

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DE DUAS VACINAS
BASEADAS NO GnRH SUÍNO COM POTENCIAL USO EM
IMUNOCASTRACÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Angélica Teresinha Andreetta

**Passo Fundo, RS, Brasil
2017**

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DE DUAS VACINAS
BASEADAS NO GnRH SUÍNO COM POTENCIAL USO EM
IMUNOCASTRACÃO

Angélica Teresinha Andretta

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

**Orientador: Prof. Eraldo
Lourenso Zanella**

**Passo Fundo, RS,
Brasil 2017**

CIP – Catalogação na Publicação

A558d Andreetta, Angélica Teresinha

Desenvolvimento e avaliação imunogênica de duas vacinas baseadas no GnRH suíno com potencial uso em imunocastração / Angélica Teresinha Andreetta. – 2017.

49 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. PhD. Eraldo Lourenso Zanella.

Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Suíno. 2. Vacinas. 3. Castração. I. Zanella, Eraldo Lourenso, orientador. II. Título.

CDU: 636.4

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE MESTRADO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DE DUAS VACINAS BASEADAS
NO GnRH SUÍNO COM POTENCIAL USO EM IMUNOCASTRACÃO**

Elaborada por
Angélica Teresinha Andreetta

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

Eraldo Lourenso Zanella, PhD, UPF

(Presidente)

Rafael Frandoloso, PhD. UPF

Ricardo Zanella, Dr. UPF

Passo Fundo, RS, Brasil

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu namorado Wilian Bouvier pelo incentivo, companheirismo, compreensão, carinho e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, pelo incentivo, compreensão e apoio incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eraldo Lourenso Zanella, pelo incentivo, pela paciência, pela confiança depositada em mim, pelas horas dedicadas a esclarecer minhas dúvidas em algumas questões relevantes para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. PhD Rafael Frandoso pelo constante incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade, interlocutor interessado em participar de minhas inquietações e co-autor em vários trechos, a realização desse trabalho não seria possível sem o seu apoio.

Ao prof. PhD Luiz Carlos Kreutz, pela oportunidade, incentivo e apoio. A prof. Adriana da Costa Motta pelo incentivo, e compreensão e a todos os docentes do programa de mestrado PPGBIOEXP, pelo incentivo e ensinamentos passados.

A Universidade de Passo Fundo pela concessão da Bolsa de estudos, fundamental nestes dois anos.

A chefia do Serviço de Hemoterapia do Hospital São Vicente de Paulo, pelo incentivo, por disponibilizar horas para cursar o mestrado.

A equipe do biotério da UPF, que cuidou dos animais utilizados na minha pesquisa, ao longo do experimento.

Aos meus colegas de mestrado, Ana Paula Andreolla e João Antonio Guizzo, que me acompanharam durante estes dois anos, sendo exemplos de dedicação, sempre me oferecendo, incentivo e auxílio.

Gostaria de agradecer aos bolsistas e funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada da UPF, em especial a Natalia Balbinotti, a bolsista Simone Ramos Ribeiro e a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que eu pudesse concluir esse importante trabalho.

Meu sincero muito obrigada!

DEDICATÓRIA

Dedico esta pesquisa a **DEUS** que sempre guiou meus pensamentos, atos e palavras, aos meus pais **Eduardo Domingos Andretta** e **Neide Beccari Andretta** obrigada por terem me dado à vida, por nunca dizer que ela seria fácil, por me educarem e por me fazer entender que os meus valores são o que de mais importante eu tenho.

“A vitória sobre as dificuldades, é a grande descoberta do homem a respeito de si mesmo. A felicidade não foi prometida ao homem como uma dádiva. Ela é, essencialmente, uma conquista. Mas para chegar a ela é necessário lutar, transpor muitos obstáculos, ter paciência, esperar. A felicidade é como uma obra de artesanato: fio por fio, fibra por fibra. Ela não nasce feita, ela se faz, minuto a minuto na prática do bem, na paz da consciência. Mas quando ela chega, é para ficar, é sua, definitivamente sua”

(J.S. Nobre)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Mercado da Carne Suína	16
2.2 Funções Testiculares.....	16
2.3 Imunocastração.....	17
2.3.1 Caracterização.....	18
2.3.2 Mecanismo de ação e reflexos da utilização.....	18
2.3.3 Imunização contra o GnRH.....	19
3. CAPÍTULO 1. Caracterização clínica e imunológica de duas vacinas baseadas no GnRH suíno recombinante	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Metodologia.....	26
Resultados.....	29
Discussão.....	31
Conclusões.....	33
Referências.....	34
4. CONCLUSÕES	37
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
6. REFERÊNCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1. Análise da expressão da proteína constructCTBsGnRh7-24His por meio de SDS-PAGE 10%. Amostras coletadas nos tempos 0h (controle da expressão antes da indução por IPTG) e *overnight* de expressão da proteína (linha 1 e 2, respectivamente) e extrato bacteriano pós-purificação com coluna *HisTrap* (linha 3). M: marcador de peso molecular.....40
- FIGURA 2. Análise da expressão da proteína Construct007 por meio de SDS-PAGE 10%. Amostras coletadas nos tempos 0h (controle da expressão antes da indução por IPTG) e *overnight* de expressão da proteína (linha 1 e 2, respectivamente) e extrato bacteriano pós-purificação com coluna *HisTrap* (linha 3). M: marcador de peso molecular.....41
- FIGURA 3. Resposta de anticorpos anti-GnRH em ratos wistar imunizados com dois imunogenos (n = 12). Os ratos machos, com cinco animais por grupo e dois controles, foram imunizados via intramuscular com dois imunogénos, duas doses, com intervalo de 21 dias. As amostras foram coletadas em três momentos distintos, dia 0 (antes de aplicar a 1^o dose da vacina), dia 21 após a segunda imunização e dia 42 (21 dias após a aplicação da segunda dose). Os soros coletados foram submetidos ao teste de ELISA ($p < 0.05$).....42
- FIGURA 4. Caracterização da proteína Construct007 e da constructCTBsGnRh7-24His por *Western Blot*. As proteínas purificadas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com 1 amostra de soro de rato não imunizado no dia 0 (linha 1), 2 amostras de soros de ratos pós inoculação para Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His (linhas 2 e 3) dia 42, respectivamente..... 43

- FIGURA 5. Efeito dos anticorpos anti-GnRH nos testículos e epidídimo dos ratos. A- Morfologia dos testículos de ratos imunizados com: a- PBS+Montenide Gel 01 (controles), b- constructCTBsGnRH7-24His, c- Construct007. B- Comparação do total de peso dos testículos dos ratos imunizados com PBS, constructCTBsGnRh7-24Hi e Construct007..... 44
- FIGURA 6. Avaliação histopatológica dos testículos e epidídimo dos ratos. As imagens microscópicas representadas pelas letras A e B referem-se ao grupo Controle, C e D ao grupo tratado com constructCTBsGnRH7-24His, E e F ao grupo tratado Construct007. HE, 100 e 400X..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

D.O.	Do inglês <i>optical density</i> ou densidade ótica;
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay (Ensaio Imuno Enzimático)
H	Hora
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
LH	Hormônio Luteinizante
IgG	Imunoglobulina G
Kb	Kilobases
kDa	Kilodáton
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Kg	Kilograma
M	Miligramas
Mm	Milimetro
mM	Milimolar
min.	Minuto
M	Molar
Nm	Nanômetro
n°	Número

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO IMUNOGÊNICA DE DUAS VACINAS BASEADAS NO GnRH SUÍNO COM POTENCIAL USO EM IMUNOCASTRACÃO

Autor: Angélica T. Andreetta
Orientador: Eraldo Lourenso Zanella
Passo Fundo, 31 de Julho de 2017

O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) tem como principal função atuar na regulação da reprodução de vertebrados. A imunização ativa contra o GnRH tem sido utilizada estrategicamente para neutralizar o GnRH endógeno e promover a imunocastração dos animais vacinados. Este método substitui a castração cirúrgica e aumenta a qualidade de vida dos animais. Neste trabalho, apresentamos o desenvolvimento e a avaliação de duas vacinas experimentais baseadas no GnRH suíno com potencial de neutralização do GnRH endógeno de ratos. Os genes codificantes das proteínas recombinantes Construct007 (carreador 001 + GnRH) e constructCTBsGnRh7-24His (carreador 002 + GnRH) foram sintetizados pela empresa Amplicon Vaccine (Pullman, USA) e clonados no vetor de expressão pET24. Em seguida, as construções foram transformadas quimicamente em *Escherichia coli* cepa ER2566 e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida *overnight* com IPTG. Após lise celular, procedeu-se a purificação das proteínas mediante cromatografia líquida de proteína utilizando uma coluna carregada com íons de níquel. Após a diálise das proteínas em PBS (pH 7,2), as vacinas experimentais foram formuladas com 50 µg dos antígenos puros potencializados com 15% de adjuvante Montanide Gel 01 (Seppic, França). Um total de 12 ratos Wistar, machos adultos, foram aleatoriamente separados em 3 grupos. Os dois primeiros grupos foram imunizados pela via intramuscular com a vacina Construct007 ou constructCTBsGnRh7-24His. O terceiro grupo foi inoculado com PBS + Montanide Gel 01. O protocolo de vacinação consistiu em 2 doses com intervalo de 21 dias. Clinicamente, avaliou-se a inocuidade das formulações e o desenvolvimento testicular (tamanho e peso dos testículos), e imunologicamente a capacidade das vacinas de induzirem anticorpos anti GnRH suíno. Os animais imunizados com vacina baseada na proteína Construct007 apresentaram títulos de anticorpos significativamente superiores em comparação com aqueles que foram vacinados com proteína recombinante constructCTBsGnRh7-24His. Clinicamente, a resposta de anticorpos induzida pela vacina Construct007 foi capaz de neutralizar o GnRH endógeno de ratos, reduzindo significativamente o desenvolvimento testicular destes animais em comparação com os animais controles (PBS + Montanide Gel 01), bem como, em comparação com aqueles vacinados com a

proteína constructCTBsGnRh7-24His. Levando em consideração a inocuidade e a capacidade funcional de bloqueio do GnRH induzida pela formulação Construct007, torna-se evidente o potencial uso desta vacina experimental em um futuro estudo de imunização na espécie alvo. Esta dissertação contém dados potencialmente patenteáveis e que devem ser mantidos em sigilo até sua tramitação junto as agências regulatórias de patentes nacionais e internacionais

Palavras-chave: GnRH , Vacinas, Suínos, imunocastração.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**DEVELOPMENT AND IMMUNOGENIC EVALUATION OFF TWO VACCINES BASED
ON GnRH PIGS WITH POTENTIAL USE IN IMUNOCASTRATION**

Author: Angélica T. Andreetta
Advisor: Eraldo Lourenso Zanella
Passo Fundo, 31 de July de 2017

Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) has as its main function regulate the reproduction of vertebrates. Active immunization against GnRH has been used strategically to neutralize endogenous GnRH and to promote immunocastration of vaccinated animals. This method replaces surgically castrated and increases the quality of life of the animals. In this work, we present the development and evaluation of two experimental vaccines based on swine GnRH with the potential to neutralize endogenous GnRH in rats. The genes encoding the recombinant proteins Construct007 (carrier 001 + GnRH) and constructCTBsGnRh7-24His (carrier 002 + GnRH) were synthesized by Amplicon Vaccine (Pullman, USA) and cloned into the expression vector pET24. Thereafter, the constructs were chemically transformed into Escherichia coli strain ER2566 and the expression of the recombinant proteins was induced overnight with IPTG. After cell lysis, the proteins were purified by liquid protein chromatography using a column loaded with nickel ions. After dialysis of the proteins in PBS (pH 7.2), the experimental vaccines were formulated with 50 µg of the pure antigens potentiated with 15% Montanide Gel 01 adjuvant (Seppic, France). A total of 12 male adult Wistar rats were randomly separated into 3 groups. The first two groups were immunized intramuscularly with either the Construct007 or constructCTBsGnRh7-24His vaccine. The third group was inoculated with PBS + Montanide Gel 01. The vaccination protocol consisted of 2 doses with a 21 day interval. Clinically, the safety of formulations and testicular development (testis size and weight), and immunologically the ability of vaccines to induce anti-GnRH pig antibodies were evaluated. Animals immunized with Construct007-based vaccine showed significantly higher antibody titers compared to those vaccinated with recombinant constructCTBsGnRh7-24His protein. Clinically, the antibody response induced by the Construct007 vaccine was able to neutralize the endogenous GnRH of rats, significantly reducing the testicular development of these animals compared to control animals (PBS + Montanide Gel 01), as well, compared to those vaccinated with the constructCTBsGnRh7-24His protein. Taking into account the safety and functional blocking ability of GnRH induced by the Construct007 formulation, it becomes evident the potential use of this experimental vaccine in a future study in the immunization target species. This dissertation contains data that are potentially patentable and should be kept confidential until

they are processed by patent and international regulatory agencies.

Key words: GnRH, Vaccines, Swine, immunocastration.

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista o cenário crescente de consumo de proteína animal, identificado nos últimos anos, no Brasil, a escolha pela carne suína segue essa tendência de alta, principalmente pelo esclarecimento levado a população através de campanhas e incentivos, impulsionados por um incremento na produção deste tipo de carne nos pais. Este mercado que se demonstra favorável à aceitação da carne suína, o aumento do consumo *per capita* mostra-se como um desafio para a cadeia produtiva, considerando que, conjuntamente, com esse significativo aumento existe, por parte do mercado consumidor, expectativas e necessidades, tendo peso significativo no momento da escolha da fonte proteica (1,2).

A carne do suíno macho inteiro possui odor e gosto desagradáveis, em razão, principalmente, da presença de androsterona e escatol. Essas duas substâncias, quando da aplicação da castração cirúrgica, tem seus níveis de presença no organismo reduzida e, em alguns casos, eliminada; entretanto, o emprego da castração tradicional, realizada cirurgicamente, vem sendo observada e, no que diz respeito a alguns países, desincentivada em detrimento da imunocastração (3,4 e 5).

Portanto, preocupações com o bem estar animal e maior rendimento de carne magra, bem como carne livre de odor sexual, pressionam a cadeia de produção de suínos a abandonar a castração cirúrgica.

Desta forma tem-se como tradicional a castração cirúrgica, que tem como objetivo entregar carne de melhor aspecto olfativo ao consumidor, visando eliminar o odor desagradável da carne de machos inteiros, característica esta que é exigência por parte dos frigoríficos que visam produzir carcaças com melhor aceitação.

Dentre os diversos métodos de castração existentes, a castração cirúrgica é largamente mais utilizada que as demais, por ser um método tradicional. Entretanto, por diversas vezes é empregado sem o uso de anestésicos e em condições de higiene não aceitáveis, é um procedimento que demanda cuidados e experiência para ser empregado, dentre outros fatores, a castração cirúrgica é um método que tem como características a de causar sofrimento e dor ao animal (3).

Tendo este fato como premissa, é grande a preocupação e o empenho em pesquisar novos métodos que sirvam de alternativa ao tradicional, visando melhorar o bem estar animal, esperando minimizar o sofrimento e dor que a castração cirúrgica causa. Neste ponto, como alternativa ao método tradicional, pode-se empregar a vacinação contra hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que surge como opção, que tem por objetivo principal neutralizar o GnRH endógeno e promover a imunocastração dos animais vacinados, proporcionando melhor bem estar aos animais

vacinados. O desenvolvimento testicular, e crescimento, em suínos é estritamente relacionado e dependente da liberação hormônio liberador de gonadotrofinas GnRH. De outro modo, o atraso no desenvolvimento testicular é verificado quando o GnRH endógeno é suprimido (6,7 e 8).

Durante as últimas quatro décadas, várias tentativas foram feitas para desenvolver vacinas de esterilização usando como antígeno o GnRH, essas vacinas puderam ser utilizadas para inúmeras práticas clínicas. A primeira vacina 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 adjuvante oleoso. Em 1998 foi lançada uma vacina para suínos contra o GnRH (IMPROVAC), que foi inicialmente comercializada na Austrália e na Nova Zelândia. A vacina que recebeu o nome de Vivax® ou Improvac® teve lançamento territorial em 2007, com registro datado de dois anos antes (9).

Pesquisas demonstram o emprego de vacinas experimentais que têm demonstrado elevada eficiência no que diz respeito à imunocastração, em características como odor característico de suínos inteiros e o desenvolvimento sexual dos mesmos. Em contrapartida, existem poucas opções de vacinas que tem como objetivo a imunocastração, um agravante que eleva seu preço e torna de difícil acesso aos produtores.

Desta forma, o presente estudo tem como objetivos desenvolver duas proteínas experimentais baseadas no GnRH suíno, imunizar e avaliar a resposta de anticorpos anti-GnRH, em ratos, e analisar o efeito dessa imunização nos testículos dos mesmos, demonstrando possível utilização na espécie alvo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mercado da carne Suína

O atual mercado mundial de carnes é dividido, principalmente, entre as carnes bovina, suína e de frango, observa-se então diferentes graus de consumos quanto a estes tipos específicos de carne, sendo, respectivamente, mais consumidas as de suínos, aves e bovinos. No ano de 2014, levando em consideração o consumo mundial de carne suína, chega-se a soma de 109.954 mil toneladas, seguido pelo segundo colocado em demanda 84.668 mil toneladas de frango e o terceiro colocado considerando a quantidade de carne consumida mundialmente que traduz-se na soma de 57.629 mil toneladas de carne bovinos (4,5).

Os principais players do mercado de exportação de carne suína são os Estados Unidos, União Europeia, Canadá e o Brasil. No que se refere à exportação de carne de frango, temos como grandes exportadores o Brasil, os Estados Unidos, União Europeia e a Tailândia. De carne bovina temos Índia, Brasil, Austrália e os Estados Unidos (4,5).

Analisando os exportadores, somente o Brasil e os Estados Unidos fazem parte de um seletor grupo que tem participação relevante na exportação dos grupos de carnes mais consumidos. Desde os anos 2000, no que diz respeito a carne suína, o Brasil mantém-se como quarto maior exportador, sendo que no ano citado os Estados Unidos foram o terceiro maior, com o decorrer do mercado e incremento na produção e mercados de exportação, atualmente, o cenário encontra-se com os EUA detendo a primeira colocação no ranking de exportação de carne suína no mundo (4,5).

A carne do suíno macho inteiro possui odor e gosto desagradáveis, em razão, principalmente, da presença de androsterona e escatol (2). Essas duas substâncias são reduzidas ou, até mesmo, eliminadas com a realização da castração cirúrgica; mas em diversos países esse tipo de cirurgia está sendo proibida para melhorar o bem-estar dos animais.

Portanto, preocupações com o bem estar animal e maior rendimento de carne magra, bem como carne livre de odor sexual, pressionam a cadeia de produção de suínos a abandonar a castração cirúrgica.

2.2 Funções Testiculares

Os testículos detêm um papel relevante no que diz respeito à gametogênese (função exócrina), em complemento a isto, fazem o papel de glândulas endócrinas por meio de suas células intersticiais (células de Leydig). Levando em consideração o aspecto químico, hormônios sexuais consistem em compostos esteroides, atuando no crescimento e na reprodução dos vertebrados, impactando também em seu comportamento, metabolismo e desenvolvimento. O desenvolvimento

testicular, e crescimento, em suínos é estritamente relacionado e dependente da liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas GnRH. De outro modo, o atraso no desenvolvimento testicular é verificado quando o GnRH endógeno é suprimido (6).

2.3 Imunocastração

2.3.1 Caracterização

O odor sexual está ligado ao desenvolvimento fisiológico, que leva à maturidade sexual dos suínos machos inteiros e que tem efeito significativo na qualidade da carne suína. Este processo se inicia na puberdade, onde ocorre um aumento expressivo na produção de hormônios que definem as características reprodutivas secundárias, sendo o principal fator responsável, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH.).

O GnRH, é um hormônio produzido no hipotálamo, é o encarregado de desencadear a produção de gonadotrofinas (LH e FSH) na hipófise anterior, atua nas gônadas, incitando o aumento testicular e espermatogênese, dentre outras funções. O LH, nos testículos, é o responsável por atuar na produção de esteroides, entretanto, diversos destes esteroides não desempenham função anabolizante, de outro modo, são causadores do odor e sabor característicos na carne de machos (7).

Segundo Dunshea et al. (2001) e Tonietti (2008), suínos começam acumular substâncias em seu tecido adiposo, principalmente nas fases peri e pós púbere; substâncias como escatol e androsterona, que em machos inteiros são também responsáveis por odor característico. A androsterona é um esteroide sintetizado nos testículos dos suínos que atingiram a sua maturidade sexual, secretada e transportada via corrente sanguínea para as glândulas salivares, onde se une a uma proteína denominada feromoxeína, sintetizada nessa glândula. Após ser liberada na saliva age como um ferormônio, que são compostos voláteis de extrema importância na transmissão das informações sexuais, principalmente na indução do estro nas fêmeas, para que ocorra o acasalamento. O escatol produto da degradação bacteriana do triptofano no intestino delgado, e absorvido no intestino delgado, é metabolizado no fígado e parcialmente excretada pela urina, o restante é transportado pelo mesmo carreador comum da androsterona no sangue. O escatol apresenta intenso odor fecal e é considerado altamente sinérgico ao odor desagradável da androsterona.

O odor identificado na carne de machos inteiros reduz a qualidade da mesma provocando sua rejeição (7), entretanto seja interessante ressaltar que o gosto e sensibilidade de cada consumidor seja fator relevante para resposta de mercado de consumo deste produto, podendo então refletir no que tange as respostas e aceitação pelo mercado. Um item que corrobora com o exposto é que consumidores irlandeses, americanos, ingleses e canadenses, tendem a aceitar de melhor forma a carne de suínos inteiros, ao passo que isso é de mais difícil aceitação para consumidores da Espanha, França, Suécia e Holanda (10). Assim, itens a relação de odor e carne de suínos machos

que gera rejeição, buscam-se alternativas para evitar que este ocorra, tem-se em conta que o método mais difundido é o da castração cirúrgica antes da desmama (7).

Com o intuito de abreviar a presença de odor na carne de machos inteiros, suínos em seus primeiros dias de vida, passam por um processo cirúrgico para que seus testículos sejam removidos, após a passagem por este procedimento, são então denominados por machos castrados ou machos cirurgicamente castrados (11).

A remoção cirúrgica dos testículos provoca a eliminação dos hormônios esteroides, culminando também em problemas de bem estar animal, ocasionando dor e sofrimento (7). Desta forma, a imunocastração é uma alternativa que possibilita um manejo diferenciado, não sendo necessária a retirada dos testículos, reduzindo também a produção de agentes que provocam o desenvolvimento de odor sexual (11).

Um dos pontos que pode ser destacado, quanto à imunocastração, refere-se aos benefícios dos cortes e aumento de produção, favorecendo que os animais expressem de melhor forma carne magra em sua constituição, com melhora de conversão alimentar (12). O processo é semelhante a diversos outros que são empregados, entretanto, trata-se de uma abordagem diferente (13). Por possuir uma modificação da forma de GnRH, em meio adjuvante aquoso, com capacidade de causar reação tecidual (8).

É estabelecida uma barreira imunológica, que interrompe o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, barrando o acesso do GnRH à área de ação na glândula pituitária. Não sendo possível a interação de estímulo com LH e FSH através da glândula pituitária, ocorre uma redução de desenvolvimento dos testículos e, em consequência, diminuição na síntese de esteroides (14).

Para que machos possam ser, de fato, considerados imunocastrados, é necessário o cumprimento de um protocolo de vacinação e tempo de resposta, visando conferir maior segurança ao método e garantir que o odor não esteja presente na carne (12). Levando em conta o protocolo adotado corretamente, mesmo substâncias que já estejam presentes nos tecidos, são progressivamente metabolizadas, desta forma é possível utilizar os próprios esteroides do macho para impedir odor na carne (8).

A vacina é eficaz no que se refere às concentrações dos hormônios androsterona e escatol, ocasionando melhor consumo alimentar e crescimento, diminuindo a ocorrência de lesões de abate decorrentes de brigas, em animais imunizados contra o GnRH, e é uma alternativa para a castração cirúrgica (8).

2.3.2 Mecanismo de ação e reflexos da utilização

O GnRH, é o principal hormônio decaféptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-

GlyNH₂) de 10,380 dáltons usado na regulação da reprodução de mamíferos (15). O mesmo é liberado pelo hipotálamo de forma pulsátil e estimula a hipófise para sintetizar e liberar as gonadotropinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Nos machos, o GnRH é essencial para a produção de testosterona e espermatogênese, e nas fêmeas é importante para o aumento de LH necessário para a ovulação (16).

Sua estrutura foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador Schally et al. em 1971, a partir de purificações de extratos hipotalâmicos de suínos. Na espécie humana, tem origem de um gene localizado no cromossomo oito, traduzido em 92 aminoácidos, inicialmente é composto por um peptídeo de sinal com 23 aminoácidos seguidos por uma sequência de Gly-Lys-Arg, onde de fato, é realizada a clivagem enzimática deste pré-pró-hormônio e a amidação do carboxiterminal do GnRH. No seguimento da molécula precursora, a fração entre o 24° até o 33° aminoácido caracteriza o GnRH-1 (18).

O GnRH é sintetizado por células neurosecretoras do hipotálamo basal e da área pré-óptica do hipotálamo (19). Em seguida, é liberado de maneira pulsátil na circulação porta hipotalâmico-hipofisária, por meio desta é transportado para a hipófise anterior (19; 20), sendo responsável pela estimulação da biossíntese e secreção do LH e do FSH (19; 15). A hipófise anterior sintetiza FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e o LH (Hormônio Luteinizante), onde apresentam por meio de um mecanismo de feedback liberado via corrente sanguínea, para exercer suas funções nos testículos ou nos ovários (19). 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 (19).

A inibina e o FSH mantem uma relação inversa (feedback negativo) controlando os níveis séricos, exercendo o controle da sua secreção (19). O FSH, nos machos, estimula a espermatogênese e a liberação da inibina via células de Sertoli. Assim, quando ocorre uma redução da taxa de espermatogênese, há também um declínio nos níveis de inibina, desta forma, elevando-se o débito de FSH (21).

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 (19).

2.3.3 Imunização contra o GnRH

O GnRH, apresenta um baixo peso molecular, tornando-o assim uma molécula com baixa imunogênicidade, precisando estar unido por conjugação química, eletrostática ou por fusão genica com proteínas carreadoras, aumentando assim de fato, seu peso molecular, tornando-se capaz de induzir uma resposta imune específica, interrompendo o eixo hipotálamo-hipófise-

gonadal, causando a imunocastração em mamíferos, podendo ser usado em vacinas. Estas vacinas com haptenos (compostos com baixo peso molecular) necessitam de moléculas carreadoras e adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias que quando adicionadas aos antígenos vacinais, favorecem sua imunogenicidade, tal como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) (22).

Pesquisas com vacinas anti-GnRH estão sendo testadas em humanos com câncer de próstata em estágio avançado, as vacinas antiGnRH 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 (23).

Em ratas com câncer de mama, a imunização ativa contra o GnRH resultou na supressão significativa do crescimento tumoral, associados a depleção de estrogênio sustentada pela atrofia dos órgãos reprodutivos femininos, inibindo assim o crescimento do tumor mamário (16).

A primeira vacina 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 adjuvante oleoso. Em 1998 foi lançada uma vacina para suínos contra o GnRH (IMPROVAC), que foi inicialmente comercializada na Austrália e na Nova Zelândia. Esta vacina foi produzida com GnRH recombinante expresso em cepa de *E. coli*, usando como molécula carreadora, a toxina diftérica e como adjuvante Dietilaminoetil (DEAE) – Dextrano (9, 24).

A partir da disseminação destes estudos na comunidade científica, foi possível construir uma melhor base de pesquisa, em cima de bases construídas por diversos estudiosos da área, tendo também como complemento, vacinas desenvolvidas e seus estudos de caso. Verificando-se também, a aplicação de doses específicas em animais, tempos diferentes de reação e possibilidade de intercalar a imunização dos mesmos, testes estes que culminaram em bases mais concretas do que anteriormente, ensejando maiores estudos e experimentos, que por sua vez, geraram vacinas que utilizam de aspectos recombinantes em doses únicas ou intercaladas.

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) (24), uma glicoproteína respiratória de alto peso molecular do molusco *Megathura crenulata* associada a um adjuvante denominado AdjuVac™, produzido pelo próprio grupo de pesquisas do National Wildlife Research Center (NWRC), em Fort Collins, Colorado (5). Este grupo tem trabalhado ativamente no desenvolvimento e avaliação das vacinas 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 (5). Segundo a USDA (2017), 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 imunocastração, 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% (25; 5). 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 (25).

A vacina utilizada, em suinocultura atualmente, Vivax®, contém uma forma modificada de GnRH (200 µl GnRH-conjugada de proteína por ml) em um sistema adjuvante aquoso (sistema que reforça a ação da proteína). O análogo do GnRH, utilizado nesta vacina não tem efeitos hormonais ou atividade química (5).

A primeira dose da vacina não tem efeito fisiológico sobre o funcionamento testicular. Após a segunda dose, o comportamento sócio-sexual e de alimentação é semelhante ao dos animais castrados duas semanas antes do abate. Os testes realizados produziram, em alguns animais, ligeira inflamação no local de aplicação e foi bem tolerada pelos animais (26). Ao aplicar a segunda dose, oito e quatro semanas antes do abate, os anticorpos neutralizam o GnRH natural do suíno e bloqueiam a liberação de LH e FSH da hipófise, que estimulam o desenvolvimento dos testículos e produção de esteroides. Ao cessar o desenvolvimento dos testículos, os mesmos atrofiam diminuindo assim seu tamanho, e conseqüentemente a produção de esteroides é suprimida e o acúmulo dos compostos responsáveis pelo odor sexual na gordura não acúmulo dos compostos responsáveis pelo odor sexual na gordura não ocorre (26).

A vacina utilizada para a imunocastração foi desenvolvida na Austrália e comercializada desde 1998 no mesmo país e também na nova Zelândia. Já foi aprovada em mais de 60 países. No Brasil, a mesma está registrada desde 2005, mas apenas em 2007 foi lançada em nível nacional sendo comercializada sob o nome de Vivax® (27). Dessa forma a vacina tem seu uso permitido de acordo o Regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos- Decreto 5053, de 22 de Abril de 2004 (BRASIL, 2004).

Diante do exposto, percebe-se que a imunocastração é um método que propicia, dentre outros fatores, um melhor bem estar animal, além disto, vem a corroborar no que diz respeito aos métodos tradicionalmente empregados. Tradicionalmente o método empregado é o de castração cirúrgica, método que, se comparado à imunocastração, leva a reflexão acerca de alguns itens, dentre eles (além do bem estar animal), higiene empregada no procedimento de imunocastração, exposição do animal a fatores infectológicos do ambiente, contribui, também, para um aumento de

produção, melhora na qualidade da carne apresentada pelo animal e conseqüente aceitação do mercado consumidor. Outro fator relevante agregado pela imunocastração demonstra-se na característica de os suínos apresentarem melhor relação consumo nutricional e desenvolvimento de carcaça (10).

3. CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE DUAS VACINAS BASEADAS NO GNRH SUÍNO RECOMBINANTE

Angélica Teresinha Andreetta¹, Ana Paula Andreolla², Rafael Frandoloso¹
Eraldo Lorenzo Zanella^{1*}

(Artigo submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2017).

¹ Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS, Brasil;

* Autor correspondente: EL, Zanella, Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia. Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS, Brasil, e-mail: ezanella@upf.br.

Abstract

Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) has as main function to regulate the reproduction of vertebrates. Immunization against GnRH has been used to neutralize endogenous GnRH and promote immunocastration of vaccinated animals. This method replaces surgically castration, increasing the quality of life of the animals. We present the development and evaluation of two experimental vaccines based on GnRH pig with potential for neutralization of endogenous GnRH rats. The genes encoding the recombinant proteins Construct007 (OVA+GnRH) and constructCTBsGnRh7-24His (Colera toxin+GnRH) were synthesized by the company Amplicon Vaccine (Pullman, USA), cloned into the pET24 expression vector and transformed into *Escherichia coli* strain ER2566. Proteins were purified by liquid chromatography. The vaccines were formulated with 50µg of the pure antigens potentiated with 15% Montanide Gel01 adjuvant (Seppic, France). A total of 12 Wistar rats, adult males, randomly separated into 3 groups. They were immunized intramuscularly two doses 21 days apart, with or Construct007 constructCTBsGnRh7-24His vaccine, and PBS + Montanide Gel 01. Clinically, we assessed the safety of the formulations, testicular development (size and weight) And immunologically, by Elisa's test, the ability of vaccines to induce anti-GnRH pig antibodies. Animals immunized with the vaccine based on the protein Construct007 showed significantly higher titers of antibodies as compared to vaccinated with recombinant constructCTBsGnRh7-24His. Clinically, the antibody response induced by the vaccine Construct007 was able to neutralize endogenous GnRH rats, significantly reducing testicular development of these animals compared with control animals (PBS + Montanide Gel01) and those vaccinated with protein constructCTBsGnRh7-24His. Considering the safety and functional capacity blocking GnRH-induced Construct007 formulation, it is obvious potential use of this experimental vaccine studies in the future immunization in the target species. This dissertation contains data that are potentially patentable and should be kept confidential until they are processed by patent and international regulatory agencies.

Key words: GnRH, Vaccines, Mice, immunocastration.

1. INTRODUÇÃO

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), também conhecido como hormônio liberador de hormônio luteinizante (LHRH), é o principal hormônio regulador da reprodução em mamíferos. O mesmo é liberado pelo hipotálamo de forma pulsátil e estimula a hipófise para sintetizar e liberar as gonadotropinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Nos machos, a GnRH é essencial para a produção de testosterona e espermatogênese (1,2).

A imunoneutralização contra o GnRH interrompe o eixo hipotalamo-pituitária-gonadal, inibindo a secreção de gonadotrofinas, induzindo a atrofia dos tecidos gonadais e interrompe a gametogênese, resultando em infertilidade de mamíferos. A imunização ativa contra o GnRH vem sendo amplamente pesquisada, pelo grande potencial de suprimir de maneira eficaz a capacidade reprodutiva de animais (3,4). Entretanto, o uso de antígenos peptídeos, como o GnRH que é um decapeptídeo de pequena massa molecular, apresenta baixa capacidade imunogênica (5,6).

O maior desafio dos pesquisadores consiste em produzir vacinas quimicamente conjugadas com moléculas previsíveis e similares entre os lotes de produção, que apresente padronização do antígeno e resposta imunológica satisfatória. Assim, buscou-se como alternativa a este problema o uso de proteínas recombinantes, onde o GnRH é sintetizado em fusão com proteínas previamente conhecidas para produzir uma vacina com maior imunogenicidade (6,7). Estudos iniciais descreveram que a utilização de GnRH, conjugada à albumina sérica bovina (BSA), atrofia e, conseqüentemente, inativa a função das gônadas de coelhos (6,8).

Além disso, a imunocastração substitui a castração cirúrgica em animais de produção, propiciando bem estar animal. Observa-se que a castração cirúrgica, em animais de produção, por consistir na remoção dos testículos, provoca a eliminação dos hormônios esteróides, impedindo o favorecimento de desempenho animal, além de ser um procedimento invasivo (9).

Assim, a castração imunológica, surge como alternativa à castração cirúrgica, possibilitando a criação dos animais sem que haja a necessidade de retirada dos testículos, uma vez que o funcionamento do eixo hipotalamo-pituitária-gonadal fica bloqueado, reduzindo assim a produção das substâncias responsáveis pelo desenvolvimento do odor sexual característico de machos. Além da questão de bem-estar animal, esta ferramenta confere benefícios na produção e aumenta o rendimento dos cortes no abatedouro (10), pois possibilita que, pela ação de vários hormônios, os animais venham a expressar melhor seu potencial de deposição de carne magra nas carcaças, refletindo, com isso, acentuada melhora na relação alimentação e conversão em carne (11).

Dessa forma, objetivou-se desenvolver e avaliar a ação imunogênica de duas novas vacinas experimentais baseadas no GnRH suíno, usando ratos para testar a neutralização do GnRH endógeno, com potencial uso em imunocastração.

2. METODOLOGIA

Expressão e purificação das proteínas

Os genes codificantes das proteínas recombinantes designados como Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His, foram sintetizados pela empresa Amplicon Vaccine (Pullman, USA) e clonados no vetor de expressão pET24 (Navagen, USA). Os vetor pET-24 possui a característica de expressar juntamente com a proteína de interesse, uma proteína de fusão que possui 6 moléculas de histidina na parte N-Terminal. Os plasmídeos carreadores das proteínas Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His, foram transformados em células competentes *E. coli* ER2566 (New England Biolabs Inc®, USA) e a expressão das proteínas Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His foram estimuladas *overnight* com 0,1M de *isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* (IPTG, Sigma, USA). O meio de cultura foi centrifugado (4000xg, 15min, 4°C) e o pellet bacteriano ressuspensionado em tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 8 mM de ureia; pH 8,0) e sonificado (3 vezes, 70watts) (Ultronic, Brasil). O lisado bacteriano foi centrifugado (13000xg, 1h, 4°C) e o sobrenadante proteico foi filtrado (0.22μMm) para posterior purificação através do equipamento *Äkta Pure Chromatography System* (GE Healthcare, Germany) com coluna *HisTrap* (GE Healthcare, Germany) conectada. As proteínas foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C até o uso.

Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As aliqüotas das proteínas Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His purificadas foram analisadas por gel SDS-PAGE usando 5% do gel *stacking* de acrilamida sobreposto em 10% de gel *resolving* de acrilamida. Amostras de proteínas coletadas antes e depois (0h e *overnight*) da indução com IPTG e sobrenadante proteico foram analisadas simultaneamente. O gel foi corado com *Coomassie Blue* R-250 para determinar o grau de pureza da proteína. A concentração proteica foi determinada através de espectrofotometria.

Procedimento de imunização

Ratos Wistar machos adultos (n=12) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, com cinco ratos para cada imunogêno, e dois para grupo controle. Os ratos foram imunizados com 50 μg/dose de proteína recombinante do constructCTBsGnRh7-24His e Construct007 em 15% de adjuvante *Montanide* gel (Seppic, França). As formulações foram administradas pela via intramuscular, injetando-se 0.1 ml nos membros posteriores dos ratos, duas doses em intervalos de 21 dias. O sangue dos animais imunizados foi coletado através da veia caudal em três momentos distintos, no dia zero antes da primeira inoculação, dia 21 antes da segunda inoculação e dia 42, 21 dias após a segunda dose, os animais foram sedados e coletou-se o sangue total para obtenção do

soro, o qual foi aliquoteado e armazenado à -80°C . Antes de qualquer procedimento os animais foram sedados utilizando Isoflurano (Cristália, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA protocolo 012/2014).

Western Blot Assay

Após eletroforese em gel SDS Page 15%, as proteínas constructCTBsGnRh7-24His e Construct007 foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, USA) usando equipamento semi-seco, segundo protocolo padrão. A membrana contendo as proteínas foram cortadas em duas tiras e bloqueada com 3% *Skin Milk* (SKM, Sigma) diluído em solução salina fosfatada com 0.05% *Tween* 20 (PBS-T, pH 7,2) por 2 h. Os soros a serem testados (soros de ratos das coletas, 42 dias após inoculações ($n=2$) de ambas as proteínas), foram diluídos 1:100 em 1% SKM-PBS-T e incubados por 1 hora à 22°C sob agitação. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com PBS-T. O anticorpo secundário de cabra anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (Boster, China) conjugado com peroxidase foi incubado nas mesmas condições, mas diluído 1:1000. Após fez-se novamente as lavagens e as membranas foram incubadas com o substrato (*4-Chloro-1-Naphthol* + 0.06% H_2O_2) por 10 minutos e as bandas das proteínas foram desenvolvidas à temperatura ambiente sob agitação. A reação foi bloqueada com água destilada.

ELISA

Os títulos de anticorpos contra GnRH em animais imunizados foram quantificados de acordo com a resposta específica induzida pelas duas vacinas avaliadas. Em suma, foram usadas três placas de ELISA com 96 orifícios Maxisorp (NUNC®), avaliando os soros dos três momentos de coleta. As placas foram revestidas com 500 ng / orifício de BSA-GnRH proteína recombinante diluída em tampão carbonato (pH 9,6) e incubadas durante 2 h a 37°C seguido *overnight* à 4°C . Os poços foram lavados com PBS-T e, então, bloqueados com 3% SKM PBS-T durante 2 horas a 37°C . Após fez-se uma diluição seriada dos soros dos animais vacinados, utilizando-se PBST com 1% de Skim milk como tampão de diluição de anticorpos. Após, 100 μl das diluições 1:100 a 1:12800 foram adicionados a placa, incubou-se durante mais 1 h a 37°C . O anticorpo primário foi diluído em 1% SKM PBS-T (1:100) e incubado por 1 hora à 37°C . Os poços foram lavados 3 vezes com PBST e após o anticorpo secundário anti-IgG rato conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 foi adicionado nas mesmas condições do anticorpo anterior. As placas foram novamente lavadas 3 vezes e, após, foi adicionado o substrato (3,3, 5,5'-*tetrametilbenzidina* + 0,06% H_2O_2) e incubado por 10 minutos no escuro à 22°C . A reação foi interrompida com 3 N HCl. A absorbância

foi lida imediatamente em 450nm usando o leitor de placa *Synergy HI* (BioTek®, USA).

Histologia dos tecidos reprodutivos

Após necropsia, os testículos e epidídimo foram pesados e colocados no formol. Seguiu-se a análise de acordo com os procedimentos padrões, sendo lavado em etanol a 70%, processado e embebido em parafina, para o corte histológico de 4–5 µm de espessura. As lâminas com os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e, em seguida, analisadas em microscópio óptico para avaliação morfológica (100 a 400x). Todas as seções histológicas foram examinadas por um patologista que não era informado sobre o tratamento que os ratos receberam.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando teste ANOVA uma via seguido de teste Tukey, teste para determinar as diferenças entre os grupos. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0.05$. A estatística foi realizada através do software *GraphPad Prisma* (GraphPad, USA).

3. RESULTADOS

Preparação das proteínas Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His

As construções constructCTBsGnRh7-24His e Construct007 foram transformadas em bactéria competente *E. coli* ER2566 e a expressão foi induzida com 0,1mM IPTG, *overnight* em um litro de caldo LB. Após a purificação, a análise por meio de SDS-PAGE seguido por coloração de *Coomasie blue* R250 demonstrou que o peso molecular da proteína constructCTBsGnRh7-24His e Construct007 juntamente com a proteína de fusão (cólera toxina (CTB-GnRH) e (OVA GnRH)) apresentou aproximadamente 27KDa e 66KDa respectivamente (Figuras 1 e 2). Também foi realizada a quantificação das proteínas, por meio de espectrofotometria, demonstrando que obtivemos 23 µg/L e 16 µg/L respectivamente de proteína purificada, sendo que foi utilizado a concentração de 1 µg/L de ambas as proteínas, para posterior formulação dos imunógenos.

Análise de anticorpos específicos anti-GnRH

Os soros foram amostrados em pontos temporais designados e as IgG GnRH específicas foram analisadas por ELISA (Figura 3). Os anticorpos não foram detectáveis nos ratos, na primeira semana (dia 0) após a imunização inicial, enquanto que no dia 42, 21 dias após a segunda imunização, os ratos tratados com Construct007 produziram altos níveis de anticorpos anti-GnRH, rendendo títulos de anticorpos anti-GnRH maiores em relação aos observados nos ratos imunizados com PBS e constructCTBsGnRh7-24His (Figura 3).

Para demonstrar a antigenicidade dos anticorpos desenvolvidos contra o GnRH o soro dos ratos imunizados com Construct007 (coluna 1) e constructCTBsGnRh7-24His (coluna 2), foram submetidos a uma análise por *Western Blot*. Os resultados demonstraram que houve resposta imune contra os imunógenos testados, e também a outras proteínas copurificadas, demonstrando que essas formulações são imunogênicas, apresentando a capacidade de induzir a formação de anticorpo (Figura 4).

Efeito dos anticorpos anti-GnRH nos órgãos reprodutores

Em ratos imunizados com Construct007, os testículos eram menores apresentando média de 2,07 g de peso, comparado com aqueles dos ratos imunizados com constructCTBsGnRh7-24His e os controles que pesaram respectivamente 5,93 e 6,15 g (Figura 5A). Além disso, na observação macroscópica observou-se atrofia testicular, sendo comprovada com o peso total dos testículos, que eram mais leves (Figura 5B). Clinicamente, a resposta de anticorpos induzida pela vacina Construct007 foi capaz de neutralizar o GnRH endógeno de ratos, reduzindo significativamente o

desenvolvimento testicular destes animais em comparação com os animais controles, bem como, em comparação com aqueles vacinados com a proteína constructCTBsGnRh7-24His.

Referente à figura 6, observou-se na análise histopatológica a presença de espermatozoides (espermatogênese) em 100% das amostras, sem alteração na arquitetura dos túbulos seminíferos (A e B). No grupo tratado com constructCTBsGnRH7-24His observou-se degeneração testicular multifocal discreta, revestimento tubular vacuolizado, número diminuído de células epiteliais e membrana basal ondulada e espessa (seta) com presença de espermatozóides. No grupo tratado com a vacina Construct007 observou-se degeneração testicular difusa moderada a acentuada, revestimento tubular vacuolizado, número diminuído de células epiteliais, ausência de algumas células de Leydig e poucos espermatozoides em alguns túbulos.

4. DISCUSSÃO

O GnRH é um hormônio decapeptídeo, que está sendo usado estrategicamente em imunoterapia para induzir a imunocastração, devido ao seu papel central no eixo hipotálamo-hipofise-gonadal. A imunização ativa contra o GnRH resulta na produção de anticorpos capazes de neutralizar o peptídeo, levando a inibição da síntese e liberação de LH e FSH, resultando no bloqueio da esteroidogênese e da gametogênese (12). Por esse motivo, durante as últimas quatro décadas, diversas alternativas foram avaliadas com o objetivo de desenvolver vacinas esterilizantes anti-GnRH (13,14).

O GnRH vem sendo utilizado desde a década de 70, com o trabalho pioneiro de Arimura et al. (1973), como um potencial alvo para o bloqueio do sistema reprodutivo de mamíferos domésticos e selvagens (14). Até o momento, diversos estudos em animais foram realizados na tentativa de gerar uma vacina segura e eficaz contra o GnRH (16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24). Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina tendo o GnRH como antígeno ainda enfrenta diversos desafios, sendo sua pobre imunogenicidade o maior deles. Assim, como é de baixa imunogenicidade, apresenta fraca reatividade, tornando-o difícil de montar uma construção com forte resposta imune. Desde então, pesquisadores veem buscando várias estratégias, como: o uso de adjuvantes poderosos, fusão ou conjugação para epítomos T-helper definidos, e / ou proteínas transportadoras, para provocar fortes respostas imunes (6). Assim a engenharia genética tornou-se um método alternativo para fabricar essas vacinas peptídicas.

Neste estudo testamos duas construções cedidas pela empresa Amplicon Vaccine (Pullman, USA), Construct007 e constructCTBsGnRH7-24His, as quais foram efetivamente expressadas em *E. coli* cepa ER2566, o nível de expressão aumentou com o tempo, atingindo seu tempo máximo após crescimento *overnight*. As proteínas foram purificadas por cromatografia líquida de proteína utilizando uma coluna carregada com íons de níquel, na primeira purificação observou-se precipitação de ambas proteínas, isto foi corrigido diluindo-as em buffer com ureia a 1M, assim conseguimos purificá-las. O estudo também comprovou que a expressão de alto nível das proteínas recombinantes, pode ser conseguida mediante expressão *overnight* em presença de 100 mM de IPTG. Tratando-se de custo benefício, observou-se no **nosso** modelo de expressão em *E. coli*, alta quantidade de proteína solúvel purificada, por conta das proteínas fusionadas (OVA e CTB), além de ser uma técnica pouco trabalhosa, rápida, quando comparado a outras sistemas de expressão e possuir baixo custo. Dessa maneira pode se dizer que as proteínas são escalonáveis por produziram muitas doses, e assim apresentam-se rentáveis. Observou-se também que a Construct007 conseguiu aumentar a imunogenicidade da proteína como pode ser observado no western blot (Figura 4).

Os animais imunizados com vacina baseada na proteína Construct007 apresentaram títulos de anticorpos significativamente superiores em comparação com aqueles que foram vacinados com proteína recombinante constructCTBsGnRh7-24His (Figura 3). Clinicamente, a resposta de

anticorpos induzida pela vacina Construct007 foi capaz de neutralizar o GnRH endógeno de ratos, reduzindo significativamente o desenvolvimento testicular destes animais em comparação com os animais controles (PBS + Montanide Gel 01), bem como, em comparação com aqueles vacinados com a proteína constructCTBsGnRh7-24His. Os mesmos resultados foram observados por Jerry J. Reeves et al (2000) que imunizou ratos com outras construções (ovalbuminLHRH-7 e talioroxina-LHRH-7), as quais resultaram em diminuição de peso e tamanho da glândula vesicular, testículo, epidídimo e próstata anterior dos ratos. A diminuição do peso e tamanho dos testículos também foi observada em outras espécies imunizadas com proteínas esterelizantes (25, 26). Do mesmo modo, bezzeros imunizados com a vacina anti-LHRH apresentaram supressão de comportamento sexual e funções das gônadas, após seis meses da aplicação da última dose (27). Além disso, o padrão da resposta biológica na imunização ativa contra o GnRH no **nosso** estudo, demonstrou alguns critérios semelhantes da vacina comercializada, VivaxTM (ImprovacTM– Zoetis, NJ, EUA), a qual foi a primeira vacina a ser aprovada para uso em suínos com o objetivo de prevenir o odor sexual e a reprodução em animais destinados ao abate. A vacina Improvac apresenta supressão testicular e o desenvolvimento efetivo de anticorpos apenas após a imunização do reforço, aplicada aproximadamente 4 semanas antes do abate (28).

A degeneração testicular discreta a moderada com espermatogênese reduzida, além da ausência de algumas células de Leydig, foram observadas em análises histológicas nas amostras do grupo vacinado com Construct007. Tendo em vista que as células de Leydig apresentam papel essencial na manutenção da esteroidogênese e da espermatogênese nos testículos, sendo que falhas nos dois processos geralmente são atribuídas a perda de função dessas células (29). Han et al. (2015) demonstraram que a imunização ativa anti-GnRH em ratos levou a uma redução da expressão de mRNA dos receptores LH e FSH nos testículos, interferindo nas funções das células de Leydig e Sertoli, respectivamente. Os autores sugerem que a perda de capacidade dos testículos de produzirem testosterona e espermatozoides deve-se primeiramente ao mal funcionamento de ambas as células de Leydig e de Sertoli. Entretanto em nosso estudo, não foi constatada fibrose intersticial, o que demonstra que as lesões observadas não são crônicas, provavelmente em consequência da retomada da função das células de Sertoli, ou pela inibição parcial da espermatogênese. Estes resultados indicaram que os órgãos reprodutores degenerariam devido à depleção de GnRH endógeno, que foi neutralizado pela indução de anticorpos por Construct007.

Se tratando do adjuvante utilizado, nos estudos realizados por Leenaars et al. (1998) observaram que, dentre cinco adjuvantes a base de óleo, o uso de Montanide em conjunto com um peptídeo sintético resultou em uma estimulação predominantemente do isotipo IgG1, além de apresentar menores efeitos patológicos adversos em camundongos quando comparado com os outros adjuvantes avaliados. No presente estudo, os resultados demonstraram que a Construct007,

pode ser utilizado na prática veterinária como uma vacina para esterilização, pois a proteína é um antígeno efetivo contra o GnRH e quando associado a um adjuvante seguro como Montanide Gel 01 não interfere no bem estar animal.

Em síntese, demonstramos que a proteína Construct007 potencializada com o adjuvante Montanide Gel 01 induz uma resposta de anticorpos com capacidade de neutralizar o GnRH murino e de bloquear o desenvolvimento testicular, sem produzir lesões no local de inoculação. Estas propriedades convertem este antígeno em um potencial candidato para ser avaliado em suínos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Naor Z (2009) Signaling by G-protein-coupled receptor (GpCR): studies on the GnRH receptor. *Front Neuroendocrinol* 30(1):10–29.
2. Plant TM (2008) Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol* 20(6):719–726.
3. ÜLKER, H.; KÜÇÜK, M.; YILMAZ, A.; YÖRÜK, M.; ARSLAN, L.; AVILA, D.M. de; REEVES, J.J. Changes in testicular development, ultrasonographic and histological appearance of the testis in buck kids immunized against LHRH using recombinant LHRH fusion protein. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.37-43,
4. ÜLKER, H.; YILMAZ, A.; KARAKUS, F.; YÖRÜK, M.; BUDAG, C.; AVILA, D.M. de; REEVES, J.J. LHRH fusion protein immunization alters testicular development, ultrasonographic and histological appearance of ram testis. *Reprodução de animais domésticos vol. 44*, p.593-599, 2009b.
5. REEVES, J.J.; CHANG, C.F.; AVILA, D.M. de; GRIEGER, D.M.; JOHNSON, H.E.; ROBERTS, A.J. Vaccines against endogenous hormones: a possible future tool in animal production. *Journal of Dairy Science*, v.72, p.3363-3371, 1989.
6. Zanella R., Zanella E.L., REEVES, J.J.; Hernandez J., Motta A. C., Avila D.. Testicular characteristics of bulls immunosterilized with anti-luteinizing hormone-releasing hormone vaccine. *Pesquisa agropecuaria brasileira, Brasília*, v.44, n.10, p.1359-1363, out. 2009.
7. QUESNELL, M.M.; ZHANG, Y.H.; AVILA, D.M. de; 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.
8. ARIMURA, A.; SATO, H.; KUMASAKA, T.; WOROBEK, R. B. fun; DEBELJUK, L.; DUNN, J.; SCHALLY, A.V. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology*, v.93, p.1092-1103, 1973
9. SANTOS, A.P.; KIEFER, C.; MARTINS, L.P. E FANTINI,C.C. 2012. Restrição alimentar para suínos machos castrados e imunocastrados em terminação. *Ciênc Rural*, 42: 147-153, 2011.
10. HECK, A.. A revolution in pork production. In: London Swine Conference - Exploring the future,11. London Swine Conference. Ontario. pp. 19-26, 2011
11. SILVA, M.A.; BARBARINO JÚNIOR, P. E GUASTALE, S.R.. Recomendações nutricionais para ma- chos inteiros submetidos à imunocastração. In: International Symposium on Nutritional requi- rements of Poultry and Swine, 3. Proceedings. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. pp. 353-375, 2011.
12. Khan, M. A. H.; Ferro, V. A.; Koyama, S.; Kinugasa, Y.; Song, M.; Ogita, K.; Tsutsui, T.; Murata, Y.; Kimura, T. Immunisation of male mice with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes suppresses fertility in vivo. *Vaccine*, v. 25, p. 3544-3553, 2007 a.

13. Khan, M. A. H.; Ogita, K.; Ferro, V. A.; Kumasawa, K.; Tsutsui, T.; Kimura, T. Immunisation with a plasmid DNA vaccine encoding gonadotrophin releasing hormone (GnRH-I) and T-helper epitopes in saline suppresses rodent fertility. *Vaccine*, v. 26, p. 1365-1374, 2008.
14. Khan, M. A. H.; Prevost, M.; Waterston, M. M.; Harvey, M. J. A.; Ferro, V. A. Effect of immunization against gonadotrophin releasing hormone isoforms (mammalian GnRH-I, chicken GnRH-II and lamprey GnRH-III) on murine spermatogenesis. *Vaccine*, v. 25, p. 2051-2063, 2007b.
15. Arimura, A.; Sato, H.; Kumasaka, T.; Worobec, R. B.; Debeljuk, L.; Dunn, J.; Schally, A. V. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LH-RH) associated with gonadal atrophy in rabbits: development of radioimmunoassays for LH-RH. *Endocrinology*, v. 93, p. 1092-1103, 1973.
16. Zeng, X. Y.; Turkstra, J. A.; Meloen, R. H.; Liu, X. Y.; Chen, F. Q.; Schaaper, W. M. M.; Oonk, H. B.; Guo, D. Z.; Van De Wiel, F. M. Active immunization against gonadotrophin-releasing hormone in Chinese male pigs: effects of dose on antibody titer, hormone levels and sexual development. *Animal Reproduction Science*, v. 70, p. 223-233, 2002.
17. Jinshu, X.; Jingjing, L.; Duan, P.; Zheng, Z.; Ding, M.; Jie, W.; Rongyue, C.; Zhuoyi, H. The immunogenicity of recombinant and dimeric gonadotrophin-releasing 77 hormone vaccines incorporating a T-helper epitope and GnRH or repeated GnRH units. *Journal of Immunological Methods*, v. 289, p. 111-122, 2004.
18. Herbert, C. A.; Trigg, T. E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science*, v. 88, p. 141-153, 2005.
19. Junco, J. A.; Peschke, P.; Zuna, I.; Ehemann, V.; Fuentes, F.; Bover, E.; Pimentel, E.; Basulto, R.; Reyes, O.; Calzada, L.; Castro, M. D.; Arteaga, N.; López, Y.; Garay, H.; Hernández H.; Bringas, R.; Guillén, G. E. Immunotherapy of prostate cancer in a murine model using a novel GnRH based vaccine candidate. *Vaccine*, v. 25, p. 8460-8468, 2007.
20. Talwar, G. P. Fertility regulating and immunotherapeutic vaccines reaching human trials stage. *Human Reproduction Update*, v. 3, p. 301-310, 1997.
21. Talwar, G. P.; Vyas, H. K.; Purswani, S.; Gupta, J. C. Gonadotropin-releasing hormone/human chorionic gonadotropin β based recombinant antibodies and vaccines. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 83, p. 158-163, 2009.
22. Fang, F.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Tao, Y.; Li, Y.; Cao, H.; Wang, S.; Wang, L.; Zhang, X. Active immunization with recombinant GnRH fusion protein in boars reduces both testicular development and mRNA expression levels of GnRH receptor in pituitary. *Animal Reproduction Science*, v. 119, p. 275-281, 2010.
23. Song, Y. J.; Kim, D. G.; Nam, H. M.; Lee, J. B.; Park, S. Y.; Song, C. S.; Seo, K. H.; Kim, H. M.; Choi, I. S. Evaluation of the efficacy of immunocastration vaccine 82 composed of gonadotrophin-releasing hormone conjugated with *Salmonella typhimurium* flagellin in rats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 47-50, 2012.
24. Han, Y.; Liu, G.; Jiang, X.; Ijaz, N.; Tesema, B. KISS1 Can Be Used as a Novel Target for Developing a DNA Immunocastration Vaccine in Ram Lambs. *Vaccine*, v. 33, p. 777-782, 2015.

25. Huxsoll, C. C., E. O. Price, and T. E. Adams. 1998. Testis function, carcass traits, and aggressive behavior of beef bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 76:1760–1766.
26. Cook, R. B., J. B. Popp, J. P. Kastelic, S. Robbins, and R. Harland. 2000. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. *J. Anim. Sci.* 78:2778–2783.
27. Robertson, I. S., J. C. Wilson, and H. M. Fraser. 1979. Immunological castration in male cattle. *Vet. Rec.* 111:529–531.
28. Zamaratskaia, G.; Andersson, H. K.; Chen, G.; Andersson, K.; Madej, A.; Lundström, K. Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac™) of steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 351-359, 2008.
29. Han, X.; Cao, X.; Tang, J.; Du, X.; Zeng, X. Active immunization against GnRH reduces the synthesis of GnRH in male rats. *Theriogenology*, v. 80, p. 1109- 1116, 2013.
30. Han, Y.; Liu, G.; Jiang, X.; Ijaz, N.; Tesema, B. KISS1 Can Be Used as a Novel Target for Developing a DNA Immunocastration Vaccine in Ram Lambs. *Vaccine*, v. 33, p. 777–782, 2015.
31. Leenaars, M.; Koedam, M. A.; Hendriksen, C. F. M.; Claassen, E. Immune Responses and Side Effects of Five Different Oil-Based Adjuvants in Mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 61, p. 291–304, 1998.

4. CONCLUSÕES

A utilização de uma vacina com potencial uso em imunocastração suína representa um avanço para a suinocultura. Com esse estudo e com os resultados obtidos pode-se concluir que:

1. As proteínas recombinantes Construct 007 e CTBsGnRh7-24His podem ser expressadas em níveis escalonáveis para a indústria utilizando como célula de expressão cepa ER2566 de *E. coli*.
2. As proteínas recombinantes Construct 007 e CTBsGnRh7-24His foram imunogênicas em ratos e os anticorpos derivados capazes de reconhecer o GnRH murino.
3. A proteína recombinante Construct 007 apresentou potencial de neutralizar eficientemente o GnRH murino e produzir a imunocastração em ratos machos.
4. As vacinas formuladas apresentaram-se seguras, não causando nenhum tipo de lesão no local de aplicação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme abordado ao longo do trabalho, verifica-se que o mercado de carne suína, no Brasil, é crescente, e segue tendências mundiais no que se refere à qualidade, bem estar animal, produtividade e manejos tecnológicos.

Outro item que corrobora com o exposto acima, atendendo a diversos requisitos que o mercado de consumo exige, é a, cada vez maior, implementação da imunocastração como alternativa à castração tradicional, oferecendo de forma mais viável a possibilidade de atender a requisitos primordiais de consumo, como odor característico de machos inteiros, mantendo um alto nível de bem estar animal, melhorando a produtividade, oferecendo melhores manejos no que tange a higiene e aplicação de tecnologias na produção. Pois a tecnologia é um meio de encurtar caminhos entre o realizável e o desejável, ensejando a cada dia o motivo de pesquisa, no caso abordado, a aplicação de tecnologia e melhores manejos traduzem-se no conceito e aplicação da imunocastração.

Baseando nos dados encontrados, e os resultados apresentados, o próximo passo para esta pesquisa, inicialmente, é a aplicação do Construct007 na espécie animal alvo, os suínos, pretendendo observar e comparar os resultados com outros apresentados no experimento atual. Outro ponto relevante, que deve ser analisado de melhor forma, diz respeito à aplicação do teste em uma quantidade maior de animais, pretendendo, da mesma forma, observar possíveis variações ou desvios quando empregados os mesmos métodos em maior escala.

Para um experimento vindouro, procurar-se-á analisar itens referentes à dosagem hormonal de LH, FSH e testosterona. Da mesma forma que é pretendida o experimentar tratamento com uma vacina anti-GnRH de âmbito comercial, visando comparações de diversos fatores e resultados.

Para que a construção e elaboração deste projeto fossem possíveis, tanto no que se refere à parte prática quanto na escrita, foram utilizados os conhecimentos, práticas e conceitos abordados ao longo do mestrado em Bioexperimentação. Espera-se, também, que o estudo aqui desenvolvido possa servir de base para futuras pesquisas nesta área.

Figura 1: Análise da expressão da proteína constructCTBsGnRh7-24His por meio de SDS-PAGE 10%. Amostras coletadas nos tempos 0h (controle da expressão antes da indução por IPTG) e *overnight* de expressão da proteína (linha 1 e 2, respectivamente) e extrato bacteriano pós-purificação com coluna *HisTrap* (linha 3). M: marcador de peso molecular.

Figura 2: Análise da expressão da proteína Construct007 por meio de SDS-PAGE 10%. Amostras coletadas nos tempos 0h (controle da expressão antes da indução por IPTG) e *overnight* de expressão da proteína (linha 1 e 2, respectivamente) e extrato bacteriano pós-purificação com coluna *HisTrap* (linha 3). M: marcador de peso molecular.

Figura 3: Resposta de anticorpos anti-GnRH em ratos wistar imunizados com dois imunogenos (n = 12). Os ratos machos, com cinco animais por grupo e dois controles, foram imunizados via intramuscular com dois imunogénos, duas doses, com intervalo de 21 dias. As amostras foram coletadas em três momentos distintos, dia 0 (antes de aplicar a 1^o dose da vacina), dia 21 após a segunda imunização e dia 42 (21 dias após a aplicação da segunda dose). Os soros coletados foram submetidos ao teste de ELISA ($p < 0.05$).

Figura 4: Caracterização da proteína Construct007 e da constructCTBsGnRh7-24His por *Western Blot*. As proteínas purificadas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com 1 amostra de soro de rato não imunizado no dia 0 (linha 1), 2 amostras de soros de ratos pós inoculação para Construct007 e constructCTBsGnRh7-24His (linhas 2 e 3) dia 42, respectivamente.

Figura 5. Efeito dos anticorpos anti-GnRH nos testículos e epidídimo dos ratos. A- Morfologia dos testículos de ratos imunizados com: a- PBS+Montenide Gel 01 (controles), b- constructCTBsGnRH7-24His, c- Construct007. B- Comparação do total de peso dos testículos dos ratos imunizados com PBS, constructCTBsGnRh7-24His e Construct007.

Figura 6. Avaliação histopatológica dos testículos e epidídimo dos ratos. As imagens microscópicas representadas pelas letras A e B referem-se ao grupo Controle, C e D ao grupo tratado com constructCTBsGnRH7-24His, E e F ao grupo tratado Construct007. HE, 100 e 400X

Figura 1:

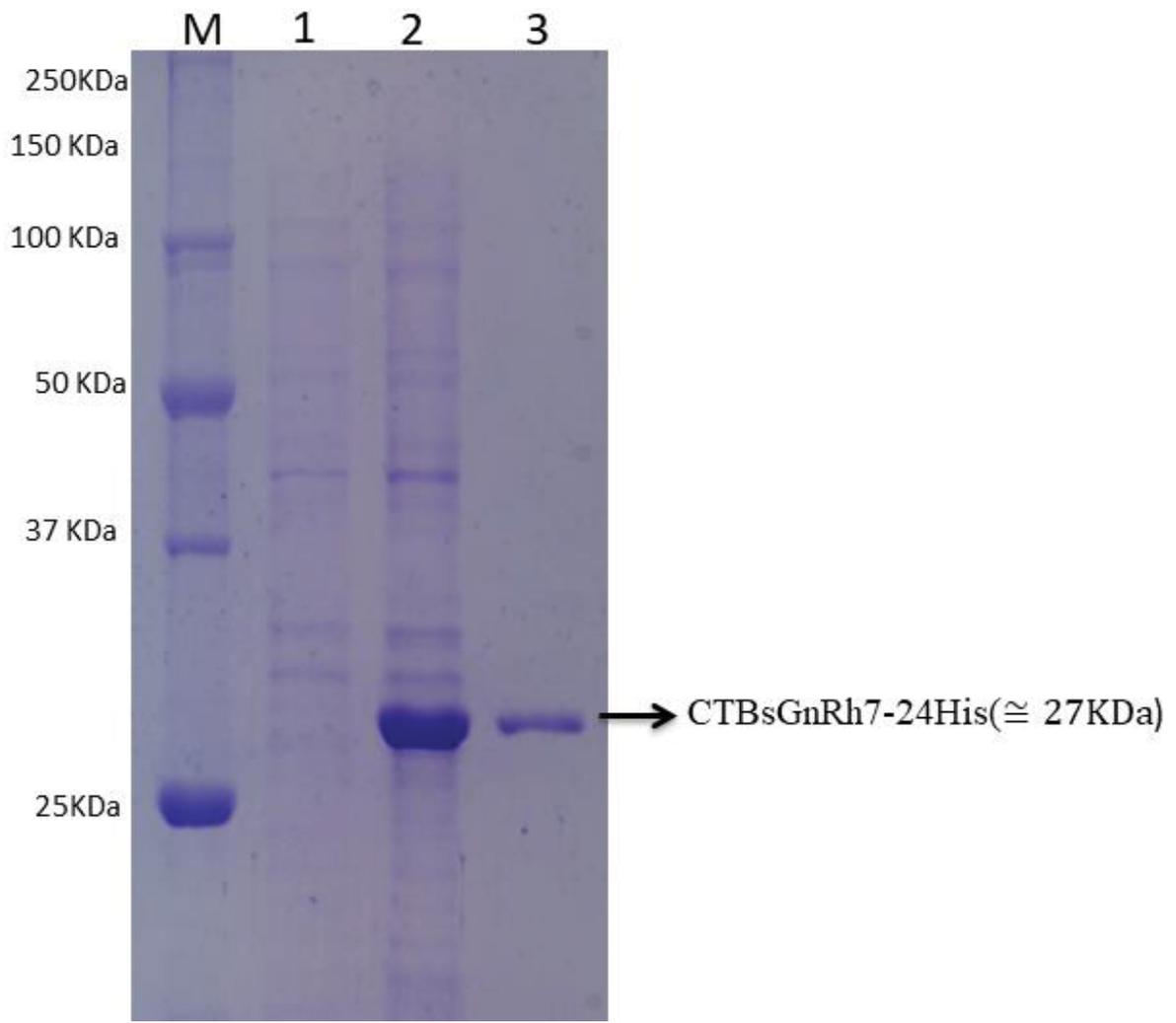


Figura 2:

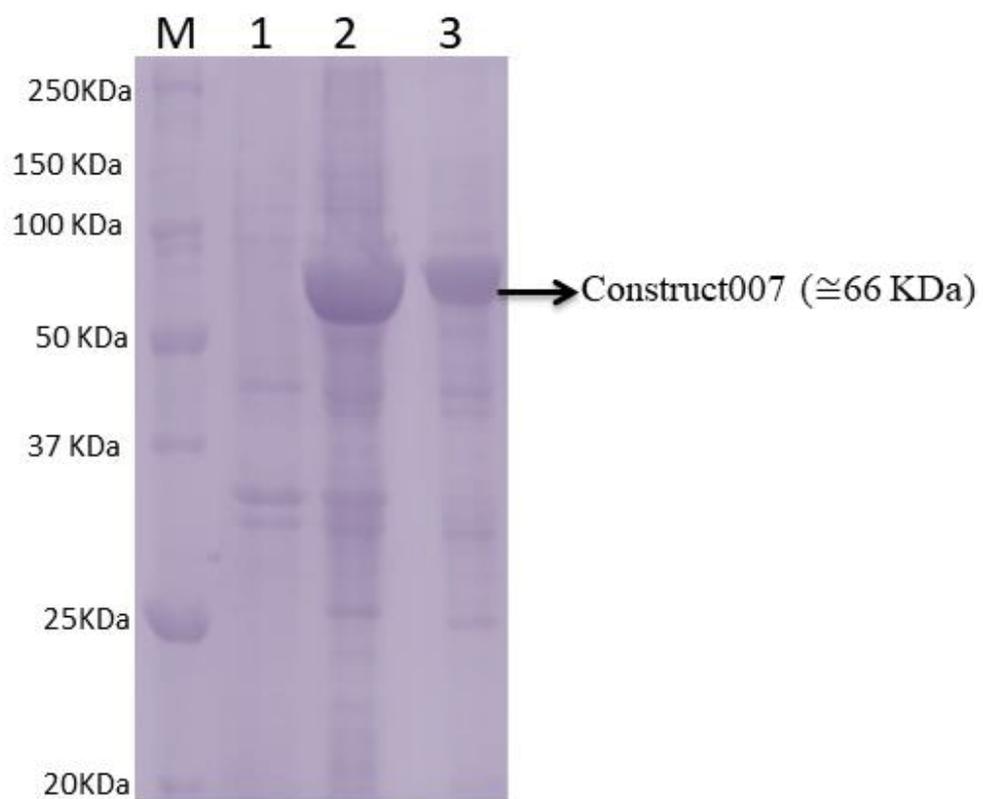


Figura 3:

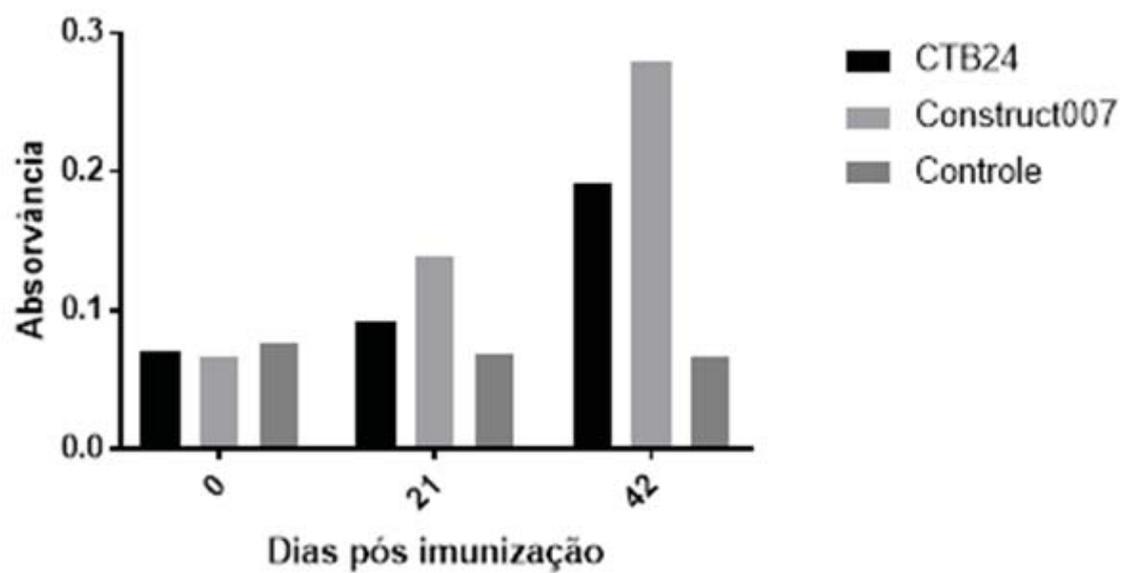


Figura 4:

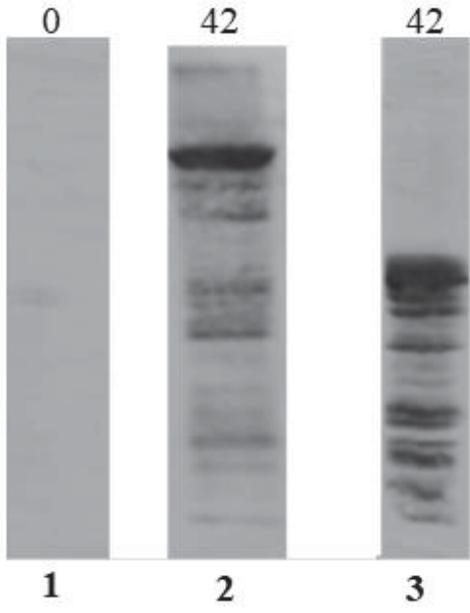


Figura 5:

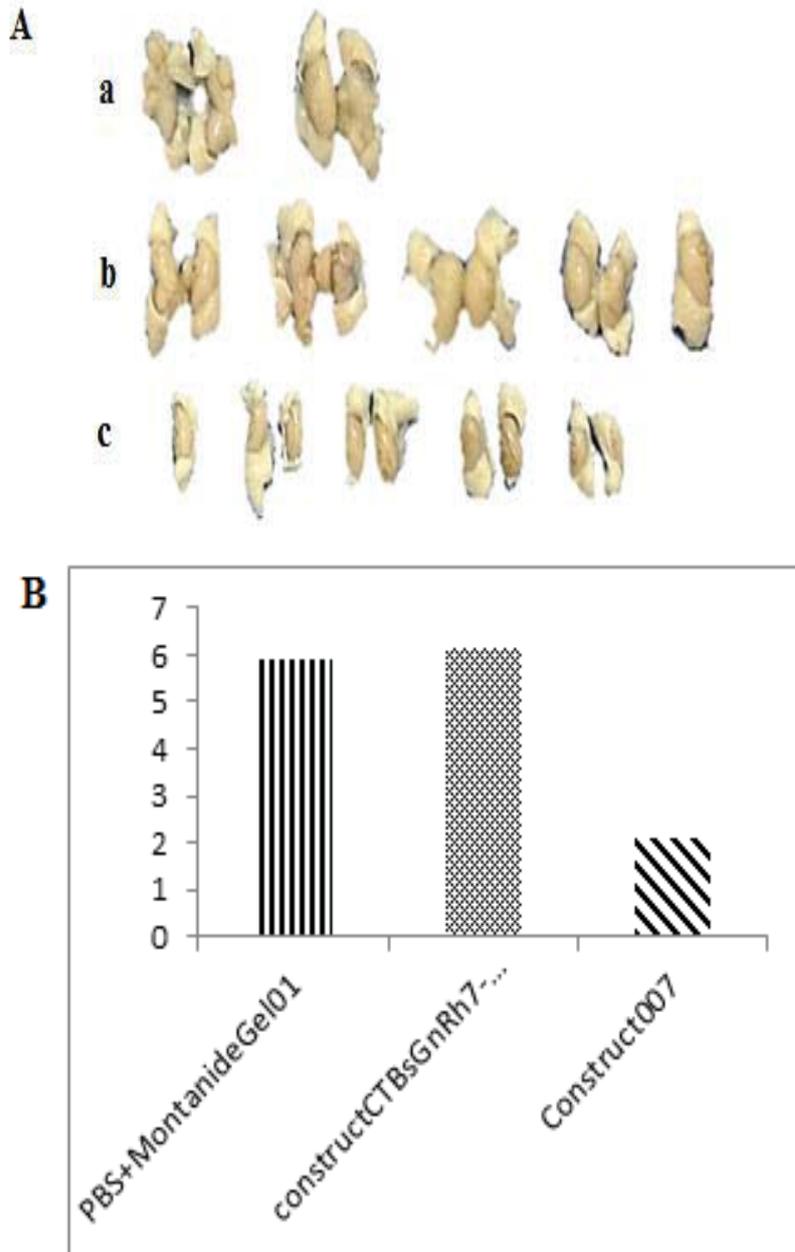
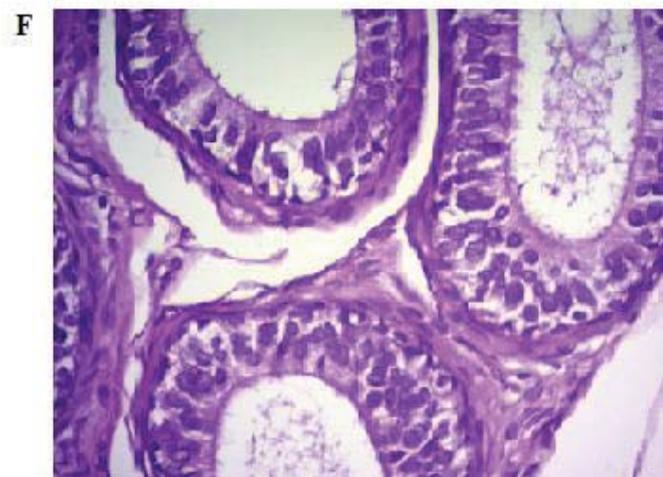
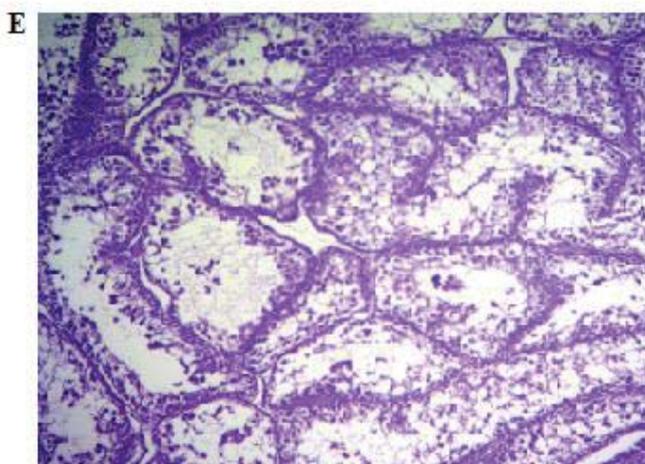
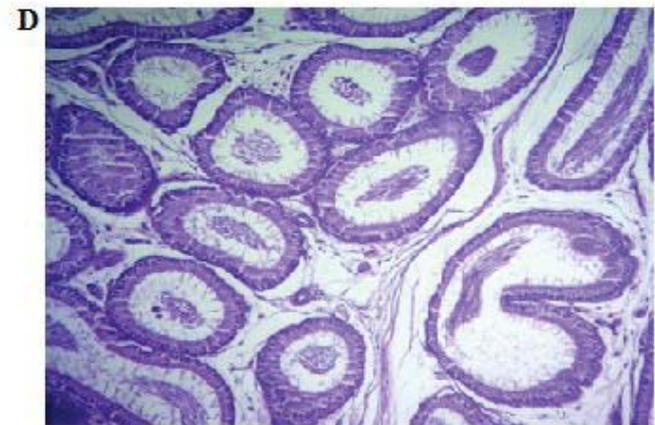
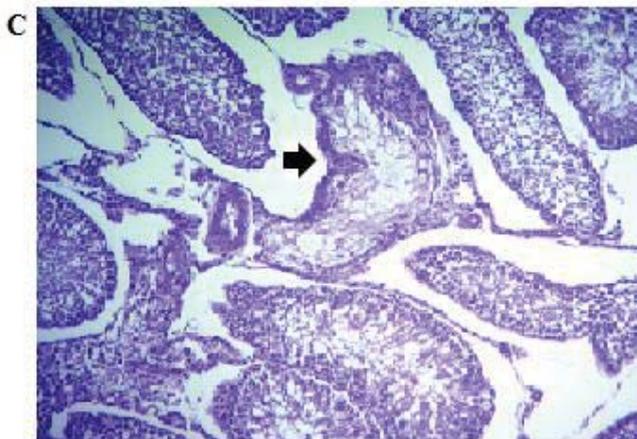
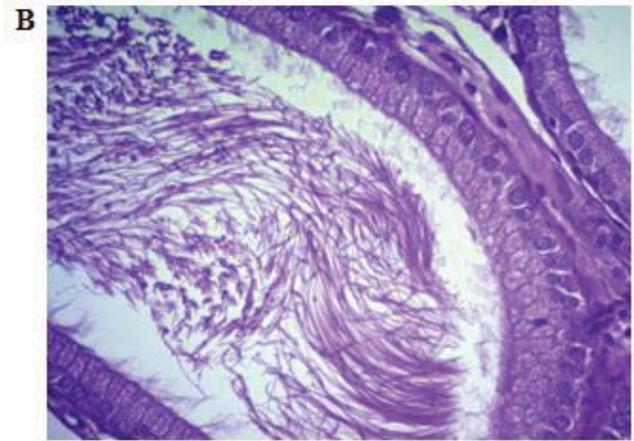
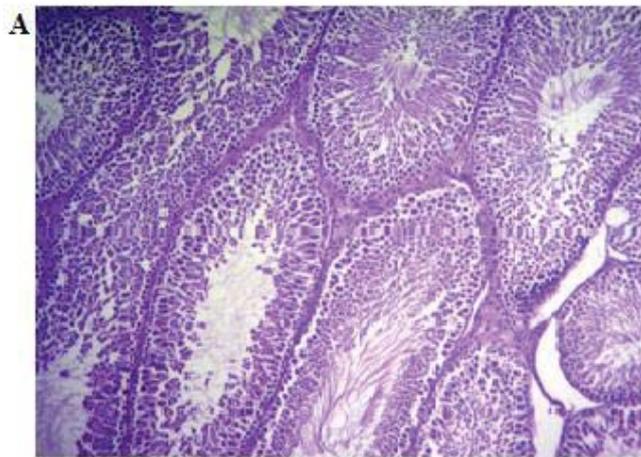


Figura 6:



6. REFERÊNCIAS

1. MOELLER, S. J. et al. Consumer perceptions of pork eating quality as affected by pork quality attributes and end-point cooked temperature. *Meat Science*, v. 84, n. 1, p. 14-22, 2010.
2. Andresen, O.; Froystein, T.; Rodbotten, Mortensen, H..P.Eiknes; O.; Lea, P. Sensoric evaluation of boar meat with diferente of androstenone and skatole. In: BORNNEAU, M. (Ed.). *Measurement and prevention of boar taint in entire male pigs*. Paris, INRA Editions, 1993. P.69-74.
3. Gastardelo T. A. R., Melz L. J. , Marion P. J. F.. A competitividade das exportações de carne suína: os casos do Brasil e dos Estados Unidos. *Revista UNEMAT de Contabilidade*. V. 5, Número 9 Jan./Jul. 2016.
4. USDA. Global Agricultural Trade System online. Disponível em: Acesso em: 1 Julho. 2017.
5. Schanbacher, B.D. Pituitary-testicular responses of estradiol-17b-implanted bull calves to contínuos versus pulsatile infusion of luteinizing hormone releasing hormone. *Journal Animal Science*, 58:943, 1984.
6. Santos, A.P.. Suínos imunocastrados na suinocultura moderna. www.mca.ufms.br/producao/seminarios/2009/S0SM.pdf, 2009.
7. Dunshea, F.R.; Colantoni, C.; Howard, K.; Mccauley, I.; Jackson, P.; Long, K.A.; Lopaticki, E.A.; Nugent, J.A.; Simons, J.A.; Walker, J. and Hennessy. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J Anim Sci*, 79: 2524-2535, 2001.
8. Tonietti, A.P.. Avaliações do desempenho zootécnico, qualidade da carcaça e carne em suíno macho inteiro imunocastrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2008.
9. Font, M.; Furnols, I. And Oliver, M.A.. Review: Production and consumption of pork meat with different levels of boar taint. *Food Sci Technol Int*, 5: 367-375, 1999.
10. Santos, A.P.; Kiefer, C.; Martins, L.P. e Fantini,C.C. 2012. Restrição alimentar para suínos machos castrados e imunocastrados em terminação. *Ciênc Rural*, 42: 147-153, 2011.
11. Silva, M.A.; Barbarino Júnior, P. E Guastale, S.R.. Recomendações nutricionais para machos inteiros submetidos à imunocastração. In: *International Symposium on Nutritional requirements of Poultry and Swine*, 3. Proceedings... Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. pp. 353-375, 2011.
12. Heck, A.. A revolution in pork production. In: *London Swine Conference - Exploring the future*, 11. London Swine Conference. Ontario. pp. 19-26, 2011.

13. Thun, R.; Gajewski, G. And Janett, F.F.. Castration in male pigs: techniques and 23 animal welfare issues. *J Physiol Pharmacol*, 57: 189-194, 2006.
14. Uniprot. P01148. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01148>. Acesso em: 23de junho de 2017.
15. Xue Jun Wang, Kai Gu, Jin Shu Xu, Ming Hui Li, Rong Yue Cao, Jie Wu, Tai Ming Li, Jing Jing Liu. Immunization with a recombinant GnRH vaccine fused to heat shock protein 65 inhibits mammary tumor growth in vivo. *Cancer Immunol Immunother* (2010) 59:1859–1866.
16. 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, p. 393-399, 1971.
17. 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.
18. AIRES, M. de M.. *Fisiologia*. Ed. Guanabara Koogan. 2º edição. Rio de Janeiro, 1999. P. 934.
19. 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. 383-306, 2005.
20. Mcdemott, M.T.: *Segredos em endocrinologia: Respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos*. Tred. Célia Beatriz Fischmann, Editora Artes Médias. Porto Alegre, 1997. p. 352.
21. Silva, W. D. DA; MOTA, I. *Imunologia Básica e Aplicada*. Ed. Guanabara Koogan. 5º Edição , Rio de Janeiro, 2003, p. 400.
22. 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.
23. 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.
24. Miller, L. A.; Talwar, G.P. ; Killian, G. J.. *Contraceptive Effect of a Recombinant GnRH Vaccine in adult Female Pigs*. Published at University of California, Davis. P. 106-109, 2006.
25. Einarsson, S. Vaccination against GnRH: pros and cons. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 48 n. 1, 2006. Disponível em : <http://www.actavetscand.com/content/48S1/S10>. Acesso 22 de Junho de 2017.
26. Pfizer Inc, 2010. VIVAX® é a primeira vacina comercial contra o odor de macho inteiro. Disponível em: improvac.com/sites/improvac/ptbr/pages/productoverview.aspx. Acesso em 11 de fevereiro de 2017.