

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec  
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Expressão e caracterização de GnRH recombinante com potencial imunocontraceptivo**

**Lívia Budziarek Eslabão**

Pelotas, 2014

**Lívia Budziarek Eslabão**

**Expressão e caracterização de GnRH recombinante com potencial  
imun contraceptivo**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

E76e Eslabão, Livia Budziarek  
Expressão e caracterização de GnRH recombinante com potencial imun contraceptivo / Livia Budziarek Eslabão. – 62f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite.

1.Biotecnologia. 2.Imunocotracepção. 3.Vacina contraceptiva. 4.GnRH. 5.LTB. 6.Quimera. I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Título.

CDD:

**Banca examinadora**

MSc. Alceu Gonçalves dos Santos Junior, Universidade Federal de Pelotas

MSc. Carine Kunzler Souza, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

MSc. Fernando Lopes Leivas Leite, Iowa State University

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Jairo Macedo Eslabão e Vera Budziarek Eslabão, e a minha irmã, Liége, por todo apoio e suporte.

Ao professor Fábio Pereira Leivas Leite pela orientação e pelas oportunidades proporcionadas ao longo da minha iniciação científica.

Ao meu orientador de estágio Fernando Leivas Leite por todo aprendizado, pela paciência e por se tornar um exemplo do tipo de profissional que eu almejo ser.

Aos colegas do Laboratório 4 (Biotecnologia) e aos colegas do Laboratório 11 (Parasitologia) pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda.

Aos meus grandes amigos, Rafaela Fossati da Silva e Frederico Schmitt Kremer, pela amizade, pelo apoio e pela ajuda nas horas difíceis.

Muito obrigada!



## Resumo

ESLABÃO, Livia Budziarek. **Expressão e caracterização de GnRH recombinante com potencial imun contraceptivo**. 2014. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

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 necessária sua associação 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 trabalho objetivou o desenvolvimento de uma quimera contendo a LTB fusionada ao GnRH. A quimera foi expressa na cepa de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). A proteína expressa foi reconhecida pelo anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis, pelo anticorpo policlonal de coelho anti-toxina colérica e pelo anticorpo anti-GnRH através da técnica de *Western blot*. Como a fusão dos antígenos não prejudicou a antigenicidade dos mesmos, isso possibilitará uma futura aplicação da proteína recombinante obtida como imun contraceptivo.

**Palavras-chave:** imun contracepção; vacina contraceptiva; GnRH; LTB; quimera;





## Abstract

ESLABÃO, Livia Budziarek. **Expression and characterization of recombinant GnRH with immunocontraceptive potential.** 2014. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

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, its association with a carrier molecule capable of stimulating the immune system is required such as the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB). The present study aimed at developing of a chimera containing LTB fused to GnRH. The chimera was expressed in *E. coli* BL21 Star™ (DE3) strain. The expressed protein was recognized by monoclonal antibody anti-6xHis, rabbit polyclonal antibody anti-cholera toxin and antibody anti-GnRH through the *Western blot* technique. As the fusion of antigens did not impair their antigenicity, this will allow the future application of the recombinant protein as an immunocontraceptive.

**Key-Words:** immunocontraception; contraceptive vaccine; GnRH; LTB; chimera;



## Lista de Figuras

Figura 1.....	34
Figura 2.....	39
Figura 3.....	40
Figura 4.....	41
Figura 5.....	42
Figura 6.....	43

## Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão Bibliográfica.....	13
2.1. Gonadotrofina Coriônica Humana.....	18
2.2. Hormônio Folículo Estimulante e Hormônio Luteinizante.....	19
2.3. Antígenos espermatozoide-específicos.....	21
2.4. Zona pelúcida.....	21
2.5. Hormônio Liberador de Gonadotrofina.....	22
2.5.1. Isoformas.....	24
2.5.2. Produção de imun contraceptivos.....	26
2.5.3. Vacinas.....	28
2.6. Subunidade B da enterotoxina termolábil de <i>Escherichia coli</i> .....	31
3. Objetivos.....	33
3.1. Objetivo geral.....	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. Metodologia.....	34
4.1. Construção e clonagem da quimera LTB/GnRH.....	34
4.2. Expressão e Caracterização.....	36
5. Resultados.....	39
6. Discussão.....	44
7. Conclusão .....	49
8. Referências .....	50

## 1. Introdução

A castração vem sendo empregada como um importante procedimento para o controle de populações selvagens e para melhorias no manejo e na qualidade da carne de animais destinados ao consumo. Entretanto, os métodos disponíveis atualmente são rejeitados pela sociedade já que ou envolvem a eliminação de diversos indivíduos ou envolvem métodos cirúrgicos que 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 quanto os métodos tradicionais. A imun contracepção tornou-se um dos principais alvos no 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). 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 associado a uma molécula carreadora capaz de estimular o sistema imune. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) vem sendo utilizada em diversos estudos como molécula carreadora para antígenos pequenos e pouco antigênicos. Ela é considerada uma potente molécula sinalizadora com capacidade de modular a resposta imune, sendo capaz de estimular resposta imune do tipo Th2 quando administrada por via sistêmica e do tipo Th1 quando administrada por via mucosa.

Neste trabalho de conclusão do curso de Graduação em Biotecnologia foi realizada a clonagem, a expressão e a caracterização de uma quimera contendo o GnRH fusionado a LTB como molécula carreadora. A quimera foi expressa utilizando a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3). A caracterização permitiu constatar que a quimera LTB/GnRH expressa preservou epítomos importantes para o reconhecimento do sistema imune.

## 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 quando visa o controle dos níveis populacionais e a eliminação de características indesejadas associados a reprodução (Delves, 2004; Ferro *et al.*, 2004b; Gupta e Bansal, 2010; Gupta *et al.*, 2011).

O grande aumento de algumas populações selvagens como, por exemplo, a de elefantes na África, gera conflito em regiões onde essas populações se sobrepõem a população humana (Gupta e Bansal, 2010; Kirkpatrick *et al.*, 2011; Naz 2011). Outro ponto preocupante é o aumento de populações selvagens que possam atuar como vetores ou reservatórios de doenças que prejudiquem tanto a saúde humana quanto a agricultura. O controle dessas populações é geralmente através da morte, resultando na eliminação de diversos indivíduos, ou cirúrgico, 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 extremamente superior quando comparados com animais inteiros e fêmeas (Zamaratskaia *et al.*, 2008). A crescente preocupação da sociedade pelo bem estar animal leva a rejeição desses métodos como forma de controle populacional (Delves, 2004; Herbert e Trigg, 2005; Zamaratskaia *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2009; Gupta e Bansal, 2010; Gupta *et al.*, 2011; Kirkpatrick *et al.*, 2011).

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). Os suínos, por exemplo, são rotineiramente castrados pelo método cirúrgico sem anestesia (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Bonneau, 2010). Esse procedimento é realizado, 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).

O odor sexual ocorre na carne de suínos machos maduros por causa da acumulação de androstenona e/ou escatol no tecido adiposo desses animais. Androstenona é um esteróide 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).

Por causa de pressões da sociedade com relação a castração cirúrgica, a União Européia em conjunto com a maioria das cadeias européias de criação de suínos se voluntariaram para acabar com essa prática até o ano de 2018 buscando novas alternativas viáveis para a substituição dessa prática como, por exemplo, a imunocastração (Kubale *et al.*, 2013).

Animais castrados pelo uso de vacinas contraceptivas apresentam peso vivo e peso de carcaça mais elevados do que animais castrados cirurgicamente, animais inteiros e fêmeas da mesma espécie (Gispert *et al.*, 2010). O percentual de gordura na região do lombo também é maior em suínos imunocastrados do que os animais inteiros. Já os níveis de gordura intramuscular e a qualidade da carne (pH e cor) de animais imunocastrados são similares as mesmas características presentes em animais inteiros (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Gispert *et al.*, 2010).

Essas características observadas em animais imunocastrados tornam a imunocastração a alternativa mais atrativa para a redução do odor sexual, para o aumento no ganho de carcaça e para o controle de comportamentos agressivos (Zamaratskaia *et al.*, 2008; Gispert *et al.*, 2010).

Pela crescente busca por contraceptivos ideais e pelas pressões exercidas pela sociedade para assegurar o bem estar animal, as vacinas contraceptivas tornam-se importantes alvos na busca por métodos de castração alternativos. Elas são capazes 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. Vacinas contraceptivas podem gerar uma inibição tanto reversível quanto irreversível da fertilidade, um atraso na maturação sexual ou um bloqueio de crescimento em tumores hormônio-dependentes (Delves, 2004; Junco *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2004b; Gupta e Bansal, 2010).

A segurança das vacinas contraceptivas deve-se ao fato de que uma grande parte das moléculas alvos dessas vacinas não apresenta reatividade cruzada com outras moléculas 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 imunoprevenção, como, por exemplo, o hormônio liberador de gonadotrofina, é mínima (Ferro *et al.*, 2001; Turkstra *et al.*, 2005). Já na utilização de hormônios que apresentam subunidades compartilhadas entre eles, como ocorre com as gonadotrofinas, são selecionadas as regiões que apresentam uma maior variação nas suas sequências para evitar 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 imunopreventivas 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 imunopreventivas é considerado um grande avanço no campo da contracepção (Naz, 2011).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), por exemplo, vem ganhando grande atenção da indústria farmacêutica devido a sua importância não só pelo seu papel na cadeia reprodutiva, mas também pela sua participação no desenvolvimento tumoral já que são encontrados altos níveis de expressão tanto do hormônio e seus receptores quanto dos esteróides 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 imunopreventivo, 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).



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).

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é sintetizado e secretado pelo hipotálamo e atua na hipófise anterior regulando a produção de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH). O LH e o FSH, por sua vez, vão atuar nos testículos e ovários levando a produção de espermatozoides e de oócitos, respectivamente (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010).

A neutralização do GnRH, LH e FSH podem interferir na produção de gametas e, portanto, inibir a fertilidade. Entretanto, o GnRH, quando utilizado para imunizar machos, também suprime a produção de testosterona. 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). Já no momento pós-fertilização, o embrião sintetiza e secreta gonadotrofina coriônica humana (hCG), a qual auxilia no resgate dos corpos lúteos e na produção de progesterona, cruciais para o estabelecimento e manutenção da gravidez. Portanto, a neutralização de hCG por meio de anticorpos pode interferir na implantação do blastocisto, resultando não manutenção da gestação (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010; Naz, 2011).

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 a proteínas da zona pelúcida (ZP) são os estudados com maior frequência e os que se encontram em um número maior de espécies. Os esteróides 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. 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 chimeras, 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).

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 células T (Munks, 2012). Um exemplo é a GonaCon™ [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, *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 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).

O hormônio é composto por uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  e uma  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é similar à encontrada em outras gonadotrofinas como o LH e o FSH. Já a subunidade  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$ -hCG. A outra abordagem leva em consideração que, se a reação cruzada acontecer, ela não deve ser prejudicial, portanto, utilizar toda a molécula  $\beta$ -hCG para atingir uma melhor capacidade de neutralização com os anticorpos gerados (Delves, 2004; Gupta e Bansal, 2010).

Purswani e Talwar (2011) fusionaram a porção C-terminal do  $\beta$ -hCG com a subunidade B da enterotoxina termolábel de *Escherichia Coli* (LTB) e utilizaram como sistema de expressão a levedura *Pichia 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 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 protéicos diméricos formados por uma subunidade  $\alpha$  comum e uma subunidade  $\beta$  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  $\alpha$  é compartilhada por outros hormônios como, por exemplo, o hCG e o hormônio tireóide estimulante (TSH), o que dificulta o desenvolvimento de vacinas contraceptivas que apresentem ambas as subunidades (Munks, 2012).

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).

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 (Martini e Nath, 2012). 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  $\alpha$  do LH de ovino foi conjugada a subunidade  $\beta$  da gonadotrofina coriônica humana e teve sua ação antitumoral em células cancerosas hCG-positivas avaliada. Anticorpos IgG de coelho anti-hCG $\beta$ -oLH $\alpha$  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 quimera 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). Esses dados 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, uma proteína da superfamília de imunoglobulina associada a 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. 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).

### 2.4. Zona pelúcida

A zona pelúcida consiste em uma matriz glicoprotéica 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 poliespermia. 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). 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). Essas proteínas são pobremente conservadas ao longo das diferentes espécies, atuando como uma barreira para impedir a fertilização entre espécies não relacionadas (Munks, 2012).

A zona pelúcida de suínos (pZP) é uma das mais estudadas em vacinas contraceptivas. Estudos em equinos mostraram a indução de uma esterilização não permanente (Levy, 2011; Munks, 2012). 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 imun contraceptivos 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 da produção de anticorpos de longa duração nas fêmeas imunizadas. Acredita-se que esse efeito tenha ocorrido, em parte, pela característica de latência do herpesvírus.

## **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 esteróides que vão regular a secreção e a síntese do GnRH no hipotálamo através de um mecanismo de feedback (Han *et al.*, 2013).

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. Esse padrão de liberação do LH e do FSH levam tanto a alterações na frequência de pulsos do GnRH quanto na ação dos esteróides 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 (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 usualmente 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 NH<sub>2</sub>) 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) sugere 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. 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  $\beta$  do LH e do FSH na hipófise; receptores LH e FSH nos testículos; e proteínas responsáveis pelo feedback realizado pelos esteróides 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 anti-tumoral 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 co-administração 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) foi 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 qual, quando utilizada para imunizar coelhos machos, resultou em atrofia testicular e involução dos túbulos seminíferos de três animais.

Já a co-administração 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 toxóides, podem levar a supressão de epítomos. Acredita-se que a supressão ocorra devido a um efeito inibitório causado pela molécula carreadora na resposta de anticorpos frente a subseqüentes administrações 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 seqüências menores derivadas de toxóides ou a ligação com proteínas conhecidas como epítomos universais 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 (Ladd *et al.*, 1990; Ferro *et al.*, 2002; Fang *et al.*, 2010).

A necessidade da aplicação de diversas dosagens 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 dosagens podem interferir no custo, no tempo e na

praticidade 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; ).

Jinshu *et al.* (2004) expressou em *E. coli* uma miniproteína 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 miniproteína 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.* desenvolveu 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 vetor do envelope do vírus japonês hemaglutinador. 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) mostrou que javalis 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 (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. 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 diversas vacinas contraceptivas contendo o GnRH como alvo de ação. Entre elas destacam-se a Vivax<sup>TM</sup> (Improvac<sup>TM</sup> – Pfizer Animal Health Ltd.) e a Bopriva<sup>TM</sup> (Pfizer Animal Health Ltd.). A Vivax<sup>TM</sup> foi a primeira vacina a ser aprovada para uso em suínos e atualmente está disponível em 63 países. Ela foi desenvolvida a partir de uma forma modificada do GnRH conjugada com o toxóide 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 Vivax™ 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 com o aumento no percentual de gordura corporal (Quiniou *et al.*, 2012).

A Bopriva™ também foi desenvolvida a partir de uma forma modificada do GnRH conjugada com o toxóide diftérico, porém, sua espécie alvo é a bovina. A diferença da Bopriva™ para a Vivax™ encontra-se na composição de adjuvantes da vacina. Além de apresentar o DEAE-dextran como adjuvante, a Bopriva™ 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) avaliou a eficácia da Bopriva™ em suínos quando comparada com a Vivax™. Foi observado que a vacina Bopriva™ conseguiu estimular resposta imune. Além disso, o tempo de eficácia da Bopriva™ foi maior quando comparado com o da Vivax™. A Bopriva™ manteve os níveis de testosterona reduzidos por até dez semanas após a segunda imunização, ao contrário da Vivax™ 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 Bopriva™. Os autores sugerem que essa maior eficácia da Bopriva™ 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 *Escherichia Coli* (LTB). Essa construção foi expressa em *Pichia pastoris* e seu potencial imunocontraceptivo foi avaliado em camundongos BALB/c machos. Os resultados mostraram que essa quimera foi capaz de gerar soroconversão nos animais imunizados, redução na concentração de espermatozoides, redução na espermatogênese, vacuolização dos túbulos seminíferos e desorganização testicular. Pelos excelentes resultados apresentados pela quimera quanto inoculada em camundongos machos, essa

construção foi utilizada como base para os experimentos desenvolvidos neste trabalho de conclusão de curso.

## **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 *Escherichia 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 compostas por duas subunidades codificadas por um óperon: 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 glicoesfingolípídeos encontrados na superfície de células de mamíferos, permitindo a entrega da subunidade A dentro das células (de Haan *et al.*, 1998; Pizza *et al.*, 2001; Hajishengallis *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 co-administrados, 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.*, 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; da Hora *et al.*, 2011); indução da expressão da molécula B7-2 (CD86) em células apresentadoras de antígenos (APCs) para subsequente sinalização co-estimulatória de células 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 células 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 Th2 quando administrada por via sistêmica (Simmons *et al.*, 2001; Hajishengallis *et al.*, 2005; Conceição *et al.*, 2006); indução de resposta imune Th1 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 células B e T CD4+ quanto um aumento na apresentação de antígenos através da ativação de células 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) fusionou 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. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Esse trabalho objetivou a obtenção de um antígeno vacinal para ser utilizado como imun contraceptivo contendo o GnRH como alvo vacinal e a LTB como molécula carreadora e adjuvante imunológico.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Clonar e expressar a quimera LTB/GnRH utilizando a bactéria *E. coli* como sistema de expressão;
- Avaliar a solubilidade da quimera LTB/GnRH;
- Caracterizar o reconhecimento da quimera por anticorpos específicos através da técnica de *Western blot*.

## 4. Metodologia

### 4.1. Construção e clonagem da quimera LTB/GnRH

As sequências de nucleotídeos referentes aos genes da LTB e do GnRH foram obtidas a partir de sequências depositadas no banco de dados GenBank (códigos S60731.1 e NM\_008145.2, respectivamente). A quimera (Fig. 1) foi construída com o auxílio do *software* VectorNTI 11 (Invitrogen) e foi sintetizada pela empresa Epoch Biolabs, Inc. (USA), contendo sítios de restrição para realizar, primeiramente, a clonagem no vetor de expressão de *Pichia pastoris* pPICZαB.

*EcoRI* LTB *KpnI* SacII **GNRH 1** **stop** *XbaI*

AGGAATTCACAAAATGGCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTTCGG  
AATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATAC  
GGAATCGATGGCAGGCAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGG  
CGCAACATTTCAGGTCTGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAA  
AAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGATCG  
AGACCAAATTGATAAATTATGTGTATGGAATCAAAAACCCCAATTCAAT  
TGC GGCAATCAGTATGAAA AAGGTACCTCGAGCCGCGCG **CAGCACTGG**  
**AGCTACGGCCTGCGTCCAGGATCCCGGTGAT**TCTAGACG

Figura 1 - Representação da construção da quimera LTB/GnRH, 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 e a região em vermelho refere-se ao códon de terminação (*Stop codon*).

Foram desenhados dois iniciadores (*primers*), o *forward primer* (5'-GCGAATTCACAAAATGGCTCCCCA-3') e o *reverse primer* (5'-CCCAAGCTTTTACCGGGATCCTGGACGC-3'), responsáveis por adicionar os sítios de restrição *EcoRI* e *HindIII* (sequência destacada com sublinhado) nas extremidades 5' e 3' da quimera, respectivamente.

Para a extração do plasmídeo contendo a sequência de interesse (LTB/GnRH) foi feito o cultivo da cepa Top 10 de *E. coli* (Invitrogen) previamente transformada com o plasmídeo pPICZαB/LTB/GnRH. Cultivou-se 1 mL da cepa armazenada em 10 mL de meio de cultura Lúria Bertani (LB) suplementado com 2,5 µL de zeocina (100 mg/µL - 1:4), incubou-se a cultura por 16h em agitador orbital à

37 °C. O método de extração utilizado foi o método de lise alcalina adaptado de Sambrook & Russel (2001).

Para a confirmação da presença do plasmídeo pPICZ $\alpha$ B/LTB/GnRH e da eficácia do processo de extração foi realizada uma amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a enzima *Taq* DNA Polymerase (Sigma-Aldrich) e com *primers* referentes às sequências AOX presentes no vetor pPICZ $\alpha$ B. A técnica teve como objetivo amplificar as sequências presentes entre as regiões AOX (*primer Forward* AOX – alpha-factor – LTB/GnRH – epítopo c-myc – cauda de histidina – *primer Reverse* AOX). A PCR foi realizada sobre as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2min; 25 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1min, anelamento dos *primers* a 55 °C por 1min e extensão a 72 °C por 1min; extensão final a 72 °C por 7min. Para confirmação da amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V por um período de 1h e 15min. O produto proveniente da PCR foi purificado através de utilização do kit comercial *NucleoSpin-Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

Logo após, foi realizado o sequenciamento do plasmídeo pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (Applied Biosystems).

Com a confirmação da presença da quimera, foi realizada a amplificação por PCR da sequência LTB/GnRH utilizando os *primers* para a clonagem em *Escherichia coli* no vetor de expressão pAE. A PCR foi realizada sobre as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 4min; 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1min, anelamento dos *Primers* a 59 °C por 1min e extensão a 72 °C por 45s; extensão final a 72 °C por 5min. Para confirmação da amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1%. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V por um período de 1h e 15min. O produto proveniente da PCR foi purificado através de utilização do kit comercial *NucleoSpin-Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

O produto da PCR e o plasmídeo pAE foram submetidos a digestão com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (BioLabs). Para cada enzima, as digestões foram incubadas

por 16h a 37 °C e ambas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da digestão.

Tanto o plasmídeo quanto o inserto foram submetidos ao processo de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Ludwig) utilizando a proporção molar de inserto:vetor de 5:1 como indicado pelo fabricante. Para confirmação da ligação, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%.

Após a confirmação da ligação, a construção pAE/LTB/GnRH foi utilizada para a transformação da cepa de *E. coli* Top 10 pela técnica de choque térmico adaptado de Sambrook & Russel (2001). Essa técnica consiste em selecionar uma colônia isolada da cepa de um cultivo em LB-ágar e adicioná-la em 100 µL de solução CaCl<sub>2</sub> 100mM na presença de 1 µL do produto da ligação. Em seguida, a amostra é incubada em gelo por 15min, é realizada uma mudança brusca de temperatura para 42 °C por 1min e, logo após, é realizada outra mudança de temperatura com incubação em gelo por 2min. As transformações foram cultivadas em meio LB-ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina por 16h em estufa a 37 °C. A seleção dos clones recombinantes foi efetuada através da técnica de extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, denominada *MicroPrep* (Jouglard *et al.*, 2002). A análise dos possíveis clones recombinantes foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%. Apenas um clone recombinante foi selecionado e cultivado em 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina por 16h a 37 °C sob agitação de 150 rpm. A extração de plasmídeo do clone selecionado foi realizada pelo método de lise alcalina adaptado de Sambrook & Russel (2001). Para a confirmação do clone recombinante, foi realizada a técnica de PCR utilizando *primers* específicos para quimera a partir do produto da extração.

## 4.2. Expressão e Caracterização

Após a confirmação, o plasmídeo foi utilizado para transformar, pela técnica de choque térmico (Sambrook e Russel, 2001), a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3), como descrito anteriormente. O produto da transformação foi cultivado em 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O pré-inóculo foi incubado por 16h sob agitação de 150 rpm a 37 °C.

A partir do pré-inóculo foi coletado 1 mL de cultivo, o qual foi adicionado em 10 mL de meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O inóculo foi

incubado a 37 °C em agitador orbital a 150 rpm até atingir a densidade óptica referente a metade da fase *log* ( $DO_{600} = 0,5-0,8$ ). Nesse momento, uma amostra de 1 mL do cultivo foi coletada para posterior análise de expressão. Quando o cultivo atingiu a DO ideal, a expressão foi induzida com a adição de isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 1mM. O cultivo permaneceu sob agitação de 150 rpm por um período de 3 h a 37 °C. Após o final da indução, uma amostra do cultivo foi coletada para posterior análise de expressão.

Para análise da expressão, as amostras coletadas foram centrifugadas a 16000 x g por 2 min, foram suspendidas em tampão PBS (*phosphate buffered saline*) e foi adicionado o tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%.

Para a expressão em maior escala, o produto da transformação foi cultivado em 25 mL de meio LB líquido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubado por 16h sob agitação de 150 rpm a 37 °C.

O pré-inóculo foi adicionado em 475 mL de meio LB líquido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. O inóculo foi incubado a 37 °C sob agitação a 150 rpm até atingir a  $DO_{600} = 0,5-0,8$ . Quando o cultivo atingiu a DO ideal, a expressão foi induzida com a adição de IPTG para uma concentração final de 1mM. O cultivo permaneceu sob agitação de 150 rpm por um período de 3h a 37 °C.

Após o termino da indução, o cultivo foi centrifugado a 15000 g por 15min (4 °C) e o *pellet* resultante foi suspenso em 20 mL de tampão de lise ( $NaH_2PO_4$  0,2M; NaCl 0,5M; Imidazole 10mM) com 20  $\mu$ L de lisozima (100 mg/ $\mu$ L) e incubado por 2h 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 15s. O processo de centrifugação foi realizado como descrito anteriormente. O sobrenadante foi armazenado e o *pellet* resultante foi suspenso em PBS-Triton X-100, permaneceu sob agitação por 1h a 4 °C e foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. Esse processo de lavagem foi repetido 2 vezes. O *pellet* resultante foi suspenso em tampão de solubilização ( $NaH_2PO_4$  0,2M; NaCl 0,5M; Imidazole 10mM; Ureia 8M) e incubado a 4 °C por 24h. O processo de centrifugação foi realizado como descrito anteriormente, o sobrenadante foi armazenado e o *pellet* descartado. Todas as amostras armazenadas foram avaliadas por SDS-PAGE 12%.

Para a amostra em tampão de solubilização foi realizado uma etapa de diálise para a diminuição da concentração de ureia. Nessa etapa, a cada 16h, a amostra era submetida à troca do tampão de solubilização contendo a mesma concentração de ureia da amostra por outro com a metade dessa concentração.

Para caracterização da quimera LTB/GnRH foi realizada a técnica de *Western blot*, na qual foram utilizados anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (reconhece a cauda composta por 6 histidinas), anticorpo policlonal de coelho anti-toxina colérica (utilizado devido a alta homologia entre a toxina colérica e a enterotoxina termolábil de *E. coli*) e anticorpo anti-GnRH (proveniente de soro de coelhos imunizados com vacina comercial e capaz de reconhecer o hormônio GnRH). A técnica de SDS-PAGE 12% foi realizado contendo o marcador de peso molecular (*PageRuler Prestained Protein Ladder* – Thermo Scientific), a quimera LTB/GnRH e o extrato bruto da cepa *E. coli* BL21 Star (DE3) como controle negativo, sendo as duas últimas aplicadas 3 vezes. As proteínas presentes no gel foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad). Para o bloqueio foi utilizada uma solução de PBS-T (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 3 tiras cada uma contendo uma amostra da quimera e um controle negativo. Cada tira foi incubada, por 1h a temperatura ambiente, com um anticorpo específico: anti-6xHis diluído 1:5000, anti-CT 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 1h a temperatura ambiente, ou com soro anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase (tiras anteriormente incubadas com anti-CT e anti-GnRH) diluído 1:4000 ou com soro anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase (tira anteriormente incubada com anti-6xHis) diluído 1:4000. Após 3 lavagens com PBS-T, as tiras foram reveladas com solução de diaminobenzidina (DAB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 5. Resultados

A PCR da sequência referente à quimera LTB/GnRH utilizando os *Primers* AOX resultou na amplificação de um fragmento de 910 pb (pares de bases), conforme o esperado (Fig. 2A). Após a amplificação da região entre os sítios de anelamento dos *Primers* AOX, uma nova PCR utilizando o produto da reação anterior e os *Primers* desenhados para a região da quimera resultou em um fragmento de 391 pb (Fig. 2B).

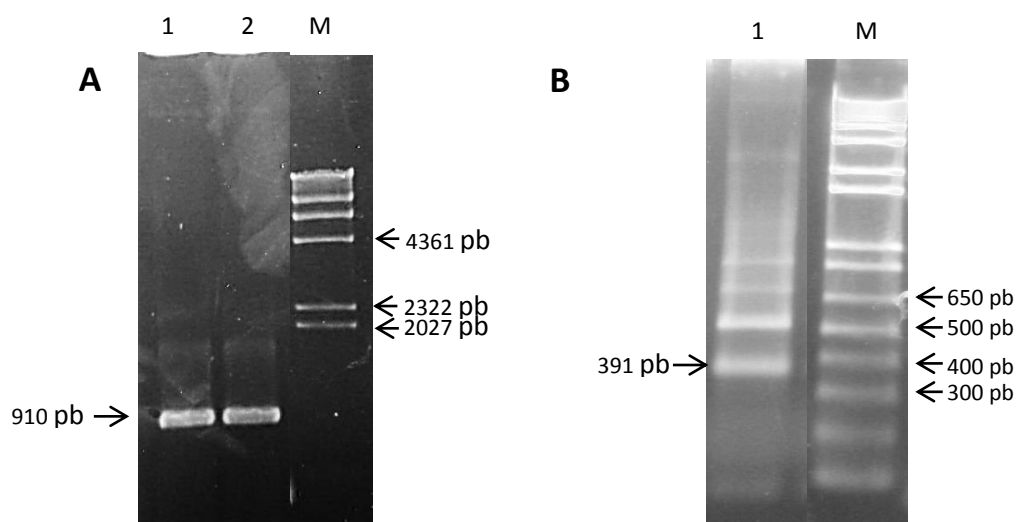


Figura 2 – Imagens referentes às análises dos produtos das amplificações em gel de agarose 1%. (A) Amplificação com *Primers* AOX. 1-2) Amplificação da região entre os *Primers* AOX, tamanho aproximado de 910 pb. M) Marcador de peso molecular *Lambda DNA-HindIII Digest* (Invitrogen). (B) Amplificação com *Primers* específicos para a quimera. 1) Amplificação da quimera LTB/GnRH, tamanho aproximado de 391 pb. M) Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen).

O inserto e o plasmídeo pAE foram digeridos pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Após a purificação de ambos, o processo de ligação foi realizado, resultando na geração do vetor recombinante pAE/LTB/GnRH com o tamanho de 3195 pb esperado para a construção (Fig. 3).



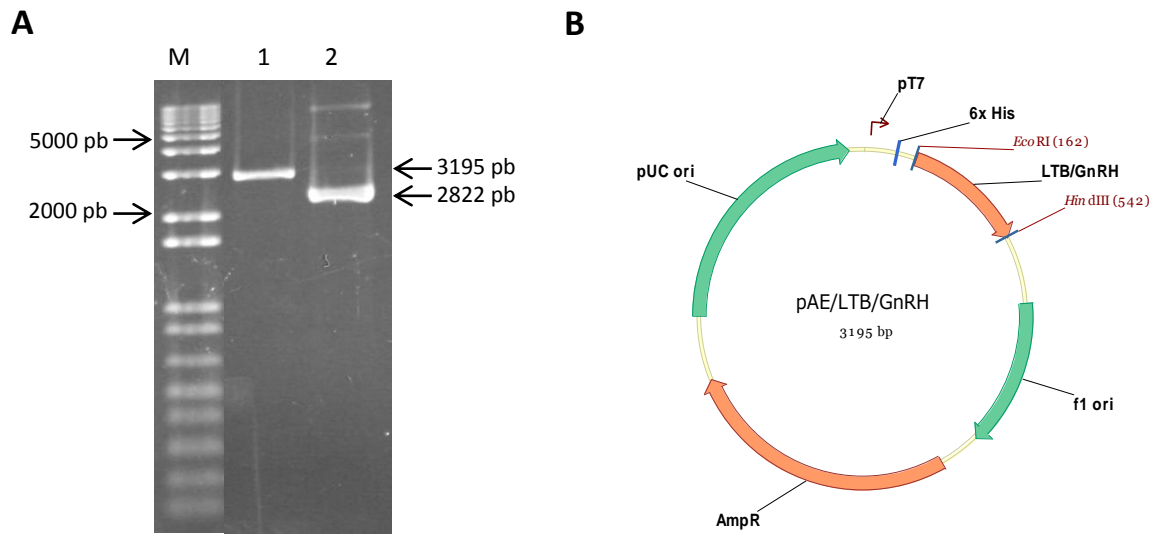


Figura 3 – Imagem referente ao processo de ligação do gene LTB/GnRH ao vetor pAE. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% com o resultado da ligação da quimera LTB/GnRH ao vetor pAE. M) Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen). 1) Produto da ligação pAE/LTB/GnRH, tamanho aproximado de 3195 pb. 2) Amostra do plasmídeo pAE, tamanho aproximado de 2822 pb. (B) Representação gráfica da quimera ligada ao vetor obtida através do *software* VectorNTI 11.

Após a confirmação da ligação, foi realizada uma seleção das colônias que cresceram em meio LB-agar a partir do cultivo da cepa de *E. coli* Top 10 proveniente da transformação por choque térmico com o vetor pAE/LTB/GnRH. As colônias selecionadas foram submetidas à triagem pela técnica de *MiniPrep* e foram analisadas através da eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 4). O clone que apresentou um tamanho de banda maior, supostamente devido ao tamanho do inserto presente no vetor, foi selecionado e, após a caracterização por PCR, teve a presença do inserto confirmada (Fig. 4).

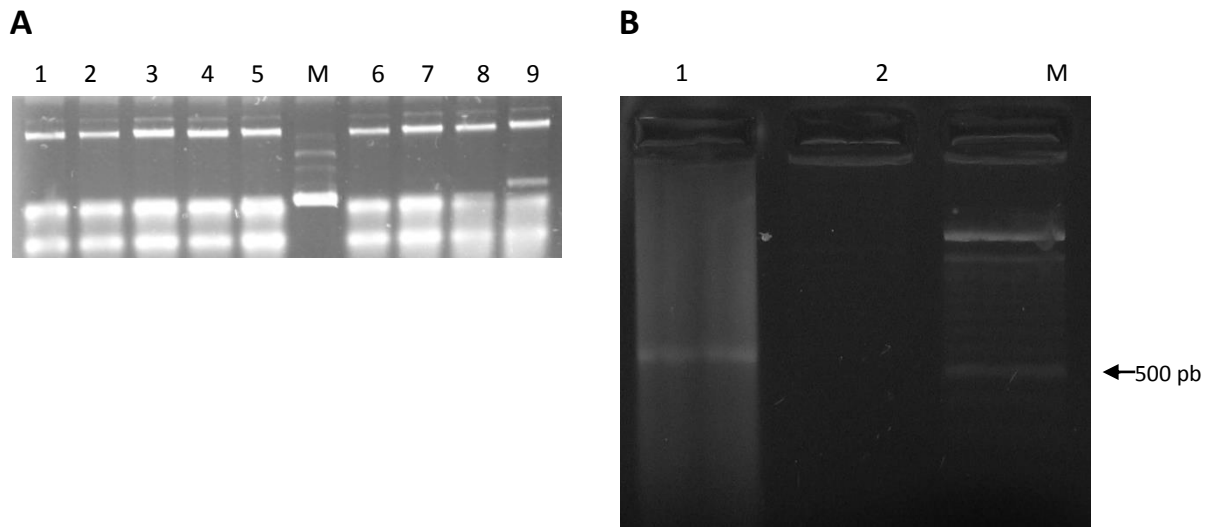


Figura 4 – Imagem referente ao processo de triagem de clones recombinantes. (A) Análise em gel de agarose 1% da triagem realizada pela técnica de *MiniPrep*. 1-8) Colônias de 1 a 8 sem inserto. 9) Colônia 9, possível colônia com inserto LTB/GnRH. M) Plasmídeo pAE purificado (2822 pb). B) PCR de confirmação da presença do inserto na colônia 9 em gel de agarose 1%. 1) PCR da colônia 9 com. 2) Controle negativo da PCR – reação sem DNA. M) Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen).

Através das avaliações feitas por SDS-PAGE utilizando gel de 15% é possível observar que a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foi capaz de expressar a químera LTB/GnRH, de aproximadamente 15 kDa, antes mesmo da indução da expressão com IPTG (Fig. 5). As etapas de lavagem foram capazes de remover uma parte das proteínas nativas de *E. coli* e foi possível constatar que, mesmo após essas etapas, a químera ainda se encontrava no *pellet* na forma de corpos de inclusão insolúveis (Fig. 5).

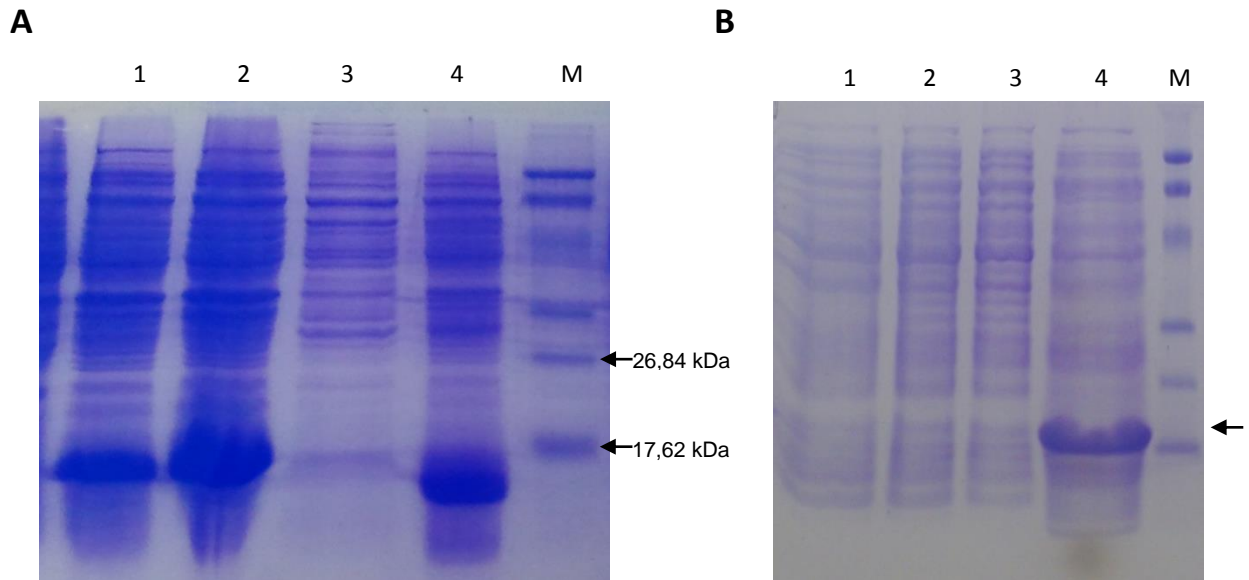


Figura 5 – Imagens referentes às análises de expressão e de obtenção da quimera LTB/GnRH em SDS-PAGE 15%. (A) Avaliação da expressão da quimera na cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3). 1) Amostra do cultivo da expressão LTB/GnRH não induzido com IPTG. 2) Amostra do cultivo da expressão LTB/GnRH após indução com IPTG. 3) Cepa selvagem de *E. coli* BL21 Star™ (DE3). 4) Amostra da expressão de LTB na cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3). M) Marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad). (B) Avaliação dos processos de lavagem e solubilização da quimera. 1) Amostra referente a primeira etapa de lavagem. 2) Amostra referente a segunda etapa de lavagem. 3) Amostra referente a terceira etapa de lavagem. 4) Amostras obtidas após centrifugação com tampão de solubilização. M) Marcador *Prestained SDS-PAGE Standards Low Range* (Bio-Rad).

A quimera LTB/GnRH teve sua antigenicidade avaliada através da técnica de *Western blot*, com anticorpos específicos capazes de reconhecer a região da LTB, a região do GnRH e a cauda de histidina adicionada pelo vetor pAE (Fig. 6). Foi possível constatar que o *Western blot* teve resultados positivos para a quimera LTB/GnRH independente do anticorpo primário utilizado (ou anti-6xHis ou anti-CT ou anti-GnRH). A quimera apresentou massa molecular de aproximadamente 15 kDa. Além disso, nenhum anticorpo foi capaz de reconhecer o controle negativo, o extrato da cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3).

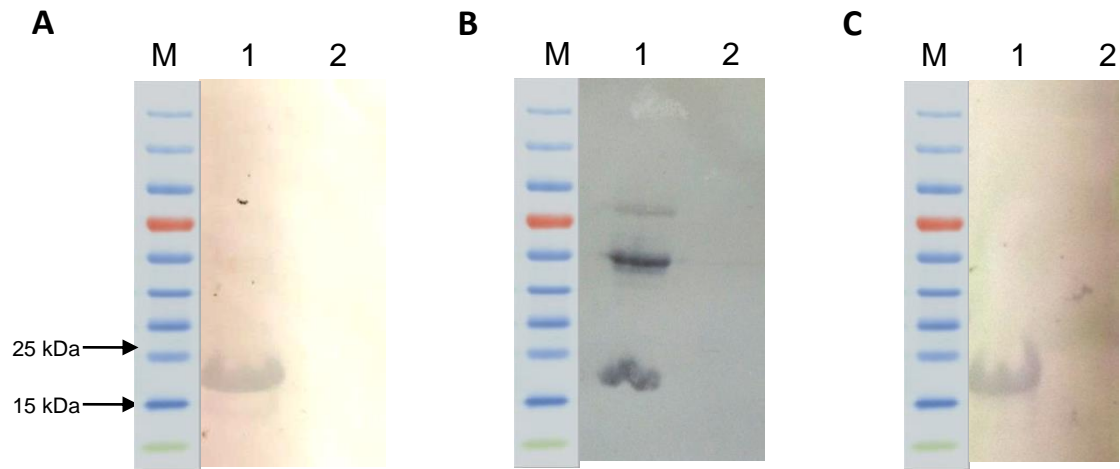


Figura 6 – Imagens referentes caracterização da quimera LTB/GnRH pela técnica de *Western blot* com anticorpos específicos para cada região da quimera. (A) Anti-CT. (B) Anti-GnRH. (C) Anti-6xHis. M) Marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific). 1) Quimera LTB/GnRH. 2) Controle negativo – cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3).

## 6. Discussão

A aplicação de hormônios como antígenos do desenvolvimento de vacinas imun contraceptivas é proposta como uma proeminente alternativa que satisfaz a maioria, senão todas, características de um contraceptivo ideal. As vacinas contraceptivas são consideradas um grande avanço no campo da contracepção já que apresentam propriedades como: a alta especificidade ao alvo de interesse, um longo período de ação, um baixo custo de produção e poucos efeitos adversos (Naz, 2011).

O hormônio liberador de gonadotrofina é responsável por desencadear a cascata hormonal da reprodução de mamíferos (Thompson, 2000; Clarke e Pompolo, 2005; Jinshu *et al.*, 2005; Millar, 2005; Song *et al.*, 2012). Suas principais funções são a estimulação da biossíntese e a liberação do hormônio luteinizante e do hormônio folículo estimulante na hipófise, promovendo, assim, a maturação dos folículos ovarianos em fêmeas e a espermatogênese em machos (Jinshu *et al.*, 2005; Millar, 2005; Song *et al.*, 2012).

Mesmo sendo considerado um excelente alvo imun contraceptivo, o GnRH apresenta uma baixa imunogenicidade já que é um decapeptídeo próprio do organismo de mamíferos. Esse motivo torna necessária a utilização de estratégias capazes de estimular o sistema imune como, por exemplo, a fusão do hormônio com uma molécula carreadora (Thompson, 2000; Ferro *et al.*, 2004<sup>a</sup>; Herbert e Trigg, 2005; Jinshu *et al.*, 2005).

A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* é um exemplo de molécula carreadora capaz de amplificar a resposta imune de moléculas pouco imunogênicas (de Haan *et al.*, 1998; Conceição *et al.*, 2006; Reed *et al.*, 2008; Mbow *et al.*, 2010; da Hora *et al.*, 2011). Seu efeito imun estimulatório é relacionado com diversas funções sendo que a melhor caracterizada é a capacidade de induzir IgA secretora específica e de estimular a produção de IgG e IgA sérica para antígenos co-administrados (Yamamoto *et al.*, 2001).

No presente estudo, nós produzimos a quimera LTB/GnRH composta pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* como molécula carreadora e o hormônio liberador de gonadotrofina como antígeno de interesse.

A presença do gene LTB/GnRH no plasmídeo pPICZαB foi confirmada pelo sequenciamento. Com isso, a quimera foi subclonada no vetor de expressão de *E. coli* (pAE). O vetor pAE possibilita a fusão da proteína de interesse a uma cauda com 6 aminoácidos histidinas, a qual permite o reconhecimento da quimera através da técnica de *Western blot* por MAb anti-6xHis e possibilitará a purificação em coluna de níquel.

A ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Ludwig) do gene LTB/GnRH ao plasmídeo pAE foi confirmada pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1% através da comparação do produto da ligação (tamanho aproximado de 3195 pb) com o plasmídeo pAE (tamanho aproximado de 2822 pb).

Para a obtenção de clones recombinantes, o produto da ligação foi utilizado na técnica de transformação por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001) da cepa *E. coli* Top 10. A seleção dos possíveis clones recombinantes foi efetuada através da técnica de *MicroPrep* (Jouglard *et al.*, 2002) e a análise em gel de agarose 1% permitiu a identificação de um possível clone recombinante, o qual teve a presença do gene LTB/GnRH confirmada pela técnica de PCR.

Para a expressão da quimera foi selecionada a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3). Essa cepa apresenta uma cópia do gene *rne* (*rne131*) mutada, a qual codifica para um polipeptídeo estável, porém sem a presença dos últimos 477 resíduos da RnaseE. A enzima RnaseE é responsável tanto pela maturação do 5S rRNA quanto pela clivagem endonucleolítica e subsequente degradação do mRNA. Por apresentar o gene *rne* mutado, a enzima codificada pela cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3) se encontra numa conformação truncada e perde a habilidade de degradar mRNA, aumentando a estabilidade do mesmo e permitindo uma maior expressão de proteínas. Entretanto, mantém a capacidade de maturação do rRNA e não afeta o crescimento termosensível da célula. Além disso, essa cepa é B/r e não contém a protease *lon* nem a protease de membrana externa (OmpT), permitindo a redução da degradação de proteínas heterólogas (Kido *et al.*, 1996; Grunberg-Manago, 1999; Lopez *et al.*, 1999). Esse sistema de expressão mostrou-se muito eficiente já que foi capaz de proporcionar a expressão da proteína recombinante.

A quimera expressa apresentou-se na forma insolúvel, formando corpos de inclusão, o que tornou necessária a utilização de um agente desnaturante para a solubilização dos mesmos. Para esse processo foi utilizado um tampão de solubilização com 8M de ureia, responsável pela desnaturação completa da proteína

através da interrupção das interações moleculares levando a perda da estrutura tridimensional. Para a remoção da ureia e para possibilitar o retorno da quimera a sua estrutura inicial, foi necessária a realização de técnica de diálise. Entretanto, a quimera pode ter sofrido uma alteração muito drástica com o processo de solubilização e pode não conseguir retornar a sua estrutura inicial, perdendo assim diversos epítomos importantes (Sambrook e Russel, 2001).

A caracterização antigênica da proteína foi realizada utilizando anticorpos específicos das regiões da LTB, do GnRH e da cauda de 6xHis. Demonstrou-se que os epítomos da proteína foram reconhecidos. Portanto, a fusão da LTB ao GnRH preservou epítomos essenciais para o reconhecimento do sistema imune. Além disso, foi possível constatar que o processo de diálise permitiu que a quimera retornasse a sua conformação original.

Nesse estudo nós mostramos que a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3) foi capaz de produzir a proteína heteróloga e que a quimera LTB/GnRH expressa preservou as características antigênicas de ambas as proteínas constituintes da quimera permitindo seu reconhecimento por anticorpos específicos.

Nosso grupo havia demonstrado anteriormente que a fusão da LTB com proteína ROP<sup>2</sup> de *Neospora caninum* não prejudicou a antigenicidade da quimera e que a cepa de expressão *E. coli* BL21 Star™ (DE3) é eficiente em relação à quantidade de proteína recombinante obtida (Santos Junior, 2013).

A utilização da LTB como molécula carreadora em vacinas contraceptivas foi avaliada por Purswani e Talwar (2011). Os autores fusionaram a LTB com o hCG $\beta$  e utilizaram a levedura *Pichia pastoris* como sistema de expressão. Essa formulação foi desenvolvida para substituir um imun contraceptivo anteriormente desenvolvido por Talwar *et al.* (1976), o qual foi ligado quimicamente ao toxóide tetânico (TT) e foi capaz de induzir anticorpos contra a hCG $\beta$ . Entretanto, quando avaliado em testes clínicos de fase II, essa formulação induziu a produção de anticorpos neutralizantes contra o hCG $\beta$  em apenas 80% das mulheres voluntárias no estudo mesmo após subsequentes inoculações da vacina. Esse fato foi relacionado com a imunossupressão induzida pelo carreador TT utilizado após repetidas imunizações. A escolha de substituir esse carreador pela LTB tem como objetivo evitar a imunossupressão causada por subsequentes imunizações. Além disso, a LTB é considerada um potente antígeno para indução de resposta imune tanto por via

mucosa quanto por via sistêmica. A LTB é capaz de ativar diretamente as células B permitindo superar a autotolerância natural ao hCG $\beta$ .

A LTB pode possibilitar a formulação de um imun contraceptivo livre de adjuvantes adicionais ou o desenvolvimento de uma formulação contendo adjuvantes que apresentem uma menor reatogenicidade. Jinshu *et al.* (2005) mostrou que apenas a conjugação da proteína de choque térmico 65 (Hsp65) de *Mycobacterium bovis* a uma miniproteína contendo o GnRH foi capaz de estimular a produção de anticorpos específicos anti-GnRH e estimular títulos de anticorpos compatíveis com os estimulados pela mesma miniproteína na presença do adjuvante completo de Freund. O poderoso efeito estimulador da Hsp65 sem a incorporação de adjuvantes adicionais já havia sido demonstrado em outros estudos (Barrios *et al.*, 1992; Barrios *et al.*, 1994; Lussow *et al.*, 1991; Perraut *et al.*, 1993).

Alguns relatos na literatura também apontam a capacidade da LTB de estimular uma resposta imune protetora sem a adição de adjuvantes complementares (Chia *et al.*, 2011; Hur e Lee, 2011; Rock *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2012). Rock *et al.* (1996) mostrou que a fusão da LTB com o peptídeo carboxi-terminal (CTP) da hCG $\beta$  foi capaz de induzir anticorpos específicos contra o hCG em camundongos sem a utilização de outros adjuvantes. Para avaliar essa possível capacidade da LTB de induzir uma resposta imune anti-GnRH sem a complementação com outros adjuvantes serão realizados testes em animais de experimentação avaliando a resposta imune induzida frente a diferentes formulações da vacina.

Além da vantagem oferecida pela fusão com a LTB, a quimera obtida pode ser utilizada para imunizar diversas espécies de animais contra a colibacilose, infecção causada por cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli*. Kemp (2011) desenvolveu uma vacina recombinante de *Salmonella choleraesuis* cepa 54 avirulenta (rSC54) capaz de expressar uma quimera multimérica de GnRH. Suínos domésticos são protegidos contra a salmonelose através da administração oral da vacina produzida com a cepa 54 não virulenta. Administrando o vetor rSC54 por via oral, camundongos foram capazes de induzir uma resposta de anticorpos anti-GnRH e inibir a produção de LH e FSH. Isso ocorre uma vez que a bactéria é capaz de expressar e expor para o tecido linfóide associado à mucosa (MALT) a quimera contendo o GnRH.



A quimera LTB/GnRH tem potencial para ser utilizada tanto como imun contraceptivo quanto como proteção contra a colibacilose. Diversos estudos relatam que o uso de cepas de *Escherichia coli* não enterotoxigênicas ou de cepas atenuadas através da engenharia genética é capaz de estimular uma imunidade protetora contra cepas enterotoxigênicas de *E. coli* (Harro *et al.*, 2011; Janjatovic *et al.*, 2010; Ruan e Zhang, 2013). O plasmídeo obtido neste trabalho de conclusão de curso pode vir a ser utilizado na transformação de uma cepa não enterotoxigênica ou atenuada de *Escherichia coli* para a produção de uma vacina de uso contraceptivo e de proteção contra a colibacilose.

## 7. Conclusão

No presente estudo foi realizada a clonagem e a expressão de uma quimera contendo a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* e o Hormônio Liberador de Gonadotrofina. Foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) como sistema de expressão. Nas condições de cultivo utilizadas no estudo, essa cepa foi capaz de expressar quantidades significativas da proteína.

Foi possível observar, através da caracterização antigênica pela técnica de *Western blot*, que a fusão das duas proteínas e os métodos de obtenção da quimera permitiram a conservação de epítomos antigênicos importantes para a estimulação de uma resposta imune neutralizante.

Estudos futuros utilizando animais de experimentação serão realizados para avaliar se a quimera LTB/GnRH expressa é capaz de induzir uma resposta imune contra o hormônio liberador de gonadotrofina e interromper a cascata reprodutiva levando a castração imunológica. Caso esse efeito seja alcançado, a quimera tem potencial para ser a primeira vacina contraceptiva desenvolvida no país tendo o GnRH como molécula alvo.

## 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.; WOROBEK, 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.

BARRIOS, C.; LUSSOW, A. R.; VAN EMBDEN, J.; VAN DER ZEE, R.; RAPPUOLI, R.; COSTANTINO, P.; LOUIS, J. A.; LAMBERT, P. H.; DEL GIUDICE, G. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. Part II: The use of the 70-kDa mycobacterial heat-shock protein as carrier for conjugated vaccines can circumvent the need for adjuvants and Bacillus Calmette Guérin priming. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 1365-1372, 1992.

BARRIOS, C.; TOUGNE, C.; POLLAR, B. S.; LAMBERT, P. H.; DEL GIUDICE, G. Specificity of antibodies induced after immunization of mice with the mycobacterial heat shock protein of 65 kD. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 98, p. 224-228, 1994.

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. 27, p. 173-184, 1974.

BONNEAU, M. Accessory sex glands as a tool to measure the efficacy of immunocastration in male pigs. **Animal**, v. 4, p. 930-932, 2010.

CHIA, M.; HSIAO, S.; CHAN, H.; DO, Y.; HUANG, P.; CHANG, H.; TSAI, Y.; LIN, C.; PANG, V. F.; JENG, C. Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and

respiratory syndrome virus and B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in pigs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, p. 215-225, 2011.

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.; HEARN, A. R.; RIVETT, J.; HIRST, T. R. Enhanced delivery of exogenous peptides into the class I antigen processing and presentation pathway. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3249-3258, 2002.

De HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I. K.; HOLTROP, M.; HOL, W. G. J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of G<sub>M1</sub> 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.

DUNSHEA, F. R.; COLANTONI, C.; HOWARD, K.; McCAULEY, I.; JACKSON, P.; LONG, K. A.; LOPATICKI, 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.; LUNDSTROM, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Short- and long-term effects of immunization against gonadotrophin-releasing hormone, using Improvac<sup>TM</sup>, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs. **Theriogenology**, v. 71, p. 302-310, 2009.

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.

FANG, F.; YANG, Y.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; TAO, Y.; WANG, S.; PU, Y.; ZHANG, X. Immunization of male mice with a new recombinant GnRH fusion protein reduces the testicular function. **Agricultural Science in China**, v. 8, p. 380-385, 2009.

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.

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.

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.

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.

GRUNBERG-MANAGO, M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. **Annual Review of Genetics**, v. 33, p. 193-227, 1999.

GUPTA, S. K.; BANSAL, 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 pellucida glycoproteins for dogs and other wildlife population management. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, P. 51-62, 2011.

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.

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.

HARRO, C.; SACK, D.; BOURGEOIS, A. L.; WALKER, R.; DeNEARING, B.; FELLER, A.; CHAKRABORTY, S.; BUCHWALDT, C.; DARSLEY, M. J. A combination vaccine consisting of three live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing a range of colonization factors and heat-labile toxin subunit B is well tolerated and immunogenic in a placebo-controlled double-blind phase I trial in healthy adults. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 2118-2127, 2011.

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.

HUR, J.; LEE, J. H. Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, p. 203-209, 2011.

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<sup>+</sup> 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 $\beta$  and oLH $\alpha$  for inhibition of the growth of hCG $\beta$ -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.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; DA CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, v. 71, p. 234, 2002.

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.

KEMP, J. M. Mucosal immunization of mice with a recombinant *Salmonella choleraesuis* that expresses a multimeric gonadotropin releasing hormone fusion protein. 2011. Tese (PhD em Ciências Biomédicas) departamento de Ciências Biomédicas, Colorado State University, Fort Collins.

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.

KIDO, M.; YAMANAKA, K.; MITANI, T.; NIKI, H.; OGURA, T.; HIRAGA, S. RNase E polypeptides lacking a carboxyl-terminal half suppress a mukB mutation in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 3917-3925, 1996.

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.

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-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.; GROOTENHUIS, 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.
- 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.
- 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.
- LOPEZ, P. J.; MARCHAND, I.; JOYCE, S. A.; DREYFUS, M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 188-199, 1999.
- 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.
- LUSSOW, A. R.; BARRIOS, C.; VAN EMBDEN, J.; VAN DER ZEE, R.; VERDINI, A. S.; PESSI, A.; LOUIS, J. A.; LAMBERT, P. H.; DEL GIUDICE, G. Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. **European Journal of Immunology**, v. 21, p. 2297-2302, 1991.
- 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.
- McNAMARA, M. K. Immunogenic LHRH compositions and methods relating thereto. Número do pedido: CA 2294865. CSL Limited.

- MELOEN, 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.
- 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 GM<sub>1</sub> in antigen presentation: binding enhances presentation of *Escherichia coli* enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4<sup>+</sup> 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. 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 *Pichia 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.

PERRAUT, R.; LUSSOW, A. R.; GAVOILLE, S.; GARRAUD, O.; MATILE, H.; TOUGNE, C.; van EMBDEN, J.; van der ZEE, R.; LAMBERT, P. H.; GYSIN, J.; DEL GIUDICE, G. Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 93, p. 382-386, 1993.

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.

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.

RUAN, X.; ZHANG, W. Oral immunization of a live attenuated *Escherichia coli* strain expressing a holotoxin-structured adhesion-toxoid fusion (1FaeG-FedF-LT<sub>A2</sub>:5LT<sub>B</sub>) protected young pigs against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) infection. **Vaccine**, v. 31, p. 1458-1463, 2013.

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.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS JUNIOR, A. G. Produção de quimera roptria 2 de *Neospora caninum* com a porção B da toxina termo lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (rROP<sup>2</sup>/LTB) como imunobiológico. 2013. Tese (mestrado em ciências) Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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.

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.

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  $\beta$  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.

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.

WALKER, J. Improved saponin adjuvant compositions and methods relating thereto. Número do pedido: CA 2359111. CSL Limited.

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.

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 (Improvac™) os steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 351-359, 2008.

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, C.; WANG, S.; HU, S.; YU, M.; ZENG, Y.; ZENG, Y.; YOU, X.; XIAO, J.; WU, Y. Protective efficacy of a *Mycoplasma pneumoniae* P1C DNA vaccine fused with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, p. 802-810, 2012.

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.