

## AVALIAÇÃO DE UMA VACINA IMUNOCONTRACEPTIVA CONTRA GnRH EM BOVINOS

**ILANA MAZZOLENI**<sup>1</sup>; **VITÓRIA CASHTOR**<sup>2</sup>; **PEDRO M. M. DE ALBUQUERQUE**<sup>3</sup>;  
**RODRIGO CASQUERO CUNHA**<sup>4</sup>; **NEIDA CONRAD**<sup>5</sup>; **FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE**<sup>6</sup>

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas - ilana.mazzoleni@gmail.com;*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas - vitoriacatschor@gmail.com;*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas - albuquerque95pedro@gmail.com;*

<sup>4</sup>*Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha\_vet@hotmail.com;*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – conradneida@gmail.com;*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com; fabio\_leite@ufpel.edu.br*

### 1. INTRODUÇÃO

A castração é 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 envolvem métodos cirúrgicos que podem gerar dor excessiva e complicações pós-operatórias (SIEL et al., 2016), tornando relevante o desenvolvimento de métodos de castração não cirúrgicos. 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 (JUNCO et al., 2007; GUPTA e BANSAL, 2010).

Um dos principais alvos para o desenvolvimento de vacinas imunocontraceptivas é o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Trata-se de um decapeptídeo hipotalâmico responsável por fornecer o estímulo primário para o eixo reprodutivo de mamíferos machos e fêmeas. A imunização ativa contra o GnRH neutraliza o GnRH endógeno, criando uma barreira imunológica entre o hipotálamo e a glândula pituitária anterior, impedindo a ligação do GnRH com seus receptores da gonadotrofina hipofisária. Esse processo leva à supressão da secreção de gonadotrofinas, inibindo, assim, a esteroidogênese e a gametogênese (HERBERT e TRIGG 2005; HAN et al., 2016).

Um obstáculo para o desenvolvimento de imunoprotectivos anti-GnRH é a baixa imunogenicidade da molécula. O uso de adjuvantes, a associação com moléculas transportadoras e a conjugação de várias cópias de hormônios são estratégias promissoras para aumentar a imunogenicidade do alvo (FERRO et al., 2004). A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) foi avaliada como um adjuvante molecular (CONCEIÇÃO et al., 2006) e é caracterizado como uma molécula de sinalização potente com a capacidade de estimular uma forte resposta sistêmica e uma resposta secretora de anticorpos IgA contra抗ígenos co-administrados ou acoplados (YAMAMOTO et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2006). A atividade adjuvante do LTB está diretamente relacionada à sua atividade de ligação aos gangliosídeos GM1 (NASHAR et al., 2001). LTB recombinante fundido com抗ígenos recombinantes pode representar uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de novas estratégias de imunocontracepção.

O objetivo deste estudo foi avaliar a antigenicidade e o potencial imunogênico de uma quimera contendo o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) e a subunidade B da enterotoxina termolábil (LTB) de *Escherichia coli* em bovinos visando o desenvolvimento de novas vacinas imunocontraceptivas.

## 2. METODOLOGIA

A sequência GnRH/LTB foi clonada no vetor pAE (RAMOS et al., 2004) e o plasmídeo recombinante pAE/GnRH/LTB foi transformado, através de choque térmico, em células de *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3). A expressão da proteína recombinante GnRH/LTB foi realizada conforme descrito por Gil et al (2013). A proteína recombinante foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando coluna carregada com níquel (1 ml HisTrap<sup>TM</sup>) em sistema de cromatografia automatizado (GE Healthcare). A expressão e purificação de rGnRH/LTB foram verificadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e caracterizada através de *Western blot* utilizando anticorpos anti-GnRH (1.400) e anti-CT (1.5000). A concentração da proteína foi determinada através de curva de BCA, utilizando BCA Protein Assay kit (GE Healthcare).

Neste estudo, a imunogenicidade da proteína rGnRH/LTB foi avaliada em vacas. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, contendo 8 em cada. O grupo 1 foi vacinado com 150 µg de rGnRH/LTB adicionado de Montanide (Sigma) e o grupo 2, controle, foi inoculado com solução salina fosfatada (PBS) acrescida de Montanide. Os animais foram vacinados via intramuscular, nos dias 0 e 28. Foram realizadas coletas de sangue a partir da veia jugular, a cada 7 dias, até o final do experimento (dia 56). Os animais tiveram o ganho de massa monitorado durante todo o experimento.

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEA 1039).

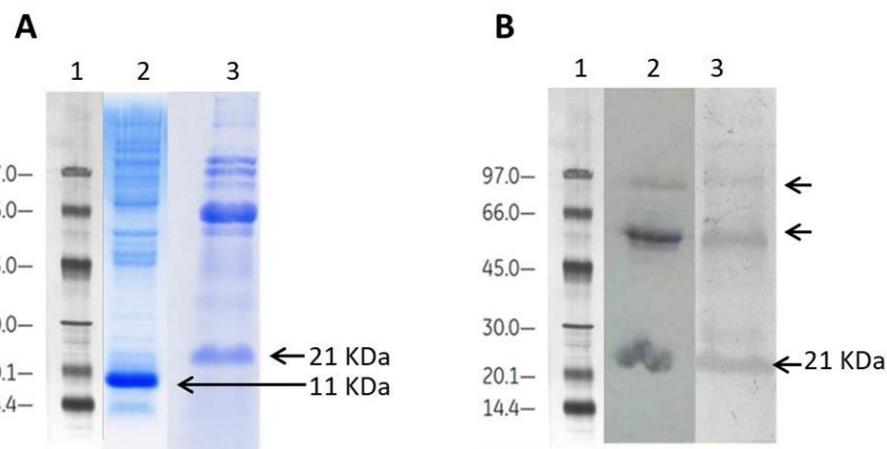
A avaliação da resposta imune humoral foi verificada através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Placas de 96 cavidades foram revestidas com 100 ng / cavidade de rGnRH/LTB diluídas em tampão carbonato bicarbonato (pH 8,0) e incubadas por 16 h a 4 °C. Os soros foram diluídos (1:200) em PBS e aplicados em triplicada às placas. Posteriormente, foram adicionados anticorpos anti-IgG de bovino conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), diluídos 1:10.000 em PBS. Entre cada etapa as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e incubadas por 1 h a 37 °C. Por fim, foi adicionado 100 µL de solução de revelação (10 mL de tampão para substrato, 0,004 g de Ortho-Phenylenediamine (Sigma-Aldrich) e 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), deixando reagir por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Para interromper a reação, foram adicionados 50 µL por cavidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. As absorbâncias foram medidas em leitor de microplacas EZ Read 400 (Biochrom, UK) com filtro de 492 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína rGnRH foi expressa de forma insolúvel, sendo solubilizada em tampão contendo 8 M de ureia. A avaliação da expressão, após purificação da proteína, demonstrou a presença de uma banda de 21 kDa, em SDS- PAGE (Figura 1A), sugerindo a expressão de rGNRH/LTB. A expressão da proteína foi confirmada pela detecção por anticorpos anti-GnRH e anti-CT através *Western blot* (Figura 1B).

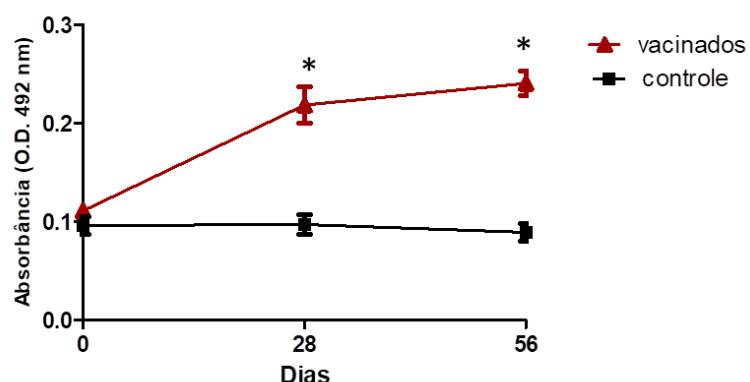
Um dos principais fatores relacionados a obtenção de uma vacina imunocontraceptiva anti-GnRH é a indução de uma resposta imune eficaz contra GnRH. A imunização ativa contra a molécula de GnRH resulta na produção de anticorpos capazes de neutralizar o peptídeo, levando à inibição da síntese e da liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH)

(KHAN et al., 2007). A maioria das vacinas anti-GnRH é baseada na incorporação de uma proteína transportadora à molécula alvo, no entanto, a presença de certas moléculas transportadoras leva à supressão da resposta anti-GnRH (SAD et al., 1991).



**Figura 1.** Expressão e caracterização de rGnRH/LTB. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 1. Marcador de massa molecular; 2. Expressão da molécula rLTB em *E. coli*; 3. Expressão de rGnRH/LTB em *E.coli*. B) Western blot de rGnRH/LTB. 2. Soro anti-GnRH; 3. Anticorpo anti-CT.

Um estudo prévio, realizado por nosso grupo de pesquisa, demonstrou que a vacinação com rGnRH/LTB induziu altos níveis de anticorpos específicos contra o GnRH, alterou o tecido gonadal e modulou os níveis de testosterona em camundongos. Além disso, foi observada uma mudança comportamental nos animais vacinados, como a diminuição da agressividade e do interesse sexual (ESLABÃO, 2016). No presente trabalho, verificamos a imunogenicidade desta molécula em bovinos. A vacina rLTB/GnRH foi capaz de induzir resposta imune específica, com a presença de anticorpos IgG superiores ao grupo controle, a partir do dia 28 e estáveis até o final do experimento, dia 56 (Figura 2). O ganho de massa nos animais vacinados foi superior ao grupo controle ao longo do estudo, característica desejável em animais de produção.



**Figura 2.** Resposta imune humoral (IgG) de bovinos vacinados com GnRH/LTB. Os animais foram vacinados nos dias 0 e 28. Os soros foram avaliados em pool e o gráfico representa a média com desvio padrão obtido nas triplicatas. A diferença estatística (\*) em relação ao grupo controle foi determinada através de ANOVA one-way seguida de Tukey multiple comparison ( $P < 0.05$ ).

Para confirmar o efeito imunocontraceptivo de GnRH/LTB em bovinos análises teciduais e de dosagens hormonais serão realizadas. Posteriormente, o ensaio será realizado com um número maior de animais.

#### 4. CONCLUSÕES

A molécula GnRH/LTB foi capaz de desencadear resposta imune humoral (IgG) em bovinos vacinados, demonstrando seu potencial para uso como antígeno em uma vacina imunocontraceptiva.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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, 2004.

ESLABÃO, L. B. **Avaliação do potencial imunogênico de vacinas contendo GnRH-I recombinante em camundongos machos BALB/c**, 2016, 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

GUPTA, S. K.; BANSAL, P. Vaccines for immunological control of fertility. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 9, p. 61-71, 2010

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.

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.

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.

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, 2007.

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* enterotoxina B subunit (EtxB) to CD4<sup>+</sup> T cells. **International Immunology**, v. 13, p. 541-551, 2001.

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.

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.