



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Doctorado en Biotecnología Molecular**

***DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN PROTOTIPO DE
HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE BOVINA DE SIMPLE
CADENA (bscFSH), PARA REPRODUCCIÓN ASISTIDA EN
RUMIANTES***

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de
Concepción para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular

POR: OSCAR IGNACIO CABEZAS ÁVILA

Profesor guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos

CONCEPCIÓN – CHILE
2023

DERECHO DE AUTOR

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor guía

Dr. Oliberto Sánchez Ramos
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión evaluadora

Dra. Raquel Montesinos Seguí
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ernesto Moreno Frias
Evaluador Externo
Universidad de Medellín

Directora del programa

Dra. Raquel Montesino Seguí
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dedicada a mis Padres e Hijos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Profesor Oliberto Sánchez Ramos, por su apoyo constante.

Al Centro de Biotecnología y Biomedicina, por su financiamiento en el desarrollo de esta tesis, especialmente quisiera agradecer a los investigadores Rita Cerro y Rodrigo Mancilla, por su colaboración y asistencia en el desarrollo de los ensayos de Laboratorio.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Foliculogénesis ovárica y ciclo estral	6
1.2.1 Reclutamiento.....	9
1.2.2 Selección	11
1.2.3 Dominancia.....	13
1.3. Naturaleza de la hormona folículo estimulante para superovulación	16
1.3.1 FSH de origen animal.	16
1.3.2 FSH recombinante.....	17
1.4. Regulación Nacional y Factores limitantes.....	20
2. HIPÓTESIS	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo general	24
3.2. Objetivos específicos	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Materiales.....	25
4.1.1 Fungibles	25
4.1.2 Animales de experimentación.....	25
4.1.3 Plásmidos	26
4.1.4 Líneas celulares.....	27
4.1.5 Kit comerciales	28
4.1.6 Medios y soluciones de cultivo celular	28
4.2 Métodos	29

4.2.1 Electroforesis en condiciones reductoras y Western blot.....	29
4.2.2 Determinación de bscFSH en medios de cultivo de células de mamíferos.....	30
4.2.2.1 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético/deoxicolato de sodio	30
4.2.2.2 Detección bscFSH por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida.....	31
4.2.3 Diseño hormona folículo estimulante bovina de simple cadena	32
4.2.4 Generación línea celular productora de vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL.....	32
4.2.5 Purificación de lentivirus	34
4.2.6 Generación de línea celular productora de bscFSH	34
4.2.6.1 Transducción con vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL	35
4.2.6.2 Sorteó celular.....	36
4.2.6.3 Escisión de la secuencia codificante de la GFP	37
4.2.6.4 Detección y cuantificación de la proteína bscFSH.....	37
4.2.6.5 Determinación productividad específica bscFSH.....	38
4.2.7 Definición de procedimiento para la producción de bscFSH	39
4.2.7.1 Adaptación del clon productor (CHO-bscFSH) a condiciones de cultivo en suspensión	39
4.2.7.2 Establecimiento bancos maestros y de trabajo del clon productor (CHO-bscFSH)	41
4.2.7.3 Establecimiento condiciones para el proceso inóculo/fermentación.....	43
4.2.7.4 Establecimiento proceso de purificación bscFSH	43
4.2.7.5 Implementación de formulación para la bscFSH.....	44
4.2.7.6 Determinación de pureza y esterilidad de la bscFSH purificada.	46
4.2.8 Caracterización de patrones de N-glicosilación de la molécula bscFSH.....	46
4.2.9 Determinación de la estabilidad de la formulación de bscFSH.....	50
4.2.10 Caracterización de los parámetros farmacocinéticos de bscFSH....	51

4.2.10.1 Implementación de formulación de bscFSH	51
4.2.10.2 Evaluación farmacocinética bscFSH.....	52
4.2.11 Establecimiento dosis y esquemas de administración en bovinos para ensayos de superovulación	55
4.2.11.1 Ensayo maduración folicular en especie de destino	55
4.2.12 Ensayo superovulación (SOV) en bovinos	56
4.2.12.1 Ensayo 1 SOV	56
4.2.12.2 Ensayo 2 de SOV	57
4.2.13 Ensayo de ajuste de dosis/frecuencia SOV	57
4.2.13.1 Ensayo 1 de ajuste de dosis/frecuencia SOV	58
4.2.13.2 Ensayo 2 de ajuste de dosis/frecuencia SOV	58
4.2.13.3 Ensayo 3 y 4 de reproducibilidad de SOV	59
4.2.14 Determinación perfil de seguridad de la formulación de bscFSH	59
4.2.15 Análisis estadístico	60
5. RESULTADOS.....	61
5.1. Diseño y expresión de la molécula de FSH bovina de simple cadena	61
5.2. Generación y evaluación de vector de expresión para la molécula bscFSH	64
5.3. Generación de línea celular productora de bscFSH.....	69
5.4. Adaptación clon productor (CHO-bscFSH) a condiciones de cultivo en suspensión.....	70
5.5. Establecimiento de condiciones de purificación de la molécula bscFSH	73
5.6. Caracterización de patrones de N-glicosilación de la molécula bscFSH.	75
5.7. Estudio de actividad <i>in vivo</i> de la bscFSH (Cebitropin B).....	76
5.8. Establecimiento de dosis y esquema de administración de bscFSH	80
5.8.1 Ensayo 1 de ajuste de dosis y esquema de administración	81
5.8.2 Ensayo 2 de ajuste de dosis y esquema de administración	83
5.8.3 Ensayo 3 y 4 para demostrar reproducibilidad.....	84
5.9. Determinación de la estabilidad de la formulación de bscFSH	86
5.10. Caracterización de parámetros farmacocinéticos de bscFSH.....	88

5.11. Determinación de perfil de seguridad de la formulación de bscFSH.....	93
6. DISCUSIÓN	97
6.1. Hormona FSH recombinante de simple cadena bovina (bscFSH).....	98
6.2. Cinética bscFSH y protocolos de superovulación	101
7. CONCLUSIONES	106
8. GLOSARIO	107
9. BIBLIOGRAFÍA	108
10. ANEXOS	116
10.1. Tabla suplementaria 1: Ensayo 1 de ajuste de dosis de bscFSH	116
10.2. Tabla suplementaria 2: Ensayo 2 de ajuste de dosis de bscFSH	117
10.3. Tabla suplementaria 3: Ensayo 3 de ajuste de dosis de bscFSH	116
10.4. Tabla suplementaria 4: Ensayo 4 de ajuste de dosis de bscFSH	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4-1. Gradiente de soluciones A y B utilizado para la separación de glicanos mediante HPLC en fase normal	48
Tabla 4-2. Gradiente de soluciones A y B utilizado para la separación de glicanos mediante HPLC en columna de intercambio aniónico.....	49
Tabla 5-1. Promedio de valores farmacocinéticos.....	91

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 4-1. Vector lentiviral con unidad transcripcional bicistriónica en orientación 5' a 3'	33
Figura 4-2. Esquema de inserción secuencial de transgenes asistida por fluorescencia para generar clon de bscFSH.....	35
Figura 5-1. Secuencia polipeptídica de la bscFSH.....	61
Figura 5-2. Diseño de la molécula de FSH bovina de simple cadena	63
Figura 5-3. Secuencia nucleotídica codificante optimizada para expresión en células CHO	64
Figura 5-4. Mapa de vector lentiviral bicistriónico que codifica para bscFSH....	65
Figura 5-5. Análisis de restricción vector pLCW-bscFSH-LGL.....	66
Figura 5-6. Evaluación cualitativa de transfección en línea celular	67
Figura 5-7. Detección de la proteína bscFSH mediante Western-blot.....	68
Figura 5-8. Generación línea celular CHO-bscFSH	70
Figura 5-9. Adaptación a suspensión de la línea celular CHO-bscFSH	71
Figura 5-10. Evaluación de la expresión de sbcFSH en cultivos en suspensión	72
Figura 5-11. Condiciones de purificación de bscFSH por IMAC	73
Figura 5-12. Análisis electroforético comparativo Folltropin/bscFSH y pureza cromatográfica de hormona recombinante.....	74
Figura 5-13. Análisis de N-glicanos de bscFSH	76
Figura 5-14. Respuesta folicular en bovinos sometidos a un esquema de superestimulación ovárica con 0,5 mg de bscFSH	78
Figura 5-15. Ensayo de eficiencia de ovulación en animales superovulados con 8 dosis de bscFSH	80
Figura 5-16. Ensayo comparativo entre bscFSH y Folltropin en esquema de 7 dosis.....	82
Figura 5-17. Desempeño de la bscFSH en ensayos de superovulación de solo 4 dosis.....	84
Figura 5-18. Desempeño de la bscFSH en esquema de superovulación de 4 dosis.....	85

Figura 5-19. Prototipo funcional Cebitropin B.....	86
Figura 5-20. Ensayo de estabilidad durante 6 meses a 4°C.....	87
Figura 5-21. Curvas de concentración plasmática de bscFSH (ng/mL)	89
Figura 5-22. Comparación de parámetros farmacocinéticos entre dos vías de administración de bscFSH.....	93
Figura 5-23. Parámetros fisiológicos individuales 48 h postratamiento de una dosis única de bscFSH en bovinos	95
Figura 5-24. Seguimiento ecográfico de estructuras ováricas en una vaca tratada con 500 µg de bscFSH por vía intramuscular, los días 1, 7 y 13 de protocolo estándar (Mindray DP60, transductor 5 MHz)	96

RESUMEN

La transferencia de embriones permite la diseminación de características genéticas desde animales de alto rendimiento hacia los rebaños bovinos de producción, tanto lecheros como de carne. Para su uso se implementan protocolos de superovulación, que actualmente, utilizan diversas glicoproteínas que no son especie específicas, siendo la hormona folículo estimulante (FSH) extraída de pituitaria de cerdo, la más utilizada actualmente. Sin embargo, esta FSH porcina tiene varias limitantes. Entre ellas, una vida media en circulación de 5 h, contaminación de hormona luteinizante y otras proteínas del extracto, se realizan 8 frecuencias de aplicación en 4 días, lo que precisa un mayor manejo animal y genera estrés, incidiendo significativamente en la respuesta ovárica y la obtención de embriones transferibles.

En este trabajo se diseñó y caracterizó una variante recombinante de cadena única, derivada de la hormona folículo estimulante bovina (bscFSH). Esta variante se diseñó considerando las secuencias aminoacídicas de las cadenas alfa y beta de la FSH nativa de *Bos taurus*, covalentemente unidas mediante un espaciador de 33 aminoácidos y conteniendo un total de 6 sitios potenciales de N-glicosilación, con estructuras altamente sialiladas. La hormona se produjo en un clon de células CHO genéticamente transformadas y se purificó en un único paso de cromatografía de afinidad, obteniéndose con un 97% de pureza. La bscFSH presentó un tiempo medio de residencia de 66,44 h y un tiempo de vida media en circulación de 44,16 h, administrada por vía intramuscular. Esto nos permitió desarrollar protocolos de superovulación en bovinos con la mitad de la frecuencia de aplicaciones (4 administraciones) utilizada actualmente con las FSH derivadas de pituitaria de cerdo, y obteniendo una mayor cantidad de embriones transferibles. La nueva hormona desarrollada induce una respuesta ovárica eficiente, permite un manejo más amigable, tiene un alto nivel de pureza y está libre de contaminantes animales, evitando posibles zoonosis, y disminuyendo la respuesta inmune y estrés animal.

ABSTRACT

Embryo transfer allows the dissemination of genetic characteristics from high-yielding animals to production cattle herds, both dairy and beef. For its use, superovulation protocols are implemented, which currently use various glycoproteins that are not specific, being the follicle-stimulating hormone (FSH) extracted from pig pituitary, the most currently used. However, this porcine FSH has several limitations. Among them, a circulating half-life of 5 h, contamination of luteinizing hormone and other extract proteins, 8 application frequencies are carried out in 4 days, which requires greater animal handling and generates stress, significantly influencing the ovarian response and the obtaining of transferable embryos.

In this work, a single-chain recombinant variant derived from bovine follicle-stimulating hormone (bscFSH) was developed and characterized. This variant was designed by considering the amino acid sequences of the alpha and beta chains of native *Bos taurus* FSH, covalently linked by a 33-amino acid spacer and containing a total of 6 potential N-glycosylation sites, with highly sialylated structures. The hormone was produced in a clone of genetically transformed CHO cells and was purified in a single affinity chromatography step, obtaining 97% purity. bscFSH had a mean residence time of 66.44 h and a circulating half-life of 44,16 h when administered intramuscularly. This allowed us to develop bovine superovulation protocols with half the frequency of applications (4 administrations) currently used with pig pituitary-derived FSH, and obtaining a greater number of transferable embryos. The newly developed hormone induces an efficient ovarian response, allows friendlier handling, has a high level of purity and is free of animal contaminants, avoiding possible zoonoses, and reducing the immune response and animal stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Para el desarrollo de programas de mejoramiento genético en la industria pecuaria estas últimas décadas, es cada vez más común el requerimiento de ovulaciones múltiples o superovulaciones (Mogollón Waltero and Burla Dias 2013), condición que asociada a la recolección de embriones son tecnologías que se han utilizado a su vez, para producir y preservar embriones de especies silvestres amenazadas (Bartlewski et al. 2016; Palomino et al. 2017), junto al uso de la transferencia de embriones interespecíficos para la conservación de especies en peligro de extinción (Vijayalakshmy, Manimegalai, and Verma 2018). Se denomina superovulación, al aumento del número fisiológico de ovulaciones propias de la especie, considerándose que la respuesta adecuada al tratamiento de superovulación en bovinos utilizando gonadotropinas, producen más de dos ovulaciones en el individuo, teniendo como base que la especie es monoovular y por ende, imposibilita la obtención de varios descendientes de manera natural en un corto período, a partir de una hembra genéticamente superior (Mogollón Waltero and Burla Dias 2013). Los esfuerzos para mejorar la técnica de transferencia de embriones durante los últimos 50 años, tendiente al mejoramiento genético en sistemas productivos bovinos, dieron como resultado avances en otras tecnologías que incluían: métodos de sincronización del estro, superovulación , equipos de recuperación y transferencia de embriones no quirúrgicos, medios de cultivo, evaluación de embriones y criopreservación

(Hasler 2014; Smith, Geisert, and Parrish 2018). Para el uso de esta tecnología reproductiva de superovulación, existe una diversidad de hormonas y protocolos disponibles, entre las que se consideran gonadotropina coriónica equina (eCG), hormona del crecimiento bovina (bST), HMG (gonadotropina menopáusica humana) y hormona folículo estimulante (FSH) tanto de origen recombinante como de pituitaria (Aerts and Bols 2010; Kulus et al. 2019; Lucy 2007; Smith, Geisert, and Parrish 2018). Esta diversidad de hormonas disponibles en el mercado y protocolos desarrollados por los investigadores estas últimas décadas, han orientado los esfuerzos a mejorar la eficacia de las respuestas de superovulación y a la búsqueda de protocolos que requieran menor manejo de los animales donantes para disminuir el stress (Tríbulo et al. 2012) sin comprometer el rendimiento de embriones de alta calidad y condición de ser transferibles a hembras receptoras (Carvalho et al. 2014; Genzebu 2015; Kimura et al. 2007; Looney and Pryor 2012), siendo el costo de las hormonas para sincronizar y superovular uno de los problemas que enfrenta esta biotecnología de transferencia de embriones, además del gran interés de evaluar la disminución de ingresos a corral durante el proceso (Mogollòn Waltero and Burla Dias 2013; Tribulo et al. 2012; Vijayalakshmy, Manimegalai, and Verma 2018).

La hormona más utilizada en programas de transferencia de embriones bovinos es la FSH-p, cuyo tratamiento es realizado con dos dosis diarias durante cuatro días (Demoustier et al. 1988), comenzando los días 8 a 12 del ciclo estral (Mogollòn Waltero and Burla Dias 2013). Los protocolos más comunes utilizan

entre 6 a 8 aplicaciones de FSH cada 12 h (Bó Gabriel, Mapletoft 2020; Demoustier et al. 1988), con la finalidad de obtener que varios folículos se desarrollen y pueda ocurrir una ovulación múltiple, lo cual permitirá una mayor colecta de embriones (Fonseca et al. 2001). Esta condición se logra al rescatar folículos subordinados de la regresión al alcanzar un estado dominante (Lopez, Sartori, and Wiltbank 2005; Mapletoft et al. 2015). Se han seguido varios enfoques por parte de los investigadores, para disminuir el número de tratamientos de FSH requeridos para superovular a las donantes con resultados interesantes pero variados, utilizando FSH derivadas de pituitaria (Carvalho et al. 2014), que considera inyecciones subcutáneas una vez al día, administración subcutánea con gel de gelatina, inyecciones intramusculares únicas disueltas en polivinilpirrolidona, disuelta en hialuronano o diluida en gel de hidróxido (Bó Gabriel, Mapletoft 2020; KIMURA 2016; Kimura et al. 2007; Tríbulo et al. 2011). Como la FSH utilizada en los tratamientos de superovulación proviene de hipófisis de animales, estos pueden estar contaminados con trazas de otras hormonas lo que lleva a variaciones de calidad y cantidad de ovocitos, determinándose que productos de FSH con niveles bajos de LH mejoran las tasas de ovulación y fertilización (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022). Adicionalmente, al provenir de cerdos faenados en matadero, existen una serie de limitantes de certificación de los procesos de producción entre los que se destacan: riesgos de contaminación de patógenos, variaciones importantes entre lotes de los ingredientes activos, contaminación con otras hormonas que interfieren en

diversos grados los procesos de fertilización asistida (Biancucci et al. 2016; Genzebu 2015). Estas condiciones han derivado en varios estudios que han utilizado FSH recombinantes específicas para inducir la sobreestimulación de los folículos en vaquillas y vacas maduras con tratamientos múltiples por 3 a 6 días con resultados interesantes (Biancucci et al. 2016; Tríbulo et al. 2011) y prometedores resultados con FSH recombinantes de larga acción (Carvalho et al. 2014), que evitarían una respuesta inmune humoral a tratamientos repetidos como la que genera la gonadotropina coriónica equina (Baruselli et al. 2011; Bó et al. 2006), o por sobreestimulación de donantes por FSH en una especie diferente (Magarey et al. 2003). El uso de FSH recombinante bovina, expresada en un sinnúmero de sistemas como bacterias, levaduras, plantas, insectos, células mamíferas o glándula mamaria, es una alternativa económicamente viable, segura y eficiente para cubrir las necesidades de productos biofarmacéuticos para programas de superovulación bovina (Bautista Vega et al. 2019), verificándose que la construcción de FSH recombinante, reduce las variaciones observadas en los diferentes tipos de FSH derivados de glándula pituitaria, evitando a su vez los posibles riesgos de inmunogenicidad, lo que resulta en un producto de mayor pureza y menor variabilidad con respecto a las hormonas extraídas de pituitaria (Hesser, Morris, and Gibbons 2011; KIMURA 2016; De Rensis and Peters 1999; Smith, Geisert, and Parrish 2018)

La FSH como otras hormonas glicoproteicas, consiste en dos cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente, constituidas por las subunidades α y β (Bautista Vega et al. 2019; Hesser, Morris, and Gibbons 2011; Mullen, Dara, and Mark 2013), la configuración de cada subunidad se estabiliza mediante varios puentes disulfuro intracadena (Adams and Boime 2008). La subunidad α es codificada por un solo gen y es idéntica en todas las gonadotropinas de una especie particular al ser altamente conservada (Hesser, Morris, and Gibbons 2011), siendo la especificación biológica de estas hormonas asociada a la subunidad β , lo cual dependiendo del tipo de gonadotropina está codificado por un gen diferente FSH β , LH β o CGB (Adams and Boime 2008; Cahoreau, Klett, and Combarrous 2015; Haj Hassan et al. 2015; Ulloa-Aguirre et al. 2018). La subunidad α está constituida por 5 puentes disulfuro intracatenarios, la subunidad β presenta 6 puentes disulfuro y 12 residuos de cisteína. Ambas subunidades presentan modificaciones post-traduccionales de glicosilación de tipo N-glicosilación y O-glicosilación, siendo las predominantes del tipo N en las subunidades alfa y beta del tipo Asn-Xaa-Thr, en posición N56 y N82 para la subunidad alfa y para la beta en N7 y N24 (Bautista Vega et al. 2019; Mullen, Dara, and Mark 2013; Oktem and Urman 2010), lo cual difiere a lo descrito por Hesser et al, que definen dos potenciales sitios de N-glicosilación en la subunidad beta en N13 y N30 (Hesser, Morris, and Gibbons 2011). La falta de glicosilación de esta hormona, con exposición de galactosa, aumenta el aclaramiento del plasma mediada por endocitosis de los hepatocitos, asociado a

los receptores de asialoglicoproteínas, determinante en el nivel de residuos de galactosa para conocer la vida media de FSH (Bautista Vega et al. 2019), donde la FSH ácida presenta una bioactividad 20 veces superior a la FSH básica *in vivo*, lo cual se contrapone con la unión al receptor y bioactividad *in vitro*, donde la FSH menos sialilada tiene mayor actividad (Ulloa-Aguirre et al. 2018).

1.2. Foliculogénesis ovárica y ciclo estral

Los factores autocrinos, paracrinos, yuxtacrinos y endocrinos son esenciales para la foliculogénesis ovárica (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009), iniciándose con la formación del folículo primordial durante la meiosis, donde los ovocitos son rodeados por células somáticas aplanadas que se definen como células de la pre granulosa, siendo la reserva ovárica de los mamíferos determinada por el número de folículos primordiales en el ovario (Oktem and Urman 2010). La transición desde folículos primordiales quiescentes a primarios, comienza en la vida fetal y continúa después del parto hasta que se agota la reserva ovárica, no requiriendo de FSH para esta transición, ya que los folículos primordiales no expresan receptores de FSH (O'Brien, Pendola, and Eppig 2003; Oktem and Urman 2010; Pepling 2006), siendo una incógnita durante décadas, los fenómenos que desencadenan el inicio del crecimiento de los folículos primordiales. Sin embargo, se ha demostrado que los folículos primordiales se mantienen en estado latente por las acciones de diversas moléculas inhibitoras para la preservación del conjunto de folículos (Oktem and Urman 2010; Skinner

2005). En bovinos, el crecimiento folicular se inicia entre los 90 a 140 días de gestación, en los ovarios de las terneras fetales, pero al nacer la cantidad de folículos antrales sigue siendo baja y no excede el diámetro de 1 mm (Tanaka et al. 2001; Yang and Fortune 2008). Los folículos primarios permanecen en una fase inactiva, hasta ser reclutados en la etapa primaria para el crecimiento hasta llegar a la fase antral, se activan para crecimiento y pasan por las etapas de desarrollo con una comunicación multidireccional orquestada entre los ovocitos y las células somáticas (células de la granulosa y tecales), y ciertos componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, que actúan de manera autocrina y paracrina desempeñando funciones en esta transición y posterior crecimiento de los folículos (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Oktem and Urman 2010; Skinner 2005). Algunos de estos factores juegan un papel crítico en el proceso de selección del folículo dominante, modificando la respuesta de los folículos a las gonadotropinas e inhibiendo la luteinización prematura (Oktem and Urman 2010), siendo la comunicación cruzada ovárica entre los ovocitos y las células somáticas más evidente a partir de la formación de folículos primordiales en adelante, que se evidencia histológicamente en esta transición de folículo primordial a primario, por el cambio morfológico de las células de la granulosa desde escamosas a cuboidales (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009). Los factores producidos localmente que promueven la transición de folículo primordial a primario incluyen factores de crecimiento como el kit ligando (KL), el factor inhibidor de leucemia (LIF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), el

factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Skinner 2005). Se ha demostrado que la utilización de Kit ligando en ovarios de ratas neonatales, acelera la transición del folículo primordial al primario, lo que resulta en un mayor número de folículos en crecimiento (Nilsson, Parrott, and Skinner 2001), al fosforilar e inactivar las proteínas FOXO3, que es un inhibidor de la activación del folículo primario (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009).

El ciclo estral en bovinos tiene una duración de 18 a 24 días con un promedio de 21 días (Aerts and Bols 2010; Deguettes et al. 2020), con dos fases, la luteal de 14 a 18 días y la folicular de 4 a 6 días (Bautista Vega et al. 2019; Smith, Geisert, and Parrish 2018). La glándula pituitaria produce FSH y LH que migran a través del torrente sanguíneo actuando sobre los ovarios, en respuesta se observa maduración de varios folículos inmaduros seguida de producción de estradiol que muestra retroalimentación positiva en la glándula pituitaria, se produce aumento repentino de LH y la maduración de un solo folículo dominante (Bartlewski et al. 2016; Deguettes et al. 2020; Franco, J. y Uribe 2012) . Normalmente en bovinos hay 2 o 3 ondas foliculares por ciclo, comenzando con el reclutamiento de una cohorte de pequeños folículos antrales, seguido de la selección de un folículo dominante que se vuelve atrésico u ovula (Filipiak, Viqueira, and Bielli 2016; Smith, Geisert, and Parrish 2018), siendo el tiempo de desarrollo del folículo primordial a ovulatorio de aproximadamente 180 días, con un crecimiento desde la etapa antral a ovulatoria temprana de 42 días, por lo que

la mayor parte del tiempo de desarrollo se determina en las etapas preantrales (Aerts and Bols 2010).

1.2.1. Reclutamiento

La fase de reclutamiento de folículos se subdivide en dos amplias categorías: activación inicial de folículos primordiales que ocurre durante toda la vida y, después de la pubertad el reclutamiento cíclico de un número limitado de pequeños folículos de la cohorte en crecimiento, de los cuales se selecciona un subconjunto para dominación y ovulación (McGee and Hsueh 2000). Cuando las células de la granulosa comienzan a proliferar, el ovocito es rodeado por más de una capa de estas células, desarrollándose un folículo secundario (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Oktem and Urman 2010), caracterizándose la foliculogénesis preantral, además de la proliferación de las células de la granulosa por la adquisición de una capa adicional, la teca (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009), siendo el crecimiento independiente de las gonadotropinas y regulado por factores autocrinos y paracrinos (Hunter et al. 2004), jugando un papel relevante el ovocito en la direccionalidad de la foliculogénesis. Una vez iniciado el desarrollo folicular de las etapas primaria y secundaria, el ovocito crece aceleradamente y las células de la granulosa proliferan para formar múltiples capas y adquieren características funcionales como la expresión de enzimas esteroideogénicas y el receptor de LH (LHR), siendo una diferencia distintiva de los folículos secundarios el contar con una capa celular tecal, que

se define como la capa más externa del folículo (Wu et al. 2004). Estas células tecales producen una serie de factores que actúan localmente para regular la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa adyacentes, en respuesta a LH, estas células tecales secretan andrógenos, que sirven de sustrato para la secreción de estrógenos por parte de las células de la granulosa (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009), careciendo las células tecales de aromatasas (CYP19A1) necesaria para convertir los andrógenos en estradiol, por lo que difunde la androstenediona por la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde en respuesta a la estimulación de FSH, regulan el alza de aromatasas y 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, que convierten la androstenediona en estradiol (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Magoffin 2005). Las células de la capa interna de la teca, que se forma fuera de la membrana basal que rodea las células de la granulosa, presentan su función principal como fuente de andrógenos para que las células vecinas de la granulosa, la conviertan en estrógenos (Magoffin 2005), mientras la teca externa es importante para la ovulación al estar compuesta por fibroblastos, células musculares lisas y macrófagos (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Magoffin 2005). El crecimiento y la maduración de los ovocitos, se coordinan con la proliferación y diferenciación de células granulares y tecales, donde las gonadotropinas derivadas de la hipófisis controlan parcialmente el proceso, siendo los factores paracrinos y autocrinos derivados del ovocito y células somáticas circundantes encargadas de regular principalmente la foliculogénesis

temprana, siendo muchos de estos factores miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento transformante (TGF), donde destaca la acción de la inhibina en la proliferación celular (Wu et al. 2004), las proteínas morfogénicas óseas, sus receptores y el factor de diferenciación de crecimiento 9, el factor de crecimiento de fibroblatos básicos y los factores de crecimiento epidérmico (Knight and Glistler 2006; Lucy 2007).

Las células de la granulosa de los folículos antrales, son la principal fuente de producción de estradiol, pero carecen de la enzima para producir androstenodiona que está contenida en la teca interna. La expresión de cada una de las enzimas está controlada por las gonadotropinas hipofisarias, las células de la teca responden a la estimulación de LH con la expresión de enzimas esteroidogénicas y las células de la granulosa responden a la FSH, regulando el alza de la 17-hidroxesteroide deshidrogenasa (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Magoffin 2005; Oktem and Urman 2010). En consecuencia, la FSH es la principal responsable del reclutamiento de una nueva cohorte de folículos antrales para una próxima onda de crecimiento (Aerts and Bols 2010; García Guerra et al. 2015).

1.2.2. Selección

La transición del folículo preantral a antral, marca un cambio de la regulación principalmente intraovárica a extraovárica de la foliculogénesis, a medida que el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal comienza a funcionar (Kumar et al. 1997),

generando cambios en el folículo durante la formación del antro, donde múltiples espacios llenos de líquido se unen para formar una sola cavidad antral, separando dos poblaciones celulares funcionalmente distintas (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009). Las células de la granulosa mural, recubre la pared del folículo y son críticas para la esteroidogénesis y la ovulación, mientras las células del cúmulo rodean el ovocito promoviendo su crecimiento y competencia para el desarrollo (Diaz, Wigglesworth, and Eppig 2007). Aunque los folículos preantrales responden a la FSH, durante la foliculogénesis antral se vuelve esencial, no sólo para prevenir la apoptosis de las células de la granulosa y la atresia folicular, si no que para la proliferación de las células de granulosa, la producción de estradiol y la expresión del receptor de LH (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009), siendo las gonadotropinas pituitarias FSH y LH, quienes coordinan el desarrollo y ovulación del folículo antral. El aumento en las concentraciones sanguíneas de FSH, conduce a los folículos dependientes de FSH de 4 a 5 mm de tamaño (Lucy 2007), en clases más grandes de folículos que promueven la síntesis de estradiol, los cuales se someten al proceso de selección (Garverick et al. 2002). Los folículos que presentan un diámetro inferior a 3 mm, no supresores de la secreción de FSH, adquieren la capacidad de suprimir esta gonadotropina cuando el folículo alcanza un diámetro de 5 mm (Aerts and Bols 2010). Mientras que los folículos que participan en el reclutamiento dependen de la FSH, el folículo dominante que surge del grupo reclutado adquiere receptores de LH en las células de la granulosa y la teca y se

vuelve dependiente de la LH (Lucy 2007), siendo diferente entre especies la expresión de receptores cuando cambia la dependencia de FSH a LH, donde en el cerdo los receptores de FSH se pierden en la capa de granulosa, situación que no ocurre en la vaca (Liu et al. 2000). Todos los folículos que alcanzan el estadio antral están destinados a sufrir atresia (Oktem and Urman 2010), sin embargo, por la acción protectora de la FSH circulante, un pequeño número de folículos antrales es rescatado cíclicamente, de los cuales sólo uno será el dominante y será destinado a ovulación, el cual es conocido como folículo preovulatorio o de Graaf (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Oktem and Urman 2010). Las hembras de animales de granja son menos fecundas con tasas relativamente bajas de ovulación; esta tasa de ovulación está estrechamente vinculada a la capacidad numérica de la madre para gestar y cuidar sus crías, lo que fisiológicamente está coordinado con el folículo dominante (Lucy 2007).

1.2.3. Dominancia

El cambio de la dependencia de FSH a LH, es determinado como el evento fundamental para el desarrollo del folículo dominante (Xu et al. 1995), siendo la adquisición de receptores de LH en las células de la granulosa una condición crítica para el establecimiento y mantenimiento del dominio folicular, mientras que los receptores de FSH solo pueden desempeñar un papel permisivo (Lucy 2007). Según el modelo Missouri, un folículo que adquirió receptores de LH antes que los otros folículos, podría en teoría, limitar a todos los folículos de

gonadotropinas al inhibir selectivamente la FSH sin inhibir la LH (Pawson and McNeilly 2005). Esta inhibición selectiva de la FSH se logra a través de las vías reguladoras independientes dentro del hipotálamo y la hipófisis que controlan la FSH y la LH, donde la FSH es inhibida por el estradiol y la inhibina mientras que la secreción de LH no lo es (Lucy 2007; Pawson and McNeilly 2005). Una vez que el folículo dominante se vuelve dependiente de LH, su destino es la atresia o la ovulación; si este folículo dominante no está expuesto al aumento de LH, sobrevivirá por un corto período antes de volverse atrésico (Valdez, Cuneo, and Turzillo 2005). Estas hormonas extracelulares actúan uniéndose a receptores específicos y activando múltiples vías de señalización para promover el crecimiento del folículo dominante o suprimiendo, lo cual provoca la regresión de los folículos subordinados (Forde et al. 2008). En bovinos la primera onda de crecimiento del ciclo aparece el día de la ovulación, en un patrón de dos ondas, la siguiente ola ocurre en los días 9 a 10 del ciclo; en un patrón de tres ondas, las siguientes ondas ocurren los días 8-9 y día 15-16 (De Rensis and Peters 1999). En las vacas que presentan dos ondas foliculares, el segundo folículo dominante es el que ovula, mientras que en las vacas con un patrón de tres ondas, el tercer folículo dominante es ovulatorio (Aerts and Bols 2010). Cuando el folículo más grande de onda alcanza un diámetro promedio de 8,5 mm, aproximadamente a los tres días de crecimiento, se produce una diferenciación entre el futuro folículo dominante y los folículos subordinados (Aerts and Bols 2010). En el folículo preovulatorio una mayor respuesta a la FSH, genera un

aumento en la expresión de los receptores a FSH y LH, generando que este folículo produzca altos niveles de estrógenos e inhibina, que condicionan la liberación de la FSH en la hipófisis, afectando la repuesta de los folículos restantes a la acción de la FSH al ser privados de la estimulación adecuada para la supervivencia (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Lucy 2007). Esta señalización de la FSH y LH la desarrolla a través de sus respectivos receptores, para aumentar el AMPc y la activación de la proteína kinasa A, que promueven el crecimiento y la proliferación celular (J. A. S. Richards et al. 1998; J. S. Richards et al. 1995). Asociadamente en las células de la granulosa mural del folículo dominante, se expresan receptores a LH en altas concentraciones, que provoca una respuesta al pico preovulatorio de la LH originado por el aumento de la producción de estradiol (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; Lucy 2007; Smith, Geisert, and Parrish 2018), que desencadena una serie de eventos que terminan en la ovulación, entre los que se cuentan: expansión del cúmulo y ruptura folicular para la liberación del ovocito competente para ser fertilizado, desarrollo de la meiosis hasta la metafase II y las células de la granulosa y la teca se transforman en el cuerpo lúteo (Edson, Nagaraja, and Matzuk 2009; McGee and Hsueh 2000).

1.3. Naturaleza de la hormona folículo estimulante para superovulación

1.3.1 FSH de origen animal

La naturaleza heterogénea de las preparaciones de gonadotropinas derivadas de tejidos, produce una variación significativa entre lotes con respecto a pureza y biopotencia (Kanitz et al. 2003), pudiendo limitar el uso repetitivo de estas preparaciones de gonadotropinas exógenas de origen equino o porcino, la inducción de una respuesta inmune en ovejas y vacas (Drion et al. 2001). Asociadamente, la corta vida media de las preparaciones de FSH derivadas de tejidos, requiere una administración continua, aumentando la manipulación de animales (Kanitz et al. 2003; Tríbulo et al. 2011). Esto ha derivado en que las estrategias de los investigadores migre hacia la definición de dosis y tiempos de administración que determinen una menor manipulación, reduciendo el estrés de las donantes y el riesgo de lesiones tanto para el ganado como el personal (Hasler 2014). Dentro de estas formulaciones de FSH derivada de tejidos, se está cambiando el diluyente de la solución salina estándar a hialuronano, que ha determinado resultados similares en la producción de embriones con 2 aplicaciones en comparación al protocolo de 8 aplicaciones (Tríbulo et al. 2011), o la administración a una sola dosis intramuscular de FSH convencional en gel de hidróxido de aluminio, que induce el crecimiento de múltiples folículos, la ovulación y la producción de múltiples embriones, pero genera induraciones en el sitio de administración, lo que ha derivado en la actualidad a aplicaciones

subcutáneas con resultados efectivos (KIMURA 2016) .Otra alternativa de uso de FSH con agentes que retardan su liberación, es mezclarla con polivinilpirrolidona (PVP), que disminuye su liberación y mantiene concentraciones en sangre para inducir múltiples folículos, siendo complejo disolver homogéneamente por la alta viscosidad de PVP (Kimura et al. 2007).

1.3.2. FSH recombinante

La estrategia empleada para la producción y utilización de FSH recombinante, se asocia a la utilización de la tecnología de ADN, basada en la pureza, potencia y naturaleza libre de patógenos de las gonadotropinas recombinantes (Adams and Boime 2008), direccionando los esfuerzos para modificar las subunidades y mejorar la vida media, considerándose entre estas el diseño de hasta cuatro sitios de consenso de glicosilación unidos a sitios N adicionales en la subunidad alfa, fusionada con beta, lo cual permite generar un mayor tiempo de retención *in vivo*, con la consecuente disminución del número de dosis requeridas para superovulación (Trousdale et al. 2009). También se ha logrado un mayor tiempo de retención al agregar una sección de ADN que codifica una proteína altamente glicosilada en el extremo C terminal, siendo el hCG el más común en humanos, incrementando entre 4 a 10 veces la vida media biológica (Fauser et al. 2009), con maduración folicular 50 h después de la dosis inicial, lo cual es comparable a cuatro inyecciones de hFSH derivada de la hipófisis con administración cada 12 h. La adición de ácido siálico, aumenta la vida media debido a la naturaleza

hidrofílica de la molécula, permitiendo mayor solubilidad (Hesser, Morris, and Gibbons 2011). Otra línea de desarrollo es la construcción de gonadotropinas de doble actividad, esto se ha logrado incorporando diferentes subunidades beta, que permite una respuesta biológica al activar ambos receptores (Adams and Boime 2008).

Hoy en día, existen variados sistemas de expresión para la producción en gran escala de proteínas recombinantes, entre las que se cuentan: expresión en bacterias *E.coli*, células de insectos mediadas por baculovirus que es un sistema de expresión versátil, levaduras y varios sistemas en mamíferos (Gómez-Sebastián, López-Vidal, and Escribano 2014; Khan et al. 2015). Los sistemas de expresión que utilizan células de mamíferos tienen una capacidad superior de producción de proteínas biológicamente activas y de bajo costo (Ha et al. 2022; Jayapal et al. 2007; Reinhart et al. 2015), que además son complejas como la FSH por las modificaciones post-traduccionales con varios sitios de N-glicosilación, necesarios para su bioactividad, que incrementa la solubilidad y estabilidad (Hesser, Morris, and Gibbons 2011). Las células de ovario de Hamster Chino han sido escogidas preferentemente para producir FSH recombinante a niveles comerciales, debido a que esta hormona requiere de modificaciones post-traduccionales (Bautista Vega et al. 2019).

Un requisito para la producción de proteínas terapéuticas en el cultivo celular industrial es que la línea celular productora es clonal, es decir, derivada de una

sola célula (Barnes, Moy, and Dickson 2006). A pesar de los rendimientos más bajos, siguen siendo el sistema de elección debido a su similitud con respecto a la modificación post-traducciona l y los patrones de glicosilación, que no pueden reproducirse adecuadamente en sistemas alternativos (Browne and Al-Rubeai 2007; Tavira et al. 2009) realizando mejoras significativas en los rendimientos del producto a través de la optimización de las condiciones de cultivo y formulaciones de medios, sistemas de expresión mejorados y una comprensión más amplia del metabolismo celular y los procesos que permiten que las células crezcan a densidades más altas durante períodos prolongados (Browne and Al-Rubeai 2007). Dentro de las líneas celulares, las células CHO se mantienen como la línea celular de mamíferos preferida para la producción de proteínas terapéuticas, debido a su capacidad de adaptarse y crecer en cultivo en suspensión, lo cual es ideal para el cultivo a gran escala en la industria (Lai, Yang, and Ng 2013). En las líneas celulares recombinantes, la estabilidad de la expresión de la proteína es dependiente del sitio de integración del ADN heterólogo en el genoma de la célula huésped (Browne and Al-Rubeai 2007), siendo necesario que las líneas celulares candidatas deben ser monitoreadas durante varios meses, en ausencia de un método de selección para evaluar la estabilidad de la producción de proteínas, considerando que el proceso clásico de generación de clones estables puede durar hasta 12 meses (Wurm 2004). Esta limitante ha derivado a la utilización de vectores lentivirales (LVs) derivados del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-I), para la aplicación de

terapia génica y transgénesis animal, por sus eficientes niveles de transducción en células tanto quiescentes como en división (Wiznerowicz and Trono 2005), tendiendo a integrarse en regiones transcripcionalmente activas de la cromatina (Bushman et al. 2005), siendo esperable que la transferencia de genes de interés rinda niveles de expresión del transgen más altos y más estables que los métodos de transferencia de ADN no viral. Otra estrategia es la inserción secuencial de transgenes para generar clones estables, mediante la transducción de células HEK- 293 con vectores lentivirales, aumentando los niveles de expresión de las líneas celulares transformadas (Bravo et al. 2020).

1.4. Regulación Nacional y Factores Limitantes

Actualmente a nivel Nacional, no existe vigencia de registro comercial en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de hormonas FSH derivadas de pituitaria de cerdo, destinadas a programas de superovulación. Esta condición se asocia a que la hormona proviene de extractos de glándula pituitaria de origen animal obtenidas en faenadora. Estos lotes comerciales no tienen acreditada la certificación de bioseguridad de enfermedades erradicadas a nivel nacional, lo que afecta los programas de mejoramiento genético que utilizan la biotecnología de transferencia de embriones. Otro problema que se asocia al uso de estas hormonas es la frecuencia de administración, que es elevada y que genera stress en los animales, abocándose estos últimos años diversos investigadores, a la búsqueda de métodos de liberación lenta de las hormonas disponibles en

mercado (Biancucci et al. 2016; Bó Gabriel, Mapletoft 2020) o el desarrollo de nuevas hormonas recombinantes con mayor vida media y especie específicas, para disminuir la frecuencia y las respuestas inmunes (Tríbulo et al. 2011), que influye directamente en la obtención de embriones transferibles genéticamente superiores (Smith, Geisert, and Parrish 2018).

Estas limitaciones asociadas a hormonas folículo estimulantes derivadas de tejidos, y hecho de no contar en el mercado nacional con alternativas de hormonas recombinantes, han derivado en la necesidad de explorar el desarrollo de nuevas variantes de FSH. En un escenario ideal, estas nuevas variantes deben cumplir con los siguientes requisitos:

- [1] Deben ser de origen bovino, a fin de evitar respuestas inmunes indeseada cuando se administran en bovinos.
- [2] Deben poseer una estructura de simple cadena. O sea, las subunidades alfa y beta deben estar unidas covalentemente a fin de impedir una eventual disociación de las cadenas.
- [3] Debe incorporar sitios adicionales de N-glicosilación. Esto con el propósito de aumentar el tamaño de la molécula e incrementar así el tiempo vida media en circulación. De esta forma se podría considerar una reducción en el número de administraciones de la hormona durante un esquema de superovulación, lo que se traduce en una disminución en el manejo de las donantes, con la consecuente reducción del stress animal.

[4] Se debe producir por vía recombinante en cultivos celulares, y en medios libre de proteínas animales. De esta forma se reduce el riesgo de contaminantes patógenos, y se anula la posibilidad de contaminación de la glicoproteína LH. Esto permitirá disminuir las restricciones regulatorias de uso en programas de mejoramiento, y teóricamente incrementaría la respuesta ovárica de embriones transferibles.

Con estos antecedentes, el presente proyecto de tesis se propone, desarrollar una variante de simple cadena de FSH bovina que será producida por vía recombinante.

2. HIPÓTESIS

La Hormona Folículo Estimulante bovina de simple cadena (bscFSH), producida por vía recombinante es activa, estable, segura y permite inducir superovulación en rumiantes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar y caracterizar un prototipo de Hormona Folículo Estimulante bovina de simple cadena (bscFSH), para reproducción asistida en rumiantes.

3.2. Objetivos específicos

1. Diseñar, expresar, purificar y formular Hormona Folículo Estimulante bovina de simple cadena (bscFSH).
2. Caracterizar la molécula bscFSH producida por vía recombinante.
3. Establecer dosis y esquema de administración de la bscFSH, para realizar ensayo de superovulación en bovino.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Fungibles

- Micropipetas p1000, p200, p20, p10 (Corning®).
- Puntas plásticas estériles de volumen 1000, 200, 20 y 10 μ L (Corning®).
- Pipetas serológicas de poliestireno desechables estériles con 10 mL (Corning®).
- Cámara de Neubauer (Blaubrand®).
- Tubos cónicos de poliestireno desechables estériles de 15 mL (Falcon™).
- Criotubos de 2 mL (Corning®).
- Recipiente de congelación Mr. Frosty™.
- Cajas para viales, Matraces Erlenmeyer de cultivo con tapa rosca de 250 mL, 500 mL y 1000 mL, estériles (Glassco).
- Equipo contador de células automático TC20™ Bio-rad.
- Frascos para centrifuga de PPCO con tapón de sellado de 500 mL, Nalgene™.
- Cassette Minimate™, TFF Capsule 10K.
- Filtros de cápsula estéril con membrana PDVF de 0,22 μ m (Durapore®).

4.1.2. Animales de experimentación

- 10 machos bovinos mestizos de características lecheras, 9 meses de edad y 250 \pm 5 kilogramos de peso.
- 22 hembras bovinas mestizas de características cárnicas, de 18 meses y 4 años, con rango de peso de 300 a 450 \pm 15 kilogramos de peso.

Los protocolos de supervisión y de muestreo se ajustaron a la certificación del comité de bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias (CBE-14-2021).

4.1.3. Plásmidos

- pLCW-LGL: Plásmido desarrollado por el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad de Concepción). Es un vector de transferencia lentiviral, que se caracteriza por contener un promotor inmediato temprano de citomegalovirus (CMW), precedido de un sitio múltiple de clonaje (MCS) para inserción de él (los) transgén (es) de interés.

- pLP1: Plásmido helper (ayudante) para la producción de vectores lentivirales en células de mamíferos (sistema producción lentiviral ViraPower™). Contiene las secuencias codificantes de los genes Gag y Pol del VIH (virus inmunodeficiencia humana), determinantes de las proteínas estructurales de las partículas lentivirales y de las enzimas para replicación e integración, respectivamente.

- pLP2: Plásmido ayudante para mediar la producción de vectores lentivirales en células de mamíferos (sistema producción lentiviral ViraPower™). Presenta la secuencia que codifica para la proteína REV (*regulator of virion*) del virus de la inmunodeficiencia humana, permitiendo la exportación de fragmentos del ARNm desde el núcleo a citoplasma.

- pLP/VSVG: Plásmido ayudante para producción de vectores lentivirales (sistema producción lentiviral ViraPower™). Contiene el gen que codifica para la proteína G del virus de estomatitis vesicular, que permite el anclaje celular (Castellanos and Hurtado 2001) y producción de retrovirus en una amplia variedad de hospederos.
- pAEC-CRE: Vector de expresión desarrollado por el Laboratorio de Biofármacos Recombinantes, Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad de Concepción). Este vector contiene el gen de Recombinasa CRE bajo el control de un promotor de citomegalovirus.

4.1.4. Líneas celulares

- HEK-293FT (Life Technologies, act. R700-07): Estas células son una variante de crecimiento rápido de HEK293T, adaptada para la producción de partículas lentivirales. Expresan de manera constitutiva y de alto nivel el antígeno T grande de SV40 pCMVSPORT6TA_g, controlada por el promotor de citomegalovirus humano (Yuan et al. 2018).
- CHO ECACC 85050302 (MERCK): Sub-clon de la línea celular parental CHO (*Chinese hamster ovary*), originada por Puck (1957). Las células se caracterizan por tener un requerimiento absoluto de L-prolina.

4.1.5. Kit comercial

- Human FSH ELISA Kit (Invitrogen): inmunoensayo enzimático para la detección con anticuerpo primario anti-cadena beta de la glicoproteína humana.
- Bovine FSH ELISA Kit (LifeSpan BioSciences, inc): ELISA competitivo para la detección cuantitativa de FSH bovina en muestras de plasma o suero. Rango de detección entre 1 a 240 ng/mL.
- PNGasa F (Promega, USA): es una glicosidasa recombinante que cataliza la escisión de los oligosacáridos N enlazados, generando un oligosacárido y un péptido libre de carbohidratos.
- Neuroaminidasa (sialidasa, MERCK): sialidasa que escinde residuos de ácido siálico terminales.

4.1.6. Medios y soluciones de cultivo celular.

- Medio DMEM (Life Technologies, USA): contiene 4,5/L D-glucosa, 3,7 g/L NaHCO₃, suplementado con 0,3 mg/mL de L-glutamina, 1 mM piruvato sódico y solución antibiótico-antimicótico 1X.
- EX-CELL[®] ACF CHO Medium (Sigma-Aldrich): Medio que contiene sales inorgánicas, HEPES, tampón de bicarbonato de sodio, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, insulina humana recombinante, hidrolizados de plantas, compuestos orgánicos y tensoactivos. No contiene antibióticos, antimicóticos, L-glutamina, transferrina ni proteínas de origen animal (cat. C5467).

- Tampón fosfato salino (Gibco): 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,09 g/L Na₂HPO₄, pH 7,2.
- Tripsina -EDTA 0,25% (Life Technologies, USA): permite despegar y remover células de la placa de cultivo.
- Solución Azul de Tripán 0,4% (Sigma Aldrich): colorante azoico para determinación de viabilidad celular en conteo directo (cámara Neubauer).
- L-Glutamina 200 mM (Hyclone), N° cat. SH30034.
- DMSO (Sigma Aldrich): dimetilsulfóxido utilizado como criopreservante celular (cat. D2650).

4.2. Métodos

4.2.1 Electroforesis en condiciones reductoras y Western blot

Se mezclaron las proteínas de muestra con el tampón de carga compuesto por 0,25 M de Tris-HCl (Calbiochem), 40% de glicerol (Merck), 4% SDS (Winkler), 0,4% azul de bromofenol (Merck), 1,2 M β-mercaptoetanol (Sigma), y se desnaturalizaron aproximadamente 50 µg de proteína por 5 min a 95°C. Los geles de poliacrilamida/bisacrilamida (Sigma Aldrich) se prepararon al 12% considerando el patrón de peso molecular de 10 a 180 kDa (AccuRuler, MaestroGen). Las muestras de interés se aplicaron con tampón de corrida que contiene 25 mM de Tris-HCl (Calbiochem), 192 mM de Glicina y 1% SDS (Winkler), migrando bajo la acción de un campo eléctrico de 110V. Las membranas de nitrocelulosa (Life Sciences), fueron utilizadas para la

transferencia de las proteínas durante 25 min, utilizando el equipo semiseco Tans-Blot Turbo (BioRad) y tampón de transferencia (Merck). Se utilizó rojo Ponceau al 0,5% (Sigma Aldrich), para la definición de una correcta transferencia de las proteínas y posterior lavado de las membranas. Las membranas fueron bloqueadas durante una hora con 30 mL de leche descremada al 5%, disuelta en tampón Tris salino a 25°C. Se incubaron por 14 h a 4°C las membranas, con las soluciones de incubación de anticuerpos primario y secundario de acuerdo con el protocolo determinado por el fabricante. La señal de fluorescencia se reveló en el equipo Odyssey CLx, con una longitud de onda entre 680 a 790 nm.

4.2.2 Determinación de bscFSH en medios de cultivo de células de mamíferos

4.2.2.1. Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético/deoxicolato de sodio

La técnica de precipitación de proteínas con deoxicolato de sodio y ácido tricloroacético (NaDOC/TCA, Merck) descrita por Besadoun y Weinstein, permiten mejorar el grado de recuperación y cuantificación de proteínas (Arnold and Ulbrich-Hofmann 1999). Para la precipitación de proteínas desde un medio de cultivo, se adicionó a un vial deoxicolato de sodio (1,5 mg/mL) en una proporción 1/10 v/v, se agitó vigorosamente por un minuto y posteriormente se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente (TA). Se agregó a continuación TCA a una proporción 1/10 v/v, se agitó por un minuto vigorosamente y se dejó

reposar a TA por 10 min. La muestra se centrifugó por 15 min a 10000 rpm, se lavó el precipitado con acetona fría (Sigma Aldrich) agitando fuertemente. Finalmente se centrifugó por 5 min a 10000 rpm y el pellet se resuspendió con 50 μ L de agua purificada (Gibco). La muestra final se almacenó a 4°C hasta su análisis.

4.2.2.2. Detección bscFSH por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida

La separación de las proteínas se realizó por medio de electroforesis unidimensional en gel desnaturizante de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), desnaturizando las proteínas con la adición de la solución tampón para facilitar la corrida compuesta por: glicerol 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, Tris-base 0,0625 g/L, azul bromofenol 0,001%, pH 6,8. La preparación de los geles se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Laemmli (LAEMMLI 1970), utilizando para la corrida la solución Tris-Glicina en los compartimentos catódico y anódico en una cámara Mighty Small II SE 250 (Hoefer Scientific Instrument), con una corriente constante de 30 mA por 2 h. Para la definición de las bandas de proteínas, se incubaron los geles durante 15 min en una solución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0,05% (Thermo Fisher), se lavaron sucesivamente en solución de destinción (metanol 10% y ácido acético 10%) hasta la visualización de las bandas.

4.2.3 Diseño de la Hormona Folículo Estimulante bovina de simple cadena

El diseño de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena (bscFSH), consideró las estructuras cristalográficas de las cadenas alfa y beta de *Bos taurus*, de la base de datos UniProt. Los códigos determinados fueron GLHA_BOVIN para la cadena alfa (UniProtKB-P01217), y C6K7A7_BOVIN para la cadena beta (UniProtKB-C6K7A7). Ambas cadenas polipeptídicas se unieron mediante un péptido espaciador flexible (fracción extremo C terminal keratina 10), con dos sitios potenciales de N-glicosilación. En el extremo C-terminal, se incorporó una etiqueta (tag) de 6 residuos de histidina, para facilitar tanto la detección como la purificación de la molécula recombinante (figura 5-1).

4.2.4 Generación línea celular productora de vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL

La secuencia génica se sintetizó y clonó en el vector de expresión pLCW-LGL (Genscript), para generar el vector pLCW-bscFSH-LGL. Este vector es del tipo lentiviral que contiene una unidad transcripcional de expresión bicistrónico de 5' a 3', un promotor de CMV (citomegalovirus), la secuencia bscFSH, una secuencia IRES (internal ribosomal entry site) y la proteína fluorescente verde (GFP). Esta última, se encuentra flanqueada por sitios LoxP, para su posterior escisión por la recombinasa CRE (figura 4-1), luego de haber seleccionado el mejor clon por medio de la expresión de intensidad de fluorescencia de GFP.



Figura 4-1: Vector lentiviral con unidad transcripcional bicistrica en orientaci3n 5' a 3'. Bajo un promotor citomegalovirus, se ubica un sitio m3ltiple de clonaci3n que presenta la secuencia codificante de la FSH bovina de simple cadena, seguido de un sitio interno de entrada a ribosoma (IRES) en el extremo 5' UTR (untranslated region o regi3n no traducida), que permite la iniciaci3n de la s3ntesis proteica, seguida de la secuencia codificante GFP (Green fluorescent protein o prote3na fluorescente verde). Esta prote3na mutante mejorada (EGFP) de *Aequorea victoria*, posee mayor intensidad de emisi3n al ser excitada a 488 nm, generando mejores se3ales para citometr3a de c3lulas eucari3ticas. Tanto el IRES como la GFP est3 flanqueada con dos sitios LoxP, para una posterior escisi3n con recombinasa CRE.

Con esta estrategia, se pueden incorporar m3s copias del transg3n en el genoma de la c3lula, seleccionando los clones que m3s producen la hormona en base a la intensidad de fluorescencia, escindir la GFP manteniendo la expresi3n de bscFSH y posteriormente, incorporar nuevas copias del transg3n repitiendo el proceso.

Para generar los vectores lentivirales, el plasmidio pLCW-bscFSH se co transfect3 qu3micamente con Polietilenimina (PEI, Sigma Aldrich) en conjunto con 3 vectores ayudantes comerciales pLP1, pLP2 y pLP/VSVG, en la l3nea celular de empaquetamiento HEK293FT en placa de 6 pocillos, a una densidad de 1×10^6 c3lulas/pocillo. Se utiliz3 5 μ g de cada pl3smido purificado con PEI 25 kDa en relaci3n PEI: DNA 1,5 μ L: 1 μ g, usando la metodolog3a descrita por Toledo y colaboradores (Toledo et al. 2009). Se evalu3 la eficiencia de transfecci3n determinando la intensidad de la fluorescencia celular, por medio de

un microscopio de fluorescencia con aumento 20X (Microscopio Invitrogen™ FLoid™ Cell Imaging Station, objetivo 20X), a las 24, 48 y 72 h.

Para realizar análisis de expresión de la hormona bscFSH por Western-blot, a las 96 h se colectó el sobrenadante del cultivo centrifugando a 4000 rpm por 10 min. Las proteínas se precipitaron y se cargó en SDS-PAGE 12,5% acrilamida, como anticuerpo primario se utilizó IgG de ratón anti-FSH humana (ORIGEN, 1:1000), incubado por 14 h a 4°C en TBS-Tween con 5% de leche. Para el anticuerpo secundario se utilizó IgG burro anti-IgG de ratón, conjugado en Alexa Fluor 790, incubado por 1 hora en TBS-Tween con 5% de leche.

4.2.5 Purificación de lentivirus

A las 72 h posterior a la transfección, se colectó el medio de cultivo conteniendo el vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL. El medio se filtró mediante un filtro de 0,45 µM, y las partículas virales se concentraron mediante ultracentrifugación a 23000 rpm durante 1 hora y 30 min. El pellet se resuspendió en 100 microlitros de PBS, y se almacenó a -80 °C hasta su uso para transducción celular.

4.2.6 Generación de línea celular productora de bscFSH

Para la producción estable de bscFSH, se seleccionó la línea celular CHO (ECACC, Cat. No. 85050302). La modificación genética de estas células se realizó utilizando la tecnología FASIT (de sus siglas en inglés: *Fluorescence-assisted sequential insertion of transgenes*), descrita por nuestro grupo en el año

2020 (Bravo et al. 2020). La figura 4-2 esquematiza la secuencia de pasos asociados al FASIT.

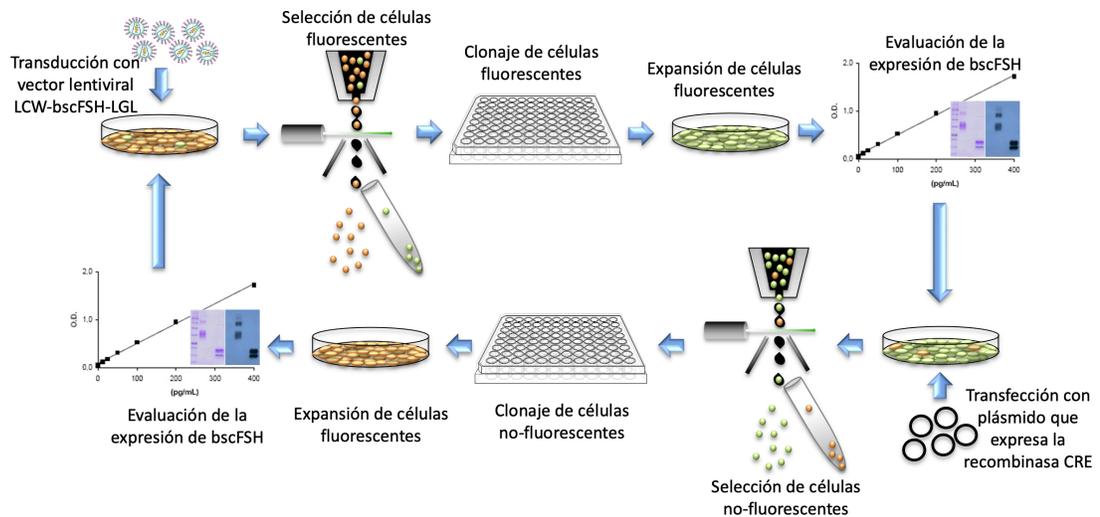


Fig 4-2: Esquema de la inserción secuencial de transgenes asistida por fluorescencia para generar clon de bscFSH. Este enfoque requiere vectores lentivirales como vehículos para la transferencia de genes. Los genomas provirales suelen integrarse en zonas transcripcionalmente activas evitando las matrices en tándem. Dentro de la secuencia proviral, el gen de interés y el marcador de fluorescencia (GFP, Green fluorescent protein) se transcriben a partir de un único promotor fuerte generando un ARNm bicistrónico, lo que garantiza que los clones con mayores niveles de fluorescencia también expresen mayores niveles del gen de interés. Tras la transducción con el vector lentiviral, las células altamente fluorescentes se aíslan, amplifican y analizan para corroborar la expresión del gen de interés. El clon que muestre los niveles de expresión más altos se transfectará con un plásmido que codifica una recombinasa sitio-específica (Ej. recombinasa CRE). Esta recombinasa elimina el marcador de fluorescencia sin afectar al gen de interés. De nuevo, las células no fluorescentes se aíslan por FACS (fluorescent activated cell sorter), se amplifican y se analizan para corroborar la expresión del gen de interés. Por último, estos clones no fluorescentes pueden someterse a una nueva ronda de transducción lentiviral. Todo el proceso puede repetirse varias veces con el fin de aumentar paso a paso la productividad específica.

4.2.6.1. Transducción con vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL

Una vez determinado el título de LCW-bscFSH-LGL, obtuvimos clones estables transduciendo las células en un único pocillo de una placa de 96 pocillos a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. La baja MOI garantiza que cada célula

transducida incorpore una sola partícula vírica. Al cabo de 48 horas, se visualizó la presencia de células fluorescentes en el microscopio de fluorescencia. A continuación, el cultivo transducido se transfirió a un pocillo de una placa de 24 pocillos (Corning, EE.UU.). Una vez alcanzada la confluencia, se transfirió de nuevo a un frasco de cultivo de 25 cm² (Corning, EE.UU.). Por último, las células se trataron con tripsina y se sembraron en dos placas de 100 mm. Las células de uno de estos platos se congelaron y las otras se utilizaron para ensayos de citometría de flujo y sorteo celular.

4.2.6.2. Sorteo Celular

El sorteo celular se realizó en un Cell Sorting BD FACSAria (Becton Dickinson, EE.UU.) equipado con una unidad de deposición celular automática para la clasificación en placas. Las células se trataron con tripsina, se lavaron con PBS y se colaron a través de una malla de nailon de 70 µm antes del análisis. La proteína GFP se excitó con un láser de estado sólido Coherent Sapphire de 13-20 mW a 488 nm, y la emisión se recogió con un filtro HQ 510/20-BP. Rutinariamente, se adquirieron 30 000 eventos para cada muestra. Los desechos y los dobletes se excluyeron mediante la selección de puntos de dispersión frontal y lateral (FSC-A frente a SSC-A, FSC-W frente a FSC-H y SSC-W frente a SSC-H). Se examinaron las células dentro de estas ventanas para determinar la expresión de GFP. Después de cada ronda de transducción con LCW-bscFSH-LGL se seleccionaron las células con los niveles más altos de fluorescencia. Por

el contrario, las células sin niveles detectables de fluorescencia se separaron tras cada ronda de transfección con el plásmido portador del gen de la recombinasa CRE. Tras la separación celular, las células se mantuvieron en placas de 96 pocillos durante al menos dos semanas hasta la formación de clones. Posteriormente, los clones individuales se transfirieron a placas de 24 pocillos y se analizó la expresión de bscFSH.

4.2.6.3. Escisión de la secuencia codificante de la GFP

Los clones fluorescentes derivados de la transducción LCW-bscFSH-LGL se transfectaron con el plásmido pAEC-CRE (plásmido desarrollado por el Laboratorio de Biofármacos), que contiene el gen que codifica la recombinasa CRE bajo el control de un promotor CMV. La transfección se realizó en frascos de cultivo de 25 cm² utilizando el método basado en polietilenimina mencionado anteriormente, con 5 µg de ADN por frasco. Tras 48 horas, las células se trataron con tripsina, se sembraron en una placa de 100 mm y se cultivaron durante otras 48 horas. La presencia de células no fluorescentes indicaba que se había producido con éxito la recombinación sitio-específica, con la consiguiente escisión de la secuencia IRES-GFP.

4.2.6.4. Detección y cuantificación de la proteína bscFSH

Para los ensayos de SDS-PAGE y Western blot, las células CHO que contenían el gen bscFSH se cultivaron en placas de 100 mm con medio RPMI (Sigma,

EE.UU.) y suero bovino fetal al 10% (Biological Industries, Israel). Tras alcanzar la confluencia, las células se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con medio libre de suero durante 72 horas. Un mL del sobrenadante se precipitó con ácido tricloroacético y se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot. El ensayo SDS-PAGE se realizó según lo descrito por Laemmli en 1970 (LAEMMLI 1970), utilizando geles de poliacrilamida al 12%. Para el Western blot, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Suecia) utilizando un electroblotter semiseco (Bio-Rad, EE.UU.). La proteína bscFSH se detectó utilizando un anticuerpo policlonal anti-cadena beta hecho en conejos (Abcam, Cat. No. ab231672) como anticuerpo primario, seguido de una incubación con un anti-IgG [H&L] de conejo, hecho en cabras y conjugado con RDye® 800CW (Abcam, Cat. No. ab216773). El resultado final se visualizó utilizando el sistema de imagen ODYSSEY CLx y el software Image Studio versión 3.1 (LI-COR Biosciences, EE.UU.).

4.2.6.5. Determinación de productividad específica

Para medir la productividad específica (Qp), los clones seleccionados se sembraron en placas de 12 pocillos (Corning, EE.UU.) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Se sembró un total de 4 pocillos por clon para su posterior análisis. Una vez alcanzada la confluencia (aproximadamente 48 horas después), se trató con tripsina un pocillo de cada clon y se contaron las células viables (C1). Los tres pocillos restantes se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en medio

libre de suero durante 24 horas. Se recogió el sobrenadante y las células se trataron con tripsina para contar el número de células viables en cada pocillo (C2). La concentración de bscFSH en el sobrenadante se determinó mediante el kit de ELISA de FSH (Adnova, Cat. No KA2278), según las instrucciones del fabricante. El Qp se calculó mediante la siguiente fórmula $Q_p = P / ([C_1 + C_2] / 2)$, donde P es la cantidad de FSH contenida en 1 mL de medio de cultivo.

4.2.7 Definición de procedimiento para la producción de bscFSH

4.2.7.1 Adaptación del clon productor (CHO-bscFSH) a condiciones de cultivo en suspensión

El clon productor de bscFSH (CHO-bscFSH) se caracterizó en condiciones de cultivo adherente, utilizando medio RPMI (Gibco®) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, Gibco®). Para llevar a cabo el escalado productivo, es necesario adaptar estas células a cultivos en suspensión en medios químicamente definidos (EX-CELL ACF CHO Medium, Merck). El cambio a condiciones de suspensión se realizó con el doble propósito de lograr mayores densidades celulares, y de eliminar el uso de SFB debido a restricciones regulatorias asociadas a su empleo.

El proceso de adaptación a condiciones de cultivo en suspensión se realizó mediante una reducción progresiva en el suplemento de SFB, según sugerencia del fabricante del medio. Una vez superada la etapa de adaptación, las células

se sembraron en placa de 96 pocillos con el propósito de obtener un clon puro (derivado de una simple célula). Se analizó mediante ELISA los niveles de expresión de los clones individuales, y se seleccionó el clon que expresó mayores niveles de bscFSH.

En cabina de bioseguridad clase II, se descongelaron 4 viales del clon #1D41A3F7D productor de bscFSH en baño termoregulado a 37°C, desde el banco de trabajo de cultivo adherente. En un tubo de poliestireno de 50 mL, se le adicionó 16 mL de medio de cultivo ExCELL®ACF CHO y se resuspendió las células provenientes de los viales. Se centrifugó a 1000 g por 5 min, extrayéndose el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular con 50 mL de medio de cultivo ExCELL®ACF CHO, suplementado con L-Glutamina (4 mM). A este banco celular se le desarrolló un análisis de viabilidad celular con azul de Tripán (100 uL suspensión/100 uL tinción), determinando una viabilidad mínima aceptada de 85% de células vivas de los 4 viales en conteo directo en cámara de Neubauer. En un matraz Erlenmeyer de 250mL, se adicionó 50 mL del medio de cultivo ExCELL®ACF CHO suplementado con L-Glutamina (4 mM), agregándose a este medio la suspensión de células con pipeta serológica estéril, alcanzando un volumen de 100 mL. Este frasco se mantuvo con la tapa enroscada pero no sellada herméticamente en incubadora, para generar el intercambio gaseoso. Las condiciones de la incubadora para este matraz con 100 mL de medio, fue de 37°C, 5% de CO₂ y una agitación de 110 rpm (agitador

orbital), con cambio de medio cada 48 h hasta lograr la confluencia para criopreservación ($3,0 \times 10^6$ /mL).

4.2.7.2 Establecimiento de bancos maestros y de trabajo del clon productor (CHO-bscFSH)

La construcción de los bancos maestros y de trabajo se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Prototipado y Escalamiento, en sala ISO 7, dentro de cabinas de flujo laminar ISO 2. El clon seleccionado se expandió en frascos Spinners hasta alcanzar un volumen de 200 mL a una densidad de 2×10^5 células por mL. Posteriormente, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 1000 g por 5 min, y el pellet celular se resuspendió en 50 mL de medio de congelación frío (ExCELL[®]ACF CHO Medium, dimetilsulfoxido 7,5% v/v). La suspensión final quedó a una concentración aproximada de 5×10^5 células/mL.

En una primera aproximación el banco maestro contiene 50 ampulas, que fueron congeladas en nitrógeno líquido y el banco de trabajo determinado es de 50 viales que se congeló a -80°C en ultracongelador (Nuaire).

4.2.7.3 Establecimiento de condiciones para el proceso inóculo/fermentación

Para establecer las condiciones de producción de bscFSH en bioreactor Infors HT de 10 litros, se determinó el siguiente flujo de trabajo:

- Preparación de inóculo: Se descongeló un vial desde el banco de trabajo con una densidad de 2×10^5 células por mL, inoculando un matraz de 2L con 200 mL de medio EX-CELL ACF CHO Medium. Posteriormente se incubó durante 48-72 h a 37°C , 5% CO_2 , con agitación a 160 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad de 2×10^6 células por mL, se adicionó 800 mL adicionales de medio, para alcanzar un volumen de 1 litro. El cultivo se mantuvo en estas condiciones durante otras 48 h, hasta alcanzar una densidad celular de 2×10^6 células por mL.

- Inóculo: El cultivo se centrifugó a 1000 g durante 10 min, y el pellet celular (aprox. 2×10^9 células) se inoculó en un biorreactor Infors HT de 10 L de capacidad total, equipado con un sistema de spinfilter, que contenía 10L de medio EX-CELL ACF CHO Medium. Al momento del inóculo, el cultivo tenía una densidad celular en torno a los 2×10^5 células/mL. Las etapas consideradas en el bioreactor se definen en dos pasos:

- I. Crecimiento: Para incrementar la densidad celular el cultivo se mantuvo a 37°C , 5% CO_2 , con agitación a 156 rpm durante 72 h. En este tiempo la densidad celular alcanzó un rango de $1,6 - 2 \times 10^6$ células/mL.
- II. Perfusión y cosecha: Una vez que se alcanzó la densidad de 2×10^6 células/mL, se comenzó el proceso de perfusión, que consistió en iniciar una alimentación continua de EX-CELL ACF CHO Medium fresco (7

mL/min), y la colecta de un volumen equivalente de medio metabolizado (conteniendo la bscFSH). Durante el proceso de perfusión se mantuvo un preciso control de la densidad celular, entre los 2 y $2,5 \times 10^6$ células por mL con ajustes del medio infundido y spinfilter, para evitar sobreconcentración o dilución.

Como resultado del proceso de perfusión, se colectaron dos lotes de medio conteniendo bscFSH. Este medio se clarificó mediante filtración y posteriormente se almacenó para el proceso de purificación.

4.2.7.4 Establecimiento proceso de purificación de bscFSH

Para la purificación de bscFSH, el medio clarificado que contiene bscFSH, se purificó en un solo paso mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), utilizando un equipo AKTA PRIME PLUS (GE Healthcare), en una matriz de *Chelating Sepharose Fast Flow*, empaquetada en una columna XK 50/20 de 60 mL (GE healthcare). Previo a la purificación, la matriz se cargó con dos volúmenes de solución de carga (200 mM de NiSO_4), se lavó con agua para eliminar exceso de metales, y posteriormente se equilibró con 5 volúmenes de solución de equilibrio (PBS suplementado con 30 mM de imidazol).

El medio de entrada conteniendo la bscFSH, se clarificó mediante filtración a través de 0,22 micrómetros. Posteriormente, el medio clarificado se suplementó con 30 mM de imidazol y se ajustó a pH 7,4. La cromatografía se realizó a un

flujo de 2 mL/min. Para separar proteínas contaminantes, la columna se lavó con 100 mM de imidazol en buffer PBS, desechándose las proteínas unidas débilmente hasta lograr absorbancia 0. La elución de la hormona bscFSH se realizó con 250 mM de imidazol en PBS. Para realizar cambio de buffer, la muestra eluida fue sometida a un paso de filtración tangencial a través de un filtro de 10KDa, y contra un tampón de PBS 0,2X, suplementado con 150 mM de NaCl. La concentración final de la proteína se determinó usando la técnica de ácido bicinconínico usando el BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher), con una lectura de absorbancia de 562 nm, para determinar rangos de concentración de proteína entre 0,5 a 40 μ g /ml, utilizando como estándar BSA (albúmina de suero bovino). En el ensayo de Western blot se utilizó el mismo protocolo descrito en el punto 4.2.4.

4.2.7.5 Implementación de formulación para la bscFSH.

Para desarrollar una formulación estable de bscFSH, se tomó como base la formulación de la FSH recombinante humana Gonal-f. El desarrollo del proceso de formulación se realizó en la planta de prototipado de la Facultad de Ciencias Biológicas. El sobrenadante obtenido del cultivo del clon #1D4A3F7D en suspensión, se purificó en un solo paso por IMAC, según protocolo establecido, y determinado su cromatograma de purificación con el análisis de expresión de bscFSH mediante electroforesis y Western blot.

La fracción de proteínas eluidas por IMAC, se diafiltró en 8 volúmenes de solución de diafiltración que contiene buffer Citrato de Sodio 14.7 g/L + Sacarosa

25 g/L a pH 7.0 (ajustado con HCL), para evitar la precipitación de la proteína. Una vez diafiltrada la bscFSH en cassette Minimate TFF Capsule 10 K, se cuantificó la proteína mediante BCA (ácido bicinconínico) y se concentró a una concentración de 1mg/mL de bscFSH, siendo determinada por densitometría en gel de poliacrilamida. El ingrediente farmacéutico activo (IFA), se microfiltró en un filtro de cápsula estéril con membrana de PDVF de 0.22 μm , utilizando 1 L de solución de diafiltración. Todos los frascos que se utilizaron para el IFA, previamente fueron esterilizados por autoclave y se conectó a la salida de la bomba peristáltica para adicionar el volumen de 1mL con una concentración de 500 $\mu\text{g/vial}$. El frasco con el IFA fue sellado herméticamente y congelado a -80°C toda la noche hasta liofilización. Para la liofilización, se utilizó el equipo de liofilización en frío Lyovapor™ (L-200), siendo retirada la tapa hermética de los contenedores del IFA (en campana de flujo), y ubicadas en las bandejas del liofilizador por 12 h. El contenedor fue extraído desde el liofilizador y se selló herméticamente con la tapa de goma y sobre estas se ubicó las retapas metálicas.

Esta formulación considera la utilización de una solución reconstituyente para la bscFSH liofilizada dispensada por frasco (adicionada al envase secundario), la cual se preparó en un frasco estéril de 20 mL, compuesta por 987,5 mg de sacarosa, 286,5 mg de citrato de sodio, 14 mg DL- metionina, 4 mg de polisorbato 20, 30 mg m-cresol y 20 mL de agua purificada c.s.p.

4.2.7.6 Determinación de pureza y esterilidad de la bscFSH purificada

La pureza de la molécula fue determinada por cromatografía en gel de filtración en HPLC y análisis de electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida dodecil sulfato y Western-blot. Se consideró desarrollar un análisis comparativo del nivel de pureza de la hormona recombinante bovina por electroforesis y Western blot, con respecto a la hormona derivada de pituitaria de cerdo, Folltropin-V, una vez reconstituidas las hormonas con los diluyentes específicos. La concentración determinada para el análisis electroforético para la pFSH fue de 0,1µg, 0,5µg, 1µg y 2µg, diluida en 1µL, 5µL, 10µL y 20µL respectivamente. Para el análisis de la bscFSH se consideró una concentración de 1µg diluida en 10µL. La esterilidad de la formulación fue evaluada por cultivo bacteriano, con tiempo de incubación máximo de 72 h. Se consideró la generación de dos lotes de producción para el desarrollo de los experimentos en modelo animal, obtenidos desde cultivos en suspensión.

4.2.8 Caracterización de patrones de N-glicosilación de la molécula bscFSH

Para analizar el perfil oligosacárido de la molécula bscFSH, se procedió a:

Extracción de glicanos. Mediante el tratamiento con la endoglicosidasa PNGase F (Sigma-Aldrich, EEUU), en un protocolo de digestión de 15 min, los oligosacáridos se separaron de la proteína por adición de 3 volúmenes de etanol absoluto frío e incubación a -20°C por 30 min. Posteriormente, la muestra se

centrifugó a 10000 g por 10 min. El sobrenadante se colectó en un tubo de reacción y el precipitado se lavó con etanol frío al 80%. Después, se centrifugó a 10000 g durante 5 min. Los sobrenadantes resultantes de ambos procesos de centrifugación se combinaron y la mezcla de oligosacáridos se secó en una centrífuga evaporadora al vacío sin calentamiento (Eppendorf, Alemania).

Derivatización de glicanos con 2-aminobenzamida (2-AB). Efectuado el proceso de secado de la muestra, los oligosacáridos se marcaron por reacción de aminación reductiva con solución de marcado de 2-AB según el método descrito por Aich y col.(Aich et al. 2014). Descripción de la técnica: se disolvieron 4,6 mg de 2-AB en 70 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) con 30 µl de ácido acético glacial (100%), disuelto a su vez en 6,4 mg de cianoborohidruro de sodio. Posteriormente, se mezclaron 50 µg de los oligosacáridos secos con el preparado anterior. La solución se incubó a 60°C por 3 h. Una vez finalizada la reacción, se añadieron 200 µl de agua destilada y el exceso de reactivo fue removido utilizando discos de papel Whatman® (Whatman plc, Maidstone, Reino Unido) incorporados en columnas desechables Bio-Rad. Los discos se lavaron con 1 ml de agua desionizada (Milli-Q; Merck, Alemania) y posteriormente con 5 ml de ácido acético al 30% y con 1 ml de acetonitrilo. Después, se aplicó la muestra con los oligosacáridos marcados en el centro del disco y se dejó por 15 min a temperatura ambiente (20°C). Para la elución, se utilizó 1 ml de agua desionizada y los discos se secaron por centrifugación al vacío.

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase normal. Los oligosacáridos liberados se separaron mediante cromatografía líquida en fase normal (NP-HPLC), en una columna TSK-Gel Amide-80 (Tosoh, Biosep, Japón). Para el gradiente de la fase móvil se utilizó una mezcla de formiato de amonio 50 mM pH 4,4 (solución A) y acetonitrilo pH 3,0 (solución B). La separación se realizó con un flujo de 0,8 ml/min por 60 min, en un gradiente de A de 35-100% (Tabla 4-1). La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación $\lambda_{exc}=330$ nm y de emisión $\lambda_{em}=420$ nm.

Tabla 4-1. Gradiente de soluciones A y B utilizado para la separación de glicanos mediante HPLC en fase normal.

Tiempo (min)*	Solución A Formiato de amonio (%)	Solución B Acetonitrilo (%)
0	35	65
48	47	53
49	100	0
53	100	0
54	35	65
60	35	65

* Se utilizó un flujo de 0,8 ml/min

Separación de glicanos marcados con 2-AB por HPLC en columna de intercambio aniónico débil. Los N-glicanos marcados con 2-AB se diluyeron en agua desionizada y se centrifugaron a 13500 g por 10 min. Se realizó una cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) en una columna LudgerSep C3 Anion Exchange HPLC de 7,5x75 mm (Ludger, UK) con el fin de determinar

las especies neutras y cargadas dentro de la población de N-glicanos de la proteína bscFSH. La columna se calibró con los N-glicanos marcados de las proteínas Fetuina bovina (Sigma, EE.UU.) que presentan un patrón definido de estructuras neutras y cargadas (mono-, di-, tri y tetra-sialiladas). La separación se efectuó con un flujo de 0,4 ml/min durante 90 min, utilizando una fase móvil compuesta por una solución de Acetonitrilo al 20% (A) y una solución de 500 mM Formiato de amonio, pH 9.0 en acetonitrilo al 20% (B) (Tabla 4-2). La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación $\lambda_{exc}=330$ nm y $\lambda_{em}=420$ nm de emisión. El tipo de estructuras presentes se asignó al comparar los tiempos de retención obtenidos con los tiempos determinados de los estándares utilizados.

Tabla 4-2. Gradiente de soluciones A y B utilizado para la separación de glicanos mediante HPLC en columna de intercambio aniónico débil.

Tiempo (min)*	Solución A 20% Acetonitrilo (%)	Solución B Formiato de amonio pH 9 en acetonitrilo (%)
0	100	0
5	100	0
21	96	4
61	74	26
72	59	41
77	51,5	48,5
80	51,5	48,5
81	100	0
89	100	0
90	100	0

* Se utilizó un flujo de 0,4 ml/min

Los ensayos de SDS-PAGE y Western blot, permitieron identificar el peso molecular de la bscFSH y establecer el grado de ocupación de los sitios potenciales de N-glicosilación.

4.2.9. Determinación de la estabilidad de la formulación de bscFSH

La formulación final liofilizada, fue testeada para determinar su estabilidad a tiempo real mantenida a 4°C durante 6 meses. A estas muestras se les evaluó la integridad del principio activo de la formulación, determinando el tamaño e integridad de la proteína en una corrida electroforética en gel de poliacrilamida. Estos lotes en el mismo tiempo del análisis molecular se evaluaron en un modelo bovino que consideró un grupo de 5 animales utilizados en el proceso de optimización de la formulación. Estos animales, 6 meses después fueron utilizados con el mismo protocolo de superovulación para la formulación del lote 2 en condiciones de estabilidad a tiempo real, manteniendo el principio de reducción. La estabilidad se determinó con variaciones que no fueran inferiores al 10% de menor actividad de folículos estimulados a nivel ovárico, considerando la evaluación en el tiempo 48 h del protocolo de superovulación del grupo con estabilidad real a 6 meses, con respecto al grupo control.

4.2.10. Caracterización de parámetros farmacocinéticos de bscFSH

4.2.10.1. Implementación de formulación bscFSH

Para desarrollar una formulación estable de bscFSH, se tomó como base la formulación de la FSH recombinante humana Gonal-f. El desarrollo del proceso de formulación se realizó en la planta de prototipado de la Facultad de Ciencias Biológicas. El sobrenadante obtenido del cultivo del clon #1D4A3F7D en suspensión, se purificó en un solo paso por IMAC, según protocolo establecido, y determinado su cromatograma de purificación con el análisis de expresión de bscFSH mediante electroforesis y Western blot.

La fracción de proteínas eluidas por IMAC, se diafiltró en 8 volúmenes de solución de diafiltración que contiene buffer Citrato de Sodio 14.7 g/L + Sacarosa 25 g/L a pH 7.0 (ajustado con HCL), para evitar la precipitación de la proteína. Una vez diafiltrada la bscFSH en cassette Minimate TFF Capsule 10 K, se cuantificó la proteína mediante BCA (ácido bicinconínico) y se concentró a una concentración de 1mg/mL de bscFSH, siendo determinada por densitometría en gel de poliacrilamida. El ingrediente farmacéutico activo (IFA), se microfiltró en un filtro de cápsula estéril con membrana de PDVF de 0.22 μm , utilizando 1 L de solución de diafiltración. Todos los frascos que se utilizaron para el IFA, previamente fueron esterilizados por autoclave y se conectó a la salida de la bomba peristáltica para adicionar el volumen de 1mL con una concentración de 500 $\mu\text{g/vial}$. El frasco con el IFA fue sellado herméticamente y congelado a –

80°C toda la noche hasta liofilización. Para la liofilización, se utilizó el equipo de liofilización en frío Lyovapor™ (L-200), siendo retirada la tapa hermética de los contenedores del IFA (en campana de flujo), y ubicadas en las bandejas del liofilizador por 12 h. El contenedor fue extraído desde el liofilizador y se selló herméticamente con la tapa de goma y sobre estas se ubicó las retapas metálicas.

Esta formulación considera la utilización de una solución reconstituyente para la bscFSH liofilizada dispensada por frasco (adicionada al envase secundario), la cual se preparó en un frasco estéril de 20 mL, compuesta por 987,5 mg de sacarosa, 286,5 mg de citrato de sodio, 14 mg DL- metionina, 4 mg de polisorbato 20, 30 mg m-cresol y 20 mL de agua purificada c.s.p.

4.2.10.2. Evaluación farmacocinética bscFSH

Para determinar el tiempo de vida media en circulación de la bscFSH, se estableció un modelo bovino en 10 machos castrados de 9 meses de edad y 250±5 kilogramos de peso, considerando 25 tiempos de evaluación para un período de 120 h. Este modelo de evaluación farmacocinético considera dos grupos aleatorizados de 5 animales cada uno: grupo de administración endovenosa a una sola dosis de 300 µg de la formulación diluida en 3mL de solución isotónica estéril (vena yugular); grupo de administración intramuscular de una sola dosis de 300 µg de la formulación diluida en 3mL (músculo glúteo medio). Para el muestreo sanguíneo, todos los animales fueron cateterizados en

la vena yugular con un catéter 18G por 3 pulgadas (SAFELET), con extensión Mun Care de 10 cms. y llave de tres pasos fijada en piel, con sutura 2/0 de seda (CVSI). Se extrajeron 9 mL de sangre/animal en tubo sin anticoagulante (Vacutainer), en los tiempos 0, 008, 0,5, 1, 3, 6, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108 y 120 horas. Todos los animales fueron mantenidos en condiciones estabuladas individualmente con alimentación de mantención y agua *ad libitum*, ajustándose a los protocolos de supervisión y de muestreo certificado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias (CBE-14-2021).

Las muestras de suero fueron mantenidas en congelación a -20°C hasta análisis de ELISA sandwich, utilizando el protocolo establecido por el Laboratorio de Biofármacos: recubrir la placa con 100 uL de anticuerpo de ratón anti-bFSH a 10ug/ml, incubar a 4°C toda la noche. Lavar la placa con PBS/tween 0,05%. Bloquear los pocillos con 300 uL de leche 3% preparada en PBS por una hora a 37°C. Lavar placa 2 veces con PBS/Tween 0,05%. Adicionar 100 uL de cada punto de curva estándar de bFSH (312,156,78,39,19,9.7,4.9, 2.4, 1.2,0.6 ng/ml preparado en suero bovino) y de las muestras problema a analizar en duplicado. Incubar durante 2 h a 37°C. Lavar la placa 3 veces con PBS/Tween 0,05%. Adicionar 100uL/pocillo de suero de gallina anti-bFSH preparado en leche 1% en PBS/Tween 0,05% a una dilución 1/40000. Incubar 1 hora a 37°C. Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween 0,05%. Adicionar 100 uL/pocillo de anticuerpo anti-IgY preparado en leche 1% en PBS/Tween 0,05 % a una dilución de 1/20000. Incubar

1 hora a 37°C. Lavar la placa 4 veces con PBS/Tween 0,05%. Adicionar 100 uL/pocillo de solución OPD (25 mL buffer sustrato + 10 mg OPD + 10 uL H₂O₂) e incubar en oscuridad durante 5 a 10 min a temperatura ambiente. Detener la reacción adicionando 50 uL/pocillo de H₂SO₄ 2.5 M. La lectura de la placa se desarrolló en lector ELISA a una longitud de onda de 492 nm.

La farmacocinética estudia la variación en el tiempo de la concentración sanguínea de un fármaco, siendo cada tiempo posterior a la administración de una dosis de un fármaco, la resultante de la concentración sanguínea por unidad de volumen alcanzada entre el balance de su velocidad de entrada y de salida (Morón. Francisco; Rodriguez 2002) El análisis compartimental es una técnica ampliamente utilizada para evaluar cuantitativamente y predecir el destino *in vivo* de un fármaco, modelando los datos de concentración/tiempo con un modelo de compartimiento farmacocinético adecuado (Farrier 1997; Zhang et al. 2010), que generalmente se relaciona con una cinética de primer orden, donde la velocidad del fármaco está condicionada por la cantidad del fármaco en cualquier momento. El análisis de los datos de concentración/tiempo o efecto del fármaco/concentración, juega un papel relevante en la investigación farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD), siendo los tediosos cálculos matemáticos, los algoritmos de optimización y el trazado de gráficos, esenciales para el análisis de datos farmacocinéticos. Para simplificar dichos análisis, se han desarrollado y comercializado una serie de software (Zhang et al. 2010),

siendo el programa PK solution una herramienta versátil de utilizar para el análisis de farmacocinética no compartimental (Farrier 1997) .

El análisis de datos farmacocinéticos de las vías endovenosa y vía intramuscular, se realizó utilizando el programa PK-solution, determinando el área bajo la curva (ABC), tiempo medio de residencia (MRT), tiempo de vida media ($T^{1/2}$), concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo máximo ($T_{m\acute{a}x}$) y volumen de distribución (Vd). El análisis de las vías de administración endovenosa e intramuscular para la misma concentración de un fármaco, permitió determinar la biodisponibilidad absoluta del ingrediente farmacéutico activo, para lo cual se utilizó la fórmula $F_{abs}=(ABC_{vo}/ABC_{iv})*100$ (Morón, Francisco y Rodríguez 2002)

4.2.11. Establecimiento dosis y esquema de administración en bovinos para ensayos de superovulación.

4.2.11.1. Ensayo maduración folicular en especie de destino

Los antecedentes farmacocinéticos de un fármaco permiten determinar una estrategia de dosis y frecuencia en el animal de destino, considerando que los programas de superovulación en bovinos utilizan protocolos de administración intramuscular de hormonas estimuladoras ováricas, con aplicaciones constantes o decrecientes.

El ensayo de respuesta folicular fue realizado en 5 hembras mestizas de carne de 450 ± 15 kg de peso. Consideró un protocolo estándar de superovulación, que utiliza un dispositivo de progesterona intravaginal el día 0 en horario am (P4, CIDR Zoetis), asociado a benzoato de estradiol (B.E., Zoetis). Los días 4 a 8 de sincronización se administraron $500 \mu\text{g}$ /total de bscFSH, distribuidos en 8 dosis decreciente. El día 6 en horario pm y día 7 en horario am se aplicó prostaglandina (PGF2 alfa, Zoetis). El retiro del implante de P4 se realizó el día 8 en horario pm y el día 8 en horario am se administró a las hembras bovinas GnRH (MSD). La evaluación ultrasonográfica se realizó en los tiempos 0, 8 y 9 de la sincronización.

4.2.12. Ensayo Superovulación (SOV) en bovinos

Este ensayo fue realizado en 4 hembras bovinas de 450 ± 11 kg en promedio, en dos fases diferenciadas por 60 días entre protocolos de superovulación. Los ensayos consideraron en común el seguimiento ecográfico de las estructuras ováricas en los tiempos 0, 8 y 13 de SOV y la colecta de ovocitos el día 15, sin la utilización de inseminación artificial en las hembras bovinas. Para la colecta de ovocitos se usó el kit de colecta no quirúrgica (Minitube ®).

4.2.12.1. Ensayo 1 de SOV

Para el protocolo se utilizó un dispositivo de progesterona intravaginal el día 0 en horario am (P4, CIDR Zoetis), asociado a benzoato de estradiol (B.E., Zoetis).

El día 4 (pm) hasta el día 8 (am), se administró 500 µg/total de bscFSH en una frecuencia de 12 horas (8 dosis). El día 6 en horario pm y día 7 en horario am se aplicó prostaglandina (PGF2 alfa, Zoetis), junto con ecografía de evaluación de folículos por ultrasonografía. El retiro del implante de P4 se realizó el día 7 en horario pm y el día 8 en horario pm se administró a las hembras bovinas GnRH (MSD).

4.2.12.2. Ensayo 2 de SOV

Este ensayo se diferenció del protocolo realizado en el ensayo 1, por la ultrasonografía los días 8 y 13, con lavado uterino el día 15.

4.2.13. Ensayo de ajuste de dosis/frecuencia SOV.

Se desarrollaron dos ensayos de ajuste de dosis y frecuencia teniendo como base el protocolo de sincronización utilizado en los ensayos preliminares, considerando la utilización de una dosis de acetato de buserelina (GnRH). El día 4 hasta el día 8, se administró la hormona FSH dependiendo del grupo. El día 6 en horario pm y día 7 en horario am se aplicó prostaglandina (PGF2 alfa, Zoetis) junto con ecografía de evaluación de folículos por ultrasonografía. El retiro del implante de P4 se realizó el día 7 en horario pm y los días 8 en horario pm y 9 en horario am se administró a las hembras bovinas GnRH (MSD). La inseminación artificial se realizó el día 9 en horario pm y 10 am, la colecta de embriones se desarrolló 7 días posterior a la inseminación para el grupo que

hembras que utilizó esta estrategia. Para la colecta de embriones se usó el kit de colecta no quirúrgica (Minitube ®).

4.2.13.1. Ensayo 1 de ajuste de dosis/frecuencia SOV.

Se realizó aleatoriamente en 10 hembras bovinas mestizas de carne (promedio 450 ± 20 kg), la evaluación de un protocolo de superovulación con inseminación artificial a tiempo fijo y colecta de embriones de tipo no quirúrgico. Se utilizó para el grupo I, 240 mg-NIH/vaca de Folltropin-V y para el grupo II, 300 μ g/vaca de bscFSH en dosis decreciente, distribuidos en 7 dosis.

4.2.13.2. Ensayo 2 de ajuste de dosis/frecuencia SOV.

Este ensayo se realizó en 10 hembras bovinas de carne de 300 kg promedio (± 10 kg), para la colecta no quirúrgica de embriones y evaluación de estructuras el día 15 del protocolo de SOV. Se utilizó un protocolo estándar de superovulación, con la consideración especial de administración de la bscFSH a una sola dosis diaria decreciente por 4 días, con una razón de uso de la dosis total: 40%/30%/20%/10%. Esta razón porcentual a dosis decreciente se asemeja a lo utilizado en SOV comerciales, siendo diferente la frecuencia de administración a una sola dosis diaria y la hormona recombinante bscFSH. Respecto al protocolo comercial, se consideró 2 inseminaciones artificiales los días 8 y 9 de sincronización, en horarios pm y am respectivamente.

4.2.13.3. Ensayo 3 y 4 de reproducibilidad de SOV.

Se consideró 60 días posterior al protocolo de ajuste dosis/frecuencia SOV (ensayo 1), la reproducibilidad del protocolo de ajuste de dosis/frecuencia. Para este ensayo 3 y 4, se utilizaron 10 animales mestizos de carne/ensayo en un esquema decreciente de administración de la bscFSH, ajustado en el ensayo 2.

4.2.14. Determinación de perfil de seguridad de la formulación de bscFSH.

Para la determinación del perfil de seguridad se utilizó una dosis única de 500 µg total por animal, que representa el contenido total de los viales y que es considerado un error de manejo común en la administración intramuscular en programas de superovulación usando múltiples donantes. Los viales liofilizados se reconstituyeron y se administró la dosis total por vía intramuscular profunda, a un grupo de 5 hembras bovinas. Esta dosis representa entre 8 a 12 veces la dosis recomendada diaria para bovinos donantes, error que comúnmente se podría cometer en los rebaños en sincronización. La base de evaluación fue la respuesta individual en 48 h (inocuidad aguda), considerando: reactividad intramuscular, que se midió por termografía local e hipersensibilidad por 48 h (hora 0, hora 1, hora 4, hora 6, hora 12, hora 24 y hora 48. Equipo Infrared thermal imager RoHS). Se efectuó monitoreo clínico de las variables temperatura corporal (termómetro digital Blunding) y frecuencia respiratoria (ciclos/minuto) para determinar hipersensibilidad sistémica, a las 0, 6, 12, 24 y 48.

Asociadamente se evaluó el análisis de cambio de conducta y de comportamiento espontáneo de los animales que evalúa: depresión, hiperactividad o condiciones de vocalización y dolor. Al ser una hormona estimulante ovárica se observó el efecto a nivel ovárico, considerando el crecimiento folicular y estructuras ovuladas los días 1, 7 y 13 del programa de superovulación.

4.2.15. Análisis Estadístico

Se realizó estadística descriptiva para las variables cuantitativas, utilizando tablas y gráficos que determinaron estadígrafos de tendencia central y dispersión para cada parámetro. Se evaluó normalidad y homocedasticidad de las varianzas, que permitió decidir la vía de análisis paramétrico (ANOVA simple o de medida repetidas) o no paramétrico (Mann-Whitney o Wilcoxon) según correspondió, con una significancia del 95%. Se consideró análisis de correlación multivariada para variables continuas mediante análisis de componentes principales (PCA). Para evaluar la asociación entre las variables farmacocinéticas y fisiológicas con el tiempo, se realizó análisis de correlación de Pearson considerando $p < 0.05$. Se utilizó para el análisis estadístico el software GraphPad Prism versión 9.3.1.

5. RESULTADOS

5.1. Diseño y expresión de la molécula de FSH bovina de simple cadena

Para el diseño de la hormona folículo estimulante recombinante bovina de simple cadena, se utilizó el repositorio de datos UniProt (UniProt 2019), estableciendo como base cristalográfica, las secuencias de referencia de FSH de *Bos Taurus* definida con los códigos GLHA_BOVIN para la cadena alfa (UniProtKB-P01217) y C6K7A7_BOVIN para la cadena beta (UniProtKB-C6K7A7). La secuencia diseñada para bscFSH de N a C-terminal, consta de la fusión de las secuencias: cadena beta de FSH bovina, secuencia espaciadora de 33 aminoácidos derivada de keratina humana tipo 10, la cadena alfa de FSH bovina, una secuencia espaciadora de glicinas, y una etiqueta (tag) de 6 residuos de histidinas (Figura 5-1). En esta secuencia primaria, la secreción es facilitada por el péptido señal de la cadena beta de FSH; mientras que el péptido señal de la cadena alfa fue removido por encontrarse en una posición interna.

MKSVQFCFLFCCWRAICCRS **CELT** **NI** **ITVEKEECGFCIS** **NI** **WCAG**
YCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTYP
VATECHCGKCDSDTDCTVRGLGPSYCSFREIKE **GSSGGGG** **NGSGG**
GSSGGSSSG **NGS** **GGSSSG**FPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSK
PDAPIYQCMGCCFSRAYPTPARSKTMLVPK **NI**SEATCCVAKAFTK
ATVMGNVRVEN **NHT**ECHCSTCYHKSGGG **HHHHHH**

Figura 5-1: Secuencia polipeptídica de la bscFSH. En negro y subrayado se muestra el péptido de señal de la cadena beta; en color rojo se muestra la secuencia de la cadena beta. En color azul celeste se muestran las secuencias espaciadoras, en letras color azul se representa la cadena alfa y en color naranja se muestra el Tag de histidinas. Sombreado en color verde se muestran las secuencias potenciales de N-glicosilación endógenas. Sombreado en color amarillo se muestran las secuencias potenciales de N-glicosilación incorporadas dentro del péptido espaciador derivado de keratina humana tipo 10.

Como la FSH es un heterodímero, para seleccionar la secuencia espaciadora era necesario tomar en cuenta que ambas subunidades debían conservar suficiente libertad estérica a fin de no afectar su plegamiento y capacidad de ensamblarse adecuadamente, como lo hace el heterodímero. La secuencia espaciadora tampoco debía afectar la interacción de la FSH con el receptor, seleccionándose como secuencia espaciadora una porción del Carboxilo terminal de la keratina-10 humana, que comprende la región 533 a 565, incorporándose a esta secuencia 4 mutaciones puntuales con la finalidad de adicionar dos sitios potenciales de N-glicosilación. Así, el péptido espaciador tiene la doble función de evitar la disociación de las cadenas alfa y beta, además de incrementar el tiempo de vida media en circulación de la molécula final, asociado al incremento de su tamaño que está determinado por los oligosacáridos adicionales incorporados.

La modelación estructural de la molécula resultante sugiere que ninguna de las modificaciones incorporadas interfiere en su capacidad de unión al receptor (Figura 5-2 B). El modelo estructural mostrado en la Figura 5-2 A, permite visualizar los 6 potenciales sitios de N-glicosilación contenidos en la molécula bscFSH. En la subunidad beta (β), se ubican en posición N5 y N22 dos sitios potenciales de N-glicosilación (color rojo), en el péptido espaciador en posiciones N117 y N132 se encuentran dos sitios adicionales (color verde). En posición N198 y N224 se ubican los dos últimos sitios potenciales de N-glicosilación

correspondientes a la subunidad alfa (α). Al final de la cadena se puede observar la etiqueta de 6 histidinas (His-tag).

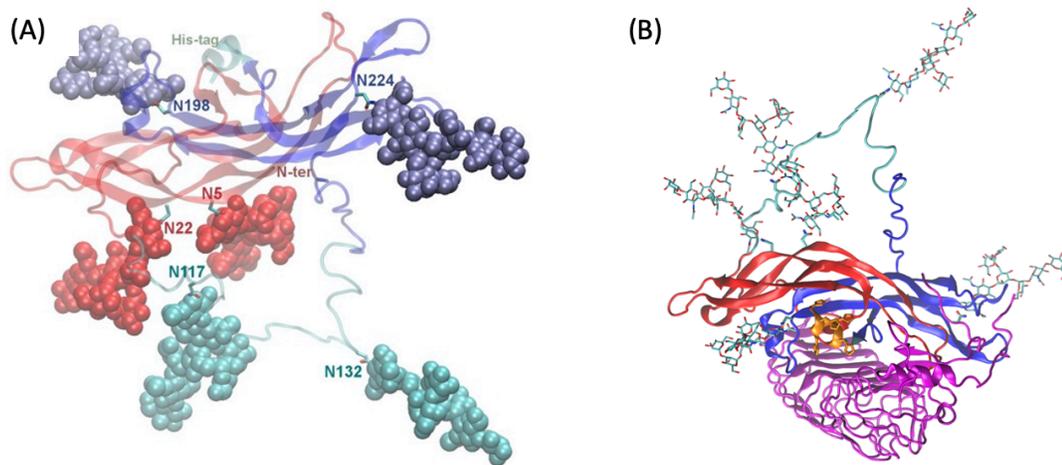


Figura 5-2: Diseño de la molécula de FSH bovina de simple cadena. (A) La estructura tridimensional de la hormona recombinante presenta 6 sitios potenciales de N-glicosilación ubicados en posición N5 y N22 para la subunidad beta (rojo), N117 y N132 para el péptido espaciador (verde), y en posición N198 y N224 se ubican los potenciales sitios de N-glicosilación de la subunidad alfa (azul). (B) Modelo tridimensional de bscFSH (parte superior de la molécula) en interacción con su receptor (magenta), determina la libertad estérica y que ninguna de las modificaciones estructurales incorporadas interfiere en su unión al receptor.

La secuencia aminoacídica de la molécula de FSH madura (bscFSH), posee un peso molecular teórico 26,3935 kDa y un punto isoeléctrico de 7.53. Es necesario considerar que esta molécula posee 6 sitios potenciales de N-glicosilación, los cuales afectan tanto la talla como la carga de la molécula final. Cada cadena de oligosacárido N-enlazada puede aportar con un peso aproximado de 3 a 4,5 kDa adicionales, lo que determina un peso molecular final de la proteína esperada que fluctúa entre los 44 a 53 kDa, dependiente de las glicofomas.

Para la expresión de la molécula, la secuencia de ADN codificante bscFSH se obtuvo por síntesis química con selección de usage de codones optimizado para

su expresión en células CHO (Figura 5-3) (Genscript; EE.UU. <http://www.genscript.com/>). Esta secuencia nucleotídica optimizada está flanqueada por las secuencias de reconocimiento para las enzimas *XhoI* y *XbaI*, y en orden de 5' y 3' se ubican: la secuencia de consenso de Kozak, el codón de inicio, secuencia nucleotídica de la bscFSH y el codón de parada.

```

CTCGAGATCTGCCACCATGAAATCTGTCCAATTTTGTTCCTCTTCTGCTGCTGGCGGGCTATCTGTTGCAGGAGTTGCGAACTCACTAATATCACTA
TAACAGTCGAGAAAGAAGAATGTGGATTTTGTATTAGCATTAACTACTTGGTGCGCAGGATATTGTTACACAAGGGATTGGGTACAGAGACC
CCGCCCGCCCAAACATTCAAAGACTTGTACGTTCAAAGAATTGGTGTATGAGACCGTGAAGGTGCCTGGATGCGCACACCATGCTGACTCCCTGT
ATACATACCCCGTAGCCACTGAATGCCACTGTGGAAAATGCGACTCCGACTCTACCGATTGCACTGTCAGAGGACTTGGACCCCTCACTAGTCTATT
TAGGGAATCAAAGAAGGCTCATCTGGGGGGCGGCGCAACGGCAGCGGAGGCGGCTCTTCTGGTGGTGGATCATCAAGTGGGAATGGAAGCGG
CGGAGGCAGTTCTTCTGGGGGCTTCCGGATGGCGAATTCACAATGCAGGGTTGTCTGAATGTAAGTAAAGGAAAAACAAGTATTTCTAAGCC
TGACGCCCAATCTATCAGTGTATGGGCTGTTGTTTTCCAGAGCTTACCCAACACCCGCTAGGTCTAAGAAAATATGTTGGTGCCGAAAAATATC
ACATCTGAAGCAACTTGTTCGCTGGCTAAAGCGTTTACTAAGGCTACAGTATGGGAAACGTAAGAGTTGAAAACACACAGAATGCCATTGCTCT
ACCTGTACTACCATAAGTCCGGGGGGGGCCACCATCACCACCCATTGATTCTAGA

```

Figura 5-3: Secuencia nucleotídica codificante optimizada para expresión en células CHO. La secuencia nucleotídica del sitio *XhoI* se muestra en letras sombreadas en gris claro, secuencia de consenso de Kozak en sombreado de letras amarillo. Las letras sombreadas en verde verde corresponden al codón de inicio. Las letras sombreadas en color azul representan al codón de parada y en sombreado gris oscuro se destaca el sitio *XbaI*.

5.2. Generación y evaluación de vector de expresión para la molécula bscFSH

El gen sintetizado se insertó en el vector lentiviral bicistriónico pLCW-LGL, generando el vector pLCW-bscFSH-LGL (Figura 5-4). En este vector, la molécula bscFSH se expresa a partir de un promotor inmediato temprano de citomegalovirus. La transcripción a partir de este promotor genera un RNAm bicistriónico, que además de contener la secuencia codificante para bscFSH, contiene una secuencia IRES sucedida de una secuencia codificante para la

proteína fluorescente verde (GFP). Por la configuración de este vector, los niveles de expresión de GFP correlacionan directamente con los niveles de expresión de bscFSH.

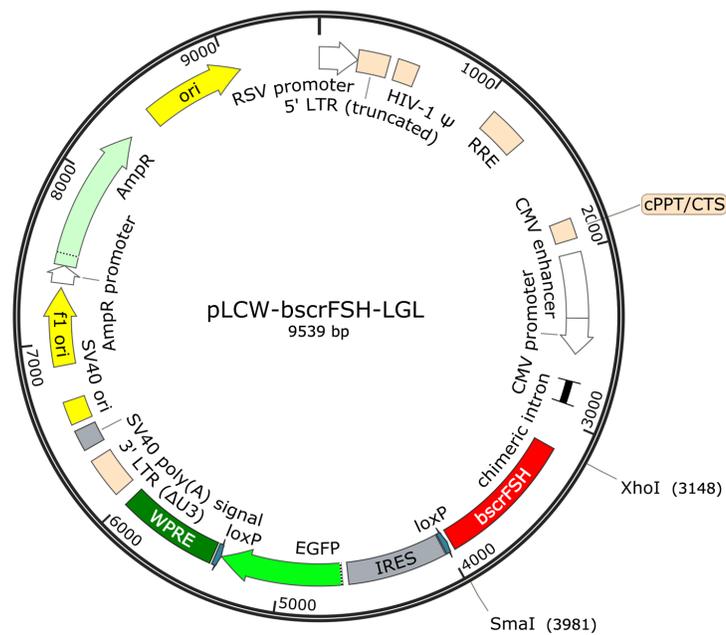


Figura 5-4: Mapa de vector lentiviral bicistriónico que codifica para bscFSH. Dentro de la partícula viral se empaqueta la región comprendida entre los LTRs 5' y 3'. En esta región la unidad transcripcional para la expresión de bscFSH está conformado en orientación de 5' a 3' por: promotor inmediato temprano de cotomegalovirus - un intrón quimérico - la secuencia codificante para bscFSH - sitio LoxP - un Sitio Interno de Entrada a Ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis - una secuencia codificante de la Proteína Fluorescente Verde (GFP) - un segundo sitio Lox P - elemento regulador pos transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

Para verificar la identidad del vector pLCW-bscFSH-LGL, se realizó un análisis de restricción empleando las endonucleasas *EcoRI*, *Sall*, *PstI*, *NaeI* y *NgoMIV*. En la figura 5-5 a se muestra el resultado esperado para cada una de estas digestiones. Este patrón de bandas se corroboró en su totalidad, cuando el vector

pLCW-bscFSH-LGL se digirió con cada una de las 5 enzimas de restricción (Fig. 5-5 b).

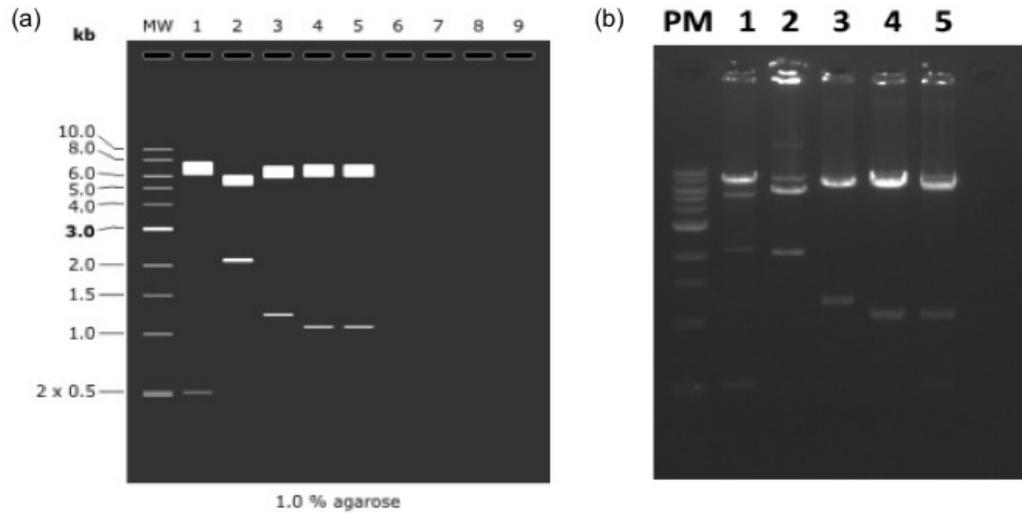


Figura 5-5: Análisis de restricción vector pLCW-bscFSH-LGL. (a) Electroforesis virtual de análisis de restricción generada por el programa SnapGene. (b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las diferentes digestiones realizadas al vector pLCW-bscFSH-LGL. Tanto para (a), como para (b); Carril 1: digestión *EcoRI* (7585 pb y 524 pb); Carril 2: digestión con *Sall* (5987 pb y 2122 pb); Carril 3: digestión con *PstI* (6873 y 1236 pb); Carril 4: Digestión con *NaeI* (7022 pb y 1087 pb); Carril 5: digestión con *NgoMIV* (7022 pb y 1087pb).

La capacidad del vector plasmídico pLCW-bscFSH-LGL para inducir la expresión de bscFSH se determinó mediante transfección en células HEK293. Para este ensayo se utilizaron dos preparaciones del plasmidio pLCW-bscFSH-LGL. Como control negativo, se usaron células no transfectadas y, como controles positivos, se emplearon células transfectadas con un vector que expresa una variante de FSH humana, y también medio de cultivo derivado de una línea celular establemente transformada con un vector que expresa la variante de simple cadena de FSH humana (Bravo et al. 2020).

La eficiencia de transfección se determinó cualitativamente mediante la observación por microscopía de fluorescencia a las 24, 48 y 72 h, observándose un incremento progresivo en la intensidad de fluorescencia, asociado a la acumulación de la proteína fluorescente verde contenida en el vector de transferencia lentiviral pLCW-bscFSH-LGL (Figura 5-6).

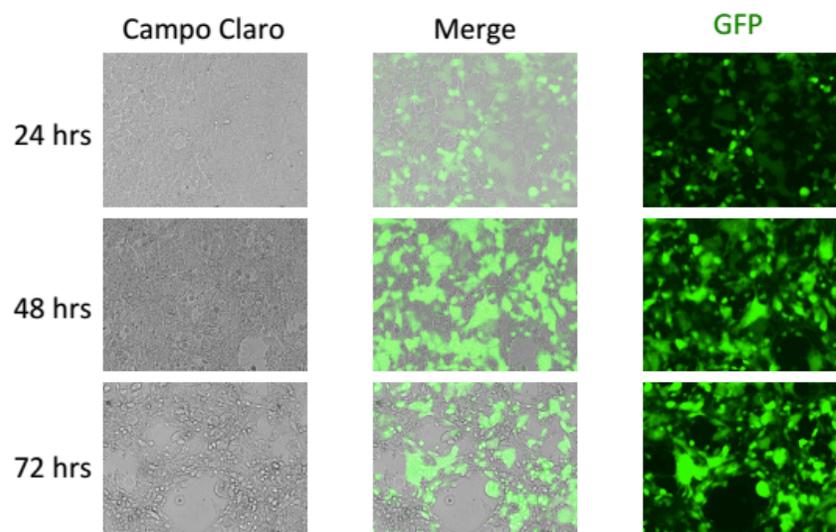


Figura 5-6: Evaluación cualitativa de transfección en línea celular. Intensidad de fluorescencia de células HEK293 FT, a las 24, 48 y 72 h post-transfección, evaluadas en microscopio de fluorescencia Olympus IX81 (20X). Se observa fluorescencia verde en la línea celular transfectada, correspondiente a la proteína GFP contenida en el vector de transferencia lentiviral incluido en la transfección.

El medio condicionado se colectó tres días después de la transfección y la presencia de bscFSH se determinó mediante ensayo de Western blot, usando un anticuerpo anti-etiqueta de histidinas. El análisis del medio derivado de células transfectadas con pLCW-bscFSH-LGL, permitió detectar bandas inmunorreactivas ligeramente por debajo de los 48 kDa (Carriles 2 y 3 de la Fig. 5-7). No se detectaron banda en el grupo control negativo (células no

transfectada), mientras que si fue posible detectar bandas en los grupos control positivo correspondientes a células HEK293 que expresan la variante humana de FSH de simple cadena (Fig. 5-7).

El *Western blot* en la figura 5-7, mostró que el vector pLCW-bscFSH-LGL es funcional permitiendo la expresión y secreción de la molécula bscFSH. Con esta evidencia, se decidió abordar la producción de vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL. Para ello se transfectaron células HEK293-FT con un coctel conteniendo los plasmidios pLCW-bscFSH-LGL, pLP1, pLP2 y pLP/VSVG. El medio condicionado se colectó 72 horas después de la transfección y las partículas lentivirales se concentraron mediante ultracentrifugación.

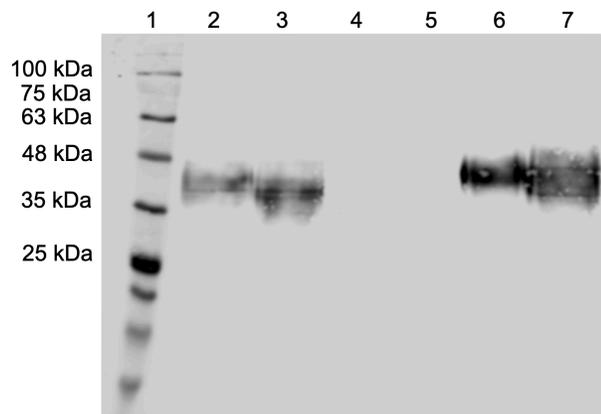


Figura 5- 7: Detección de la proteína bscFSH mediante Western-blot. La proteína bscFSH se inmunoidentificó utilizando un anticuerpo primario anti-etiqueta de histidina de ratón, y un anti-IgG murino, hecho cabra y conjugado con IRDye 800. Carril 1: Patrón de peso molecular; Carriles 2 y 3: Sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio pLCW-bscFSH-LGL; Carril 4: Control negativo correspondiente al medio de cultivo de células no transfectadas; Carril 5: nada cargado; Carril 6: Medio derivado de células HEK293 transfectadas con el vector pLCW-hFSH-LGL que expresa la variante humana de FSH; Carril 7: medio derivado de células HEK293 establemente transformadas con el vector pLCW-hFSH-LGL. La imagen infrarroja se reveló usando un equipo ODISEY CLX de LI-COR.

5.3. Generación de línea celular productora de bscFSH

Para la producción estable de bscFSH se utilizó como sistema de expresión la línea celular CHO. Las células fueron modificadas genéticamente usando la tecnología FASIT (de sus siglas en inglés: *Fluorescence-assisted sequential insertion of transgenes*), descrita por nuestro grupo en el año 2020 (Bravo et al. 2020). Brevemente, Las células CHO fueron transducidas con el vector lentiviral LCW-bscFSH-LGL usando una multiplicidad de infección de 0,1. Después de cada ronda de transducción, se seleccionaron de 4 a 7 clones que mostraban los más altos niveles de fluorescencia. En estos clones se verificó y cuantificó la expresión de bsFSH mediante *Western blot* y ELISA (Figura 5-8). Una vez identificado el clon con mayores niveles de expresión, este se transfectó con un vector plasmídico que expresa la recombinasa CRE a fin de eliminar la región IRES-GFP y con ello, eliminar la fluorescencia. El clon resultante, no-fluorescente, fue entonces sometido a un nuevo ciclo de transducción para incorporar copias adicionales del casete de expresión de bscFSH. Así, mediante la inserción secuencial de transgenes asistida por fluorescencia (FASIT), después de 4 rondas sucesivas de transducción, se obtuvo el clon 1D4A3F7D. Este clon, que de manera abreviada denominamos CHO-bscFSH, expresa la hormona folículo estimulante bovina a niveles en torno a los 30 pg/célula/día, según se determinó mediante ELISA (Fig. 5-8).

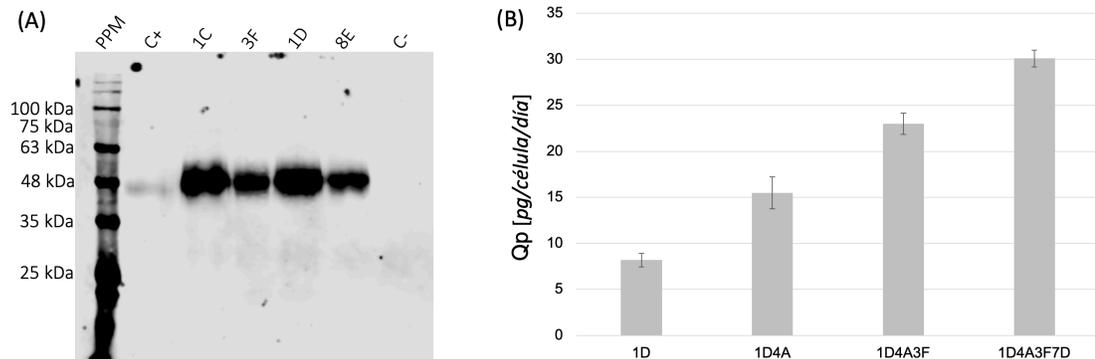


Figura 5-8: Generación de la línea celular CHO-bscFSH. (A) Detección de la proteína bscFSH por Western-blot del sobrenadante de cuatro clones derivado de la primera ronda de transducción. La proteína bscFSHs e inmunoidentificó utilizando un anticuerpo anti-FSH-beta y una IgG [H&L] anti-conejo de cabra conjugada con IRDye 800. El sobrenadante de células transfectadas con el plasmidio pLCW-bscFSH-LGL se utilizó como control positivo (C+). Como control negativo, se utilizó el sobrenadante de células no transfectadas. La reacción se visualizó utilizando el sistema de imágenes ODYSSEY CLx y el software Image Studio versión 3.1. (B) Productividad específica (Qp) de cada uno de los clones seleccionados al final de cada ronda de FASIT. El gráfico muestra el incremento progresivo de la Qp en los clones seleccionados al final de cada ronda de FASIT.

5.4. Adaptación de clon productor (CHO-bscFSH) a condiciones de cultivo en suspensión

Las células CHO-bscFSH se sometieron a un proceso de adaptación a condiciones de cultivo en suspensión. La adaptación se realizó utilizando medio de cultivo ExCELL[®] ACF CHO (Millipore -SIGMA). El proceso de adaptación tomó aproximadamente 40 días, y se realizó incrementando progresivamente el porcentaje de medio ExCELL[®] ACF CHO (Fig. 5-9 A). Durante el proceso se pudo observar una reducción en la viabilidad celular que alcanzó hasta el 22% para el día 27 (Fig. 5-9 B).

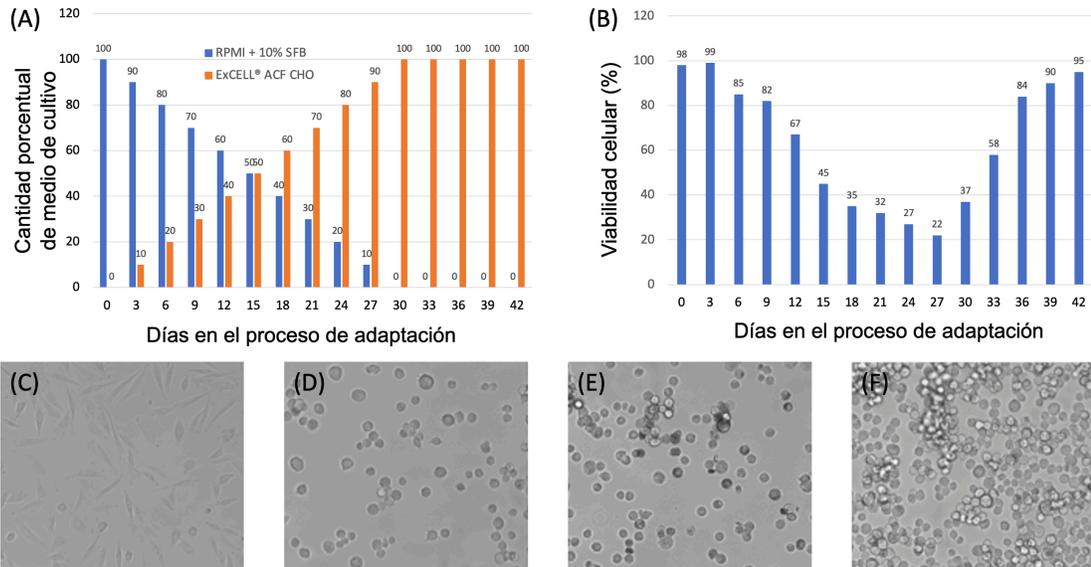


Figura 5-9: Adaptación a suspensión de la línea celular CHO-bscFSH. (A) La adaptación a cultivo en suspensión se realizó de forma gradual, realizando cambios de medios cada 72 horas. De esta forma, en cada cambio de medio, se incrementaba en un 10% la proporción de medio ExCELL® ACF CHO. (B) Evaluación de la viabilidad celular a todo lo largo del proceso de adaptación a condiciones de cultivo en suspensión. El análisis de viabilidad cada 72 horas, junto con el cambio de medio. El porcentaje de células vivas y células muertas se determinó mediante tinción con tripán azul, en un contador de células automático Luna™ Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems). (C) Fotografía del cultivo al día 3 del ensayo. Se puede observar que todas las células se encuentran en forma adherente, con una morfología mayormente fibroblastoide. (D) Fotografía del cultivo al día 12 del proceso de adaptación. En esta etapa, la mayoría de las células se han separado del plástico y muestran una morfología redondeada. (E) Fotografía del cultivo al día 24 del proceso de adaptación. En esta etapa, el 100% de las células se encuentran en suspensión. Sin embargo, se observan células oscuras y con membrana irregular lo que es un indicativo de muerte celular. (F) Fotografía del cultivo al día 42 del proceso de adaptación. En esta etapa, el 100% de las células se encuentran en suspensión. Se nota una marcada proliferación celular y altos niveles de viabilidad.

Desde la primera semana se pudo observar que la mayoría de las células se separaron de la superficie del plástico y adoptaron una morfología redondeada. Para la tercera semana (día 24) ya todo el cultivo se encontraba en suspensión, aunque era posible observar un gran número de células muertas. Para el día 42, la viabilidad se había recuperado alcanzando un 95%, lo que fue considerado como un criterio de adaptación completa a condiciones de cultivo en suspensión

(Fig. 5-9 C-F). A partir de este punto, el clon resultante, adaptado a condiciones de crecimiento en suspensión se denominó sCHO-bscFSH.

Una vez concluido el proceso de adaptación a suspensión se realizó un nuevo análisis para evaluar si el cambio en las condiciones de cultivo podría haber afectado los niveles de expresión de bscFSH. Con este propósito, se montaron cultivos adherentes y en suspensión para comparar la expresión de bscFSH en ambas condiciones. Ambos tipos de cultivos se hicieron por triplicado, y con un número similar de células. Mediante ensayo de western blot y de ELISA, se pudo demostrar que el cambio a condiciones de cultivo en suspensión, no afectó los niveles de expresión de bscFSH (Fig. 5-10)

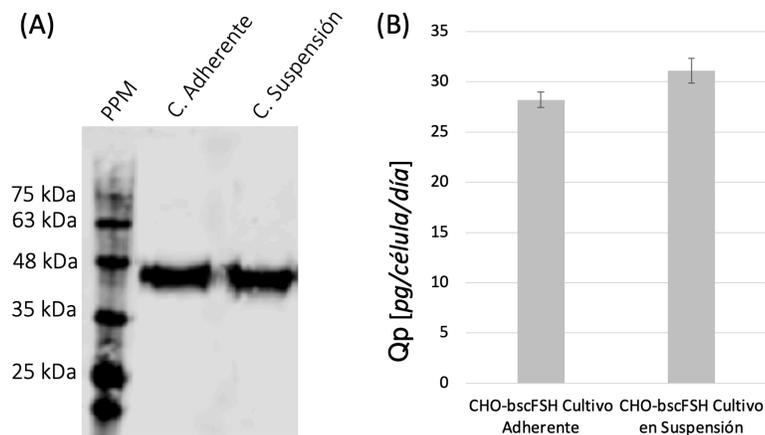


Figura 5-10: Evaluación de la expresión de sbcsFSH en cultivos en suspensión. 1×10^6 células de cada tipo de cultivo fueron sembradas en placas de 6 pocillos, por triplicado. Pasadas 24 horas se colectó medio de cultivo para determinar la productividad específicas mediante ELISA. Dos días después (72 horas desde el momento de la siembra) se colectó el resto del medio para realizar ensayo de western blot. (A) Detección de la proteína bscFSH por Western-blot del sobrenadante de cultivo de células CHO-bscFSH y sCHO-bscFSH. Para el western blot, la proteína bscFSHs se inmunoidentificó utilizando un anticuerpo anti-FSH-beta y una IgG [H&L] anti-conejo de cabra conjugada con IRDye 800. La reacción se visualizó utilizando el sistema de imágenes ODYSSEY CLx y el software Image Studio versión 3.1. (B) Productividad específica determinada mediante ELISA, a partir de medio de cultivo colectado 24 horas después de la siembra.

5.5. Establecimiento de condiciones de purificación de la molécula bscFSH

A partir de este medio condicionado se implementó un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos utilizando una matriz de níquel-sefarosa de rápido flujo (*Ni Sepharose Fast Flow*). La figura 5-11 a, muestra el cromatograma donde se identifican las fracciones correspondientes a las proteínas no unidas, al lavado, y a la elución. Cada una de estas fracciones fue sometida a un SDS-PAGE y a un ensayo de *western blot*, utilizando un anticuerpo anti-cadena beta de FSH (Fig. 5-11 b y c).

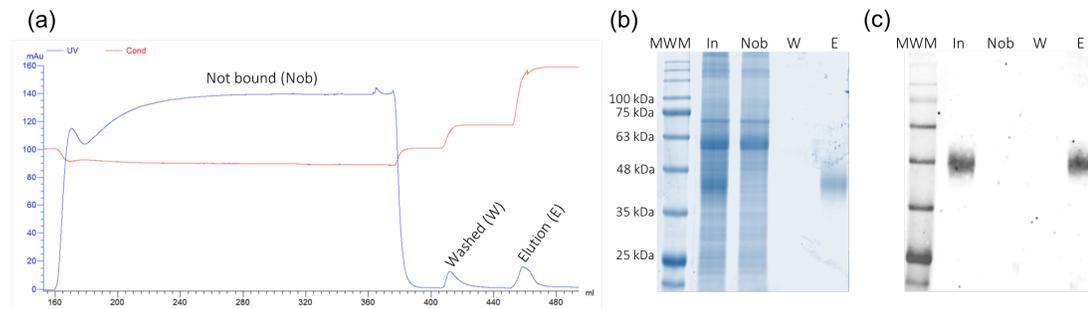


Figura 5-11: Condiciones de purificación de bscFSH por IMAC. (a) Cromatograma de cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados de bscFSH, utilizando una columna de níquel sefarosa (*Ni Sepharose Fast Flow*). **NoB**: proteína no unida, **W**: Pick de proteínas posterior al lavado de la columna, **E**: pick de proteína, posterior de añadir el buffer de elución (Imidazol 250 mM). (b) SDS-PAGE de las fracciones de carga y su migración electroforética, destacando la banda cercana a 48 kDa de E (bscFSH), (c) Western blot que inmunoidentifica en las fracciones de carga (In) y de elución (E) de la bscFSH, utilizando un anticuerpo anti-FSH-beta bovino de ratón, y una IgG [H&L] anti-ratón de cabra conjugada con IRDye 800. La reacción se visualizó utilizando el sistema de imágenes ODYSSEY CLx y el software Image Studio versión 3.1 (<https://www.lstudio-lite/download>).

El ensayo de Western blot, no mostró bandas inmunoreactivas en los carriles correspondientes a las fracciones no unida y al lavado, lo que sugiere que toda la FSH contenida en el medio de cultivo se unió a la matriz de quelato, y eluyó cuando se aplicó una solución conteniendo 250 mM de imidazol.

La movilidad electroforética de la bscFSH purificada también se comparó con una variante comercial, altamente purificada de FSH-p. La figura 5-12a muestra un SDS-PAGE donde se corrieron 3 μ g bscFSH junto a 1, 5, 10 y 20 μ l de una

FSH-p comercial, previamente reconstituida en 20 mL según indica su prospecto. El SDS-PAGE muestra la diferencia en cuanto a nivel de pureza entre ambos preparados. Por su parte el ensayo de Western blot, usando un anticuerpo anti-cadena beta, muestra que la molécula bscFSH se mantiene íntegra bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras, mientras que en las muestras correspondientes a la variante comercial de FSH-p se observa una banda inmunoreactiva entre los 20 y 25 kDa, resultado de la disociación de las cadenas alfa y beta (Fig. 5-12b). Para determinar el nivel de pureza de la bscFSH, se realizó una cromatografía de alta resolución en una columna TSK G2000SW. El cromatograma en figura 5-12c muestra un único pico con un tiempo de retención de 26,7 minutos, y establece un nivel de pureza del 97 % para la bscFSH purificada.

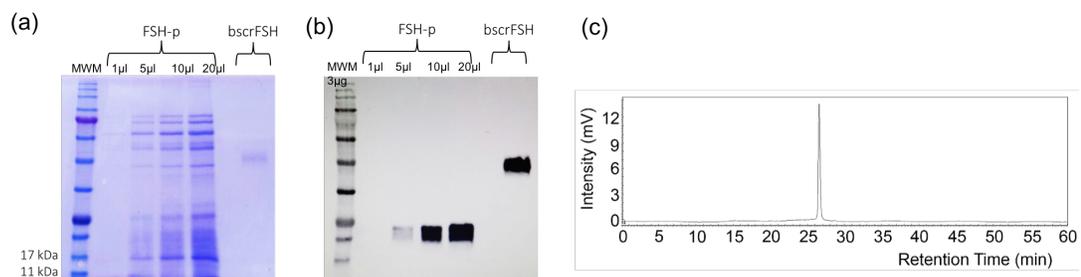


Figura 5-12: Análisis electroforético comparativo Folltropin/bscFSH y pureza cromatográfica de hormona recombinante. La bscFSH recombinante obtenida luego del proceso de purificación, se comparó con Folltropin-V (Syntex) en términos de movilidad electroforética y niveles de contaminación en la muestra. Se observa que la bscFSH, se encuentra libre de proteínas contaminantes a diferencia de FSH-p (a) y posee un peso molecular cercano a los 48 kDa. Para la inmunoidentificación de FSH recombinante y comercial, se utilizó un anticuerpo primario anti-cadena beta, acoplado a un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa, determinándose un PM cercano a los 25 kDa para Folltropin y de 48 kDa para bscFSH (b). La determinación de pureza de bscFSH (c), se analizó por cromatografía en gel filtración en HPLC, estableciendo un único pico que evidencia el nivel de pureza de la muestra.

5.6. Caracterización de patrones de N-glicosilación de la molécula bscFSH

La bscFSH posee 6 sitios potenciales de N-glicosilación, cuatro de estos sitios son endógenos, mientras que los restantes dos se incorporaron como parte de la secuencia espaciadora o linker que une las cadenas alfa y beta. Considerando que los 6 sitios de N-glicosilación han sido ocupados, se debe generar una molécula con un peso molecular heterogéneo entre los 44 y 53 kDa. Los ensayos de SDS-PAGE y Western Blot (Figura 5-12 b), demostraron que efectivamente la bscFSH migra como una banda difusa por encima de los 48 kDa, lo que nos sugiere que los 6 sitios potenciales de N-glicosilación están ocupados. Esto se relaciona con la suma de los pesos moleculares aportados por las cadenas alfa y beta y los N-glicanos de los sitios potenciales de N-glicosilación.

La presencia de glicanos N-enlazados a la proteína FSH se corroboró luego de la incubación con la endoglicosidasa PNGasaF. Se realizó un SDS-PAGE al 12,5% con el producto de la reacción, y la FSH sin tratar. El aumento de la migración electroforética en la muestra tratada respecto a la no tratada demostró que la proteína posee ocupados sus sitios de N-glicosilación (Fig. 5-13A, panel superior derecho). Los N-glicanos 2AB derivatizados de la glicoproteína FSH se separaron en columna de fase normal Amida 80. El perfil de glicanos obtenido mostró la heterogeneidad esperada de una proteína expresada en células CHO, donde están presentes estructuras neutras y cargadas. La cuantificación relativa de las estructuras según el contenido de ácido siálico se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico demostrando que el 74 %

aproximadamente corresponde a estructuras cargadas, que incluye glicanos mono-, di-, tri- y tetra-sialilados (Fig. 5-13B, inserto superior).

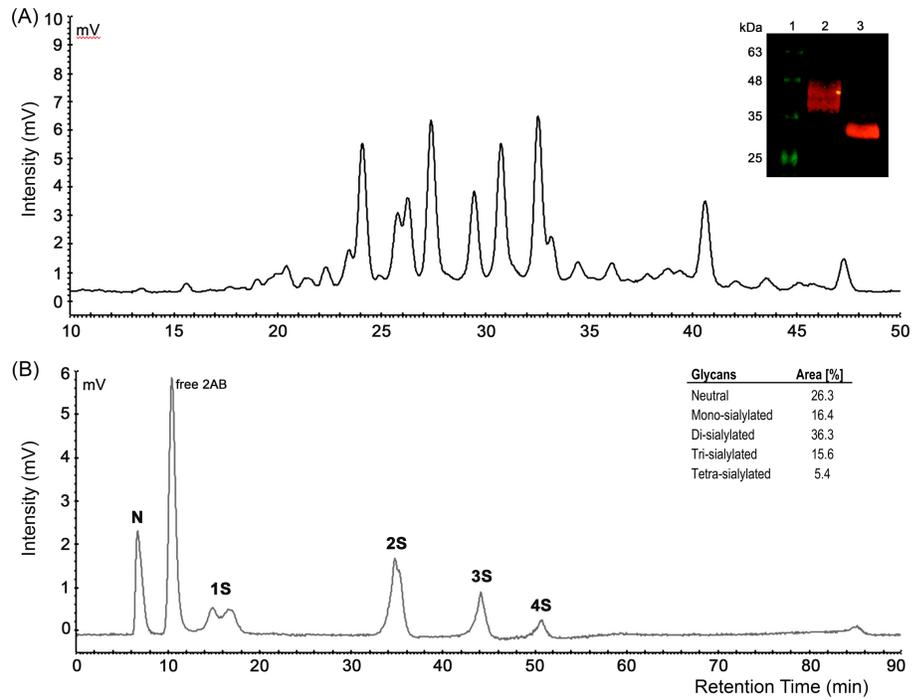


Figura 5-13: Análisis de N-glicanos de bscFSH. Cromatografía líquida de alta resolución en fase normal en columna TSK-Gel Amide-80 (A) y separación por intercambio aniónico en columna LudgerSep C3 (B) de oligosacáridos 2AB. Insertado en A, el análisis SDS-PAGE de bscFSH tratada con la enzima PNGaseF. Líneas: 1 marcador de peso molecular; 2 FSH glicosilada; 3 bscFSH después de la incubación con PNGaseF. Insertado en B, la proporción relativa de estructuras neutras y cargadas presentes en la glicoproteína bscFSH producida en células CHO.

5.7. Estudio de actividad *in vivo* de la bscFSH (Cebitropin B).

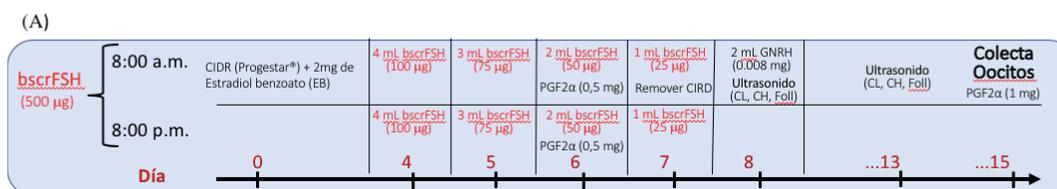
Para la realización de ensayos *in vivo*, la bscFSH se empaquetó en un prototipo para investigación que fue provisionalmente nombrado “Cebitropin B”. En una etapa inicial, cada caja de Cebitropin B contenía dos frascos, uno de ellos con

0,5 mg de bscFSH liofilizada, y el otro con 20 mL de solución diluyente conteniendo sacarosa, citrato de sodio, polisorbato 20 y DL-Metionina. Así, en esta presentación preliminar, después de la reconstitución, la bscFSH queda a una concentración de 25µg/mL.

La capacidad bscFSH para inducir maduración folicular *in vivo*, se evaluó en 5 vaquillas de raza Aberdeen Angus rojo. En estos primeros ensayos se usaron 0,5 mg totales de FSH por animal. Se empleó un esquema de superovulación basado en la administración de 8 dosis decrecientes espaciadas por 12 horas (Figura 5-14A). La maduración folicular se determinó mediante ultrasonografía en el día 8, y en el conteo se consideraron solo aquellos folículos con un diámetro igual o superior a los 10 mm (Fig. 5-14B y C). Todos los animales respondieron al tratamiento hormonal con una tasa promedio de $22,6 \pm 2,5$ folículos maduros por animal (Fig. 5-14D). Estos resultados fueron la primera evidencia de que bscFSH es funcional *in vivo* y que, a la dosis empleada, muestra una elevada capacidad para inducir maduración folicular.

(Figura 5-15A). En estos animales no se realizó inseminación artificial, ya que el ensayo solamente perseguía determinar el número de estructuras ovuladas.

El ultrasonido en el día 8 mostró una tasa promedio $26 \pm 2,9$ folículos maduros por animal. En esta etapa no se visualizó ningún cuerpo hemorrágico o cuerpo lúteo. Este resultado fue consistente con el obtenido en el ensayo previo, y da cuenta de la elevada potencia de la bscFSH (Figura 5-15B). Sin embargo, cuando se realizó el ultrasonido en el día 13, entre las 4 vaquillas solo se pudo detectar 3 cuerpos lúteos y 9 cuerpos hemorrágicos. De forma curiosa, el número de folículos (no ovulados) se mantuvo en el mismo rango, lo que sugiere que podría existir una estimulación del crecimiento folicular durante un período más prolongado, incluso después de haber aplicado la GnRH. En este ensayo, después del lavado uterino, no se logró recuperar ningún ovocito.



(B)

Resultados de Ultrasonografía en día 8								
Número de Vaca	Vaca 1		Vaca 2		Vaca 3		Vaca 4	
Ovario	OD	IO	OD	IO	OD	IO	OD	IO
Folículos	11	15	16	18	11	12	10	11
Cuerpos hemorrágicos	0	0	0	0	0	0	0	0
Cuerpos lúteos	0	0	0	0	0	0	0	0
Promedio	26,6 ± 2,9 folículos/animal							
Resultados de Ultrasonografía en día 13								
Número de Vaca	Vaca 1		Vaca 2		Vaca 3		Vaca 4	
Ovario	OD	IO	OD	IO	OD	IO	OD	IO
Folículos	11	15	20	16	11	12	10	11
Cuerpos hemorrágicos	0	0	0	2	5	1	0	1
Cuerpos lúteos	2	0	0	0	0	0	1	0

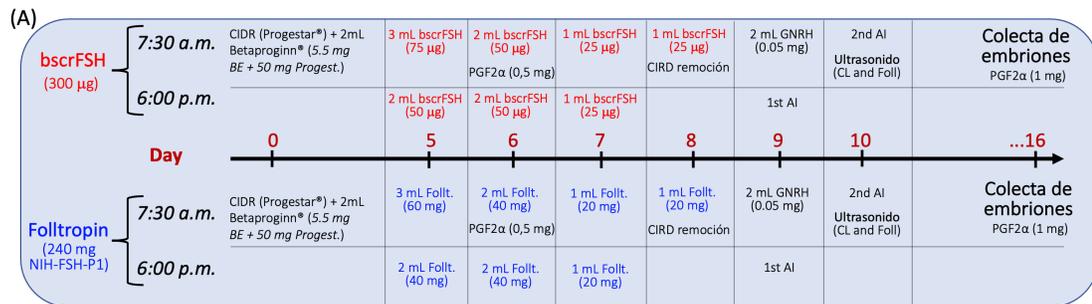
Figura 5-15: Ensayo de eficiencia de ovulación en animales superovulados con 8 dosis de bscfFSH. (A) Diseño experimental para evaluar recuperación de ovocitos ovulados, después de un régimen de estimulación folicular con 0,5 bscfFSH. El ensayo se realizó en 4 vacas de raza Aberdeen Angus rojo. El régimen de administración de bscfFSH se inició en el día 4, después de la implantación del CIDR. Se utilizaron 0,5 mg de bscfFSH por animal, administradas cada 12 horas (8:00 am y 8:00 PM) por 4 días. Se aplicó un régimen de administración decreciente (20% am y 20% pm en el día 4, 15% am y 15% pm en el día 5, 10% am y 10% pm en el día 6, y 5% am y 5% pm en el día 7). En el día 6, se administraron dos dosis de 0,5 mg de prostaglandina F2 alfa (PGF2α); una en la mañana, y una en la tarde. En el día 8, se administró GnRH (Conceptal®), y se realizaron ultrasonidos en los días 8 y 13. En el día 15 se realizó lavado uterino para recuperar ovocitos ovulados. (B) Respuesta folicular y ovulatoria en bovinos sometidos a un esquema de superovulación con 0,5 mg de bscfFSH. En la tabla el término LO: se refiere a ovario izquierdo; RO: Ovario derecho. El número de folículos en cada ovario se determinó mediante ultrasonografía transvaginal. En el conteo solo se consideraron aquellos folículos con 1 cm, o más, de diámetro.

Los resultados de este ensayo sugirieron que podría haber algún nivel de asincronía entre los procesos de maduración y ovulación, presumiblemente debido al esquema de administración o debido a una dosis muy elevada de FSH. Así, probablemente, la descarga de LH, post administración de GnRH podría no ser suficiente para lograr una ovulación eficiente.

5.8. Establecimiento de dosis y esquema de administración de la bscFSH

5.8.1. Ensayo 1 de ajuste de dosis y esquema de administración

Se realizó un nuevo ensayo reduciendo a 0.3 mg la dosis total de bscFSH. En este ensayo se usaron vaquillas Brangus y Braford, y se crearon dos grupos experimentales de 5 animales cada uno. Uno de los grupos fue superovulado con bscFSH (0,3 mg), mientras que el otro se superovuló con 240 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin. La figura 5-16A, muestra el esquema de superovulación empleado. En este ensayo, las estructuras colectadas se clasificaron acorde a su grado de calidad. También se contabilizó el número de cuerpos lúteos y el número de folículos anovulatorios al momento de la segunda inseminación. Los resultados individualizados por animal se muestran en la [Tabla suplementaria 1](#). En valores promedio, la bscFSH rindió un número de embriones similar, e incluso ligeramente superior, a los obtenidos a partir de animales superovulados con Folltropin (Fig. 5-16B). Sin embargo, incluso con la reducción en la dosis de bscFSH, la ultrasonografía realizada al momento de la segunda inseminación (día 10) reveló que todos los animales tratados con bscFSH, mostraban más de 10 folículos anovulatorios y ovarios de gran tamaño.



(B)

Grupo	G1	G2	UFO	DEG	Total	Viable	CL	Foll. Anov.	BCS
Folltropin (240 mg NIH-FSH-P1)	7.4	0	3.6	0	10.4	7.4	9.2	8.6	5.2
bscrFSH (0.3 mg)	7.4	1.6	6.6	0	15.6	9	12	+10	5.2

Figura 5-16: Ensayo comparativo entre bscFSH y Folltropin en esquema de 7 dosis. (A) Diseño experimental para evaluar recuperación de embriones en un ensayo comparado, después de superovular con 0,3 mg de bscFSH, 0 240 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin. Cada grupo experimental estuvo compuesto por 5 vacas de las razas Brangus y Braford. El régimen de administración de bscFSH se inició en el día 5, después de la implantación del CIDR. Las hormonas se distribuyeron en un total de 7 dosis, administradas cada 12 horas (8:00 am y 8:00 PM) por 4 días. Se aplicó un régimen de administración decreciente (25% am y 16,6% pm en el día 5, 16,6% am y 16,6% pm en el día 6, 8,3% am y 8,3% pm en el día 7, y 8,3% am en el día 7). En el día 6, se administraron dos dosis de 0,5 mg de prostaglandina F2 alfa (PGF2α); una en la mañana, y una en la tarde. En el día 9, se administró GnRH, y se realizaron ultrasonidos en los días 10 y 13. En el día 16 se realizó lavado uterino para recuperar ovocitos ovulados. (B) Respuesta folicular y ovulatoria en bovinos sometidos a un esquema de superovulación con 0,3 mg de bscFSH. En la tabla el término G1: se refiere a embriones grado 1; G2: embriones grado 2; UFO: Ovocitos no fertilizados; Total: Número total de estructuras recuperadas después del lavado uterino; CL: Cuerpos lúteos; Foll Anov: Folículos anovulatorios; BCS: Puntuación de la condición corporal.

Si bien este ensayo mostró que la superovulación con bscFSH permite obtener embriones de grado 1 a niveles similares a Folltropin, aún se detectó asincronía entre los procesos de maduración folicular y ovulación. Esta observación sugirió la necesidad de, no solo reducir más la dosis de bscFSH, sino que, además, se debía modificar el esquema de superovulación reduciendo el número de administraciones de la hormona recombinante.

5.8.2. Ensayo 2 de ajuste de dosis y esquema de administración

Se elaboró un nuevo ensayo de superovulación. Para esta nueva prueba se emplearon 10 vaquillas de la raza Aberdeen Angus rojo con un peso promedio de 300 kg, y buena condición corporal. En este ensayo se usaron 150 microgramos totales de bscFSH, administradas en un protocolo de 4 dosis decrecientes. Así, según se muestra en la figura 5-17A, en el día 4 se administró una única dosis con el 40% de la dosis total (60 μ g), en el día 5 se administró el 30% (45 μ g), en el día 6 se administró el 20% (30 μ g), y el día 7 se administró el 10% de la dosis total (10 μ g). Se realizó un ultrasonido al momento de la segunda inseminación, en el día 9 del ensayo, y en el día 15 se hizo lavado uterino. Los resultados individualizados por animal se muestran en la [Tabla suplementaria 2](#). De un total de 153 cuerpos lúteos visualizados mediante ultrasonografía, se recuperaron 118 estructuras de las cuales 86 fueron mórulas compactas o blastocistos tempranos viables. Las restantes 32 estructuras fueron ovocitos no fertilizados (UFO) o embriones degenerados (DEG). La figura 5-17B muestra un gráfico con los valores promedios obtenidos para este ensayo. Estos resultados indican que una dosis total bscFSH, 3.3 veces inferior a los 0,5 mg estimados inicialmente, y administrada en un esquema decreciente de solo 4 dosis, es suficiente para lograr una excelente respuesta ovulatoria.

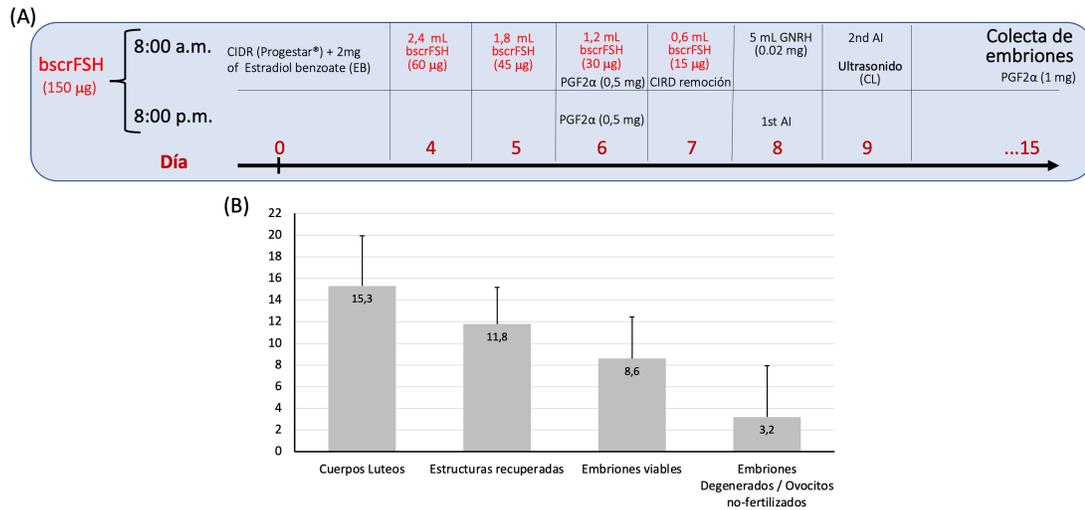


Fig. 5-17. Desempeño de la bscrFSH en ensayos de superovulación de solo 4 dosis. (A) Diseño experimental para evaluar recuperación de embriones, después de un régimen de estimulación folicular con 0,150 mg de bscrFSH. El ensayo se realizó en 10 vaquillas de raza Aberdeen Angus rojo. El régimen de administración de bscrFSH se inició en el día 4, después de la implantación del CIDR. Se utilizaron 0,150 mg de bscrFSH por animal, administradas cada 24 horas (8:00 am) por 4 días. Se aplicó un régimen de administración decreciente (40% el día 4, 30% en el día 5, 20% en el día 6 y, 10% en el día 7). En el día 6, se administraron dos dosis de 0,5 mg de prostaglandina F2 alfa (PGF2α); una en la mañana, y una en la tarde. En el día 8, se administró GnRH (Conceptal®), y se realizaron dos inseminaciones, una en el día 8 pm, y la otra en el día 9. En el día 9 también se realizó ultrasonido. En el día 15 se realizó lavado uterino para recuperar los embriones. (B) Gráfico con valores promedio de un ensayo de superovulación realizado en vaquillas Aberdeen Angus rojo, utilizando 0,15 mg de bscrFSH por animal.

5.8.3. Ensayos 3 y 4 para demostrar reproducibilidad

Con el propósito de demostrar reproducibilidad, se realizaron dos ensayos adicionales independientes. En cada ensayo se utilizaron 10 animales de las razas Aberdeen Angus rojo, overo colorado (Holstein rojo). En ambos ensayos se utilizó un esquema de superovulación decreciente de solo 4 dosis, similar al ensayo previo mostrado en la figura 5-17A. La principal diferencia entre los dos ensayos es que en uno de ellos la superovulación se realizó con 0,163 mg totales de bscrFSH; mientras que en el otro se emplearon 0,137 mg de la hormona. Esto

es, 13 µg por encima, y 13 µg por debajo de la dosis total evaluada en el ensayo previo. Los resultados de estos ensayos, individualizados por animal, se muestran en las [Tablas suplementarias 3 y 4](#). En promedio se obtuvieron 11.2 y 9.4 embriones viables para los grupos superovulados con 0,163 y 0,137 mg de bscFSH, respectivamente (Fig 5-18A y 5-18B). Un análisis estadístico entre estos tres ensayos mostrados en la figura 5-17, indica que entre ellos, no existe diferencia significativa en cuanto al número de cuerpos lúteos detectados en el día 9 ($P>0,05$), ni en cuanto al número de embriones viables recuperados después del lavado uterino ($P>0,05$).

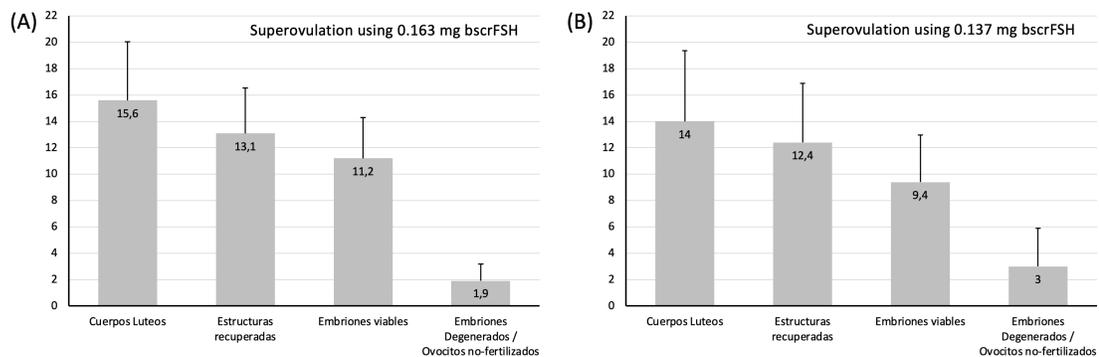


Fig. 5-18: Desempeño de la bscFSH en esquemas de superovulación de 4 dosis. (A) Gráfico con valores promedio de un ensayo de superovulación que combina vaquillas Aberdeen Angus rojo y Overo Colorado, donde se utilizaron 0,163 mg totales de bscFSH por animal. (B) Gráfico con valores promedio de un ensayo de superovulación donde se combinan vaquillas Aberdeen Angus rojo, Overo Colorado y Holstein rojo. En este ensayo se utilizaron 0,137 mg de bscFSH por animal. En los dos ensayos se empleó un esquema de superovulación de 4 dosis de bscFSH (una dosis diaria), administradas de forma decreciente (40% de la dosis total en el día 4, 30% en el día 5, 20% en el día 6, y 10 en el día 7). Los gráficos muestran los valores promedio del número de cuerpos lúteos detectados para el día 9 del ensayo. También se muestran los valores promedio del número de estructuras recuperadas después del lavado uterino, el número de embriones viables, y el número de embriones degenerados y ovocitos no fertilizados. Para cada uno de estos parámetros, se muestra una barra con la desviación estándar.

5.9. Determinación de la estabilidad de la formulación de bscFSH

Conociendo la dosis y esquema de administración de la bscFSH, se decidió modificar el prototipo funcional Cebitropin B. En su nueva forma de presentación este prototipo consta de una caja conteniendo dos viales con capacidad para 20 mL. Uno de los viales contiene 0,3 mg de la bscFSH liofilizada en presencia de NaCl (10.37 μ g), KCl (0.04 μ g), Na₂HPO₄ (0.284 μ g) y KH₂PO₄ (0.054 μ g). El segundo vial contiene 20 mL de una solución de reconstitución estéril consistente en sacarosa (50mg/mL), citrato de sodio di-hidratado (14,7 mg/mL) polisorbato 20 (0,2 mg/mL) y DL metionina (0,7 mg/mL), pH7. La figura 19 muestra una imagen de prototipo Cebitropin B usado en los ensayos de campo posteriores.

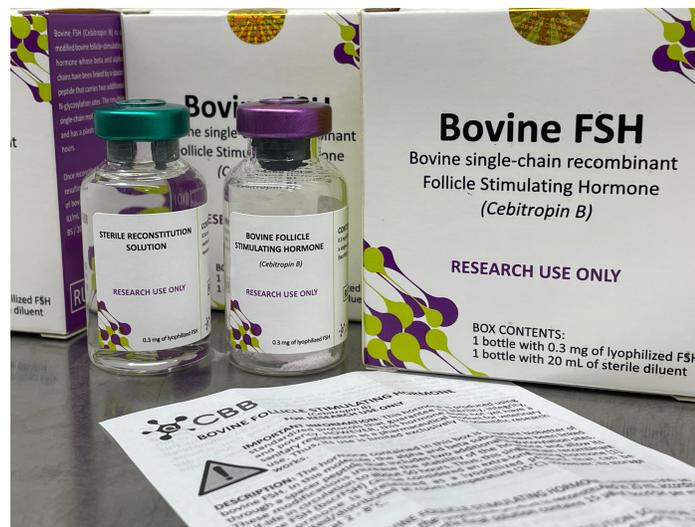


Fig. 5-19: Prototipo funcional Cebitropin B. Se trata de una caja con dos viales, uno de los cuales contiene 0,3 mg de bscFSH mientras que el otro contiene 20 mL de solución de reconstitución estéril. Este prototipo es de uso exclusivo de investigación (RUO, por sus siglas en inglés, Research use only).

A partir de dos lotes diferentes de bscFSH, se realizaron ensayos de estabilidad durante 6 meses a 4°C. El ensayo perseguía detectar alteraciones tanto en la

integridad de la hormona, como en su capacidad para inducir maduración folicular en bovinos. Con este propósito se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida de ambos lotes, tanto en el tiempo 0 (T0) correspondiente a los lotes recién liofilizados, como en tiempo 6 (T6), correspondiente a los lotes después de 6 meses de almacenamiento a 4°C. El SDS-PAGE, mostró que pasados 6 meses a 4°C, la mayor parte de la hormona se mantiene íntegra, migrando como una banda ancha en torno a los 48 kDa. Sin embargo, también se pudo observar la presencia de bandas más tenues con un peso molecular inferior a los 48 kDa, lo que sugiere que podría existir algo de degradación en las muestras almacenadas (Fig. 5-20A y 5-20B).

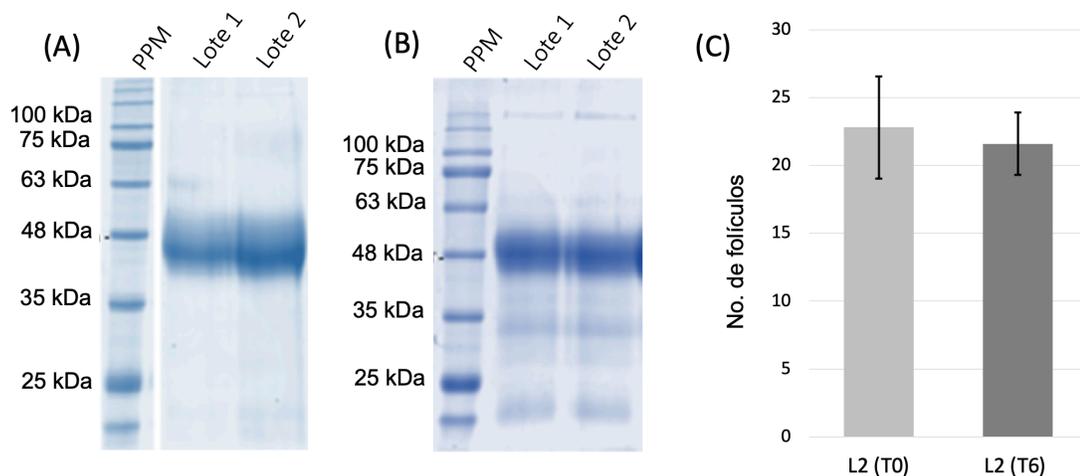


Fig. 5-20: Ensayo de estabilidad durante 6 meses a 4°C. (A) SDS-PAGE de muestras de los lotes 1 y 2 de bscFSH, recién liofilizados (B) SDS-PAGE de muestras de los lotes 1 y 2 de bscFSH, después de 6 meses de almacenamiento a 4°C. Tanto para A como para B, el término PPM se refiere al patrón de peso molecular. La preparación de las muestras de bscFSH se realizó reconstituyendo el liofilizado en 100 μ l de agua y aplicando 15 μ l en cada carril (45 μ g totales). (B) Determinación ecográfica de estructuras foliculares estimuladas a nivel ovárico, utilizando protocolos de superovulación con bscFSH del lote 2, en los tiempos 0 y 6 meses. El número de promedio folículos fue de $22,4 \pm 3,8$ para el grupo que utilizó la hormona recién liofilizada (T0), Mientras que la hormona almacenada por 6 meses a 4°C rindió un promedio de $21,6 \pm 2,3$ folículos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p > 0,05$).

El ensayo de actividad biológica se realizó solo con el lote 2. Para este ensayo se utilizaron 5 vaquillas de raza Aberdeen Angus rojo. Se usaron las mismas vaquillas para evaluar, tanto el tiempo 0 como el Tiempo 6, (correspondiente a los 6 meses de almacenamiento a 4°C). En ambos ensayos, las vaquillas se sometieron a un protocolo de superovulación similar al mostrado en la figura 5-17A, con la única modificación de que no se realizó lavado uterino para recuperar embriones resultado de la ovulación. En su lugar, la actividad de la hormona se determinó mediante ultrasonografía en el día 8 del ensayo, contabilizando los folículos de más 1 cm de diámetro. Los resultados de estos ensayos muestran que no existe diferencias significativas entre el número de folículo maduros inducidos por la hormona recién preparada, y aquella almacenada por 6 meses a 4°C (Fig. 5-20C).

5.10. Caracterización de parámetros farmacocinéticos de bscFSH

Se realizaron pruebas farmacocinéticas en bovinos macho castrados de aproximadamente 250 Kg. Para la realización del ensayo, se crearon dos grupos experimentales de 5 animales cada uno. A uno de los grupos se le administró 0,3 mg de bscFSH por vía intravenosa, mientras que al otro se les administró 0,3 mg de bscFSH por vía intramuscular. A todos los animales se les tomó muestras de sangre en el tiempo 0, y durante las 120 horas posteriores a la administración

de bscFSH. Los niveles de FSH en sangre se determinaron mediante un sistema ELISA.

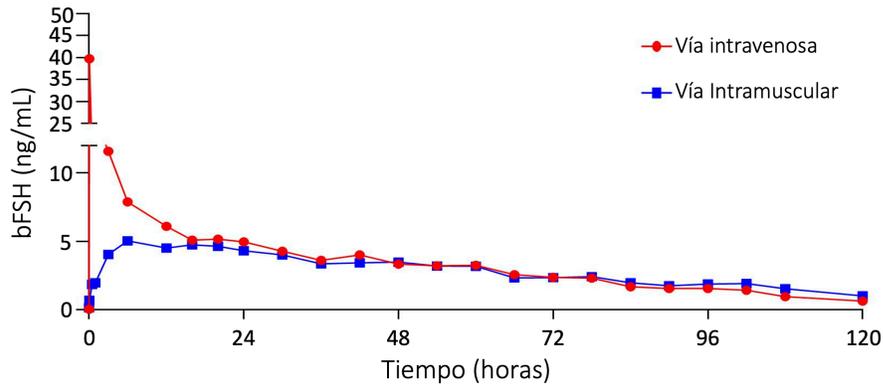


Fig. 5-21: Curvas de concentración plasmática de bscFSH (ng/mL). Análisis de los niveles plasmáticos de bscFSH después de la administración en bovinos de una dosis única de 0,3 mg de bscFSH. La curva en color rojo muestra los niveles promedio de FSH plasmática en el grupo que recibió la hormona por vía intravenosa. La curva en color azul muestra los niveles promedio de FSH plasmática en el grupo que recibió la hormona por vía intramuscular. Las muestras de sangre se colectaron en los tiempos 0, 0.08, 0.5, 1, 3, 6, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108 y 120 horas. La FSH en plasma se cuantificó mediante ELISA.

A pesar de la elevada dosis administrada en una única inyección, ninguno de los animales mostró reacciones adversas al medicamento. No se observaron alteración de comportamiento espontáneo, ni tampoco como resultado de la manipulación durante las 120 h de muestreo. Durante las primeras 12 horas del ensayo, las curvas de concentración de bscFSH en sangre, fueron diferentes entre los grupos experimentales. Sin embargo, para la hora 16 los niveles plasmáticos de bscFSH alcanzaron valores similares en ambos grupos experimentales, y se comportaron de forma similar hasta el final del ensayo (Fig. 5-21).

Las concentraciones plasmáticas de bscFSH se analizaron con el software no compartimental PK Solution 2.0. Estos modelos estiman un compartimiento abierto donde el fármaco ingresa al organismo acorde a una constante de velocidad de absorción (k_a), y son eliminados del organismo acorde una constante de velocidad de eliminación (k_e). Específicamente para el grupo donde se realizó la administración intramuscular, se definió los intervalos de la fase de absorción entre los tiempos 0,08 y las 3 h; la fase de distribución/absorción entre la hora 6 a la hora 60; y la fase de eliminación entre las horas 66 a 120. La velocidad calculada por el programa para la constante de velocidad de absorción (k_a) fue de $0,2614 \text{ h}^{-1}$, mientras que la k_e fue de $-0,0072 \text{ h}^{-1}$. Usando la vía de administración intramuscular, la concentración máxima (C. máx) de 5 ng/ml que se logra a las 11 h ($t_{\text{máx}}$). El área bajo la curva (AUC 0-T) desde hora 0 hasta la hora 120 fue de 349,9 ng-h/mL; mientras que el tiempo de residencia (TMR) es de 66,44 h. El tiempo de vida media en circulación es de 44,16 h y el volumen de distribución (V_d) fue de 44,98 L (Tabla 1, superior).

Tabla 5-1: Promedio de valores farmacocinéticos: El panel superior muestra los resultados individualizados por animal para el grupo donde se administró la bscFSH por vía intramuscular. El panel inferior muestra los resultados individualizados por animal para el grupo donde se administró la bscFSH por vía intravenosa. Al final de cada panel, se muestran los valores promedios de los diferentes parámetros farmacocinéticos. t máx (hr): tiempo máximo; C. MÁX (ng/mL): concentración máxima; AUC 0-T (ng-hr/mL): área bajo la curva de 0-T; AUC INF (ng-hr/mL): área bajo la curva del último tiempo al infinito; AUMCC (ng-hr*hr/mL) área bajo la curva al primer momento; MRT (Hr): tiempo medio de residencia; t ½ (hr): tiempo de vida media; Vd (L): volumen de distribución y, Ke (1/hr): constante de eliminación. Cada uno de estos parámetros fue entregado por el software no compartimental PK Solution 2.0, luego de analizar las concentraciones séricas de bscFSH en los dos grupos experimentales.

	No. Animal	t máx (hr)	C. MÁX (ng/ml)	AUC 0-T (ug-hr/ml)	AUC INF (ng-hr/ml)	AUMC (ng-hr*hr/ml)	MRT (hr)	t 1/2 (hr)	Vd (L)	Ke (1/hr)
Vía Intramuscular	BOVINO 1	16	8,4	537,8	654	50293	76,9	58,7	47,22	-0,0051
	BOVINO 2	24	2,9	186,5	208,6	12519	60	29,5	68,4	-0,0102
	BOVINO 3	6	8,7	562	669,4	46634	69,7	42,9	33,1	-0,0070
	BOVINO 4	3	6,9	387,1	472	33539	71,1	45,8	51,2	-0,0066
	BOVINO 5	6	2,7	76	85,4	4654	54,5	43,9	24,99	-0,0069
	Prom IM	11	5,92	349,88	417,88	29527,8	66,44	44,16	44,982	-0,0072
	<i>Desv Est.</i>		8,775	2,9295	214,1246	262,8141	20297,2322	9,0249	10,3763	16,8296
Vía Intravenosa	BOVINO 6	0	51,6	199,2	216,9	10291	47,4	42,9	5,8	-0,0070
	BOVINO 7	0	29,6	493	552,3	30151	54,6	40,4	10,15	-0,0074
	BOVINO 8	0	55	581,9	627,7	28729	45,8	37	5,45	-0,0081
	BOVINO 9	0	17,9	261,4	287	13458	46,9	36,6	16,73	-0,0082
	BOVINO 10	0	46,1	571,1	603,7	27772	46	37,7	6,51	-0,0079
	PromEV	0	40,04	421,32	457,52	22080,2	48,14	38,92	8,928	-0,0077
	<i>Desv. Est.</i>		0	15,7586	179,0738	191,2382	9421,6308	3,6699	2,6734	4,7458

El análisis de las concentraciones plasmáticas de bscFSH, en el grupo donde la hormona se administró por vía intravenosa mostró que la concentración plasmática máxima de 40,04 ng/mL se alcanza inmediatamente después de la administración. Es necesario tomar en cuenta que para este grupo no existe fase de absorción. Por tanto, se consideró que la fase de distribución abarca el intervalo de tiempo desde las 0,5 hasta las 6 horas, mientras que la fase de eliminación fue acotada entre las 12 y las 120 horas. En base a estas definiciones, la k_e calculada para este grupo fue de -0.0077 h, y las variables farmacocinéticas fueron las siguientes: AUC 0-T de 421,3 ng-h/mL, el TMR de

48,14 h, tiempo de vida media en circulación de 38,92 h y el Vd de 8,93 litros (Tabla 1, inferior).

Si bien la administración de FSH por vía endovenosa, no se usa en los protocolos de superovulación; en nuestro caso el uso de esta vía nos permite contrastar los parámetros farmacocinéticos de la bscFSH con aquellos obtenidos cuando la hormona se administra por vía intramuscular. Así, una comparación utilizando un test-t no pareado, entre los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en ambos grupos muestra que la vía de administración no se traduce en una diferencia significativa en parámetros tales como área bajo la curva entre las 0 y 120 horas (AUC 0-t), área bajo la curva entre el momento 0 y el infinito (AUC 0- ∞), constante de eliminación (K_e) y tiempo de vida media en circulación ($t_{1/2}$). La comparación entre ambos ensayos si permitió detectar diferencias significativas entre los volúmenes de distribución (Vd) ($P=0,0017$), y entre los tiempos medios de residencia (MRT) ($P=0,003$) (Fig. 22). La administración endovenosa e intramuscular en bovinos de una concentración similar de bscFSH (300 μg), permitió establecer la biodisponibilidad relativa a nivel plasmático del fármaco, la que correspondió a un 83,05%. Este elevado valor de la hormona recombinante (bscFSH), determina que gran parte de la dosis administrada por vía intramuscular se encuentra disponible para el efecto deseado de superovulación.

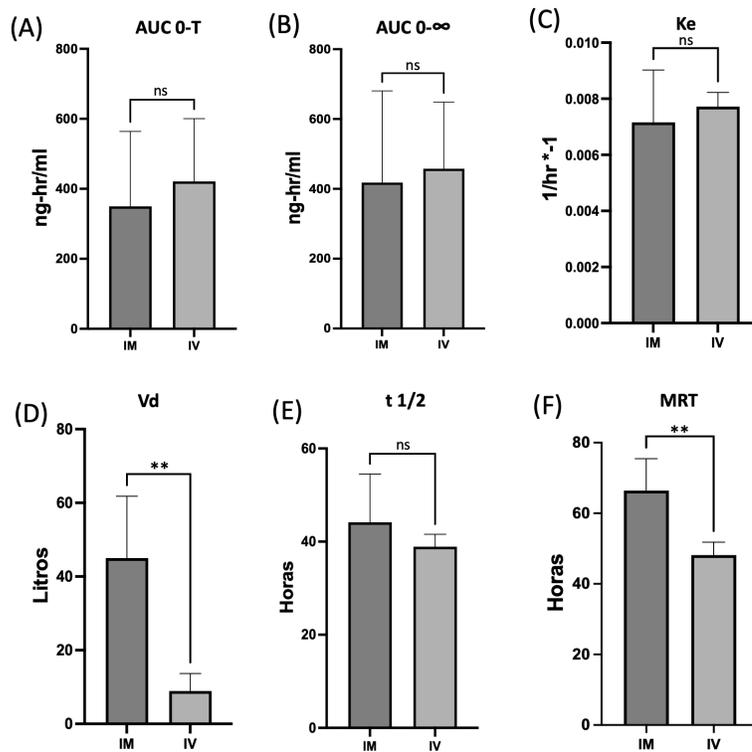


Fig. 5-22: Comparación de parámetros farmacocinéticos entre dos vías de administración de bscFSH. (A) Gráfico que compara el área bajo la curva entre las 0 y 120 horas (AUC 0-t); (B) Gráfico que compara el área bajo la curva entre el momento 0 e infinito (AUC 0-∞); (C) Gráfico que compara las constantes de eliminación (K_e); (D) Gráfico que compara los volúmenes de distribución (Vd); (E) Gráfico que compara los tiempos de vida media en circulación ($t_{1/2}$); (F) Gráfico que compara los tiempos medios de residencia (MRT). Para todos los gráficos IM se refiere al grupo donde la bscFSH se administró por vía intramuscular, mientras que IV se refiere al grupo donde la hormona se administró por vía endovenosa.

5.11. Determinación de perfil de seguridad de la formulación de bscFSH

Los ensayos de farmacocinética realizados previamente permitieron demostrar que dosis tan altas como 0,3 mg de FSH administradas en una única inyección, tanto por vía intramuscular, como por vía intravenosa; no provocan alteración de comportamiento espontáneo de los animales, ni tampoco como resultado de la manipulación durante los 5 días posteriores a la administración. Esta observación, aunque no constituye un resultado formal de toxicidad, si sugiere

que la bscFSH es bien tolerada en bovinos, incluso cuando se administra el total de la dosis contenida en un frasco.

Con este antecedente, se decidió realizar un ensayo específico para caracterizar la seguridad de bscFSH. El ensayo se realizó en 5 vacas de aproximadamente 450 kg cada una. Con el propósito de sincronizar el celo, en el día cero, a todos los animales se les implantó un dispositivo de aplicación intravaginal a base de progesterona (CIDR), y se les administró 2 mg de benzoato de estradiol. En el día 4, a cada animal se le administró una única inyección intramuscular con 0,5 mg de bscFSH. Esta es una dosis 8,3 veces más alta que la dosis más alta establecida en el protocolo de superovulación que se describe en la figura 5-17A. Después de la administración de bscFSH se monitoreó el comportamiento de los animales durante las siguientes 48 horas. Ninguno de los animales mostró cambios conductuales. Tampoco se detectaron signo de dolor general, ni signos de dolor local en respuesta a la palpación en el sitio de administración.

El análisis termográfico local mostró fluctuaciones pequeñas, entre 0,2°C y 0,5°C, durante las primeras 6 horas después de lo cual la temperatura se estabilizó. Estas variaciones no resultaron significativas según se pudo corroborar mediante un análisis de varianza (ANOVA). Tampoco se detectaron cambios estadísticamente significativos en la frecuencia respiratoria ni en temperatura rectal de ningún animal ($p > 0,05$). Los valores determinados para todos los animales se encuentran dentro de los rangos definidos para la especie,

con temperaturas rectales de $38\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y las frecuencias respiratorias en los 18 a 28 ciclos por minuto (Fig. 5-23).

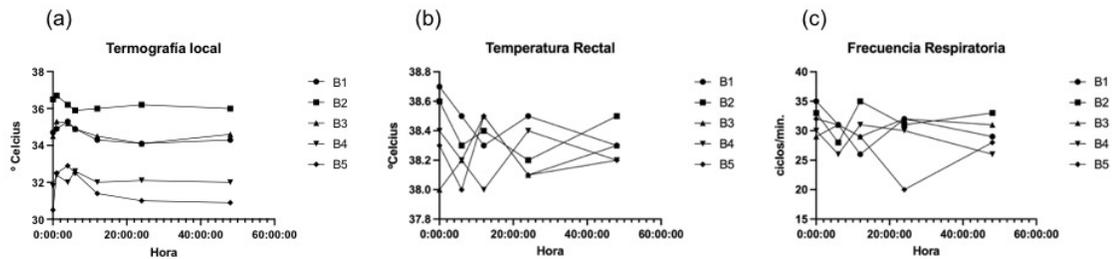


Fig. 5-23: Parámetros fisiológicos individuales 48 h postratamiento de una dosis única de bscFSH en bovinos: (A) termografía local individual en la zona del glúteo medio, (B) temperatura rectal y frecuencia respiratoria (C). Aunque los valores de correlación son negativos no presentan diferencias significativas para cada individuo evaluado, durante el período de 48 h ($p>0,05$).

A todos los animales utilizados en el ensayo también se le hizo un seguimiento ecográfico para evaluar los cambios foliculares resultado de la administración de una dosis elevada de bscFSH. Las ecografías se realizaron en los días 1, 7 y 13 de ensayo. La figura 5-24 muestra imágenes ecográficas obtenidas desde uno de los animales (vaca 6968). Estas imágenes son representativas de lo observado en los 5 de los animales usado en el ensayo. En el día 1, previo a la administración de la bscFSH, se puede observar la presencia de una estructura luteal madura. Esta estructura se marca con un asterisco en la Figura 5-24A. En el día 7 del ensayo, o sea, tres días después de la administración de 0,5 mg de bscFSH, se puede observar un crecimiento folicular en los ovarios de todos los animales usados en el ensayo. En esta etapa, se pudo contabilizar un promedio de 27,3 folículos por animal, con diámetro promedio de $10,3\text{ mm}\pm 0,6$ (Fig. 5-24B). En la ecografía correspondiente al día 13 se puede observar un gran

número de folículos anovulatorios, mayores a 13 mm. Estas estructuras se muestran en la figura 5-24C marcadas con 3 asteriscos. En esta etapa también es posible visualizar estructuras ovuladas consistentes, principalmente en cuerpos hemorrágicos. Una de estas estructuras se muestra en la figura 5-24C marcadas con 4 asteriscos. La presencia de un gran número de folículos anovulatorios en el día 13 del ensayo, es un indicador de asincronía, similar al observado en ensayos previos durante la etapa de ajuste de dosis. Esta asincronía se debe a un exceso en la dosis bscFSH.

Una vez terminado el ensayo, en el día 16, a todos los animales se les administró prostaglandinas con el propósito de inducir su retorno al ciclo estral normal. La manifestación de estro se observó entre las 24 y 36 horas posteriores a la administración de prostaglandinas. El seguimiento de retorno de la etapa de estro en ciclo estral normal, posterior a la manifestación de calor, se presentó en todos los animales entre los días 19 a 21.

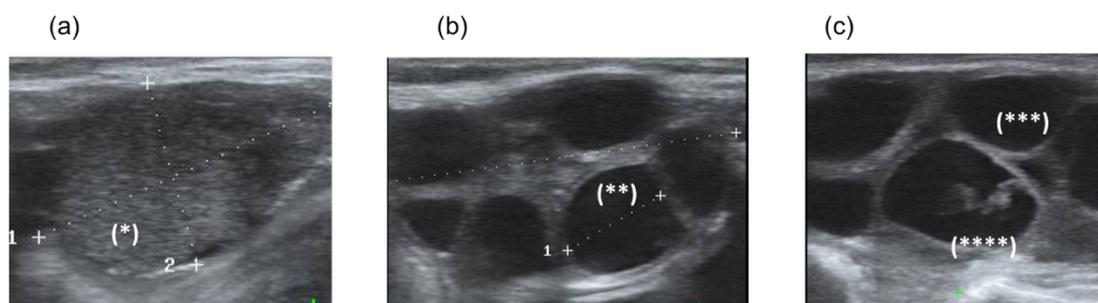


Figura 5-24: Seguimiento ecográfico de estructuras ováricas en una vaca tratada con 500 µg de bscFSH por vía intramuscular, los días 1, 7 y 13 de protocolo estándar (Mindray DP60, transductor 5 MHz). (a) Día 1 protocolo superovulación con presencia de estructura luteal madura (*); (b) estructuras foliculares el día 7 con diámetro promedio de 10,3 mm±0,6 (**). (c) Día 13 de superovulación, con gran presencia de folículos anovulatorios mayores a 13 mm (***) y cuerpo hemorrágico (****).

6. DISCUSIÓN

El éxito de la superovulación y la recuperación de embriones en el ganado bovino utilizando la tecnología de transferencia de embriones, depende de numerosos factores relacionados con el donante, ambientales y de manejo (Bó and Mapletoft 2020; Mikkola and Taponen 2017). Durante los aproximadamente 40 años de evolución de la superovulación en esta especie, el número de embriones viables recuperados por donante no ha aumentado apreciablemente (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022; Hasler 2014; Mikkola and Taponen 2017), y en lugar de aumentar el número de embriones transferibles, las mejoras en este campo se han desarrollado en los protocolos, en el manejo y bienestar animal (Bó and Mapletoft 2020; Hasler 2014; Kimura et al. 2007; Mikkola and Taponen 2017; Mogollón Waltero and Burla Dias 2013; Tríbulo et al. 2011; Vijayalakshmy, Manimegalai, and Verma 2018). El factor limitante más significativo asociado a la donante para el éxito de la superovulación, continúa siendo la imprevisibilidad en la respuesta ovárica en las donantes, debido a la alta variabilidad entre individuos (Mikkola and Taponen 2017; Sendag et al. 2008) a la estimulación con gonadotropinas, siendo la población sensible de folículos al inicio del tratamiento un factor fundamental (Bó and Mapletoft 2020; Mikkola and Taponen 2017). Un problema asociado que persiste en la práctica de los protocolos de superovulación es la necesidad de administrar FSH derivada de tejidos cada 12 h, que pueden afectar negativamente en los resultados, pueden provocar un estrés indebido que tiende

a reducir la respuesta superovulatoria y comprometer el rendimiento de embriones transferibles (Bó and Mapletoft 2020; Carvalho et al. 2014; Genzebu 2015; Kanitz et al. 2003; Tríbulo et al. 2012) y/o alterar la liberación preovulatoria de LH (Bó Gabriel, Mapletoft 2020). Por lo tanto la optimización y simplificación de los protocolos de superestimulación debiera tender a reducir el manejo de donantes y mejorar la respuesta, particularmente en animales menos tratables, generando un manejo más amigable (Bó and Mapletoft 2020; Mogollòn Waltero and Burla Dias 2013; Vijayalakshmy, Manimegalai, and Verma 2018).

6.1. Hormona FSH recombinante de simple cadena bovina (bscFSH)

Los programas de superovulación utilizan principalmente pFSH, cuya limitante es el tiempo de vida media de 5 h y la necesidad de utilizar dos tratamientos al día en los animales donantes (Bó Gabriel, Mapletoft 2020; Demoustier et al. 1988; Mogollòn Waltero and Burla Dias 2013; Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F. and Boland 1993), siendo una condición no deseable por el efecto negativo en el rendimiento embrionario de las donantes asociado al manejo (Bó Gabriel, Mapletoft 2020; Kanitz et al. 2003; Tríbulo et al. 2012). Frente a estas complicaciones de uso, los esfuerzos de los investigadores se han enfocado en buscar condiciones que permitan incrementar los tiempos de vida media de la pFSH, utilizando polímeros asociados a estrategias de administración de vías subcutáneas o intramuscular, como polivinilpirrolidona, hialuronano o hidroxido de aluminio (Bó and Mapletoft

2020; KIMURA 2016; Kimura et al. 2007; Ongaratto F. L., Tríbulo A., Ramos M., Rodriguez P. 2010; Tríbulo et al. 2012). Esta estrategia de uso de hormonas derivadas de tejidos, presenta limitantes, que extiende las posibilidades a los desarrollos de FSH recombinantes, que se diferencian al utilizar la tecnología de ADN, en pureza, vida media, potencia y no presentar contaminantes patogénicos (Adams and Boime 2008). Como la vida media está directamente relacionada con su patrón de glicosilación, las gonadotropinas de acción prolongada se han generado basado en dos estrategias: inclusión de sitios de O-glicosilación adicionales al incorporar una cola de CTP (péptido terminal COOH) en la construcción, comúnmente como conector entre las subunidades alfa y beta (Lustbader 2003; Sanderson and Martinez 2020), incluyendo 4 a 12 sitios adicionales de O-glicosilación. La segunda estrategia es la adición de un enlazador sintético entre las subunidades alfa y beta, que incluye una o varias secuencias Asn-X-Ser/Thr, que determinan entre dos a cuatro sitios potenciales de N-glicosilación adicionales (Sanderson and Martinez 2020; Szkudlinski, Mariusz; Weintraub 2011; Trousdale et al. 2009). Esta estrategia de incremento de sitios potenciales de N-glicosilación fue la determinada para el diseño de la hormona bscFSH, al incorporar dos sitios potenciales de N-glicosilación en el péptido espaciador, incrementando los N-glicanos altamente sialilados, que permitió disminuir el número de aplicaciones a la mitad de la posología utilizada en programas de superovulación en comparación a la FSH porcina. El ácido siálico confiere en los extremos de las cadenas oligosacáridas una mayor vida

media, al evitar que la molécula sea captada por los receptores de manosa y galactosa del hígado, condiciones necesarias para incrementar la solubilidad y estabilidad de las proteínas (Hesser, Morris, and Gibbons 2011). Adicionalmente este diseño que utiliza el péptido espaciador, mantiene covalentemente unidas las cadenas alfa y beta de la FSH y permite dar libertad estérica a la hormona, manteniendo un adecuado acoplamiento molecular con la proteína G. Además esta hormona bscFSH presenta en su secuencia génica, integrada con vectores lentivirales, la GFP para el proceso de selección de clones de manera más eficiente y de alta producción (Meng et al. 2000), utilizando el sistema FASIT (Bravo et al. 2020). Este diseño bicistriónico de la unidad transcripcional, permite integrar el gen de interés y una secuencia IRES, seguida de un gen que codifica la proteína GFP, siendo la traducción de estos genes mediados por mecanismos dependientes de cap (cápside) y de IRES (Bravo et al. 2020). Esta herramienta de selección puede generar acumulación tóxica de GFP a nivel celular, afectando la viabilidad y duplicación celular (Ansari et al. 2016), junto con generar posibles cuestionamientos regulatorios la coexpresión de GFP en células de cultivo (Ansari et al. 2016; Bravo et al. 2020). La solución determinada en estos constructos son los sitios LoxP que flanquean las secuencias codificantes IRES y GFP, una estrategia de diseño que permite superar estos inconvenientes en clones productivos (Bravo et al. 2020), al escindir estas secuencias con plásmidos que contienen la recombinasa CRE.

Esta hormona, cuenta en su diseño hacia el extremo C terminal, con etiquetas de 6 histidinas que mejoran la capacidad de rendimiento de los procesos de purificación a un solo paso en IMAC, logrando un rendimiento de 97% de pureza de esta hormona bovina de simple cadena. La pureza de la bscFSH y su condición de no presentar glicoproteínas contaminantes de LH ni patogénicos, establece una diferencia significativa con las FSH derivadas de pituitaria de cerdo (p-FSH). Estas hormonas derivadas de tejidos, presentan limitantes de certificación, riesgos de contaminación de patógenos, riesgos de zoonosis, respuesta inmune en las donantes e interferencia en la producción de embriones (Biancucci et al. 2016; Genzebu 2015; Gutiérrez-Reinoso et al. 2022; Ongaratto et al. 2011; Tríbulo et al. 2011)

6.2. Cinética bscFSH, y protocolos de superovulación

Las variables farmacocinéticas establecidas para la bscFSH, determinaron un elevado tiempo medio de residencia del fármaco y un tiempo de vida media mayor a las 44 horas, al ser utilizada por vía intramuscular. Estos valores son muy superiores a las 5 h de tiempo de vida media de las FSH de origen porcino (Bó Gabriel, Mapletoft 2020; Demoustier et al. 1988; Mogollón Waltero and Burla Dias 2013; Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F. and Boland 1993), condición que determina perspectivas interesantes de optimización de la bscFSH en programas de superestimulación ovárica en bovinos, considerando que el protocolo de

tratamiento ideal se relaciona con un aumento de los niveles de FSH circulante a valores comparables a los requeridos para la inducción de emergencia de ondas foliculares, y mantener estos niveles durante al menos 72 h (o 36 h para la superestimulación antes de captación del óvulo), para permitir que los folículos alcancen un tamaño ovulatorio y adquieran la capacidad de ovular (Bó Gabriel, Mapletoft 2020). El tamaño folicular en la emergencia de la onda folicular del futuro folículo dominante se determina en 4 mm (Lopez, Sartori, and Wiltbank 2005), con crecimientos que están limitados por la existencia de uno o más folículos dominantes, siendo definido los folículos codominantes como dos o más folículos de 10 mm de diámetro que aún no han sufrido una desviación de diámetro (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022; Lopez, Sartori, and Wiltbank 2005). En esta etapa la FSH es la principal responsable para el reclutamiento de folículos para la generación de ondas de crecimiento (Aerts and Bols 2010; García Guerra et al. 2015).

Esta hormona recombinante bscFSH ajustada a la mitad de la frecuencia de utilización para protocolos de superovulación en bovinos, comparado a las 8 dosis requerida por las FSH extractadas de pituitaria de cerdo (Bó, Rogan, and Mapletoft 2018; Sanderson and Martinez 2020; Tríbulo et al. 2012), es una alternativa válida por los mejores resultados obtenidos en el número de embriones transferibles, similar a lo observado por Gutierrez-Reinoso que determinó un número significativo de embriones colectados grado I en

comparación con el grupo que utilizó NIH-FSHp, siendo principalmente mórulas compactas, que indica a su vez que los folículos preovulatorios tendrían un rango más estrecho y sincrónico a la estimulación con bscFSH (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022). El número de embriones transferibles al utilizar FSH extractadas de tejidos, determinan colectas en promedio de 7 embriones para Folltropin y 7,1 embriones para Pluset (Mikkola and Taponen 2017), promedios que son inferiores a lo obtenido con la bscFSH, condición que determina la limitación de producción de embriones viables con estas hormonas derivadas de tejidos de cerdo (Hasler 2014).

Este ajuste de frecuencia simplifica los protocolos de manejo, que representa uno de los factores más relevantes que se han esmerado diversos investigadores en solucionar en las hembras donantes estas últimas décadas, para establecer perfiles de FSH que podrían ser útiles para la optimización de la respuesta superovulatoria (Bó Gabriel, Mapletoft 2020). Esta corta vida media de la p-FSH, determina administraciones dos veces al día que requiere de mucha mano de obra y causa estrés en el ganado donante, lo que da como resultado una disminución de la respuesta superovulatoria y una inhibición de la luteinización (KIMURA 2016).

Una condición diferenciadora al utilizar la bscFSH en relación a la FSH porcina, es la elevada capacidad de estímulo ovárico, determinado por una respuesta

folicular potente y gran porcentaje de generación de cuerpos lúteos. Esta diferencia se explica al no presentar contaminantes hormonales (LH), como lo observado en las FSH derivadas de tejidos. Estas respuestas con mayor o menor contenido de LH se han podido comparar entre hormonas derivadas de tejidos, al observar el efecto en el desarrollo folicular. Se ha considerado que la utilización de Folltropin-V con bajos niveles de LH, presenta un nivel superior de estructuras ováricas en comparación con Pluset o eCG, que presentan una actividad de LH relativamente alta, lo que establece el efecto nocivo de exceso de LH en la gonadotropina (Ferré L., Bogliotti Y., Chitwood J., Kjelland M. 2015; Mikkola and Taponen 2017; Sendag et al. 2008). El rendimiento de folículos por vaca frente a la utilización de Pluset (FSH porcina) y eCG, fue en promedio de 13,8 folículos y 7,7 folículos, respectivamente (Sendag et al. 2008), determinando que la respuesta ovárica y el número de folículos en los ovarios, es dependiente del tipo de gonadotropina.

Por el contrario, los niveles adecuados de FSH y la ausencia de LH mejoran la respuesta superovulatoria, la calidad de los ovocitos, la tasa de ovulación y el número de embriones recolectados (Bó and Mapletoft 2014; Gutiérrez-Reinoso et al. 2022), como lo reportado en este ensayo, y que es coincidente con otros estudios que determinaron diferencias significativas en el número de CL entre los protocolos de superovulación que utilizó bscFSH, con respecto a la utilización de Folltropin (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022). Se han observado resultados más

pobres al utilizar una FSH recombinante ovina en bovinos, siendo definido por los autores como una estimulación ovárica exitosa con un promedio de 11,8 cuerpos lúteos y 6,1 embriones de buena calidad recolectados en vacas (Sanderson and Martinez 2020), que puede ser asociado a que no es una hormona recombinante especie específica. Por el contrario en estudios más antiguos que han utilizado FSH recombinantes, existen discrepancias de los resultados al utilizar en un grupo de bovinos FSH recombinante humana pura (rhFSH), sin contenido de LH, y un grupo con eCG (alto contenido de LH contaminante), donde se determinó diferencias en la respuesta más baja de embriones y en las concentraciones de estradiol y progesterona, que podría estar determinada por la falta de actividad de LH (Takagi et al. 2001), condición que puede haberse debido a una falla de ajuste de dosis. En contraposición, la utilización de FSH recombinante bovina en protocolos de ocho dosis, generó una respuesta adecuada de superovulación en vacas (Wilson et al. 1993). Según lo reportado en este trabajo, el uso de la bscFSH aporta interesantes ventajas en protocolos de superovulación, al mejorar los resultados obtenidos con una mayor respuesta ovárica, mejorar la calidad embrionaria y lograr un rendimiento superior en la producción de embriones, con un menor número de aplicaciones en comparación con los protocolos que utilizan FSH porcina (Gutiérrez-Reinoso et al. 2022), siendo una alternativa novedosa, segura y eficaz, que reduce los problemas de bienestar animal, los requisitos de mano de obra e incrementa la obtención de embriones transferibles.

7. CONCLUSIONES

El diseño y formulación de la FSH recombinante bovina de simple cadena (bscFSH), covalentemente unida, expresada en condiciones de suspensión en línea celular CHO, permitió reducir a la mitad la frecuencia de aplicación de los protocolos de superovulación en bovinos, con un rendimiento superior en la respuesta ovárica y colecta de embriones transferibles, respecto a las alternativas disponibles que utilizan FSH extractada de pituitaria de cerdo.

Esta glicoproteína recombinante de alta pureza, especie específica y tiempo de vida media de acción prolongada, se presenta como una alternativa viable de optimización de los protocolos de superestimulación en bovinos, disminuyendo el stress animal, la reacción inmune contra el fármaco y el riesgo de contaminantes patogénicos, logrando protocolos con manejos más amigables.

8. GLOSARIO

µg: microgramo

µL: microlitro

ADN: ácido desoxirribonucleico

BCA: ácido bicinconínico

BSA: albúmina sérica bovina

pb: pares de base

CHO: células de ovario de hámster chino

GFP: proteína verde fluorescente

h: hora

HRP: peroxidasa de rábano picante

IRES: sitio interno de entrada al ribosoma

Kb: kilo pares de bases

min: minuto

mM: milimolar

OPD: orto-fenilendiamina

PBS: tampón fosfato salino

PPM: patrón de peso molecular

PS: péptido señal

RPMI: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

sec: segundo

SFB: suero fetal bovino

TMB: tetrametilbenzidina

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T. E., and I. Boime. 2008. "The Expanding Role of Recombinant Gonadotropins in Assisted Reproduction." *Reproduction in Domestic Animals* 43(SUPPL.2): 186–92.
- Aerts, J. M.J., and P. E.J. Bols. 2010. "Ovarian Follicular Dynamics. A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part II: Antral Development, Exogenous Influence and Future Prospects." *Reproduction in Domestic Animals* 45(1): 180–87.
- Aich, Udayananth et al. 2014. "Evaluation of Desialylation during 2-Amino Benzamide Labeling of Asparagine-Linked Oligosaccharides." *Analytical Biochemistry* 458(April): 27–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.008>.
- Ansari, Amir Mehdi et al. 2016. "Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments." *Stem Cell Reviews and Reports* 12(5): 553–59. <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8>.
- Arnold, Ulrich, and Renate Ulbrich-Hofmann. 1999. "Quantitative Protein Precipitation from Guanidine Hydrochloride-Containing Solutions by Sodium Deoxycholate/Trichloroacetic Acid." *Analytical Biochemistry* 271(2): 197–99.
- Barnes, Louise, Nicolas Moy, and Alan Dickson. 2006. "Phenotypic Variation During Cloning Procedures: Analysis of the Growth Behavior of Clonal Cell Lines." *Biotechnology and Bioengineering* 94(3): 530–37.
- Bartlewski, Pawel M. et al. 2016. "Intrinsic Determinants and Predictors of Superovulatory Yields in Sheep: Circulating Concentrations of Reproductive Hormones, Ovarian Status, and Antral Follicular Blood Flow." *Theriogenology* 86(1): 130–43.
- Baruselli, P. S. et al. 2011. "Timed Embryo Transfer Programs for Management of Donor and Recipient Cattle." *Theriogenology*.
- Bautista Vega, Valeria M. et al. 2019. "FSH in Bovine Superovulation." *Bionatura* 4(1).
- Biancucci, Andrea et al. 2016. "Reducing Treatments in Cattle Superovulation Protocols by Combining a Pituitary Extract with a 5% Hyaluronan Solution: Is It Able to Diminish Activation of the Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis Compared to the Traditional Protocol?" *Theriogenology* 85(5): 914–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.041>.
- Bó Gabriel, Mapletoft, Reuben J. 2020. "Theriogenology Superstimulation of Ovarian Follicles in Cattle : Gonadotropin Treatment Protocols and FSH pro Fi Les." *Theriogenology* (xxxx): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>.
- Bó, Gabriel A., Pietro S. Baruselli, Pablo M. Chesta, and Claudiney M. Martins. 2006. "The Timing of Ovulation and Insemination Schedules in Superstimulated Cattle." *Theriogenology* 65(1): 89–101.
- Bó, Gabriel A., and Reuben J. Mapletoft. 2020. "Superstimulation of Ovarian

- Follicles in Cattle: Gonadotropin Treatment Protocols and FSH Profiles.” *Theriogenology* 150(xxxx): 353–59.
- Bó, Gabriel A., Dragan R. Rogan, and Reuben J. Mapletoft. 2018. “Pursuit of a Method for Single Administration of PFSH for Superstimulation in Cattle: What We Have Learned.” *Theriogenology* 112: 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.034>.
- Bó, Gabriel A, and Reuben J Mapletoft. 2014. “Theriogenology Historical Perspectives and Recent Research on Superovulation in Cattle.” *Theriogenology* 81(1): 38–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>.
- Bravo, Felipe E. et al. 2020. “Fluorescence-Assisted Sequential Insertion of Transgenes (FASIT): An Approach for Increasing Specific Productivity in Mammalian Cells.” *Scientific Reports* 10(1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69709-1>.
- Browne, Susan M., and Mohamed Al-Rubeai. 2007. “Selection Methods for High-Producing Mammalian Cell Lines.” *Trends in Biotechnology* 25(9): 425–32.
- Bushman, Frederic et al. 2005. “Genome-Wide Analysis of Retroviral DNA Integration.” *Nature Reviews Microbiology* 3(11): 848–58.
- Cahoreau, Claire, Danièle Klett, and Yves Combarous. 2015. “Structure-Function Relationships of Glycoprotein Hormones and Their Subunits’ Ancestors.” *Frontiers in Endocrinology* 6(FEB): 1–14.
- Carvalho, Paulo D. et al. 2014. “Use of a Single Injection of Long-Acting Recombinant Bovine FSH to Superovulate Holstein Heifers: A Preliminary Study.” *Theriogenology* 82(3): 481–89.
- Castellanos, Jaime E., and Hernán Hurtado. 2001. “Receptores Para El Virus de La Rabia.” *Biomédica* 21(4): 389.
- Deguettes, Quentin et al. 2020. “Controlled Delivery of Follicle-Stimulating Hormone in Cattle.” *International Journal of Pharmaceutics* 590(September).
- Demoustier, M. M. et al. 1988. “Determination of Porcine Plasma Folliotropin Levels during Superovulation Treatment in Cows.” *Theriogenology* 30(2): 379–86.
- Diaz, Francisco J., Karen Wigglesworth, and John J. Eppig. 2007. “Oocytes Determine Cumulus Cell Lineage in Mouse Ovarian Follicles.” *Journal of Cell Science* 120(8): 1330–40.
- Drion, P. V. et al. 2001. “Increase of Plasma ECG Binding Rate after Administration of Repeated High Dose of ECG to Cows.” *Reproduction Nutrition Development* 41(3): 207–15.
- Edson, Mark A., Ankur K. Nagaraja, and Martin M. Matzuk. 2009. “The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation.” *Endocrine Reviews* 30(6): 624–712. <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2009-0012> (October 25, 2019).
- Farrier, DS. 1997. “PK Solutions 2.0.” *data analysis.*, Summit Research

- Services, Ashland* (. <http://www.summitpk.com/files/PKS2Equations.pdf>).
- Fauser, B. C.J.M. et al. 2009. "Advances in Recombinant DNA Technology: Corifollitropin Alfa, a Hybrid Molecule with Sustained Follicle-Stimulating Activity and Reduced Injection Frequency." *Human Reproduction Update* 15(3): 309–21.
- Ferré L., Bogliotti Y., Chitwood J., Kjelland M., Ross P. 2015. "234 HORMONAL FOLLICLE STIMULATION IN HOLSTEIN COWS FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION USING SPERM SORTED BY FLOW CYTOMETRY." *Reproduction, Fertility and Development* 28: 248–49.
- Filipiak, Y, M Viqueira, and A Bielli. 2016. "Desarrollo y Dinámica de Los Folículos Ováricos Desde La Etapa Fetal Hasta Prepuberal En Bovinos." *Veterinaria* 52: 14–22.
- Fonseca, J. F., J. M.Silva Filho, A. Pinto Neto, and M. S. Palhares. 2001. "Estádios de Desenvolvimento Embrionário de Vacas Zebuínas Superovuladas." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 53(6): 671–76.
- Forde, N. et al. 2008. "Differential Expression of Signal Transduction Factors in Ovarian Follicle Development: A Functional Role for Betaglycan and FIBP in Granulosa Cells in Cattle." *Physiological Genomics* 33(2): 193–204.
- Franco, J. y Uribe, L. 2012. "Hormonas Reproductivas de Importancia Veterinaria En Hembras Domésticas." *Biosalud* 11(1): 41–56.
- García Guerra, A. et al. 2015. "Lengthened Superstimulatory Treatment in Cattle: Evidence for Rescue of Follicles within a Wave Rather than Continuous Recruitment of New Follicles." *Theriogenology* 84(3): 467–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.037>.
- Garverick, H. A. et al. 2002. "Regulation of Expression of Ovarian MRNA Encoding Steroidogenic Enzymes and Gonadotrophin Receptors by FSH and GH in Hypogonadotrophic Cattle." *Reproduction* 123(5): 651–61.
- Genzebu, Dessalegn. 2015. "A Review of Embryo Transfer Technology in Cattle." *Global Journal of animal Scientific Research* 2(c): 120–26.
- Gómez-Sebastián, Silvia, Javier López-Vidal, and José M. Escribano. 2014. "Significant Productivity Improvement of the Baculovirus Expression Vector System by Engineering a Novel Expression Cassette." *PLoS ONE* 9(5).
- Gutiérrez-Reinoso, Miguel A et al. 2022. "Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (BscrFSH) on Cattle Superovulation."
- Ha, Tae Kwang et al. 2022. "Factors Affecting the Quality of Therapeutic Proteins in Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture." *Biotechnology Advances* 54(June 2021): 107831. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107831>.
- Haj Hassan, Maya et al. 2015. "Differential Thermal Stability of Human, Bovine and Ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) Quaternary Structures." *General and Comparative Endocrinology*.
- Hasler, John F. 2014. "Forty Years of Embryo Transfer in Cattle: A Review Focusing on the Journal *Theriogenology*, the Growth of the Industry in

- North America, and Personal Reminiscences." *Theriogenology* 81(1): 152–69.
- Hesser, M. W., J. C. Morris, and J. R. Gibbons. 2011. "Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation." *Reproduction in Domestic Animals* 46(5): 933–42.
- Hunter, M. G., R. S. Robinson, G. E. Mann, and R. Webb. 2004. "Endocrine and Paracrine Control of Follicular Development and Ovulation Rate in Farm Species." *Animal Reproduction Science* 82–83: 461–77.
- Jayapal, Karthik P., Katie F. Wlaschin, Wei Shou Hu, and Miranda G.S. Yap. 2007. "Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells - 20 Years and Counting." *Chemical Engineering Progress* 103(10): 40–47.
- Kanitz, W. et al. 2003. "Superovulation in Cattle: Practical Aspects of Gonadotropin Treatment and Insemination." *Reproduction Nutrition Development* 42(2002): 587–99.
- Khan, D. R., C. Guillemette, M. A. Sirard, and F. J. Richard. 2015. "Characterization of FSH Signalling Networks in Bovine Cumulus Cells: A Perspective on Oocyte Competence Acquisition." *Molecular Human Reproduction* 21(9): 688–701.
- Kimura, Koji et al. 2007. "Successful Superovulation of Cattle by a Single Administration of FSH in Aluminum Hydroxide Gel." *Theriogenology* 68(4): 633–39.
- KIMURA, Koji. 2016. "Superovulation with a Single Administration of FSH in Aluminum Hydroxide Gel: A Novel Superovulation Method for Cattle." *Journal of Reproduction and Development* 62(5): 423–29.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/62/5/62_2016-066/_article (October 24, 2019).
- Knight, Phil G., and Claire Glister. 2006. "TGF- β Superfamily Members and Ovarian Follicle Development." *Reproduction* 132(2): 191–206.
- Kulus, Jakub, Maria Wieczorkiewicz, Kulus Magdalena, and J. Jaskowski. 2019. "Superovulation in Cattle – Searching for the Optimal Dose, Alternative Routes of Administration and a Simplified FSH Application Program." *Medycyna Weterynaryjna* 75(02): 6216–2019.
- Kumar, T. Rajendra, Yan Wang, Naifang Lu, and Martin M. Matzuk. 1997. "Follicle Stimulating Hormone Is Required for Ovarian Follicle Maturation but Not Male Fertility." *Nature Genetics* 15(2): 201–4.
- LAEMMLI, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680–85.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lai, Tingfeng, Yuansheng Yang, and Say Kong Ng. 2013. "Advances in Mammalian Cell Line Development Technologies for Recombinant Protein Production." *Pharmaceuticals* 6(5): 579–603.
- Liu, Jiazhong et al. 2000. "Growth and the Initiation of Steroidogenesis in Porcine Follicles Are Associated with Unique Patterns of Gene Expression for Individual Components of the Ovarian Insulin-Like Growth Factor System 1." *Biology of Reproduction* 63(3): 942–52.

- Looney, C, and J Pryor. 2012. "Novel Bovine Embryo Transfer Technologies in the United States." *Animal Reproduction* 9(3): 404–13.
- Lopez, Hernando, Roberto Sartori, and Milo C Wiltbank. 2005. "Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle 1." 795(November 2004): 788–95.
- Lucy, M. C. 2007. "The Bovine Dominant Ovarian Follicle." *Journal of Animal Science* 85(suppl_13): E89–99.
- Lustbader, Joyce W. 2003. "(12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2003/0143694 A1." 1(19).
- Magarey, G. M., J. C. Rodger, J. M. Buist, and K. E. Mate. 2003. "Effects of Repeated Superovulation and Surgical Oocyte Collection on Ovarian Response and Natural Breeding Ability of the Tammar Wallaby (*Macropus Eugenii*)." *Reproduction* 125(5): 701–7.
- Magoffin, Denis A. 2005. "Ovarian Theca Cell." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37(7): 1344–49.
- Mapletoft, Reuben J et al. 2015. "In Vitro and in Vivo Embryo Production in Cattle Superstimulated with FSH for 7 Days." *Animal Reproduction* 12(3): 383–88.
- McGee, Elizabeth A., and Aaron J.W. Hsueh. 2000. "Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles." *Endocrine Reviews* 21(2): 200–214.
- Meng, Y. Gloria, Jie Liang, Wai Lee Wong, and Vanessa Chisholm. 2000. "Green Fluorescent Protein as a Second Selectable Marker for Selection of High Producing Clones from Transfected CHO Cells." *Gene* 242(1–2): 201–7.
- Mikkola, M., and J. Taponen. 2017. "Embryo Yield in Dairy Cattle after Superovulation with Follitropin or Pluset." *Theriogenology* 88: 84–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.052>.
- Mogollón Waltero, Edgar Mauricio, and Angelo Jose Burla Dias. 2013. "Superovulación de Hembras Bovinas: Alternativas Para Reducir El Número de Inyecciones de FSH." *Spei Domus* 9(18).
- Morón, Francisco y Rodríguez, Mayra. 2002. *Farmacología General*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Morón. Francisco; Rodríguez, Mayra. 2002. *Farmacología General*. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- Mullen, M.P, J Dara, and A Mark. 2013. "Structural and Functional Roles of FSH and LH as Glycoproteins Regulating Reproduction in Mammalian Species." In *Gonadotropin*, , 155–80.
- Nilsson, Eric, Jeff A. Parrott, and Michael K. Skinner. 2001. "Basic Fibroblast Growth Factor Induces Primordial Follicle Development and Initiates Folliculogenesis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 175(1–2): 123–30.
- O'Brien, Marilyn J., Janice K. Pendola, and John J. Eppig. 2003. "A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence1." *Biology of Reproduction* 68(5): 1682–86.

- Oktem, Ozgur, and Bulent Urman. 2010. "Understanding Follicle Growth in Vivo." *Human Reproduction* 25(12): 2944–54.
- Ongaratto F. L., Tríbulo A., Ramos M., Rodriguez P., Bó G. A. 2010. "207 OOCYTE RECOVERY RATES AND IN VITRO BLASTOCYST PRODUCTION IN CATTLE TREATED WITH A SINGLE INJECTION OF FOLLTROPIN-V DILUTED IN A SLOW-RELEASE FORMULATION." *Reproduction, Fertility and Development* 23: 202–3.
- Ongaratto, F. L. et al. 2011. "207 OOCYTE RECOVERY RATES AND IN VITRO BLASTOCYST PRODUCTION IN CATTLE TREATED WITH A SINGLE INJECTION OF FOLLTROPIN-V DILUTED IN A SLOW-RELEASE FORMULATION." *Reproduction, Fertility and Development* 23(1).
- Palomino, J. Manuel et al. 2017. "Effects of ECG and Progesterone on Superovulation and Embryo Production in Wood Bison (*Bison Bison Athabascae*)." *Animal Reproduction Science* 181: 41–49.
- Pawson, Adam J., and Alan S. McNeilly. 2005. "The Pituitary Effects of GnRH." *Animal Reproduction Science* 88(1-2 SPEC. ISS.): 75–94.
- Pepling, Melissa E. 2006. "From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development." *genesis* 44(12): 622–32. <http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.20258> (November 2, 2019).
- Reinhart, David, Lukas Damjanovic, Christian Kaisermayer, and Renate Kunert. 2015. "Benchmarking of Commercially Available CHO Cell Culture Media for Antibody Production." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(11): 4645–57.
- De Rensis, F., and A. R. Peters. 1999. "The Control of Follicular Dynamics by PGF₂ α , GnRH, HCG and Oestrus Synchronization in Cattle." *Reproduction in Domestic Animals* 34(2): 49–59.
- Richards, J S et al. 1995. "Ovarian Cell Differentiation: A Cascade of Multiple Hormones, Cellular Signals, and Regulated Genes." *Recent progress in hormone research* 50: 223–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7740159> (November 3, 2019).
- Richards, Jo Anne S. et al. 1998. "Molecular Mechanisms of Ovulation and Luteinization." *Molecular and Cellular Endocrinology* 145(1–2): 47–54.
- Sanderson, N., and M. Martinez. 2020. "A Single Administration of a Long-Acting Recombinant Ovine FSH (RoFSH) for Cattle Superovulation." *Theriogenology* 154: 66–72.
- Sendag, Sait et al. 2008. "Effects of ECG and FSH on Ovarian Response, Recovery Rate and Number and Quality of Oocytes Obtained by Ovum Pick-up in Holstein Cows." *Animal Reproduction Science* 106(1–2): 208–14. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008000109> (October 24, 2019).
- Skinner, Michael K. 2005. "Regulation of Primordial Follicle Assembly and Development." *Human Reproduction Update* 11(5): 461–71.
- Smith, Michael F., Rodney D. Geisert, and John J. Parrish. 2018. "Reproduction in Domestic Ruminants during the Past 50 Yr: Discovery to Application."

- Journal of Animal Science* 96(7): 2952–70.
- Szkudlinski, Mariusz; Weintraub, Bruce D. 2011. "(12) Standard Patent Application (19) Australian Patent Office." 6004(12): 31–36.
- Takagi, M. et al. 2001. "Impaired Final Follicular Maturation in Heifers after Superovulation with Recombinant Human FSH." *Reproduction* 121(6): 941–51.
- Tanaka, Y., K. Nakada, M. Moriyoshi, and Y. Sawamukai. 2001. "Appearance and Number of Follicles and Change in the Concentration of Serum FSH in Female Bovine Fetuses." *Reproduction* 121(5): 777–82.
- Tavira, Carlos Alberto et al. 2009. "Alcances y Perspectivas Del Cultivo de Células Animales En La Biotecnología Farmacéutica Animal Cell Culture in Pharmaceutical Biotechnology : Research and Perspectives." *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40(4): 35–46. www.redalyc.org.
- Toledo, Jorge R., Yanet Prieto, Nayrobis Oramas, and Oliberto Sánchez. 2009. "Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral Vectors." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157(3): 538–44.
- Tríbulo, Andrés et al. 2011. "Superstimulation of Ovarian Follicular Development in Beef Cattle with a Single Intramuscular Injection of Folltropin-V." *Animal Reproduction Science* 129(1–2): 7–13.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.10.013>.
- Tríbulo, Andrés et al. 2012. "Superovulation of Beef Cattle with a Split-Single Intramuscular Administration of Folltropin-V in Two Concentrations of Hyaluronan." *Theriogenology* 77(8): 1679–85.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X11006637> (October 24, 2019).
- Trousdale, Rhonda K. et al. 2009. "Efficacy of Native and Hyperglycosylated Follicle-Stimulating Hormone Analogs for Promoting Fertility in Female Mice." *Fertility and Sterility* 91(1): 265–70.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.013>.
- Ulloa-Aguirre, Alfredo et al. 2018. "Structure-Function Relationships of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor." *Frontiers in Endocrinology* 9(November): 1–17.
- UniProt, Consortium. 2019. "UniProt: A Worldwide Hub of Protein Knowledge." *Nucleic Acids Research* 47(D1): D506–15.
- Valdez, Kelli E., S. Peder Cuneo, and Adele M. Turzillo. 2005. "Regulation of Apoptosis in the Atresia of Dominant Bovine Follicles of the First Follicular Wave Following Ovulation." *Reproduction* 130(1): 71–81.
- Vijayalakshmy, Kennady, J Manimegalai, and Ranjeet Verma. 2018. "Embryo Transfer Technology in Animals: An Overview." *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6(5): 2215–18.
- Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F. and Boland, M.P. 1993. "Theriogenology40:313-321,1993." *Theriogenology* 40: 313–21.

- Wilson, J M, A L Jones, K Moore, and C R Looney. 1993. "Superovulation of Cattle with a Recombinant- D N A Bovine Follicle Stimulating Hormone." 33: 71–82.
- Wiznerowicz, Maciej, and Didier Trono. 2005. "Harnessing HIV for Therapy, Basic Research and Biotechnology." *Trends in Biotechnology* 23(1): 42–47.
- Wu, Xuemei et al. 2004. "Interrelationship of Growth Differentiation Factor 9 and Inhibin in Early Folliculogenesis and Ovarian Tumorigenesis in Mice." *Molecular Endocrinology* 18(6): 1509–19.
- Wurm, Florian M. 2004. "Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells." *Nature Biotechnology* 22(11): 1393–98.
- Xu, Zhenzhong et al. 1995. "Expression of Messenger Ribonucleic Acid Encoding Cytochrome P450 Side-Chain Cleavage, Cytochrome P450 17 Alpha-Hydroxylase, and Cytochrome P450 Aromatase in Bovine Follicles during the First Follicular Wave." *Endocrinology* 136(3): 981–89.
- Yang, M.Y., and J.E. Fortune. 2008. "The Capacity of Primordial Follicles in Fetal Bovine Ovaries to Initiate Growth In Vitro Develops During Mid-Gestation and Is Associated with Meiotic Arrest of Oocytes1." *Biology of Reproduction* 78(6): 1153–61.
- Yuan, Jun et al. 2018. "The Scattered Twelve Tribes of HEK293." *Biomedical and Pharmacology Journal* 11(2): 621–23.
- Zhang, Yong, Meirong Huo, Jianping Zhou, and Shaofei Xie. 2010. "PKSolver : An Add-in Program for Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis in Microsoft Excel." *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 99(3): 306–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2010.01.007>.

10. ANEXOS

10.1. Tabla suplementaria 1: Ensayo 1 de ajuste de dosis de bscFSH. Se realizó un ensayo de 7 dosis utilizando 240 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin o 0,3 mg de bscFSH. En cada grupo experimental se utilizaron 5 vaquillas, 4 de las cuales fueron de raza Brangus, y una de raza Braford. Después del esquema de superovulación, las estructuras recuperadas se clasificaron en embriones de grado 1 (G1), embriones de grado 2 (G2), Ovocitos no fertilizados (UFO), y estructuras degeneradas (DEG). La ecografía realizada en el día también permitió cuantificar el número de cuerpos lúteos (CL) y de folículos anovulatorios (Foll. Anov.). Todos los animales utilizados en el ensayo tenían un Score de condición corporal (BCS) entre 5 y 5.5. Al momento del lavado uterino se registró (observación) aquellos animales que tenía un útero normal (UN), y aquellos que tenían un útero con tono (UT).

Folltropin (240 mg)	Código vaca	Raza	G1	G2	UFO	DEG	Total	Viable	CL	Foll. Anov.	BCS	Registro
	8280	Brangus	10	0	4	0	11	10	10	8	5	UN
	8057	Brangus	6	0	1	0	7	6	6	5	5	UN
	8300	Brangus	6	0	2	0	8	6	10	10	5	UN
	8407	Brangus	4	0	10	0	14	4	10	10	5.5	UT
	Q6006	Braford	11	0	1	0	12	11	10	10	5.5	UN
	Total		37	0	18	0	52	37	43	43		
	Promedio		7.4	0	3.6	0	10.4	7.4	9.2	8.6	5.2	
bscrFSH (0.3 mg)	Código vaca	Raza	G1	G2	UFO	DEG	Total	Viable	CL	Fol. Anov.	BCS	Registro
	7214	Brangus	0	0	8	0	8	0	15	+10	5	UT, sin estro
	7618	Brangus	0	8	7	0	15	8	15	+10	5.5	UT
	7925	Brangus	12	0	3	0	15	12	10	+10	5	UN
	7638	Brangus	25	0	9	0	34	25	10	+10	5	UN
	4985	Braford	0	0	6	0	6	0	10	+10	5.5	UT
	Total		37	8	33	0	78	45	60	+50		
	Promedio		7.4	1.6	6.6	0	15.6	9	12	+10	5.2	

10.2. Tabla suplementaria 2: Ensayo 2 de ajuste de dosis de bscFSH. Se realizó un ensayo de 4 dosis utilizando 0,15 mg de bscFSH. En el ensayo se usaron 10 vaquillas de raza Aberdeen Angus rojo. Después del esquema de superovulación, se contabilizó el Total de estructuras recuperadas por animal. Estas estructuras se clasificaron en embriones viables y en estructuras degeneradas u ovocitos no fertilizados (DEG/UFO). La ecografía realizada en el día 9 del ensayo también permitió cuantificar el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en los ovarios.

bscrFSH (0.15 mg)	Código vaca	Raza	CL	Total	Viable	DEG/UFO	
	500	Aberdeen Angus rojo	16	11	9	2	
	2741	Aberdeen Angus rojo	24	11	10	1	
	2742	Aberdeen Angus rojo	14	11	9	2	
	2743	Aberdeen Angus rojo	15	15	15	0	
	2745	Aberdeen Angus rojo	11	10	10	0	
	3604	Aberdeen Angus rojo	23	20	7	13	
	6905	Aberdeen Angus rojo	14	8	6	2	
	7554	Aberdeen Angus rojo	11	10	10	0	
	7560	Aberdeen Angus rojo	12	11	0	11	
	busty	Aberdeen Angus rojo	13	11	10	1	
	Total			153	118	86	32
	Promedio			15,3	11,8	8,6	3,2
	Desviación estándar			4,62	3,36	3,84	4,73

10.3. Tabla suplementaria 3: Ensayo 3 de ajuste de dosis de bscFSH. Se realizó un ensayo de 4 dosis utilizando 0,163 mg de bscFSH. En el ensayo se usaron 10 vaquillas combinando las razas Aberdeen Angus rojo y Overo colorado. Después del esquema de superovulación, se contabilizó el Total de estructuras recuperadas por animal. Estas estructuras se clasificaron en embriones viables y en estructuras degeneradas u ovocitos no fertilizados (DEG/UFO). La ecografía realizada en el día 9 del ensayo también permitió cuantificar el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en los ovarios.

bscrFSH (0.163 mg)	Raza	CL	Total	Viable	DEG/UFO	
	Aberdeen Angus rojo	16	14	12	2	
	Aberdeen Angus rojo	11	10	10	0	
	Overo colorado	14	13	9	4	
	Aberdeen Angus rojo	24	16	13	3	
	Aberdeen Angus rojo	23	20	18	2	
	Overo colorado	13	12	12	0	
	Aberdeen Angus rojo	13	8	7	1	
	Overo colorado	14	13	11	2	
	Overo colorado	12	10	8	2	
	Aberdeen Angus rojo	16	15	12	3	
	Total		156	131	112	19
	Promedio		15,6	13,1	11,2	1,9
	Desviación estándar		4,45	3,45	3,08	1,29

10.4. Tabla suplementaria 4: Ensayo 4 de ajuste de dosis de bscFSH. Se realizó un ensayo de 4 dosis utilizando 0,137 mg de bscFSH. En el ensayo se usaron 10 vaquillas combinando las razas Aberdeen Angus rojo, Overo colorado y Holstein rojo. Después del esquema de superovulación, se contabilizó el Total de estructuras recuperadas por animal. Estas estructuras se clasificaron en embriones viables y en estructuras degeneradas u ovocitos no fertilizados (DEG/UFO). La ecografía realizada en el día 9 del ensayo también permitió cuantificar el número de cuerpos lúteos (CL) presentes en los ovarios.

bscrFSH (0.137 mg)	Raza	CL	Total	Viable	DEG/UFO
	Overo colorado	9	8	6	2
	Overo colorado	20	18	9	0
	Overo colorado	12	11	6	4
	Overo colorado	15	15	15	3
	Aberdeen Angus rojo	17	14	11	2
	Aberdeen Angus rojo	25	21	15	0
	Aberdeen Angus rojo	10	8	7	1
	Aberdeen Angus rojo	8	8	5	2
	Overo colorado	11	10	10	2
	Holstein rojo	13	11	10	3
	Total	140	124	94	30
	Promedio	14	12,4	9,4	3
	Desviación estándar	5,35	4,50	3,57	2,91