

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Avaliação do potencial imunogênico de vacinas
contendo GnRH-I recombinante em camundongos
machos BALB/c**

Lívia Budziarek Eslabão

Pelotas, 2016
Lívia Budziarek Eslabão

**Avaliação do potencial imunogênico de vacinas contendo GnRH-I
recombinante em camundongos machos BALB/c**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite
Coorientador(es): Rodrigo Casquero Cunha

Pelotas, 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride (Universidade Federal de Pelotas, CDTec)

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Medicina Veterinária)

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

E76a Eslabão, Lívia Budziarek

Avaliação do potencial imunogênico de vacinas contendo gnrh-i recombinante em camundongos machos balb/c / Lívia Budziarek Eslabão ; Fábio Pereira Leivas Leite, orientador ; Rodrigo Casquero Cunha, coorientador. — Pelotas, 2016.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Quimera. 2. Gnrh. 3. Ltb. 4. Imunocontraceptivo. 5. Castração imunológica. I. Leite, Fábio Pereira Leivas, orient. II. Cunha, Rodrigo Casquero, coorient. III. Título.

CDD : 615.372

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e a minha irmã.

Agradeço aos amigos.

Agradeço ao meu orientador professor Fábio Pereira Leivas Leite.

Agradeço ao meu coorientador Rodrigo Casquero Cunha.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Microbiologia.

Agradeço aos colegas do Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPEL).

Agradeço aos funcionários do Biotério Central da UFPel.

Agradeço a todos que colaboraram com este estudo.

Resumo

ESLABÃO, Livia Budziarek. **Avaliação do potencial imunogênico de vacinas contendo GnRH-I recombinante em camundongos machos BALB/c.** 2016. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A imun contracepção é reconhecida como um dos principais novos métodos contraceptivos para o controle e o manejo da fertilidade em diferentes espécies animais. Dentre os potenciais alvos utilizados em vacinas contraceptivas, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é considerado um dos mais atrativos. O GnRH é um decapeptídeo hipotalâmico que apresenta um papel central na reprodução de mamíferos. Entretanto, devido à sua baixa imunogenicidade, é necessário associar o GnRH com uma molécula carreadora capaz de estimular o sistema imune como, por exemplo, a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB). O presente estudo visou avaliar o potencial imun contraceptivo de duas quimeras LTB/GnRH em camundongos machos da linhagem BALB/c. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais. O grupo LTB/GnRH-P recebeu a quimera expressa em *P. pastoris*. O grupo LTB/GnRH-P/A recebeu a quimera expressa em *P. pastoris* adsorvida em adjuvante oleoso. O grupo LTB/GnRH-E recebeu a quimera expressa em *E. coli*. O grupo LTB/GnRH-E/A recebeu a quimera expressa em *E. coli* adsorvida em adjuvante oleoso. O grupo LTB recebeu a proteína LTB expressa em *E. coli*. Os grupos Controle e Controle/A não receberam nenhum antígeno vacinal. O grupo Vacina comercial recebeu vacina comercial anti-GnRH utilizada em bovinos. A resposta imune humoral foi avaliada pela técnica de ELISA indireto e o potencial imun contraceptivo foi avaliado por meio da quantificação de testosterona sérica e das análises histológicas das gônadas dos animais. Os grupos que receberam os antígenos LTB/GnRH (25 µg por vacina) apresentaram níveis de IgG total significativamente superiores quando comparados aos grupos controle, mostrando que ambos os antígenos são imunogênicos. Os grupos LTB/GnRH-P e LTB/GnRH-P/A apresentaram as maiores absorbâncias nos dias 28 ($1,11 \pm 0,09$) e 42 ($1,44 \pm 0,04$), respectivamente. Além disso, o grupo LTB/GnRH-P/A apresentou níveis de testosterona significativamente menores ao controle a partir do dia 28 ($192 \text{ ng/dl} \pm 254,55$). Os grupos LTB/GnRH-E e LTB/GnRH-E/A também obtiveram os maiores níveis de anticorpos nos dias 28 ($0,33 \pm 0,005$) e 42 ($1,44 \pm 0,08$), respectivamente. O grupo LTB/GnRH-E/A apresentou níveis de testosterona significativamente menores ao controle a partir do dia 28 ($<12 \text{ ng/dl} \pm 0$). Os resultados da histologia mostraram que ambos os antígenos causam alterações na espermatogênese, sendo que o antígeno expresso em *E. coli* foi relacionado com as maiores alterações nas gônadas. O presente estudo mostrou quimeras produzidas através da fusão da LTB com uma única molécula de GnRH é capaz de induzir a geração de resposta imune humoral, bloqueio das funções endócrinas relacionadas com a reprodução e alterações teciduais nas gônadas de camundongos machos.

Palavras-chave: quimera; GnRH; LTB; imun contraceptivo; castração imunológica.

Abstract

ESLABÃO, Livia Budziarek. **Assessment of immunogenic potential of vaccines containing recombinant GnRH-I in male BALB/c mice.** 2016. 80f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Immunocontraception is recognized as one of the major new contraceptive methods for the control and management of fertility in different animal species. Among the potential targets used in contraceptive vaccines, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is considered one of the most attractive. GnRH is a hypothalamic decapeptide that presents a central role in mammalian reproduction. However, due to its low immunogenicity, it is necessary to associate the GnRH with a carrier molecule capable of stimulating the immune system such as, for example, the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB). The present study aimed to evaluate the immunocontraceptive potential of two LTB/GnRH chimeras in male BALB/c mice. Mice were randomly divided into eight experimental groups. The LTB/GnRH-P group received the chimera expressed in *P. pastoris*. The LTB/GnRH-P/A group received the chimera expressed in *P. pastoris* adsorbed in oil adjuvant. The LTB/GnRH-E group received the chimera expressed in *E. coli*. The LTB/GnRH-E/A group received the chimera expressed in *E. coli* adsorbed in oil adjuvant. The Control and Control/A groups did not receive vaccine antigen. The Commercial vaccine group received an anti-GnRH commercial vaccine used in cattle. The humoral immune response was evaluated by indirect ELISA and the immunocontraceptive potential was assessed through the quantification of serum testosterone and the histological analysis of animal's gonads. The groups that received LTB/GnRH antigens (25 µg per vaccine) presented total IgG levels significantly higher when compared to the control groups, showing that both antigens are immunogenic. The LTB/GnRH-P and LTB/GnRH-P/A groups showed higher absorbances at days 28 ($1,11 \pm 0,09$) and 42 ($1,44 \pm 0,04$), respectively. Furthermore, the LTB/GnRH-P/A group presented testosterone levels significantly lower to the control from day 28 ($192 \text{ ng/dl} \pm 254,55$). The LTB/GnRH-E and LTB/GnRH-E/A groups also obtained the highest antibody levels at days 28 ($0,33 \pm 0,005$) and 42 ($1,44 \pm 0,08$), respectively. The LTB/GnRH-E/A group presented testosterone levels significantly lower to the control from day 28 ($<12 \text{ ng/dl} \pm 0$). The results from histology showed that both antigens cause changes in spermatogenesis, wherein the antigen expressed in *E. coli* was associated with major changes in gonads. The present study showed that chimeras produced through the merge of LTB with a single GnRH molecule is capable to induce the generation of humoral immune response, block of the endocrine functions related to reproduction, and tissue alterations in the gonads of male mice.

Keywords: chimera; GnRH; LTB; immunocontraceptive; immunological castration.

Lista de Figuras

Figura 1. Sequência da quimera LTB/GnRH utilizada na clonagem do plasmídeo pPICZαB.....	44
Figura 2. Sequência da quimera LTB/GnRH utilizada na clonagem do plasmídeo pAE	46
Figura 3. SDS-PAGE das quimeras LTB/GnRH	52
Figura 4. <i>Western blot</i> das quimeras LTB/GnRH	53
Figura 5. Cinética de IgG total em resposta aos antígenos LTB/GnRH <i>P. pastoris</i> , LTB/GnRH <i>E. coli</i> e LTB <i>E. coli</i>	56
Figura 6. Perfil de IgG1 e IgG2a dos animais em experimentação	58
Figura 7. Histologia testicular dos animais vacinados com LTB/GnRH <i>P. pastoris</i> ...	61
Figura 8. Histologia testicular dos animais vacinados com LTB/GnRH <i>E. coli</i>	63

Lista de Tabelas

Tabela 1. Representação dos grupos de animais utilizados no experimento.	48
Tabela 2. Concentração de testosterona sérica em camundongos machos BALB/c.	59

Lista de Abreviaturas

ANOVA – Análise de variância

APC – Células apresentadoras de antígenos

AR – Receptor de andrógeno

BMGY – Meio tamponado complexo com glicerol (*Buffered glycerol-complex medium*)

BMMY – Meio tamponado complexo com metanol (*Buffered methanol-complex medium*)

BSA – Albumina sérica bovina

CG – Gonadotrofina coriônica

CpG – Regiões genômicas ricas em citosina e guanina

CT – Toxina colérica

CTP – Peptídeo carboxi-terminal

DAB - Diaminobenzidina

DEAE – Dietilaminoetanol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO₆₀₀ – Densidade ótica a 600 nm

FA – Antígeno fertilizante

FSH – Hormônio folículo estimulante

GAP – Peptídeo associado ao GnRH

GM – Receptor gangliosídeo

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GPR54 – Receptor de *kisspeptin*

hCG – Gonadotrofina coriônica humana

Hsp65 – Proteína de choque térmica 65

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IPTG - Tiogalactopiranosídeo

ISC – Complexo imunoestimulante

Kiss - *Kisspeptin*

KLH – *Keyhole limpet hemocyanin* – hemocianina de lapa californiana

LB – Luria Bertani

LH – Hormônio luteinizante

LHRH – Hormônio liberador do hormônio luteinizante

LT – Enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

LTA – Subunidade A da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

LTB – Subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

LTB/GnRH – Quimera recombinante contendo a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* e o hormônio liberador de gonadotrofina

MBP – Proteína ligante de maltose

MCMV – Citomegalovírus murino

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

OPD – O-fenilenodiamina

OVA – Ovalbumina

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

PBS – Solução salina fosfatada

PBS-T – Solução salina fosfatada contendo 0,05% de Tween-20

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGC - Poliglicosilceramida

PH – Proteína da superfície espermática

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonila

PVP – Polivinilpirrolidona

pZP – Zona pelúcida de suínos

rpm – Rotações por minuto

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SP – Proteína espermática

SPGA – Antígeno associado ao espermatozoide

T_h1 – Linfócito T-*helper* do tipo 1

T_h2 – Linfócito T-*helper* do tipo 2

TLR – Receptor do tipo Toll

TSH – Hormônio tireoide estimulante

TT – Toxóide tetânico

YPD – Meio contendo dextrose, peptona e levedura (*Yeast peptone dextrose*)

ZP – Zona pelúcida

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Gonadotrofina Coriônica Humana.....	25
2.2 Hormônio Folículo Estimulante e Hormônio Luteinizante.....	26
2.3 Antígenos espermatozoide-específicos	28
2.4 Zona pelúcida.....	29
2.5 Hormônio Liberador de Gonadotrofina.....	31
2.5.1 Isoformas	33
2.5.2 Produção de imun contraceptivos	35
2.5.3 Vacinas	37
2.6 Subunidade B da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i>	40
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	43
3.1 Hipótese.....	43
3.2 Objetivo Geral	43
3.3 Objetivos Específicos.....	43
4 Materiais e métodos	44
4.1 Produção do antígeno LTB/GnRH em <i>Pichia pastoris</i>	44
4.2 Produção do antígeno LTB/GnRH em <i>Escherichia coli</i>	46
4.3 Animais e desenho experimental	47
4.4 Detecção da produção de anticorpos por ELISA	49
4.5 Determinação de testosterona sérica.....	50
4.6 Avaliação histológica do efeito da imunização nos órgãos reprodutivos.....	51
4.7 Análises estatísticas.....	51
5 Resultados	52
5.1 Análise da expressão da químera LTB/GnRH por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	52

5.2 Avaliação da resposta imune contra os antígenos LTB/GnRH em camundongos BALB/c machos	53
5.3 Quantificação de testosterona	59
5.3 Observações histológicas dos tecidos reprodutivos.....	60
6 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	65
7 CONCLUSÃO GERAL.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

A castração vem sendo empregada como um importante procedimento para melhorias no manejo e na qualidade da carne de animais destinados ao consumo e para o controle de populações selvagens. Entretanto, os métodos disponíveis atualmente não possuem uma ampla aceitação pela sociedade já que envolvem ou a eliminação de indivíduos de uma determinada população ou métodos cirúrgicos, os quais podem gerar dor excessiva e complicações pós-operatórias.

Os problemas enfrentados pelos métodos contraceptivos atuais geraram uma crescente busca por novos contraceptivos que assegurem o bem estar animal e que sejam tão eficientes quantos os métodos tradicionais. A imun contracepção tornou-se um dos principais alvos na busca pelo desenvolvimento de novos contraceptivos. As vacinas contraceptivas permitem a indução de uma resposta imune humoral e/ou celular contra hormônios/proteínas envolvidos na cascata reprodutiva, interferindo nas suas funções biológicas e bloqueando a fertilidade da espécie alvo.

Um dos principais alvos candidato a imun contraceptivo é o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), também conhecido como hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH). O GnRH é um decapeptídeo hipotalâmico responsável por regular a biossíntese e a liberação do hormônio luteinizante e do hormônio folículo estimulante, os quais vão atuar promovendo a maturação dos folículos ovarianos em fêmeas e a espermatogênese em machos.

Entretanto, por apresentar uma baixa imunogenicidade, o GnRH necessita ser conjugado a múltiplas cópias do próprio hormônio para estimular o sistema imune a induzir uma resposta contra o hormônio. Outra alternativa é a fusão com moléculas carreadoras capazes de apresentar o antígeno ao sistema imune e modular o tipo de resposta induzida. Nosso grupo clonou, expressou e caracterizou a antigenicidade de uma quimera composta pelo GnRH e pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) em dois sistemas diferentes de expressão de proteínas recombinantes.

A LTB vem sendo utilizada em diversos estudos como molécula carreadora para antígenos. Ela é considerada uma potente molécula sinalizadora com

capacidade de modular a resposta imune, sendo capaz de estimular resposta imune mista T_h1/T_h2 quando administrada por via sistêmica.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial imun contraceptivo em camundongos machos da linhagem BALB/c das duas quimeras LTB/GnRH obtidas em sistemas de expressão procarioto e eucarioto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização de contraceptivos para limitar a fertilidade de espécies animais, incluindo animais de produção, selvagens e domésticos, vem se tornando uma questão muito importante. Isso deve-se a necessidade de controle dos níveis populacionais, a dependência humana da produção de carne, a eliminação de características indesejadas associadas a reprodução e o interesse ao bem estar animal e aos procedimentos éticos envolvidos no abate de animais (Delves, 2004; Ferro *et al.*, 2004b; Gupta e Bansal, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Naz e Saver, 2015).

O controle da fertilidade de diversas populações animais vem ganhando impulso desde a década de 60, na qual diversos métodos disponíveis para uso humano como, por exemplo, pílulas com base em esteroides, implantes e métodos de barreira, foram adaptados e implementados para o uso animal (Kirkpatrick e Turner, 1991; Naz e Saver, 2015). Entretanto, o uso desses contraceptivos apresentam diversas limitações incluindo o consumo diário para alcançar a eficácia desejada e os efeitos adversos decorrentes do consumo contínuo ou do implante (Naz e Saver, 2015).

A castração cirúrgica é frequentemente realizada em animais destinados ao consumo já que pode atuar influenciando no crescimento do animal, na qualidade da carne e no controle do comportamento agressivo de machos de algumas espécies (Turkstra *et al.*, 2011; Kubale *et al.*, 2013). O controle de populações selvagens é geralmente através da morte, resultando na eliminação de diversos indivíduos, ou de procedimentos cirúrgicos, podendo resultar em complicações pós-operatórias, dor excessiva e retardo no crescimento do animal (Gupta e Bansal, 2010; Gupta *et al.*, 2011). Além disso, o número total de inflamações crônicas em animais castrados cirurgicamente é superior quando comparados com animais inteiros e fêmeas (Zamaratskaia *et al.*, 2008).

Os suínos, por exemplo, eram rotineiramente castrados pelo método cirúrgico sem anestesia (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Bonneau, 2010; Zamaratskaia e Rasmussen, 2015). Esse procedimento é caracterizado, principalmente, pela presença de odor e de sabor desagradáveis na carne, interferindo na qualidade e na comercialização da mesma (Dunshea *et al.*, 2001; Zamaratskaia *et al.*, 2008; Gispert *et al.*, 2010; Turkstra *et al.*, 2011; Zamaratskaia e Rasmussen, 2015).

O odor sexual ocorre na carne de suínos machos maduros por causa da acumulação de androsterona e/ou escatol no tecido adiposo desses animais. Androsterona é um esteroide testicular produzido nas células de Leydig e tem sua produção controlada pelo hormônio luteinizante, este último envolvido com o processo reprodutivo. Já o escatol é produzido pela degradação microbiana do aminoácido triptofano no intestino grosso dos animais (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Turkstra *et al.*, 2011; Zamaratskaia e Rasmussen, 2015).

Estudos mostram que hormônios esteroides, como a androsterona, podem estar associados com a regulação dos níveis de escatol no fígado. A androsterona é capaz de inibir a expressão da enzima CYP2E1, principal enzima do metabolismo do escatol, reduzindo a degradação do mesmo e favorecendo o acúmulo no tecido adiposo (Doran *et al.*, 2002; Zamaratskaia *et al.*, 2007; Zamaratskaia *et al.*, 2008). Portanto, altos níveis de escatol são geralmente associados com altos níveis de hormônios esteroides em machos. Já fêmeas não acumulam altos níveis de escatol no tecido adiposo devido a diferenças nas atividades enzimáticas do metabolismo do escatol no fígado (Zamaratskaia *et al.*, 2008).

Devido a pressões exercidas pela sociedade com relação a castração cirúrgica, a União Europeia, em conjunto com a maioria das cadeias europeias de criação de suínos, se voluntariaram para eliminar com essa prática até o ano de 2018, buscando novas alternativas viáveis para a substituição da mesma (Kubale *et al.*, 2013).

As vacinas contraceptivas são uma alternativa válida para a substituição da castração cirúrgica. Uma vacina ideal deve fornecer efeitos de longo prazo sem qualquer efeito adverso a saúde do animal e possibilitar a reversão da castração, exceto em casos onde a castração permanente é necessária. Existem requerimentos específicos para cada tipo de população a ser aplicada, sendo ela selvagem, cativeiro, consumo ou doméstica (Gupta e Bansal, 2010; Naz, 2011; Naz e Saver, 2015). A redução do comportamento sexual e agressivo é vista como vantagem em populações em cativeiro, destinadas ao consumo e domésticas, porém, não é vantajosa quando empregada em animais selvagens visto que esses comportamentos são necessários para manutenção da hierarquia da manada. Para populações selvagens e de cativeiro, administração remota é importante para evitar o estresse causado pela captura e pela contenção que ocorre durante administração

manual (Gupta e Bansal, 2010; Kirkpatrick *et al.*, 2011; Naz e Saver, 2015; Zamaratskaia e Rasmussen, 2015). Para aplicação em populações selvagens e animais destinados ao consumo, os antígenos vacinais não devem ser transmitidos através da cadeia alimentar, impossibilitando que populações não alvo de contracepção gerem resposta imune contra o antígeno (Naz e Saver, 2015).

Desde 1980 que o uso de uma abordagem imunológica para a contracepção vem gerando interesse como alternativa para os métodos contraceptivos atuais. Esse interesse ocorre pela capacidade da imunocastração de gerar resposta imune humoral e celular contra hormônios/proteínas que apresentam um papel crucial na reprodução, interferindo nas suas funções biológicas o que resulta no bloqueio da fertilidade. Estudos mostram que vacinas imun contraceptivas podem gerar uma inibição tanto reversível quanto irreversível da fertilidade, um atraso na maturação sexual e/ou um bloqueio de crescimento em tumores hormônio-dependentes (Delves, 2004; Junco *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2004b; Gupta e Bansal, 2010).

Animais imunocastrados apresentam peso vivo e peso de carcaça mais elevados do que animais castrados cirurgicamente e animais inteiros da mesma espécie (Gispert *et al.*, 2010). Em suínos imunocastrados, o percentual de gordura na região do lombo também é maior do que os encontrados em animais inteiros. Já os níveis de gordura intramuscular e a qualidade da carne (pH e cor) de animais imunocastrados são conservados pela castração imunológica sendo mantidas as mesmas características presentes em animais inteiros (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Gispert *et al.*, 2010).

A segurança das vacinas imun contraceptivas deve-se ao fato de que uma grande parte das moléculas alvo não apresenta reatividade cruzada com outras moléculas fundamentais ao organismo já que são alvos envolvidos quase que exclusivamente com a reprodução (Kirkpatrick *et al.*, 2011). Além disso, estudos mostram que a reatividade cruzada entre isoformas de alguns hormônios utilizados na imun contracepção, como, por exemplo, o hormônio liberador de gonadotrofina, é mínima (Ferro *et al.*, 2001; Turkstra *et al.*, 2005). Em imun contraceptivos cujo o alvo sejam hormônios que apresentam subunidades compartilhadas entre com outras moléculas, como ocorre com as gonadotrofinas, são selecionadas as regiões que apresentam uma maior variação nas suas sequências para prevenir a

ocorrência de reações cruzadas e possíveis efeitos adversos (Deves, 2004; Gupta e Bansal, 2010; Munks, 2012).

A utilização, principalmente, de hormônios como antígenos na produção de vacinas imun contraceptivas vem sendo proposta como uma proeminente alternativa que satisfaz a maioria, senão todas, características de um contraceptivo ideal. Por apresentarem propriedades como a alta especificidade ao alvo de interesse, um longo período de ação, o baixo custo de produção e os poucos efeitos adversos, o desenvolvimento de vacinas imun contraceptivas é considerado um grande avanço no campo da contracepção (Naz, 2011; Kaur e Prabha, 2014).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), por exemplo, vem ganhando grande atenção da indústria farmacêutica devido, não só a importância do papel que exerce na cadeia reprodutiva, mas também pela participação no desenvolvimento tumoral. Pesquisas apontam que são encontrados altos níveis de expressão tanto do hormônio e seus receptores quanto dos esteroides sexuais, cuja expressão é induzida pelo GnRH, e seus receptores em diversos tumores malignos como, por exemplo, o câncer de mama (Pazaitou-Panayiotou *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 1998), de ovário (Schneider *et al.*, 2006), de endométrio (Limonta *et al.*, 2003) e de próstata (Aguilar *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2008; Junco *et al.*, 2007; Talwar *et al.*, 2009).

Para o desenvolvimento de um imun contraceptivo, o alvo de intervenção deve contemplar alguns requisitos. Primeiro, o alvo deve ser absolutamente essencial para a reprodução. Segundo, ele não deve apresentar outra função fisiológica que não esteja relacionada com o processo reprodutivo. Terceiro, é preferível escolher um alvo que atue na reprodução tanto de machos quanto de fêmeas, ao contrário torna-se necessário o desenvolvimento de um produto específico para cada sexo. Quarto, o alvo vacinal deve, se possível, estar relacionado com os comportamentos sexuais com o objetivo de eliminar comportamentos indesejados. Finalmente, o alvo deve ser preferencialmente extracelular, já que, sob condições fisiológicas normais, os anticorpos não são eficientes em localizar antígenos intracelulares (Munks, 2012; Kaur e Prabha, 2014).

Existem diversos pontos durante o processo reprodutivo que podem servir como alvos para a intervenção imunológica com o objetivo de atingir a infertilidade. Os três principais meios de intervenção estão relacionados com: a produção de

gametas, a funcionalidade dos gametas e a sobrevivência do embrião (Gupta e Bansal, 2010; Naz, 2011; Kaur e Prabha, 2014).

A produção de gametas inclui a síntese de células reprodutivas pelas gônadas, ou seja, a produção de espermatozoides pelos testículos e a produção de oócitos pelos ovários. O GnRH é o primeiro hormônio da cadeia reprodutiva, sendo sintetizado e secretado pelo hipotálamo. Ele atua na hipófise anterior regulando a produção de duas gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). A imunoneutralização do GnRH, LH e FSH podem prevenir a interação desses hormônios com os seus respectivos receptores, interferindo na produção de gametas e, portanto, inibindo a fertilidade (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010; Kaur e Prabha, 2014). Além disso, o GnRH, quando utilizado para imunizar machos, também suprime a produção de testosterona (Miller *et al.*, 2000; Delves, 2004). Essa inibição traz complicações na utilização desse tipo de vacina em homens já que torna necessária a suplementação com andrógenos para preservar as características sexuais secundárias e a libido (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010).

Além dos hormônios envolvidos na reprodução, tanto os espermatozoides quanto os óvulos apresentam antígenos únicos contra os quais pode ser estimulada uma resposta imune, levando ao bloqueio da fertilidade, atuando na funcionalidade do gameta (Baskin, 1932; Edwards, 1964; Gupta e Bansal, 2010; Ivanovo *et al.*, 1995; Munks, 2012). Essa abordagem tem como alvo os antígenos das zonas pelúcidas (ZP) dos oócitos e os antígenos de superfície do espermatozoide. Por não serem alvos hormonais, o bloqueio da funcionalidade dos gametas é considerado o método mais seguro entre as alternativas existentes. As vacinas visando os antígenos ZP atuam bloqueando a ancoragem do espermatozoide ao oócito em fêmeas enquanto as vacinas baseadas em espermatozoide atuam no trato reprodutivo de fêmeas com o objetivo de interferir na motilidade e na função do espermatozoide (Kaur e Prabha, 2014; Naz e Saver, 2015).

A fusão do espermatozoide com o óvulo resulta na formação do embrião. O embrião sintetiza e secreta gonadotrofina coriônica (CG), a qual auxilia no resgate dos corpos lúteos, na produção de progesterona e preparo do endométrio, cruciais para o estabelecimento e manutenção da prenhez. Portanto, a neutralização de CG por meio de anticorpos pode interferir na implantação do blastocisto, resultando não

manutenção da gestação (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010; Naz, 2011; Kaur e Prabha, 2014).

Apesar da existência de diferentes proteínas que estão relacionadas com a reprodução e que preenchem os critérios para o desenvolvimento de um imun contraceptivo, o GnRH e as proteínas da zona pelúcida (ZP) são os estudados com maior frequência e os que se encontram em um número maior de espécies (Naz, 2011; Naz e Saver, 2015). Os esteroides sexuais, em teoria, também poderiam servir como alvo vacinal. Entretanto, como compartilham um mesmo precursor, a produção de anticorpos pode não ser específica para o hormônio de interesse o que poderia levar a efeitos adversos indesejados (Naz, 2011; Munks, 2012).

Mesmo com os grandes avanços já alcançados no desenvolvimento de vacinas contraceptivas, ainda não foi possível obter uma vacina de uso prático com aplicação a todos os mamíferos. Os principais problemas que essas vacinas enfrentam incluem: a necessidade de aplicação de mais de uma dose para alcançar o efeito desejado; a variabilidade da resposta imune entre diferentes espécies animais; recuperação da fertilidade em casos nos quais o objetivo é a castração; e efeitos adversos induzidos pela utilização de adjuvantes (Herbert e Trigg, 2005; Jinshu *et al.*, 2005; Munks, 2012).

Um dos grandes desafios no desenvolvimento de uma vacina contraceptiva é a quebra da autotolerância do sistema imune para moléculas próprias. O sistema imune de mamíferos apresenta um mecanismo que garante que linfócitos T e linfócitos B produtores de anticorpos não respondam aos antígenos próprios presentes no organismo. Esse processo que garante a autotolerância ocorre no Timo durante desenvolvimento de linfócitos T, na medula óssea durante desenvolvimento de linfócitos B e na periferia tanto para linfócitos T maduros quanto para linfócitos B maduros. No caso de imun contraceptivos, a quebra da autotolerância pode ser alcançada com o uso de adjuvantes e quimeras, os quais apresentam o papel de induzir o sistema a reagir contra componentes específicos que participam da cascata do sistema reprodutivo (Talwar, 1997; Herbert e Trigg, 2005; Jinshu *et al.*, 2005; Munks, 2012; Goodwin *et al.*, 2015).

Na literatura são encontradas três categorias de vacina que podem ser utilizadas no desenvolvimento de imun contraceptivos e cada uma delas apresenta

diferenças na sua construção que permitem a quebra de tolerância por diferentes mecanismos (Munks, 2012).

Uma dessas categorias é formada pelas vacinas de subunidade, as quais são compostas pelo antígeno em conjunto com um adjuvante exógeno capaz de ativar a resposta imune inata e induzir a produção de anticorpos específicos e as respostas de linfócitos T (Munks, 2012; Goodwin *et al.*, 2015). Um exemplo é a GonaConTM [United States Department of Agriculture (USDA) Wildlife Services (WS) National Wildlife Research Center (NWRC), Fort Collins, Colorado, USA] que é constituída pelo GnRH acoplado a uma molécula carreadora, hemocianina de lapa californiana (*keyhole limpet hemocyanin* - KLH), atuando como antígeno e uma fração purificada de *Mycobacterium avium* (versão diluída da vacina contra paratuberculose contendo o microrganismo morto e óleo) atuando como adjuvante (Gupta *et al.*, 2011; Munks, 2012).

Outra categoria é a composta pelas vacinas de DNA, as quais são constituídas por um plasmídeo de DNA purificado de *E. coli* que codifica para um antígeno recombinante através da utilização de um promotor que permite a expressão alvo específico. Por serem provenientes do DNA de uma bactéria, essas sequências possuem uma alta proporção de dinucleotídeos CpG quando comparada com o DNA de mamíferos. Além disso, em bactérias essas regiões apresentam-se hipometiladas ao contrário do que ocorre em mamíferos. A presença dessas regiões CpG hipometiladas leva a ativação da resposta imune inata via receptor *Toll-like* 9 (TLR9), o qual é um receptor pro-inflamatório capaz realizar uma potente ativação da resposta imune inata e adaptativa (Khan *et al.*, 2007a; Munks, 2012).

A última categoria é formada por vacinas de vetores recombinantes, as quais são formadas por microrganismos atenuados e geneticamente modificados para expressar o antígeno de interesse. Esses patógenos apresentam adjuvantes endógenos que incluem uma alta variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e que normalmente são considerados ativadores robustos do sistema imune (Khan *et al.*, 2007a; Munks, 2012).

Os principais alvos testados atualmente como imun contraceptivos são: a gonadotrofina coriônica humana, os hormônios folículo estimulante e luteinizante, os

antígenos espermatozoide-específicos, as glicoproteínas presentes na zona pelúcida e o hormônio liberador de gonadotrofina.

2.1 Gonadotrofina Coriônica Humana

A gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi descoberta por Selmar Ascheim e Bernhard Zondek em 1927 (Talwar *et al.*, 2011). A hCG é um hormônio gravidez-específico que, exceto quando produzido por alguns tumores, só está presente em quantidades detectáveis no sangue e na urina quando ocorre a concepção, por esse motivo vem sendo utilizado como marcador para o estabelecimento da gravidez (Delves, 2004; Talwar *et al.*, 2011).

Esse hormônio é inicialmente produzido pelo blastocisto e é possível de ser detectado em até 7 dias no sobrenadante da cultura de blastocistos humanos. Esse hormônio é necessário para manter a secreção de progesterona e estrogênios a partir dos corpos lúteos e, portanto, manter o endométrio em um estado de suporte, evitando a necrose das artérias espiraladas do útero e possibilitando a implantação do trofoblasto. As vacinas baseadas no hCG vão atuar após a fertilização, impedindo a implantação do embrião (Delves, 2004; Talwar *et al.*, 2011; Kaur e Prabha, 2014).

O hormônio é composto por uma cadeia polipeptídica α e uma β . A subunidade α é similar à encontrada em outras gonadotrofinas como o LH e o FSH. Já a subunidade β é composta por 145 aa e tem uma extensão única de 30 aa na região carboxi-terminal, sendo conhecido como peptídeo carboxi-terminal (CTP). Entretanto, dos 115 aa amino-terminal restantes, cerca de 80% é homólogo a subunidade β do hormônio luteinizante (Gupta e Bansal, 2010).

Por esse motivo, duas abordagens diferentes são utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contraceptivas baseadas em hCG. Uma dessas abordagens é desenvolver uma vacina que gere uma resposta imune específica contra o hCG e que não apresente reações cruzadas com o hormônio luteinizante, ou seja, utilizar como imunógeno a região CTP do β -hCG. A outra abordagem leva em consideração que, se a reação cruzada acontecer, ela não deve ser prejudicial, portanto, utilizar toda a molécula β -hCG para atingir uma melhor capacidade de neutralização com os anticorpos gerados (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010).

A vacina anti-hCG foi a primeira e única vacina de controle de natalidade a passar com sucesso por testes clínicos de fase II (Talwar *et al.*, 1994). O uso da vacina em mulheres sexualmente ativas foi capaz de preveni-las da gravidez. A vacina se mostrou altamente efetiva contando que os títulos de anticorpos se mantivessem acima de 50 ng/ml. Não foram observados efeitos adversos durante os ensaios de fase I e II, as mulheres mostraram ovulação normal e síntese normal de hormônios sexuais junto com ciclo menstrual regular. Mesmo com os resultados encorajadores, apenas 60-80% das mulheres foram capazes de desenvolver altos títulos de anticorpos protetores, porcentagens não satisfatórias para vacinas de controle de natalidade (Talwar *et al.*, 1994; Kaur e Prabha, 2014).

Purswani e Talwar (2011) fusionaram a porção C-terminal do β -hCG com a subunidade B da enterotoxina termolábel de *E. coli* (LTB) e utilizaram como sistema de expressão a levedura *P. pastoris*. Utilizando a quimera adsorvida em Alhydrogel (hidróxido de alumínio) em conjunto com *Mycobacterium indicus pranii*, foram capazes de estimular uma resposta de anticorpos em 100% dos camundongos BALB/c imunizados.

2.2 Hormônio Folículo Estimulante e Hormônio Luteinizante

O GnRH induz a secreção de FSH e de LH pelos gonadotrofos na corrente sanguínea, onde eles se deslocam até as gônadas de machos e de fêmeas, iniciando sua ação. Tanto o FSH quando o LH são hormônios proteicos diméricos formados por uma subunidade α comum e uma subunidade β única, a qual pode ser utilizada como alvo vacinal (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010; Jiang *et al.*, 2010; Munks, 2012). Como descrito anteriormente, a subunidade α é compartilhada por outros hormônios como, por exemplo, o hCG e o hormônio tireoide estimulante (TSH), o que dificulta o desenvolvimento de vacinas contraceptivas que apresentem ambas as subunidades (Munks, 2012; Kaur e Prabha, 2014).

O hormônio folículo estimulante desenvolve um importante papel no crescimento de folículos ovarianos em fêmeas, atuando em conjunto com o LH na estimulação da secreção de estrogênios pelas células ovarianas. Em machos, o FSH estimula as células de Sertoli nos túbulos seminíferos, as quais respondem promovendo a maturação física do desenvolvimento espermático (Gupta e Bansal, 2010; Martini e Nath, 2012).

A imunização de macacos machos da espécie *Macaca radiata* com FSH ovino levou a um reversível bloqueio de fertilidade. Além disso, os animais imunizados apresentavam diminuição da espermatogênese, resultando em oligospermia, diminuição na motilidade do espermatozoide e manutenção da libido (Moudgal, 1992; Moudgal *et al.*, 1997a; Moudgal *et al.*, 1997b). A partir dos resultados obtidos, iniciou-se um experimento com um grupo de cinco homens voluntários, os quais foram imunizados com FSH ovino. Os anticorpos produzidos contra o FSH ovino foram capazes de reconhecer o FSH humano e gerar uma redução (30-90%) de transferrina no plasma seminal, marcador para funções das células de Sertoli e dos túbulos seminíferos, e redução da contagem de espermatozoides. Além disso, não foram observadas mudanças significantes nos níveis de LH, TSH e testosterona (Moudgal *et al.*, 1997b; Gupta, 2010).

A maior parte dos estudos envolvendo o uso de FSH são realizados utilizando a molécula FSH ovina devido a capacidade dessa de induzir a produção de anticorpos FSH específicos em diversas espécies de mamíferos e devido a redução da probabilidade de produzir anticorpos de reação cruzada com LH e TSH de outras espécies (Moudgal, 1992; Kaur e Prabha, 2014).

Já o hormônio luteinizante é responsável, em fêmeas, por induzir a ovulação (processo de produção de células reprodutivas) e a secreção de estrogênio e de progestinas (como, por exemplo, a progesterona) pelos ovários, os quais são responsáveis pelo preparo do organismo para uma possível gestação. Em machos, o LH estimula a produção de hormônios sexuais, chamados de andrógenos, pelas células intersticiais de Leydig dos testículos (Martini e Nath, 2012).

A subunidade α do LH de ovino foi conjugada a subunidade β da gonadotrofina coriônica humana e teve sua ação antitumoral em células cancerosas hCG-positivas avaliada. Anticorpos IgG de coelho anti-hCG β -oLH α foram capazes de inibir a proliferação de células humanas de câncer colorretal que expressavam o hCG. Além disso, quando utilizada para imunizar camundongos BALB/c que apresentavam células tumorais SP2/0 expressando hCG, foi observado que a químera inibiu a proliferação tumoral (Jiang *et al.*, 2010).

2.3 Antígenos espermatozoide-específicos

Os primeiros estudos utilizando espermatozoides ou seus extratos como antígenos vacinais, tanto em animais quanto em humanos, mostraram-se capazes de inibir a fertilidade dos indivíduos imunizados (Baskin, 1932; Edwards, 1964; Gupta e Bansal, 2010). O espermatozoide possui tanto autoantígenos quanto isoantígenos que, conseqüentemente, levam a geração de anticorpos anti-espermatozoide quando inoculados em diversas espécies (Kaur e Prabha, 2014). Baskin (1932) mostrou que, quando mulheres férteis (que tiveram ao menos uma gestação) foram inoculadas com o sêmen do parceiro, houve a indução da geração de anticorpos anti-espermatozoide e o bloqueio da concepção durante um período de um ano de observação.

Mais de 70% dos homens que passam pelo processo de vasectomia produzem anticorpos anti-espermatozoide após o procedimento o que resulta em problemas de fertilidade mesmo após a reanastomose cirúrgica. Além disso, é estimado que 30% dos casos em infertilidade tanto em homens quanto em mulheres estejam associados com a indução de anticorpos anti-espermatozoide (Bronson *et al.*, 1984; Kaur e Prabha, 2014).

A imunização com toda a célula espermática ou com extratos de espermatozoides pobremente caracterizados não é considerada uma abordagem prática e possível devido a presença de diversos antígenos que são compartilhados com células somáticas. Essa abordagem levaria a consequências imunopatológicas em diversos tecidos e órgãos (Frayne e Hall, 1999; Kaur e Prabha, 2014).

Esses resultados levaram a busca para identificar e caracterizar antígenos espermatozoide-específicos com a finalidade de serem utilizados em vacinas contraceptivas, resultando, assim, na identificação de diversos possíveis alvos como o PH-20 (Primakoff *et al.*, 1988), proteína espermática 10 (SP-10) (Herr *et al.*, 1990), SP-17 (RSA) (Lea *et al.*, 1998), sp56 (Hardy e Mobbs, 1999), antígeno fertilizante 1 (FA-1) (Zhu e Naz, 1997), antígeno associado ao espermatozoide – 9 (SPAG9) (Suri, 2007), entre outros. A maioria dessas proteínas geraram graus de eficácia contraceptiva variados em animais imunizados de diversas espécies (Primakoff *et al.*, 1988; Herr *et al.*, 1990; Zhu e Naz, 1997; Lea *et al.*, 1998; Hardy e Mobbs, 1999; Suri, 2007; Gupta e Bansal, 2010).

Izumo, glicoproteína de membrana do tipo I que consiste em um domínio similar a imunoglobulina associado ao espermatozoide, tem sido relatada como um dos principais possíveis alvos vacinais já que apresenta um importante papel na fusão da membrana do espermatozoide com o oolema do óvulo (Inoue *et al.*, 2005; Naz, 2008). A proteína não é detectável no esperma ejaculado, mas se torna reconhecível uma vez que o espermatozoide passa pela reação acrossômica (Kaur e Prabha, 2014). Camundongos *knockout* para o Izumo são saudáveis, porém, estéreis. Esses camundongos produzem espermatozoides de aparência normal que são capazes de penetrar na zona pelúcida, entretanto, não conseguem se fundir ao óvulo (Inoue *et al.*, 2005; Gupta e Bansal, 2010). Naz (2008) analisou o potencial imun contraceptivo de três peptídeos Izumo em camundongos. Além da indução de altos níveis de anticorpos específicos, foi possível constatar que fêmeas imunizadas ainda realizavam acasalamento, entretanto, foi observado bloqueio da contracepção resultando em infertilidade.

2.4 Zona pelúcida

A zona pelúcida consiste em uma matriz extracelular glicoproteica que envolve o oócito de mamíferos e apresenta um papel importante durante a fertilização, servindo de substrato espécie-específico para a ligação do espermatozoide, de gatilho para o início da reação acrossômica e como uma proteção para evitar a polispermia. Além disso, a zona pelúcida atua como uma barreira de proteção ao redor do oócito e dos estágios iniciais do embrião antes da implantação do blastocisto no endométrio (Wassarman e Litscher, 2008; Gupta e Bansal, 2010; Levy, 2011; Munks, 2012; Naz e Saver, 2015). A matriz da zona pelúcida é composta por três glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3. Entretanto, estudos comprovaram que alguns mamíferos como, por exemplo, ratos, macacos e humanos, apresentavam um quarto tipo de ZP, a ZP4 (Lefièvre *et al.*, 2004; Gupta e Bansal, 2010). O conteúdo de componentes presentes na ZP é conservado entre mamíferos, entretanto, a concentração de cada glicoproteína presente nessa matriz varia entre as espécies, atuando como uma barreira para impedir a fertilização entre espécies não relacionadas (Munks, 2012; Naz e Saver, 2015).

A imunização contra as proteínas da ZP pode resultar na geração de anticorpos anti-ZP, os quais vão reconhecer e se ligar ao antígeno na superfície do oócito. Portanto, quando o espermatozoide encontra o oócito de uma fêmea imunizada, a fusão dos dois gametas é bloqueada por causa da presença de anticorpos envolvendo a ZP (Kaur e Prabha, 2014).

A zona pelúcida de suínos (pZP) é uma das mais estudadas em vacinas contraceptivas uma vez que oócitos de suínos são facilmente obtidos de abatedouros e a heteroimunização com antígenos de origem pZP induz uma resposta imune mais forte do que a aloimunização (Naz e Saver, 2015). Estudos em equinos mostraram a indução de uma esterilização não permanente, sendo necessária a aplicação de doses anuais dos antígenos (Kirkpatrick e Turner, 2008; Levy, 2011; Munks, 2012). Entretanto, foi observado um aumento significativo no tempo de vida desses animais, nas quais as fêmeas não tratadas apresentavam uma média de idade ao morrer de 6,47 anos e as fêmeas imunocastradas apresentaram uma média de 19,94 anos. Esse aumento no tempo de vida foi relacionado com a redução do consumo de energia devido a inexistência de prenhez e de lactação (Kirkpatrick e Turner, 2007).

Já em felinos, apenas o primeiro estudo realizado foi capaz de induzir esterilidade em 4 de 5 fêmeas imunizadas (Ivanovo *et al.*, 1995). Estudos subsequentes mostraram que, em felinos, a utilização de imuncontraceptivos proveniente de proteínas da ZP de outras espécies não é capaz de alterar o desenvolvimento folicular e a fecundidade devido a indução de anticorpos que apresentam uma baixa reação cruzada com as proteínas da ZP desses animais (Gorman *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2005; Munson *et al.*, 2005; Munks, 2012). Além disso, o uso de adjuvantes como, por exemplo, o adjuvante de Freund e os adjuvantes a base de alumínio, resultaram em reações adversas severas em felinos (Munson *et al.*, 2005).

As vacinas contraceptivas utilizando as proteínas da ZP alcançaram seu maior sucesso quando desenvolvidas para serem utilizadas no controle do crescimento excessivo de populações de camundongos. Lloyd *et al.* (2003) utilizou o citomegalovírus murino (MCMV) para expressar as proteínas ZP de camundongos. Utilizando apenas uma dose do MCMV para imunizar camundongos, foi possível observar a indução de esterilidade e a manutenção da produção de anticorpos por

um longo período de tempo nas fêmeas imunizadas. Acredita-se que esse efeito tenha ocorrido, em parte, pela característica de latência do herpes vírus.

Arukha *et al.* (2016) demonstraram que a produção de uma quimera contendo um fragmento da proteína ZP3 de cães conjugada com duas moléculas GnRH e com epítomos “promíscuos” de linfócitos T (epítomos com habilidade de se ligar a diversas moléculas de MHC de classe II) foi capaz de estimular a produção de altos títulos de anticorpos em fêmeas de camundongos FvB/J. Além disso, estudo *in vitro* com os soros dos camundongos vacinados demonstrou a inibição da fertilização através do bloqueio das proteínas de zona pelúcida dos oócitos pelos anticorpos presentes.

2.5 Hormônio Liberador de Gonadotrofina

O hormônio liberador de gonadotrofina, também conhecido como hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), é um decapeptídeo hipotalâmico de 10,380 Dáltons que apresenta um papel central na cascata hormonal da reprodução de mamíferos (Thompson, 2000; Clarke *et al.*, 2005; Jinshu *et al.*, 2005; Millar, 2005; Song *et al.*, 2012). O GnRH é processado no corpo celular de neurônios hipotalâmicos especializados a partir de um polipeptídeo precursor. Esse precursor é constituído por: um peptídeo sinal; o GnRH; uma região com o sinal de processamento (Gly-Lys-Arg); e um peptídeo associado ao GnRH (GAP). O GAP consiste em uma sequência de 56 aminoácidos e, por ser co-secretado com o GnRH, tem sua função relacionada com o correto processamento e empacotamento do hormônio (Schneider *et al.*, 2006). Esse precursor sofre um processamento enzimático e, logo após, é empacotado em grânulos de armazenamento, os quais são transportados através do axônio até a região terminal do neurônio, sendo liberados nos vasos capilares primários da eminência mediana (Thompson, 2000; Millar, 2005; Schneider *et al.*, 2006).

A partir das terminações nervosas de cerca de 1000 neurônios, o GnRH é liberado de forma pulsátil no sistema porta hipotálamo-hipófise a cada 30-120 minutos (Thompson, 2000; Millar, 2005; Schneider *et al.*, 2006). O GnRH é então transportado do sistema porta hipotálamo-hipófise para o plexo capilar senoidal na hipófise, nesse momento, o hormônio deixa os capilares e torna-se disponível para ligação com as células alvo, os gonadotrofos (Thompson, 2000).

O hormônio é responsável pela estimulação da biossíntese e pela liberação de LH e FSH na hipófise anterior, os quais, por sua vez, vão promover a maturação dos folículos ovarianos em fêmeas e a espermatogênese em machos (Jinshu *et al.*, 2005; Millar, 2005; Song *et al.*, 2012). As gônadas produzem esteroides que vão regular a secreção e a síntese do GnRH no hipotálamo através de um mecanismo de feedback (Han *et al.*, 2013).

Os pulsos de GnRH ocorrem aproximadamente a cada 2 h em machos adultos. Entretanto, em fêmeas, o padrão de liberação do hormônio é mais complicado e apresenta variações durante os diferentes estágios reprodutivos, o qual influencia o desenvolvimento de funções sexuais, e durante o ciclo ovulatório (Maggi *et al.*, 2015).

Cada pulso de GnRH leva a geração de um pulso de LH a partir dos gonadotrofos presentes na hipófise, o que acarreta, em fêmeas, uma maior frequência de pulsos durante o surgimento do LH ovulatório e uma diminuição da frequência dos mesmos durante a fase lútea do ciclo ovariano. Portanto, o LH aparenta ser armazenado e ser extremamente dependente do GnRH para sua liberação. Já a produção de pulsos de FSH a partir de estímulos do GnRH não é bem elucidada, acredita-se que o FSH é constitutivamente secretado e que essa secreção é inteiramente dependente da sua biossíntese (Millar, 2005; Maggi *et al.*, 2015). Resumidamente, a síntese de ambos LH e FSH é regulada pela frequência de pulsos do GnRH, onde a produção de FSH é favorecida pela baixa frequência de pulsos (<1 pulso a cada 2-3 h) e o LH é favorecido com uma rápida frequência de pulsos (1 pulso a cada 60-90 min) (Maggi *et al.*, 2015).

Esse padrão de liberação do LH e do FSH levam tanto a alterações na frequência de pulsos do GnRH quanto na ação dos esteroides gonadais e dos hormônios peptídeos na modulação do LH e do FSH em resposta ao GnRH, e, além disso, nas diferenças de meia-vida dos dois hormônios (Gibson *et al.*, 1997; Millar, 2005).

Em machos, o LH é responsável pela síntese e pela secreção de andrógenos como, por exemplo, a testosterona, a partir das células de Leydig nos testículos. O alto nível de andrógenos é capaz de inibir direta e indiretamente a secreção de LH por um mecanismo de feedback, inibindo a liberação de GnRH. O FSH é

responsável pela iniciação da espermatogênese e, em conjunto com a testosterona, controla a produção de espermatozoides em adultos. Ele reconhece receptores específicos nas células de Sertoli e estimula a produção de diversos fatores de crescimento e outras proteínas como, por exemplo, a proteína ligante de andrógeno (ABP), a qual é responsável por manter a alta concentração de testosterona nos túbulos seminíferos através de sua ligação a ela. Além disso, as células de Sertoli também secretam inibina que é o principal regulador da liberação do FSH (Turkstra *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2013).

Além de estimular a biossíntese do LH e do FSH, o GnRH apresenta outras funções em vertebrados e protocordados, as quais incluem: as funções neuroendócrinas como a liberação de hormônio do crescimento em certos peixes; as funções autócrinas como atuação nas células imunes e nas células tumorais de mama e de próstata; e papéis de neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso central e periférico (Millar e King, 1987a; Millar *et al.*, 1987b; Millar, 2005).

2.5.1 Isoformas

Estudos iniciais apontavam o GnRH como sendo uma estrutura única com um papel principal na regulação do LH e do FSH (Schally *et al.*, 1971; Schally *et al.*, 1973; Besser e Mortimer, 1974). Entretanto, diferentes isoformas foram sendo identificadas ao longo dos anos, atualmente as pesquisas referentes às isoformas estão direcionadas para o estudo do GnRH II e do GnRH III e suas respectivas características e funções. A maioria dos vertebrados apresenta ao menos duas isoformas do GnRH, sendo geralmente encontradas três (Ferro *et al.*, 2001; Millar, 2005). A isoforma identificada a partir do cérebro de galinhas, denominada *chicken* GnRH II (cGnRH II), apresenta sua estrutura totalmente conservada desde peixes ósseos até o homem, sugerindo que sua estrutura tenha sido uma das primeiras a evoluir e a desempenhar funções importantes (Miyamoto *et al.*, 1984; Millar e King, 1987a; Ferro, 2001; Millar, 2005).

Análises das diferentes isoformas apontam duas regiões conservadas a mais de 500 milhões de anos de evolução, a região N-terminal (Pro-Gly NH₂) e a região C-terminal (pGlu-His-Trp-Ser), indicando que ambas são de extrema importância para a ancoragem do hormônio ao receptor e a ativação do mesmo (Millar, 2005). As isoformas variam apenas na região central do hormônio, entre os aminoácidos 5 e 8

(Khan *et al.*, 2007b). O aminoácido na posição 8 é considerado o mais variável, ou seja, nessa posição aparentemente qualquer resíduo é tolerado. Entretanto, estudos apontam que o receptor hipofisário tipo I de mamíferos necessita da presença de uma arginina na posição 8, sugerindo, assim, que o resíduo presente nessa posição vai exercer um papel importante na seletividade do ligante nos diferentes receptores do GnRH (Sealfon *et al.*, 1997; Millar, 2005).

As funções dessas isoformas também permanecem controversas, principalmente quanto aos seus papéis na reprodução. O GnRH I continua sendo aceito como principal peptídeo regulador da reprodução. Já o GnRH II está relacionado com um papel fisiológico mais amplo, complementando a atuação do GnRH I e, em algumas espécies, controlando a reprodução e o comportamento sexual baseado no status de energia e através de modificações na ingestão de curto prazo de alimentos (Temple *et al.*, 2003; Kauffman, 2004; Khan *et al.*, 2007b). Em regiões periféricas, ambos apresentam funções similares como, por exemplo, a regulação da proliferação celular e a mediação da secreção hormonal a partir do ovário e da placenta. Além disso, por estar presente no endométrio humano e por ser liberado no início da formação da placenta, o GnRH II está sendo relacionado com o processo de implantação do embrião e com a regulação da gestação (Turkstra *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007b). O GnRH II também pode ser encontrado em altas concentrações nos rins e na medula óssea, indicando, assim, sua participação em funções não relacionadas com a reprodução (White *et al.*, 1998; Turkstra *et al.*, 2005).

Por outro lado, o papel do GnRH III no organismo ainda não é bem elucidado e o único conhecimento disponível atualmente sobre essa isoforma é que ela não é capaz de induzir a secreção de LH. Entretanto, Khan *et al.* (2007b) sugerem uma possível participação do GnRH III na liberação de FSH e o considera como um fator liberador de FSH mais potente e mais específico que o GnRH I. Porém, desde sua identificação, diversos estudos falharam em reproduzir na prática essa teoria o que resulta na contestação de sua participação na reprodução (Lovas *et al.*, 1998; Kovacs *et al.*, 2002; Amstalden *et al.*, 2004; Turkstra *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2007b).

2.5.2 Produção de imun contraceptivos

Por todo o papel que desempenha no processo reprodutivo, o GnRH I é capaz de inibir a reprodução de mamíferos através da imunização ativa criada a partir de uma barreira imunológica entre o hipotálamo e a hipófise anterior (D'Occhio, 1993; Meloen, 1995; Zeng *et al.*, 2002; Herbert e Trigg, 2005). Os anticorpos se ligam ao hormônio na circulação porta hipotálamo-hipófise e previnem que o mesmo se ligue aos receptores presentes nos gonadotrofos da hipófise, resultando na supressão das gonadotrofinas e na inibição da cascata reprodutiva (Naz e Saver, 2015). Além disso, estudos realizados determinaram que a imunização ativa contra o GnRH é capaz de reduzir os níveis de expressão dos mRNAs de moléculas essenciais para a reprodução, entre elas estão: o GnRH no hipotálamo; os receptores do GnRH e as subunidades β do LH e do FSH na hipófise; receptores LH e FSH nos testículos; e proteínas responsáveis pelo feedback realizado pelos esteroides sexuais como o receptor de andrógeno (AR), *kisspeptin* (Kiss-1) e o receptor de *kisspeptin* (GPR54) no hipotálamo (Fang *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2013).

Esses fatores possibilitaram a classificação do GnRH como uma das mais atrativas alternativas para substituir a castração cirúrgica e para o uso na terapia antitumoral contra tumores dependentes de hormônios sexuais (Zeng *et al.*, 2002; Jinshu *et al.*, 2004; Herbert e Trigg, 2005; Jinshu *et al.*, 2005; Junco *et al.*, 2007; Gökdal *et al.*, 2009; Talwar *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012).

Entretanto, mesmo sendo, em teoria, um excelente alvo imun contraceptivo, o desenvolvimento de uma vacina utilizando o GnRH como antígeno ainda enfrenta diversos desafios. O maior deles é na indução de imunidade contra o GnRH. Por ser um decapeptídeo próprio, ele apresenta uma baixa imunogenicidade o que torna necessária a utilização de algumas estratégias para estimular o sistema imune como, por exemplo, a administração de cópias múltiplas do hormônio, a administração do hormônio associado a uma proteína carreadora ou a coadministração de adjuvantes (Thompson, 2000; Ferro *et al.*, 2004a; Herbert e Trigg, 2005; Jinshu *et al.*, 2005). Além de ser pouco imunogênico, o GnRH sozinho apresenta um tempo de meia-vida muito curto, de apenas 15 minutos, após esse

período o hormônio sofre uma digestão proteolítica e dá origem a dois peptídeos inativos (Ferro *et al.*, 1996).

Arimura *et al.* (1973) foram o primeiro a conseguir gerar uma resposta de anticorpos contra o GnRH. Em seu trabalho, o hormônio foi adsorvido em polivinilpirrolidona (PVP) e utilizado para inocular 3 coelhos machos. Dois animais foram capazes de induzir a produção de anticorpos anti-GnRH e apresentaram atrofia testicular. No mesmo ano, Fraser e Gunn (1973) fusionaram covalentemente o GnRH com albumina sérica bovina (BSA) através da técnica de carbodiimida. A imunização de coelhos machos com essa quimera resultou em atrofia testicular e involução dos túbulos seminíferos de três animais.

Já a coadministração de adjuvantes, tanto em vacinas para uso humano quanto para uso animal, apresenta certas limitações que estão relacionadas com o tipo de antígeno utilizado, com a estabilidade final da vacina e com os possíveis efeitos adversos que venham a causar em cada espécie (Altman e Dixon, 1989; Thompson, 2000; Herbert e Trigg, 2005; Jinshu, 2005).

Além disso, a associação do GnRH com algumas proteínas como, por exemplo, os toxoides, podem levar a um fenômeno de dominância antigênica, no qual a proteína carreadora suprime a resposta aos epítomos da molécula de interesse após sucessivas imunizações do hapteno fusionado ao mesmo carreador ou a moléculas similares (Ferro *et al.*, 2004a; Jinshu *et al.*, 2004; Talwar *et al.*, 2009). Para contornar esses problemas, estudos visam a fusão do hormônio com sequências menores derivadas de toxoides ou a ligação com proteínas conhecidas como epítomos universais de linfócitos T-*helper* por meio de técnicas de biologia molecular para produção de proteínas recombinantes (Sad *et al.*, 1993; Jinshu *et al.*, 2004; Jinshu *et al.*, 2005; Talwar *et al.*, 2009).

A escolha da região de fusão do GnRH com outra molécula também se mostrou de extrema importância para a efetividade da castração imunológica. A conjugação de proteínas carreadoras na região N-terminal é capaz de promover uma imunocastração altamente efetiva, já a conjugação na região C-terminal é ineficiente o que sugere uma importância dessa região na indução de uma resposta imune, devido seu papel no reconhecimento e na ancoragem do hormônio ao

receptor e a ativação do mesmo (Ladd *et al.*, 1990; Ferro *et al.*, 2002; Millar, 2005; Fang *et al.*, 2010).

A necessidade de repetidas imunizações para assegurar a manutenção níveis de anticorpos neutralizantes anti-GnRH é outro ponto crítico na produção, sendo que, em alguns casos, podem ser necessárias até três doses para atingir uma resposta de anticorpos significativa quando comparada a grupos controle. Essas diversas vacinações podem interferir no custo, no tempo, na praticidade e na segurança do método, tornando-o inviável para aplicação em grandes rebanhos e em animais selvagens (Thompson, 2000; Herbert e Trigg, 2005).

Por último, o tipo de castração, reversível ou não, também gera dúvidas sobre a aplicação do hormônio na imunocastração. Diferentes estudos comprovaram que a imunocastração ou é reversível com o tempo através da dissipação gradual dos anticorpos anti-GnRH ou é capaz de gerar uma supressão a longo prazo mesmo com a redução dos títulos de anticorpos (Han *et al.*, 2013). Pouco se sabe ainda por qual motivo essas diferenças observadas no período de supressão da fertilidade são causadas. Entretanto, acredita-se que a idade de desenvolvimento da espécie seja um fator essencial. Estudos mostram que a imunização neonatal, em algumas espécies, levou a redução da secreção de GnRH durante a fase adulta e a indução de infertilidade a longo prazo, alterando o número de neurônios GnRH e a morfologia, em alguns casos, do hipotálamo e da eminência mediana (Clarke *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2013).

2.5.3 Vacinas

Diversos grupos de pesquisa vem desenvolvendo estratégias para obter vacinas contraceptivas anti-GnRH que consigam contornar esses desafios e promover uma imunidade protetora com o mínimo de efeitos adversos possíveis (Jinshu *et al.*, 2004; Jinshu *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2007a; Fang *et al.*, 2010; Goodwin *et al.*, 2015).

Jinshu *et al.* (2004) expressaram em *E. coli* uma proteína de cadeia dupla, cada cadeia contendo três repetições lineares do GnRH, a região dobradiça da IgG1 humana e um epítipo T-helper da proteína do vírus do sarampo. A proteína recombinante teve sua imunogenicidade comprovada quando foi inoculada em ratos

Sprague-Dawley em conjunto com o adjuvante completo de Freund. A quimera foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos e um leve atrofiamento dos testículos e dos úteros de ratos machos e fêmeas, respectivamente.

O mesmo grupo, em 2005, avaliou a resposta imune da mesma quimera conjugada com a proteína de choque térmico 65 (Hsp65) recombinante de *Mycobacterium bovis* e sem a utilização de adjuvantes para a formulação da vacina. Observou-se que a nova formulação foi capaz de estimular títulos de anticorpos compatíveis com o estudo anterior e que os machos apresentavam atrofia dos túbulos seminíferos e redução na espermatogênese e as fêmeas apresentavam útero de tamanhos menores e redução no desenvolvimento folicular.

Essa mesma formulação foi testada em 2008 (Xu, 2008) em camundongos modelos para câncer de próstata ortotópicos, a qual foi capaz de gerar resposta imune humoral e celular contra o GnRH e conseguiu inibir o crescimento do tecido tumoral, aumentando a taxa de sobrevivência dos grupos tratados quando comparados com os grupos controles.

Como alternativa para contornar a supressão de antígenos, algumas pesquisas apresentam como objetivo o desenvolvimento de vacinas de DNA para induzir a supressão da fertilidade (Khan *et al.*, 2007a; Khan *et al.*, 2008). Em 2007, Khan *et al.* desenvolveram uma vacina de DNA codificando para 5 sequências do GnRH e 4 epítomos T-helper diferentes. Duas formulações foram desenvolvidas, uma utilizando apenas o plasmídeo e outra utilizando o plasmídeo em conjunto com o envelope do vírus japonês hemaglutinador como vetor. As formulações foram utilizadas para imunizar camundongos ICR machos sexualmente maduros. Ambas foram capazes de induzir alta resposta de anticorpos IgG anti-GnRH, queda na contagem de espermatozoides no epidídimo, redução nos níveis de testosterona sérico, supressão da espermatogênese testicular e decréscimo significativo nos números de ninhada.

Fang *et al.* (2010) mostraram que javalis (*Sus scrofa moupinensis*) inoculados com o GnRH fusionado a proteína ligante de maltose (MBP) apresentavam alterações tanto no desenvolvimento testicular, através de testes histológicos, quanto nos níveis de transcrição do gene do receptor hipofisário do GnRH, por meio da utilização de PCR quantitativo. Além disso, os animais imunizados com a quimera

apresentavam comportamento de monta cerca de 4 semanas mais tarde que os animais controle (imunizados apenas com MBP).

Além das pesquisas desenvolvidas, já existem no mercado sete vacinas contraceptivas contendo o GnRH como alvo de ação. Entre elas destacam-se a VivaxTM (ImprovacTM – Zoetis, NJ, EUA) e a BoprivaTM (Zoetis, NJ, EUA). A VivaxTM foi a primeira vacina a ser aprovada para uso em suínos com o objetivo de prevenir o odor sexual e a reprodução em animais destinados ao abate, atualmente está disponível em 63 países. Ela foi desenvolvida a partir de uma forma modificada do GnRH conjugada com o toxoide diftérico e utilizando como adjuvante o polissacarídeo iônico DEAE-dextran responsável por causar poucos danos aos tecidos (Dunshea *et al.*, 2001; Zamaratskaia *et al.*, 2008; McNamara, 2009; Wicks *et al.*, 2013). A vacinação com a VivaxTM é realizada duas vezes durante período de crescimento com pelo menos 4 semanas de diferença entre as aplicações, sendo que a segunda dose deve ser aplicada aproximadamente 4 semanas antes do abate (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Einarsson *et al.*, 2009). Após a segunda dose da vacina, é possível observar um aumento na ingestão de alimentos, o que pode ser associado ao aumento no percentual de gordura corporal (Quiniou *et al.*, 2012).

A BoprivaTM também foi desenvolvida a partir de uma forma modificada do GnRH conjugada com o toxoide diftérico, porém, sua espécie alvo é a bovina. A diferença da BoprivaTM para a VivaxTM encontra-se na composição de adjuvantes da vacina. Além de apresentar o DEAE-dextran como adjuvante, a BoprivaTM possui também um sistema conhecido como complexo imunoestimulante (ISC), o qual é capaz de aumentar o efeito estimulatório da vacina e, ao mesmo tempo, diminuir a reatogenicidade de outros adjuvantes presentes na vacina (Walker, 2008; Wicks *et al.*, 2013).

Wicks *et al.* (2013) avaliaram a eficácia da BoprivaTM em suínos quando comparada com a VivaxTM. Foi observado que a vacina BoprivaTM conseguiu estimular resposta imune. Além disso, o tempo de eficácia da BoprivaTM foi maior quando comparado com o da VivaxTM. A BoprivaTM manteve os níveis de testosterona reduzidos por até dez semanas após a segunda imunização, ao contrário da VivaxTM que mostrou aumento dos níveis de testosterona após oito semanas. A redução na produção diária de espermatozoides também foi maior em animais imunizados com a BoprivaTM. Os autores sugerem que essa maior eficácia

da BoprivaTM está relacionada com uma maior estimulação do sistema imune a partir dos adjuvantes utilizados na formulação da mesma.

Em 2011, Pereira desenvolveu no Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL) uma quimera contendo o GnRH fusionado a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB). Essa construção foi expressa em *P. pastoris* e seu potencial imun contraceptivo foi previamente avaliado em camundongos BALB/c machos. Os resultados mostraram que essa quimera foi capaz de gerar soro conversão nos animais imunizados, redução na concentração de espermatozoides, redução na espermatogênese, vacuolização dos túbulos seminíferos e desorganização testicular. Em 2014, Eslabão clonou, expressou e caracterizou a quimera LTB/GnRH expressa em *E. coli*. O potencial imun contraceptivo dessa quimera não foi avaliado no trabalho. Pelos resultados apresentados pela LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* quanto inoculada em camundongos machos e pelos resultados obtidos frente a caracterização da LTB/GnRH expressa em *E. coli*, ambas as proteínas recombinantes foram utilizadas como base para os experimentos desenvolvidos no presente estudo.

2.6 Subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*

As vacinas de nova geração, desenvolvidas pela técnica do DNA recombinante, são geralmente constituídas por proteínas ou peptídeos purificados com a finalidade de tornar a formulação final mais segura para o uso em humanos e em animais, além de proporcionar custos de produção menos elevados que as vacinas tradicionais (Reed *et al.*, 2008; Mbow *et al.*, 2010). Entretanto, essas novas vacinas são comumente pouco imunogênicas já que não apresentam todos os componentes estimulatórios presentes em vacinas que utilizam organismos inteiros. Essa baixa imunogenicidade torna necessária a administração de moléculas capazes de amplificar a resposta imune como, por exemplo, a enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT) (de Haan *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 2008; Mbow *et al.*, 2010; da Hora *et al.*, 2011).

A LT é uma exotoxina adenosina difosfato (ADP)-ribosil transferase composta por duas subunidades codificadas por um operon: a subunidade A (LTA) de 28 kDa que representa a porção enzimática da exotoxina e a subunidade B (LTB) um pentâmero não tóxico de 60 kDa (cada peptídeo com 11,6 kDa) organizado de

forma cilíndrica com uma cavidade central. A LTB é reconhecida pelos receptores gangliosídeo GM1, que consistem em glicoesfingolipídeos encontrados na superfície de células de mamíferos, permitindo a entrega da subunidade A dentro das células (Pizza *et al.*, 2001; Hajishengallis *et al.*, 2005; Rezaee *et al.*, 2005; Pitcovski *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2008; da Hora *et al.*, 2011).

A LTB é uma potente molécula sinalizadora com capacidade de modular a resposta imune (Yamamoto *et al.*, 2001; Conceição *et al.*, 2006; da Hora *et al.*, 2011). Ela é capaz de induzir IgA secretora específica para antígenos coadministrados, além de estimular a produção de IgG e IgA sérica (Yamamoto *et al.*, 2001).

O efeito imunoestimulatório dessa subunidade vem sendo relacionado com as seguintes funções: capacidade de aumentar a apresentação de antígenos através do Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe I (MHC-I) e de Classe II (MHC-II) (Nashar *et al.*, 1997; Nashar *et al.*, 2001; de Haan *et al.*, 2002; da Hora *et al.*, 2011); ativação da diferenciação seletiva de linfócitos (Williams, 2000; da Hora *et al.*, 2011); participação na maturação e ativação de células dendríticas (Pitcovski *et al.*, 2006); indução da expressão da molécula B7-2 (CD86) em células apresentadoras de antígenos (APCs) para subsequente sinalização co-estimulatória de linfócitos T CD4⁺ (Yamamoto *et al.*, 2001; Hajishengallis *et al.*, 2005); capacidade de aumentar a expressão de marcadores de ativação de linfócitos B (MHC-II, B7, CD40, CD25 e ICAM-1) (Nashar *et al.*, 1997; Hajishengallis *et al.*, 2005); promove a indução de apoptose em linfócitos T CD8⁺ (Hajishengallis *et al.*, 2005); indução da produção de IL-10 e inibição da liberação de IL-12 em monócitos, favorecendo uma resposta imune do tipo T_h2 quando administrada por via sistêmica (Simmons *et al.*, 2001; Hajishengallis *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006); indução de resposta imune T_h1 quando administrada por via mucosa (Conceição *et al.*, 2006; da Hora *et al.*, 2011).

Um dos principais motivos para a utilização da LTB acoplada a outras proteínas é a possibilidade de conferir ao antígeno a atividade de ligação a gangliosídeos, favorecendo, portanto, sua absorção em regiões de mucosa. Além disso, a capacidade de ligação aos gangliosídeos poderá favorecer a interação da quimera com as APCs presentes nos sítios de indução (Hajishengallis *et al.*, 2005). Acredita-se que a interação entre a subunidade B e os receptores GM1 vai promover

tanto a ativação de linfócitos B e T CD4⁺ quanto um aumento na apresentação de antígenos através da ativação de células de dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos (da Hora *et al.*, 2011).

Uma das principais vantagens da LTB em relação à subunidade B da toxina colérica é a capacidade de ligação, mesmo que com baixa afinidade, a outros receptores como os poliglicosilceramidas (PGC), os asialo-GM1, os GM2 e os glicoproteicos que contêm polilactosaminos. Esse maior espectro de receptores pode ser o responsável pelas diferenças nas propriedades imunológicas apresentadas pelas duas moléculas (Pizza *et al.*, 2001; Simmons *et al.*, 2001; Williams, 2000).

Rock *et al.* (1996) fusionaram a LTB com o peptídeo carboxi-terminal da cadeia beta da hCG. Foi possível observar que a proteína expressa era estável e formava pentâmeros característicos da LTB. Em camundongos, a quimera purificada induziu anticorpos específicos anti-hCG sem a utilização de adjuvantes adicionais.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A fusão da proteína carreadora LTB com o GnRH torna o hormônio imunogênico e permite o bloqueio da cascata reprodutiva quando inoculado em camundongos.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o potencial imun contraceptivo da quimera recombinantes LTB/GnRH em camundongos machos da linhagem BALB/c.

3.3 Objetivos Específicos

- Otimizar a expressão da quimera contendo o GnRH nos sistemas de expressão heteróloga *E. coli* e *P. pastoris*;
- Avaliar a dinâmica de anticorpos anti-GnRH induzida nos animais vacinados;
- Avaliar o efeito da vacinação nos níveis de testosterona dos animais em experimentação;
- Avaliar a eficácia da vacinação com base em observações histológicas das gônadas masculinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção do antígeno LTB/GnRH em *Pichia pastoris*

Uma cepa X-33 de *P. pastoris* previamente transformada com o plasmídeo pPICZαB/LTB/GnRH (Figura 1) foi selecionada para a expressão da proteína quimérica LTB/GnRH (Pereira, 2011).

EcoRI LTB KpnI ___ SacII GnRH 1 stop XbaI

XXGAATTCXXAAAATGGCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTTCGGA
 ATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATAC
 GGAATCGATGGCAGGCCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAG
 CGGCGCAACATTTCAAGGTCAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACT
 CCCAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACAT
 ATCTGATCGAGACCAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATCAAAAAC
 CCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGAAAXXGGTACCXXXXCCGC
 GGXXCAGCACTGGAGCTACGGCCTGCGTCCAGGATCCCGGTGATCT
 AGAXX

Figura 1. Sequência da quimera LTB/GnRH utilizada na clonagem do plasmídeo pPICZαB, na qual as regiões sublinhadas referem-se aos sítios de restrição (*EcoRI*, *KpnI*, *SacII* e *XbaI*, respectivamente), a região em amarelo refere-se a sequência de nucleotídeos da LTB, a região em verde refere-se a sequência de nucleotídeos do GnRH, a região em vermelho refere-se ao códon de terminação (*Stop codon*) e as regiões com X referem-se aos espaçamentos necessários para o reconhecimento das enzimas de restrição sendo que cada X pode ser substituído por qualquer nucleotídeo (A, T, C ou G).

As células armazenadas em glicerol 80% foram inoculadas em 5 ml de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) suplementado com zeocina 100 µg/ml e incubadas por 12 h a 28 °C sob agitação de 250 rpm. O cultivo foi centrifugado a 3000 x g por 5 min em temperatura ambiente. O *pellet* celular foi suspenso em 25 ml de meio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*) e incubado a 28 °C em agitador orbital (250 rpm) até o cultivo ter alcançado uma DO₆₀₀ (densidade ótica a 600 nm) entre 2 e 6. Após a DO₆₀₀ ideal ser obtida, o cultivo foi centrifugado a 3000 x g por 5 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Para suspender o *pellet* celular, foi utilizado aproximadamente 200 ml de meio BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*), obtendo um cultivo com DO₆₀₀ de 1,0. O cultivo foi incubado a 28 °C em agitador orbital (250 rpm). A indução da expressão de LTB/GnRH foi

realizada através da adição de metanol 100% a uma concentração final no meio de 1% a cada 24 h de cultivo durante um período de 120 h.

O cultivo foi centrifugado a 10000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado. O inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) foi adicionado ao sobrenadante a uma concentração final de 1 mM. A proteína LTB/GnRH foi recuperada através da adição de sulfato de amônio com nível de saturação de 80% e incubação a 4 °C por 3 h sob agitação. O sobrenadante saturado foi centrifugado a 10000 x g por 15 min a 4 °C e o precipitado foi suspenso em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4. A amostra foi submetida a uma etapa de diálise em tampão PBS (pH 7,4) para redução da concentração de sulfato de amônio presente na mesma. A diálise foi realizada durante 3 dias com troca de tampão a cada 12 h.

Para análise da expressão, uma amostra proveniente da diálise foi coletada e foi adicionada ao tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. A antigenicidade da LTB/GnRH foi avaliada mediante *Western blot*. Os seguintes soros policlonais foram utilizados: soro de coelhos antitoxina colérica (Sigma-Aldrich) e soro de coelhos imunizados com vacina anti-GnRH comercial. A técnica de SDS-PAGE 10% foi realizado contendo o marcador de peso molecular (Marcador *Protein Mixture* GE Healthcare - 17044601) e a quimera LTB/GnRH. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Para o bloqueio foi utilizada uma solução de PBS-T (PBS contendo 0,05% de Tween 20) com 5% de leite em pó desnatado. Logo após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T e foi dividida em tiras cada uma contendo uma amostra da quimera. Cada tira foi incubada, por 1 h a temperatura ambiente, com um anticorpo específico: anti-CT (anti-toxina colérica - Sigma-Aldrich) diluído 1:5000 e anti-GnRH diluído 1:400. Após a incubação, foram realizados mais 3 etapas de lavagem e as tiras foram incubadas, por 1 h a temperatura ambiente, ou com soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase diluído 1:4000. Após 3 lavagens com PBS-T, as tiras de membrana foram reveladas com solução de diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

4.2 Produção do antígeno LTB/GnRH em *Escherichia coli*

Uma cepa BL21 StarTM (DE3) de *E. coli* previamente transformada com o plasmídeo pAE/LTB/GnRH (Figura 2) foi selecionada para a expressão da proteína quimérica LTB/GnRH (Eslabão, 2014).

EcoRI **LTB** *KpnI* *SacII* **GnRH 1** **stop** *HindIII*
 XXGAATTCXXAAAATGGCTCCCCAGACTATTACAGAAC
 TATGTTTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAA
 ATGACAAGATACTATCATATACGGAATCGATGGCAGGC
 AAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGC
 AACATTTTCAGGTCTGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATA
 GACTCCCAAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACA
 CATTAAAGAATCACATATCTGATCGAGACCAAAATTGATA
 AATTATGTGTATGGAATCAAAAACCCCAATTCAATTG
 CGGCAATCAGTATGAAAXXGGTACCXXXXXCCGCGGX
 XCAGCACTGGAGCTACGGCCTGCGTCCAGGATCCCG
 GTGAAGCTTXX

Figura 2. Sequência da quimera LTB/GnRH utilizada na clonagem do plasmídeo pAE, na qual as regiões sublinhadas referem-se aos sítios de restrição (*EcoRI*, *KpnI*, *SacII* e *HindIII*, respectivamente), a região em amarelo refere-se a sequência de nucleotídeos da LTB, a região em verde refere-se a sequência de nucleotídeos do GnRH, a região em vermelho refere-se ao códon de terminação (*Stop codon*) e as regiões com X referem-se aos espaçamentos necessários para o reconhecimento das enzimas de restrição sendo que cada X pode ser substituído por qualquer nucleotídeo (A, T, C ou G).

As células armazenadas em glicerol 80% foram inoculadas em 5 ml de meio LB (Luria Bertani) suplementado com ampicilina 100 µg/ml e incubadas por 12 h a 37 °C sob agitação de 150 rpm. O cultivo foi centrifugado a 3000 x g por 5 min em temperatura ambiente. O *pellet* celular foi suspenso em 25 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubado a 37 °C em agitador orbital (150 rpm) por um período de 12 h. O pré-inóculo foi adicionado em 475 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml). O inóculo foi incubado 37 °C sob agitação a 150 rpm até o cultivo ter alcançado uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,8. Após o cultivo atingir a DO ideal, a expressão foi induzida com a adição de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 1 mM. O cultivo permaneceu sob agitação de 150 rpm por um período de 3 h a 37 °C.

Após o término da indução, o cultivo foi centrifugado a 15000 x g por 15 min (4 °C) e o *pellet* resultante foi suspenso em 20 ml de tampão de lise (NaH₂PO₄ 0,2 M; NaCl 0,5 M; Imidazole 10 mM) com 20 µL de lisozima (100 mg/µL) e incubado por 2 h a 4 °C. Após a incubação, a amostra passou pelo processo de sonicação para o rompimento das células, no qual foram realizados 30 ciclos de 15 s. O processo de centrifugação foi realizado como descrito anteriormente. O *pellet* resultante foi suspenso em tampão de solubilização (NaH₂PO₄ 0,2 M; NaCl 0,5 M; Imidazole 10 mM; Ureia 8 M) e incubado a 4 °C por 24 h. A amostra foi submetida a uma etapa de diálise em tampão PBS (pH 7,4) com concentrações decrescentes de ureia. A diálise foi realizada durante 3 dias com troca de tampão a cada 12 h. A LTB/GnRH presente na amostra foi purificada através da cromatografia de afinidade pela presença de uma *tag* de 6 histidinas na proteína recombinante.

Para análise da expressão, uma amostra proveniente da purificação foi coletada e foi adicionada ao tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. A antigenicidade da LTB/GnRH foi avaliada mediante *Western blot*. Os seguintes soros policlonais foram utilizados: soro de coelhos anti-CT (Sigma-Aldrich) e soro de coelhos imunizados com vacina anti-GnRH comercial. A técnica de SDS-PAGE 10% foi realizada contendo o marcador de peso molecular (Marcador *Protein Mixture* GE Healthcare - 17044601) e a químera LTB/GnRH. A técnica de *Western blot* foi realizada conforme descrito anteriormente.

4.3 Animais e desenho experimental

Os experimentos foram realizados em camundongos de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e da CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) da UFPel. O projeto teve parecer favorável no CEEA e foi cadastrado sob o número 1039.

A imunogenicidade da químera LTB/GnRH foi avaliada em machos BALB/c (camundongos) com idade entre cinco a sete semanas. Eles foram identificados individualmente e aleatoriamente separados em oito grupos contendo nove animais. As inoculações ocorreram nos dias 0 e 14 do experimento.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos (Tabela 1): grupo LTB/GnRH-P foi inoculado com 25 µg da quimera LTB/GnRH, expressa em *P. pastoris*, em 200 µl de solução salina 0,9% por via intramuscular; grupo LTB/GnRH-P/A foi inoculado com 25 µg da quimera LTB/GnRH, expressa em *P. pastoris*, em 100 µl de solução salina 0,9% e adsorvida, na proporção 1:1, em adjuvante oleoso Marcol:Montanide (9:1) por via intramuscular; grupo LTB/GnRH-E foi inoculado com 25 µg da quimera LTB/GnRH, expressa em *E. coli*, em 200 µl de solução salina 0,9% por via intramuscular; grupo LTB/GnRH-E/A foi inoculado com 25 µg da quimera LTB/GnRH, expressa em *E. coli*, em 100 µl de solução salina 0,9% e adsorvida, na proporção 1:1, em adjuvante oleoso Marcol:Montanide (9:1) por via intramuscular; grupo LTB recebeu 25 µg de LTB, expressa em *E. coli*, em 200 µl de solução salina 0,9% via por intramuscular; grupo Controle/A recebeu apenas uma solução contendo 100 µl de solução salina 0,9% e 100 µl de adjuvante oleoso Marcol:Montanide (9:1) por via intramuscular; grupo Controle foi inoculado com 200 µl de solução salina 0,9% por via intramuscular; e grupo Vacina Comercial recebeu uma vacina comercial anti-GnRH para bovinos com 25 µg de antígeno em 200 µl de solução salina 0,9% por via subcutânea.

Tabela 1. Representação dos grupos de animais utilizados no experimento.

GRUPOS E ANTÍGENOS		[] DO ANTÍGENO	ADJUVANTE	Nº DE ANIMAIS	ROTA	VOLUME
LTB/GNRH-P	LTB/GnRH <i>P. pastoris</i>	25 µg		9	I.M.	200 µl
LTB/GNRH-P/A	LTB/GnRH <i>P. pastoris</i>	25 µg	Marcol:Montanide (9:1)	9	I.M.	200 µl
LTB/GNRH-E	LTB/GnRH <i>E. coli</i>	25 µg		9	I.M.	200 µl
LTB/GNRH-E/A	LTB/GnRH <i>E. coli</i>	25 µg	Marcol:Montanide (9:1)	9	I.M.	200 µl
LTB	LTB	25 µg		9	I.M.	200 µl
CONTROLE/A	Controle		Marcol:Montanide (9:1)	9	I.M.	200 µl
CONTROLE	Controle			9	I.M.	200 µl
VACINA COMERCIAL	Vacina comercial	25 µg		9	S.C.	200 µl

Coletas de sangue foram realizadas através de punção do plexo venoso retroocular a cada 7 dias até o dia 49 após a primovacinação e uma última coleta foi

realizada no dia 126. As coletas de sangue do grupo Vacina Comercial foram realizadas só a partir do dia 21 do experimento devido a efeitos adversos das vacinações nos animais, os quais foram caracterizados pela presença de abertura na cavidade abdominal, pela atrofia e paralisia do membro traseiro, pelo aumento da temperatura corporal e pela perda de apetite.

Após cada coleta sanguínea, as amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 15 min e centrifugadas a 5000 x g por 5 min. Os soros foram coletados, fracionados em tubos crioprotetores e armazenados a -20 °C para análises posteriores.

Durante o período experimental foram realizadas três coletas de animais, os quais eram destinados a eutanásia e posterior coleta das gônadas para avaliação histológica. As coletas foram realizadas nos dias 28, 42 e 126 do experimento. Cada coleta consistia na retirada de três animais de cada grupo experimental.

Os camundongos foram anestesiados com pentobarbital (60 mg/kg), aplicado por via intraperitoneal e, logo após, foi realizada a técnica de eutanásia com CO₂, de acordo com a resolução nº 1000 de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Para a orquiectomia, foram realizados, na esquerda e na direita da região inguinal do abdômen dos animais, dois cortes pequenos (<0,5 cm) na pele e na parede muscular abdominal utilizando instrumentos cirúrgicos esterilizados.

4.4 Detecção da produção de anticorpos por ELISA

Os anticorpos IgG totais foram avaliados por ELISA, utilizando-se placas de poliestireno com 96 cavidades (Corning, NY). A avaliação dos soros frente a produção de anticorpos foi realizada contra as seguintes proteínas: LTB/GnRH expressa em *P. pastoris*, LTB/GnRH expressa em *E. coli* e LTB expressa em *E. coli*. Para a sensibilização da placa foram utilizados 100 µl de suspensão contendo 200 ng de proteína diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 permanecendo por 12 h a 4 °C. Após a sensibilização, a placa foi lavada três vezes com PBS-T (pH 7,4).

O pool de soros foi diluído 1:200 em PBS-T e adicionado 100 µl de cada diluição por cavidade (em triplicata). As placas foram incubadas por 60 min a 37 °C.

Foram realizadas três lavagens com PBS-T e, logo após, foram adicionados 100 µl de anti-camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000. As placas foram incubadas por 60 min a 37 °C. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com PBS-T e foi adicionado 50 µl de solução substrato/cromógeno Ortho-Phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio, deixando reagir por 15 min no escuro a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico 3%. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 492 nm.

Para a isotipagem dos anticorpos presentes no soro, foi utilizado o kit de reagentes *Mouse Monoclonal Antibody Isotyping* (Sigma-Aldrich). Os isotipos analisados foram IgG2a e IgG1. A avaliação dos soros foi realizada contra as seguintes proteínas: LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* e LTB/GnRH expressa em *E. coli*. A sensibilização das placas e a incubação com os soros foram realizadas conforme descrito anteriormente. Foram realizadas três lavagens com PBS-T e, logo após, foram adicionados 100 µl de cada isotipo específico diluído 1:1000 em PBS. As placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com PBS-T e foram adicionados 100 µl de anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase diluído 1:5000 em PBS. As placas foram incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Após as três lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µl de solução substrato/cromógeno OPD (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio, deixando reagir por 15 min no escuro a temperatura ambiente. A reação foi finalizada com a adição de 50 µl de ácido sulfúrico 3%. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 492 nm. A razão dos isotipos IgG1 e IgG2a foi calculada pela divisão do valor da absorbância para IgG1 pelo valor da absorbância para IgG2a.

4.5 Determinação de testosterona sérica

A concentração da testosterona presente no soro dos animais em experimentação foi mensurada a partir da técnica de radioimunoensaio. A técnica foi realizada pelo Laboratório de Análises Clínicas Pasin (Santa Maria, RS). Brevemente, para a quantificação, foram estabelecidos um controle contendo apenas testosterona marcada com ¹²⁵I, amostras padronizadas para curva de

quantificação e as amostras de soro dos animais em experimentação. Os soros enviados para análise fazem parte dos grupos imunizados com LTB/GnRH expresso em *P. pastoris* com ou sem adjuvante oleoso, grupos imunizados com LTB/GnRH expresso em *E. coli* com ou sem adjuvante oleoso, grupo imunizado com vacina comercial para bovinos e grupo controle inoculado com solução salina 0,9%. Foram analisadas as amostras referentes aos dias 14, 28, 42 e 126 do experimento. Em todas as amostras foram adicionados testosterona marcada com ^{125}I e anticorpos IgG anti-testosterona. As amostras são homogeneizadas através de vortex e incubadas em temperatura ambiente por 3 h. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g por 15 min e o sobrenadante foi coletado. A leitura da radioatividade é realizada em um contador gamma e as concentrações são calculadas de acordo com a curva padrão. A diluição do soro utilizado nas análises foi de 1:20 e o limite de detecção foi 12 ng/dl.

4.6 Avaliação histológica do efeito da imunização nos órgãos reprodutivos

Após o procedimento de eutanásia, os testículos foram removidos cirurgicamente como descrito anteriormente. Os testículos foram fixados em solução Bouin por 24 h. Os tecidos foram desidratados em soluções alcoólicas crescentes, clareados em xileno e incorporados em parafina Paraplast X-tra® (Sigma-Aldrich). As lâminas foram montadas a partir de blocos microtomizados (Microtomo motorizado Leica – RM2255) com 5 µm de espessura. As lâminas contendo os cortes dos tecidos foram desparafinadas em xileno, reidratadas em concentrações decrescentes de etanol e coradas com hematoxilina e eosina de Mayer. As análises foram realizadas em microscópio Olympus BX51 com câmera digital de alta resolução.

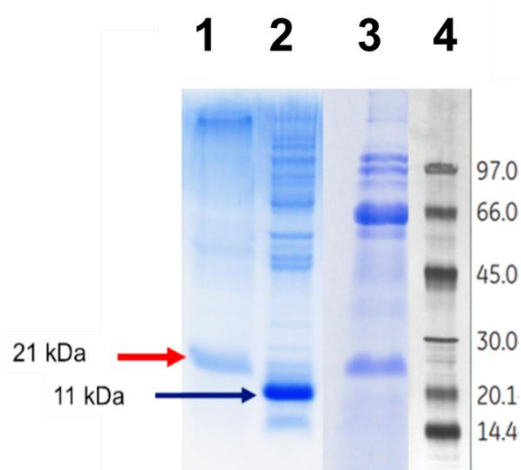
4.7 Análises estatísticas

Para a determinação de diferenças estatísticas, foram realizadas as análises de variância (ANOVA) seguido pelo teste post-hoc de Dunnett utilizando o software GraphPad Prism 6. Foi considerado $p < 0,05$ como significativo nas análises e os dados foram apresentados como média das triplicatas $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão da quimera LTB/GnRH por SDS-PAGE e *Western blot*

Conforme descrito por Pereira (2011) e Eslabão (2014), a proteína quimérica LTB/GnRH foi clonada e produzida em dois sistemas diferentes de expressão de proteínas heterólogas: *P. pastoris* e *E. coli*. Os clones obtidos a partir desses trabalhos foram utilizados para produzir os antígenos presentes nas formulações vacinais do presente estudo. Para a confirmação da expressão das proteínas recombinantes foram realizadas análises por SDS-PAGE 10% (Figura 3) e *Western blot* (Figura 4), ambos apresentaram padrão de banda correspondente a proteína



LTB/GnRH com peso molecular de aproximadamente 21 kDa.

Figura 3. Análise da expressão das proteínas LTB/GnRH em *P. pastoris* e *E. coli* por SDS-PAGE em gel 10%. (1) LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* banda com cerca de 21 kDa, (2) LTB expressa em *E. coli* banda com cerca de 11 kDa, (3) LTB/GnRH expressa em *E. coli* banda com cerca de 21 kDa, (4) Marcador *Protein Mixture* GE Healthcare – 17044601.

A técnica de *Western blot* (Figura 4) permitiu ainda a caracterização da antigenicidade da LTB/GnRH. Os resultados obtidos pela técnica mostraram que ambas as proteínas mantiveram epítomos importantes para o correto reconhecimento por anticorpos. O soro antitoxina colérica (anti-CT) reconheceu a porção LTB presente nas proteínas, devido à alta homologia entre as estruturas da toxina colérica e da enterotoxina termolábil de *E. coli*. Já o soro anti-GnRH, obtido

através da imunização de coelhos com vacina comercial, foi capaz de reconhecer a porção GnRH presente nas moléculas.

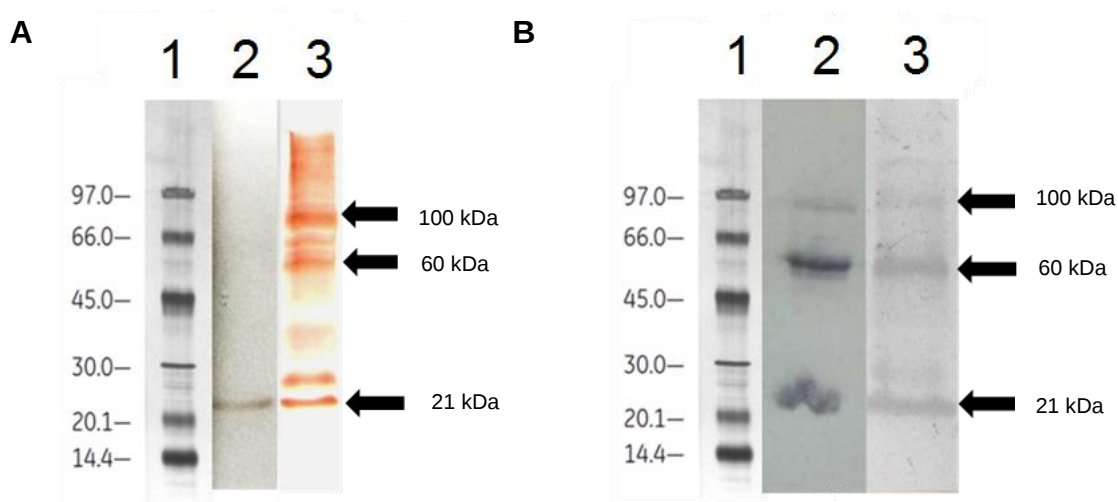


Figura 4. Avaliação da antigenicidade das proteínas LTB/GnRH expressas em *P. pastoris* e *E. coli* por Western blot. A – (1) Marcador *Protein Mixture* GE Healthcare – 17044601 (2) LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* – soro anti-CT 1:5000. (3) LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* – soro anti-GnRH 1:400. B – (1) Marcador *Protein Mixture* GE Healthcare – 17044601 (2) LTB/GnRH expressa em *E. coli* – soro anti-GnRH 1:400. (3) LTB/GnRH expressa em *E. coli* – soro anti-CT 1:5000.

5.2 Avaliação da resposta imune contra os antígenos LTB/GnRH em camundongos BALB/c machos

As respostas de IgG total, IgG1 e IgG2a, geradas pelos camundongos em experimentação frente aos antígenos produzidos, foram avaliadas através da técnica de ELISA. A reatividade dos anticorpos contra cada proteína foi expressa como a média da absorbância em 492 nm $\pm$ o desvio padrão.

A cinética da resposta imune de IgG sérica total frente a proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* é apresentada na figura 5A. Os grupos vacinados com o mesmo antígeno utilizado na técnica, tanto na presença quanto na ausência do adjuvante oleoso Marcol:Montanide, mostraram níveis de anticorpos detectáveis e diferentes significativamente dos grupos controle a partir de uma semana após a primeira vacinação. O grupo LTB/GnRH-P apresentou o maior nível de anticorpos no dia 28 do experimento ($1,11 \pm 0,09$) e o grupo LTB/GnRH-P/A obteve a maior leitura no dia 42 do experimento ($1,44 \pm 0,04$).

O grupo LTB/GnRH-E/A também apresentou resultados significativamente diferentes, mesmo que em menores proporções, após a primeira semana do experimento quando comparado com os grupos controle. Já, o grupo vacinado com a vacina comercial apresentou resposta significativa apenas a partir do dia 21 (dados não apresentados), apresentando maior absorbância ao final do experimento ($0,21 \pm 0,009$).

Com relação a cinética da resposta imune de IgG sérica total frente a proteína LTB/GnRH expressa em *E. coli* (Figura 5B), os grupos vacinados com o mesmo antígeno utilizado na técnica, tanto na presença quanto na ausência do adjuvante oleoso Marcol:Montanide, mostraram níveis de anticorpos detectáveis e diferentes significativamente dos grupos controle apenas a partir do dia 14 do experimento. O grupo LTB/GnRH-E apresentou o maior nível de anticorpos duas semanas após a segunda dose ($0,33 \pm 0,005$) e o grupo LTB/GnRH-E/A obteve a maior leitura no dia 42 do experimento ($1,44 \pm 0,08$).

Os grupos vacinados com a quimera produzida em *P. pastoris* não apresentaram resultados significativamente diferentes quando comparado com os grupos controle. Já, o grupo Vacina comercial apresentou maior absorbância na terceira semana após a segunda vacinação ($1,242 \pm 0,074$). Além disso, o grupo LTB também foi capaz de gerar resposta imune e de reconhecer a quimera produzida em *E. coli*, obtendo sua maior absorbância no dia 42 do experimento ($1,618 \pm 0,004$).

Com relação a resposta imune de IgG sérica total frente a proteína LTB expressa em *E. coli* (Figura 5C), o grupo LTB, vacinados com o mesmo antígeno utilizado na técnica, mostrou níveis de anticorpos detectáveis e diferentes significativamente dos grupos controle a partir do dia 7 do experimento. Já os grupos vacinados com a quimera expressa em *E. coli* mostraram níveis de anticorpos diferentes significativamente só após a segunda vacinação. O grupo LTB/GnRH-E apresentou o maior nível de anticorpos duas semanas após a segunda dose ($0,22 \pm 0,008$) e o grupo LTB/GnRH-E/A obteve a maior leitura no dia 42 do experimento ($1,22 \pm 0,15$).

Os grupos vacinados com a quimera produzida em *P. pastoris* e o grupo vacinado com a vacina comercial não apresentaram resultados significativamente diferentes quando comparado com os grupos controle.

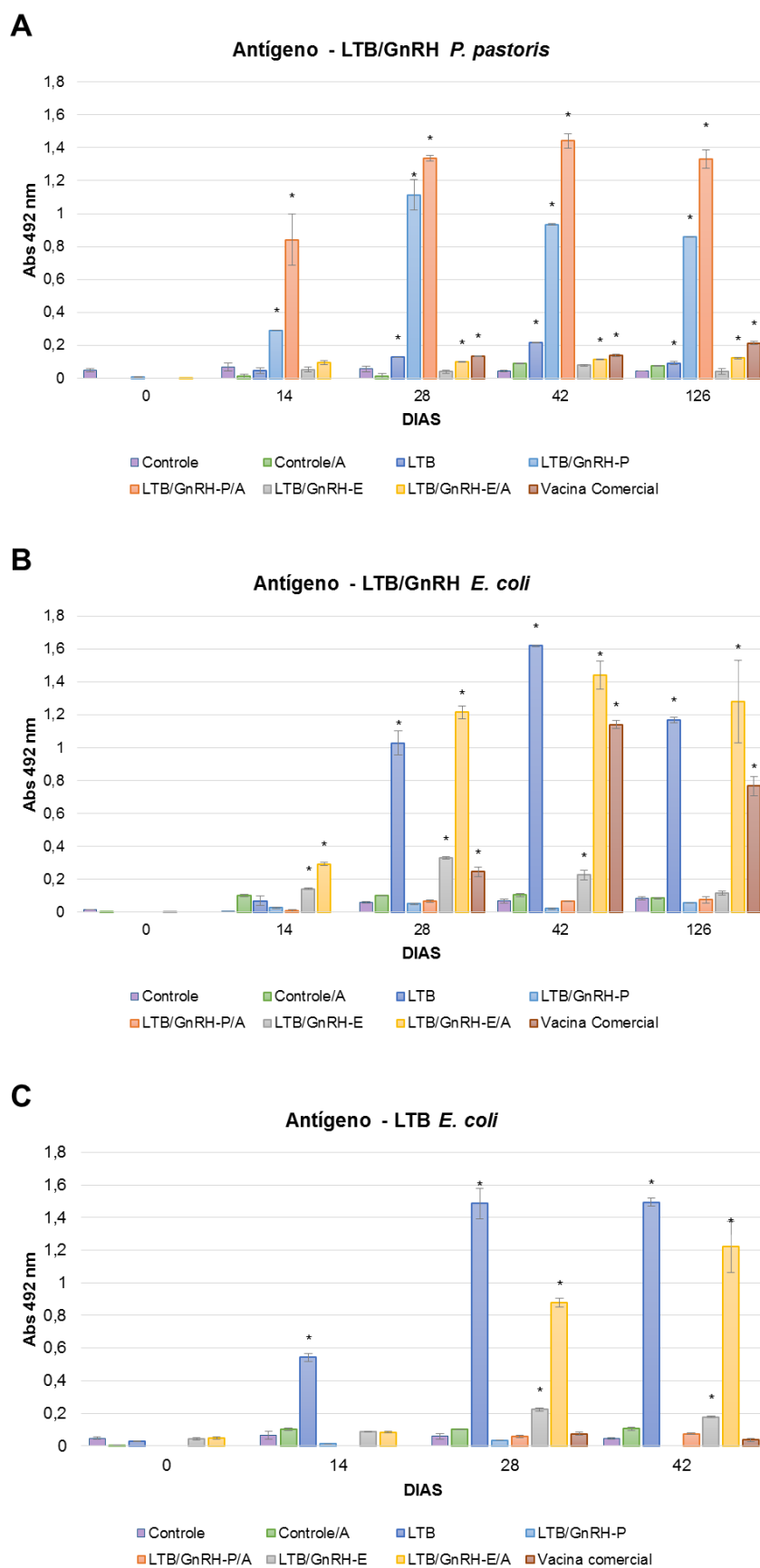


Figura 5. Cinética de IgG sérica total dos grupos de camundongos BALB/c vacinados em resposta aos antígenos LTB/GnRH *P. pastoris* (A), LTB/GnRH *E. coli* (B) e LTB *E. coli* (C) pela técnica de

ELISA indireto. Os animais foram vacinados nos dias 0 e 14 do estudo. Os resultados apresentados referem-se a média das absorbâncias obtidas em 492 nm $\pm$ o desvio padrão para os soros em diluição de 1:200 (Dias 0, 14 e 28 – n = 9; dia 42 – n = 6; dia 126 – n = 3). *p < 0,05 quando comparados com o grupo Controle.

As subclasses de IgG induzidas após a vacinação são um indicador indireto da contribuição relativa de citocinas do tipo T_h2 e do tipo T_h1. Mais especificamente, a produção de anticorpos do tipo IgG1 é primeiramente induzida por citocinas do tipo T_h2, enquanto a produção de anticorpos do tipo IgG2a é um reflexo do envolvimento de citocinas do tipo T_h1. O perfil de resposta imune humoral T_h1 e T_h2 induzido foi determinado por ELISA (Figura 6). O grupo LTB/GnRH-P (Figura 6A) apresentou os níveis de IgG1 mais elevados em relação a IgG2a a partir da terceira semana do experimento (p < 0,05). O grupo LTB/GnRH-P/A (Figura 6B) mostra um crescimento contínuo de ambas as imunoglobulinas a partir do dia 14. Os grupos LTB/GnRH-E (Figura 6C) e LTB/GnRH-E/A (Figura 6D) também mostram um crescimento de ambas as isotipos, sendo que os níveis de anticorpos do primeiro grupo são os menores de todos os antígenos analisados. O grupo Vacina (Figura 6E) comercial apresentou um elevado crescimento nos níveis de ambos os isotipos a partir da terceira semana, mantendo-se estáveis do dia 28 ao dia 42 e sofrendo um declínio ao final do experimento.

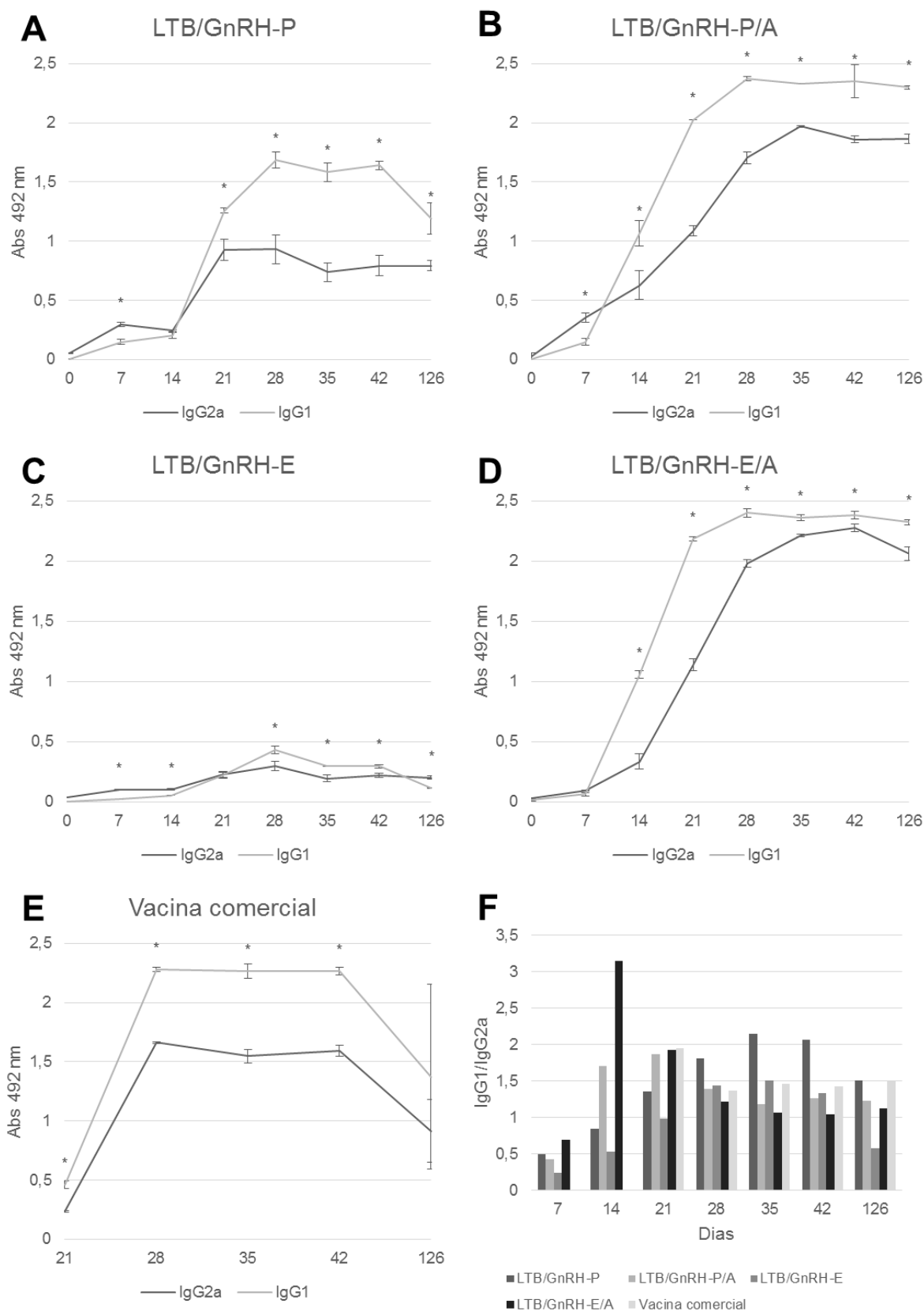


Figura 6. Perfil de IgG2a (T_H1) e IgG1 (T_H2) da resposta imune humoral em camundongos imunizados com as quimeras recombinantes LTB/GnRH na ausência (A e C) ou presença (B e D) de adjuvante oleoso e com vacina anti-GnRH comercial (E). Os resultados apresentados referem-se a média das

absorbâncias obtidas em 492 nm $\pm$ o desvio padrão para os soros em diluição de 1:200 (Dias 0, 7, 14, 21 e 28 – n = 9; dias 35, 42 e 49 – n = 6; dia 126 – n = 3). *p < 0,05. (F) Razão IgG1:IgG2a obtida a partir da divisão da média da absorbâncias de IgG1 pela média da absorbância de IgG2a resultantes da técnica de ELISA indireto. Valores > 1 sugerem resposta T_h2.

5.3 Quantificação de testosterona

Devido a liberação pulsátil da testosterona, a variação dos níveis de testosterona nos grupos analisados foi extremamente amplo e, mesmo que os grupos imunizados com LTB/GnRH tenham apresentado níveis menores quando comparados com o grupo controle, não foi possível observar diferenças estatísticas na quantificação nas amostras do dia 42 (Tabela 2).

Nos animais controle, a média da concentração de testosterona se manteve estável durante os dias 14 (821,5 ng/dl $\pm$ 122,32) e 28 (872 ng/dl $\pm$ 104,65). Entretanto, no dia 42 do experimento, o mesmo grupo apresentou um grande declínio na concentração do hormônio (372,5 ng/dl $\pm$ 4,94), impossibilitando a observação dos efeitos cascata dos antígenos quiméricos produzidos na concentração da testosterona.

Os grupos LTB/GnRH-P, no dia 28 (546 ng/dl $\pm$ 84,85), e LTB/GnRH-E, no dia 14 (403 ng/dl $\pm$ 86,26), ambos na ausência de adjuvante oleoso, foram os únicos grupos que não mostraram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle.

Tabela 2. Concentração de testosterona sérica em camundongos machos BALB/c.

GRUPOS	DIA 14	DIA 28	DIA 42	DIA126
Controle	821,5 ($\pm$ 122,32)	872 ($\pm$ 104,65)	372,5 ($\pm$ 4,94)	1100 ($\pm$ 53,74)
LTB/GnRH-P	< 12 ($\pm$ 0) ^a	546 ($\pm$ 84,85)	234 ($\pm$ 313,95)	< 12 ($\pm$ 0) ^a
LTB/GnRH-P/A	334 ($\pm$ 31,11) ^a	192 ($\pm$ 254,55) ^a	< 12 ($\pm$ 0)	< 12 ($\pm$ 0) ^a
LTB/GnRH-E	403 ($\pm$ 86,26)	131 ($\pm$ 168,29) ^a	545 ($\pm$ 86,26)	< 12 ($\pm$ 0) ^a
LTB/GnRH-E/A	136 ($\pm$ 175,36) ^a	< 12 ($\pm$ 0) ^a	289 ($\pm$ 12,72)	144 ($\pm$ 186,67) ^a
Vacina comercial	153 ($\pm$ 199,40) ^a	168 ($\pm$ 220,61) ^a	154 ($\pm$ 200,81)	< 12 ($\pm$ 0) ^a

Todos os dados foram apresentados como média (ng/dl) $\pm$ desvio padrão (Dias 14 e 28 – n = 9; dia 42 – n = 6; dia 126 – n = 3).

^a – Indica os grupos que apresentaram diferença significativa (p < 0,05) quando comparados com o grupo controle.

5.3 Observações histológicas dos tecidos reprodutivos

As análises histológicas das gônadas foram realizadas nas semanas 2, 4 e 16 após a segunda inoculação. Os tecidos provenientes dos animais dos grupos controle (Figuras 7A, 7B, 7C, 8A, 8B e 8C) mostraram túbulos seminíferos normais contendo células espermatogênicas em todos os estágios de desenvolvimento, incluindo espermatogônias, espermatócitos primário, espermatídes e espermatozoide. Em contraste, os tecidos dos grupos LTB/GnRH-P (Figuras 7D, 7E e 7F) e LTB/GnRH-P/A (Figuras 7G, 7H e 7I) apresentaram grande parte dos túbulos seminíferos sem lúmen definidos, com células desprezas na luz dos túbulos, e poucos ou nenhum espermatozoide presente. Além disso, o número de células germinativas, em todos os estágios de desenvolvimento, foi reduzido quando comparado com os controles, com uma maior redução no número de espermatídes. Outras características observadas foram a grande presença de vesículas permeando o epitélio germinal e degeneração das caudas espermáticas. Esses resultados foram observados a partir da primeira análise (segunda semana) e permaneceram até o final do experimento (décima sexta semana).

Já os grupos LTB/GnRH-E (Figuras 8D, 8E e 8F) e LTB/GnRH-E/A (Figuras 8G, 8H e 8I) apresentaram as mesmas características encontradas nos grupos tratamento anteriores. Entretanto, as lesões eram mais visíveis e abrangiam uniformemente o tecido. O grupo LTB/GnRH-E/A ao final do experimento (Figura 7I) apresentou as lesões mais severas, mostrando atrofia de todos os túbulos seminíferos, ausência de espermatogênese e redução na quantidade de células de Leydig.

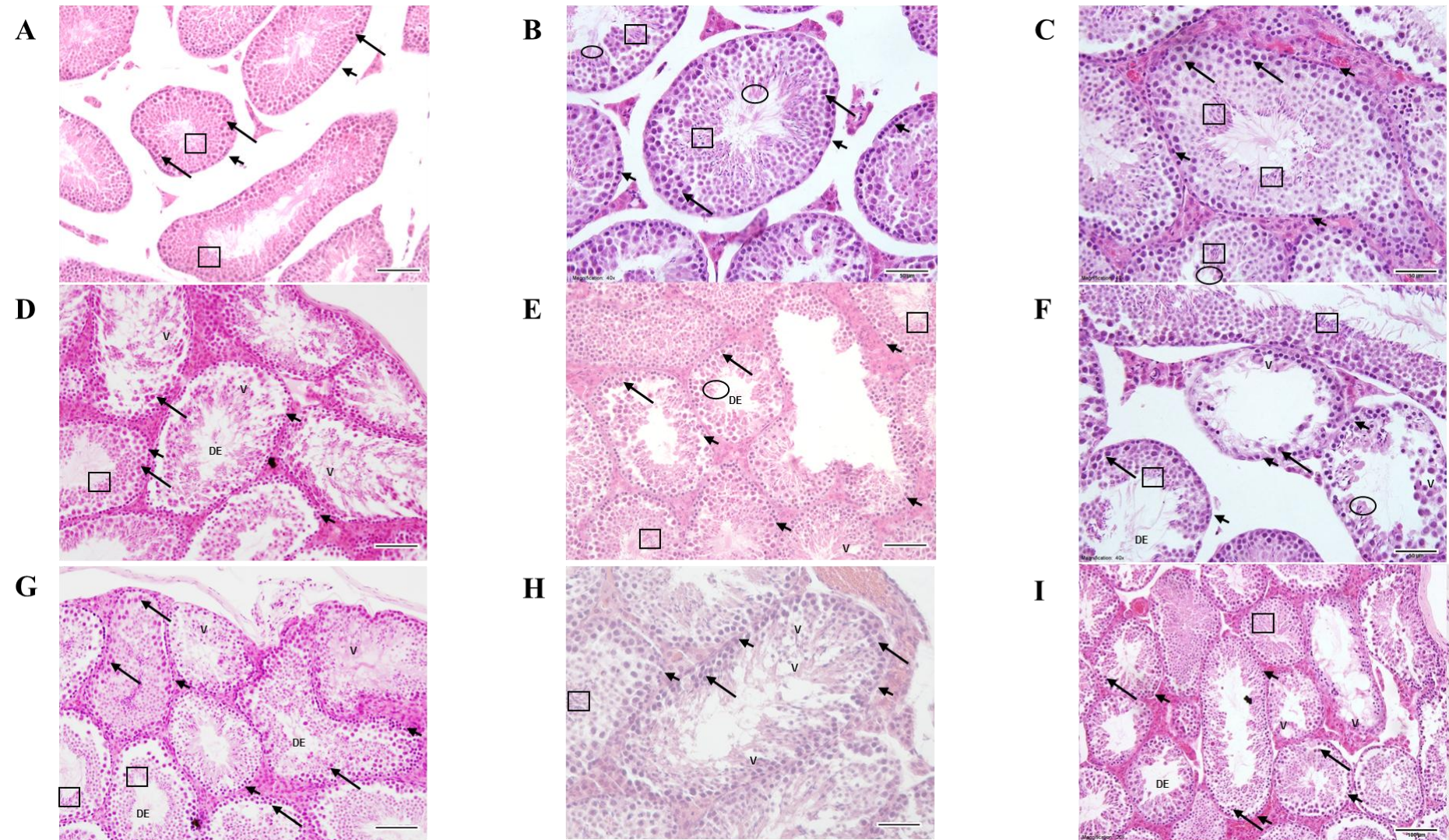


Figura 7. Histologia testicular dos animais dos grupos controle (A, B e C), LTB/GnRH *P. pastoris* com solução salina (D, E e F) e LTB/GnRH *P. pastoris* com 50% V/V Marcol:Montanide (G, H e I). A primeira coluna de imagens referente ao dia 28 do experimento, a segunda coluna ao dia 42 e a terceira coluna ao

dia 126. (B, C, F e H) ampliação x400, barra de escala = 50 μm . (A, D, E, G e I) ampliação x200, barra de escala = 100 μm . Células em espermatogênese apresentadas como espermatogônia (seta curta), espermatócito primário (seta longa), espermatíde (elipse) e espermatozoide (quadrado). V = vesícula. DE = degradação da cauda espermática.

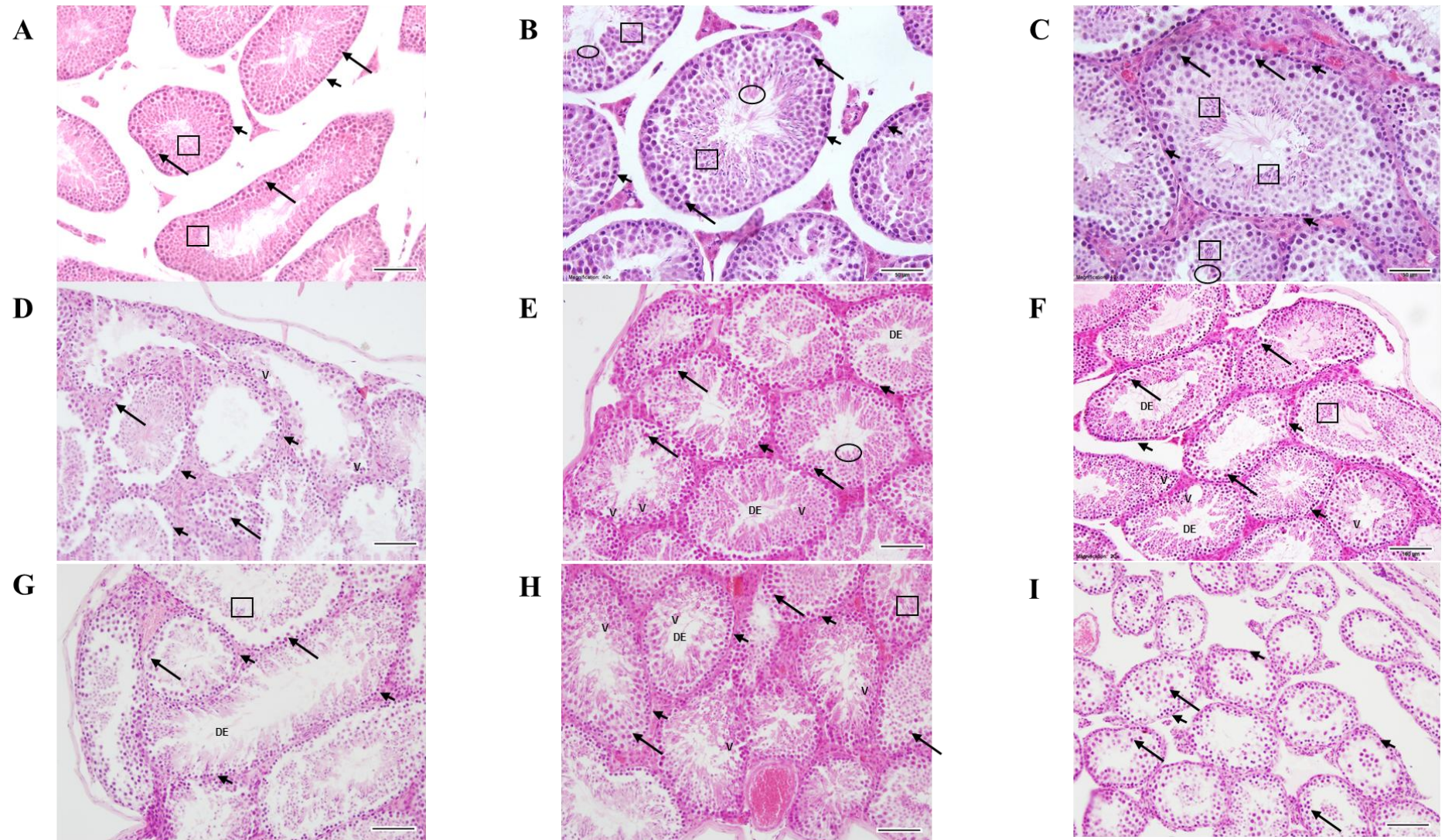


Figura 8. Histologia testicular dos animais dos grupos controle (A, B e C), LTB/GnRH *E. coli* com solução salina (D, E e F) e LTB/GnRH *E. coli* com 50% V/V Marcol:Montanide (G, H e I). A primeira coluna de imagens referente ao dia 28 do experimento, a segunda coluna ao dia 42 e a terceira coluna ao dia 126. (B

e C) ampliação x400, barra de escala = 50 μm . (A, D, E, F, G, H e I) ampliação x200, barra de escala = 100 μm . Células em espermatogênese apresentadas como espermatogônia (seta curta), espermatócito primário (seta longa), espermatíde (elipse) e espermatozoide (quadrado). V = vesícula. DE = degradação da cauda espermática.

6 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A imunização ativa contra o GnRH resulta na produção de anticorpos capazes de neutralizar o peptídeo, levando a inibição da síntese e liberação de LH e FSH, resultando no bloqueio da esteroidogênese e da gametogênese (Khan *et al.*, 2007). Por esse motivo, durante as últimas quatro décadas, diversas alternativas foram avaliadas com o objetivo de desenvolver vacinas esterilizantes anti-GnRH. Neste estudo, foram fornecidas informações sobre as respostas imune, endócrina e tecidual de camundongos BALB/c imunizados com antígenos recombinantes LTB/GnRH, associados ou não com adjuvante.

O GnRH vem sendo utilizado desde a década de 70, com o trabalho pioneiro de Arimura *et al.* (1973), como um potencial alvo para o bloqueio do sistema reprodutivo de mamíferos domésticos e selvagens (Khan *et al.*, 2008). Até o momento, diversos estudos em animais foram realizados na tentativa de gerar uma vacina segura e eficaz contra o GnRH (Zeng *et al.*, 2002; Jinshu *et al.*, 2004; Herbert e Trigg, 2005; Junco *et al.*, 2007; Talwar *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2015). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina tendo o GnRH como antígeno ainda enfrenta diversos desafios, sendo sua pobre imunogenicidade o maior deles.

Por ser um decapeptídeo próprio, torna-se necessária a utilização de estratégias capazes de estimular o sistema imune a gerar uma resposta contra o hormônio. Essas estratégias incluem a construção de moléculas contendo múltiplas cópias do peptídeo e/ou a fusão com proteínas carreadoras como a albumina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide tetânico (TT), ovalbumina (OVA), entre outras (Jinshu *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2014). No presente estudo, foram analisadas dois antígenos recombinantes contendo o GnRH associado a proteína carreadora LTB, um produzido em *P. pastoris* (Pereira, 2011) e outro produzido em *E. coli* (Eslabão, 2014).

Os mecanismos que permitem a LTB de exercer seu papel de adjuvante ainda não estão bem elucidados. Entretanto, uma importante vantagem do uso da LTB como molécula carreadora é sua captação dependente de receptor por células apresentadoras de antígenos o que resulta na indução de uma resposta imune antígeno específica (Fingerut *et al.*, 2005). Além disso, a LTB confere aos antígenos

associados outras características imunogênicas favoráveis como a capacidade de aumentar o peso molecular de peptídeos pequenos e o aumento da solubilidade em água (Harakuni *et al.*, 2005).

Um grande número de receptores de superfície celular vem sendo associados com capacidade de mediar a endocitose e apresentar antígenos efetivamente, entre eles estão presentes os gangliosídeos GM1. Esses receptores estão distribuídos ubiquamente nas células de mamíferos e são os principais receptores para as subunidade B das proteínas termolábeis de *E. coli* e *Vibrio cholerae* (Williams, 2000). A ligação cruzada dos receptores GM1 com proteínas, como a toxina colérica, parece apresentar um papel importante na separação de membranas, tradução de sinais e adesão celular (Nashar *et al.*, 2001). Além disso, estudos mostram que a apresentação da LTB mediada pelos receptores GM1 por linfócitos B e células dendríticas CD11c⁺ promove um aumento significativo da proliferação e expressão de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ LTB específicos. A ligação direta da LTB no receptor induz o aumento da expressão de moléculas do MHC de classe II em linfócitos B além de resultar na rápida internalização e acesso aos compartimentos ricos em MHC de classe II (Francis *et al.*, 1992; Nashar *et al.*, 2001; Fingerut *et al.*, 2005).

Pelos motivos apresentados, a imunogenicidade da LTB está diretamente relacionada com a sua capacidade de ligação aos receptores gangliosídeos, sendo necessária a presença de no mínimo duas subunidades B para a que mesma ocorra (Sixma *et al.*, 1991; Fingerut *et al.*, 2005). De acordo com os resultados obtidos com as análises por SDS-PAGE (Figura 1), *Western blot* (Figura 2) e ELISA (Figuras 3, 4 e 5), é possível inferir que a conformação da proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* impossibilitou a formação de oligômeros funcionais, interferindo na interação com os receptores GM1 e reduzindo a indução de uma resposta específica anti-GnRH e anti-LTB.

Através das técnicas de SDS-PAGE (Figura 1) e *Western blot* (Figura 2) foi possível observar que a proteína LTB/GnRH expressa em *E. coli* apresenta três padrões de bandas, uma banda com cerca de 21 kDa de peso molecular, referente a uma única subunidade B fusionada ao hormônio, e outras duas banda com cerca de 60 kDa e 100 kDa, sugerindo a oligomerização de duas ou mais subunidades (Fingerut *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2009). A quimera expressa em *P. pastoris*

apresentou padrão de banda similar a proteína expressa em *E. coli* apenas frente ao soro policlonal anti-GnRH. Esse padrão não se manteve quando as análises foram realizadas frente ao soro anti-CT. Ma *et al.* (2010) sugerem que as técnicas de SDS-PAGE e *Western blot* levam a desestabilização dos pentâmeros formados, por conta das temperaturas elevadas e do uso de dodecilsulfeto de sódio (SDS), e a liberação de monômeros. Entretanto, diversos autores mostram que a LTB manteve a formação de pentâmeros mesmo após as amostras serem submetidas as condições e aos reagentes exigidos nas técnicas (Fingerut *et al.*, 2005; Harakuni *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2009). Esses resultados sugerem que a exportação para meio extracelular dos monômeros de LTB produzidos em *P. pastoris* não possibilitou a criação de um ambiente favorável a oligomerização dos mesmos.

Estudo prévio demonstrou que a oligomerização da LTB em *E. coli* ocorre após a liberação das subunidades maduras no periplasma da bactéria (Hirst, 1991). É postulado que o periplasma de bactérias gram-negativas fornece um ambiente favorável a oligomerização espontânea de monômeros de subunidades B já que possibilita o acúmulo e a concentração dos mesmos (Hirst e Holmgren, 1987). Rezaee *et al.* (2005) clonaram e expressou a proteína LTB em ambiente intracelular de *Saccharomyces cerevisiae* e observou que esse sistema de expressão não possibilitava a formação de pentâmeros das subunidades. Segundo os autores, a expressão da LTB no amplo espaço do citoplasma da levedura não forneceu um ambiente limitado para o acúmulo e oligomerização dos monômeros.

Lim *et al.* (2009) produziram com sucesso a forma pentamérica da LTB em *S. cerevisiae* com capacidade de ligação ao receptor GM1. Para tal, os autores direcionaram a produção da subunidade para o lúmen do retículo endoplasmático a partir da adição do peptídeo sinal amilase 1A (*Ramy1A*), possibilitando a criação de um ambiente apropriado para a oligomerização.

Em termos de níveis totais de IgG sérica (Figuras 3 e 4), os grupos que receberam os antígenos LTB/GnRH apresentaram valores elevados quando comparados com os grupos controle do experimento, confirmando a imunogenicidade de ambas as quimeras. Esses resultados contradizem os achados de Hsu *et al.* (2000), os quais demonstraram que a fusão do GnRH com um domínio de enterotoxina de ligação a receptores, no caso a enterotoxina A de *Pseudomonas*, não foi capaz de gerar uma resposta imunológica, tornando necessária a fusão da

proteína carreadora com múltiplas cópias do hormônio. Já Rock *et al.* (1996) demonstraram que a fusão da proteína LTB com o peptídeo carboxi-terminal da cadeia β do hCG foi capaz de induzir anticorpos hCG específicos sem a complementação com adjuvantes. Entretanto, o potencial imun contraceptivo dessa quimera recombinante não foi avaliada. No presente trabalho também foi observada a indução de anticorpos anti-GnRH mesmo na ausência de adjuvante oleoso. Esses resultados apontam que a LTB sozinha pode estimular o sistema imune a responder contra antígenos próprios, não necessitando da fusão com múltiplas cópias do hormônio.

Surpreendentemente, os grupos imunizados com LTB/GnRH-E, LTB/GnRH-E/A, LTB e Vacina comercial apresentaram pouca ou nenhuma resposta avaliada por ELISA quando realizada com a proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* (Figura 5A). O mesmo foi observado com as proteínas LTB/GnRH e LTB expressas em *E. coli* (Figuras 5B e 5C), os grupos imunizados com LTB/GnRH-P e LTB/GnRH-P/A não mostraram níveis de anticorpos significativamente diferentes dos grupos controles. Haan *et al.* (1998) demonstraram que, para indução de anticorpos específicos anti-LTB, é necessária a ligação do pentâmero LTB com os receptores GM1 e que a afinidade da ligação vai determinar o potencial adjuvante da subunidade. Os dados obtidos no presente trabalho em conjunto com os relatos de literatura (Rock *et al.*, 1996; Haan *et al.*, 1998; Rezaee *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2009) sugerem que a quimera produzida em *P. pastoris* possui conformação terciária diferente da quimera produzida em *E. coli* e que essa conformação não é capaz de manter expostos epítomos importantes para a indução de uma resposta imune eficaz contra a porção da LTB e contra o GnRH.

A natureza de uma resposta imune a um determinado antígeno é estabelecida por uma série de fatores, incluindo o uso de adjuvante, a dose do antígeno, a via de administração e a genética do hospedeiro (Ferro *et al.* 2004). Uma alternativa para examinar o perfil da resposta induzida é determinar as subclasses de anticorpos induzidos e relacioná-las com o tipo de linfócito T-helper (T_h) envolvido. Em camundongos, a subclasse IgG1 é considerada um indicativo de uma resposta T_h2 , enquanto a subclasse IgG2a é relacionada com a resposta T_h1 (Jegerlehner *et al.* 2007).

Os grupos que receberam o adjuvante oleoso Marcol:Montanide (9:1) rapidamente apresentaram uma polarização para uma resposta T_H2 , obtendo níveis de IgG1 mais elevados em relação a IgG2a a partir do dia 14 do experimento. Leenaars *et al.* (1998) observaram que, dentre cinco adjuvantes a base de óleo, o uso de Montanide em conjunto com um peptídeo sintético resultou em uma estimulação predominantemente do isotipo IgG1, além de apresentar menores efeitos patológicos adversos em camundongos quando comparado com os outros adjuvantes avaliados.

Entretanto, os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a polarização para resposta T_H2 , apresentada pelos grupos imunizados com a quimera e o adjuvante oleoso, não é conservada até o final do experimento, sugerindo a manutenção de uma resposta imune mista T_H1/T_H2 a partir do dia 28. O grupo LTB/GnRH-P e o grupo Vacina comercial apresentaram uma cinética similar de perfil de isotipos, mesmo o primeiro tendo apresentado níveis mais baixos de anticorpos. Ambos apresentaram níveis de IgG1 mais elevados em relação a IgG2a, sugerindo a polarização para uma resposta T_H2 a partir do dia 28 e conservando a mesma até o final do experimento. O grupo LTB/GnRH-E apresentou níveis baixos de ambos os isotipos, isso se deve a fraca resposta imune induzida por esse grupo. Porém, foi possível observar um perfil de resposta imune mista T_H1/T_H2 a partir do dia 21 do experimento.

Richards *et al.* (2001) mostraram que a LTB sozinha foi capaz de modular a resposta imune aos antígenos do herpes vírus simples do tipo 1, favorecendo uma resposta dominante do tipo T_H2 ao invés de uma resposta T_H1 associada com a imunopatologia da infecção viral. Conceição *et al.* (2006) também demonstraram que, após a imunização parenteral de uma quimera contendo a região R1 da adesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* fusionada a LTB, houve uma predominância de anticorpos IgG1 em relação a anticorpos IgG2a. Ambos os trabalhos sugerem que a resposta imune induzida por antígenos heterólogos coadministrados com LTB está fortemente associada com um perfil T_H2 . Nossos dados corroboram com esses relatos já que foi possível observar uma tendência a uma maior resposta IgG1 em relação a IgG2a nos grupos LTB/GnRH-P, LTB/GnRH-P/A, LTB/GnRH-E e LTB/GnRH-E/A.

O efeito da imunização nos níveis de testosterona (Tabela 2) não foi facilmente correlacionado com as alterações observadas nos tecidos. Isso ocorreu devido a liberação de natureza pulsátil do hormônio, a qual impossibilitou a comparação dos animais imunocastrados com os animais inteiros em determinados dias do experimento. Khan *et al.* (2007) também não observaram diferenças em termos de testosterona sérica total em camundongos imunizados com os antígenos GnRH-I, GnRH-II e GnRH-III fusionados a toxoide tetânico. Os autores sugerem que a coleta sanguínea para mensuração de testosterona deve ser realizada frequentemente durante o período do estudo, prática não aceita pelos comitês de ética em experimentação animal. Contudo, nossos dados mostram que, ao final do experimento, foi possível associar os baixos níveis de testosterona de todos os grupos imunocastrados com as alterações mais severas observadas nas gônadas.

Os grupos imunizados com LTB/GnRH emulsificada em adjuvante oleoso, LTB/GnRH-P/A e LTB/GnRH-E/A, apresentaram níveis de testosterona baixos e constantes durante todo o experimento. A castração imunológica é alcançada quando anticorpos anti-GnRH bloqueiam o eixo hipotálamo-hipófise-gônada, inibindo efetivamente a secreção hipofisária de LH e FSH. Esse fato acarreta na redução da produção de testosterona já que a produção da mesma é induzida pela presença de LH (Fang *et al.*, 2010).

Além da redução dos níveis de testosterona, a maior severidade de lesões foram encontradas nesses grupos, sendo que o grupo LTB/GnRH-E/A (Figura 9) apresentou alterações uniformes ao longo do tecido e atrofia na gônadas em todos os animais no dia 126 do experimento. Ferro *et al.* (2004) também observaram resultados similares em ratos imunizados com um peptídeo GnRH modificado fusionado ao toxoide tetânico e associado com diferentes adjuvantes. Seus resultados mostraram que a associação com adjuvantes que permitem uma liberação lenta do antígeno e que possibilitam a indução de uma resposta imune prolongada com anticorpos neutralizantes presentes sistemicamente é fundamental para a imunocastração, não sendo necessário levar em consideração o isotipo ou a afinidade dos anticorpos produzidos.

Em alguns dos tecidos analisados (Figuras 8F, 8I, 9F e 9I) foi possível observar o rompimento do tecido intersticial em algumas regiões, incluindo uma redução no número de células de Leydig nos testículos dos animais imunocastrados.

Entretanto, esse rompimento também foi observado em algumas regiões dos tecidos dos animais controle (Figuras 8A, 8B, 9A e 9B), sugerindo que essa ruptura tenha ocorrido durante o processo de corte histológico, fixação dos tecidos nas lâminas e coloração. Apenas os animais do grupo LTB/GnRH-E/A no dia 126 (Figura 9I) apresentaram rompimento severo abrangendo todo o tecido intersticial testicular, além da ausência de células de Leydig.

As células de Leydig apresentam papel essencial na manutenção da esteroidogênese e da espermatogênese nos testículos, sendo que falhas nos dois processos geralmente são atribuídas a perda de função dessas células Han *et al.* (2013). Han *et al.* (2015) demonstraram que a imunização ativa anti-GnRH em ratos levou a uma redução da expressão de mRNA dos receptores LH e FSH nos testículos, interferindo nas funções das células de Leydig e Sertoli, respectivamente. Os autores sugerem que a perda de capacidade dos testículos de produzirem testosterona e espermatozoides deve-se primeiramente ao mal funcionamento de ambas as células de Leydig e de Sertoli.

No presente trabalho foram avaliados dois antígenos recombinante LTB/GnRH, obtidos em sistemas de expressão procarioto e eucarioto, frente ao possível potencial imun contraceptivo. O antígeno LTB/GnRH expresso em *E. coli* apresentou o maior potencial imun contraceptivo, principalmente quando associado com adjuvante oleoso, promovendo a atrofia das gônadas dos animais em experimentação. Com relação ao antígeno LTB/GnRH expresso em *P. pastoris*, foram observados tanto a indução da produção de anticorpos anti-GnRH, mesmo que em menores proporções devido a não atuação da LTB como adjuvante, quanto alterações na espermatogênese em algumas regiões das gônadas. A partir dos resultados obtidos com relação a resposta imune induzida, a esteroidogênese e a espermatogênese, pode-se inferir que ambos os antígenos foram capazes de atuar como imun contraceptivo em camundongos machos da linhagem BALB/c. Esse estudo fornece resultados preliminares da utilização dos antígenos LTB/GnRH como imun contraceptivo para mamíferos, possibilitando a futura ampliação das análises em animais de interesse humano.

7 CONCLUSÃO GERAL

- As quimera LTB/GnRH expressas em *P. pastoris* e *E. coli* se mostraram imunogênicas quando inoculadas em camundongos machos da linhagem BALB/c;
- O antígeno expresso em *P. pastoris* resulta em uma baixa indução de anticorpos anti-LTB;
- Os animais dos grupos LTB/GnRH-P e LTB/GnRH-P/A apresentaram uma neutralização incompleta do hormônio e efeitos histológicos nas gônadas;
- O antígeno expresso em *E. coli* foi capaz de induzir tanto uma resposta anti-GnRH quanto anti-LTB, sugerindo a correta conformação terciária da proteína recombinante;
- Os animais dos grupos LTB/GnRH-E e LTB/GnRH-E/A apresentaram alterações histológicas mais severas nas gônadas, sugerindo um bloqueio completo do GnRH.

8 REFERÊNCIAS

- Aguilar, F. F.; Barranco, J. J.; Fuentes, E. B.; Aguilera, L. C.; Saez, Y. L.; Santana, M. D. C.; Vazquez, E. P.; Baker, R. B.; Acosta, O. R.; Perez, H. G.; Nieto, G. G. Very Small Size Proteoliposomes (VSSP) and Montanide Combination Enhance the Humoral Immuno Response in a GnRH Based Vaccine Directed to Prostate Cancer. *Vaccine*, v. 30, p. 6595–6599, 2012.
- Altman, A.; Dixon, F. J. Immunomodifiers in vaccines. *Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine*, v. 33, p. 301-343, 1989.
- Amstalden, M.; Zieba, D. A.; Garcia, M. R.; Stanko, R. L.; Welsh Jr, T. H.; Hansel, W. H.; Williams, G. L. Evidence that lamprey GnRH-III does not release FSH selectively in cattle. *Reproduction*, v. 127, p. 35-43, 2004.
- Arimura, A.; Sato, H.; Kumasaka, T.; Worobec, R. B.; Debeljuk, L.; Dunn, J.; Schally, A. V. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology*, v. 93, p. 1092-1103, 1973.
- Arukha, A. P.; Minhas, V.; Shrestha, A.; Gupta, S. K. Contraceptive efficacy of recombinant fusion protein comprising zona pellucida glycoprotein-3 fragment and gonadotropin releasing hormone. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 114, p. 18-26, 2016.
- Baskin, M. J. Temporary sterilization by injection of human spermatozoa: a preliminary report. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 24, p. 892-897, 1932.
- Besser, G. M.; Mortimer, C. H. Hypothalamic regulatory hormones : a review. *Journal of Clinical Pathology*, v. 23, p. 173–184, 1974.
- Bonneau, M. Accessory Sex Glands as a Tool to Measure the Efficacy of Immunocastration in Male Pigs. *International Journal of Animal Bioscience*, v. 4, p. 930–932, 2010.
- Clarke, I. J.; Brown, B. W.; Tran, V. V.; Scott, C. J.; Fry, R.; Millar, R. P.; Rao, A. Neonatal immunization against gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) results in diminished GnRH secretion in adulthood. *Endocrinology*, v. 139, p. 2007-2014, 1998.
- Clarke, I. J.; Pompolo, S. Synthesis and Secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 29–55, 2005.
- Conceição, F. R.; Moreira, Â. N.; Dellagostin, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine*, v. 24, p. 5734-5743, 2006.
- Da Hora, V. P.; Conceição, F. R.; Dellagostin, O. A.; Doolan, D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. *Vaccine*, v. 29, p. 1538-1544, 2011.
- De Haan, L.; Verweij, W. R.; Feil, I. K.; Holtrop, M.; Hol, W. G. J.; Agsteribbe, E.; Wilschut, J. Role of G_{M1} binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant

- activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina and its B subunit. *Immunology*, v. 94, p. 424-430, 1998.
- Delves, P. J. How far from a Hormone-Based Contraceptive Vaccine? *Journal of Reproductive Immunology*, v. 62, p. 69–78, 2004.
- D'occhio, M. J. Immunological suppression of reproductive functions in male and female mammals. *Animal Reproduction*, v. 33, p. 345-372, 1993.
- Doran, E.; Whittington, F. W.; Wood, J. D.; McGivan, J. D. Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) Is Induced by Skatole and This Induction Is Blocked by Androstene in Isolated Pig Hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, v. 140, p. 81–92, 2002.
- Dunshea, F. R.; Colantoni, C.; Howard, K.; McCauley, I.; Jackson, P.; Long, K. A.; Lopatnicki, S.; Nugent, E. A.; Simons, J. A.; Walker, J.; Hennessy, D. P. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *Journal of Animal Science*, v. 79, p. 2524-2535, 2001.
- Edwards, R. G.; Immunological control of fertility in female mice. *Nature*, v. 203, p. 50-53, 1964.
- Einarsson, S.; Andersson, K.; Wallgren, M. Short- and Long-Term Effects of Immunization against Gonadotropin-Releasing Hormone Using Improvac TM on Sexual Maturity, Reproductive Organs and Sperm Morphology in Male Pigs. *Theriogenology*, v. 71, p. 302–310, 2009.
- Eslabão, L. B. Expressão e caracterização de GnRH recombinante com potencial imun contraceptivo. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Fang, Fugui, Haidong Li, Ya Liu, Yunhai Zhang, Yong Tao, Yunsheng Li, Hongguo Cao, Suolu Wang, Lin Wang, and Xiaorong Zhang. Active Immunization with Recombinant GnRH Fusion Protein in Boars Reduces Both Testicular Development and mRNA Expression Levels of GnRH Receptor in Pituitary. *Animal Reproduction Science*, v. 119, p. 275–281, 2010.
- Ferro, V. A.; Costa, R.; Carter, K. C.; Harvey, M. J. A.; Waterston, M. M.; Mullen, A. B.; Matschke, C.; Mann, J. F. S.; Colston, A.; Stimson, W. Immune responses to a GnRH-based anti-fertility immunogen, induced by different adjuvants and subsequent effect on vaccine efficacy. *Vaccine*, v. 22, p. 1024-1031, 2004a.
- Ferro, V. A.; Khan, M. A.; Earl, E. R.; Harvey, M. J.; Colston, A.; Stimson, W. H. Influence of carrier protein conjugation site and terminal modification of GnRH peptide sequence in the development of a highly specific anti-fertility vaccine. Part I. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 48, p. 361-371, 2002.
- Ferro, V. A.; Khan, M. A.; Latimer, V. S.; Brown, D.; Urbanski, H. F.; Stimson, W. H. Immunoneutralisation of GnRH-I, without cross-reactivity to GnRH-II, in the development of a highly specific anti-fertility vaccine for clinical and veterinary use. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 51, p. 109-129, 2001.
- Ferro, V. A.; Khan, M. A.; McAdam, D.; Colston, A.; Aughey, E.; Mullen, A. B.; Waterston, M. M.; Harvey, M. J. A. Efficacy of an anti-fertility vaccine based on

- mammalian gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) – a histological comparison in male animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 101, p. 73-86, 2004b.
- Ferro, V. A.; O'Grady, J. E.; Notman, J.; Stimson, W. H. An investigation into the immunogenicity of a GnRH analogue in male rats: a comparison of the toxicity of various adjuvants used in conjunction with GnRH-glycys. *Vaccine*, v. 14, p. 451-457, 1996.
- Fingerut, E.; Gutter, B.; Goldway, M.; Eliahoo, D.; Pitcovski, J. B Subunit of E. Coli Enterotoxin as Adjuvant and Carrier in Oral and Skin Vaccination. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 112, p. 253–263, 2006.
- Fraser, H. M.; Gunn, A. Effects of antibodies to luteinizing hormone-releasing hormone in the male rabbit and on the rat oestrous cycle. *Nature*, v. 244, p. 160-161, 1973.
- Frayne, J.; Hall, L. The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 43, p. 1-33, 1999.
- Fang, F.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Tao, Y.; Li, Y.; Cao, H.; Wang, S.; Wang, L.; Zhang, X. Active immunization with recombinant GnRH fusion protein in boars reduces both testicular development and mRNA expression levels of GnRH receptor in pituitary. *Animal Reproduction Science*, v. 119, p. 275-281, 2010.
- Gibson, M. J.; Wu T. J.; Miller, G. M.; Silverman J. What Nature's Knockout Teaches Us about GnRH Activity: Hypogonadal Mice and Neuronal Grafts. *Hormones and Behavior*, v. 31, p. 212–220, 1997.
- Gispert, M.; Oliver, M. À.; Velarde, A.; Suarez, P.; Pérez, J.; Furnols, M. F. Carcass and meat quality characteristics of immunocastrated male, surgically castrated male, entire male and female pigs. *Meat Science*, v. 85, p. 664-670, 2010.
- Goodwin, D.; Varamini, P.; Simerska, P.; D'Occhio, M. J.; Toth, I. Design, synthesis and evaluation of a gonadotropin releasing hormone-based subunit vaccine in rams (*Ovis aries*). *Vaccine*, v. 33, p. 1453-1458, 2015.
- Gökdal, O.; Atay, O.; Ülker, H.; Yarali, E.; Helva, I. B.; DeAvila, D. M.; Reeves, J. J. GnRH or eCG treatment fails to restore reproductive function in GnRH immunized ewes. *Animal Reproduction Science*, v. 112, p. 251-260, 2009.
- Gorman, S. P.; Levy, J. K.; Hampton, A. L.; Colante, W. R.; Harris, A. L.; Brown, R. G. Evaluation of a porcine zona pellucida vaccine for the immunocontraception of domestic kittens (*Felis catus*). *Theriogenology*, v. 58, p. 135-149, 2002.
- Gupta, S. K.; BAnsals, P. Vaccines for immunological control of fertility. *Reproductive Medicine and Biology*, v. 9, p. 61-71, 2010.
- Gupta, S. K.; Srinivasan, V. A.; Suman, P.; Rajan, S.; Nagendrakumar, S. B.; Gupta, N.; Shrestha, A.; Joshi, P.; Panda, A. K. Contraceptive vaccines based on the zona pellucid glycoproteins for dogs and other wildlife population management. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, P. 51-62, 2011.
- Haan, L.; Verweij, W. R.; Feil, I. K.; Holtrop, M.; Hol, W. G. J.; Agsteribbe, E.; Wilschut, J. Role of G_{M1} binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant

- activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxina and its B subunit. *Immunology*, v. 94, p. 424-430, 1998.
- Hajishengallis, G.; Arce, S.; Gockel, C. M.; Connell, T. D.; Russell, M. W. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: Applications for oral infections. *Journal of Dental Research*, v. 84, p. 1104-1116, 2005.
- Han, X.; Cao, X.; Tang, J.; Du, X.; Zeng, X. Active immunization against GnRH reduces the synthesis of GnRH in male rats. *Theriogenology*, v. 80, p. 1109-1116, 2013.
- Han, Y.; Liu, G.; Jiang, X.; Ijaz, N.; Tesema, B. KISS1 Can Be Used as a Novel Target for Developing a DNA Immunocastration Vaccine in Ram Lambs. *Vaccine*, v. 33, p. 777-782, 2015.
- Harakuni, T.; Sugawa, H.; Komesu, A.; Tadano, M.; Arakawa, T. Heteropentameric Cholera Toxin B Subunit Chimeric Molecules Genetically Fused to a Vaccine Antigen Induce Systemic and Mucosal Immune Responses: A Potential New Strategy to Target Recombinant Vaccine Antigens to Mucosal Immune Systems. *Infection and Immunity*, v. 73, p. 5654-5665, 2005.
- Hardy, C. M.; Mobbs, K. J. Expression of recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use as an antigen in an immunocontraceptive vaccine. *Molecular Reproduction and Development*, v. 52, p. 216-224, 1999.
- Herbert, C. A.; Trigg, T. E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 141-153, 2005.
- Herr, J. C.; Flickinger, C. J.; Homyk, M. Biochemical and morphological characterization of intra-acrosomal antigen SP-10 from human sperm. *Biology of Reproduction*, v. 42, p. 181-193, 1990.
- Hsu, C.; Ting, C.; Ting, C. Vaccination against Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Using Toxin Receptor-Binding Domain-Conjugated GnRH Repeats. *Cancer Research*, v. 60, p. 3701-3705, 2000.
- Inoue, N.; Ikawa, M.; Isotani, A.; Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, v. 434, p. 234-238, 2005.
- Ivanovo, M.; Petrov, M.; Klissourska, D.; Mollova, M. Contraceptive potential of porcine zona pelúcida in cats. *Theriogenology*, v. 45, p. 969-981, 1995.
- Janjatovic, A. K.; Lackovic, G.; Bozic, F.; Kezic, D.; Popovic, M.; Valpotic, H.; Harapin, I.; Pavicic, Z.; Njari, B.; Valpotic, I. Histomorphometric evaluation of intestinal cellular immune responses in pigs immunized with live oral F4ac⁺ non-enterotoxigenic *E. coli* vaccine against postweaning colibacillosis. *European Journal of Histochemistry*, v. 54, p. 18-24, 2010.
- Jiang, C.; Jiang, Y.; Huang, Z.; Shen, W.; Wang, J.; Shen, Q. Evaluation of the immunogenicity of a single chain chimeric peptide composed of hCG β and oLH α for inhibition of the growth of hCG β -expressing cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 59, p. 1771-1779, 2010.
- Jinshu, X.; Jingjing, L.; Duan, P.; Zheng, Z.; Ding, M.; Jie, W.; Rongyue, C.; Zhuoyi, H. The immunogenicity of recombinant and dimeric gonadotrophin-releasing

- hormone vaccines incorporating a T-helper epitope and GnRH or repeated GnRH units. *Journal of Immunological Methods*, v. 289, p. 111-122, 2004.
- Jinshu, X.; Jingjing, L.; Duan, P.; Zheng, Z.; Ding, M.; Jie, W.; Rongyue, C.; Zhuoyi, H.; Roque, R. S. A synthetic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine for control of fertility and hormone dependent diseases without any adjuvant. *Vaccine*, v. 23, p. 4834-4843, 2005.
- Jun, X.; Gu, K.; Shu, J.; Yue, R.; Hui, M.; Wu, J. Preparation of a Peptide Vaccine against GnRH by a Bioprocess System Based on Asparaginase. *Vaccine*, v. 28, p. 4984–4988, 2010.
- Junco, J. A.; Peschke, P.; Zuna, I.; Ehemann, V.; Fuentes, F.; Bover, E.; Pimentel, E.; Basulto, R.; Reyes, O.; Calzada, L.; Castro, M. D.; Arteaga, N.; López, Y.; Garay, H.; Hernández H.; Bringas, R.; Guillén, G. E. Immunotherapy of prostate cancer in a murine model using a novel GnRH based vaccine candidate. *Vaccine*, v. 25, p. 8460-8468, 2007.
- Kauffman, A. S. Emerging functions of gonadotropin-releasing hormone II in mammalian physiology and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 16, p. 794-806, 2004.
- Kaur, K.; Prabha, V. Immunocontraceptives: New Approaches to Fertility Control. *BioMed Research International* 2014.
- Khan, M. A. H.; Ferro, V. A.; Koyama, S.; Kinugasa, Y.; Song, M.; Ogita, K.; Tsutsui, T.; Murata, Y.; Kimura, T. Immunisation of male mice with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes suppresses fertility *in vivo*. *Vaccine*, v. 25, p. 3544-3553, 2007a.
- Khan, M. A. H.; Ogita, K.; Ferro, V. A.; Kumasawa, K.; Tsutsui, T.; Kimura, T. Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. *Vaccine*, v. 26, p. 1365-1374, 2008.
- Khan, M. A. H.; Prevost, M.; Waterston, M. M.; Harvey, M. J. A.; Ferro, V. A. Effect of immunization against gonadotrophin releasing hormone isoforms (mammalian GnRH-I, chicken GnRH-II and lamprey GnRH-III) on murine spermatogenesis. *Vaccine*, v. 25, p. 2051-2063, 2007b.
- Kirkpatrick, J. F.; Turner Jr., J. W. Reversible Contraception in Nondomestic Animals. *American Association of Zoo Veterinarians Stable*, v. 22, p. 392–408, 1991.
- Kirkpatrick, J. F.; Luda, R. O.; Frank, K. M. Contraceptive vaccines for wildlife: a review. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, p. 40-50, 2011.
- Kirkpatrick, J. F.; Turner, A. Immunocontraception and Increased Longevity in Equids. *Zoo Biology*, v. 26, p. 237-244, 2007.
- Kirkpatrick, J. F.; Turner, A. Achieving Population Goals in a Long-Lived Wildlife Species (*Equus Caballus*) with Contraception. *Wildlife Research*, v. 35, p. 513–519, 2008.
- Kovacs, M.; Seprodi, J.; Koppan, M.; Horvath, J. E.; Vincze, B.; Teplan, I.; Flerko, B. Lamprey gonadotropin hormone-releasing hormone-III has no selective follicle-

- stimulating hormone-releasing effect in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 14, p. 647-655, 2002
- Kubale, V.; Batorek, N.; Skrlep, M.; Prunier, A.; Bonneau, M.; Fazarinc, G.; Candek-Potokar, M. Steroid Hormones, Boar Taint Compounds, and Reproductive Organs in Pigs according to the Delay between Immunocastration and Slaughter. *Theriogenology*, v. 79, p. 69–80, 2013.
- Ladd, A.; Tsong, Y.; Lok, J.; Thau, R. B. Active immunization against LHRH. I. Effects of conjugation site and dose. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 22, p. 56-63, 1990.
- Lea, I. A.; van Lierop, M. J.; Widgren, E. E.; Grootenhuys, A.; Wen, Y.; van Duin, M. A. A chimeric sperm peptide induces antibodies and strain-specific reversible infertility in mice. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 527- 536, 1998.
- Leenaars, M.; Koedam, M. A.; Hendriksen, C. F. M.; Claassen, E. Immune Responses and Side Effects of Five Different Oil-Based Adjuvants in Mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 61, p. 291–304, 1998.
- Lefièvre, L.; Conner, S. J.; Salpekar, A.; Olufowobi, O.; Ashton, P.; Pavlovic, B.; Lenton, W.; Afnan, M.; Brewis, I. A.; Monk, M.; Hughes, D. C.; Barratt, C. L. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction*, v. 19, p. 1580-1586, 2004.
- Levy, J. K. Contraceptive vaccines for the humane control of community cat populations. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, p. 63-70, 2011.
- Levy, J. K.; Mansour, M.; Crawford, P. C.; Pohajdak, B.; Brown R. G. Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology*, v. 63, p. 1334-1341, 2005.
- Lim, J. Expression of Functional Pentameric Heat-Labile Enterotoxin B Subunit of *Escherichia Coli* in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 502–510, 2009.
- Limonta, P.; Moretti, R. M.; Marelli, M. M.; Motta, M. The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 24, p. 279-295, 2003.
- Lloyd, M. L.; Shellam, G. R.; Papadimitriou, J. M.; Lawson, M. A. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse zona pellucida 3. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 2024-2032, 2003.
- Lovas, S.; Palyi, I.; Vincze, B.; Horvath, J.; Kovacs, M.; Mezo, I.; Toth, G.; Teplan, I.; Murphy, R. F. Direct anticancer activity of gonadotropin-releasing hormone-III. *Journal of Peptide Research*, v. 52, p. 384-389, 1998.
- Ma, X.; Yao, B.; Zheng, W.; Li, L. Comparative study on characterization of recombinant B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin (rLTB) prepared from *E. coli* and *P. pastoris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, p. 550-557, 2010.

- Maggi, R.; Cariboni, A. M.; Marelli, M. M.; Moretti, R. M.; Andrè, V.; Marzagalli, M.; Limonta, P. GnRH and GnRH Receptors in the Pathophysiology of the Human Female Reproductive System. *Human Reproduction Update*, v. 0, p. 1–24, 2015.
- Martini, F. H.; Nath, J. L. Fundamentals of anatomy & physiology. 9.ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2012.
- Mbow, M. L.; De Gregorio, E.; Valiante, N. M.; Rappuoli, R. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, p. 411-416, 2010.
- McLaughlin, E. A.; Aitken, R. J. Molecular and Cellular Endocrinology Is There a Role for Immuncontraception?. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 335, p. 78–88, 2011.
- McNamara, M. K. Immunogenic LHRH compositions and methods relating thereto. Número do pedido: CA 2294865. CSL Limited.
- Meloan, R. H. Basic aspects of immunomodulation through active immunization. *Livestock Production Science*, v. 42, p. 135-145, 1995.
- Millar, R. P. GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 5-28, 2005.
- Millar, R. P.; King, J. A. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone. *International Review of Cytology*, v. 106, p. 149-182, 1987a.
- Millar, R. P.; King, J. A.; Davidson, J. S. Gonadotrophin-releasing hormone – diversity of functions and clinical applications. *South African Medical Journal*, v. 72, p. 748-755, 1987b.
- Miller, L. A.; Johns, B. E.; Killian, G. J. Immuncontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 44, p. 266-274, 2000.
- Miller, L.; Fagerstone, K.; Wagner, R.; Finkler, M. Use of a GnRH Vaccine, GonaCon, for Prevention and Treatment of Adrenocortical Disease (ACD) in Domestic Ferrets. *Vaccine*, v. 31, p. 4619–4623, 2013.
- Miyamoto, K.; Hasegawa, Y.; Nomura, M. Identification of the second gonadotrophin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81; p. 3874-3878, 1984.
- Moudgal, N. R.; Jeyakumar, M.; Krishnamurthy, H. N.; Sridhar, S.; Krishnamurthy, H.; Martin, F. Development of male contraceptive vaccine – a perspective. *Human Reproduction*, v. 3, p. 335-346, 1997a.
- Moudgal, N. R.; Murthy, G. S.; Prasanna Kumar, K. M.; Martin, F.; Suresh, R.; Medhamurthy, R.; Patil, S.; Sehgal, S.; Saxena, B. N. Responsiveness of human male volunteers to immunization with ovine follicle stimulating hormone vaccine: results of a pilot study. *Human Reproduction*, v. 12, p. 457-463, 1997b.
- Moudgal, N. R.; Ravindranath, N.; Murthy, G. S.; Dighe, R. R.; Aravindan, G. R.; Martin, F. Long-term contraceptive efficacy of vaccine of ovine follicle-stimulating

- hormone in male bonnet monkeys (*Macaca radiata*). *Journals of Reproduction & Fertility*, v. 96, p. 91-102, 1992.
- Munks, M. W. Progress in development of immunocontraceptive vaccines for permanent non-surgical sterilization of cats and dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 223-227, 2012.
- Munson, L.; Harrenstien, L. A.; Acton, A. E.; Graham, P. A.; Chassy, L. M.; Kirkpatrick, J. F. Immunologic responses and adverse reactions to Freund's-adjuvanted porcine zona pellucida immune-contraceptives in domestic cats. *Vaccine*, v. 23, p. 5646-5654.
- Nashar, T. O.; Betteridge, Z. E.; Mitchell, R. Evidence for a role of ganglioside GM₁ in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxina B subunit (EtxB) to CD4⁺ T cells. *International Immunology*, v. 13, p. 541-551, 2001.
- Nashar, T. O.; Hirst, T. R.; Williams, N. A. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. *Immunology*, v. 91, p. 572-578, 1997.
- Naz, R. K. Immunocontraceptive effect of Izumo and enhancement by combination vaccination. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, p. 336-344, 2008.
- Naz, R. K. Contraceptive vaccines: success, status, and future perspective. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, p. 2-4, 2011.
- Pazaitou-Panayiotou, K.; Chemonidou, C.; Poupi, A.; Koureta, M.; Kaprara, A.; Lambropoulou, M.; Constantinidis, T. C.; Galaktidou, G.; Koffa, M.; Kiziridou, A.; Kakolyris, S.; Kolios, G.; Kortsaris, A.; Chatzaki, E. Gonadotropin-releasing hormone neuropeptides and receptor in human breast cancer: Correlation to poor prognosis parameters. *Peptides*, v. 42, p. 15-24, 2013.
- Pereira, J. L. Expressão heteróloga da quimera LTB/GnRH sintética em *P. pastoris* e seu efeito na resposta imunológica e no epitélio seminífero de camundongos. 2011. Tese (mestrado em ciências) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Pitcovski, J.; Bazak, Z.; Wasserman, E.; Elias, O.; Levy, A.; Peretz, T.; Fingerut, E.; Frankenburg, S. Heat labile enterotoxina of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. *Vaccine*, v. 24, p. 636-643, 2006.
- Pizza, M.; Giuliani, M. M.; Fontana, M. R.; Monaci, E.; Douce, G.; Dougan, G.; Mills, K. H. G.; Rappuoli, R.; Del Giudice, G. Mucosal vaccines: non-toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, v. 19, p. 2534-2541, 2001.
- Primakoff, P.; Lathrop, W.; Wollman, L.; Cowan, A.; Myles, D. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature*, v. 335, p. 543-547, 1988.
- Purswani, S.; Talwar, G. P. Development of a highly immunogenic recombinant candidate vaccine against human chorionic gonadotropin. *Vaccine*, v. 29, p. 2341-2348, 2011.

- Quiniou, N.; Monziols, M.; Colin, F.; Goues, T.; Courboulay, V. Effect of feed restriction on the performance and behaviour of pigs immunologically castrated with Improvac®. *Animal*, v. 6, p. 1420-1426, 2012.
- Reed, S. G.; Bertholet, S.; Coler, R. N.; Friede, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, v. 30, p. 23-32, 2008.
- Rezaee, M. A.; Rezaee, A.; Moazzeni, S. M.; Salmaniam, A. H.; Yasuda, Y.; Tochikubo, K.; Pirayeh, S. N.; Arzanlou, M. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit (LTB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Microbiology*, v. 43, p. 354-360, 2005.
- Richards, C. M.; Aman, T.; Hirst, T. R.; Hill, T. J.; Williams, N. Protective Mucosal Immunity to Ocular Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Mice by Using *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit as an Adjuvant. *Journal of Virology*, v. 75, p. 1664–1671, 2001.
- Rock, E. P.; Reich, K. A.; Lyu, D. M.; Hovi, M.; Hardy, J.; Schoolnik, G. K.; Stocker, B. A. D.; Stevens, V. Immunogenicity of a fusion protein linking the beta subunit carboxyl terminal peptide (CTP) of human chorionic gonadotropin to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB). *Vaccine*, v. 14, p. 1560-1568, 1996.
- Sad, S.; Chauhan, V. S.; Arunan, K.; Raghupathy, R. Synthetic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) vaccines incorporating GnRH and synthetic T-helper epitopes. *Vaccine*, v. 11, p. 1145-1150, 1993.
- Schally, A. V.; Arimura, A.; Baba, Y.; Nair, R. M.; Matsuo, H.; Redding, T. W.; Debeljuk, L. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 43, p. 393-399, 1971.
- Schally, A. V.; Arimura, A.; Kastin, A. J. Hypothalamic regulatory hormones. *Science*, v. 179, p. 341-350, 1973.
- Schneider, F.; Tomek, W.; Gründker, C. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*, v. 66, p. 691-709, 2006.
- Sealfon, S. C.; Weinstein, H.; Millar, R. P. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine Reviews*, v. 18, p. 180-205, 1997.
- Sharma, S.; McDonald, I.; Miller, L.; Hinds, L. Parenteral Administration of GnRH Constructs and Adjuvants: Immune Responses and Effects on Reproductive Tissues of Male Mice. *Vaccine*, 2014.
- Simmons, C.P.; Ghaem-Magami, M.; Petrovska, L.; Lopes, L.; Chain, B. M.; Williams, N. A.; Dougan, G. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 53, p. 218-226, 2001.
- Sixma, T. K.; Pronk, S. E.; Kalk, K. H.; Wartna, E. S.; van Zanten, B. A.; Witholt B. Crystal structure of a cholera toxin-related heat-labile enterotoxin from *E. coli*. *Nature*, v. 351, p. 371-377, 1991.
- Song, Y. J.; Kim, D. G.; Nam, H. M.; Lee, J. B.; Park, S. Y.; Song, C. S.; Seo, K. H.; Kim, H. M.; Choi, I. S. Evaluation of the efficacy of immunocastration vaccine

- composed of gonadotrophin-releasing hormone conjugated with *Salmonella typhimurium* flagellin in rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 47-50, 2012.
- Suri, A. Family of sperm associated antigens: relevance in sperm-egg interaction and immunocontraception. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, v. 63, p. 433-443, 2007.
- Talwar, G. P. Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage. *Human Reproduction Update*, v. 3, p. 301-310, 1997.
- Talwar, G. P.; Gupta, J. C.; Shankar, N. V. Immunological approaches against human chorionic gonadotropin for control of fertility and therapy of advanced-stage cancers expressing hCG/subunits. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 66, p. 26-39, 2011.
- Talwar, G. P.; Sharma, N. C.; Dubey, S. K.; Salahuddin, M.; Das, C.; Ramakrishnan, S. K.; Kumar, S.; Hingorani, V. Isoimmunization against human chorionic gonadotropin with conjugates of processed beta-subunit of the hormone and tetanus toxoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 73, p. 218-222, 1976.
- Talwar, G. P.; Vyas, H. K.; Purswani, S.; Gupta, J. C. Gonadotropin-releasing hormone/human chorionic gonadotropin β based recombinant antibodies and vaccines. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, p. 158-163, 2009.
- Temple J. L.; Millar, R. P.; Rissman, E. F. An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology*, v. 144, p. 13-19, 2003.
- Thompson Jr, D. L. Immunization against GnRH in male species (Comparative aspects). *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 459-469, 2000.
- Turkstra, J. A.; Schaaper, W. M. M.; Oonk, H. B.; Meloen, R. H. GnRH tandem peptides for inducing an immunogenic response to GnRR-I without cross-reactivity to other GnRH isoforms. *Vaccine*, v. 23, p. 4915-4920, 2005.
- Turkstra, J. A.; Van Der Staay, F. J.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Woelders, H.; Meloen, R. H.; Schuurman, T. Pharmacological and toxicological assessment of a potential GnRH vaccine in young-adult male pigs. *Vaccine*, v. 29, p. 3791-3801, 2011.
- Walker, J.; Ghosh, S.; Pagnon, J.; Colantoni, C.; Newbold, A.; Zeng, W.; Jackson, D. C. Totally Synthetic Peptide-Based Immunocontraceptive Vaccines Show Activity in Dogs of Different Breeds. *Vaccine*, v. 25, p. 7111–7119, 2007.
- Wassarman, P. M.; Litscher, E. S. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 52, p. 665-676, 2008.
- White, R. B.; Eisen, J. A.; Kasten, T. L.; Fernald, R. D. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 305-311, 1998.

- Wicks, N.; Crouch, S.; Pearl, C. A. Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization. *Animal Reproduction Science*, v. 142, p. 149-159, 2013.
- Williams, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 290, p. 447-453, 2000.
- Xu, J.; Zhu, Z.; Duan, P.; Li, W.; Zhang, Y.; Wu, J.; Hu, Z.; Roque, R. S.; Liu, J. Cloning, Expression, and Purification of a Highly Immunogenic Recombinant Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Chimeric Peptide. *Protein Expression and Purification*, v. 50, p. 163–170, 2006.
- Xu, J.; Zhu, Z.; Wu, J.; Liu, W.; Shen, X.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Zhu, D.; Roque, R. S.; Liu, J. Immunization with a recombinant GnRH vaccine conjugated to heat shock protein 65 inhibits tumor growth in orthotopic prostate cancer mouse model. *Cancer Letters*, v. 259, p. 240-250, 2008.
- Yamamoto, M.; Mcghee, J. R.; Hagiwara, Y.; Otake, S.; Kiyono, H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 53, p. 211-217, 2001.
- Yin, H.; Cheng, K. W.; Hwa, H.; Peng, C.; Auersperg, N.; Leung, P. C. K. Expression of the messenger RNA for gonadotropin-releasing hormone and its receptor in human cancer cell lines. *Life Sciences*, v. 62, p. 2015-2023, 1998.
- Zamaratskaia, G.; Andersson, H. K.; Chen, G.; Andersson, K.; Madej, A.; Lundström, K. Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (ImprovacTM) of steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 351-359, 2008.
- Zamaratskaia, G.; Gilmore, W. J.; Lundström, K.; Squires, E. J. Effect of testicular steroids on catalytic activities of cytochrome P450 enzymes in porcine liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 676–681, 2007.
- Zamaratskaia, G.; Rasmussen, M. K.; Immunocastration of male pigs – situation today. *Procedia Food Science*, v. 5, p. 324-327, 2015.
- Zeng, X. Y.; Turkstra, J. A.; Meloen, R. H.; Liu, X. Y.; Chen, F. Q.; Schaaper, W. M. M.; Oonk, H. B.; Guo, D. Z.; Van De Wiel, F. M. Active immunization against gonadotrophin-releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development. *Animal Reproduction Science*, v. 70, p. 223-233, 2002.
- Zhu, X.; Naz, R. K. Fertilization antigen-1: cDNA cloning, testis-specific expression and immunocontraceptive effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 4704-4709, 1997.