

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL  
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



## INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL LEGAL

*“Expresión de oxitocina en fagémidos”*

Presentador del Servicio Social:

**Corona Bedoya Samantha Haydee**

Matricula: 2183070655

Asesor Interno:

**Orozco Gregorio Héctor Oscar**

Ced. Prof. 11192421

Asesor Externo:

**Cano Buendía José Alberto**

Ced. Prof. 2481601

Fecha de inicio y terminación: Del 02 de diciembre de 2022 al 02 de junio de 2023

Fecha de entrega: 5 de julio del 2024

Dr. En ciencias biológicas y de la salud  
Orozco Gregorio Héctor Óscar  
No. Eco. 31955  
Depto. de Producción Agrícola y Animal

Dr. José Alberto Cano Buendía  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
UNAM

# Índice

- I. Introducción
- II. Justificación
- III. Hipótesis
- IV. Objetivo general
- V. Objetivos específicos
- VI. Marco teórico
  - A. Oxitocina
    - 1. Mecanismo de acción
    - 2. Importancia en producción porcina
  - B. Biología de los fagemidos
    - 1. Ventajas
    - 2. Proteínas de cubierta y fagémido pG8SAET
  - C. Técnica de phage display
- VII. Material y métodos
  - A. Inoculación del vector de clonación
  - B. Purificación del plásmido
  - C. Secuencia de oxitocina
  - D. Digestión del plásmido con enzima de restricción
  - E. Hibridación de oligos
  - F. Ligación y transformación
  - G. Conteo de colonias
  - H. PCR de colonia
  - I. Extracción de DNA
  - J. Secuenciación
- VIII. Resultados y discusión
- IX. Conclusión
- X. Bibliografía

## **I. Introducción**

La oxitocina (OT) es una hormona peptídica de nueve aminoácidos que fue sintetizada artificialmente por primera vez para su uso médico en 1953, por el bioquímico Vincent Du Vigneaud (Uvnäs-Moberg, 2023); esta hormona tiene como principal efecto la contracción del músculo liso. Actualmente, en porcicultura, la OT se utiliza para inducir o potenciar las contracciones uterinas en el momento del parto, así como disminuir la mortalidad intraparto, ya que acorta su duración y el intervalo de nacimiento entre lechones (Mota-Rojas et al., 2005). Entre otras indicaciones también se incluye la expulsión de desechos uterinos postparto (Hill et al., 2022). Sin embargo, al ser un fármaco sintetizado artificialmente, aumentan las probabilidades de presentar defectos en su calidad, por ejemplo, no tener la suficiente cantidad de ingrediente activo o por el contrario, contener demasiada concentración, lo que podría causar que las contracciones sean demasiado fuertes o débiles causando daños en el cordón umbilical, lo que pone en riesgo la vida del lechón (Mota-Rojas et al., 2005).

Una de las alternativas para la síntesis de OT son los bacteriofagos, virus que tienen la capacidad de infectar bacterias, y son utilizados frecuentemente como herramientas moleculares relacionadas en el control de enzimas, síntesis de virus y mutagénesis de genes de bacterias, así como la clonación de fragmentos de DNA del plásmido mediante el uso de técnicas como Phage Display (Elois et al., 2023). Por ello, el objetivo del presente trabajo es realizar la expresión de la secuencia de oxitocina en el vector de clonación pG8SAET.

## **II. Justificación**

Aunque la oxitocina sintética es usada frecuentemente en porcicultura, es importante mencionar que estos péptidos tienen una permeabilidad de membrana débil; y poca estabilidad *in vivo*. Estas propiedades hacen que sean química y físicamente inestables, con una vida media corta y una rápida eliminación (L. Wang et al., 2022). Los fármacos sintetizados químicamente contienen como vehículo otros compuestos que normalmente son antibióticos, esto significa que para fines productivos, la oxitocina debe tener un periodo de retiro de por lo menos 30 días

(Theunissen et al., 2018). Otro factor que afecta la eficiencia de éste fármaco son las altas temperaturas, la Organización Mundial de la Salud recomienda que la oxitocina se almacene entre 2°C y 8°C; es decir, debe estar refrigerada desde el momento de fabricación hasta el momento de su administración (Theunissen et al., 2018).

Los fagos filamentosos (fagos Ff) son muy estables en una variedad de condiciones utilizadas; estas condiciones incluyen un pH extremo, altas temperaturas, presencia de ADNasa, y enzimas proteolíticas (Qi et al., 2012); su producción es más sencilla y toma poco tiempo (Rodríguez Carnero et al., 2021); además, pueden ser inactivados fácilmente (Loc-Carrillo & Abedon, 2011) por lo tanto, los fagos podrían ser una mejor alternativa al uso de la oxitocina sintética durante el manejo de partos.

### **III. Hipótesis**

La clonación de la secuencia de oxitocina permitirá su expresión en fusión con la pVIII de fagémidos.

### **IV. Objetivo general**

Realizar la clonación de la secuencia de oxitocina en el vector pG8SAET.

### **V. Objetivos específicos**

Identificar y optimizar la secuencia de oxitocina para su expresión en fagos.

Realizar la expresión de la secuencia de oxitocina en el vector pG8SAET.

Secuenciar el vector pG8SAET con oxitocina contenida.

### **VI. Marco teórico**

#### **A. Oxitocina**

La oxitocina (OT) es un neuropéptido compuesto por nueve aminoácidos (cisteína, tirosina, isoleucina, glicina, asparagina, cisteína, prolina, leucina y glicina), (López et al., 2014); se sintetiza en células neurosecretoras magnocelulares en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo y se libera en la glándula pituitaria durante el parto (Senturk et al., 2023).

Algunos receptores para oxitocina se encuentran en el útero, un órgano hueco compuesto por 3 capas de tejido; un revestimiento interno de endometrio funcional (superficial) y basal, un miometrio grueso compuesto por células de músculo liso y una capa externa delgada (serosa) conocida como perimetrio que está compuesta por células epiteliales (Yin et al., 2022).

### **1. Mecanismo de acción**

Esta hormona promueve las contracciones uterinas del miometrio, específicamente, durante el nacimiento de la cría (Uvnäs-Moberg, 2023). La contracción del miometrio se lleva a cabo por el aumento de los iones de calcio en respuesta a un estímulo nervioso u hormonal. Los iones calcio se unen a la proteína calmodulina y este complejo calmodulina-calcio se une después a la miosina cinasa de cadena ligera, que es una enzima fosforiladora, y la activa. Una de las cadenas ligeras de cada una de las cabezas de miosina, se fosforila en respuesta a la cinasa; cuando la cadena reguladora está fosforilada, la cabeza tiene la capacidad de unirse repetitivamente al filamento de actina, produciendo de esta manera la contracción muscular (Guyton & Hall, 2021).

La oxitocina también ejerce un efecto en la secreción de leche, induciendo la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos y transfieren la leche alveolar al espacio cisternal de la glándula mamaria (Torres et al., 2014).

### **2. Uso en producción porcina**

La OT está indicada como última opción en el parto cuando el tiempo de intervalo entre lechones supera los 15-20 minutos. Si se administra antes del nacimiento del primer lechón o de que el cuello uterino esté completamente dilatado puede provocar distocia (Linneen et al., 2005). Antes del parto, la oxitocina sólo debe ser usada cuando existe relajación del cérvix natural o por la administración previa de estrógenos (Plumb & Pharm, 2010).

Se ha discutido su uso debido a los efectos que tiene sobre el lechón, ya que al saturar los receptores uterinos, puede ocasionar la ruptura del cordón umbilical, lo que induce un periodo de estrés para los lechones que aún no han nacido, provocando, en el peor de los casos, muerte por asfixia (Trujillo et al., 2019)

## B. Biología de los fagémidos

Los vectores de fagémidos consisten en un genoma de fago en el que se inserta DNA que codifica la proteína o péptido de interés (Lowman, 2013). Contienen además el gen que codifica para una proteína de la cápside viral, múltiples sitios de clonación y un gen de resistencia a antibióticos. Sin embargo, estos vectores carecen del resto de la información genética necesaria para el ensamblaje de partículas virales completas. Esta información es aportada por un fago ayudador como el M13K07, que es un fago filamentoso que infecta *E. coli* a través de pilus F (filamentos flexibles elaborados por la misma bacteria) (Silverman & Clarke, 2010). Su genoma consiste en ADN monocatenario circular de 6.4kb rodeado de una capa proteica. Después de infectar a la *E.coli*, se convierte en una molécula de ADN bicatenario llamada forma replicativa (RF) utilizando la maquinaria de la bacteria (Vispo et al., 2016).

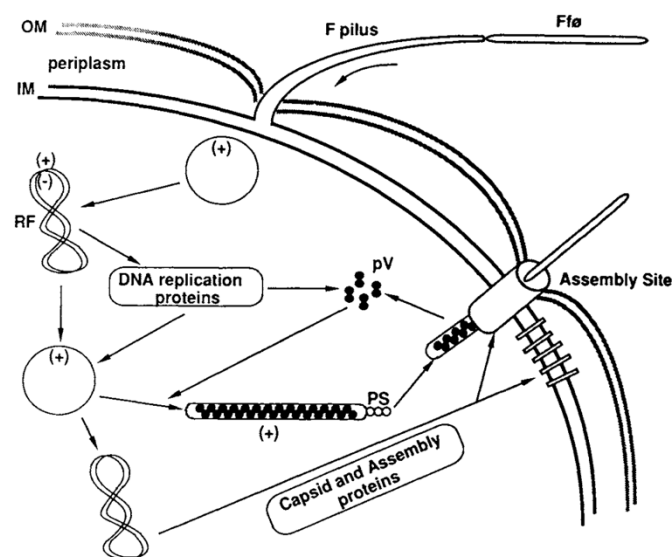
Los componentes principales de un fagémido son: (Qi et al., 2012):

- El origen de replicación de un plásmido
- El marcador selectivo
- La región intergénica (contiene la secuencia de empaquetamiento y el origen de replicación de las hebras)
- Un gen de proteína de cubierta de fago
- Sitios de reconocimiento de enzimas de restricción
- Promotor y segmento de ADN que codifica un péptido señal

Al entrar en la célula huésped, a través de la interacción con la punta del pilus F (Figura 1), el ADN monocatenario (ssDNA) de las partículas fagémidas se puede convertir en la forma replicativa (RF) de los fagémidos por las polimerasas de RNA y DNA huésped y la topoisomerasa, que actúan sobre el origen de replicación de la hebra negativa ubicada en la región intergénica de los fagémidos. Esta molécula sirve como plantilla para la transcripción y la traducción desde las cuales todas las proteínas del fago son sintetizadas. Después de la transcripción y la traducción, las proteínas de fusión salen hacia la membrana interna de las células huésped, seguidas de la eliminación de un péptido señal líder por la peptidasa señal y posteriormente se pliegan. Un origen replicativo del fago Ff de cadena positiva,

presente en la región intergénica del fagémido, no se activa hasta que las células huésped se sobreinfectan con el fago auxiliar que proporciona genes de proteínas de fago que faltan en un fagémido (Qi et al., 2012; Webster, 1996).

Finalmente, la secuencia de empaquetamiento, también ubicada en la región IG de los fagémidos, interactúa con el complejo de ensamblaje formado por pI, pIV, pXI y la tiorredoxina de la célula huésped. Después de la elongación y la terminación, los fagos de la progenie de los fagémidos están maduros y se completan los ciclos de vida de los fagémidos (Qi et al., 2012).



**Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida del fago, donde: OM, membrana externa; IM, membrana interna; (+), ADN monocatenario del bacteriófago; (-), cadena de ADN complementaria; RF, forma replicativa de doble hebra; PS, señal de empaquetamiento del bacteriófago y pV, producto de la gen del bacteriófago V.**

## 1.Ventajas

Las características únicas del fago filamentoso hacen que su visualización sea una herramienta poderosa para la bioingeniería, por ejemplo, la identificación de interacciones proteína - ligando (Mullen et al., 2006), desarrollo de vacunas (L.-F. Wang & Yu, 2005), o el desarrollo de medicamentos (L. Wang et al., 2022). Se han aislado numerosas proteínas o péptidos con alta especificidad y afinidad a partir de bibliotecas de expresión de fagos mediante selección por afinidad (biopanning) y se han utilizado ampliamente en diferentes campos (Qi et al., 2012).

Los fagos y fagémidos representan los vectores más utilizados para la

presentación de fagos, sin embargo, los fagémidos tienen algunas ventajas sobre los fagos (Qi et al., 2012):

- Genoma más pequeño.
- Capacidad para acomodar un fragmento de ADN más grande.
- Transformación más eficiente que permite obtener una gran diversidad de presentación de fagos.
- Variedad de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.
- El nivel de expresión de las proteínas de fusión puede controlarse y modularse fácilmente.
- Son genéticamente más estables.

## 2. Proteínas de cubierta y fagémido pg8SAET

Los fagémidos se pueden dividir en tipo III, tipo VI, tipo VII, tipo VIII o tipo IX, que contienen la proteína de cubierta pIII, pVI, pVII, pVIII o pIX, respectivamente. Los de tipo III y tipo VIII son los más utilizados en la presentación de fagos. Para fines del presente trabajo, se hará enfoque en los fagémidos de tipo VIII, específicamente en el fagémido pG8SAET (Jacobsson et al., 2003; Qi et al., 2012).

El pG8SAET (Figura 2) es un vector que mide 3395 pb con una etiqueta de detección universal que permite la clonación de insertos de DNA. Esto permitirá la generación de partículas de fagos (400-500 copias) fusionadas con la proteína VIII de la cápside principal recombinante (rpVIII) en oposición a la visualización de un solo dígito de péptidos (1–5 copias) obtenidos al usar la proteína de la cápside menor III (pIII). La secuencia de la señal y la etiqueta electrónica no están en el mismo marco de lectura; en su lugar, se requiere la inserción de un DNA extraño en cualquiera de los sitios de clonación, NcoI o SnaBI, para la expresión de la proteína de fusión de la etiqueta VIII-E-gen (Jacobsson et al., 2003; Rodriguez Carnero et al., 2021)

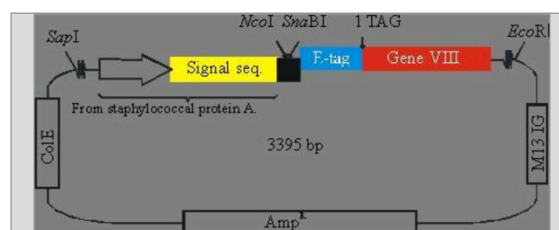


Figura 2. Vector pG8SAET basado en la proteína VIII

### C. Técnica de phage display

La técnica de Phage Display fue inventada por George Smith en 1985, desarrolló una tecnología de visualización para la presentación de péptidos cortos en la superficie de bacteriófagos. La presentación de fagos puede facilitar el manejo de una amplia colección de péptidos *in vitro* para su manipulación y enriquecimiento. El requisito previo para una selección exitosa a través de la presentación de fagos radica en la capacidad de generar un abundante suministro de partículas de fagos dentro de un volumen manejable (Song et al., 2024).

Esta técnica representa un paso para la evolución molecular en laboratorio. A continuación se enlistan dos de sus principales aplicaciones:

- Uso de anticuerpos recombinantes: La tecnología de presentación en fagos ha demostrado ser exitosa en la generación de anticuerpos recombinantes capaces de atacar antígenos virales específicos, proporcionando así una poderosa herramienta para combatir infecciones virales (Mustafa & Mohammed, 2024).
- Inmunógenos: El uso de fagos recombinantes como transportadores inmunogénicos ofrece diversas ventajas los transportadores peptídicos (ovalbúmina, toxoide tetánico, hemocianina) (L.-F. Wang & Yu, 2005)

## VIII. Material y métodos

### A. Amplificación del fagemido

Se hizo la inoculación de *E. coli* con pG8SAET en 100 mL de medio LB (100 mL de agua destilada, 1 g de triptona, 1 g de NaCl, 500 mg de extracto de levadura) con ampicilina a una concentración de 100mg/mL (100 uL) en un matraz estéril. Dicho matraz se dejó cultivando durante 16 horas a una velocidad de 230 rpm, 15 min a 37.5°C. Posterior a la incubación, se colocaron 45 mL del medio en un tubo de 50 mL.

### B. Purificación del plásmido

Se usó GenElute™ Plasmid Midiprep Kit (SIGMA, Cat. No. SLBS1809V, USA). Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Para pelletizar las bacterias se realizó una centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf, 5805F, Alemania) y se desechó el sobrenadante.

- Al pellet se le añadieron 1200 uL de solución de resuspensión (Cat. No. R1149) (que contiene RNAasa Cat. No. R6148) y por medio de pipeteo se resuspendieron las bacterias.
- Se añadieron 1200 uL de solución de lisis (Cat. No. L1912) , se mezcló por inversión (no más de 6 veces) y se dejó incubando durante tres minutos y medio a temperatura ambiente (es importante que la reacción no exceda los 5 minutos).
- La neutralización se hizo agregando 1600 uL de solución especial (Cat. No. N5158) y del mismo modo se mezcló por inversión, finalmente se hizo una centrifugación a 11000 rpm por 15 minutos.
- Se insertó una columna de unión (Cat. No. G6540) en el tubo de colección (Cat. No. C4228) y se agregaron 3000 uL de solución preparadora (Cat. No. C2112), el tubo con la columna se centrifugó a 5000 rpm durante dos minutos y se descartó el sobrenadante.
- Una vez que el tubo contenía la columna, se transfirió la solución lisada y se centrifugó a 5000 rpm por dos minutos, el sobrenadante se descartó.
- Se realizó el lavado de la columna con 3000 uL de solución de lavado (Cat. No. W3886) y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante.
- Finalmente para eluir el DNA se colocó la columna en un nuevo tubo de colección y se añadieron 1000 uL de solución para eluir (Cat. No. E5650)

El DNA se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, USA)

### C. Secuencia de oxitocina

Se determinó la secuencia de oxitocina (López et al., 2014) (cisteína-tirosina-isoleucina-glutamina-asparagina-cisteína-prolina-leucina-glicina) y con ayuda de la base de datos Kazusa (*Codon Usage Database*, n.d.), se tomaron los codones con mayor índice de uso. Cabe mencionar que la secuencia se encuentra en RNA, por lo tanto se hizo la codificación a DNA dirección 5'-3' (positiva) y 3'-5' (negativa) (Figura 3).

	C	Y	I	Q	N	C	P	L	G
RNA	UGU	UAU	AUU	CAG	AAU	UGU	CCG	CUG	GGU
DNA 5'	TGT	TAT	ATT	CAG	AAT	TGT	CCG	CTG	GGT
DNA 3'	ACA	ATA	TAA	GTC	TTA	ACA	GGC	GAC	CCA

**Figura 3. Codificación de RNA a DNA**

Una vez determinada la secuencia, se hizo la solicitud de los oligos en la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM de la siguiente manera:

Nombre	Secuencia
“oxi pos sam”	CCA TGG CAT GTT ATA TTC AGA ATT GTC CGC TGG GT
“oxi neg sam”	ACC CAG CGG ACA ATT CTG AAT ATA ACA TGC CAT GG

#### D. Digestión del plásmido con enzima de restricción

Para ello, se siguió con el protocolo Anza™ 43 Eco105I; enzima que corta el DNA en el sitio de reconocimiento TAC<sup>^</sup>GTA y tiene afinidad por el sitio de restricción SNABI. (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. IVGN043-4, USA):

- Se usó 1 ug de DNA:

Plásmido purificado  
 1000 ng - 1 ug  
 136.6 ng - **0.13 ug**

0.13 ug - 1ul  
 1 ug - **7.6 ul**

La reacción de digestión se preparó de la siguiente manera:

Componente	Cantidad
Buffer	2 uL
DNA	10 uL
Enzima	1 uL
Agua libre de nucleasas	7 uL
Volumen total	20 uL

- Se dejaron incubando durante 15 minutos a 37°C en el Thermoblock (BioProducts, SBD120, Taiwán)

Una vez finalizada la incubación, se realizó electroforesis (Thermo Scientific, EC300XL, China)

Para la electroforesis, se usó gel de agarosa al 1% (Norgen, Cat. No. 28035, Canadá) en 100 mL de buffer TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA).

- Se añadieron 10 uL de marcador de DNA (Invitrogen, Cat. No. S33102, USA).

Se usó como escalera DNA el GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Cat. No. SM0321, USA) y el buffer de carga.

Finalmente, se hizo la extracción del DNA con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. No. A9281, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante:

- A cada fragmento de gel de agarosa se le añadieron 10 uL de solución de unión a membrana por cada 10 mg de gel. Se dejaron los tubos incubando durante 10 minutos a 50-65° C.
- El gel disuelto se transfirió a un tubo preparado con una columna y se dejó incubando un minuto a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. 75002446, Alemania) a 14000 rpm por un minuto. El líquido se descartó.
- Se agregaron 700 uL de solución de lavado de membrana y se centrifugó a 14000 rpm por un minuto, el líquido se descartó. Después se repitió el lavado, con 500 uL y se hizo una segunda centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
- La columna se colocó en un nuevo tubo de colección de 1.5 mL y se agregaron 50 uL de agua libre de nucleasa para eluir el DNA; se dejó incubando durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm por un minuto.
- El tubo con DNA se almacenó a -20°C

#### E. Hibridación de oligos

Se hizo una hibridación bajo las siguientes condiciones:

- Thermoblock a 90°C.
- En un tubo de 2 ml se añadió 1 ul de cada oligo (previamente centrifugados 20 segundos) y 1 ml de agua libre de nucleasas.
- Vórtex

- Se colocó en el thermoblock 5 minutos. Después, se dejó sobre la mesa el bloque hasta que la temperatura descendiera a 22°C, una vez alcanzada la temperatura se dejaron incubando durante 10 minutos.

#### F. Ligación y transformación

La solución de ligación se hizo con base en el protocolo para la T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. EL0013, USA):

- Con ayuda de la calculadora biométrica de Promega (Promega, 2024), y con base en la siguiente fórmula se obtuvo la relación inserto:vector para la reacción de ligación:

$$\text{Relación inserto: vector} = \frac{\text{longitud del inserto(kb)}}{\text{longitud del vector (kb)}} \times \text{cantidad de vector (ng)}$$

Dónde:

- Longitud de inserto (kb): 0.035
- Longitud de vector (kb): 3.395
- Cantidad de vector (ng): en este caso, 100 .

En este caso se usó una relación 5:1, se preparó la reacción en un tubo de 1.5 mL:

Componente	Cantidad
Vector	2 uL
Inserto DNA	1.4 uL
Buffer	2 uL
Enzima	1 uL
Agua libre de nucleasas	11.6 uL
Volumen total	20 uL

La reacción se dejó incubando durante una hora a temperatura ambiente.

Para la transformación, se siguió el protocolo de alta eficiencia creado por Biolabs, Nueva Inglaterra (Biolabs, n.d.). Todo se realizó en hielo y bajo esterilidad:

- Se descongelaron las células en hielo y se añadieron 50 uL al tubo de transformación (se usaron tubos de 1.5 mL).
- Posteriormente, se añadió toda la solución de ligación a la reacción y se mezcló por inversión.
- Se dejaron en hielo durante 30 minutos.
- Se realizó el choque térmico a 42°C durante 45 segundos.
- Se colocó nuevamente en hielo durante un minuto.

- Se añadieron 900 uL de SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa).
- Se colocaron los tubos en la cámara de agitación durante una hora a 37°C y 200 rpm.

El plateado se hizo bajo esterilidad, en cajas petri con LB agar (200 mL de medio LB + 2.4 g de agar bacteriológico) y ampicilina (200 uL), las cuales se dejaron incubando toda una noche en la estufa bacteriológica (Blue M Electric Company, M 100<sup>a</sup>, USA).

#### G. Conteo de colonias

Se contaron las colonias de cada caja petri y de éstas, se tomó una muestra con punta blanca (bajo esterilidad) la cuál se inoculó en tubos de 15 mL que contenían 2 mL de medio LB y 2 uL de ampicilina. Los tubos se incubaron en la cámara de agitación durante 16 horas a 37°C y 200 rpm. Una vez finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos para pelletizar las bacterias.

#### H. PCR de colonia

Se hizo la solicitud de primers a la Unidad de Secuenciación y Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, de la siguiente manera (Rodriguez Carnero et al., 2021):

Primer	Secuencia
pG8FWD (forward)	CAGGGGGTATTAATTTGAAAAGG
pG8REV (reverse)	TATTCGGTCGCTGAGGCTTG

Para la PCR se siguió el protocolo de TopTaq<sup>®</sup> Mater Mix Kit (Qiagen, Cat. No. 145013676, Alemania). Previo a la preparación de las reacciones se hizo una dilución del vector en 20 uL (2 uL vector + 18 uL de agua libre de nucleasas), y se pusieron a descongelar en hielo los pellet de bacterias y el Master Mix.

La reacción se hizo en un volumen de 15 uL, entonces:

	1 reacción	9.5 reacciones
Master mix 2x	7.5 uL (15/2=7.5)	71.25 uL
Primer FWD	1.5 uL	14.25 uL
Primer REV	1.5 uL	14.25 uL
Agua libre de nucleasa	4.5 uL	42.75 uL
DNA	Se tomará muestra con una punta blanca	
Volumen total	15 uL	142.5 uL

#### I. Extracción de DNA

Se realizó con QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen. Cat. No. 27106, Alemania):

- Se resuspendió el pellet por pipeteo con 250 uL de buffer P1, el líquido fue transferido a un tubo de 1.5 mL.
- Se agregó 250 uL de buffer P2 y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces.
- Se añadieron 350 uL de buffer N3 e igualmente se mezcló por inversión. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos.
- Se añadieron 800 uL del supernadante a un columna y se centrifugó durante un minuto, el sobrenadante se descartó.
- Se hizo un lavado de la columna con 750 uL de buffer PE y se hizo una tercera centrifugación durante un minuto, del mismo modo, el sobrenadante se descartó y se hizo una centrifugación más, durante un minuto.
- Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 mL y se añadieron 50 uL de agua libre de nucleasas, se dejó incubando un minuto y se centrifugó un minuto más.

Una vez que se extrajo el DNA, se hizo su cuantificación en el NanoDrop.

#### J. Secuenciación

Se realizó la solicitud a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBT, UNAM. Los resultados de dicha secuenciación se revisaron con ayuda del software SEQUENCHER (Gene Code, USA)

## IX. Resultados y discusión

### Purificación del plásmido

Como se observa en la Figura 4, la concentración de DNA del plásmido purificado fue de 136.6 ng/uL. De acuerdo con Osorio (et al., 2013), cuando la proporción A260/A280 para el ADN se encuentra superior a 1.8 nos indica que la muestra es pura, en este caso, la relación fue de 1.85.

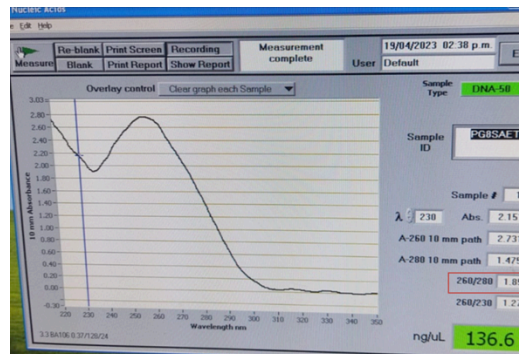


Figura 4. Cuantificación del DNA de pG8SAET purificado en el Nanodrop

### Secuencia de oxitocina

La cantidad de DNA de los oligos solicitados al Instituto de Biotecnología de la UNAM fue de 3.750 ug/uL (Figura 5), este dato fue necesario para realizar el cálculo de la cantidad de inserto de DNA para la solución de ligación.

Muestra	Clave	Tamaño	Secuencia			
#1	oxi pos sam	35	CCA TGG CAT GTT ATA TTC AGA ATT GTC CGC TGG GT			
	Número oligo	2419	Pureza	NO	NanoDrop A(260)	96.744
	Volumen (ul)	500	OD's totales	28.50	Conc. (ug/ul)	1.88
	C+G (%)	45.71	Tm(1)	71.8	Tm(2)	102.0
	p.m.	11550	picomol/ul	162.9		
	Nota	Para preparar 100 uL de una solución 10 uM, tome 6.1 microlitros del OLIGO y agregue 93.9 microlitros de AGUA. 10uM = 10pmol/uL				
	Observación 1	OLIGO CRUDO. EXTRAIDO DE SOLUCION AMONIACAL e/ nBUTANOL. SECADO EN SAVANT y RESUSPENDIDO EN BUFFER DE ELUCION				
	Observación 2	UNA BANDA POR UV-SHADOWING EN GEL DE ACRILAMIDA 20% 7M UREA				
#2	oxi neg sam	35	ACC CAG CGG ACA ATT CTG AAT ATA ACA TGC CAT GG			
	Número oligo	2420	Pureza	NO	NanoDrop A(260)	96.223
	Volumen (ul)	500	OD's totales	28.35	Conc. (ug/ul)	1.87
	C+G (%)	45.71	Tm(1)	71.8	Tm(2)	102.0
	p.m.	11550	picomol/ul	162.0		
	Nota	Para preparar 100 uL de una solución 10 uM, tome 6.2 microlitros del OLIGO y agregue 93.8 microlitros de AGUA. 10uM = 10pmol/uL				
	Observación 1	OLIGO CRUDO. EXTRAIDO DE SOLUCION AMONIACAL e/ nBUTANOL. SECADO EN SAVANT y RESUSPENDIDO EN BUFFER DE ELUCION				
	Observación 2	UNA BANDA POR UV-SHADOWING EN GEL DE ACRILAMIDA 20% 7M UREA				

Figura 5. Resultados de la solicitud de oligos

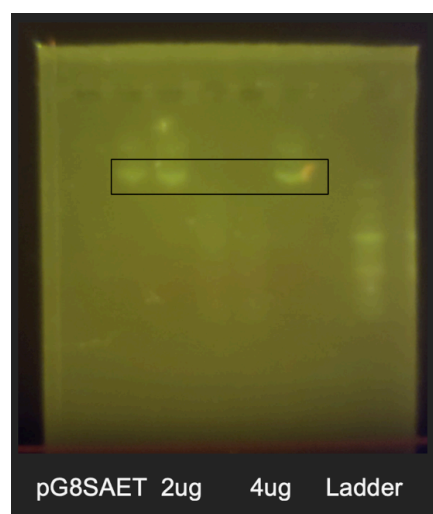
## Digestión del plásmido con enzima de restricción

	Tubo "2 ug"	Tubo "4 ug"
Agua libre de nucleasas (uL)	14	0
Buffer (uL)	4	4
Enzima (uL)	2	2
DNA (uL)	20	34
Volumen total (uL)	40	40
Cantidad de DNA (ug)	2.62	4.46
Incubación durante 60 minutos a 37°C en el Thermoblock		

**Tabla 1. Reacción de digestión, se prepararon dos a distinta concentración de DNA.**

Pozo	DNA	Buffer	Agua	Volumen total
pG8SAET	2.2 uL	2 uL	7.8 uL	12 uL
2ug	4.5 uL	2 uL	5.5 uL	12 uL
4ug	2.6 uL	2 uL	7.4 uL	12 uL
Ladder	2 uL	2 uL	8 uL	12 uL
50 minutos a 90 volts				

**Tabla 2. Preparación de electroforesis muestra con 300 ng de DNA**



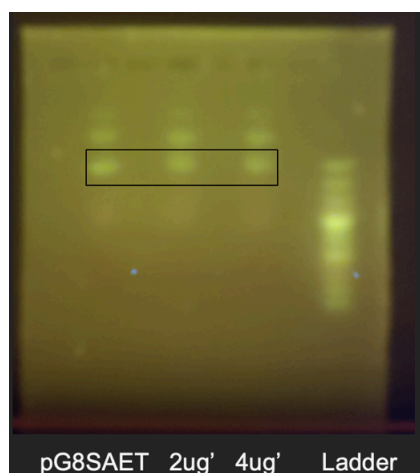
**Figura 6. Gel de agarosa 1%, dónde se amplificaron un control del plásmido no digerido (pG8SAET), dos muestras (2ug y 4ug) y un marcador de peso molecular (Ladder) que amplifica a 100bp.**

Como se observa en la Figura 6, los fragmentos de la banda control y las dos muestras se encuentran en el mismo sitio. Cuando el plásmido está digerido, la banda de DNA debería recorrer más, lo que indicaría que el plásmido está fragmentado por la enzima de restricción, como se observa en la Figura 7 (Thermo Fisher Scientific, 2016) :



**Figura 7. Electroforesis de una plásmido; se observa el plásmido sin digerir y el mismo digerido con la enzima de restricción**

Por lo anterior, se decidió hacer una nueva incubación, ahora de 10 minutos, sin embargo, se observó una mala digestión (Figura 8), esta deficiencia se puede atribuir al corto tiempo de incubación ya que, de acuerdo con el manual de uso de la enzima de restricción (Thermo Fisher Scientific, 2015), el tiempo mínimo de incubación para una digestión eficiente es de 15 minutos.

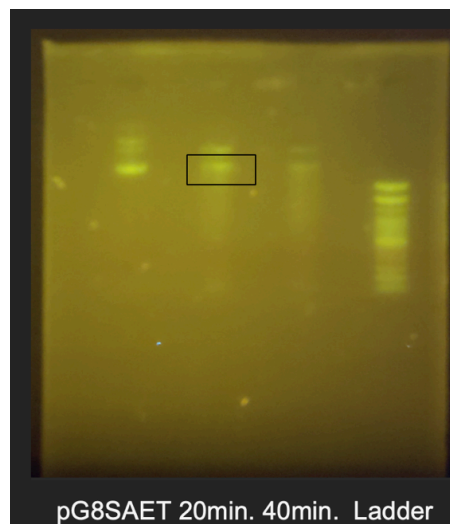


**Figura 8. Electroforesis de digestión con 10 minutos de incubación**

Entonces, se realizó una nueva incubación, esta se vez se hicieron dos reacciones de digestión igual a “2 ug” (Tabla 2), sin embargo, los tiempos de incubación fueron de 20 y 40 minutos.

Pozo	DNA	Buffer	Agua	Volumen total
PG8SAET	2.2 uL	2 uL	7.8 uL	12 uL
20 min	4.5 uL	2 uL	5.5 uL	12 uL
40 min	4.5 uL	2 uL	5.5 uL	12 uL
Ladder	2 uL	2 uL	8 uL	12 uL

**Tabla 2. Electroforesis muestra**



**Figura 9. Electroforesis muestra de digestión con incubación de 20 y 40 minutos.**



**Figura 10. Electroforesis del resto de la reacción de digestión con incubación de 20 y 40 minutos**

Al observar los geles de agarosa (Figura 9 y 10), se determinó que hubo una buena digestión en ambos tiempos de incubación, sin embargo, la banda de gel a los 20 minutos de incubación presentó mayor luminosidad, aún con ello, se decidió extraer el DNA de ambas bandas.

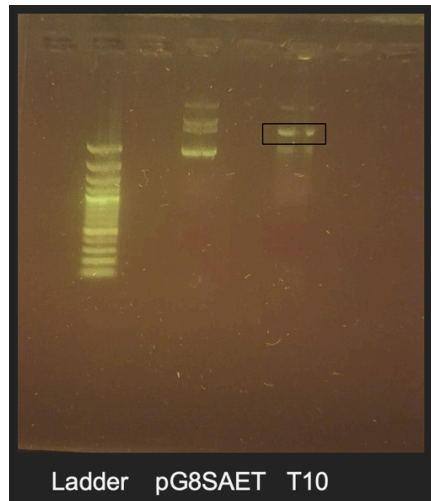
El DNA cuantificado fue muy poco (9.7 ng/uL) y con poca pureza (260/280: 1.78), por tanto se decidió partir desde una nueva reacción de digestión, esta vez se realizó al 10x (Tabla 4), además, se decidió eluir con 30 uL y no con 50 uL al extraer el DNA. Cabe mencionar que la decisión se tomó bajo la finalidad de tener una mayor concentración de DNA, ya que el kit permite purificar hasta 40 ug de DNA (Promega Corporation, 2019).

	<b>Tubo "T10"</b>
Agua libre de nucleasas (uL)	70
Buffer (uL)	20
Enzima (uL)	10
DNA (uL)	100
Volumen total (uL)	200
Cantidad de DNA (ug)	13
Incubación durante 20 minutos a 37°C	

**Tabla 4. Preparación de la reacción de digestión a 10x**

<b>Pozo</b>	<b>DNA</b>	<b>Buffer</b>	<b>Agua</b>	<b>Volumen total</b>
Ladder	2 uL	2 uL	8 uL	12 uL
pG8SAET	2.2 uL	2 uL	7.8 uL	12 uL
T10	5 uL	2 uL	5 uL	12 uL

**Tabla 5. Electroforesis muestra**

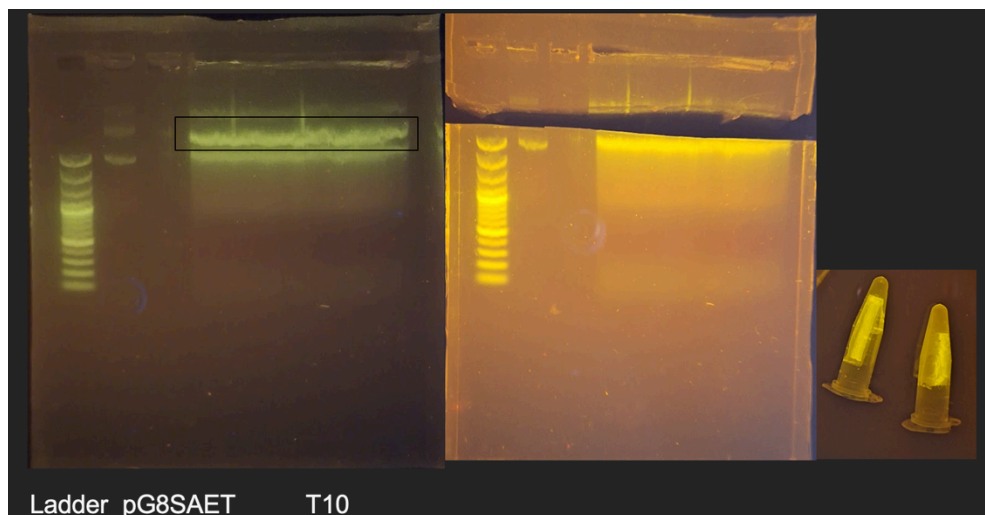


**Figura 11. Electroforesis muestra de digestión del tubo “T10”**

Como se observa en la Figura 11, el plásmido tuvo una buena digestión, por tanto se procedió con la electroforesis del resto de la reacción (Tabla 6; Figura 12).

Pozo	DNA	Buffer	Agua	Volumen total
Ladder	2 uL	2 uL	8 uL	12 uL
pG8SAET	2.2 uL	2 uL	7.8 uL	12 uL
T10	195 uL	32 uL	-	226 uL

**Tabla 6. Electroforesis con el resto de la reacción de digestión**



**Figura 12. Electroforesis del resto de la digestión “T10”**

Posterior a la extracción del DNA, se cuantificó en el nanodrop (Figura 13), sin embargo, la muestra tenía poca pureza, con una relación 260/280 de 1.72. Así que se decidió repetir la reacción de digestión y la electroforesis (Figura 14), esta vez uniendo sólo 4 pozos en el gel; además, al extraer el DNA se realizó un tercer lavado con 500 uL y una centrifugación adicional de 5 minutos.



Figura 13. Cuantificación de DNA, tubo “T10”

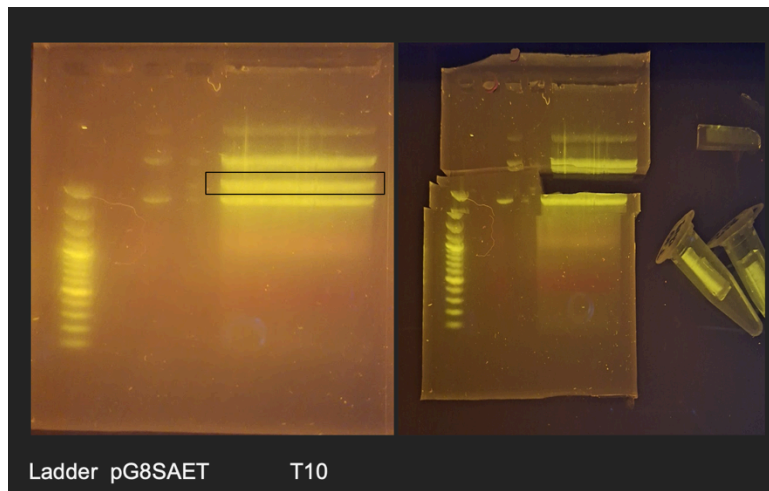
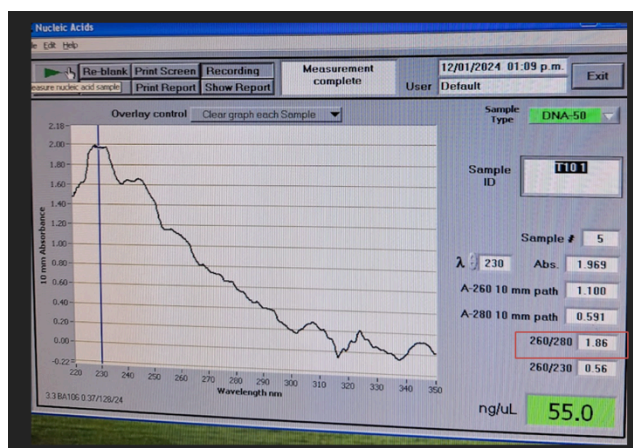


Figura 14. Electroforesis de digestión tubo “T10”



**Figura 15. Cuantificación de DNA, tubo “T10”**

### Ligación y transformación

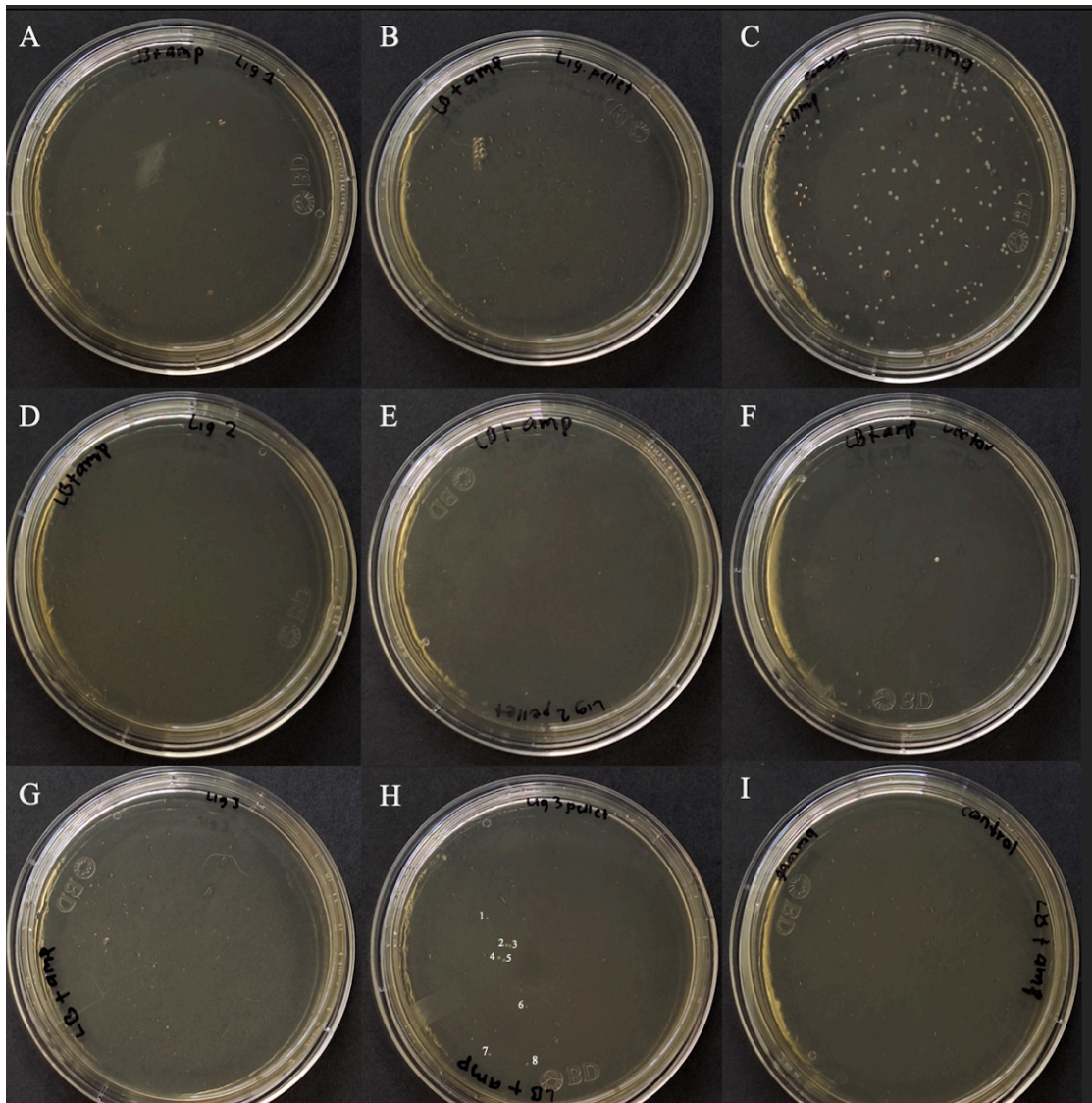
Posterior a la cuantificación (Figura 15), se procedió a realizar la solución de ligación a relación 5:1 (inserto:vector), después se realizó la transformación y el plateado.

Al revisar las cajas petri no hubo el crecimiento esperado, esto puede estar asociado al tiempo de incubación, a pesar de que el manual de usuario de la T4 ligasa indica un tiempo de incubación de una hora; el mismo recomienda el uso de PEG (polietilenglicol), ya que este compuesto aumenta la eficiencia de las reacciones de ligación (Thermo Fisher Scientific, 2014), mismo que no fue usado inicialmente. Por ello, se decidió optimizar las soluciones de ligación a relación 10:1, 20:1 y 30:1 (Tabla 7), realizar el precipitado del DNA y también incubar las reacciones durante 16 horas a 16°C en el termociclador (SelectBioProducts, Cat. No. SBT9610, USA) (Rodriguez Carnero et al., 2021)

	10:1 (Lig 1)	20:1 (Lig 2)	30:1 (Lig 3)
Vector (“T10”) (uL)	2	2	2
Inserto DNA (uL)	2.6	5.3	8
Buffer (uL)	2	2	2
PEG (uL)	2	2	2
Enzima (uL)	1	1	1
Agua libre de nucleasa (uL)	10.4	7.7	5
Volumen total (uL)	20	20	20
Incubación de 16-24 horas a 16°C en el termociclador			

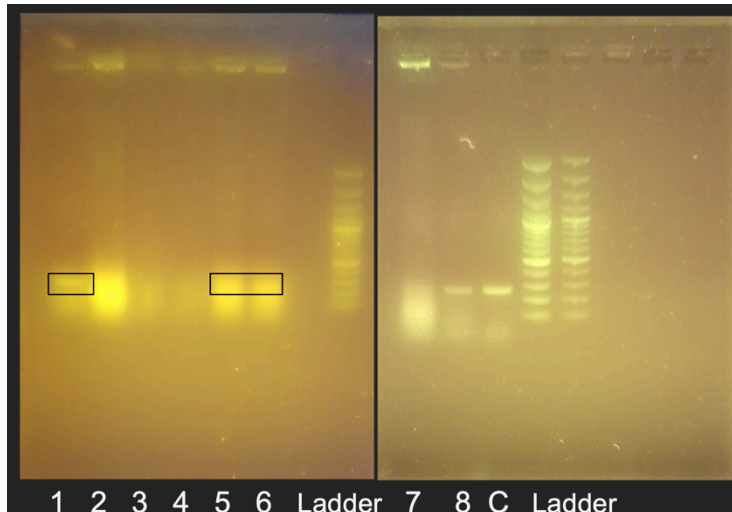
**Tabla 7. Soluciones de ligación a distinta relación**

## Conteo de colonias y PCR



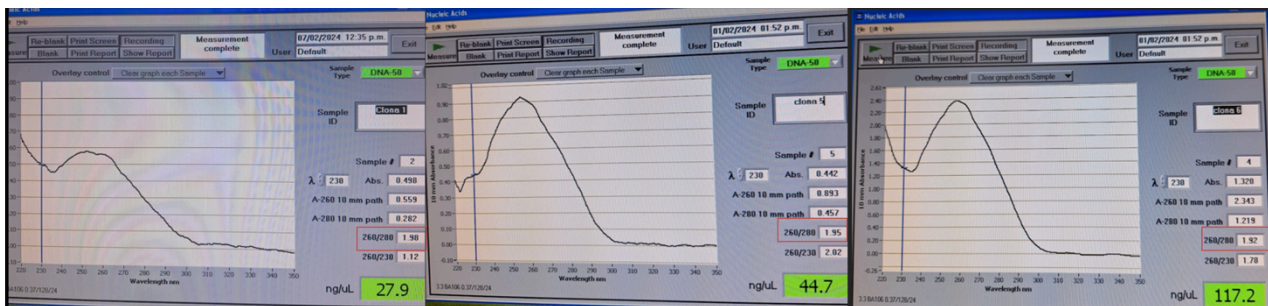
**Figura 16. Plateado y revisión del crecimiento. A (Lig 1); B (Lig 1 pellet); C (Control "gamma"); D (Lig 2); E (Lig 2 pellet); F (Control "vector"); G (Lig 3); H (Lig 3 pellet); I (Control "0")**

Como se observa en la Figura 16, Lig 3 (imagen H), fue seleccionada por la cantidad de colonias que crecieron (8), se procedió con la PCR y electroforesis de las colonias (Figura 17).



**Figura 17. Gel de agarosa 1.2%, donde se amplificaron 8 muestras (colonias), un control del plásmido no digerido (pG8SAET) y un marcador de peso molecular (Ladder) que amplifica a 100bp.**

De acuerdo con el Software SEQUENCHER si la secuencia de oxitocina se encuentra dentro del plásmido, su tamaño sería 299 bp. Con base en lo anterior, se determinó que las colonias 1, 5 y 6 podrían contener dicha secuencia, por tanto, se procedió con la purificación de las mismas usando QIAprep® Spin Miniprep Kit para finalmente cuantificar el DNA en el nanodrop (Figura 18).



**Figura 18. Cuantificación del DNA extraído de las colonias 1, 5 y 6**

#### - Secuenciación

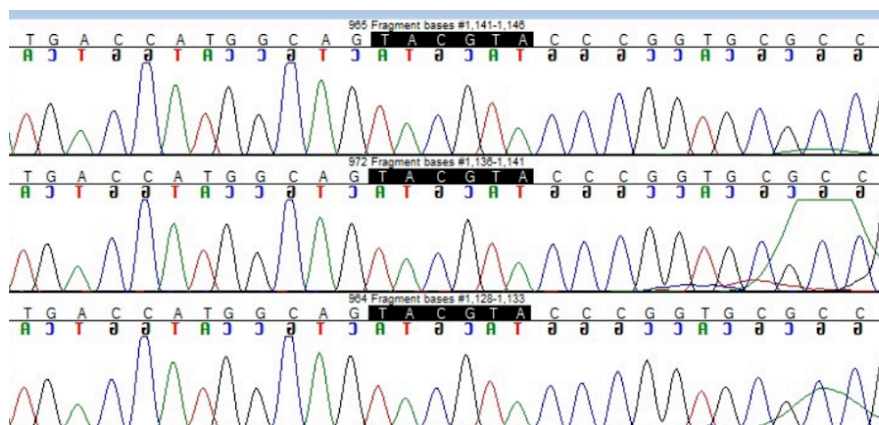
El IBT requiere 400 ng de DNA en un volumen máximo de 16 uL para secuenciar (Instituto de Biotecnología, n.d.), por tanto, se prepararon las muestras de la siguiente manera:

	OXISB1	OXISB5	OXISB6
DNA (uL)	12	9	4
Primer REVERSE (uL)	1	1	1
Agua libre de nucleasas (uL)	3	6	11
Volumen total (uL)	16	16	16

**Tabla 8. Preparación de muestras a secuenciar**



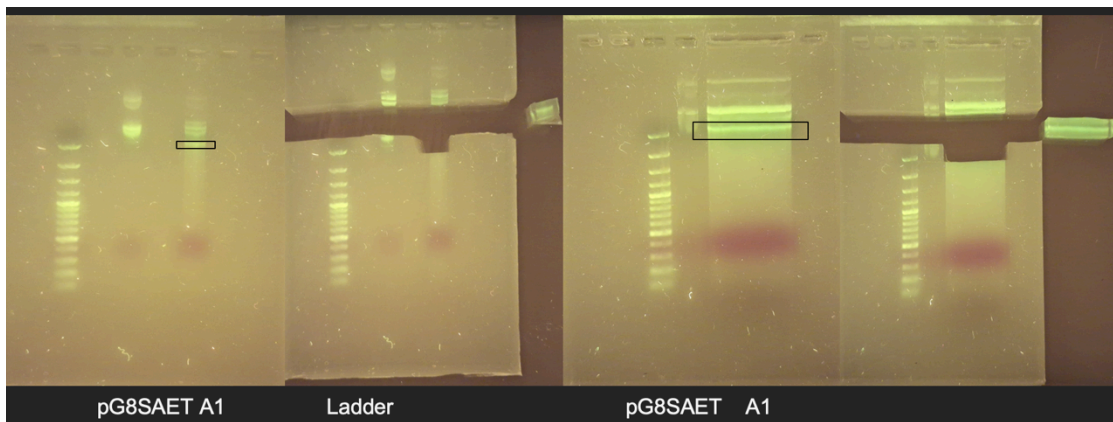
**Figura 19. Revisión de resultados de las colonias secuenciadas en SEQUENCHER. Se distinguen las secuencia del E-tag, el sitio de restricción de Eco105I y NcoI**



**Figura 20. Cromatograma, sitio de restricción Eco105I**

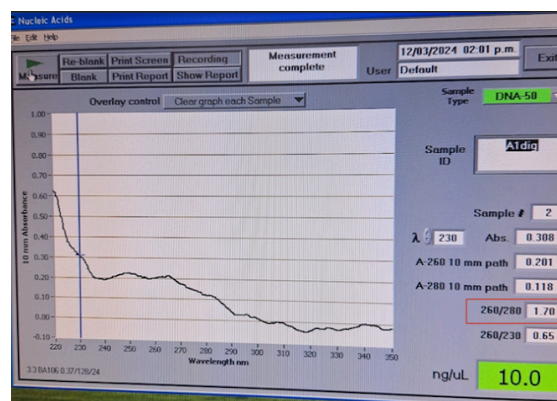
La enzima de restricción utilizada reconoce los sitios TAC/GTA (Thermo Fisher Scientific, 2015); como se observa en las Figura 19 y 20, el sitio de restricción de

Eco105I sigue presente, por lo tanto, la secuencia de oxitocina no se encuentra dentro del plásmido. Se decidió entonces partir de una nueva digestión (Figura 21).



**Figura 21. Gel de agarosa 1%, donde se amplificaron una muestra con 500 ng y otra con el resto de la reacción (A1), un control del plásmido no digerido (pG8SAET) y el marcador molecular que amplifica a 100bp.**

Se extrajo el DNA tanto de la muestra como del resto de la digestión (Figura 22)



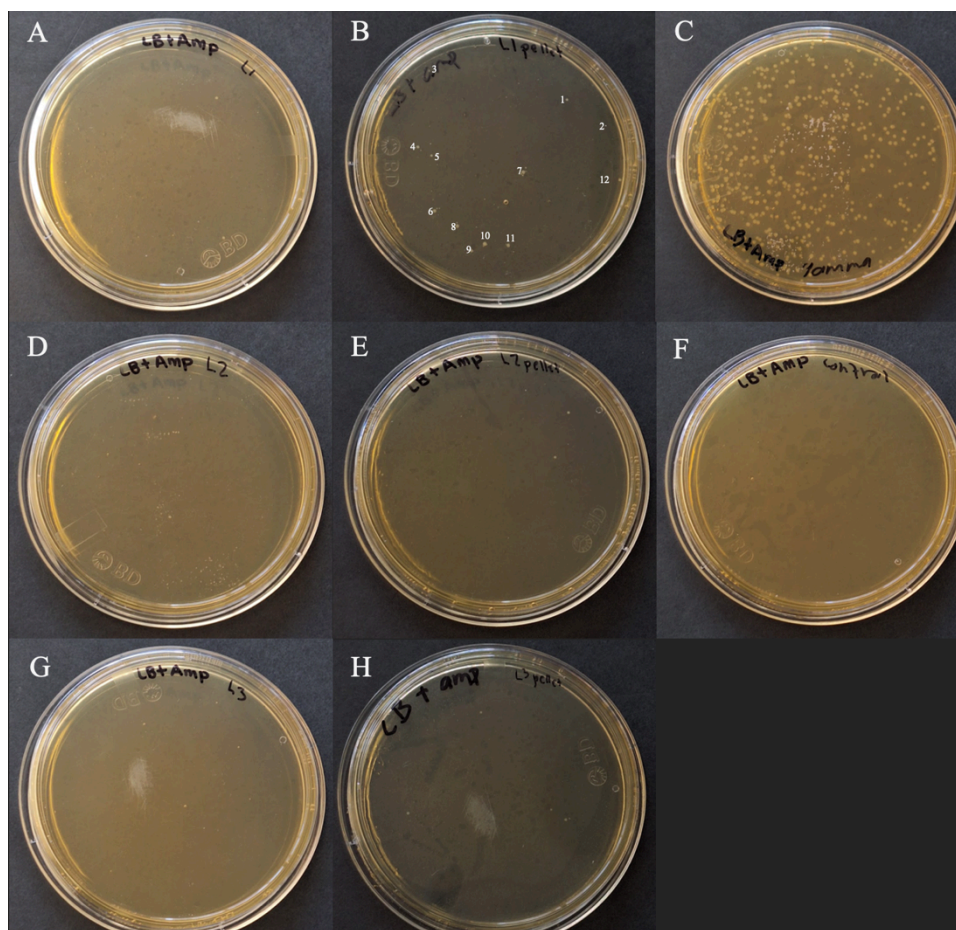
**Figura 22. Cuantificación de DNA de “A1”**

No existió una buena pureza, sin embargo se decidió proseguir con la ligación, esta vez se prepararon tres ligaciones a razón 30:1, 40:1. 50:1 (Tabla 9):

	30:1 (L1)	40:1 (L2)	50:1 (L3)
Vector (“A1”) (uL)	8	8	8
Inserto DNA (uL)	6.5	9	11
Buffer (uL)	2	2	2
PEG (uL)	2	2	2
Enzima (uL)	1	1	1
Agua libre de nucleasa (uL)	8.5	6	4
Volumen total (uL)	20	20	20

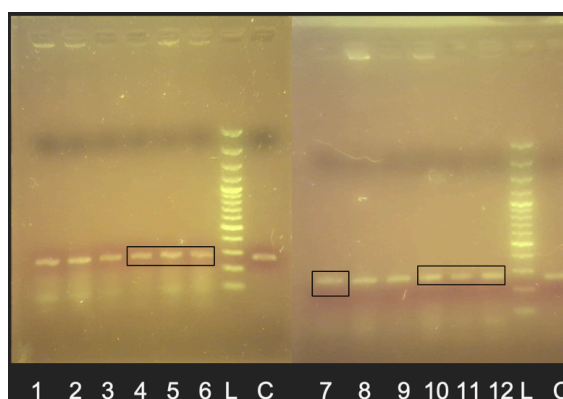
Incubación de 16-24 horas a 16°C en el termociclador

**Tabla 9. Preparación de las soluciones de ligación**



**Figura 23. Plateado y revisión del crecimiento. A (L1); B (L1 pellet); C (Control "gamma"); D (L2); E (L2 pellet); F (Control "vector"); G (L3); H (L3 pellet)**

Se determinó que L1 (Figura 23; imagen B) a razón de 30:1 contenía más colonias (12), por tanto se procedió con la PCR y electroforesis de las mismas (Figura 24).



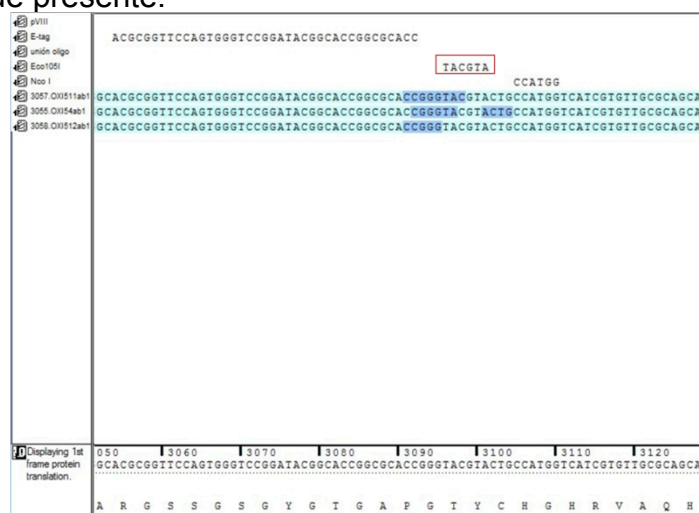
**Figura 24. Gel de agarosa 1.2%, donde se amplificaron 12 muestras (colonias), dos controles del plásmido no digerido (C) y un marcador de peso molecular (L) que amplifica a 100bp.**

Se concluyó las colonias 4, 5, 6, 7, 10, 11, y 12 podrían contener la secuencia, por tanto, se procedió con la purificación de las mismas usando QIAprep® Spin Miniprep Kit para finalmente cuantificar el DNA en el nanodrop. De las 7 colonias, se mandaron a secuenciar únicamente 4 de ellas, ya que tuvieron un DNA mayor (Tabla 10):

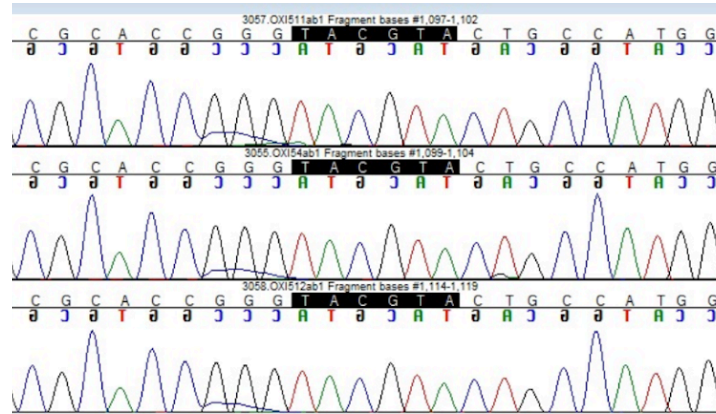
	OXIS4	OXIS7	OXIS11	OXIS12
DNA de la colonia (ng/uL)	36.1	25.6	45.8	41.8
DNA (uL)	11	16	9	10
Primer REVERSE (uL)	1	1	1	1
Agua libre de nucleasas (uL)	4	-	6	5
Volumen total (uL)	16	16	16	16

**Tabla 10. Preparación de muestras a secuenciar**

Al revisar los resultados en el software (Figura 25; Figura 26) se llegó a la misma conclusión, la secuencia no se encuentra dentro del plásmido, debido a que el sitio de restricción sigue presente.



**Figura 25. Revisión de resultados de las colonias secuenciadas en SEQUENCHER. Se distinguen las secuencia del E-tag, el sitio de restricción de Eco105I y NcoI**



**Figura 26. Cromatograma, sitio de restricción Eco105I**

## X. Conclusión

La secuencia de oxitocina fue optimizada debido a que se tomaron los codones con mayor índice de uso. El vector fue digerido con las enzimas de restricción utilizadas sin embargo la ligación no mostró resultados de clonación por lo que se realizaron cambios durante las etapas del proyecto con el fin de optimizar la ligación y obtener la expresión exitosa de la secuencia de oxitocina en pG8SAET, sin embargo, al secuenciar el producto obtenido de la ligación se observó la presencia del sitio de restricción y se determinó que no se encontraba la secuencia.

Se recomienda adquirir una enzima T4 ligasa de distinto laboratorio e intentar la ligación nuevamente.

## XI. Bibliografía

- Biolabs. (n.d.). *Chemical Transformation Tips*. High Efficiency Transformation Protocol. Retrieved January 11, 2024, from <https://www.neb.com/en/tools-and-resources/usage-guidelines/chemical-transformation-tips>
- Codon Usage Database*. (n.d.). Retrieved May 26, 2024, from <https://www.kazusa.or.jp/codon/>
- Elois, M. A., Silva, R. da, Pilati, G. V. T., Rodríguez-Lázaro, D., & Fongaro, G. (2023). Bacteriophages as Biotechnological Tools. In *Viruses* (Vol. 15, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/v15020349>
- Guyton, A., & Hall, J. (2021). Excitación y contracción del músculo liso. In *Tratado de fisiología médica* (12th ed., pp. 93–94). Elsevier.
- Hill, S. V., del Rocio Amezcua, M., Ribeiro, E. S., O'Sullivan, T. L., & Friendship, R. M. (2022). Defining the Effect of Oxytocin Use in Farrowing Sows on Stillbirth Rate: A Systematic Review with a Meta-Analysis. In *Animals* (Vol. 12, Issue 14). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12141795>
- Instituto de Biotecnología, U. (n.d.). *Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA*. Retrieved May 7, 2024, from <https://sibiotec.ibt.unam.mx/SiBioTec/modulos/SintesisSecuenciacion/SecuenciaEditExterno.aspx>
- Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J., & Frykberg, L. (2003). Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptors or other Exported Proteins. *Biol. Proced. Online*, 5(1), 123–135.
- Linneen, S. K., Benz, J. M., DeRouchey, J. M., Goodband, R. D., Tokach, M. D., & Dritz, S. S. (2005). A review of oxytocin use for sows and gilts. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, 10, 1–3. <https://doi.org/10.4148/2378-5977.6934>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- López, C., Arámbula, J., & Camarena, E. (2014a). Oxitocina, la hormona que todos utilizan y pocos conocen. *Ginecol Obstet Mex*, 82, 472–482.
- López, C., Arámbula, J., & Camarena, E. (2014b). Oxitocina, la hormona que todos utilizan y que pocos conocen. *Ginecol Obstet Mex*, 82, 472–482.
- Lowman, H. B. (2013). *Phage Display for Protein Binding*.
- Mota-Rojas, D., Rosales, A. M., Trujillo, M. E., Orozco, H., Ramírez, R., & Alonso-Spilsbury, M. (2005). The effects of vetrabutín chlorhydrate and oxytocin on stillbirth rate and asphyxia in swine. *Theriogenology*, 64(9), 1889–1897. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.12.018>
- Mullen, L. M., Nair, S. P., Ward, J. M., Rycroft, A. N., & Henderson, B. (2006). Phage display in the study of infectious diseases. In *Trends in Microbiology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 141–147). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.01.006>
- Mustafa, M. I., & Mohammed, A. (2024). Developing recombinant antibodies by phage display technology to neutralize viral infectious diseases. In *SLAS Discovery* (Vol. 29, Issue 3). Society for Laboratory Automation and Screening (SLAS). <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.01.001>
- Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2013). *Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años\* DNA concentration and purity of blood samples stored in whatman FTA paper between 1 to 3 years*.
- Plumb, Donald., & Pharm, D. (2010). *Manual de farmacología veterinaria* (Inter-médica, Ed.; 6a ed.). LABYES.

- Promega. (2024). *Biomath Calculators*. Ligations: Molar Ratio of Insert:Vector. <https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>
- Promega Corporation. (2019). *TECHNICAL BULLETIN: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*.
- Qi, H., Lu, H., Qiu, H. J., Petrenko, V., & Liu, A. (2012). Phagemid vectors for phage display: Properties, characteristics and construction. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 417, Issue 3, pp. 129–143). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>
- Rodriguez Carnero, L. A., Reis Teixeira, A. A., Fen Tang, F. H., Kuramoto, A., Manso Alves, M. J., Colli, W., Setubal, J. C., Cunha-Neto, E., Pasqualini, R., Arap, W., & Giordano, R. J. (2021). Protocol for design, construction, and selection of genome phage (gPhage) display libraries. *STAR Protocols*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100936>
- Senturk, G. E., Sezer, Z., Sahin, H., Isildar, B., & Abdulova, A. (2023). Effects of chronically exogenous oxytocin on ovary and uterus: A comparison of intraperitoneal and intranasal administration. *Peptides*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171006>
- Silverman, P. M., & Clarke, M. B. (2010). New insights into F-pilus structure, dynamics, and function. In *Integrative Biology* (Vol. 2, Issue 1, pp. 25–31). <https://doi.org/10.1039/b917761b>
- Song, B. P. C., Ch'ng, A. C. W., & Lim, T. S. (2024). Review of phage display: A jack-of-all-trades and master of most biomolecule display. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 256). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128455>
- Thermo Fisher Scientific. (2014). *PRODUCT INFORMATION: T4 DNA Ligase*.
- Thermo Fisher Scientific, I. (2015). *Product Insert: Anza 43 Eco105I*.
- Thermo Fisher Scientific, I. (2016). *Restriction enzyme isoschizomers and key considerations*.
- Theunissen, F., Cleps, I., Chinery, L., Bochaton, F., & Vemer, H. (2018). *Oxytocin Quality – Evidence for Action*.
- Torres, A., Capote, J., Argüello, A., Sánchez-Macías, D., Morales-delaNuez, A., & Castro, N. (2014). Effects of oxytocin treatments on milk ejection in dairy goats traditionally milked once a day. *Small Ruminant Research*, 120(2–3), 231–233. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.05.010>
- Trujillo, Ma. E., Silva, H., & Gutiérrez, O. (2019). Parto. In *Reproducción del cerdo: una visión práctica* (1st ed., pp. 71–74).
- Uvnäs-Moberg, K. (2023). The physiology and pharmacology of oxytocin in labor and in the peripartum period. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2023.04.011>
- Vispo, N. S., Camacho, F., Antúnez, M. P., Toledo, R., & Ramos, O. S. (2016). Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents. In *Bionatura* (Vol. 1, Issue 1, pp. 22–29). Centro de Biotecnología y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech. <https://doi.org/10.21931/RB/2016.01.01.6>
- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R., & Fu, C. (2022). Therapeutic peptides: current applications and future directions. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>
- Wang, L.-F., & Yu, M. (2005). Epitope Identification and Discovery Using Phage Display Libraries: Applications in Vaccine Development and Diagnostics. *Current Drug Targets*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/1389450043490668>
- Webster, R. (1996). Biology of the Filamentous Bacteriophage. In B. Kay, J. Winter, & J. McCafferty (Eds.), *Phage Display of Peptides and Proteins*. Elsevier.

Yin, Z., Su, J., Fei, J., Li, T., Li, D., Cao, Y., & Khalil, R. A. (2022). Preserved oxytocin-induced myometrium contraction and sensitivity to progesterone inhibition following rat uterus thermal insult. Impact on fertility. *Biochemical Pharmacology*, 204. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115244>