarria, L., Soler-Tovar, D., y Falcón, N. (2018). Métodos de contracepción en el control poblacional de perros: un punto de vista de los médicos veterinarios de clínica de animales de compañía. *Salud tecnol. Vet.*, 2: 55-61. DOI: 10.20453/stv.v6i2.3459. [https://www.researchgate.net/publication/331150489\\_M](https://www.researchgate.net/publication/331150489_M)

- etodos\_de\_contracepcion\_en\_el\_control\_poblacional\_de\_perros\_un\_punto\_de\_vista\_de\_los\_medicos\_veterinarios\_de\_clinica\_de\_animales\_de\_compania
- Recabarren, S., Muñoz, P., Lobos, A., Vilches, C., y Parilo, J. (2006). Análogo de GnRH disminuye la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) en ovejas prepúberes. *Arch. Med. Vet.*, Vol. XXXVIII N° 1: 39-46.  
[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000100006](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000100006)
- Sánchez, M., González, R., Padrón, Y. y Abraham, C. (2007). Estrés y sistema inmune. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.*, V. 23 N.2 Ciudad de la Habana.  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892007000200001](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892007000200001)
- Salamanca, C., Polo, L., y Vargas, J. (2011). Sobrepoblación canina y felina: tendencias y nuevas perspectivas. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 58 (I): 45:53.  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v58n1/v58n1a05.pdf>
- Tami, M. (1999). *Evaluación de vacunas peptídicas contra el virus de la fiebre aftosa en bovinos: Aislamiento y caracterización de mutantes de escape*. [Tesis de Posgrado no publicada]. Universidad FCEN - UBA.  
[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3184\\_Tami.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3184_Tami.pdf)
- Uribe, F., Prada, Y., Rodríguez, B., y Bayona, J. (2018). *Métodos de esterilización en caninos y felinos; revisión de literatura*. [Tesis no publicada]. Universidad de Cuenca.  
[https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/13779/1/2018\\_metodos\\_esterilizacion.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/13779/1/2018_metodos_esterilizacion.pdf)
- Viscasillas, J. y Aranda, M. (2010). Comparative study between two anaesthetics protocols for canine orchietomy: sedation plus intrtesticular block versus general anaesthesia. *Clin. Vet. Peq. Anim.*, 30 (4): 243-248.  
[https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/clivetpeqani\\_a2010v30n4/clivetpeqaniv30n4p243.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/clivetpeqani_a2010v30n4/clivetpeqaniv30n4p243.pdf)
- Vivar, F. (2016). *Comparación de dos abordajes quirúrgicos para orquiectomía, escrotal y pre-escrotal, en perros de 6 meses a 6 años*. [Tesis no publicada]. Universidad Cooperativa de Colombia.  
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26000/1/Tesis.pdf>

**ANEXO A: RESULTADOS DE LA HISTOLOGÍA TESTICULAR**

**Figura 1.** Histología del testículo de animales vacunados con la vacuna anti – LH (grupo vacuna) y de animales inoculados con adyuvante mas buffer (grupo control) .

La figura muestra un corte de los testículos de ambos experimentos, a los cuales se les realizó histología para la identificación de espermatozoides. En los cortes se observa una espermatogénesis activa por la presencia de espermatozoides en el túbulo seminífero.

### ANEXO B: FRECUENCIAS DE LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS

**Tabla 1:** Frecuencias observadas en el experimento control y experimento vacuna.

	Presencia de Espermatogénesis	Ausencia de Espermatogénesis
Experimento Control	4/4 = 1	0/4 = 0
Experimento Vacuna	4/4 = 1	0/4 = 0

La tabla muestra las frecuencias obtenidas en el experimento control y el experimento vacuna. Se obtiene un valor de 1 en la frecuencia debido a que en ambos experimentos los 4 individuos presentaron una espermatogénesis activa.

### ANEXO C: RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS

**Tabla 2:** Resultados obtenidos de las muestras testiculares de los especímenes del experimento control y el experimento vacuna.

	Presencia de Espermatogénesis	Ausencia de Espermatogénesis
Experimento Control	4	0
Experimento Vacuna	4	0

La tabla muestra que en el experimento control los 4 especímenes tienen una espermatogénesis activa al igual que los 4 especímenes del experimento vacuna. En ambos experimentos se obtiene un resultado de 0 especímenes con espermatogénesis inactiva.



### ANEXO D: ESPERMATOGÉNESIS ESPERADA VS ESPERMATOGÉNESIS OBTENIDA

**Tabla 3:** Espermatogénesis esperada vs Espermatogénesis obtenida en animales vacunados con la vacuna anti – LH (vacuna) y animales inoculados con adyuvante mas buffer (control).

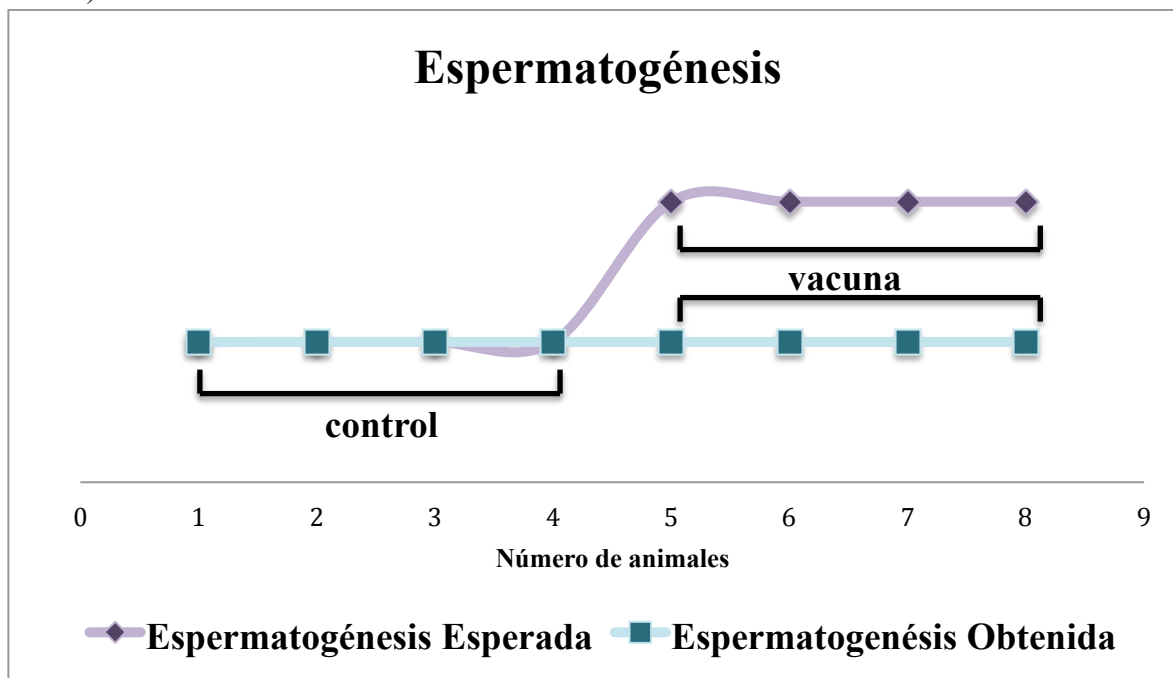
Número de animales	Espermatogénesis Esperada	Espermatogénesis Obtenida
1 (control)	1	1
2 (control)	1	1
3 (control)	1	1
4 (control)	1	1
5 (vacuna)	2	1
6 (vacuna)	2	1
7 (vacuna)	2	1
8 (vacuna)	2	1

<b>Espermatogénesis</b>	Positiva (presencia) = 1
	Negativa (ausencia) = 2

La tabla 3 muestra el total de animales de experimentación y el subgrupo al que pertenece cada individuo. En la tabla se encuentra la espermatogénesis esperada y la obtenida, cada individuo tiene un distinto número que representa lo siguiente: 1 presencia de espermatogénesis y 2 ausencia de espermatogénesis.

## ANEXO E: ESPERMATOGÉNESIS ESPERADA VS ESPERMATOGÉNESIS OBTENIDA

**Figura 2:** Espermatogénesis esperada vs Espermatogénesis obtenida en los experimentos del grupo vacuna (inoculación vacuna anti – LH) y del grupo control (inoculación adyuvante mas buffer).



La figura muestra la relación entre la espermatogénesis obtenida y la espermatogénesis esperada de los 8 individuos utilizados en los diferentes experimentos. El control con 4 individuos experimentales y vacuna con 4 individuos experimentales.