

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Centro de Desenvolvimento Tecnológico



Dissertação

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA QUIMERA LTB/GnRH
SINTÉTICA EM *Pichia pastoris* E SEU EFEITO NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA E NO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE
CAMUNDONGOS**

Juliano Lacava Pereira

Pelotas, julho de 2011.

JULIANO LACAVA PEREIRA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA QUIMERA LTB/GnRH SINTÉTICA EM *Pichia pastoris* E SEU EFEITO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E NO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Biotecnologia).

Orientação:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (UFPel)

Prof. Dr. Ivan Bianchi (UFPel)

Prof. Dr. Fabrício Rochedo da Conceição (UFPel)

Prof. Dr. Thomas Lúcia Júnior (UFPel)

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)
Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto (UFPel)
Prof. Dr. Ivan Bianchi (UFPel)
Prof. Dra. Carine Dahl Corcini (UFPel)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por toda força e pela proteção que me concedeu para superar os momentos mais "difíceis".

Aos meus pais: Tânia Maria Rocha Lacava Pereira e João Batista Lacava Pereira, que quando tudo parecia perdido, sempre vinha alguma mensagem que me dava forças para levantar.

A minha esposa Alini de Oliveira Valcarenghi, pelos inúmeros momentos que pareceu ter se transformado em duas para ajudar-me nos momentos em que me encontrava sobrecarregado.

Ao meu filho Nícolas Valcarenghi Lacava Pereira, por ser a maior motivação para meu crescimento profissional e saliento que sem dúvida é o meu maior orgulho.

Ao prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, por sua amizade, pelo apoio que me deu durante toda a orientação do mestrado.

Ao prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin, por ter acreditado que eu conseguiria cursar o mestrado mesmo tendo que trabalhar em outras cidades, ser de outra cidade, ter mulher e filho em outra cidade, entre outros empecilhos. Também por ter me recebido no programa de pós-graduação e me apresentado ao meu orientador.

Ao meu colega e amigo, Gabriel Baracy Klafke, por todo apoio que me deu durante o mestrado, tanto escrevendo algum artigo ou dissertação, quanto nos trabalhos de bancada.

Aos meus/minhas colegas do Centro de Biotecnologia (CDTec), de todos os laboratórios, por toda ajuda que me deram desde dicas, bibliografias, reagentes, etc, por suas amizades, companheirismo e atenção, que proporcionaram agradáveis ambientes de trabalho e de contínuo aprendizado.

RESUMO

PEREIRA, Juliano Lacava. **Expressão heteróloga da quimera LTB/GnRH sintética em *Pichia pastoris* e seu efeito na resposta imunológica e no epitélio seminífero de camundongos.** 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Diversas proteínas recombinantes estão sendo pesquisadas para utilização na imunocontracepção de mamíferos. Entre elas, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), entretanto devido ao seu baixo peso molecular há necessidade de associá-lo a uma molécula carreadora. Dentre as plataformas eucarióticas, encontra-se a levedura *Pichia pastoris* que tem possibilitado expressão e modificações pós-traducionais das proteínas recombinantes. O objetivo deste trabalho foi clonar e expressar a quimera LTB/GnRH em *P. pastoris*, visando sua utilização como imunocontraceptivo. Para tanto, sequências com os códons preferenciais de *P. pastoris* da proteína foram sintetizadas e clonada no plasmídeo pPICZαB. O plasmídeo foi propagado e transformado na levedura por eletroporação. As colônias transformadas foram selecionadas por resistência antibiótica e confirmadas por *Colony Blotting*. O clone selecionado foi cultivado e após indução expressou a proteína no sobrenadante. A proteína foi concentrada e utilizada como antígeno vacinal. Camundongos BALB/c machos foram vacinados com duas doses de 100 μ g de LTB/GnRH adsorvidas em hidróxido de alumínio com intervalo de 15 dias. A resposta imune foi avaliada por ELISA, mostrando soroconversão nos animais imunizados. A concentração espermática no grupo controle foi 16,93 x 10⁷ e no grupo imunizado 8,00 x 10⁷ espermatozoides/mL. A imunização induziu a redução da espermatogênese ($p < 0,05$), vacuolização nos túbulos seminíferos e desorganização testicular. Concluiu-se que a levedura foi capaz de expressar a proteína LTB/GnRH recombinante e a mesma apresentou potencial imunocontraceptivo em camundongos.

Palavras-chave: Imunocontraceptivo. Vacinas recombinantes. Espermatogênese. Levedura.

ABSTRACT

PEREIRA, Juliano Lacava. Heterologous expression of chimera synthetic LTB/GnRH in *Pichia pastoris* and its effect on immune response and in the seminiferous epithelium of mice. 2011. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Several recombinant proteins have been studied as immunocontraception agents in mammals, among them the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Nevertheless, due to its low molecular weight, GnRH needs to be conjugated with a carrier protein. Among the eukaryotic platforms the yeast *Pichia pastoris*, which are able of promoting post-translational modifications to expressed recombinant protein. The aim of this study was to clone and express the GnRH/LTB chimera in *P. pastoris*, and to test it as an immunocontraceptive. In order to accomplish this, sequences of *P. pastoris* codons usage were synthesized and cloned into the plasmid pPICZαB. The plasmid containing the sequence were propagated and transformed into yeast by electroporation. The transformed colonies were selected by resistance to antibiotics and confirmed by Colony Blotting. The selected clone was cultivated, induced and the protein expressed in supernatant. The protein was concentrated and used as a vaccine antigen. BALB/c males mice were vaccinated twice 15 apart with 100µg de LTB/GnRH adjuvanted with aluminum hydroxide. The immune response was evaluated by ELISA, showing seraconversion in vaccinated animals. The sperm concentration in the control group was 16.93×10^7 and 8.00×10^7 sperm/mL in the immunized group. Vaccination caused a reduction of spermatogenesis ($p < 0,05$), vacuolization and disorganization of the seminiferous tubules. We concluded that the yeast was able to express the recombinant protein LTB/GnRH, and it demonstrated immunocontraceptive potential in mice.

Keywords: Immunocontraceptive. Recombinants Vaccines. Spermatogenesis. Yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de DNA plasmidial da cepa TOP 10 de <i>Escherichia coli</i>	34
Figura 2	Liberação do inserto após digestão com enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Eco</i> RI.....	35
Figura 3	<i>Colony Blotting</i> para seleção de colônias transformadas.....	36
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação do gene codificador da proteína LTB/GnRH.....	37
Figura 5	<i>Dot Blot</i> referente à indução da colônia transformada.....	37
Figura 6	SDS-PAGE 15% do sobrenadante do cultivo de <i>P. pastoris</i> X33 transformada com plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH.....	38
Figura 7	<i>Western Blot</i> da proteína LTB/GnRH.....	38
Figura 8	Soroconversão produzida nos animais imunizados com a vacina contra a quimera LTB/GnRH.....	39
Figura 9	Soroconversão produzida nos animais do grupo controle (Cont/LTB) vacinados com LTB e Al(OH) ₃	40
Figura 10	Avaliação histopatológica dos testículos dos camundongos...	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração Espermática.....	40
--	----

LISTA DE ABREVIASÕES

Ácido Desoxi Ribonucléico - DNA
Álcool oxidase - AOX
Anti toxina colérica - anti-CT
Antígeno Prostático Específico - PSA
Cloreto de sódio - NaCl
Complexo Maior de Histocompatibilidade - MHC
Densidade Ótica - D.O.
Diaminobenzidina - DAB
Dihidroxiacetona sintase - DAS
Dióxido de Carbono - CO₂
Eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE
Enzime Linked Immuno Assay (Ensaio Imuno Enzimático) - ELISA
Fenilmetsulfonilflúor - PMSF
Formaldeído desidrogenase - FDL
Formate desidrogenase - FDH
Herpesvírus Bovino Tipo 5 - BoHV-5
Hidróxido de Alumínio - Al(OH)₃
Hora - h
Hormônio Folículo Estimulante - FSH
Hormônio Liberador de Gonadotrofinas - GnRH
Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante - LHRH
Hormônio Luteinizante - LH
Imunoglobulinas G - IgGs
Intramuscular - IM
keyhole limpet hemocyanin - KLH
Kilobase - kb
Kilodálton - kDa
Kilovolt - kV
Litro - L
Microfarads - µF
Micrograma - µg
Microlitro - µL

Miligrama - mg

Miligrama por quilograma - mg/kg

Mililitro - mL

Milímetro - mm

Milimolar - mM

Minuto - min

Molar - M

Nanômetro - nm

Número - nº

Ortho-Phenylenediamine - OPD

Para análise - P.A.

Pares de bases - pb

Peptídeo Associado ao GnRH - GAP

Potencial de hidrogênio - pH

Reação em cadeia da polimerase - PCR

Subcutânea - SC

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

Volts - V

Volume por volume - vol./vol.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIACÕES	9
1.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2.0 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3.0 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 β -HCG.....	17
3.1.1 Zona Pelúcida.....	18
3.1.2 Antígenos Espermáticos	19
3.1.3 GnRH.....	19
3.2 LTB.....	23
3.3 Sistemas de Expressão Heteróloga.....	24
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Construção do Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH.....	26
4.2 Propagação do Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH.....	26
4.3 Caracterização do Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH.....	27
4.4 Transformação e Seleção de <i>P. pastoris</i>	27
4.5 <i>Colony Blotting</i>	27
4.6 PCR para Confirmação da Transformação do Clone de <i>P. pastoris</i>	28
4.7 Indução da Expressão da Proteína Recombinante	29
4.8 Precipitação de Proteínas.....	29
4.8.1 Concentração de Proteínas com Metanol 50% v/v.....	29
4.8.2 Concentração de Proteínas com Sulfato de Amônio 80%.....	29
4.8.3 Concentração de Proteínas com Acetona 3:1 v/v	30
4.9 Quantificação de Proteínas Totais.....	30
4.10 <i>Dot Blot</i>	30
4.11 SDS-PAGE.....	30
4.12 <i>Western Blot</i>	31
4.13 Construção do Imunocontraceptivo.....	31

4.14 Animais para Experimentação	31
4.15 Determinação dos Níveis de Anticorpos.....	32
4.16 Determinação da Concentração Espermática e Avaliação Histopatológica.....	32
4.17 Análises Estatísticas.....	33
5.0 RESULTADOS.....	34
5.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i> TOP 10 por Eletroporação.....	34
5.2 Eletroforese do Produto da Extração Plasmidial.....	34
5.3 Clivagem do Plasmídeo.....	35
5.4 Sequenciamento da Construção do Gene <i>LTB/GnRH</i>	35
5.5 <i>Colony Blotting</i>	35
5.6 Reação em Cadeia da Polimerase.....	36
5.7 Quantificação de Proteínas.....	36
5.8 <i>Dot Blot</i>	37
5.9 SDS-PAGE.....	37
5.10 <i>Western Blot</i>	38
5.11 Avaliação da Resposta Imune dos Camundongos Vacinados.....	39
5.11.1 Enzime Linked Immuno Assay (ELISA).....	39
5.11.2 Determinação da Concentração Espermática.....	40
5.11.3 Exame Histológico dos Túbulos Seminíferos.....	41
6.0 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	43
7.0 CONCLUSÃO.....	48
8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	49
9.0 REFERÊNCIAS.....	50

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

Diversos alvos imunocontraceptivos vêm sendo estudados nas últimas décadas, tais como o β -HCG, zona pelúcida, antígenos espermáticos e o GnRH. A tecnologia do DNA recombinante alavancou este tipo de pesquisa, possibilitando a produção destas proteínas em microrganismos. Diversas são as plataformas de expressão, por exemplo, a bactéria *Escherichia coli*, *ghost bacteria*, *Baculovírus* em cultura de tecidos e as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. A *P. pastoris* quando utilizada para expressão de proteínas, costuma oferecer características importantes como altas concentrações do produto expresso e modificações pós traducionais, tornando-se mais econômica na expressão de proteínas em escala industrial. Portanto, esta levedura foi escolhida como plataforma de expressão da quimera LTB/GnRH neste trabalho.

Uma das proteínas mais interessantes para utilização como imunocontraceptivo em mamíferos é o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH), um decapeptídeo descrito por Schally et al. em 1971. Existem trabalhos mostrando seu uso como alvo imunocontraceptivo em humanos, animais domésticos e selvagens. Seu uso para humanos está voltado para a terapêutica do câncer de próstata, baseado na redução dos níveis de testosterona ocasionado pelo bloqueio deste hormônio. Em animais domésticos, por exemplo, os suínos e os bovinos de corte, o imunocontraceptivo tem por objetivo a melhoria da qualidade da carne e em cães, visa o controle populacional.

O GnRH, por ser um hapteno, foi fusionado com a porção B da Enterotoxina Termolábil de *Escherichia coli* (LTB), uma proteína imunogênica capaz de desencadear respostas imunes de mucosas e sistêmicas, que terá um papel de carreadora do GnRH. Uma das suas utilidades no ramo da Biotecnologia é na construção de vacinas, principalmente para estimular imunidade de mucosas, além de ser usada como molécula carreadora em imunocontraceptivos. Em imunocontraceptivos recombinantes, a LTB mostrou ser capaz de servir como uma carreadora dos hormônios relacionados à reprodução, tais como o β -HCG expresso em *P. pastoris* e o GnRH expresso em *E. coli*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo geral deste estudo foi produzir um imunógeno anti-GnRH recombinante para utilizar como método contraceptivo em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Clonar e expressar a quimera sintética LTB/GnRH em *Pichia pastoris*;
- Imunizar e avaliar a resposta de anticorpos anti-GnRH em camundongos;
- Avaliar o efeito da imunização nos testículos dos camundongos.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

Embora muitos métodos tenham sido utilizados no controle de natalidade, não há contraceptivo ideal que seja seguro, eficaz e amplamente aceitável. Uma característica que é indiscutivelmente importante é a falta de efeitos negativos de um método anticoncepcional na saúde da espécie em estudo e a reversibilidade dos mesmos (AITKEN, 2002; YODER & MILLER; SUN et al., 2010).

Segundo a Global Health Council (2011), mais de 700.000 mortes ocorreram entre 1995 e 2000, relacionadas a causas associadas com gravidezes indesejadas, sendo que mais de 400 mil dessas mortes resultaram de abortos inseguros. Isso indica que os contraceptivos existentes não estão disponíveis ou estão de forma inadequada. A necessidade de contraceptivos seguros e eficazes foi destaque em dois relatórios do Instituto de Medicina, publicados em 1996 e 2004 (HARRISON & ROSENFELD, 1996; NASS & STRAUSS, 2004). Outros benefícios para a saúde que os contraceptivos podem ter é a prevenção do carcinoma de mama e próstata (AITKEN et al., 2008).

Os métodos contraceptivos para homens e para mulheres podem ser divididos em 4 grupos: esterilização cirúrgica, uso de esteróides, métodos de barreira (física ou química) e imunológicos.

A esterilização cirúrgica consiste, na mulher, em ligadura tubária (salpingectomia parcial). Esta técnica bloqueia a possibilidade de contato entre os gametas femininos e masculinos (BARACAT & LIMA, 2005; TANAGHO & McANINCH, 2007). No homem, a cirurgia é a vasectomia, que obstrui o ducto deferente e como consequência, proporciona a incapacidade de eliminação dos espermatozoides no ejaculado. Esta interrupção do canal deferente pode ser reversível com outro procedimento cirúrgico (FREITAS et al., 2001; TANAGHO & McANINCH, 2007). Quanto aos suínos machos, a pressão da sociedade para buscar alternativas mais humanas para a castração cirúrgica vem crescendo. Desta forma, este tipo de técnica é improvável de sustentar-se no futuro. Tendo em vista o bem estar animal, uma técnica alternativa à cirurgia é a imunocontracepção utilizando

uma vacina contra o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (TUYTTENS et al., 2011).

A utilização de pílulas anticonceptivas, baseadas em hormônios esteróides, é um método bastante usado mundialmente (FREITAS et al., 1990). A pílula anticonceptiva leva à anovulação, tanto em humanos como em outros mamíferos, desta maneira, evita a fecundação (RANDALL et al. 2000; FREITAS et al., 2001). A escolha deste método contraceptivo fornece vantagens como: ser reversível, aliviar sintomas pré-menstruais e a dor mediada pela ovulação e reduz a incidência de displasias na mama e de cistos funcionais nos ovários. Mas também apresenta algumas desvantagens como: ganho de peso, retenção de líquidos, náuseas e vômitos (BARACAT & LIMA, 2005; FREITAS et al. 1990).

Os principais métodos de barreiras físicas são o preservativo masculino de látex; e nas mulheres o diafragma (FREITAS et al., 2001). Já dentre os métodos de barreiras químicas encontram-se as geléias espermicidas, que para mulheres que tem problemas de lubrificação vaginal, estas se apresentam como vantajosas e o dispositivo intra-uterino (DIU) (FREITAS et al., 2001). O dispositivo intra-uterino se caracteriza como um corpo estranho na cavidade uterina que causa endometrite asséptica, consequentemente levando à uma ação espermicida. O DIU pode também ser potencializado com cobre, progestagênio, levonorgestrel ou progesterona, desta forma aumentando seu potencial contraceptivo (BARACAT & LIMA, 2005; FREITAS et al. 1990; TANAGHO & McANINCH, 2007).

Vacinas imunocontraceptivas são de grande interesse para a clínica médica e veterinária. Atualmente, a população mundial aproxima-se de 7 bilhões de habitantes segundo a World POPClock Projection (2011), que mostra uma tendência de continuar aumentando. A superpopulação humana e dos animais é reconhecida como um problema crescente no mundo.

Quanto aos métodos imunológicos, ainda não há nenhuma vacina contraceptiva disponível para uso humano. Diversos alvos vêm sendo estudados, mas o que se destaca até o momento é a fração beta da gonadotrofina coriônica humana (β -HCG) (HE et al., 2011). Em termos imunológicos, o que se tem disponível é a aplicação de anticorpos recombinantes contra o β -HCG, sendo este método utilizado como contraceptivo de emergência (TALWAR et al., 2011).

O fato de que os métodos contraceptivos existentes são extremamente eficazes, com efeitos adversos mínimos, fez com que muitas empresas

farmacêuticas não incluísssem o desenvolvimento de anticoncepcionais novos como uma prioridade (MC LAUGHLIN & AITKEN, 2011). Em contra partida, devido à falta de habitat, superlotação e doenças, principalmente as zoonoses, vários trabalhos foram realizados para implementar um controle de fertilidade na população de animais, tanto domésticos como selvagens (KIRKPATRICK et al., 2009). Uma estratégia que vem sendo adotada é utilização de vacinas anticoncepcionais para controlar o comportamento em animais de companhia e melhorar a qualidade da carne dos animais de produção (HARDY and BRAID, 2007; FAYRER-HOSKEN, 2008).

Atualmente, os principais alvos que estão sendo testados como imunocontraceptivos são: β -HCG, zona pelúcida,抗ígenos espermáticos e o GnRH.

3.1 β -HCG

A gonadotrofina coriônica humana foi descoberta por Selmar Ascheim e Bernhard Zondek em 1927 (TALWAR et al., 2011), quando divulgaram que havia uma substância estimulante das gônadas presente no sangue e na urina de mulheres grávidas. Logo ficou conhecida como um marcador confiável de gravidez e, atualmente, sabe-se que este hormônio é também expresso por alguns tumores e as características pelas quais o HCG exerce suas funções são: promotor de crescimento autócrino, inibidor da apoptose, promotor da angiogênese, invasão e proteção contra a rejeição pelo sistema imunológico (TALWAR et al., 2011).

O β -HCG é um hormônio glicoprotéico de aproximadamente 39kDa (AIRES, 1999). Sua principal função é evitar a degeneração do corpo lúteo, que fornece progesterona e estrogênios para manutenção do endométrio, a fim de evitar a necrose das artérias espiraladas do útero, possibilitando a recepção do trofoblasto pelo útero (MAIA, 2002). O responsável pela produção deste hormônio nas primeiras semanas de gestação é o trofoblasto, mas com períodos variáveis entre espécies, a placenta assume este papel (GUYTON & HALL, 2006; MAIA, 2002).

Talwar et al. (2011) desenvolveram um imunocontraceptivo fusionando geneticamente o β -HCG com a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) e expressaram a proteína correspondente em *P. pastoris*. Esta vacina gerou altos títulos de anticorpos contra β -HCG-LTB nos camundongos vacinados (PURSWANI & TALWAR, 2011).

A vacina contra o β -HCG foi a primeira a avançar para a Fase Clínica II em humanos (TALWAR et al., 1994; HE et al., 2011). Sua eficiência foi demonstrada resguardando mais de 200 mulheres sexualmente ativas da gravidez, sendo desprovida de efeitos colaterais durante as Fases I e II de pesquisas. Este imunocontraceptivo permite que a mulher ovule normalmente e mantenha os ciclos menstruais periódicos, sem efeitos adversos (NAZ et al., 2005). A dificuldade da industrialização de vacinas contra o β -HCG deve-se a problemas como a limitação de respostas imunes à vacinação, complexidade da produção da fórmula e custo elevado (STEVENS, 1996).

3.1.1 Proteínas da Zona Pelúcida

A zona pelúcida (ZP) é uma membrana com aproximadamente 6 micrômetros de espessura em humanos, constituída principalmente por mucopolissacarídeos e por glicoproteínas de membrana. Esta camada (ZP) situa-se em torno do ovócito, a fim de protegê-lo e também faz a recepção dos espermatozoides em todas as espécies de mamíferos (MAIA, 2002). Para fecundação, os espermatozoides devem interagir com a ZP para fertilizar o óvulo. Tal vinculação é reconhecida como uma interação receptor-ligante, entretanto, os epítópos que participam da ligação esperma-ZP ainda são desconhecidos (MAIA, 2002; SAMOYLOVA et al., 2010).

Segundo Tesarik (1995), a ação contraceptiva de anticorpos anti-ZP, visando eventos que ocorrem antes da fusão dos gametas, é desprovida de preocupações éticas relacionadas com a destruição de embriões. O elevado teor de proteínas da ZP de mamíferos, o conhecimento das sequências completas de aminoácidos das principais proteínas da ZP e do alto grau de homologia das sequências entre as espécies favorecem o rápido avanço dos projetos de vacinas anti-ZP.

Vacinas contraceptivas contra a zona pelúcida demonstraram inibição da fertilização em diversas espécies de animais, como por exemplo, coelhos, gambás, cães, macacos, camundongos (CUI et al., 2010). Algumas sequências de proteínas da ZP quando incorporadas nas vacinas imunocontraceptivas, ativam linfócitos T auxiliares CD4⁺ do organismo receptor para dirigir um ataque imune celular causando ooforite auto-imune, entretanto pode induzir resposta semelhante para outros componentes funcionalmente relevantes do ovário, como folículos primordiais e células esteroidogênicas (TESARIK, 1995).

Vacinas contra a zona pelúcida têm sido estudadas para a imunização de animais silvestres, como na Nova Zelândia, onde há uma espécie de gambá chamada Brushtail (*Trichosurus vulpecula*), que é eleita uma das principais pragas na Nova Zelândia. Para combater estes animais, estudos com imunocontraceptivos estão sendo realizados, utilizando como alvo, proteínas recombinantes da zona pelúcida (CUI et al., 2009; CUI et al., 2010).

3.1.2 Antígenos Espermáticos

A viabilidade de contraceção anti-esperma foi demonstrada tanto em humanos como em animais (NAZ, 2009). Este foi um dos motivos que fortaleceu a idéia de desenvolver uma vacina anti-espermatozóides. Os espermatozóides podem induzir naturalmente a produção de anticorpos anti-espermatozóides em machos e fêmeas, devido ao seu potencial antigênico (TANAGHO & McANINCH, 2007).

As vacinas anti-espermatozóides atingem a infertilidade *in vitro* e *in vivo* através de vários mecanismos, como a inibição da capacitação espermática e deficiência da reação acrossômica (NAZ, 2008). Sabe-se que cerca de 70% dos homens vasectomizados podem produzir auto-anticorpos contra seus espermatozóides e 20 a 30% dos casos de infertilidade deve-se a presença de anticorpos anti-espermatozóides no homem ou na mulher (FRAYNE & HALL, 1999; NAZ, 2008).

Um antígeno espermático que está sendo estudado desde a década de 90 é a *zonadhesin* (TARDIF & CORMIER, 2011). Sua função baseia-se na adesão do espermatozóide com a zona pelúcida do óvulo. Foram obtidos os cDNA (s) (DNAs complementares) desta proteína em amostras de suínos, ratos, humanos, coelhos e muares e os mesmos foram sequenciados. Os resultados deste estudo demonstraram que a *zonadhesin* compartilha uma estrutura muito comum entre as espécies, porém, apresentaram uma considerável variação inter-espécies da identidade de aminoácidos, sugerindo assim que a *zonadhesin* é um antígeno espécie específico (TARDIF & CORMIER, 2011).

3.1.3 GnRH

O GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), também denominado LHRH ou GnRH-1, é um decapeptídeo (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) de 10,380 Dáltons (UNIPROT P01148, 2009). Sua estrutura primária foi

descrita por Schally et al. em 1971, a partir de purificações de extratos hipotalâmicos de suínos (AIRES, 1999).

Em humanos, provém de um gene encontrado no cromossomo 8p, traduzido em uma sequência de 92 aminoácidos, composta inicialmente por um peptídeo sinal de 23 aminoácidos seguidos por uma sequência de Gly-Lys-Arg, na qual é realizada a clivagem enzimática deste pré-pró-hormônio e a amidação do carboxiterminal do GnRH (WORMALD et al., 1989). Na sequência da molécula precursora, a fração entre o 24º até o 33º aminoácido caracteriza o GnRH-1. Os demais aminoácidos compõem o GAP (Peptídeo Associado ao GnRH), que não tem um papel fisiológico conhecido (AIRES, 1999). O decapeptídeo é sintetizado por células neurosecretoras do hipotálamo basal (núcleo arqueado) e da área pré-óptica do hipotálamo (AIRES, 1999). Posteriormente, é liberado de maneira pulsátil na circulação porta hipotalâmico-hipofisária, através da qual é transportado para a hipófise anterior (AIRES, 1999; CHENG & LEUNG, 2005), onde é responsável pela estimulação da biossíntese e secreção do LH e do FSH (CHENG & LEUNG, 2005; UNIPROT, 2009). Na hipófise anterior são sintetizados o FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e o LH (Hormônio Luteinizante), onde através de um mecanismo de *feedback* ambos são difundidos via sanguínea para cumprir suas funções nos testículos ou ovários (GUYTON & HALL, 2006).

Nas fêmeas, o FSH é responsável pela maturação dos folículos ovarianos e pela regulação da síntese de estrógenos pelas células da granulosa (MAIA, 2002). Estas células, também produzem inibina, um hormônio glicoprotéico que desempenha um papel regulatório na secreção do FSH pela hipófise.

Em mamíferos machos, a inibina é produzida nos testículos pelas células de Sertoli, e em fêmeas, nas células da granulosa dos folículos ovarianos (AIRES, 1999). Existe uma relação inversa (*feedback negativo*) entre níveis séricos de inibina e do FSH. A inibina, o estrógeno e a progesterona, são os principais hormônios que controlam a secreção do FSH (AIRES, 1999; FERNANDES et al., 2002). O FSH, via células de Sertoli, estimula a espermatogênese e a liberação da inibina como descrito acima. Portanto, quando ocorre uma redução da taxa de espermatogênese, há também um declínio nos níveis de inibina, desta forma, elevando-se o débito de FSH (McDERMOTT, 1997).

O LH é responsável pelo processo de ovulação nas fêmeas, em conjunto com o FSH na fase de maturação folicular (GUYTON & HALL, 2006). Nos machos, este

hormônio estimula a produção de testosterona pelas células intersticiais de Leydig. Após a testosterona ser secretada na corrente sanguínea, a mesma inibe o débito de secreção do LH, através de um mecanismo de retroalimentação negativa (AIRES, 1999; RANDALL et al., 2000).

Atualmente, pesquisas com vacinas anti-GnRH estão sendo testadas em humanos (TALWAR et al., 2009), animais domésticos (PICKLES et al., 2001) e selvagens (YODER & MILLER, 2001).

Em humanos com câncer de próstata em estágio avançado, as vacinas anti-GnRH promoveram redução dos níveis de testosterona, redução da próstata e dos níveis do Antígeno Prostático Específico (PSA) mostrando-se como uma alternativa viável no prognóstico dos tumores dependentes de esteróides, como o câncer de próstata (PARKINSON et al., 2004).

Já em cães, a imunização pode proporcionar a redução da população canina de rua, através da contracepção imunológica (LOPES et al., 2005), contribuindo para a redução das zoonoses transmitidas por cães como a leptospirose (BROWN & PRESCOTT, 2008), a toxocariase (HOFFMEISTER et al., 2007), a leishmaniose (WANG et al., 2011) e a raiva (FAVI C. et al., 2008). Desta forma, vacinas contra o GnRH podem se apresentar como uma alternativa à castração cirúrgica (DONALD & THOMPSON, 2000; USDA, 2011).

Em suínos e bovinos, as vacinas contra o GnRH proporcionam redução dos androgênios sexuais e consequentemente da libido dos machos. Outra função em suínos é a redução dos níveis de escatol na carcaça. O escatol é um metabólito produzido no intestino, a partir do metabolismo do triptofano, é lipofílico e responsável pelo odor característico de esterco na carne do macho inteiro (CANELLAS et al., 1999). Através do uso da vacina anti-GnRH há redução dos andrógenos e consequentemente o escatol produzido no intestino não é absorvido e com isso é excretado nas fezes (BONNEAU et al., 1994; BONNEAU & ENRIGHT, 1995; ZENG et al., 2002).

A União Européia produz cerca de 240 milhões de suínos por ano. O peso para abate destes animais difere muito entre países. Durante os últimos anos, houve uma tendência global de aumento do peso para abate dos suínos. Essa elevação pode gerar aumento do odor sexual de machos inteiros, devido à maturação sexual, segundo *Welfare Aspects of the Castration of Piglets* (2004).

O GnRH, assim como outras substâncias de baixo peso molecular, por si só não é imunogênico, mas por conjugação química, eletrostática ou por fusão genética com proteínas carreadoras aumentando seu peso molecular, tornam-se capazes de induzir uma resposta imune específica em mamíferos. As moléculas que possuem esta propriedade são denominadas haptenos (BIER et al., 1989).

A primeira vacina imunocontraceptiva a ser comercializada, utilizando como alvo vacinal o GnRH, foi a Vaxstrate. Esta vacina compreendia o neuropeptídeo GnRH conjugado com ovoalbumina e emulsionado com um óleo adjuvante (MEEUNSEN et al., 2007).

Em 1998 foi lançada uma vacina para suínos contra o GnRH (IMPROVAC), que foi inicialmente comercializada na Austrália e na Nova Zelândia (MEEUNSEN et al., 2007). Esta vacina foi produzida com GnRH recombinante expresso em *E. coli*, usando como molécula carreadora, a toxina diftérica e como adjuvante Dietilaminoetil (DEAE) – Dextrano. (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2009; INSTITUTO NACIONAL PROPRIEDADE INDUSTRIAL, 2011).

Uma vacina recombinante de dose única, aplicada por via intramuscular, chamada GonaCon™, que ainda não está comercialmente disponível, utiliza o peptídeo GnRH, acoplado a *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) (MILLER et al., 2006), uma glicoproteína respiratória de alto peso molecular do molusco *Megathura crenulata* (SWERDLOW et al., 1996) e a um adjuvante denominado AdjuVac™, produzido pelo próprio grupo de pesquisas do National Wildlife Research Center (NWRC), em Fort Collins, Colorado (USDA, 2011). Este grupo tem trabalhadoativamente no desenvolvimento e avaliação dos imunocontraceptivos para utilização em animais selvagens desde 1992. Este adjuvante é mais eficaz do que o adjuvante de Freund, e não causa os efeitos secundários negativos (USDA, 2011).

Segundo a USDA (2011), a GonaCon™ foi capaz de imunizar fêmeas de suínos e veados de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) por cinco anos com uma única dose. Entretanto, estudos demonstram que quando esta vacina é aplicada em veados de cauda branca fêmeas, pode proporcionar a imunocontracepção, durante o primeiro ano, em 88% dos animais estudados. Mas no segundo ano, o percentual de animais que se manteve infértil ficou abaixo de 50% (MILLER et al., 2000; USDA, 2011). O efeito protetor desta vacina contra a gestação é diretamente relacionado com os níveis de anticorpos anti GnRH adquiridos (MILLER et al., 2000). Devido ao alto custo de KLH, os cientistas precisaram substituir este carreador por uma

hemocianina do molusco *Concholepas concholepas* como proteína carreadora, a qual possui um valor mais acessível para produção. Esta proteína possui cor azul devido sua alta concentração de cobre. Desta forma, desenvolveram uma vacina de segunda geração chamada GonaCon-Blue, que permanece em fases de teste (MILLER et al., 2006).

Vacinas com haptenos necessitam de moléculas carreadoras e adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias que quando adicionadas aos抗ígenos vacinais, favorecem sua imunogenicidade, tal como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) (SILVA & MOTA, 2003).

3.2 LTB

Algumas cepas enterotoxigênicas de *E. coli* produzem dois tipos de toxinas, a termoestável (ST) e a termo-lábil (LT). A LT é uma exotoxina que se divide em duas famílias, LT-I e LT-II, porém a maioria das informações disponíveis sobre a LT referem-se a família LT-I (da HORA et al., 2011). A proteína LT é composta de duas subunidades codificadas por um operon: a subunidade A (LTA), uma enzima de 28kDa; e a subunidade B (LTB), uma proteína de aproximadamente 60kDa, composta por cinco polipeptídeos idênticos (11,6kDa). Cada polipeptídeo é produzido separadamente, com uma sequência líder que lhe permite ser transportado para o exterior da célula, onde as unidades de toxinas são agregadas (da HORA et al., 2011). A LTB é uma subunidade não tóxica, altamente estável, disposta em uma estrutura cilíndrica, pentamérica com uma cavidade central. Esta subunidade apresenta um domínio que possui alta afinidade pelo gangliosídeo GM1, um receptor de membrana presente em todas as células nucleadas de mamíferos e principalmente nas mucosas (LILJEQVIST et al., 1997; CHIKWAMBA et al., 2002).

A LTB tem sido amplamente utilizada como adjuvante, tanto de mucosas como sistêmico (VERWEIJ et al., 1998; CONCEIÇÃO et al., 2006). Segundo da Hora et al. (2011), alguns pesquisadores relataram que a administração de LTB por via parenteral estimula principalmente respostas imunes do tipo Th2 e quando inoculada através das mucosas, estimula respostas do tipo Th1. Conceição et al. (2006), demonstrou que uma quimera recombinante composta da região de repetição R1 da adesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* e LTB (LTB-R1) provocou respostas do tipo Th2 quando administrada por via intramuscular em camundongos, mas tipo Th1 quando administrada por via intranasal.

A LTB recombinante, fusionada com antígenos através de fusão genética ou conjugação química, pode representar uma nova alternativa no desenvolvimento de vacinas. Uma das finalidades de seu uso é na construção de vacinas, principalmente para estimular imunidade de mucosa para combater patógenos que invadem o hospedeiro através desta via provocando assim uma imunidade protetora (OJEN et al., 1994; CONCEIÇÃO, 2005). Como molécula carreadora em β -HCG e GnRH, a LTB mostrou-se capaz de exercer este papel de forma efetiva (PURSWANI & TALWAR, 2011) e o GnRH (TALWAR et al., 2009).

3.3 Sistemas de Expressão Heteróloga

Muitos estudos sobre imunocontraceptivos recombinantes utilizam a *E. coli* como plataforma de expressão dos alvos imunocontraceptivos. Isto pode ser observado nos estudos de Harris et al. (1999) e Wang et al. (2008). Outros vetores utilizados para expressão de proteínas contraceptivas são Bactérias Fantasmas (ghost bactéria, *E. coli*) (WALCHER et al., 2008; TALWAR et al., 2009; CUI et al., 2010), *P. pastoris* (TALWAR et al., 2009), Baculovirus em cultura de tecido de insetos (HARRIS et al., 1999), expressão em células CHO (ovário de Hamster Chinês) (HARRIS et al., 1999) e Citomegalovírus murino (HARDY, 2007).

A produção heteróloga de proteínas em leveduras tem sido muito utilizada para a expressão de um grande número de genes (ARRUDA, 2008), sendo que a *P. pastoris* salienta-se por apresentar importantes vantagens como a capacidade de modificações pós traducionais e de secreção de proteínas, crescimento em meios de cultura de baixo custo (CEREGHINO & GREGG, 2000; DALY & HEARN, 2005; DUMMER et al., 2009), possibilitando sua utilização em escala industrial e expressão de altos níveis das proteínas de interesse (HARTWIG et al., 2010). A utilização da *P. pastoris* para expressão de alvos imunocontraceptivos foi demonstrada por Purswani & Talwar (2011), quando expressaram uma fusão genética envolvendo os genes do hormônio β -HCG e da LTB.

O sistema de expressão em *P. pastoris* tem as seguintes características: simplicidade de manipulação sobre o promotor induzível álcool oxidase (AOX) para controlar a expressão do gene exógeno, o potencial de obtenção de alta densidade celular e a secreção de proteínas heterólogas. Para que ocorra a clonagem na levedura, são utilizados vetores como o plasmídeo pPICZ α B, que possuem sequências complementares às do genoma da levedura, proporcionando

recombinação homóloga. Este plasmídeo possui um peptídeo sinal fusionado chamado *α-Mating Factor*, responsável pela secreção das proteínas heterólogas para o meio (Invitrogen®, 2009).

A produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris* é basicamente dividida em duas fases: na primeira, utilizando o glicerol como fonte de carbono, ocorre a multiplicação da levedura acumulando grande quantidade de células funcionais (Invitrogen®, 2009). Pesquisas sobre a otimização da estratégia de nutrição com glicerol na fase de produção da biomassa e redução de metabólitos tóxicos têm sido extensivamente relatados demonstrando que essa fase é crucial para a produção da proteína (JIN et al., 2010). Já na segunda fase, ocorre a etapa de indução, proporcionando a expressão da proteína de interesse a partir da utilização do metanol (DUMMER et al., 2009; JIN et al., 2010).

O metanol é uma excelente alternativa para ser utilizado na indução dos cultivos celular devido seu baixo custo. Este álcool pode ser derivado de fontes fósseis ou fermentação microbiana (OLAH, 2005). No entanto, apenas alguns microrganismos são considerados relevantes para produção de proteínas recombinantes em escala industrial, utilizando o metanol como única fonte de carbono e fonte de energia. Entre esses, estão as leveduras *P. pastoris* e *Hansenula polymorpha*, que são capazes de fornecer rotas metabólicas especiais para a utilização do metanol (HARTNER and GLIEDER; VAN DER KLEI et al., 2006). Primeiro, a enzima álcool oxidase (AOX) converte o metanol em formaldeído, que é então assimilado por outra enzima chamada dihidroxiacetona sintase (DAS), utilizando xilulose-5-fosfato como doador de glicoaldeído ou pela via dissimilada formando dióxido de carbono. Na via dissimilatória, duas moléculas de NADH são formadas pela ação das enzimas NAD-dependentes, formaldeído desidrogenase (FLD) e formate desidrogenase (FDH) (SCHROER et al., 2010).

A hipótese deste trabalho foi que a proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* tem função de imunocontraceptivo em camundongo. Como o GnRH não é imunogênico, utilizou-se a LTB como carreadora do hormônio e Al(OH)₃ como adjuvante. Portanto, é possível que além de carreadora do GnRH, esta exerça o papel de adjuvante na vacina (MILLAR et al., 2001; CONCEIÇÃO et al., 2003).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

4.1 Construção do Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH

O genes codificantes para os antígenos LTB e GnRH (fusionados) foram sintetizados pela empresa Epoch Biolabs, Inc. (USA), contendo códons preferenciais (*codon usage*) de *P. pastoris* e sítios de enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão *P. pastoris* pPICZ α B. As sequências depositadas no GenBank, localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), foram usadas no desenho dos genes sintéticos. A seguinte quimera foi construída para expressar LTB/GnRH em *P. pastoris* (pPICZ α B):

EcoRI_LTB_KpnI_SacII_GNRH 1_stop_XbaI
AGGAATTCACAAAATGGCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTCGGAAT
ATCGCAACACACAAATATACGATAAAATGACAAGATACTATCATACGGAATC
GATGGCAGGCCAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTAAAGAGCGGGCAACATT
TCAGGTCGAAGTCCGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAAAGCCATTGA
AAGGATGAAGGACACATTAAGAACATATCTGATCGAGACC AAAATTGATAAA
TTATGTGTATGGAATCAAAAAACCCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGAAAA
AGGTACCTCGAGCCGGCGCAGCACTGGAGCTACGGCCTGCGTCCAGGATC
CCGGTGATCTAGACG

Em amarelo a sequência de nucleotídeos da LTB, em verde as bases referentes ao GnRH e em vermelho um códon de terminação (*stop codon*). Sublinhados os sítios das respectivas enzimas de restrição.

4.2 Propagação do Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH

A cepa Top 10 (Invitrogen®) de *E. coli*, foi utilizada para propagar o plasmídeo pPICZ α B que possui o gene codificador da quimera LTB/GnRH. A bactéria foi transformada por eletroporação e semeada em meio de cultura Lúria

Bertani (LB) líquido, com concentração reduzida de cloreto de sódio (NaCl) e com 25µg/mL de zeocina. O cultivo foi incubado por 18h a 37°C. Posteriormente, o plasmídeo foi extraído com o kit *SPIN MINIPREP KIT* (QIAGEN®) e quantificado em fluorímetro QubitTM fluorometer (Invitrogen®).

4.3 Caracterização do Plasmídeo pPICZαB-LTB/GnRH

Para a caracterização do plasmídeo pPICZαB-LTB/GnRH foi realizada uma digestão utilizando as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI. Para a reação, utilizou-se 15µL de plasmídeo (aproximadamente 3µg), 5,5µL de água M. Q. estéril, 1µL de *Xba*I, 1µL de *Eco*RI e 2,5µL de *buffer React 2*. Também, o plasmídeo oriundo da Epoch Biolabs, Inc. (USA) teve o gene *LTB/GnRH* sequenciado (sequenciador MegaBACE, Amershan Biosciences) no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, para avaliação da integridade da construção.

4.4 Transformação e Seleção de *P. pastoris*

Para a transformação, utilizou-se 8µg de plasmídeo linearizado com enzima de restrição (*Pmel*) e concentrado de acordo com o protocolo recomendado pelo manual da *P. pastoris* (Invitrogen®, 2009).

A partir de um cultivo em meio de cultura *Yest Peptone Dextrose* (YPD) líquido, efetuou-se a preparação de células competentes e após, a levedura foi transformada pelo método de eletroporação de acordo com o manual da *P. pastoris* (Invitrogen®, 2009). Os parâmetros utilizados foram: 25µF capacidade, 200 ohms de resistência e 2kV de voltagem.

Em seguida, no meio de cultura *Yest Peptone Dextrose Sorbitol* (YPDS) com zeocina 150µg/mL, as leveduras foram semeadas e incubadas a 28°C por sete dias. A seleção das colônias foi realizada por resistência à zeocina e indução da expressão em placa, sendo revelada pelo método de *Colony Blotting*.

4.5 Colony Blotting

Foram semeados os transformantes em placa com Buffered Methanol-complex Medium (BMMY) e incubados a 28°C por 24h. Após este período, acrescentou-se 1% de metanol absoluto. Este procedimento de adição de metanol se repetiu a cada 24h até completar 72h de incubação.

Após o término da indução foi realizado o teste de *Colony Blotting*. A membrana ficou 3h em contato com a placa a 28°C. Após o término da incubação, a membrana foi lavada com PBS-T, e seca sobre papel filtro.

Para o ensaio imunológico de revelação da presença da proteína LTB/GnRH, bloqueou-se a membrana com uma solução de leite em pó a 5% diluído em PBS-T e incubada a temperatura ambiente sob agitação constante por duas horas. A solução de bloqueio foi removida da membrana com três lavagens de cinco minutos com PBS-T e posteriormente, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpos policlonais de coelho anti-CT (SIGMA) diluído 1: 1500 no mesmo tampão citado anteriormente.

Decorrido o tempo da incubação, a membrana foi lavada novamente nas mesmas condições e adicionado o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase, (SIGMA). A membrana foi incubada a temperatura ambiente sob agitação constante com este conjugado por uma hora.

Para revelar a reação, a membrana foi coberta com 10mL de uma solução formada por 6mg de diaminobenzidina (DAB), 9mL de Tris-HCl 50mM pH 7,6, 1mL de solução de níquel 0,3% e 30µL de peróxido de hidrogênio a 30%, e após, a membrana foi incubada a temperatura ambiente sob agitação constante por 30min. Após esse período foi avaliada a presença de bandas na membrana.

4.6 PCR para Confirmação da Transformação do Clone de *P. pastoris*

A partir da obtenção do DNA genômico de clones supostamente transformados de *P. pastoris* X33, que se apresentavam resistentes ao antibiótico de seleção, foi realizada a reação de PCR utilizando os *primers* forward AOX1 5' (5'- GACTGGTCCAATTGACAAGC-3') e reverse AOX1 3' (5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). A PCR foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5min seguido de 30 ciclos de 95°C por 1min, 54°C por 1min, 72°C por 1min e extensão final a 72°C por 7min. A análise da amplificação foi realizada em gel de agarose 1,0% submetido à eletroforese (90V) utilizando o marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen®). Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pPICZαB com o gene codificante da proteína quimérica LTB/GnRH, o qual, foi encomendado da empresa Epoch Biolabs, Inc. (EUA).

4.7 Indução da Expressão da Proteína Recombinante

Uma colônia recombinante foi repicada para uma placa de Petri com meio Yeast Peptone Dextrose agar (YPD) e zeocina 150µg/mL. A mesma foi incubada por 48h em estufa a 30°C. Em um Erlenmeyer com capacidade para 250mL, contendo 25mL de meio BMGY, foi inoculado uma colônia e incubou-se *overnight* a 30°C sob agitação constante de 220rpm em agitador orbital até $D.O_{600\text{ nm}} = 4,0$. O cultivo foi centrifugado (Sigma 3K30) a 1.500g por 5min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspendido, com meio BMGY e inoculado em biorreator de 2L até atingir a $D.O_{600\text{ nm}} = 1,0$. Acrescentou-se 1% de metanol absoluto a cada 24h, mantendo a indução por 160h. Ao final da indução, a cultura foi centrifugada (Sigma 3K30) a 4°C e 3.300g por 5min e o sobrenadante foi coletado, tratado com 1mM do inibidor de proteases fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), fracionado em alíquotas e congelado a -20°C até o momento da precipitação e quantificação.

4.8 Precipitação de Proteínas

4.8.1 Concentração de Proteínas com Metanol 50% vol./vol.

Em um tubo cônico com capacidade para 50mL, foi adicionada uma alíquota de 25mL do sobrenadante da colônia recombinante cultivada no biorreator e 25mL de metanol absoluto. Imediatamente, o frasco foi homogeneizado por inversão e incubado a -20°C por 210min. Após, centrifugou-se (Sigma 3K30) a 4°C por 15min a 10.000g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi incubado a 37°C por 15min para secar. O *pellet* foi suspendido em 500µL de água ultrapura.

4.8.2 Concentração de Proteínas com Sulfato de Amônio 80%

Em um tubo cônico com capacidade para 50mL, foi adicionado 17,5mL do sobrenadante da colônia recombinante cultivada no biorreator e 9,8g de sulfato de amônio. O material foi homogeneizado por inversão até a dissolução completa do soluto. A incubação e a suspensão do *pellet* foram realizadas de maneira semelhante ao item (4.8.1). O *pellet* foi suspendido em 150µL de água ultrapura.

4.8.3 Concentração de Proteínas com Acetona 3:1 vol./vol.

Em um tubo cônico com capacidade para 50mL, foi adicionada uma alíquota de 10mL do sobrenadante da colônia recombinante cultivada no biorreator e 30mL de acetona P.A.. Imediatamente, o frasco foi homogeneizado por inversão e o

protocolo seguiu conforme o item (4.8.1). O *pellet* foi suspenso em 350µL de água ultrapura.

4.9 Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação das amostras de proteínas foi realizada por espectrofotometria, através do aparelho Metrolab 2300 (WIENNER, Argentina), com o kit (PROT2) para quantificação de proteínas totais (WIENNER, Argentina). Para a calibração e controles, foram utilizados os protocolos recomendados pelo fabricante.

4.10 Dot Blot

Na membrana de nitrocelulose HybondTM ECLTM (Amersham Biosciences), foi adicionado 2,5µL das alíquotas a serem testadas e dos controles. Após, a membrana foi bloqueada (sob agitação constante) por duas horas com leite em pó a 5%, diluído em PBS-T. Removeu-se a solução de bloqueio, lavando a membrana com PBS-T três vezes sob agitação constante. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-CT, (SIGMA) diluído 1: 5000 em PBS-T. O mesmo foi incubado em agitador orbital, sob agitação constante de 80rpm por 1h a temperatura ambiente.

Após, foram realizadas três lavagens com PBS-T na membrana e adicionado o anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase, (SIGMA), diluído 1: 15000. O anticorpo conjugado foi incubado a temperatura ambiente por 1h sob agitação constante. Posteriormente, o excesso de conjugado foi removido, lavando três vezes a membrana com PBS-T. A revelação foi realizada de acordo com o item 4.5.

4.11 SDS - PAGE

As amostras de proteínas devidamente quantificadas foram desnaturadas (por 10min a 99°C) na presença de tampão de amostra de SDS-PAGE (contendo β-mercaptoetanol), sendo imediatamente submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%. A proteína LTB purificada e concentrada de *E. coli* foi utilizada como controle positivo. A voltagem inicial à qual as amostras foram submetidas foi 80V, sendo alterada para 120V após entrada das amostras no gel de resolução. Em seguida, corou-se o gel com solução Coomassie Blue, deixando esta reagir por 1h sendo então imediatamente descorada utilizando-se água até a visualização nítida das bandas.

4.12 Western Blot

As amostras de proteínas devidamente quantificadas foram desnaturadas (por 10min a 99°C) na presença de tampão de amostra de SDS-PAGE (contendo β-mercaptoetanol), sendo imediatamente submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A proteína LTB purificada e concentrada de *E. coli*, disponível no Centro de Biotecnologia da UFPel, foi utilizada como controle positivo.

Para a detecção imunológica, a técnica de *Western Blot* foi executada de acordo com o item (4.10).

4.13 Construção do Imunocontraceptivo

Foi avaliada uma única concentração da quimera LTB/GnRH na vacinação dos camundongos. A concentração foi de 100μg/camundongo, com 10% de Al(OH)₃ como adjuvante, administrada pela via subcutânea com uma dose de 200μL/camundongo. Os animais foram revacinados uma vez no 15º dia de experimento. No grupo controle (Cont/LTB), foi administrado LTB na mesma concentração, adjuvante, dose, período de revacinação e via utilizada pelo imunocontraceptivo. Para a escolha da concentração de proteínas na vacina, realizou-se um projeto piloto (dados não mostrados), o qual mostrou a concentração de 100μg/camundongo como mais eficaz entre as avaliadas.

4.14 Animais para Experimentação

Os experimentos foram realizados em camundongos da linhagem BALB/c. Foram utilizados 16 camundongos machos de 21 dias, com 16g, divididos em dois grupos como descrito abaixo:

- Grupo vacinado com a quimera LTB/GnRH (GnRH): 08 camundongos machos da linhagem BALB/c vacinados com 100μg de LTB/GnRH e adsorvidos em 10% de Al(OH)₃;
- Grupo controle (Cont/LTB): 08 camundongos machos da linhagem BALB/c vacinados com 100μg de LTB e adsorvidos em 10% de Al(OH)₃.

4.15 Determinação dos níveis de Anticorpos

Os anticorpos da classe IgG foram avaliados por ELISA, utilizando-se placas de poliestireno com 96 cavidades (CORNING, NY). Seguiram-se protocolos padrões

(CROWTHER, 2001) para a realização do teste. Para sensibilização da placa utilizou-se 50µL de suspensão contendo 2µg/mL de proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris* ou LTB expressa em *E. coli* diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 permanecendo por 18h a 4°C. Após foram lavadas três vezes com tampão fosfato pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,5% (PBS-T) pH 7,6. O *pool* de soros foi diluído 1/100 em PBS-T, adicionado 50µL de cada diluição por cavidade (em duplicata) e incubadas por 90min a 37°C, em seguida lavadas três vezes com PBS-T e após o adicionado 50µL do conjugado (diluído 1/15000 em PBS-T de imunoglobulina de coelho anti-camundongo DAKOPATTS A/S, Dinamarca, conjugada com peroxidase) e incubadas por 90min a 37°C. Após, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e adicionado 50µL de substrato/cromógeno Ortho-Phenylenediamine (OPD, Sigma), deixando reagir por 15min no escuro, a temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro (MR 700 Microplate Reader, Dynatech Laboratories, Alemanha) a 450nm. As absorbâncias de cada amostra foram divididas pela absorbância do soro da coleta 1 (dia zero) do mesmo *pool* e os resultados expressos como soroconversão.

4.16 Determinação da Concentração Espermática e Avaliação Histopatológica

Os testículos dos camundongos foram extraídos e avaliados de acordo com o protocolo de Adams et al. (1993) para análises histopatológicas. Para isto, os animais foram anestesiados com pentobarbital (60mg/kg), aplicado intraperitoneal e após foram eutanasiados com CO₂, de acordo com Report of the American Veterinary Medical Association, nº 5, de 01 de março de 2001.

Para obtenção do sêmen, a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente, de ambos os testículos do animal, foram removidas e colocadas em placa de Petri (35mm), contendo 500µL de solução de Ringer Lactato, previamente aquecida e mantida a 37°C, onde permaneceram por aproximadamente 15min (REVEL et al., 2004). Um volume de 500µL de sêmen foi utilizado para obtenção da suspensão de espermatozoides. O material colhido foi utilizado na avaliação da concentração espermática (CE). Para a colheita do sêmen, realizou-se o rompimento das estruturas anatômicas, com auxílio de agulhas hipodérmicas (30 G). Na determinação da CE foi utilizada a câmara de Neubauer, sendo a suspensão de espermatozoides diluída em formol salina na proporção de 1: 100 (REVEL et al., 2004).

A partir destas peças, foram realizadas as análises histopatológicas dos túbulos seminíferos, no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biológicas da Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Os testículos foram fixados em Bouim, desidratados em soluções alcoólicas crescentes, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em Paraplast Xtra® (Sigma, P-3808) (CARSON & HLADIK, 2009). As lâminas foram montadas a partir dos blocos microtomizados (Microtomo motorizado Leica – RM2255) com 5 μ m de espessura, sendo coradas com hematoxilina de Mayer e eosina e fotografadas em microscópio (Olympus – BX51) com câmera digital de alta resolução (Olympus – DP72).

Após o estudo, os animais foram encaminhados ao Biotério Central da UFPel. O biotério repassou à empresa Ambientus Tecnologia Ambiental Ltda. para posterior incineração.

4.17 Análises Estatísticas

Para análise dos títulos de anticorpos e da concentração espermática, utilizou-se o teste T de Student. Foram consideradas significativas as análises que apresentaram $p<0,05$.

5.0 RESULTADOS

5.1 Transformação de *Escherichia coli* TOP10 por eletroporação

Para propagação do plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH, transformou-se a bactéria *E. coli* TOP10 por eletroporação seguindo os parâmetros de Sambrook & Russel (2001). A confirmação da transformação foi evidenciada pelo crescimento em meio com zeocina.

5.2 Eletroforese do Produto da Extração Plasmidial

Para avaliar a eficiência da extração plasmidial foi realizada a eletroforese do DNA extraído da cepa transformada TOP 10 de *E. coli* contendo pPICZ α B-LTB/GnRH. Verificou-se a presença de uma banda de aproximadamente 4kb, referente ao plasmídeo (Fig.1).

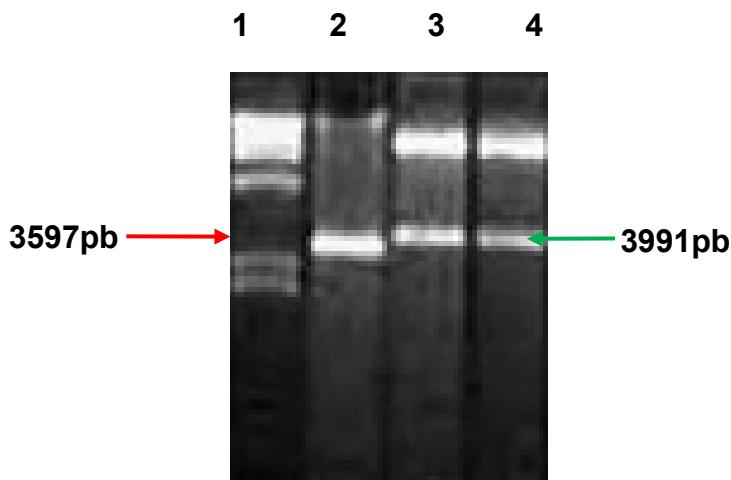


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose a 1% da extração de DNA plasmidial da cepa TOP 10 de *E. coli*. 1. Marcador de peso molecular *Hind* III; 2. Plasmídeo pPICZ α B sem inserto; 3 e 4. Plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH.

5.3 Clivagem do Plasmídeo

Para a caracterização do plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH, foi realizada a digestão do mesmo com as enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI. Pode-se observar o fragmento *LTB-GnRH* de ~400pb, sendo este do tamanho esperado (Fig.2).

1 2 3

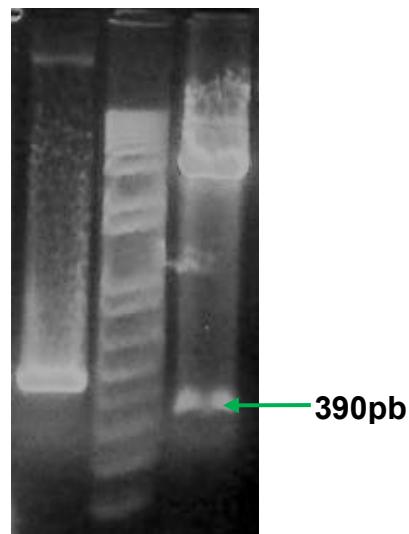


FIGURA 2. Liberação do inserto após digestão com enzimas de restrição *Xba*I e *Eco*RI. 1. Fragmento de 486pb; 2. Marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen®); 3. Inserto digerido com enzimas de restrição.

5.4 Sequenciamento da Construção do Gene *LTB/GnRH*

O gene inserido no plasmídeo pPICZaB foi sequenciado por eletroforese capilar utilizando di-desoxi-nucleotídeos marcados em sequenciador MegaBACE (Amersham Biosciences). O gene apresentou 100% de homologia com a construção *L TB/GnRH*, quando os dados do sequenciamento foram compilados e analisados no programa de alinhamento de sequências ContigExpress (Informax inc.) e Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), localizado no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.5 Colony Blotting

Para a triagem dos possíveis transformantes de *P. pastoris* foi realizada a técnica de *Colony Blotting* para detectar as proteínas na membrana de nitrocelulose. Observou-se a presença de diferentes níveis de expressão nas colônias testadas, a partir da visualização das diferentes intensidades dos *dots* (Fig.3).

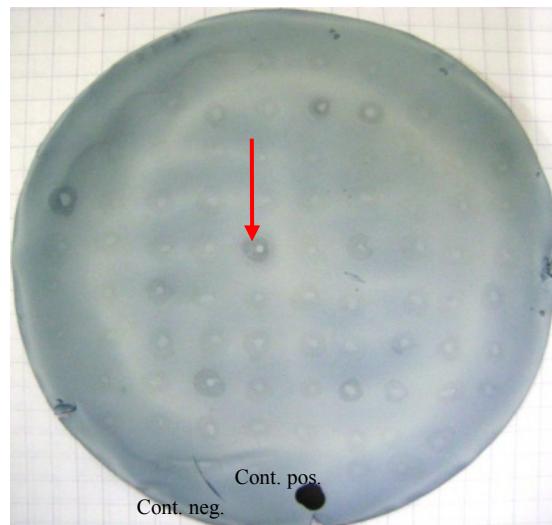


FIGURA 3. *Colony Blotting* para seleção de colônias transformadas. A seta aponta um *dot* resultado do produto da colônia escolhida para expressão em biorreator da proteína LTB-GnRH. Como controle negativo, foi utilizado uma colônia de *P. pastoris* X33 não transformada e uma colônia de *Pichia* transformada com plasmídeo pPICZ α B, que expressa uma lectina de *Bauhinia variegata*. Como controle positivo utilizou-se a proteína LTB.

5.6 Reação em Cadeia da Polimerase

A partir da PCR das colônias transformadas, foi possível observar a presença de um fragmento de ~ 982pb referente aos genes *LTB/GnRH* e o responsável pela expressão do peptídeo sinal α -*Mating Factor*, ambos inseridos entre os sítios dos primers AOX1 e AOX2 (Fig.4).

5.7 Quantificação de Proteínas

Para preparar as doses da vacina contra a quimera LTB/GnRH, as proteínas totais relativas ao sobrenadante concentrado por diferentes métodos foram quantificadas e apresentaram as seguintes concentrações:

- Sobrenadante concentrado com metanol 50% vol./vol. - 26 μ g/ μ L;
- Sobrenadante concentrado com sulfato de amônio 80% - 15 μ g/ μ L;
- Sobrenadante concentrado com acetona 3:1 vol./vol. - 11 μ g/ μ L.

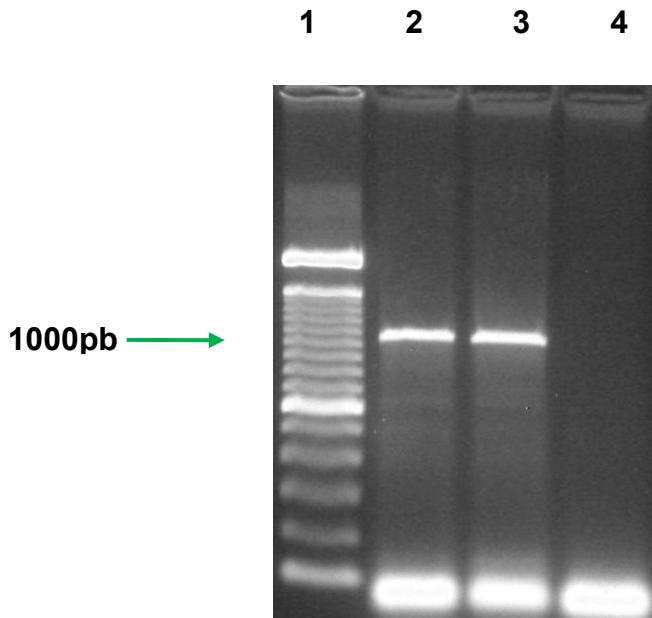


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Produto de amplificação do gene codificador da proteína LTB/GnRH. 1. Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen®); 2 e 3. Amplificação do gene *LTB/GnRH* com 982pb; 4. Controle negativo da reação.

5.8 Dot Blot

Para caracterização da expressão da proteína LTB/GnRH foi utilizada a técnica *Dot Blot*. Foi possível visualizar a presença da proteína a partir do quinto dia de indução com 1% de metanol em BMMY (Fig.5)



FIGURA 5. *Dot Blot* do sobrenadante do cultivo induzido de *P. pastoris* transformada com *LTB/GnRH*. Na linha 1, coluna 1, controle positivo; colunas 2 a 8, sobrenadantes não concentrados do 1° ao 7° dias de cultivo respectivamente. Na linha 2, coluna 1, controle negativo da reação; colunas 2 a 8, sobrenadantes concentrados com metanol a 50% vol./vol. referentes ao 1° ao 7° dias de cultivo.

5.9 SDS-PAGE

Para visualização da proteína expressada foi realizado a técnica SDS-PAGE. Foi possível observar uma banda que sugere a presença da proteína LTB/GnRH (Fig.6).

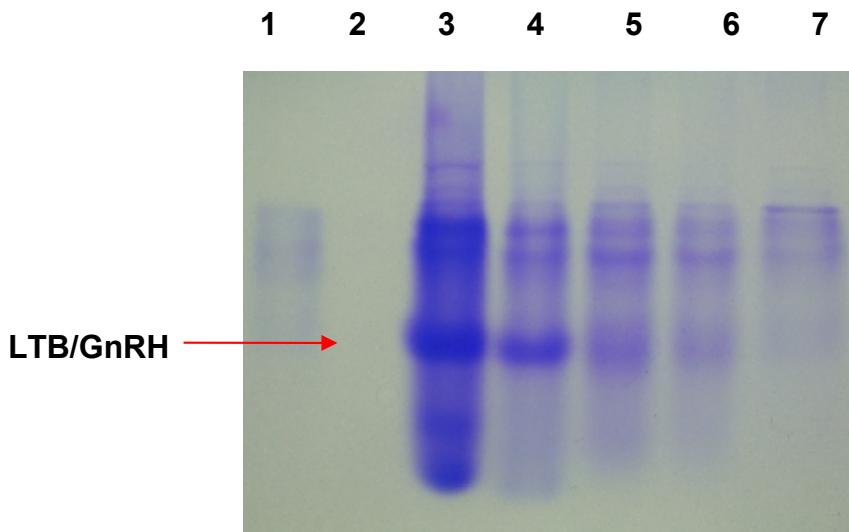


FIGURA 6. SDS-PAGE 15% do sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* X33 transformada com plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH. 1 Sobrenadante do cultivo com o plasmídeo pPICZ α B sem inserto; 2. Água; 3 e 4 sobrenadante do cultivo contendo plasmídeo pPICZ α B-LTB/GnRH concentrado com metanol a 50% vol./vol., puro e diluído 1:2, respectivamente; 5 e 6 sobrenadante concentrado com acetona 3:1, puro e diluído 1:2 respectivamente; 7 Sobrenadante de cultivo sem inserto, concentrado com metanol 50% vol./vol..

5.10 Western Blot

A técnica de *Western Blot* foi realizada para avaliar de forma qualitativa a expressão da proteína LTB/GnRH pela levedura *P. pastoris*. Para detecção da proteína utilizou-se anticorpos anti-CT 1: 4500 (SIGMA) e conjugado anti-camundongo 1: 5000 (SIGMA) (Fig.7).

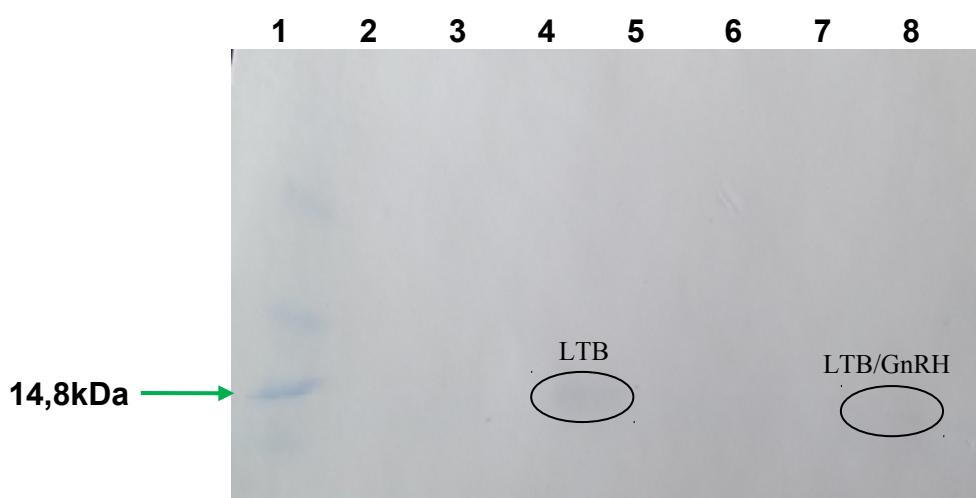


FIGURA 7. *Western Blot* da proteína LTB/GnRH. 1. Marcador de peso molecular (BenchMark™ Pre-stained); 2. Água ultra pura; 3. Controle negativo (proteína de *M. hiopneumoniae*); 4. Controle positivo (LTB expressa em *E. coli*); 5. Lectina recombinante de *Bauhinia variegata* (rBVL1); 6. Controle negativo (Lectina nativa de *B. variegata*); 7. Água; 8. LTB/GnRH expresso em *P. pastoris*, concentrada com metanol 50% vol./vol..

5.11 Avaliação da Resposta Imune dos Camundongos Vacinados

5.11.1 Enzime Linked Immuno Assay (ELISA)

O ELISA demonstrado na figura 8 teve a placa sensibilizada com a proteína LTB/GnRH expressa em *P. pastoris*. A soroconversão produzida nos animais imunizados com LTB/GnRH, mostrou-se significativa ($p<0,05$) a partir o sétimo dia após vacinação, mas apresentou-se mais eficiente após a segunda dose no 15º dia. Os níveis de anticorpos das classes IgG foram crescentes no grupo que recebeu a proteína alvo até a última coleta, no 28º dia (Fig.8).

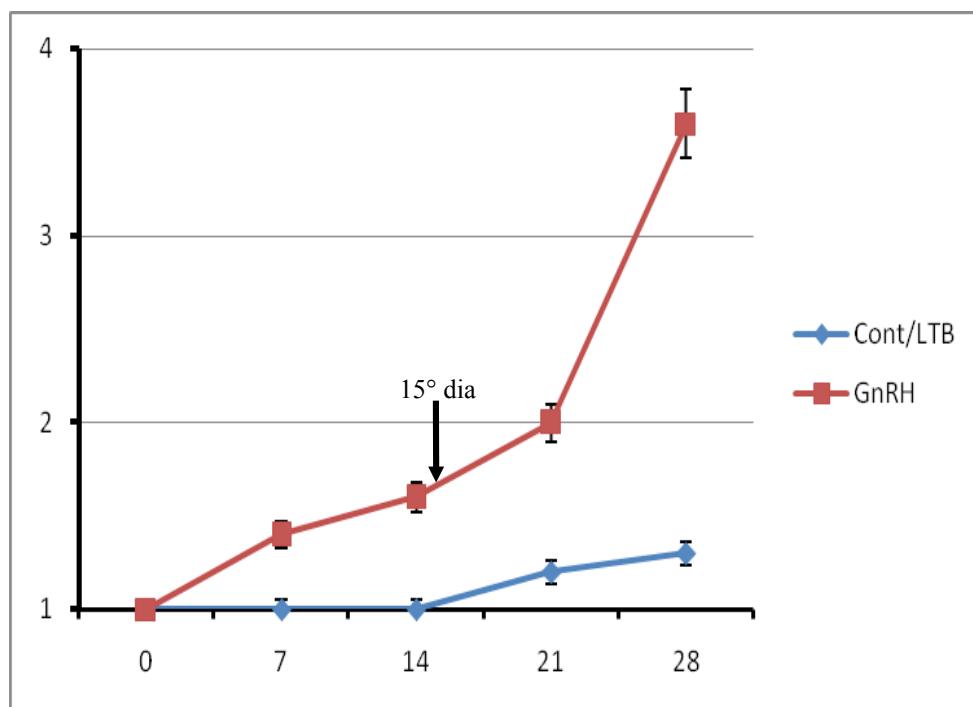


FIGURA 8. Soroconversão produzida nos animais imunizados com a vacina contra a quimera LTB/GnRH. Os dados representam as médias (+/- erro padrão da média) das soroconversões contra LTB/GnRH induzidas pela vacina. Em vermelho, está representado o grupo vacinado com a proteína LTB/GnRH com Al(OH)₃ e em azul, o grupo controle, LTB e Al(OH)₃. A seta indica o dia da revacinação (2º dose).

O teste de ELISA demonstrado na figura 9 teve a placa sensibilizada com LTB, a qual foi expressa em *E. coli*. A soroconversão produzida nos animais vacinados com LTB (Cont/LTB) foi significativa ($p<0,05$) desde o décimo quarto dia após a vacinação, mantendo-se crescente após a segunda dose no 15º dia. Os níveis de anticorpos das classes IgGs foram crescentes no grupo que recebeu a LTB expressa em *E. coli*, entretanto, no grupo (GnRH) vacinado com LTB/GnRH, a partir do vigésimo primeiro dia, os níveis de anticorpos anti-LTB manteram-se estagnados (Fig.9).

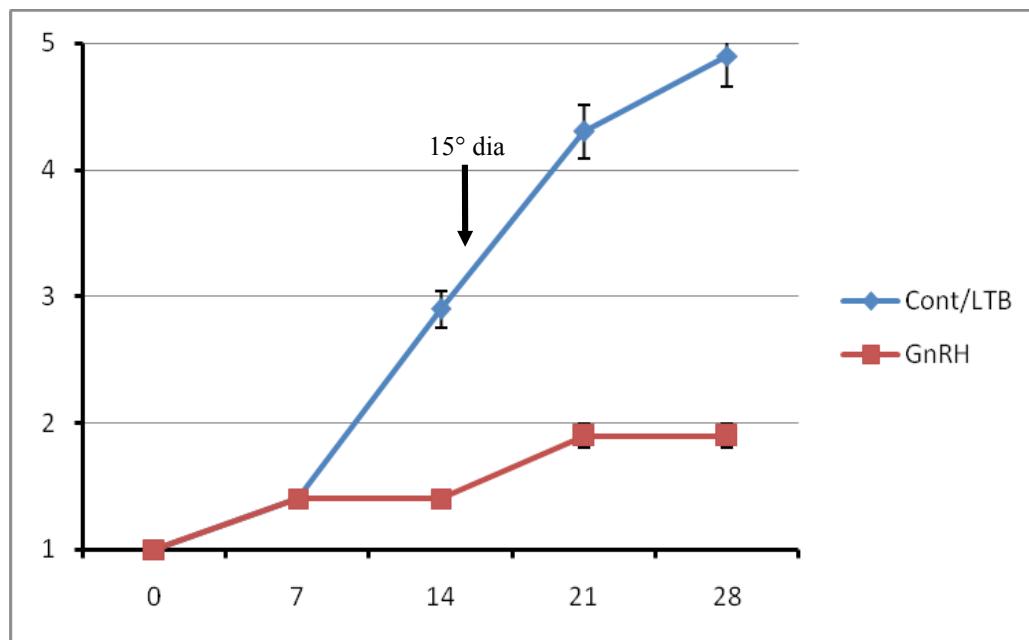


FIGURA 9. Soroconversão produzida nos animais do grupo controle (Cont/LTB) vacinados com LTB e Al(OH)₃. Os dados representam as médias (+/- erro padrão da média) das soroconversões contra LTB induzidas pela vacina. Em vermelho, está representado o grupo vacinado com a proteína LTB/GnRH com Al(OH)₃ e em azul, o grupo controle, LTB e Al(OH)₃. A seta indica o dia da revacinação (2º dose).

5.11.2 Determinação da Concentração Espermática

A quantificação dos espermatozoides de ambos os grupos do estudo foi realizada no último dia do experimento (28º). O grupo GnRH, vacinado com a proteína LTB/GnRH, mostrou redução da espermatogênese quando comparado ao grupo controle. Estes resultados estão demonstrados na tabela abaixo:

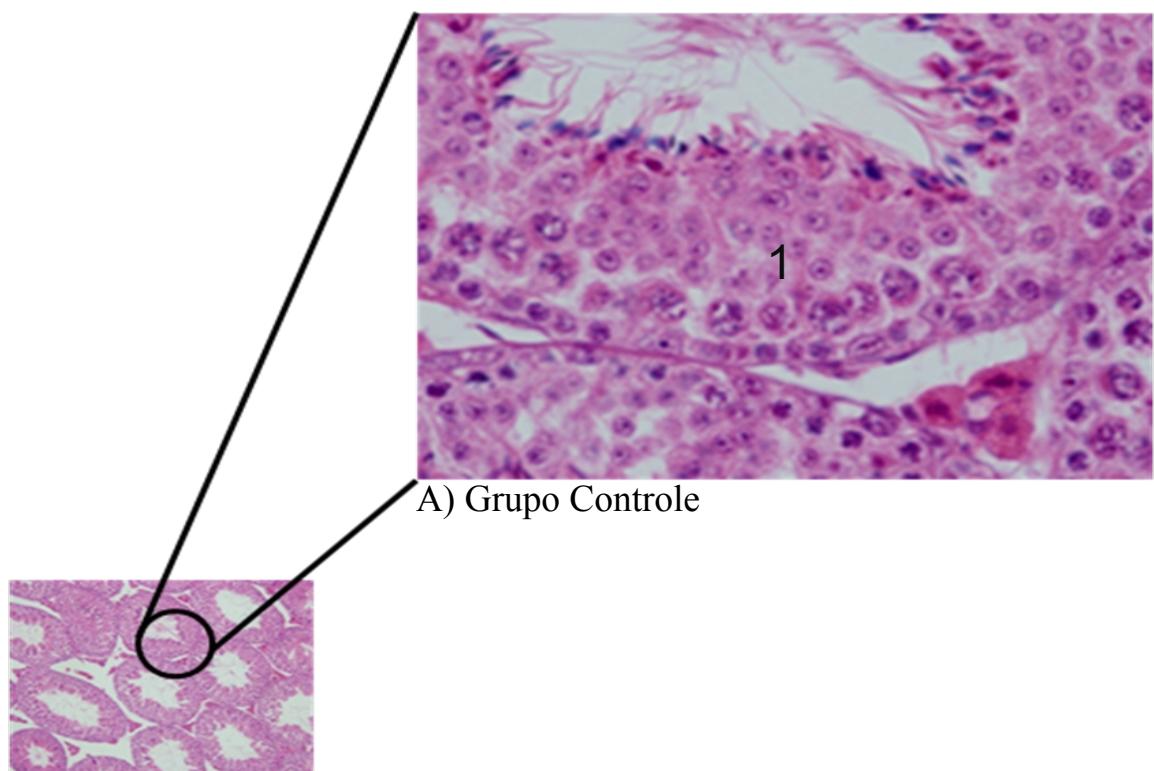
TABELA 1. Concentração espermática. Os dados da tabela representam as médias e desvios-padrão do número de espermatozoides dos grupos LTB/GnRH e controle, (*) indica diferença significativa p<0,05.

	Média	Desvio-padrão
Grupo GnRH	$8,00^* \times 10^7$ espermatozoides/mL	1,60
Grupo controle	$16,93 \times 10^7$ espermatozoides/mL	1,24

5.11.3 Exame Histológico dos Túbulos Seminíferos

A avaliação dos túbulos seminíferos dos animais vacinados demonstrou que no grupo controle, o epitélio seminífero encontrava-se normal, com túbulos seminíferos nas diferentes fases da espermatogênese. Já o grupo GnRH, apresentou diversas anormalidades como degeneração tubular, presença de espermatócitos no lúmem,

vacuolização, infiltrados leucocitários, granulações citoplasmáticas e redução de espermatozóides (Fig.10).



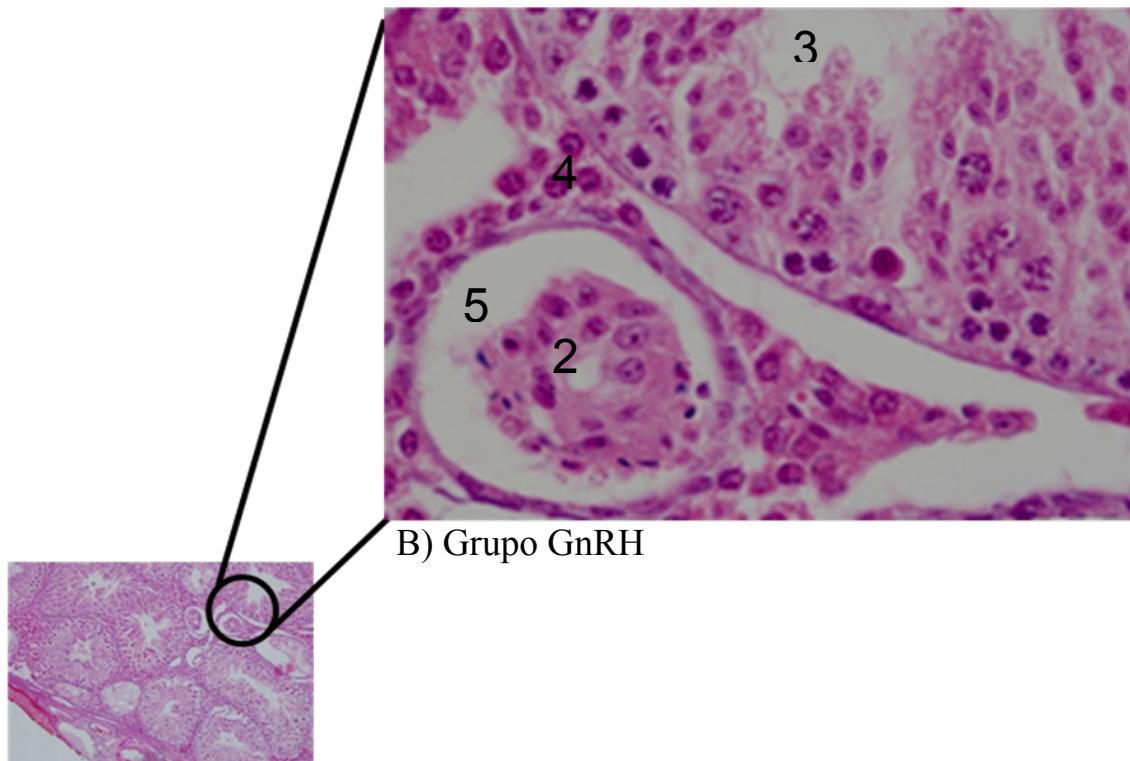


FIGURA 10. Avaliação histopatológica dos testículos dos camundongos. As imagens representadas pelas letras A e B, referem-se respectivamente ao grupo controle e ao grupo GnRH. Aumento de 100 e 1000 vezes, respectivamente.

Referente à figura 10, foi observada a presença de túbulos seminíferos normais (1) referentes ao grupo controle. No grupo GnRH, observou-se a presença de espermatócitos primários e secundários (2) na luz tubular, presença de grânulos citoplasmáticos na superfície apical do epitélio seminífero, diminuição de espermatozóides (3) e vacuolização nos túbulos seminíferos. Pode-se também observar algumas áreas inflamatórias, com extensa infiltração leucocitária, demonstrada por alta concentração de plasmócitos (4), túbulos seminíferos em degeneração (5) com a presença desorganizada de espermatogônias e espermatócitos primários, apresentando espermatócitos secundários livres na luz tubular e diminuição do número de espermatozóides e espermátides. Já no interior dos túbulos seminíferos, pode-se observar espermatogônias, espermatócitos e espermátides com granulações citoplasmáticas e vacuolizações no citoplasma, elevado número de células com núcleo picnótico, e reduzido número de células germinativas, principalmente espermatozóides, espermátides e espermatócitos secundários.

6.0 DISCUSSÃO

A esterilização cirúrgica seguida por retorno ao meio ambiente é um método de controle de natalidade eficaz e não letal para população animal, mas o uso é limitado devido ao custo elevado e dos entraves logísticos. A imunocontracepção tem potencial para ser um método mais prático e eficaz de controle (LOPES et al., 2005; LEVY, 2011), pois diversos trabalhos mostram resultados promissores com diferentes alvos imunocontraceptivos, tais como o β -HCG (PURSWANI & TALWAR, 2011), a zona pelúcida (CUI et al., 2010) e o GnRH (MILLER et al., 2006).

O presente trabalho alcançou resultados que mostraram-se promissores com uma vacina contra a proteína fusionada LTB/GnRH expressa em *P. pastoris*. Para tanto, a construção do gene *LTB/GnRH* inserida no plasmídeo pPICZαB, sintetizada pela Epoch Biolabs, Inc. (USA), foi propagada em *E. coli* TOP10 e sequenciada de forma semelhante a Pinto et al. (2008). O sequenciamento resultou em 100% de identidade com a montagem *in silico*, mostrando-se compatível para o experimento. Além do sequenciamento, comparou-se na corrida eletroforética os plasmídeos pPICZαB com inserto *LTB/GnRH* e sem inserto, também comprovando o sucesso da construção pela Epoch Biolabs, Inc. (USA). Para concluir a caracterização do plasmídeo pPICZαB-LTB/GnRH, realizou-se a clivagem do mesmo por enzimas de restrição, de acordo com o protocolo EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen®, 2009). O fragmento retirado do plasmídeo apresentou-se com o tamanho esperado (390pb), finalizando a caracterização do mesmo.

A levedura foi transformada de acordo com o protocolo EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen®, 2009), sendo posteriormente avaliada quanto a expressão pela técnica de *Colony Blotting* (Invitrogen®, 2009). Neste método se obteve resultados positivos com diversos clones, mas apenas um foi selecionado para expressão em meio líquido. O clone selecionado teve seu DNA genômico extraído por fervura em água e foi utilizado como *template* da reação de PCR, de acordo com Hartwig et al. (2010). Esta reação apresentou um produto de 982pb e auxiliou na caracterização do transformante.

Após a caracterização, o mesmo foi submetido a um cultivo em biorreator e induzido com metanol a 1% conforme Hartwig et al. (2010) e Purswani & Talwar (2011), objetivando a expressão da proteína LTB/GnRH em meio líquido.

O sobrenadante proveniente do biorreator foi dividido em três alíquotas, a fim de avaliar o melhor método para precipitação de suas proteínas. Foram testadas a precipitação com metanol 50% vol./vol., com acetona 3:1 e com sulfato de amônio 80%. Como o método mais eficiente foi a concentração com o metanol, mostrado no item 5.6, foi dado continuidade à alíquota referente ao mesmo para a corrida em SDS-PAGE.

A técnica de SDS-PAGE para avaliação da expressão, apresentou uma banda, que possivelmente corresponde a proteína LTB/GnRH. Embora a corrida eletroforética não tenha sido acompanhada por um marcador de peso molecular, a mesma teve como controle o sobrenadante do cultivo de *P. pastoris* transformada com o plasmídeo pPICZαB sem inserto. Isto possibilitou observar que a *P. pastoris*, secreta algumas proteínas nativas, mas em baixas concentrações. Esta técnica demonstrou que as proteínas presentes no sobrenadante, após concentradas com metanol, foram capazes de migrar no gel. O fato não corrobora com Sambrook & Russel (2001), quando mencionam que as substâncias utilizadas no presente trabalho para a precipitação das proteínas prejudicam a solubilização das mesmas.

A partir da observação da proteína LTB/GnRH no gel da SDS-PAGE, realizou-se *Western Blot* para melhor caracterizar a quimera. Nesta técnica de detecção imunológica, a proteína foi apresentada de maneira insatisfatória, uma vez que a banda referente a proteína LTB/GnRH mostrou-se extremamente fraca. A caracterização da proteína químérica por este método foi prejudicada, possivelmente em função de uma fase desnaturante do método. Este tipo de problema, pode ter ocorrido pela falta de reconhecimento do anticorpo anti-CT, devido à epítopes conformacionais terem se perdidos pela desnaturação (BIER et al., 1989).

Como o alvo imunocontraceptivo LTB/GnRH foi apresentado no gel da SDS-PAGE e na membrana do *Western Blot*, embora pouco visível, vacinou-se os camundongos BALB/c machos pela via subcutânea, de acordo com Conceição et al. (2003). Na detecção de anticorpos anti-LTB/GnRH, pelo método de ELISA, o grupo GnRH superou o grupo controle desde o início do ensaio de imunização, mas teve uma forte elevação após a segunda dose (15º dia), corroborando com o trabalho de Zee et al. (1995), que vacinaram bezerros e ratas por via subcutânea com uma

fusão genética de GnRH e uma fímbria (F11) de *E. coli* recombinantes (GnRH/F11), demonstrando aumento nos níveis de anticorpos anti-GnRH/F11 após a revacinação. Com a segunda dose da vacina, o grupo controle também apresentou um aumento nos títulos dos anticorpos. Os anticorpos que se elevaram no grupo controle após a revacinação, provavelmente são anti-LTB, pois em situações onde são fusionadas uma molécula imunogênica como a LTB e um hapteno como o GnRH, tem-se três tipos de anticorpos formados, o anti-LTB/GnRH, o anti-LTB e o anti-GnRH (BIER et al., 1989). Como demonstrado por Ferro et al. (2004), a avaliação da resposta de anticorpos IgG específicos para GnRH, indicou que em ovinos e cães, a resposta não foi mantida, ao contrário de roedores, sugerindo que a supressão da fertilidade, pode ser devido a diferenças nas respostas imunes em diferentes espécies animais. Portanto, outros estudos serão realizados para avaliar o potencial imunocontraceptivo em diferentes espécies.

O ELISA apresentou diferença significativa ($p<0,05$) quando os níveis de anti-LTB/GnRH do grupo GnRH foram comparados com o grupo controle. Estes resultados corroboram com Purswani & Talwar (2011), que desenvolveram um imunocontraceptivo recombinante cujo alvo era o antígeno β -HCG/LTB, expresso em *P. pastoris*, que imunizou 100% dos camundongos BALB/c. Estes dados demonstram que a construção do gene *LTB/GnRH* com códons *usage* para *P. pastoris* foi eficaz com uma única cópia de GnRH na molécula traduzida, não sendo necessário utilizar várias cópias do hormônio como sugerem alguns autores. Estes dados corroboram com o estudo de Zee et al. (1995), que com apenas uma cópia de GnRH recombinante, mostraram ser suficiente para gerar anticorpos anti-GnRH e inibir o ciclo estral de ratas. Jinshu et al. (2004), demonstraram que uma construção recombinante contendo três cópias de GnRH em *tandem*, foi mais eficiente quanto ao aumento dos níveis de anticorpos anti-GnRH do que outra contendo apenas um GnRH. Assim como Quesnell et al. (2000), que expressaram duas quimeras diferentes, uma com sete cópias de GnRH e ovoalbumina e outra com sete cópias do hormônio e thioredoxina, ambas mostrando-se capazes de induzir resposta imune humoral em camundongos.

A LTB como carreador de antígenos imunocontraceptivos tem se mostrado eficaz. De acordo com os dados do presente trabalho e dos estudos de Purswani & Talwar (2011), as características da utilização da LTB como molécula carreadora são extremamente favoráveis, uma vez que quando expressa em *P. pastoris*, a

mesma mantém plenamente suas propriedades adjuvantes. Isto foi demonstrado por ELISA, quando a placa foi adsorvida com LTB expressa em *E. coli* e aplicou-se os soros dos animais vacinados com LTB/GnRH expressa em *P. pastoris*. O teste mostrou diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$), confirmando que a LTB, mesmo após a fusão com o GnRH e o *fold* gerado pela expressão em leveduras, foi capaz de gerar a formação de anticorpos anti-LTB em camundongos. Assim, foi demonstrado o papel adjuvante da LTB, corroborando com Conceição et al. (2003) e Purswani & Talwar (2011). Com o uso da LTB como proteína carreadora de uma única molécula de GnRH, notou-se ser suficiente na soroconversão do grupo GnRH em relação ao controle. A estratégia da construção foi diferente do trabalho de Oonk et al. (1998), que usou o peptídeo GnRH repetido em sequências idênticas, modificado em um aminoácido e conjugado com a ovoalbumina, foi eficaz para reduzir o peso dos testículos, os níveis séricos de LH e androstenona de suínos, proporcionando assim a melhoria na qualidade da carne desses animais.

O papel dos anticorpos gerados com a vacinação, foi avaliado quando comparou-se o grupo vacinado com LTB/GnRH e o grupo controle, percebendo a redução da espermatogênese e a degeneração dos túbulos seminíferos. A espermatogênese foi suprimida de forma significativa ($p<0,05$) no grupo vacinado com LTB/GnRH, possivelmente devido a redução da síntese e secreção dos hormônios LH, FSH pela hipófise, devido a ação do bloqueio imune contra a quimera. Em machos, a depleção da estimulação pelo FSH afeta significativamente a proliferação de espermatogônias e, assim, afeta de forma quantitativa os espermatócitos primários (SURESH et al., 1995). Além disso, evidências sugerem que a privação de FSH também afeta o processo de espermogênese, levando à produção de espermatozoides de baixa qualidade ou imaturos, resultando em infertilidade (LOPES et al., 2005). Esses resultados foram semelhantes ao estudo de Ladd et al. (1994), que vacinaram cães contra o GnRH e observaram azoospermia. A redução da testosterona, deve-se a ausência de um efeito “cascata” naturalmente causado pelo GnRH e é a principal causa da degeneração tubular dos testículos (AIRES, 1999). Essa redução, pode ter sido responsável pelas alterações encontradas nos testículos durante as avaliações histopatológicas dos animais imunizados, onde foi observado degeneração dos túbulos seminíferos, apresentando resultados semelhantes aos encontrados por Junaidi et al. (2009), que observaram efeitos histológicos pela supressão do GnRH por um agonista chamado Deslorelin.

O presente trabalho demonstrou o potencial imunocontraceptivo da proteína recombinante LTB/GnRH, entretanto, estudos complementares ainda se fazem necessários.

7.0 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados do presente estudo conclui-se que:

- A *P. pastoris* mostrou-se como um sistema viável de expressão da proteína LTB/GnRH;
- A LTB atingiu sua finalidade como molécula carreadora;
- A quimera apresentou potencial imunocontraceptivo em camundongos.

8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS

A proteína LTB/GnRH será testada em outras espécies de animais como ovinos, bovinos e suínos.

O estudo será repetido com uma amostragem maior de animais e testado em ambos os sexos.

A dosagem hormonal do LH, FSH e testosterona será realizada nos próximos experimentos.

Pretende-se testar um tratamento com uma vacina anti-GnRH comercial como controle.

Avaliar a reversibilidade das lesões causadas pela proteína LTB/GnRH.

9.0 REFERÊNCIAS

- ADAMS, T. E.; DALEY, C. A.; ADAMS, B. M.; SAKURAI, H.. Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone: effect of implants containing progesterone and estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 811-817, 1993.
- AIRES, M. de M.. **Fisiologia**. Ed. Guanabara Koogan. 2º edição. Rio de Janeiro, 1999. p. 934.
- AITKEN, R. J.. Immunocontraceptive vaccines for human use. **Journal Reproduction Immunology**, v. 57, p. 273-87, 2002.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; DONCEL, G. F.; MATZUK, M. M.; MAUCK, C. K.; HARPER, M. J.K.. As the world grows: contraception in the 21st century. **The Journal of clinical investigation**. v. 118, p. 1330–1343, 2008
- ARRUDA, A. **Utilização do promotor do gene PGK1 de Pichia pastoris para expressão heteróloga**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BARACAT, E. C.; LIMA, G. R. de.. **Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar de Ginecologia**. 1º edição. Editora: Manole, Barueri, 2005. 698 p.
- BIER, O. G.; MOTA, I.; SILVA, W. D. da.. **Imunologia Básica e Aplicada**. 4º Edição. Editora: Guanabara, Rio de Janeiro, 1989. 497 p.
- BONNEAU, M.; DUFOUR, R.; CHOUVET, C.; ROULET, C.; MEADUS, W.; SQUIRES, E. J.. The effects of immunization against luteinizing hormone- releasing

hormone on performance, sexual development, and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 14-20, 1994.

BONNEAU, M.; ENRIGHT, W. J.. Immunocastration in cattle and pigs. **Livestock Production Science**, v. 42, p. 193-200, 1995.

BROWN, K.; PRESCOTT, J.. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. **Canadian Medical Association Journal**, v.178, p. 399–401. 2008.

CANELAS, L. P.; SANTOS, G. DE A.; GURIDI, F.; RUMJANEK, V. M.; FREIRE, R. B.. Compostos Heterocíclicos Nitrogenados em Ácidos Húmicos Extraídos de Compostos de Resíduos Sólidos Urbano. **Floresta e Ambiente**. v. 6, n. 1, p.1 - 7, jan./dez. 1999.

CARSON, F. L.; HLADIK, C.. Histotechnology. A self-introductional text. **ASCP American Society for Clinical Pathology Press**. 3^a edição, 2009. 400 p.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J.. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CHENG, C. K.; LEUNG, P. C. K.. Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and Their Receptors in Humans. **Endocrine Reviews**, v. 26, p. 283-306, 2005.

CHIKWAMBA, R.; CUNNICK, J.; HATHAWAY, D.; MCMURRAY, J.; MASON, H.; WANG, K.. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). **Transgenic Research**, v.11, p. 479–493, 2002.

CONCEIÇÃO, F. R.. **Produção e avaliação de uma vacina de subunidade recombinante contra a pneumonia enzoótica suína /** Fabricio Rochedo Conceição; orientador Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2005. – 69f. : il. color –

Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

CONCEIÇÃO, F. R.; MICHELON, A.; MICHELON, M.; CERQUEIRA, G. M. DE; DELLAGOSTIN, O. A. LTB-R1: an alternative to swine mycoplasmal pneumoniae control. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 79-81, 2003.

CONCEICAO, F. R.; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A.. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734–5743, 2006.

CROWTHER, J. R.. **The ELISA Guidebook**. v. 149, editora Humana Press, New Jersey, EUA, 2001. 421 p.

CUI, X.; DUCKWORTH, J. A.; LUBITZ, P.; MOLINIA, F. C.; HALLER, C.; LUBITZ, W.; COWAN, P. E. Humoral immune responses in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) induced by bacterial ghosts expressing possum zona pellucida 3 protein. **Vaccine**, v. 28, p. 4268-4274, 2010.

CUI, X; DUCKWORTH, J. A.; MOLINIA, F. C.; COWAN, P.E. Identification and evaluation of an infertility-associated ZP3 epitope from the marsupial brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Vaccine**. v. 28, p.1499-505, 2009.

da HORA, V. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; DOOLANA, D. L.. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v. 29, p. 1538-1544, 2011.

DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of Molecular Recognition**, v. 18, p. 119-138, 2005.

DONALD, L.; THOMPSON, J.R.. Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 459-469, 2000.

DUMMER, L. A.; CONCEICAO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; MORAES, C. M.; ROCHA, A. DA S. R.; SOUZA, L. L. DE; ROOS, T. B.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L.. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, p. 84-90, 2009.

EasySelect™ Pichia Expression Kit (Version I, Cat. N°. K1740-01 25-0172, Invitrogen®) 2009.

European Medicines Agency. **Relatório Público Europeu de Avaliação**. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000035/WC500066138.pdf. Acesso em: 15 de maio de 2009.

FAVI C., M.; RODRIGUEZ A., L.; ESPINOSA M., C.; YUNG P., V.. Rabia en Chile. 1989-2005. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 25, p. 8-13, 2008.

FAYRER-HOSKEN, R. Controlling animal populations using anti-fertility vaccines, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 179–185, 2008.

FERNANDES, C. A. C.; OBA, E.; FERREIRA, A. M.; URIBE-VELAQUEZ, L. F.; VIANA, J. H. M.. Number of ovulations and progesterone profile in bovine females immunized against swine follicular fluid. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54 nº 6, p. 595-601, 2002.

FERRO, V. A.; KHAN, M. A.; MCADAM, D.; COLSTON, A.; AUGHEY, E.; MULLEN, A. B., WATERSTON, M. M.; HARVEY, M. J.. 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.

FRAYNE, R. J.; HALL, L.. Review The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. **Journal of Reproductive Immunology**. v. 43, p. 1–33, 1999.

FREITAS, F. de; KRUSE, W.; RIVOIRE, W.; MENKE, C. H.. **Rotinas em ginecologia.** 2º edição revista. Editora: Artes Médicas, Porto Alegre, 1990. 254 p.

FREITAS, F.; MENKE, C. H.; RIVOIRE, W.; PASSOS, E. P. I.. **Rotinas em Ginecologia.** 4º edição. Editora: Artmed, Porto Alegre, 2001. 496 p.

Global Health Council. Woman's Health. Disponível em:
http://www.globalhealth.org/view_top.php3?id=225. Acesso em: 03 de março de 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E.. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11º edição. Editor Elsevier. Rio de Janeiro, 2006. p. 996-1041.

HARDY, C.M., Current status of virally vectored immunocontraception for biological control of mice, **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v. 63, p. 495–506, 2007.

HARDY, C.M.; BRAID, A.L. Vaccines for immunological control of fertility in animals. **Revue Scientifique Technique**, v. 26, p. 461-70, 2007.

HARRIS, J. D.; SEID, C. A.; FONTENOT, G. K.; LIU, H. F.. Expression and Purification of Recombinant Human Zona Pellucida Proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 16, p. 298–307, 1999.

HARRISON, P.F.; ROSENFIELD, A. Contraceptive research and development: looking to the future. **Institute of Medicine Report**. National Academy Press. Washington, DC, USA. p. 519, 1996.

HARTNER, F.S.; GLIEDER, A.. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 39, 2006.

HARTWIG, D. D.; OLIVEIRA, T. L.; SEIXAS, F. K.; FORSTER, K. M.; RIZZI, C.; HARTLEBEN, C. P.; MCBRIDE, A. J. A.; DELLAGOSTIN, O. A.. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 98, 2010.

HE, Y.; XU, W.; HONG, A.; LIAO, M.; JI, C.; GU, S.; CHEN, J.; XIE, Y.. Immunogenic comparison for two different recombinant chimeric peptides (CP12 and CP22) containing one or two copies of three linear B cell epitopes from β -hCG subunit. **Journal of Biotechnology**, v. 151, p. 15-21, 2011.

HOFFMEISTER, B.; GLAESER, S.; FLICK, H.; PORNSCHLEGEL, S.; SUTTORP, N.; BERGMANN, F.. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76 p. 600-602, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. **Boletim da Propriedade Industrial**. n° 051, 2011.

JIN, H.; LIU, G.; YE, X., DUAN, Z.; LI, Z.; SHI, Z.. Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 91–98, 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.

JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P. E.; TRIGG, T. E.; CUMMINS, J. M.; MARTIN, G. B.. Morphological Study of the Effects of the GnRH Superagonist Deslorelin on the Canine Testis and Prostate Gland. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 757–763, 2009.

KIRKPATRICK, J. F.; ROWAN, A.; LAMBERSKI, N.; WALLACE, R.; FRANK, K.; LYDA, R.. The practical side of immunocontraception: zona proteins and wildlife. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, p. 151-157, 2009.

LADD, A., TSONG, Y., WALFIELD, A.; THAU, R.. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. **Biology of Reproduction**, v.51, p.1076-1083, 1994.

LEVY, J. K.. Contraceptive Vaccines for the Humane Control of Community Cat Populations. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, 63-70, 2011.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S.; ANDRÉONI, C.. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. **Journal of Immunological Methods**, v. 210, p. 125-135, 1997.

LOPES, C. A. P.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; FIGUEIREDO, J. R. de. Imunocontracepção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, p. 159-166, 2005.

MAIA, G. D.. **Embriologia Humana**. Editora Atheneu. São Paulo, 2002. 115 p.

MCDERMOTT, M. T.. **Segredos em endocrinologia: respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos**. Trad. Célia Beatriz Fischmann. Editora Artes Médicas. Porto Alegre, 1997. p. 352.

MCLAUGHLIN; E. A.; AITKEN, R.J.. Is there a role for immunocontraception? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, p. 78-88, 2011.

MEEUSEN, E. N. T.; WALKER, J.; PETERS, A.; PASTORET, P.-P. JUNGERSEN, G.. Current Status of Veterinary Vaccines. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, nº. 3, p. 489–510, 2007.

MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 3476-3482, 2001.

MILLER, L. A.; JOHNS, B. E.; KILLIAN, G. J.. Immunocontraception of White-Tailed Deer with GnRH Vaccine. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 44, p. 266-274, 2000.

MILLER, L. A.; TALWAR, G. P.; KILLIAN, G. J.. Contraceptive Effect of a Recombinant GnRH Vaccine in Adult Female Pigs. **Published at Universit of California**, Davis. p. 106-109, 2006.

NASS, S. J.; STRAUSS, J. F. New frontiers in contraceptive research: a blueprint for action. **Institute of Medicine report**. National Academy Press. Washington, DC, USA. p. 232, 3rd, 2004.

National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em: 19 de março de 2009.

NAZ, R. K. Development of genetically engineered human sperm immunocontraceptives. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, p.145-50. 2009.

NAZ, R. K.. Status of Contraceptive Vaccines. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, 11-18, 2008.

NAZ, R. K.; GUPTA, S. K.; GUPTA, J. C.; VYAS, H. K.; TALWAR, G. P.. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. **Human Reproduction**, v.20, nº.12 p. 3271–3283, 2005.

OIEN, N. L.; BRIDEAU, R. J.; WALSH, E. E.; WATHEN, M. W. Induction Of Local And Systemic Immunity Against Human Respiratory Syncytial Virus Using A Chimeric Fg Glycoprotein And Cholera-Toxin B-Subunit. **Vaccine**, v. 12, p. 731-735, 1994.

OLAH, G. A. Beyond oil and gas: the methanol economy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 2636–2639, 2005.

OONK, H. B.; TURKSTRA, J. A.; SCHAAPEL, W. M. M.; ERKENS, J. H. F.; SCHUIITEMAKER-DE WEERD, M. H.; VAN NES, A.; VERHEIJDEN, J. H. M.; MELOEN, R. H.. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient

immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH. **Vaccine**. Volume 16, p. 1074-1082, 1998.

PARKINSON, R. J.; SIMMS, M. S.; BROOME, P.; HUMPHREYS, J. E.; BISHOP, M. C.. A vaccination strategy for the long-term suppression of androgens in advanced prostate cancer. **European Urology**, v. 45, p. 171-174, 2004.

PICKLES, K. J.; BERGER, J; DAVIES, R; ROSER, J; MADIGAN, J. E. Use of a gonadotrophin releasing hormone vaccine in headshaking horses. **Veterinary Record**, v. 168, 168-119, 2001.

PINTO L. S.; NAGANO C. S.; OLIVEIRA T. M.; MOURA T. R.; SAMPAIO A. H.; DEBRAY H.; PINTO V. P.; DELLAGOSTIN O. A.; CAVADA B. S.. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from Bauhinia variegata seeds. **Journal of Biosciences**. v. 33. p. 355-363, 2008.

PURSWANI, S.; TALWAR, G. P. Development of a highly immunogenic recombinant candidate vaccine against human chorionic gonadotropin. **Vaccine**, v. 29, p. 2341–2348, 2011.

QUESNELL, M. M.; ZHANG, Y.; DE AVILA, D. M.; BERTRAND, K. P.; REEVES, J. J. Immunization of Male Mice with Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Fusion Proteins Reduces Testicular and Accessory Sex Gland Function. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 347–353, 2000.

RANDALL, D.; BURGREEN, W.; FRENCH, K.. **Fisiologia animal – Mecanismos e adaptações**. Ed. Guanabara Koogan. 4° edição. Rio de Janeiro, 2000. p. 764.

Report of the American Veterinary Medical Association. **Panel on euthanasia**. v. 218, n° 5, 2001. p. 696.

REVEL, A.; MOSHE, N.; HELMAN, A.; SAFRAN, A.; SIMON, A.; KOLER, M.; Mouse embryos generated from frozen-thawed oocytes can successfully survive a second cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 19, p. 666-669, 2004.

- SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W.. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 1448.
- SAMOYLOVA, T. I.; COX, N. R.; COCHRAN, A. M.; SAMOYLOV, A. M.; GRIFFIN, B.; BAKER, H. J.. ZP-binding peptides identified via phage display stimulate production of sperm antibodies in dogs. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 151-157, 2010.
- SCHALLY, A.V.; ARIMURA, A.; BABA, Y.. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 43, p. 393-399, 1971.
- SCHROER, K.; LUEF, K. P.; HARTNER, F. S.; GLIEDER, A.; PSCHEIDT, B.. Engineering the *Pichia pastoris* methanol oxidation pathway for improved NADH regeneration during whole-cell biotransformation. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 8–17, 2010.
- SILVA, W. D. DA; MOTA, I.. **Imunologia Básica e Aplicada**. Ed. Guanabara Koogan. 5° edição. Rio de Janeiro, 2003. p. 400.
- STEVENS, V. C.. Progress in the development of human chorionic gonadotropin antifertility vaccines, **American Journal of Reproductive Immunology**, v.35, p. 148–155, 1996.
- SUN, Z; JIN, F; LI, Y; ZHANG, J. Immunocontraceptive effect of DNA vaccine targeting fertilin β in male mice. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 282–290, 2010.
- SURESH, R.; MEDHAMURTHY, R.; MOUDGAL, N. R.. Comparative studies on the effects of specific immunoneutralization of endogenous FSH or LH on testicular germ cell transformations in the adult bonnet monkey (*Macaca radiata*). **American Journal of Reproductive Immunology**, v.34, p.35-43, 1995.
- SWERDLOW, R. D.; EBERT, R. F.; LEE, E. P. BONAVENTURA, C.; MILLER, K. I.. Keyhole Limpet Hemocyanin: Structural and Functional Characterization of Two

Different Subunits and Multimers. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 113 p. 537-548, 1996.

TALWAR, G. P. ; SINGH , O., PAL, R.; CHATTERJEE, N.; SAHAI, P.; DHALL, K.; KAUR, J.; DAS, S. K., SURI, S., BUCKSHEE, K.; SARAYA L.; SAXENA, B. N.. A vaccine that prevents pregnancy in women, **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 8532–8536, 1994.

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.158-63, 2009.

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 hCGSubunits. **Journal of reproductive immunology**, v. 66, p. 26-39, 2011.

TANAGHO, E. A.; MCANINCH, J. W.. **Urologia Geral de Smith**. 16° Edição. Editora: Manole, Barueri, 2007. 844 p.

TARDIF, S.; CORMIER, N. Role of Zonadhesin during Sperm-egg interaction: a Species-Specific Acrosomal Molecule with multiple functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 24863-24870, 2010.

TESARIK, J.. Targeting the zona pellucida for immunocontraception: a minireview. **Reprodução Humana**, v. 10, p. 132-139, 1995.

TUYTTENS, F. A. M.; VANHONACKER, F.; VERHILLE, B.; DE BRABANDER, D.; VERBEKE, W.. Pig producer attitude towards surgical castration of piglets without anesthesia versus alternative strategies. **Research in Veterinary Science**, doi:10.1016/j.rvsc.2011.02.017, 2011.

U. S. Census Bureau. World POPClock Projection. Disponível em: <http://www.census.gov/ipc/www/popclockworld.html>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2011.

UniProt. P01148. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01148>. Acesso em: 29 de junho de 2009.

United States Department of Agriculture. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/wildlife_damage/nwrc/research/reproductive_control/gonacon.shtml. Acesso em: 09 de fevereiro 2011.

VAN DER KLEI, I.J., YURIMOTO, H., SAKAI, Y.; VEENHUIS, M.. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, p. 1453–1462, 2006.

VERWEIJ, W. R.; HAAN, L.; HOLTROP, M.. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: Induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, v. 16, p. 3476-3482, 1998.

WALCHER, P.; CUI, X.; ARROW, J. A.; SCOBIE, S.; MOLINIA, F. C.; COWAN, P. E.; LUBITZ, W.; DUCKWORTH, J.A. Bacterial ghosts as a delivery system for zona pellucida-2 fertility control vaccines for brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). **Vaccine**, v. 26, p. 6832–6838, 2008.

WANG, D.; HUANG, T.; XIE, Q.; AN, G.. Investigation of recombinant mouse sperm protein Izumo as a potential immunocontraceptive antigen. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 225-234, 2008.

WANG, J. Y.; HA, Y.; GAO, C. H.; WANG, Y.; YANG, Y. T.; CHEN, H. T.. The prevalence of canine Leishmania infantum infection in western China detected by PCR and serological tests. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 4-69, 2011.

Welfare Aspects of the Castration of Piglets. Scientific Report of the Scientific Panel for Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare aspects of the castration of Piglets. **The EFSA Journal**, n° 91, 1-18. 2004.

WORMALD, P. J.; ABRAHAMSON, M. J.; SEEBURG, P. H.; NIKOLICS, K.; MILLAR, R. P.. Prolactin-inhibiting activity of GnRH associated peptide in cultured human pituitary cells. **Clinical Endocrinology**, v. 30, p. 149–155, 1989.

YODER, C. A.; MILLER, L. A.. Effect of GonaCon™ vaccine on black-tailed prairie dogs: Immune response and health effects. **Vaccine**, v. 29, p. 233-239, 2010.

ZEE, A. V. D.; NOORDEGRAAFT, C. V.; BOSCH, H. V. D.; GELEN, J.; BERGMANS, H.; HOEKSTRA, W.; DIE, I. V.. P-fimbriae of *Escherichia coZi* as carriers for gonadotropin releasing hormone: development of a recombinant contraceptive vaccine. **Vaccine**, vol. 13, p. 753-758, 1995.

ZENG, X. Y.; TURKSTRA, J. A.; TSIGOS A.; MELOEN, R. H.; LIU, X. Y.; CHEN, F. Q.; SCHAAPEL, W. M. M.; OONK, H. B. (RIA); GUO, D. Z.; WIEL, D. F. M. VAN DE. Effects of active immunization against GnRH on serum LH, inhibin A, sexual development and growth rate in Chinese female pigs. **Theriogenology**, v. 58, p. 1315-1326, 2002.