

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Cláudio Afonso Pinho Lopes**

**POTENCIAL DA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO TOTAL DE
COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO SUÍNOS PARA A
ESTERILIZAÇÃO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGOS E DE CADELAS**

**Fortaleza, Ceará
Dezembro de 2003**

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
Cláudio Afonso Pinho Lopes**

**POTENCIAL DA IMUNIZAÇÃO COM EXTRATO TOTAL DE
COMPLEXOS *CUMULUS*-OÓCITO SUÍNOS PARA A
ESTERILIZAÇÃO DE FÊMEAS DE CAMUNDONGAS E DE CADELAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

Fortaleza, Ceará

Dezembro de 2003

L696i Lopes, Cláudio Afonso Pinho

Potencial da imunização com extrato total de complexos cumulus-oócito suínos para a esterilização de camundongos e de cadelas / Dissertação de Mestrado do Programa de Pós - Graduação em Ciências Veterinárias. Fortaleza, UECE, 2003
82p; il; 29,7 cm.

Dissertação de Mestrado UECE.FAVET.

1. Imunoesterilização 2. cadelas 3. complexos cumulus-oócito

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias**

Título do Trabalho: Potencial da imunização com extrato total de complexos *cumulus*-oócitos suínos para a esterilização de fêmeas de camundongos e de cadelas.

Autor: Cláudio Afonso Pinho Lopes

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Orientadora

Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello
Examinador

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Examinador

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Examinador

Aos meus queridos pais, Heine e Suely, e à minha irmã Cláudia Valéria, pelo amor e pelo exemplo de vida.

A todos os vira-latas do mundo, que sobrevivem e morrem terrivelmente a cada dia, carentes, mais do que de abrigo e de alimento, de amor. Tudo isso é por vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela luz, por tudo.

A São Francisco de Assis, pela força, pela luz e pela proteção na minha vida e no meu trabalho pelo nossos irmãos animais.

Aos meus amados pais, Heine Maia e Suely Pinho Lopes, pela vida, pelo amor, pela dedicação, pela compreensão, pelo carinho, pela alegria, enfim, por tudo. À minha amada irmã e madrinha Cláudia Valéria, pelo amor, pelo carinho, pela atenção, pela amizade, pelo apoio, pela alegria, por existir. À minha namorada Cynthia Levi Baratta Monteiro, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio em todos os momentos difíceis, pela dedicação, pela felicidade.

À minha orientadora, Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, pela amizade, pela atenção, pelos inúmeros ensinamentos, pela alegria, pelo apoio, pelo exemplo.

Aos meus irmãozinhos peludos Biriba, Biriba Jr e Neo, pelo amor, pela lealdade, pelo companheirismo, pela alegria. Aos meus irmãozinhos Mansinho (*in memoriam*) e Birutta (*in memoriam*), que partiram em matéria, mas ficaram no meu coração e me motivaram a trilhar este caminho pelos animais. Aos amiguinhos Daniele, Zigu, Guga, Chico, Catarina, Leão, Flash e Bino, pelo carinho e pela alegria.

Aos amigos Ana Karine Rocha de Melo Leite, Marcos Renato Franzosi Mattos, Lucilene Simões-Mattos, Ney de Carvalho Almeida, Ticiane Franco Pereira da Silva, Priscila Teixeira de Sousa e Carlos Alfonso Hedman Altamirano, pelo companheirismo, pelo apoio nas dificuldades, pelos momentos de alegria compartilhados, pelo carinho.

A todos os colegas de laboratório, especialmente Luziana Tavares Braga, Karine Lins Leite, Maria Vivina Barros Monteiro, Viviane Moura de Farias, Giovana Quintino Rodrigues, Verdiane de Araújo Verdiano e Juliana Ramos Silva. Aos amigos de outros laboratórios pela ajuda, especialmente Eduardo Aragão, Ana, Ricardo, Rosinha e Daniele.

Aos professores do PPGCV-UECE, pelos ensinamentos e pela amizade. Às amigas Alzenira e Adrianinha, pela amizade, pela atenção, pelo carinho.

Aos Professores Dr Cláudio Cabral Campello, Dr José Ferreira Nunes, Dr Vicente José de Figueirêdo Freitas, Dr Renato de Azevedo Moreira, Dra Teresa Neuma Albuquerque Gomes Nogueira, Dra Isabel Florindo Guedes, e ao Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, em especial à Dra Evanisa Ventura e ao Dr Paulo Roberto, pela atenção e pela colaboração.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	PÁGINA
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. O homem e o cão	18
2.2. Dinâmica da população de cães	19
2.3. Contracepção para cães	20
2.4. Sistema imunológico	21
2.4.1. Respostas imunes humoral e celular	21
2.4.1.1. <i>Resposta imune humoral</i>	21
2.4.1.2. <i>Resposta imune celular</i>	22
2.5. Métodos imun contraceptivos	24
2.6. Vacinas contraceptivas baseadas em hormônios	25
2.7. Vacinas contraceptivas baseadas em antígenos de gametas	27
2.7.1. Vacinas contraceptivas baseadas em antígenos espermáticos	27
2.7.2. Vacinas contraceptivas baseadas na zona pelúcida	30
2.8. Vacinas contraceptivas baseadas em proteínas placentárias	34
3. JUSTIFICATIVA	35
4. HIPÓTESE	37
5. OBJETIVOS	38
6. MATERIAL E MÉTODOS	39
6.1. Animais	39
6.2. Antígeno	40
6.2.1. Obtenção dos ovários suínos	40
6.2.2. Isolamento dos complexos <i>cumulus</i> -oócito e preparação do extrato	40
6.3. Imunização	42
6.4. Protocolo experimental	43
6.5. Sorologia	45
6.5.1. Obtenção de soros	45

6.5.2. ELISA indireto	45
6.5.3. Imunodifusão dupla em gel de agarose (IDGA)	46
6.6. Avaliação da resposta imune celular dos camundongos	47
6.7. Avaliação do desempenho reprodutivo	48
6.8. Análise histopatológica	50
6.9. Análise estatística	52
7. RESULTADOS	53
7.1. Produção de anticorpos anti-EpCCO em camundongos	53
7.2. Produção de anticorpos anti-EpCCO em cadelas	54
7.3. Resposta imune celular de camundongos ao EpCCO	55
7.4. Avaliação do desempenho reprodutivo	56
7.5. Análise histopatológica	58
8. DISCUSSÃO	62
9. CONCLUSÃO	67
10. PERSPECTIVAS	68
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmulas para cálculo dos índices analisados na avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas de camundongos.	48
Tabela 2. Critérios utilizados para a classificação dos folículos ovarianos.	50
Tabela 3. Reatividade dos soros das cadelas imunizadas com EpCCO sete dias após a administração do reforço.	53
Tabela 4. Aumento percentual da espessura da pata 24 horas após desafio nos camundongos imunizados com EpCCO.	54
Tabela 5. Índices reprodutivos das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO e acasaladas uma semana após a administração da última dose de reforço.	55
Tabela 6. Duração da gestação e tamanho da ninhada das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO e acasaladas uma semana após a administração da última dose de reforço.	56
Tabela 7. Números de folículos por corte histológico dos ovários das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO obtidos uma semana após a administração da última dose de reforço.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo de produção do EpCCO.	40
Figura 2. Protocolo experimental da imunização dos camundongos com EpCCO.	42
Figura 3. Protocolo experimental da imunização das cadelas com EpCCO.	43
Figura 4. Escores de ELISA para amostras de soro dos camundongos obtidas uma semana após a aplicação do último reforço.	52
Figura 5. Fotomicrografias de folículos ovarianos em atresia.	59
Figura 6. Fotomicrografias das estruturas ovarianas estudadas.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CAP – Célula apresentadora de antígeno
ELISA – Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima
EpCCO – Extrato total de complexos *cumulus*-oócito suínos
FA – Antígeno de fertilização
FNT - α - fator de necrose tumoral alfa
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG – Gonadotrofina coriônica humana
H-E - hematoxilina e eosina
IDGA – Imunodifusão em gel de agarose
Ig - Imunoglobulina
IL – Interleucina
LT - linfócitos T
LT CD4 - linfócito auxiliar
LT CD8 - linfócito citotóxico
NK - células matadoras naturais
PBS – solução tampão salina-fosfato
pZP – Zona pelúcida suína
RHT - reação de hipersensibilidade tardia
Th1 - linfócito auxiliar 1
ZP – Zona pelúcida
ZP3 – Glicoproteína 3 da zona pelúcida

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da imunização com extrato total de complexos *cumulus*-oócito suínos (EpCCO) para a esterilização de fêmeas de camundongos e de cadelas. Folículos pré-ovulatórios de ovários suínos foram puncionados para obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos, que foram homogeneizados para produção do EpCCO. Camundongas foram imunizadas com doses de 100, 500, 1.000 ou 1.500 µg de EpCCO, enquanto que cadelas foram imunizadas com 10 mg de EpCCO. A produção de anticorpos anti-EpCCO foi avaliada por ELISA para as camundongas e por IDGA para as cadelas. A resposta imune celular foi avaliada nas camundongas através da reação de hipersensibilidade tardia (RHT) após desafio com EpCCO. Ovários de metade das camundongas foram obtidos para exame histopatológico. A outra metade foi mantida com camundongos para avaliação do desempenho reprodutivo. A resposta imune ao EpCCO foi significativamente maior nos animais imunizados com 100 µg, reduzindo-se com o aumento da dose de imunização. Os escores de ELISA e a RHT foram significativamente maiores no grupo de animais imunizados com 100 µg (D100) e mais baixos no grupo imunizado com 1500 µg (D1500). Observou-se uma redução significativa dos folículos antrais nos ovários dos animais de D100, enquanto em D1500 não houve alteração ovariana. Houve uma redução significativa do tamanho da ninhada no D100, enquanto em D1500 este parâmetro não se alterou. Houve produção de anticorpos anti-EpCCO nas cadelas imunizadas. Conclui-se que a imunização com EpCCO possui o potencial de esterilizar fêmeas de camundongos e cadelas.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the potential of immunization with swine *cumulus*-oocyte complex extract (EpCCO) for sterilization of female mice and bitches. Pre-ovulatory follicles from pig ovaries were aspirated to obtain *cumulus*-oocyte complexes, which were homogenized to be used as EpCCO. Female mice were immunized with doses of 100, 500, 1.000 or 1.500 μg of EpCCO. Bitches were immunized with 10 mg de EpCCO. Anti-EpCCO production was assessed with ELISA for mice and IDGA for bitches. Cellular immune response in mice was evaluated through delayed hypersensitivity reaction (DHR) after challenge with EpCCO. Ovaries from half of the mice were removed for histopathological exam. Remaining mice were cohabited with males for the evaluation of reproductive performance. The level of the immune response to EpCCO was significantly higher in animals immunized with 100 μg , decreasing as the immunization dose was increased. The ELISA scores and DHR were significantly higher in the group of animals immunized with 100 μg (D100) and lower in the group immunized with 1500 μg (D1500). A significant reduction in antral follicles numbers in the ovary of animals from D100 was observed, but in D500 no alteration in the ovaries was verified. A significant reduction of litter size was observed in D100, and in D1500 this parameter showed no change. Anti-EpCCO were detected in immunized bitches. The conclusion is that immunization with EpCCO has the potential for sterilizing female mice and bitches.

1. INTRODUÇÃO

A superpopulação canina nos centros urbanos constitui uma das principais questões de bem-estar animal e um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Este fenômeno caracteriza-se, sobretudo, por um grande conjunto de cães que vivem nos logradouros públicos, compondo-se, assim, um importante reservatório de doenças. No âmbito dos programas de controle da raiva, zoonose considerada mais importante pelas autoridades sanitárias dada sua letalidade, as densidades de cães de rua são continuamente reduzidas através do método de captura e eutanásia (WANDELER *et al.*, 1988).

Contudo, tal abordagem é notadamente paliativa, por não se direcionar à causa do problema, que consiste de altas taxas de natalidade canina, responsáveis pelo crescimento da população em níveis excessivos. A quantidade de nascimentos excede em muito o número de pessoas dispostas a assumir a responsabilidade da criação de um animal, o que leva ao abandono e ao contínuo suprimento de indivíduos à população errante (WSPA, 1999). Neste contexto, um sistema de controle populacional de cães, para ser efetivo, deve contemplar a contenção da natalidade de animais pertencentes a um criador identificável, através de programas de controle reprodutivo. Entretanto, os métodos contraceptivos atualmente disponíveis para cães não são passíveis de aplicação em escala populacional, por razões econômicas, operacionais, culturais e/ou de segurança (WHO, 1992).

Dentre os avanços mais recentes na área de pesquisa contraceptiva, os métodos imun contraceptivos surgem como uma importante perspectiva para o desenvolvimento de técnicas eficientes, seguras e de baixo custo (BRADLEY *et al.*, 1999). Estes métodos utilizam o sistema imunológico, induzindo a produção de anticorpos capazes de se ligar a elementos fundamentais do processo reprodutivo, que, dessa forma, é interrompido (DELVES, 2002).

Quando os mecanismos efetores da resposta imunológica desenvolvida promovem a destruição total das estruturas-alvo, sem possibilidade de regeneração, obtêm-se a esterilização do animal submetido à técnica (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 2000).

Neste contexto, a imunização com proteínas de folículos ovarianos constitui uma alternativa promissora para o desenvolvimento de uma técnica de imunoesterilização para uso em cadelas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O homem e o cão

A domesticação do cão ocorreu, segundo estudos arqueológicos, na Eurásia, há cerca de 14.000 anos. Canídeos selvagens passaram a adentrar a área dos acampamentos humanos, para se alimentarem com sobras de comida, o que fez com que estabelecessem, paulatinamente, um convívio harmonioso com o homem. Em contrapartida, esses animais passaram a auxiliar na defesa dessas comunidades e na caça (WSPA, 1999).

Esta associação, muito vantajosa para ambos os envolvidos, extrapolou os limites da domesticação, constituindo, sobretudo, uma relação de parceria. Esta condição de reciprocidade evoluiu para um relacionamento no qual se integraram laços de afetividade e lealdade, passando o cão a ocupar uma posição especial na estrutura da sociedade humana, o que o fez ser tradicionalmente considerado "o melhor amigo do homem". Contudo, este vínculo de lealdade fora rompido unilateralmente pelo homem quando, tendo adotado o padrão urbano de assentamento, passou a permitir a reprodução deliberada de seus cães, não assumindo a responsabilidade pela vida dos animais das numerosas ninhadas, e os abandonando nas ruas, onde têm de sobreviver à própria sorte (KIRKPATRICK e RUTBERG, 2001).

2.2. Dinâmica da população de cães

Segundo estudos da Organização Mundial da Saúde sobre dinâmica populacional canina, não existe nenhuma prova de que a eliminação de cães possa gerar um impacto significativo sobre as densidades populacionais caninas ou sobre a propagação da raiva. Qualquer redução no tamanho da população canina, resultante do aumento da taxa de mortalidade, é rapidamente compensada pelo aumento da taxa de sobrevivência das frações remanescentes, que terão melhor acesso aos recursos disponíveis. Além disso, a taxa de reposição sobrepõe facilmente a taxa de eliminação, sendo que a mais elevada registrada até hoje gira em torno de 15% da população canina (WHO, 1992).

Por outro lado, as populações de cães errantes são mantidas a partir das crias em excesso dos animais domiciliados (que possuem elevadas taxas de sobrevivência, por receberem abrigo e alimento antes de serem abandonados às ruas), e não pelas proles dos próprios animais errantes, que apresentam taxas de sucesso de criação muito reduzidas (WANDELER *et al.*, 1988).

Dessa forma, um sistema de controle populacional de cães, para ser efetivo, deve contemplar a contenção da natalidade, através de programas de controle reprodutivo. Uma única cadela, produzindo oito cães por ano, pode, em sete anos, ser responsável pelo nascimento de até 781.250 animais, considerando-se a reprodução das crias nascidas, e, assim, a expansão geométrica do número de animais. Portanto, a restrição reprodutiva de uma única cadela é capaz de ter um impacto profundo sobre o problema de animais em excesso (OLSON e JOHNSTON, 1993).

2.3. Contracepção para cães

Os métodos contraceptivos atualmente disponíveis para controle reprodutivo canino não são passíveis de aplicação em escala populacional, por razões econômicas, operacionais, culturais e/ou de segurança.

O confinamento de cadelas durante o cio é considerado um método bastante satisfatório, por sua simplicidade e por não envolver custo algum. Contudo, em vários lugares sua aplicação é dificultada por questões culturais, não se podendo contar com a cooperação efetiva das comunidades, sobretudo as de baixa renda. A utilização prolongada de progestágenos, como a proligestona, a medroxiprogesterona e o megestrol, tem sido associada ao desenvolvimento de neoplasias mamárias e de piometrite. Além disso, estes produtos são bastante caros, o que impede seu uso pelas camadas mais pobres da sociedade. A esterilização cirúrgica, além de ter um custo elevado, é inviável em termos operacionais para a utilização em populações caninas numerosas (WHO, 1992).

2.4 Sistema imunológico

O sistema imune de um indivíduo saudável é capaz de responder a invasores através de muitos mecanismos que compreendem as imunidades inata e adquirida (DUTTA, 2002).

A imunidade inata caracteriza-se pelas barreiras físicas, células fagocitárias, células exterminadoras naturais (EN), mediadores e citocinas (ABBAS *et al.*, 2001). A imunidade adquirida ou específica é induzida ou estimulada através da exposição a substâncias estranhas. A cada sucessiva exposição a uma macromolécula a imunidade é aumentada em sua magnitude e em sua capacidade defensiva. A imunidade específica caracteriza-se pela presença de anticorpos específicos, linfócitos ativados e de memória e de citocinas derivadas de sua ativação, estabelecendo-se um processo de regulação para a manutenção da homeostase (ABBAS *et al.*, 2001). A imunidade é uma reação manifestada pelo organismo frente a substâncias estranhas, incluindo microrganismos, macromoléculas, proteínas e polissacarídeos, sem implicar necessariamente em uma patologia (ABBAS *et al.*, 2001). Um sistema de defesa mais especializado foi desenvolvido nos animais superiores durante a evolução e é manifestado através da resposta imune adaptativa ou adquirida que é classificada em imunidade humoral e imunidade celular (ROITT, 1989; ABBAS *et al.*, 2001).

2.4.1. Respostas imunes humoral e celular

2.4.1.1. Resposta imune humoral

O primeiro passo para a resposta imune humoral é a captura do material estranho, seu processamento e apresentação do antígeno pelas células apresentadoras de antígenos (CAP) aos linfócitos T auxiliares (LT CD4). Os determinantes antigênicos são associados a uma glicoproteína conhecida por complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC classe II) internamente na

CAP e, em seguida, levadas à superfície celular para apresentação e interação específica com os linfócitos T auxiliares através dos receptores (TCR) do linfócito T CD4. Essa interação é responsável pela ativação do linfócito T CD4, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que culminam com sua proliferação e diferenciação em células T efetoras e de memória, além da secreção de um padrão de citocinas que irão caracterizar e direcionar a produção específica de anticorpos (HARLOW *et al.*, 1988).

A ativação do linfócito ocorre através da transdução de sinais que levam à transcrição gênica de interleucina-2 (IL-2), de receptores de IL-2 e da ativação gênica de novas proteínas incluindo a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e interferon- γ (TIZARD, 1998). Assim, o linfócito T CD4 é levado a aumentar de volume, entrar no ciclo celular, secretar novas proteínas e, conseqüentemente, proliferar e se diferenciar, estimulado pela IL-2 produzida e secretada por ele mesmo.

Para que ocorra a ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos, faz-se necessário o contato entre linfócitos T CD4 e linfócitos B, pela participação de citocinas e de moléculas co-estimulatórias. Essa ligação gera a liberação de IL-4 por linfócitos T CD4 e a síntese de receptores para IL-4 nos linfócitos B. Após a ativação do linfócito B pela IL-4 em associação com outros sinais que não estão bem compreendidos, ocorre a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e a formação de células de memória. Os plasmócitos são responsáveis pela produção e liberação dos anticorpos a fim de que os mesmos possam interagir com os antígenos, formando os complexos imunes (HARLOW *et al.*, 1988).

2.4.1.2. Resposta imune celular

A resposta imune celular se inicia pela adesão do linfócito T citotóxico (LT CD8) à célula alvo através da ligação entre o complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHC-I) e moléculas oriundas de linfócitos T auxiliares tipo I (TH1). Além disso, a IL-2 produzida e secretada pela TH1 se conjuga com os receptores do LT

CD8, estimulando sua ativação, proliferação e diferenciação em células de memória e efetora. O LT CD8 efetor ou ativado libera grânulos contendo perforinas e granzimas que, dentro da célula alvo, ativam mecanismos que são responsáveis pelo processo de apoptose (forma de morte celular programada na qual todo material genético é fragmentado e a célula morre sem destruição da arquitetura tecidual; TIZARD, 1998). Outra forma pela qual o LT CD8 extermina outra célula é através da glicoproteína *fas* através do seu ligante *fasL* presente na célula alvo. Outros mecanismos de citotoxicidade vêm sendo estudados em diferentes protocolos experimentais.

2.5. Métodos Imunocontraceptivos

Os métodos imunocontraceptivos baseiam-se em imunizações ativas (vacinas) utilizando-se hormônios ou proteínas fundamentais à reprodução, que resultam na produção de anticorpos capazes de se ligar a estes elementos próprios do indivíduo. Uma vez recobertos por imunoglobulinas, estes fatores são impedidos de interagir com seus receptores, perdendo, assim, sua atividade biológica, o que interrompe o processo reprodutivo. A duração da infertilidade estabelecida por estes procedimentos varia de acordo com o título de anticorpos contraceptivos alcançado, podendo perdurar de meses a anos. As imunizações passivas (soros) podem também ser utilizadas (DELVES, 2002).

Quando a resposta imunológica desses procedimentos conduz à destruição total de tecidos fundamentais à gametogênese, obtêm-se uma esterilização imunomediada ou imunoesterilização do organismo submetido. O potencial de imunizações utilizando-se GnRH ou zona pelúcida suína para a esterilização de animais tem sido relatado (BRADLEY *et al.*, 1999; GONZÁLEZ, 2003).

Vinte e três vacinas contraceptivas têm sido desenvolvidas, sendo que seis destas, todas dirigidas contra hormônios, já se encontram em estágio de testes clínicos. Três destas vacinas são direcionadas contra a gonadotrofina coriônica humana (hCG), duas contra o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), e uma contra o hormônio folículo-estimulante (FSH)(TALWAR, 1997).

2.6. Vacinas contraceptivas baseadas em hormônios

Diversos estudos buscaram avaliar o potencial da imunização ativa contra hormônios reprodutivos como técnica contraceptiva, tendo sido avaliados o hormônio luteinizante, o hormônio folículo-estimulante, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), a testosterona, a progesterona e a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Destes, o GnRH e o hCG se mostraram os candidatos mais promissores (MELOEN, 1995).

O GnRH é um hormônio que desempenha um papel chave na regulação da atividade reprodutiva nos mamíferos, sendo sua estrutura molecular bem conservada entre as diversas espécies desta classe. Consiste de um decapeptídeo hipotalâmico que regula a secreção dos hormônios folículo-estimulante e luteinizante pela hipófise, e, portanto, controla a gametogênese em machos e fêmeas (MELOEN, 1995).

Miller *et al.* (2000) demonstraram a eficiência da vacinação contra o GnRH para controle reprodutivo de cervos de cauda branca. Após a imunização, observou-se uma redução de 88% na fertilidade do grupo de animais tratados em relação ao controle, redução esta que se manteve por período superior a dois anos sem a necessidade de reforços.

Estudos toxicológicos das duas vacinas contra GnRH atualmente desenvolvidas para o homem, uma na Índia (D-6 lys GnRH) e outra nos Estados Unidos (GnRH-1-TT), têm sido realizados. Ambas receberam autorizações dos órgãos reguladores do consumo e da comercialização de drogas para testes nesses dois países e na Áustria. Os testes com a vacina D-6 lys GnRH foram realizados em homens com carcinoma prostático no estágio avançado D2 com metástase. Com o incremento dos anticorpos, a concentração plasmática de testosterona foi reduzida aos níveis obtidos com a castração. Uma redução do antígeno prostático-específico (PSA) foi também observada (TALWAR, 1997).

Vacinas contra o hCG encontram-se em avançado estágio de desenvolvimento e estão sendo testadas pela Organização Mundial da Saúde em seres humanos, após ter sido demonstrada sua eficiência em babuínos (TALWAR *et al.*, 1993).

2.7. Vacinas contraceptivas baseadas em antígenos de gametas

O bloqueio do processo de fertilização por anticorpos constitui outra modalidade imun contraceptiva bastante estudada. Neste caso, os antígenos a serem bloqueados por imunoglobulinas consistem das moléculas presentes na superfície dos gametas, as quais são responsáveis pelas interações que resultam na fecundação. No oócito, tais moléculas correspondem às glicoproteínas da zona pelúcida, que constituem sítios de ligação aos espermatozóides e de ativação da reação acrossômica, enquanto que, no gameta masculino, os receptores para estas glicoproteínas zonárias ligadoras e/ou ativadoras representam os possíveis alvos.

2.7.1. Vacinas contraceptivas baseadas em antígenos espermáticos

A imunização de machos ou fêmeas com preparações de espermatozóides autólogos ou isólogos, ou de testículos maduros, resulta em infertilidade por falha de fertilização ou por morte embrionária pré-implantação em várias espécies (MENGE, 1970). A primeira demonstração da viabilidade de uma vacina contraceptiva baseada em antígenos de superfície espermáticos é atribuída a Baskin (1932), que induziu uma infertilidade prolongada em mulheres, imunizando-as com sêmen de seus maridos. Este experimento rendeu ao pesquisador uma patente americana de uma “vacina espermotóxica” em 1937 (US Patent 2 103 240).

A produção de anticorpos antiespermatozóides é também um fenômeno natural, sendo estimada sua ocorrência no homem ou na mulher em mais de 30% dos casais inférteis, nos quais, mais do que um fator que corrobora para a infertilidade, é a causa principal desta condição (SHULMAN, 1986).

Apesar de tais evidências acerca da viabilidade da imunização com espermatozóides para promoção de infertilidade, não é seguro utilizarem-se preparações de tais células inteiras, uma vez que estas possuem diversos antígenos internos e de superfície compartilhados com várias células somáticas (NAZ e MENGE, 1990). Assim, faz-se necessária a identificação de antígenos exclusivos da

célula espermática que tenham participação no processo de fertilização e sejam suficientemente imunogênicos para induzirem uma produção significativa de anticorpos de anticorpos no trato genital.

A indução da secreção de anticorpos antiespermatozóides no trato genital feminino representa a modalidade imun contraceptiva que apresenta menos efeitos sobre a fisiologia do organismo tratado. A presença de tais anticorpos no muco cervical pode ocasionar a aglutinação das células espermáticas, impedindo-as de progredirem ao trato reprodutivo superior da fêmea, ao passo que a presença desses anticorpos no fluido do oviduto pode impedir a ligação espermatozóide-óvulo. A ocorrência de casos naturais de produção de anticorpos aglutinadores de espermatozóides por mulheres em casais inférteis indica que essa estratégia pode ser efetiva, e a ausência de quaisquer efeitos colaterais à infertilidade devida à presença destes anticorpos é animadora (VAN VOORHIS e STOVALL, 1997).

Na fêmea, a cérvix deve ser o principal sítio para esta produção de anticorpos. A lâmina própria da endocérvix contém plasmócitos, sendo demonstrada a presença de IgG, IgA (em concentrações menores que as de IgG) (MESTECKY e RUSSELL, 2000) e de componentes do sistema complemento no muco cervical (PRICE e BOETTCHER, 1979). No fluido dos ovidutos, tanto IgA como IgG estão presentes, sendo, possivelmente, derivados da transudação de anticorpos circulantes (NAZ, 1999). Já os anticorpos presentes no fluido uterino parecem provir dos ovidutos.

Vacinações para indução de imunidade no trato genital têm sido estudadas intensamente (GOCKEL *et al.*, 2000), sobretudo pelo potencial destes procedimentos para a prevenção de doenças sexualmente transmissíveis (GALLICHAN *et al.*, 2001). A imunização intranasal parece ser um método efetivo para induzir a produção de anticorpos no trato reprodutivo feminino, sendo a subunidade B da toxina colérica um estimulador potente destas respostas (MESTECKY e RUSSELL, 2000).

Vacinas antiespermatozóides também têm potencial de aplicação em homens, embora o número de espermatozóides a serem neutralizados ($\sim 10^8$ - 10^9)

seja um desafio ainda maior que aquele de neutralizar um número bem menor (dezenas ou centenas) de espermatozóides presentes no trato reprodutivo superior da fêmea. Anticorpos neutralizadores teriam que adentrar o compartimento luminal do trato reprodutivo masculino, e isto poderia ser melhor conseguido através da indução de respostas secretórias de IgA na próstata (BEAGLEY, 1998).

Diversos antígenos espermáticos candidatos a uma vacina antiespermatozóide têm sido identificados através de abordagens como o uso de anticorpos obtidos de casais inférteis em bibliotecas de DNA recombinante (cDNA) testiculares (DIEKMAN E HERR, 1997), a eletroforese bidimensional de alta resolução e a técnica de Western Blot (SHETTY, 1999). Aqueles que se apresentaram especificamente na célula espermática e cujos anticorpos foram capazes de promover infertilidade têm sido isolados, caracterizados bioquímica e imunologicamente, e alguns já têm seu segmento de cDNA clonado e seqüenciado. Dentre estes, destacam-se a lactato desidrogenase (LDH-C4), os antígenos espermáticos de coelho (RSAs), as proteínas PH-20 e SP-10, o antígeno espermático do homem (HSA-63), o antígenos de fertilização FA-1 e FA-2 e o sinalizador de clivagem CS-1 (NAZ *et al.*, 1995). Destes, as glicoproteínas FA-1 e FA-2, presentes nos espermatozóides de várias espécies, mostraram-se os candidatos mais promissores.

Anticorpos contra o FA-1 têm sido verificados em homens e/ou mulheres de casais inférteis, sendo considerados mais como a causa principal da infertilidade nesses casos, do que como um dos fatores que, em associação, determinam esse fenômeno. Assim, fica naturalmente estabelecida a imunogenicidade significativa do FA-1, bem como o potencial dos anticorpos anti-FA-1 de promoverem infertilidade. Além disso, o fato de que tais pacientes inférteis são, de um modo geral, saudáveis, não apresentando qualquer doença concomitante, sugere uma localização do FA-1 restrita aos espermatozóides, atributo inexorável para seu uso em uma vacina contraceptiva (NAZ *et al.*, 1995).

O FA-1 é uma glicoproteína detectável nos espermatozóides a partir do estágio de espermatócito secundário (NAZ e BHARGAVA, 1990). Sua estrutura apresenta-se conservada evolutivamente entre várias espécies de mamíferos, como

o camundongo, o coelho, o búfalo, o macaco *rhesus* e o homem (COONROD *et al.*, 1994). Além de uma identidade molecular muito acentuada entre essas espécies, este antígeno parece desempenhar em todas a mesma função: anticorpos monoclonais contra o FA-1 bloqueiam completamente a fertilização *in vitro* (FIV) (NAZ *et al.*, 1995). A imunização ativa de coelhas com FA-1 purificado resultou em infertilidade, sendo verificada a especificidade dos anticorpos policlonais obtidos para os espermatozóides. O epítipo funcional do FA-1 foi isolado, seu cDNA clonado e seqüenciado, e sua estrutura, um decapeptídeo, sintetizada (NAZ, 1987a).

Vacinas contra a FA-2, uma proteína espermática que parece estar relacionada ao desencadeamento da reação acrossômica, também têm sido desenvolvidas pela Organização Mundial da Saúde para uso em humanos (NAZ *et al.*, 1995).

2.7.2. Vacinas contraceptivas baseadas na zona pelúcida

A ZP consiste de um envoltório protetor presente nos oócitos dos mamíferos, que persiste no embrião até sua implantação no útero. A estrutura da ZP compreende filamentos compostos pela polimerização de duas glicoproteínas (ZP2 e ZP3) de forma alternada, interligados por unidades de uma terceira glicoproteína (ZP1) (WASSARMAN *et al.*, 1996).

Os carboidratos da ZP desempenham papéis fundamentais no processo de fertilização, sendo responsáveis pela fixação dos espermatozóides ao oócito, bem como pelo desencadeamento da reação acrossômica. A glicosilação da ZP é feita através de ligações covalentes dos carboidratos com radicais amino de resíduos de asparagina (carboidratos N-ligados), ou com resíduos de serina ou treonina (carboidratos O-ligados) (BARBER e FAYRER-HOSKEN, 2000).

A partir de estudos realizados com camundongos, foi demonstrado que os oligossacarídeos O-ligados presentes na ZP3 atuam como as moléculas de adesão

primárias para os espermatozóides, ligando-se a receptores complementares da superfície espermática. Espermatozóides tratados com misturas destes glicídeos mostraram-se incapazes de se fixarem a oócitos *in vitro* (FLORMAN e WASSARMAN, 1985). MILLER *et al.* (1992) descreveram que os oligossacarídeos O-ligados responsáveis por essa função são os resíduos de N-acetil-glucosamina, que têm como receptores as enzimas β -1,4-galactosiltransferase (GALTase) presentes na membrana plasmática dos espermatozóides.

Além de promoverem a adesão espermática, os resíduos de N-acetil-glucosamina também respondem pela indução da reação acrossômica (RA). LOESER e TULSIANI (1999) demonstraram a ocorrência da RA em espermatozóides capacitados, tratados com este glicídeo, o que não foi observado quando utilizaram-se glucose ou galactose.

Outros estudos têm revelado que, além dos oligossacarídeos O-ligados da ZP3, outros carboidratos da ZP também são necessários para a fixação espermática e para a ativação da RA. LIU *et al.* (1997) demonstraram a capacidade de oligossacarídeos N-ligados da ZP3 em desempenhar estas funções. Isto sugere a existência de um sistema de fixação espermática composto por múltiplas moléculas de adesão (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 1999).

Uma vez estabelecido o papel fundamental dos carboidratos da ZP no processo de fertilização, vários estudos buscaram avaliar o potencial de anticorpos capazes de se ligarem à ZP e recobri-los como forma de bloqueio desse processo. Experimentos realizados em diversas espécies revelaram falhas na fertilização *in vitro* de oócitos tratados com antissoro de animais imunizados contra a ZP, confirmando a capacidade de anticorpos anti-ZP em impedir a fixação espermática, a reação acrossômica e, assim, a fertilização (NAZ *et al.*, 1995).

A partir destes resultados, diversos experimentos têm sido realizados para verificar a eficácia da imunização ativa contra as glicoproteínas da ZP como técnica

contraceptiva. O extrato total de zona pelúcida suína (pZP) tem sido o imunógeno mais utilizado nestes estudos, por ser facilmente obtida em grandes quantidades, e pelo elevado grau de homologia que possui com as zonas pelúcidas das demais espécies de mamíferos (BARBER e FAYRER-HOSKEN, 2000).

A imunização com pZP mostrou-se capaz de causar infertilidade em fêmeas de hamsters, cavalos, coelhos, cães, macacos, elefantes, cervos de cauda branca, focas e leões da montanha (GORMAN *et al.*, 2002). Inicialmente, atribuiu-se a infertilidade obtida pela imunização com pZP ao mecanismo de bloqueio da fertilização por anticorpos anti-ZP observado *in vitro*. Contudo, a constatação de alterações dos níveis de hormônios ovarianos sugeriu que, *in vivo*, o mecanismo primário pelo qual os anticorpos anti-ZP determinavam infertilidade consistia da inibição da atividade ovariana. De fato, WOOD *et al.* (1981) observaram que coelhas imunizadas com pZP não ovularam em resposta à administração de hCG, ao contrário das fêmeas não-imunizadas. A análise histológica dos ovários dessas fêmeas revelou uma interrupção da foliculogênese, confirmando assim que a imunização com pZP resultava em disfunção ovariana.

O primeiro estudo a avaliar o potencial de anticorpos contra a ZP para o controle reprodutivo em cadelas foi realizado por MAHI e YANAGIMACHI (1979). Estes pesquisadores compararam a afinidade da ligação cruzada à ZP canina, de anticorpos contra a ZP bovina e anticorpos contra a ZP suína, e avaliaram também a capacidade destes em inibir a fertilização *in vitro* de oócitos caninos. Os melhores resultados foram obtidos com anticorpos anti-pZP, o que definiu o potencial da zona pelúcida suína como imunógeno para a imunonoconcepção em cadelas.

A partir desses resultados, MAHI-BROWN *et al.* (1982) estudaram os efeitos da imunização ativa com extrato total de zona pelúcida suína sobre a fertilidade em cadelas. Foram administradas, em média, cinco doses de pZP por cadela, com intervalos mensais entre as aplicações, para a estabilização (pico) dos títulos de anticorpos anti-pZP. Durante o primeiro estro pós-tratamento, as cadelas foram inseminadas, e todas se apresentaram inférteis. Contudo, a duração da infertilidade

não foi verificada, relatando-se apenas que uma das cadelas imunizadas manteve-se infértil no segundo estro pós-tratamento.

2.8. Vacinas contraceptivas baseadas em proteínas placentárias

Vacinas capazes de promover a interrupção da gestação constituem outra modalidade de controle reprodutivo imunológico. Contudo, esta abordagem representa um questão ética complexa, por se tratar de um método abortivo e não contraceptivo. Diversas proteínas placentárias possuem potencial para utilização nessas vacinas, sendo a proteína transportadora de riboflavina (PTR) um candidato bastante promissor.

A PTR é o principal mediador do suprimento vitamínico para o embrião, sendo detectável em oócitos ovulados e em embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento através de imunohistoquímica. A vacinação de fêmeas de roedores e de primatas com a PTR de galinha induz a produção de anticorpos que **interrompem** a gestação por volta do momento da implantação, ou, possivelmente, durante a fertilização. A PTR também é encontrada como um componente dos espermatozoides, e, portanto, pode ter um potencial adicional em uma vacina contraceptiva anti-espermática (ADIGA *et al.*, 1997).

3. JUSTIFICATIVA

A superpopulação canina nos centros urbanos é responsável pelo dispêndio de um elevado volume de recursos públicos. O tratamento profilático pós-exposição para pessoas agredidas por cães de rua, instituído obrigatoriamente nestes casos por não ser possível a observação do animal agressor, onera bastante os cofres públicos. Isto porque o custo de um esquema completo de soro-vacinação pode exceder a quantia de U\$ 1.000, quando se utilizam vacinas produzidas em cultivo celular (MELTZER e RUPPRECHT, 1998), e a freqüência desses eventos de agressão é significativa (LOPES, 2001).

Além do elevado custo, outra consideração importante acerca desses tratamentos é o risco de reações adversas severas, quando usadas vacinas produzidas por cultivo em cérebro de animais. Em nosso serviço público de saúde, a vacina utilizada é a Fuenzalida & Palácios, obtida a partir de cultivo em cérebros de camundongos lactentes. Reações de desmielinização central e/ou periférica, algumas das quais fatais, têm sido associadas ao uso dessa vacina, sendo reportadas incidências de até um caso para cada 1.250 tratamentos (MELTZER e RUPPRECHT, 1998).

Mais que um dilema de ordem econômica e sanitária, a superpopulação canina e a forma como é controlada compõem um complexo dilema ético. A qualidade de vida de cães abandonados é extremamente baixa, sendo marcantes a fome, doenças, desconforto por condições climáticas adversas, atropelamentos, crueldades, enfim, uma situação multifatorial de sofrimento intenso. Um estudo de avaliação clínica da população de cães errantes do Município de Manaus, Amazonas, caracterizou bem esta situação. Constatou-se que apenas 5,3% dos animais encontravam-se sadios, enquanto 46,6% apresentavam sinais de debilidade orgânica e baixo nível de infestação parasitária, e 47,9% foram considerados gravemente enfermos, apresentando doenças infecciosas e/ou parasitárias, debilidade orgânica acentuada e distrofias músculo-esqueléticas (BRITES-NETO, 1999).

Neste contexto, faz-se fundamental e urgente o desenvolvimento de métodos contraceptivos eficientes, seguros e de custo suficientemente baixo para permitir sua utilização em massa. Assim, será possível intervir de maneira racional, efetiva e humanitária sobre o problema da superpopulação canina, obtendo-se uma economia expressiva de recursos públicos, além de se estar protegendo a população dos riscos inerentes ao tratamento profilático anti-rábico pós-exposição, e, sobretudo, promovendo o bem-estar animal. O potencial de vacinas esterilizadoras em reunir todas as características supracitadas representa uma importante perspectiva para a solução desta questão.

De acordo com KIRKPATRICK e RUTBERG (2001), “um imunoesterilizador para animais de companhia seria uma graça extraordinária para os milhões de cães e de gatos que, em todo o mundo, sofrem e morrem a cada ano, carentes de compaixão e de lares amorosos”.

4. HIPÓTESE

A imunização de fêmeas de camundongos e de cadelas com extrato total de complexos *cumulus*-oócito de suíno (EpCCO) resulta na produção de anticorpos capazes de se ligar cruzadamente às células dos folículos ovarianos desses animais, que são então destruídas por mecanismos efetores do sistema imune.

5. OBJETIVOS

A) Objetivo geral:

Avaliar o potencial da imunização com extrato total de complexos *cumulus*-oócito de suínos para a esterilização de camundongos (*Mus musculus*) e de cadelas (*Canis familiaris*).

B) Objetivos específicos:

- Avaliar as respostas imunes humoral e celular à imunização com EpCCO em camundongos;
- Verificar o efeito da imunização com EpCCO sobre o desempenho reprodutivo em fêmeas de camundongos;
- Avaliar histologicamente os ovários de fêmeas de camundongos submetidas à imunização com EpCCO;
- Verificar a produção de anticorpos em cadelas submetidas à imunização com EpCCO.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Animais experimentais

6.1.2. Camundongos

Foram utilizados 100 camundongos albinos Swiss, fêmeas, com oito semanas de idade, pesando 25-35 g, oriundos das colônias do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes animais foram mantidos em caixas de polipropileno padronizadas, sob condições adequadas de temperatura e umidade, recebendo 12 horas/dia de iluminação natural (6:00 – 18:00), e sendo alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

6.1.3. Cadelas

Utilizaram-se também 10 cadelas sem raça definida (SRD), adultas, pesando em torno de 7 Kg, que foram gentilmente cedidas pelo Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza. Estes animais foram mantidos em canis desta instituição sob condições adequadas de temperatura e umidade, recebendo 12 horas/dia de iluminação natural (6:00 – 18:00). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial e receberam água à vontade.

6.2. Antígeno

6.2.1. Obtenção dos ovários suínos

Ovários suínos foram coletados imediatamente após a inspeção sanitária nos abatedouros Marupiara e Paraibano, localizados no Município de Maracanaú/CE. Após a coleta, procedeu-se a lavagem do material com álcool a 70%, enxágue com solução de NaCl 0,9% esterilizada, e transporte a 4°C nesta mesma solução em até uma hora ao Laboratório de Imunologia e Bioquímica dos Animais, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Estadual do Ceará.

6.2.2. Isolamento dos complexos *cumulus*-oócito e preparação do extrato

Realizou-se a punção dos folículos pré-ovulatórios para obtenção de complexos *cumulus*-oócito, utilizando-se seringa e agulha de 25x7. A suspensão obtida foi centrifugada a 300 \times g por cinco minutos para separação dos referidos complexos no precipitado, e do fluido folicular no sobrenadante, que foi então dispensado. Os complexos foram ressuspensos em salina tamponada com fosfato (PBS) 0,01 M e pH 7,2 a 4°C, sendo em seguida homogeneizados com o uso de grau e pistilo, obtendo-se assim o extrato total de complexos *cumulus*-oócito suínos (EpCCO). A concentração protéica do extrato foi medida através do método de Bradford (1976), sendo utilizada albumina sérica bovina para definição da curva padrão. A leitura foi feita em espectrofotômetro utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm. A concentração do extrato foi então ajustada para 10 mg/mL através da adição de PBS 0,01 M, pH 7,2. Em seguida, o EpCCO foi dividido em alíquotas de 2 mL, que foram mantidas congeladas a -20°C. O processamento completo do ovário para obtenção do EpCCO está representado no diagrama da figura 1.

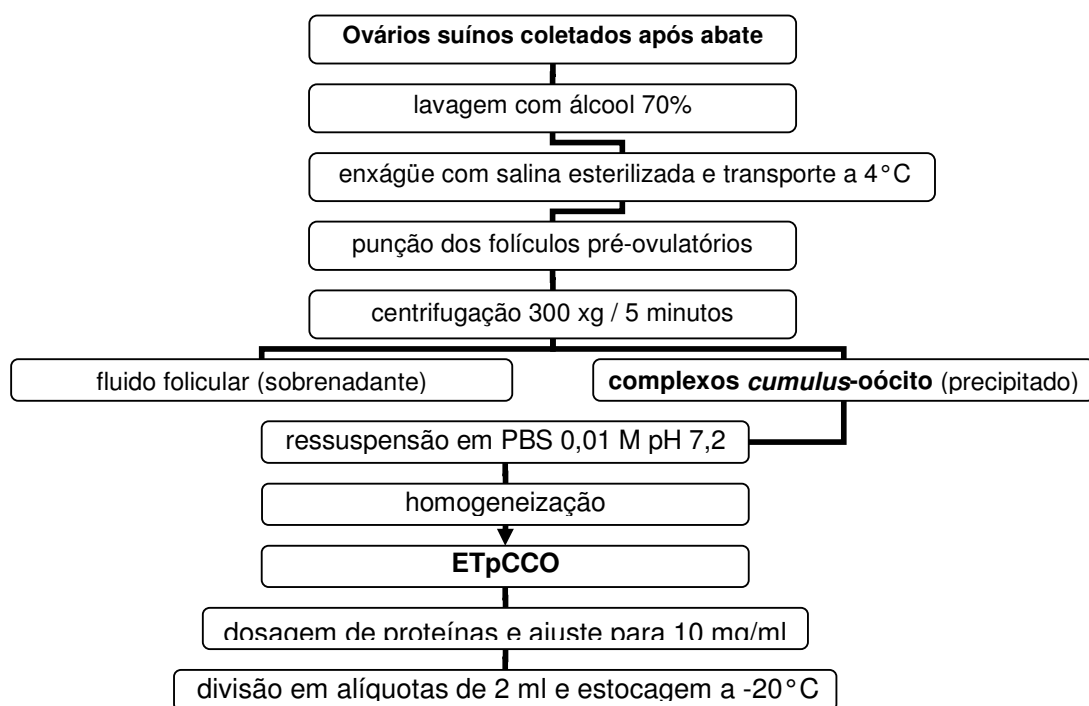


Figura 1. Protocolo de produção do EpCCO.

6.3. Imunização

Os camundongos foram imunizados por via subcutânea no dorso, com diferentes quantidades de EpCCO (relacionadas no protocolo experimental) e 1,0 mg de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃], suspensos em 0,2 mL de salina esterilizada.

As cadelas foram imunizadas por via subcutânea no dorso, com 10 mg de EpCCO e 1,0 mg de Al(OH)₃. Após 14 dias, uma dose de reforço sem adjuvante foi aplicada.

6.4. Protocolo experimental

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em cinco grupos de 20 animais, que foram imunizados com diferentes doses do EpCCO conforme o esquema descrito na figura 2. A cada 14 dias, doses de reforço foram aplicadas, perfazendo um total de cinco imunizações (primoimunização e quatro reforços).

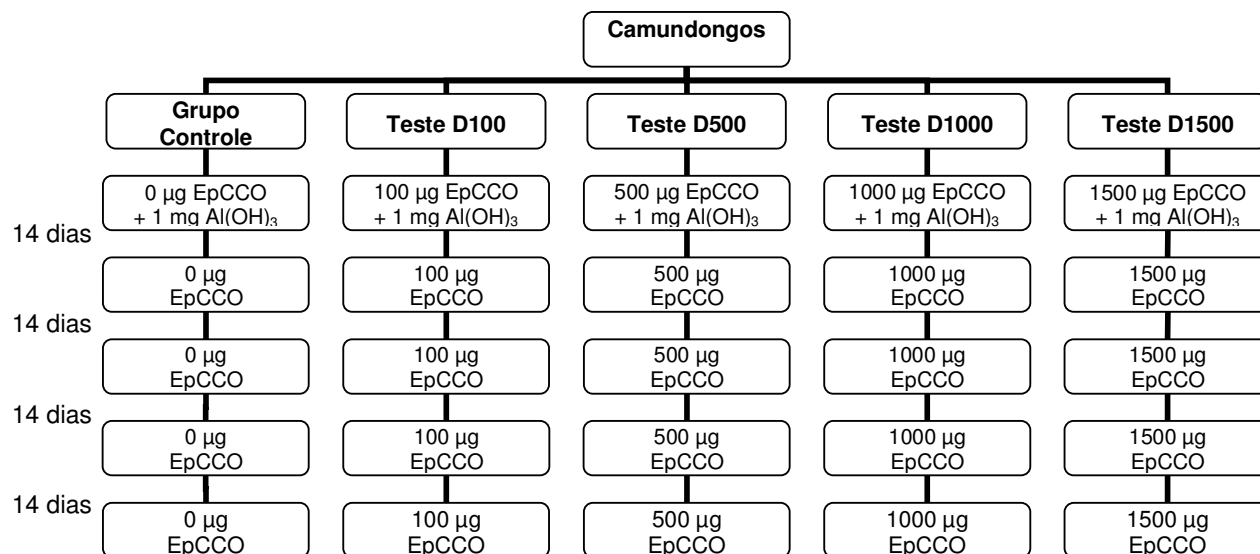


Figura 2. Protocolo experimental da imunização dos camundongos com EpCCO.

As cadelas foram numeradas e sorteadas para a formação de dois grupos: grupo teste (n=5), que foi imunizado com EpCCO conforme descrito anteriormente, e grupo controle, que recebeu apenas o adjuvante (Figura 3).

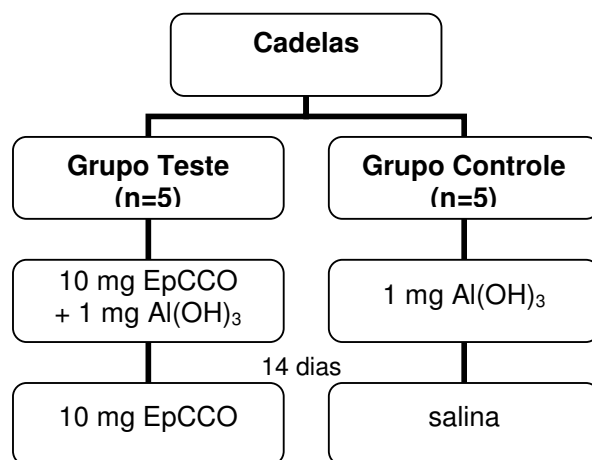


Figura 3. Protocolo experimental da imunização das cadelas com EpCCO.

6.5. Sorologia

6.5.1. Obtenção de soros

Amostras de sangue dos animais experimentais foram coletadas uma semana após a aplicação da última dose de reforço, por venopunção do plexo retro-orbital ou da veia jugular, respectivamente para os camundongos e para as cadelas. Após uma hora de repouso a 37°C, o coágulo formado nas amostras de sangue foi desprendido das paredes dos tubos de coleta. Estes foram então mantidos a 4°C por uma noite para retração do coágulo e liberação do soro, o qual foi transferido para tubos Eppendorf e conservado a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

6.5.2. ELISA indireto

Para avaliação da produção de anticorpos anti-EpCCO nos camundongos imunizados, foi realizado o Ensaio Imunoadsorvente Ligado a Enzima (ELISA) indireto. Para tanto, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas adicionando-se 50 µL de EpCCO a 100 µg/mL a cada poço, seguindo-se incubação a 4°C durante uma noite. Os poços foram então lavados com PBS-Tween 20 a 0,05%, e bloqueados pela adição de 50 µL/poço de solução de leite em pó desnatado (MOLICO®) a 1%, seguida de incubação a 37°C durante duas horas. As placas foram novamente lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05%, e preenchidas com 50 µL/poço dos soros a serem analisados, em duplicata, que foram diluídos com PBS 0,01 M, pH 7,2 nas proporções de 1:2 a 1:4.096. Após incubação a 37°C por duas horas, realizou-se lavagem das placas com PBS-Tween 20 a 0,05%, e adição de 50 µL/poço de anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (SIGMA), diluídos com PBS 0,01 M, pH 7,2 na proporção de 1:5.000. As placas foram incubadas a 37°C por duas horas, lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05%, sendo então adicionados 50 µL/poço do substrato cromógeno orto-fenilenodiamino-H₂O₂ (OPD; SIGMA). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL/poço de H₂SO₄, e a densidade óptica dos poços foi medida em um leitor automático de microplacas utilizando-se o comprimento de onda de 492 nm. Para cada amostra, as densidades ópticas de cada uma das doze diluições foram somadas e multiplicadas

por 1.000, sendo o valor obtido definido como o escore do ELISA, que foi utilizado para a análise estatística (VERDOLIN *et al.*, 2001).

6.5.3. Imunodifusão dupla em gel de agarose (IDGA)

A resposta imunológica das cadelas foi avaliada através do método de imunodifusão dupla em gel de agarose de Ouchterlony (OUCHTERLONY, 1949). Placas de difusão foram preparadas adicionando-se 6 ml de solução de agarose a 1% (p/v) em PBS, a placas de Petri de 75x50 mm. Um poço central e seis periféricos foram produzidos com o uso de um cortador apropriado. Após a adição de 50 µL do EpCCO no poço central, e, nos poços periféricos, de 50 µL dos soros a serem testados, diluídos com PBS 0,01M pH 7,2 na proporção 1:32 (soro:tampão), incubou-se a placa em uma câmara úmida a temperatura ambiente (25°C) durante cinco dias.

6.6. Avaliação da resposta imune celular dos camundongos

Para avaliação da resposta imune celular dos camundongos à imunização com EpCCO, realizou-se, uma semana após a aplicação da última dose de reforço, o teste do edema de pata, para a verificação da reação de hipersensibilidade tardia (RHT). Após a medição da espessura das patas posteriores com um paquímetro digital, 20 μ L do EpCCO e 20 μ L de solução de NaCl a 0,15 M foram injetados no espaço subcutâneo dos coxins plantares direito e esquerdo respectivamente. Vinte e quatro horas depois, a espessura das patas posteriores foi novamente medida, e a diferença entre a espessura da pata direita e a espessura da pata esquerda foi considerada como o aumento devido à RHT. Os resultados foram expressos como o percentual de aumento da espessura da pata.

6.7. Avaliação do desempenho reprodutivo

Uma semana após a aplicação da última dose de reforço de EpCCO, as fêmeas de camundongos foram divididas em pares, que foram alojados separadamente com um macho comprovadamente fértil. Os animais foram monitorados continuamente para o registro de cópulas (através de observação direta ou de verificação da presença de um tampão copulatório vaginal) e de nascimentos. Para a avaliação do desempenho reprodutivo dos animais, foram analisados os seguintes parâmetros (HELLWIG *et al.*, 2002):

- A) **Índice de cópula**, que foi definido como o percentual de fêmeas que copularam, dentre o total de fêmeas do grupo experimental mantidas com um macho;
- B) **Índice de fertilidade**, que foi definido como o percentual de fêmeas que produziram ninhadas, dentre o total de fêmeas do grupo experimental;
- C) **Duração da gestação**, que foi definida como o intervalo de dias decorridos entre a observação da primeira cópula ou de um tampão copulatório vaginal, e o nascimento de uma ninhada;
- D) **Tamanho da ninhada** (número de filhotes);
- E) **Índice de nascidos vivos**, que foi definido como o percentual de filhotes vivos em uma ninhada;
- F) **Índice de viabilidade**, que foi definido como o percentual de filhotes vivos no dia quatro pós-parto em relação a total de filhotes nascidos vivos;
- G) **Índice de sobrevivência após 21 dias**, que foi definido como o percentual de filhotes vivos no dia 21 pós-parto em relação ao total de filhotes nascidos vivos.

A Tabela 1 relaciona as fórmulas utilizadas para cálculos dos índices descritos.

Tabela 1. Fórmulas para cálculo dos índices analisados na avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas de camundongos (HELLWIG *et al.*, 2002).

ÍNDICE	FÓRMULA
Cópula	$\frac{\text{número fêmeas que copularam} \times 100}{\text{número de fêmeas mantidas com um macho}}$
Fertilidade	$\frac{\text{número fêmeas que produziram ninhadas} \times 100}{\text{número de fêmeas}}$
Nascidos vivos	$\frac{\text{número de filhotes paridos vivos} \times 100}{\text{número de filhotes paridos}}$
Viabilidade	$\frac{\text{número de filhotes vivos no dia 4 pós-parto} \times 100}{\text{número de filhotes paridos vivos}}$
Sobrevivência após 21 dias	$\frac{\text{número de filhotes vivos no dia 21 pós-parto} \times 100}{\text{número de filhotes paridos vivos}}$

6.8. Análise histopatológica

Uma semana após a aplicação do último reforço, 10 camundongos de cada grupo foram sacrificados por deslocamento cervical para coleta dos ovários, que foram lavados com solução salina fisiológica e imediatamente imersos em solução de formol a 10% em PBS 0,01 M pH 7,2, onde permaneceram por 24 horas. Procedeu-se a técnica histológica de rotina, incluindo as etapas de desidratação gradativa em álcool etílico, diafanização em xilol, e inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram processados em um micrótomo, obtendo-se quatro secções não-contíguas de 5 µm espessura, que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H-E), e analisadas por microscopia óptica. As lâminas foram identificadas com códigos, de forma que o examinador não soubesse a que grupo experimental uma dada amostra pertencia.

A análise dos ovários consistiu na verificação de alterações indicativas de processo auto-imune direcionado aos folículos (infiltração de células inflamatórias, lesões nas células foliculares etc.), e na contagem destes elementos, seguindo-se a metodologia descrita por Mahi-Brown *et al.* (1992). Cada folículo visível em uma secção foi classificado quanto ao estágio de desenvolvimento e contado. Uma vez que os folículos primordiais e primários foram de difícil identificação, quando a secção analisada não continha seu oócito, apenas aqueles com oócito evidente foram contados. Os critérios utilizados para a classificação dos folículos estão relacionados na Tabela 2.

Além da contagem de folículos primordiais ou em desenvolvimento, o número de folículos em atresia também foi contado, sendo a observação de pelo menos cinco células em apoptose utilizada como critério para identificação de tais entidades (AMSTERDAM *et al.*, 2001).

Tabela 2 - Critérios utilizados para a classificação dos folículos ovarianos (BANKS, 1991).

Folículo	Estrutura
Primordial	Oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas.
Primário	Oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas ou colunares.
Secundário	Oócito circundado pela zona pelúcida e por duas ou mais camadas de células da granulosa.
Antral	Oócito circundado pela zona pelúcida e por várias camadas de células da granulosa com corpúsculos de Call-Exner, ou presença do antro folicular.

6.9. Análise estatística

Os dados foram expressos sob a forma de média aritmética e desvio-padrão, e analisados com o programa estatístico Prism 4 for Windows (GraphPad Software Inc.). O efeito da imunização com EpCCO sobre os títulos de anticorpos anti-EpCCO, sobre a reação de hipersensibilidade tardia e sobre as contagens de folículos ovarianos foi avaliado por análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$). A ocorrência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi verificada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os índices reprodutivos e a produção de anticorpos anti-EpCCO em cadelas foram analisados pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,05$).

7. RESULTADOS

7.1. Produção de anticorpos anti-EpCCO em camundongos

A resposta imune humoral à imunização com EpCCO foi avaliada nos camundongos através de ELISA indireto, utilizando-se soros obtidos sete dias após o último reforço. Os níveis de anticorpos policlonais anti-EpCCO foram expressos como escores de ELISA, definidos como a soma das densidades ópticas de todas as diluições multiplicada por 1.000. O maior escore do ELISA foi verificado no grupo de animais imunizados com 100 µg de EpCCO (10.404 ± 906), seguido em ordem decrescente pelos escores dos grupos imunizados com 500 µg (7.932 ± 891), 1.000 µg (4.096 ± 917), 1.500 µg (1.544 ± 895) de EpCCO e grupo controle (348 ± 66). Os resultados estão representados na Figura 4.

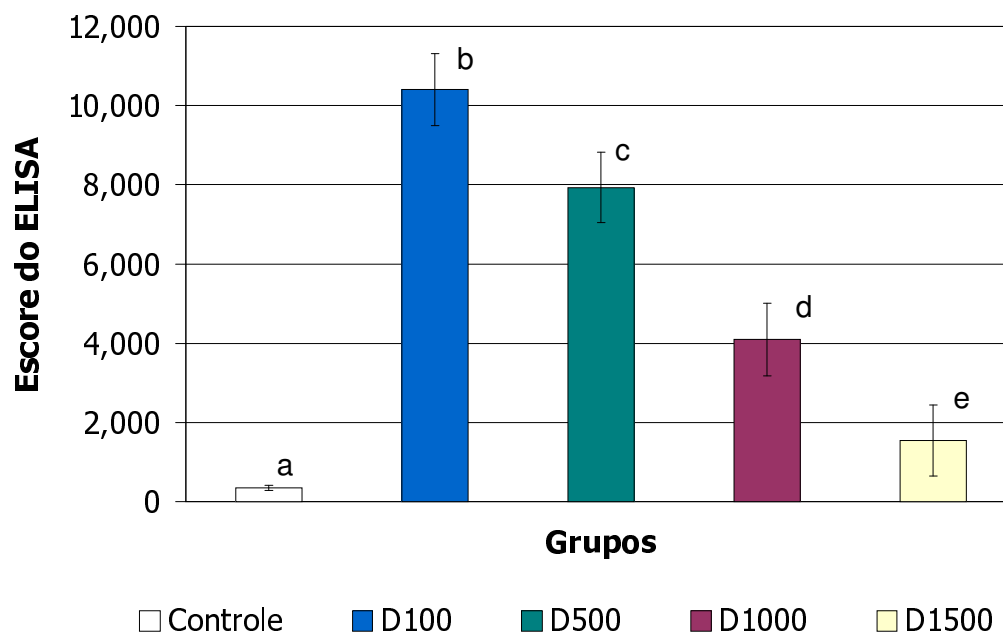


Figura 4. Escores de ELISA para amostras de soro dos camundongos obtidas uma semana após a aplicação do último reforço. ^{a,b,c,d,e} Diferença significativa (teste de Tukey, $p < 0,05$).

7.2. Produção de anticorpos anti-EpCCO em cadelas

Para avaliação da resposta imune humoral das cadelas à imunização com EpCCO, amostras de sangue foram coletadas uma semana após a aplicação da dose de reforço, sendo a reatividade ao EpCCO dos soros obtidos verificada através do teste de imunodifusão dupla em gel de agarose. Foram observadas reações positivas para todas as amostras de soro do grupo de cadelas imunizadas com EpCCO. Não foi observada nenhuma reação positiva para as amostras de soro dos animais do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 – Reatividade dos soros das cadelas imunizadas com EpCCO sete dias após a administração do reforço.

Grupo	Número de soros reativos*
Controle	0/5
Teste	5/5

* O soros foram diluídos com PBS 0,01 M pH 7,2 na proporção de 1:32 (soro:tampão).

7.3. Resposta imune celular de camundongos ao EpCCO

A resposta imune celular à imunização com EpCCO foi avaliada nos camundongos uma semana após a aplicação da última dose de reforço, através da indução de uma reação de hipersensibilidade tardia, utilizando-se o modelo do edema de pata. O aumento percentual da espessura da pata foi maior nos grupos de animais imunizados com doses de 100 µg ($17,47 \pm 1,61$) e de 500 µg ($15,45 \pm 1,64$) de EpCCO ($p < 0,05$). No grupo imunizado com 1.000 µg, esse aumento foi significativamente inferior ($9,55 \pm 1,62$), sendo ainda menor no grupo imunizado com 1.500 µg ($6,52 \pm 1,36$) ($p < 0,05$). Os resultados estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 – Aumento percentual da espessura da pata direita em decorrência da reação de hipersensibilidade tardia induzida nos camundongos imunizados com EpCCO uma semana após a aplicação da última dose de reforço.

Grupo	Aumento (%) [*]
Controle	$1,18 \pm 0,08^a$
D100	$17,47 \pm 1,61^b$
D500	$15,45 \pm 1,64^c$
D1000	$9,55 \pm 1,62^d$
D1500	$6,52 \pm 1,36^e$

^{a,b,c,d,e} Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa conforme verificado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); * Espessura da pata direita 24 h após injeção intraplantar de 20 µL de EpCCO, subtraída a espessura da pata esquerda, na qual foram injetados 20 µL de salina fisiológica, sendo o resultado dividido pela espessura original da pata esquerda e multiplicado por 100.

7.4. Avaliação do desempenho reprodutivo

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$) em relação aos índices de cópula, de fertilidade, de nascidos vivos, de viabilidade e de lactação (Tabela 5).

Tabela 5 – Índices reprodutivos das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO e acasaladas uma semana após a administração da última dose de reforço.

Grupo*	Índices reprodutivos (%)				
	Cópula	Fertilidade	Nascidos vivos	Viabilidade	Sobrevivência após 21 dias
Controle	100	100	100	100	100
D100	100	90	100	100	100
D500	100	100	100	100	90
D1000	100	100	100	90	100
D1500	100	90	100	100	100

*Grupos de 10 animais

A duração da gestação também não diferiu entre os grupos. Contudo, observou-se uma redução significativa do tamanho da ninhada nos grupos de animais imunizados com 100 μg ($4,3 \pm 0,7$) e com 500 μg ($6,0 \pm 0,8$) de EpCCO em relação aos demais grupos, que não diferiram entre si ($p < 0,05$). Os resultados estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6 – Duração da gestação e tamanho da ninhada das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO e acasaladas uma semana após a administração da última dose de reforço.

Grupo*	Duração da gestação (dias)	Tamanho da ninhada (nº filhotes)
Controle	20,90±0,87	9,1 ± 0,7 ^a
D100	21,14±0,76	4,3 ± 0,7 ^b
D500	20,87±0,82	6,0 ± 0,8 ^c
D1000	21,23±0,79	8,9 ± 0,7 ^a
D1500	21,04±0,86	9,1 ± 0,7 ^a

^{a,b,c} Diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa conforme verificado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); * Grupos de 10 animais.

7.5. Análise histopatológica

A análise histopatológica dos ovários das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO não revelou a presença de fagócitos polimorfonucleares, macrófagos ou linfócitos em nenhuma das amostras examinadas. Contudo, foram observadas alterações significativas dos números de folículos em atresia, de folículos antrais e de corpos lúteos nos ovários dos animais dos grupos D100 e D500 em relação aos demais grupos, que não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Os resultados estão relacionados na Tabela 7.

O número de folículos em atresia foi significativamente maior nos ovários dos animais dos grupos D100 e D500 ($p < 0,05$). Estes folículos apresentaram uma grande quantidade de células com evidência de apoptose (pela ocorrência de cariorrexe) e de corpos apoptóticos (corpúsculos altamente basófilos que resultam da divisão do citoplasma da célula apoptótica em brotos que contêm um fragmento nuclear). Por outro lado, as quantidades de folículos antrais e de corpos lúteos foram significativamente menores nos grupos D100 e D500 ($p < 0,05$). A Figura 5 mostra fotomicrografias de folículos atrésicos de animais dos grupos controle e D100. Na Figura 6, podem ser observadas as diferentes estruturas ovarianas estudadas.

Tabela 7 – Números de folículos por corte histológico dos ovários das fêmeas de camundongos imunizadas com EpCCO obtidos uma semana após a administração da última dose de reforço.

Grupo*	Nº de folículos / secção					Corpo lúteo
	primordial	primário	secundário	antral	atrésico	
Controle	10,9 ± 1,6	4,0 ± 0,3	3,2 ± 0,3	11,9 ± 0,8 ^a	4,6 ± 0,5 ^a	6,1 ± 0,5 ^a
D100	10,8 ± 1,5	3,8 ± 0,4	3,0 ± 0,4	5,5 ± 0,8 ^b	10,1 ± 0,6 ^b	2,8 ± 0,7 ^b
D500	11,3 ± 1,7	3,9 ± 0,2	3,9 ± 0,3	8,5 ± 0,7 ^c	7,4 ± 0,5 ^c	4,4 ± 0,6 ^c
D1000	9,9 ± 1,5	4,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	11,9 ± 0,8 ^a	4,8 ± 0,6 ^a	6,3 ± 0,6 ^a
D1500	11,5 ± 1,6	4,2 ± 0,3	3,0 ± 0,3	11,8 ± 0,7 ^a	4,8 ± 0,5 ^a	6,4 ± 0,7 ^a

^{a, b, c} Teste de Tukey (p<0,05); * Grupos de 10 animais.

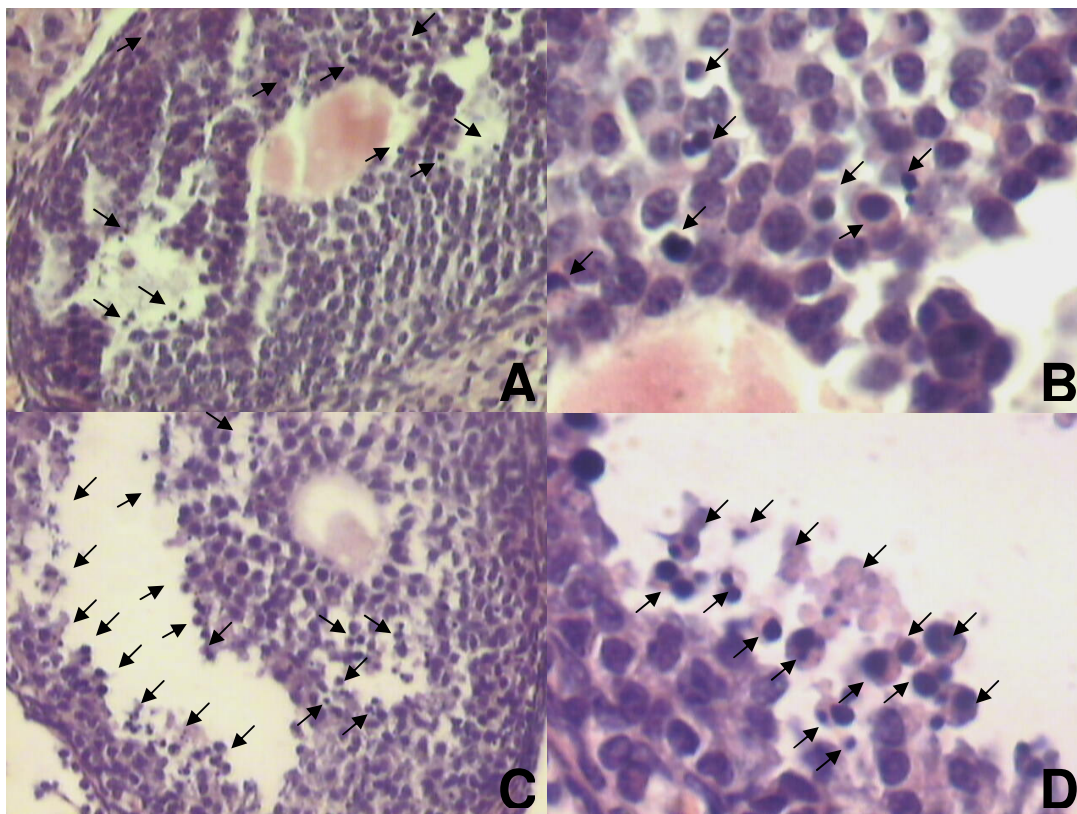


Figura 5. Fotomicrografias de folículos ovarianos em atresia. A) Folículo atrésico de animal do grupo controle (200X, H-E); B) Folículo atrésico de animal do grupo controle (600X, H-E); C) Folículo atrésico de animal imunizado com doses de 100 µg de EpCCO (200X, H-E); D) Folículo atrésico de animal imunizado com doses de 100 µg de EpCCO (600X, H-E). As setas indicam células da granulosa com evidência de apoptose (cariorrexe) e corpos apoptóticos. Estas amostras são representativas de todos os animais de um mesmo grupo.

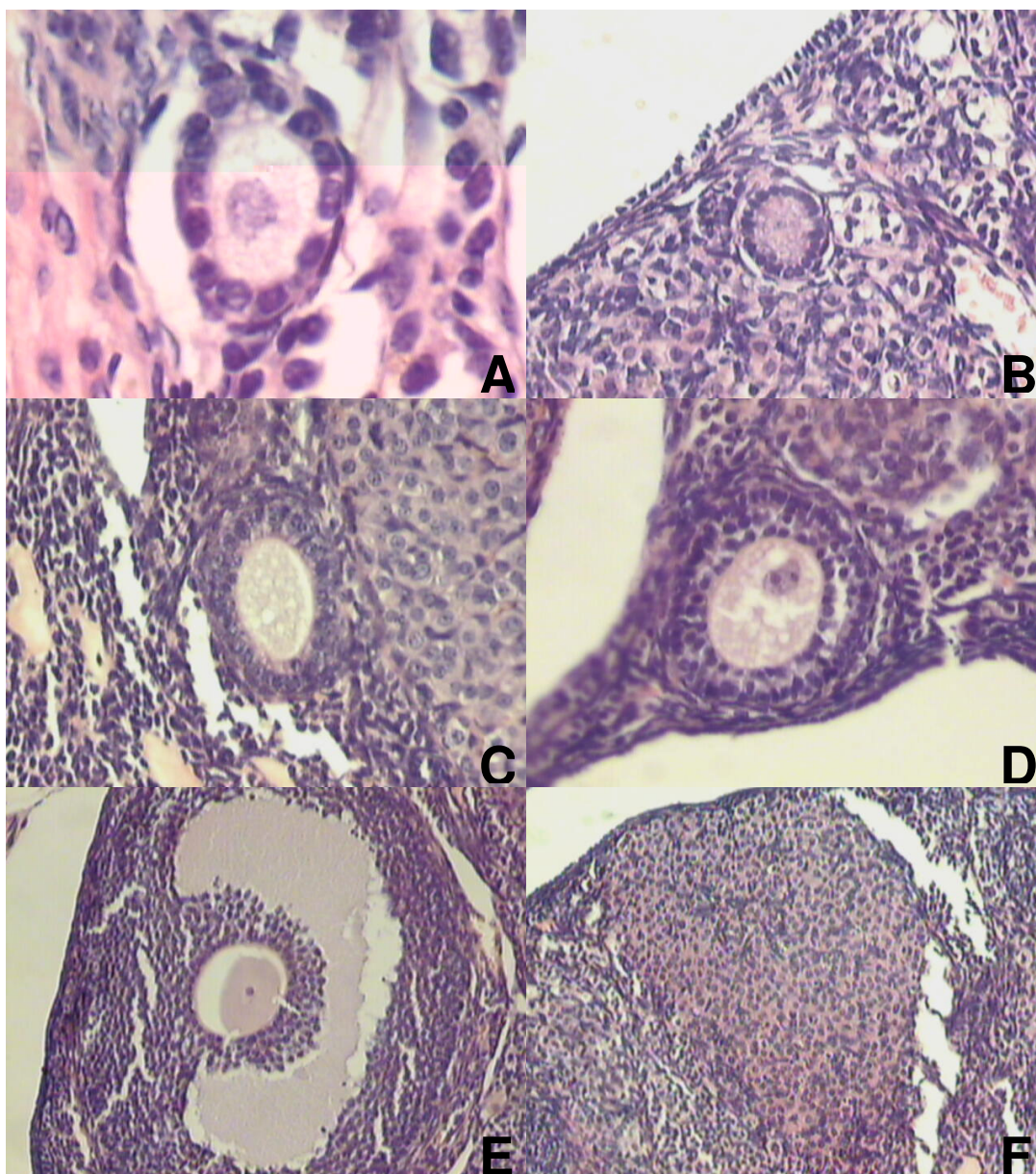


Figura 6. Fotomicrografias das estruturas ovarianas estudadas. A) Folículo primordial (600X, H-E); B) Folículo primário (100X, H-E); C) Folículo primário (200X, H-E); D) Folículo secundário (200X, H-E); E) Folículo antral (100X, H-E); F) Corpo lúteo (100X, H-E).

8. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a imunização com EpCCO induz o desenvolvimento de respostas imunes celulares e humorais significativas, conforme observado no teste de indução da reação de hipersensibilidade tardia e no ELISA. De fato, antígenos particulados, como células inteiras, bactérias e vírus, são bastante imunogênicos (HARLOW e LANE, 1998).

A intensidade das respostas imunes humoral e celular à imunização com EpCCO variou em função da dose utilizada, sendo reduzida com o aumento da quantidade de antígeno utilizada. Segundo JANEWAY *et al.* (2001), a magnitude da resposta imunológica depende da dose de imunógeno administrada. Abaixo de um determinado limiar de dose, a maioria das proteínas não induz qualquer resposta imunológica. Acima desse limiar, ocorre um aumento gradual na resposta à medida que a dose de antígeno é aumentada, até que um largo platô é alcançado, seguindo-se um declínio, que também evolui com o aumento da dose de antígeno. Com doses muito elevadas de antígeno, a resposta imunológica é inibida, o que deve ser importante para a manutenção da tolerância para proteínas próprias abundantes, como as proteínas plasmáticas.

A inibição da resposta imune ocasionada pelo aumento da dose de imunógeno dá-se pela indução de anergia nos clones de células T específicos para o antígeno utilizado. As moléculas do antígeno em alta concentração interagem diretamente com os linfócitos T, ao invés de serem apresentadas pelas células especializadas que fornecem o estímulo adequado. Essa interação direta resulta na transdução de sinais para a expressão de um gene repressor que torna a célula anérgica (TIZARD, 1998).

Assim, a redução da reação de hipersensibilidade tardia observada com o aumento da dose de EpCCO pode estar relacionada com a indução progressiva de anergia nos linfócitos T. Como a resposta humoral aos antígenos do EpCCO depende do auxílio de células T (resposta B dependente de T), a produção de anticorpos foi reduzida com a diminuição da resposta celular.

Diante do exposto, as quantidades de 500, 1.000 e 1.500 µg de EpCCO devem situar-se no intervalo de valores de dose correspondentes à porção decrescente da curva de resposta. A dose de 100 µg pode estar situada nesse intervalo, ou mesmo na faixa de valores relacionados ao platô da resposta imune, sendo assim necessários testes com doses menores para verificação desta hipótese.

O grau das alterações histológicas nos ovários dos animais imunizados variou, por sua vez, em função do nível da resposta imune humoral. A imunização com 100 µg de EpCCO, que levou à maior produção de anticorpos, resultou no maior aumento do número de folículos atrésicos e na maior redução da quantidade de folículos antrais e de corpos lúteos. A dose de 500 µg induziu uma produção de anticorpos menor que a dose de 100 µg, sendo inferior também a intensidade das alterações histológicas. Os animais imunizados com 1.000 ou 1.500 µg de EpCCO desenvolveram respostas de anticorpos ainda menores, e não apresentaram alterações nas populações de folículos ovarianos. Assim, parece existir uma relação entre as modificações ovarianas verificadas e a produção de anticorpos anti-EpCCO. Como não foi observada infiltração de linfócitos nos ovários alterados, sugere-se que a imunidade citomediada independente de anticorpos não tenha participação no processo.

Em outros estudos envolvendo indução de auto-imunidade, evidências da participação de anticorpos na reação contra o tecido-alvo também foram encontradas. VLADUTIU e ROSE (1971) relataram uma correlação estreita entre o dano à tireóide e a resposta imune humoral em um modelo de tireoidite autoimune experimental.

SKINNER *et al.* (1984) observaram **um aumento do número de folículos atrésicos** e uma redução significativa das quantidades de folículos antrais em ovários de coelhas imunizadas com zona pelúcida suína (pZP). Estes autores também atribuíram tais efeitos à resposta imune humoral, mas não à resposta imune celular, uma vez que constataram uma correlação entre as alterações e a presença de anticorpos anti-pZP, e não observaram nenhum sinal de inflamação ou infiltrados mononucleares. Resultados semelhantes foram obtidos com macacos-esquilo (**GULYAS** *et al.*, 1983), hamsters (**HASEGAWA** *et al.*, 1992), camundongos

imunizados com zona pelúcida de rato (MAHI-BROWN, 1992), coelhos imunizados com zona pelúcida homóloga (KERR, 1999) e cangurus (KITCHENER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, observou-se que os folículos classificados como atrésicos nos grupos de animais que desenvolveram respostas humorais mais intensas apresentavam um número visivelmente maior de células com evidência de apoptose e de corpos apoptóticos em relação aos animais do grupo controle. LI *et al.* (2002), ao imunizarem fêmeas de camundongos com pZP, também observaram a ocorrência de picnose nuclear e de corpos apoptóticos em folículos antrais, além da redução do número de folículos em desenvolvimento e da ausência de corpos lúteos. Estes autores consideraram a produção e a ação de anticorpos anti-ZP como a causa do aumento da frequência de apoptose folicular, uma vez que não foi observada infiltração de células inflamatórias. Assim, se tais alterações histológicas estiverem realmente associadas a elevados níveis de anticorpos específicos para as células foliculares, o mecanismo desse fenômeno deve ser a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA).

A CCDA pode ocorrer quando uma célula é revestida por imunoglobulinas do isotipo G (IgG) específicas para antígenos presentes em sua superfície. Linfócitos citotóxicos e células exterminadoras naturais (EN), o mediador celular predominante neste processo, ao circularem ligam-se a tais moléculas de IgG através de receptores específicos para a porção livre (Fc) desses anticorpos da IgG denominados FcR ou CD 16. A ligação Fc-FcR ativa a célula citotóxica, que responde com a síntese e secreção de citocinas e de toxinas celulares, que promovem a morte da célula-alvo (ABBAS *et al.*, 2001). Isto pode ocorrer através da indução do processo de apoptose mediada pelo fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) e por outras citotoxinas secretadas (TIZARD, 1998).

A apoptose (do grego *apo*=de, *ptosis*=cair) consiste em um processo fisiológico de morte celular, no qual diversos estímulos específicos ativam enzimas que clivam o DNA no núcleo, que se fragmenta (cariorrexe) juntamente com o citoplasma para formar os corpos apoptóticos (BRASILEIRO-FILHO, 1998).

O aumento significativo do número de folículos atrésicos e a redução do número de folículos antrais após a imunização com EpCCO, conforme foi observado neste estudo, sugerem que, ao atingirem o estágio antral de desenvolvimento, os folículos, em quantidade acima do normal, foram induzidos à atresia. Por sua vez, a redução do número de folículos antrais resultou em uma quantidade menor de corpos lúteos, que são formados a partir desses folículos após a ovulação.

O tamanho da ninhada é influenciado pelo número de óvulos disponíveis para a fertilização (taxa de ovulação), pelas taxas de fertilização e de implantação, e pela proporção de embriões implantados que sobrevivem até o parto (U.S. EPA, 1996). Assim, a redução significativa do tamanho da ninhada nos animais imunizados com 100 ou 500 µg de EpCCO pode ter decorrido de uma menor taxa de ovulação, o que é sugerido pelo menor número de corpos lúteos nos ovários desses animais. A taxa de fertilização também pode ter sido reduzida pela ação de anticorpos anti-pZP capazes de revestir os oócitos ovulados, impedindo a adesão espermática e o desencadeamento da reação acrossômica, necessários ao processo de fertilização.

SHIVERS et al. (1972) demonstraram que anticorpos produzidos em coelhos imunizados com ovários de hamster homogeneizados se ligam à zona pelúcida de oócitos de hamster e bloqueiam a fertilização *in vitro*. A injeção desses anticorpos em fêmeas de hamster e de camundongo também mostrou-se capaz de impedir a fertilização *in vivo* (**OIKAWA e YANAGIMACHI, 1975; JILEK e PAVLOK, 1975; TSUNODA e CHANG, 1978a**).

MAHI E YANAGIMACHI (1979) trataram oócitos caninos com soro de coelhos imunizados com ovários caninos homogeneizados, e observaram o bloqueio da fertilização *in vitro*. A diluição progressiva do soro anti-ovário utilizado resultou no aumento gradual do número de oócitos fertilizados. Dessa forma, o título de anticorpos anti-pZP obtidos no presente trabalho pode ter sido suficiente para bloquear a fertilização de alguns oócitos ovulados, reduzindo, assim, a taxa de fertilização. **Além do bloqueio da fertilização, anticorpos anti-zona podem também reduzir taxa de implantação (TSUNODA e CHANG, 1978b; EAST et al., 1985).**

Os índices de viabilidade e de sobrevivência 21 dias após o nascimento, que não diferiram entre os grupos experimentais, indicam normalidade dos filhotes, sugerindo que os oócitos formadores desses animais não foram alterados.

A demonstração da capacidade de cadelas de desenvolver uma resposta imune humoral significativa à imunização com EpCCO estabelece o potencial deste procedimento para a imunoesterilização nesta espécie. Mais estudos são necessários para verificar a capacidade dos anticorpos anti-EpCCO de se ligar cruzadamente aos folículos antrais caninos, induzindo o processo de apoptose, conforme observado nas fêmeas de camundongos.

9. CONCLUSÃO

A imunização de camundongos com o extrato total de complexos *cumulus*-oócitos suínos (EpCCO) induziu a produção de elevados níveis de anticorpos anti-EpCCO, aumentou a incidência de atresia em folículos ovarianos antrais e reduziu o número de filhotes por ninhada.

A imunização de cadelas com o extrato total de complexos *cumulus*-oócitos suínos foi capaz de induzir uma produção de anticorpos anti-EpCCO significativa, o que estabelece o potencial deste procedimento para a esterilização nessa espécie.

10. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho estabelecem o potencial da imunização com proteínas obtidas de folículos ovarianos suínos para a esterilização de cadelas. Contudo, faz-se necessário o desenvolvimento do protocolo de imunização, de forma que seja possível a obtenção de níveis ainda maiores de anticorpos capazes de ligar-se cruzadamente aos folículos caninos. Assim, será possível a destruição da totalidade destas estruturas, e não apenas de uma parte, conforme observado. Além disso, o uso preferencial de proteínas de folículos primordiais deve ser buscado, sendo que a depleção do “pool” destes folículos estabelece definitivamente a esterilidade, não sendo necessária a manutenção de níveis elevados de anticorpos. Dentre essas proteínas, é imprescindível a identificação daquelas específicas do folículo ovariano, para que se evitem efeitos adversos em outros órgãos e tecidos que compartilhem antígenos com o ovário. Neste contexto, surge no horizonte uma importante perspectiva para findar o sofrimento de inúmeros animais abandonados que padecem a cada dia em todo o mundo.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Cellular and Molecular Immunology*. 4th ed, W.B. SAUNDERS, Philadelphia, 553p., 2000.

ADIGA P.R.; SUBRAMANIAN, S; RAO, J.; KUMAR, M. Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals. *Hum. Reprod. Update*, 3:325-334, 1997.

AMSTERDAM, A.; KANNAN, K.; GIVOL, D.; YOSHIDA, Y.; TAJIMA, K., DANTES, A. Apoptosis of Granulosa Cells and Female Infertility in Achondroplastic Mice Expressing Mutant Fibroblast Growth Factor Receptor 3^{G374R}. *Mol. Endocrinol.*, 15:1610-1623, 2001.

BANKS, W.J. *Histologia veterinária aplicada*. 2^a. Ed., Manole, São Paulo, 1991.

BARBER, M.R.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. *J. Reprod. Immun.*, 46:103-124, 2000.

BASKIN, M.J. Temporary sterilization by the injection of human spermatozoa. A preliminary report. *Am. J. Obstet. Gynec.*, 24:892–897, 1932.

BEAGLEY, K.W.; WU, Z.L., POMERING, M.; JONES, R.C. Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 53:235–245, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.

BRADLEY, M.P.; EADE, J.; PENHALE, J. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J. Biotechnol.*, 73:91-101, 1999.

BRASILEIRO-FILHO, G. Bogliolo - *Patologia Geral*. 2ª ed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 312p., 1998.

BRITES-NETO, J. Avaliação clínica de uma amostragem da população canina errante no município de Manaus, Estado do Amazonas. Disponível em http://www.saudeanimal.com.br/hvvb/caninos/pop_cao.htm. Acesso em 15/10/2001.

COONROD, S.A., WESTHUSIN, M.; NAZ, R.K. Monoclonal antibody to human fertilization antigen-1 (FA-1) inhibits bovine fertilization in vitro: application in immunocontraception. *Biol. Reprod.*, 51:14-23, 1994.

DELVES, P.J.; LUND, T.; ROITT, I.M. Antifertility vaccines. *Trends Immunol.*, 23:213-219, 2002.

DIEKMAN, A.B.; HERR, J.C. Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 37:111-117, 1997.

DUTTA, R.C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. *Immunology Letters*, 83:153-161, 2002.

EAST, I.J.; GULYAS, B.J.; DEAN, J. Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity: effects on fertilization and early development. *Dev. Biol.*, 109:268-273, 1985.

FAYRER-HOSKEN, R.A.; BERTSCHINGER, H.J.; KIRKPATRICK, J.R. Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology*, 52:835-846, 1999.

FAYRER-HOSKEN, R.A.; DOOKWAH, H.D.; BRANDON, C.I. Immunocontrol in dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61:365-373, 2000.

FLORMAN, H.M.; WASSARMAN, P.M. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell*, 41:313-324, 1985.

GALLICHAN, W.S.; WOOLSTENCROFT, R.N.; GUARASCI, T.; McCLUSKIE, M.J.; DAVIS, H.L.; ROSENTHAL, K.L. Intranasal immunization with CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant dramatically increases IgA and protection against herpes simplex virus 2 in the genital tract. *J. Immunol.*, 166:3451–3457, 2001.

GOCKEL, C.M.; BAO, S.; BEAGLEY, K.W. Transcutaneous immunization induces mucosal and systemic immunity: a potent method for targeting immunity to the female reproductive tract. *Mol. Immunol.*, 37:537–544, 2000.

GONZÁLEZ, P.L.L.; PASTOR, P.M.; GRANADO, G.S.; LIU, I.K.M.; DEL PORTAL, I. Immunization of Prepubertal Bitches Against Porcine Zona Pellucida: Effects on Estradiol and Progesterone Profiles. 27th WSAVA Congress Proceedings, 2003.

GORMAN, S.P., LEVY, J.K.; HAMPTON, A.L. Evaluation of a porcine zona pellucida vaccine for the immunocontraception of domestic kittens (*Felis catus*). *Theriogenology*, 6689:1-15, 2002.

GULYAS, B.J.; GWSTKIN, R.B.L.; YUAN, L.C.; 1983. Active immunization of cynomolgus monkeys (*Macaca Fascicularis*) with porcine zona pellucida. *Gamete Res.*, 7:299-3XX, 1983.

HARLOW, E.D.; LANE, D. *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York , 349p., 1988.

HASEGAWA, A.; KOYAMA, K.; INOUE, M.; **et al.** Antifertility effect of active immunization with ZP4 glycoprotein family of porcine zona pellucida in hamsters. *J. Reprod. Immunol.*, 22:197-XXX, 1992.

HELLWIG, J.; GEMBARDT, C.; JASTI, S. Tetrahydrofuran: two-generation reproduction toxicity in Wistar rats by continuous administration in the drinking water. *Food Chem. Toxicol.*, 40:1515-1523, 2002.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Immunobiology*. 5th ed., Garland Publishing, New York and London, 466p., 2001.

JILEK, F.; PAVLOK, A. Antibodies against mouse ovaries and their effects of fertilization in vitro and in vivo in the mouse. *J. Reprod. Fert.*, 42:377-380, 1975.

KIRKPATRICK, J.F.; RUTBERG, A.T. Fertility Control in Animal. IN: Salem, D.J.; Rowan, A.N. (eds) *The State of the Animals 2001*. Human Society Press, Washington, 2001.

KITCHENER, A.L.; EDDS, L.M.; MOLINIA, F.C.; KAY, D.J. Porcine zonae pellucidae immunization of tammar wallabies (*Macropus eugenii*): fertility and immune responses. *Reprod. Fertil. Dev.*, 14:215-23, 2002.

LI, D.; SUN, X.; LI, C.; CAI, L.; MENG, Y. Effects on fertility of immunizing mice with anti-idiotypic antibodies to porcine zona pellucida antigen. *J. Reprod. Immunol.*, 54:81-92, 2002.

LIU, C.; LITSHER, E.S.; WASSARMAN, P.M. Zona pellucida glycoprotein mZP3 bioactivity is not dependent on the extent of glycosilation of its polypeptide or on sulfatation and syalilation of its oligossacharides. *J. Cell Sci.*, 110:745-752, 1997.

LOESER, C.R.; TULSIANI, D.R. The role of carbohydrates in the induction of the acrossome reaction in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 60:94-101, 1999.

LOPES, C.A.P.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LEITE, A.K.R.M. Profilaxia anti-rábica pós-exposição para agressões por animais errantes no Município de Fortaleza, Ceará. *Revista Ciência Animal*, 11:82-4, 2001.

MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Prevention of in vitro fertilization of canine oocytes by anti-ovary antisera: a potential approach to fertility control in the bitch. *J. Exp. Zool.*, 210:129-135, 1979.

MAHI-BROWN, C.A.; HUANG JR., T.T.F.; YANAGIMACHI, R. Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zonae pellucidae. *J. Exp. Biol.*, 222:89-95, 1982.

MAHI-BROWN, C.A.; McGUINNESS, R.; MORAN, F. The cellular immune response to immunization with zona pellucida antigens. *J. Reprod. Immunol.*, 21:29-46, 1992.

MELOEN, R.H. Basic aspects of immunomodulation through active immunization. *Liv. Prod. Sci.*, 42:135-145, 1995.

MELTZER, MI; RUPPRECHT, C.E. A review of the economics of the prevention and control of rabies. *Pharmacoeconomics*, 14:365-383, 1998.

MENGE, A.C. Immune reactions and infertility. *J. Reprod. Fert.*, 10:171-185, 1970.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M.W. Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27:351-355, 2000.

MILLER, D.J.; MACEK, M.B.; SHUR, B.D. Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, 357:585-593, 1992.

NAZ, R.K. The fertilization antigen (FA-1) causes reduction of fertility in actively immunized female rabbits. *J. Reprod. Immunol.*, 11:117-133, 1987.

NAZ, R.K. Vaccine for contraceptive targeting sperm. *Immunol. Rev.*, 171:193-202, 1999.

NAZ, R.K.; BHARGAVA, K. Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in male genital tract. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:175-183, 1990.

NAZ, R.K.; MENGE, A.C. Development of antisperm contraceptive vaccine for humans: why and how? *Hum. Reprod.*, 5:511-518, 1990.

NAZ, R.K.; SACCO, A.; SINGH, O.; PAL, R.; TALWAR, G. Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. *Hum Reprod Update*, 1:1-18, 1995.

OIKAWA, T.; YANAGIMACHI, R. Block of hamster fertilization by anti-ovary antibody. *J. Reprod. Fert.*, 45:487-494, 1975.

OLSON, P.N.; JOHNSTON, S.D. New developments in small animal population control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 202: 904-9, 1993.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol. Scand.*, 26:505-513, 1949.

PRICE, R.J.; BOETTCHER, B. The presence of complement in the human cervical mucus and its possible relevance to infertility in women with complement-dependent immobilizing antibodies. *Fertil. Steril.*, 32:61-66, 1979.

ROITT, I. M. *Imunologia*. 5^a ed., Atheneu, Rio de Janeiro, 452p., 1989.

SHETTY, J.; NAABY-HANSEN, S.; SHIBAHARA, H.; BRONSON, R.; FLICKINGER, C.J.; HERR, J.C. Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol. Reprod.*, 61:61-69, 1999.

SHIVERS, C.A.; DUDKIEWICZ, A.B.; FRANKLIN, L.E.; FUSSEL, E.N. Inhibition of sperm-egg interaction by specific antibody. *Science*, 178:1211-1213, 1972.

SHULMAN, S. Sperm antigens and autoantibodies: effects on fertility. *Am J. Reprod. Immunol. Microbiol.*, 10:86-89, 1986.

SKINNER, S.M.; MILLS, T., KIRKICH, H.J.; DUNBAR, B.S. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology*, 115:2418-2432, 1984.

TALWAR, G.P. Vaccines for control of fertility and hormone-dependent cancers. *Immunol. Cell Biol.*, 75:184-189, 1997.

TALWAR, G.P.; SINGH, O.; PAL, R. A birth control vaccine is on the horizon for family planning. *Annu. Med.*, 25:207-212, 1993.

TIZARD, R. I. *Imunologia Veterinária uma introdução*. 5^a ed., Rocca, São Paulo, 545p., 1998.

TSUNODA, Y.; CHANG, M.C. Effect of antisera to eggs and zona pellucida on fertilization and development of mouse eggs in vivo and in culture. *J. Reprod. Fertil.* 1978; 54:233–237.

TSUNODA, Y.; CHANG, M.C. Further studies of antisera on the fertilization of mouse, rat and hamster eggs in vivo and in vitro. *Int. J. Fert.*, 22:129-139, 1978.

U.S. EPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment*. Federal Register, 1996.

VAN VOORHIS, B.J.; STOVALL, D.W. Autoantibodies and infertility: a review of the literature. *J. Reprod. Immunol.*, 33:239–256, 1997.

VERDOLIN, B.A.; FICKER, S.M.; FARIA, A.M.C.; VAZ, N.M.; CARVALHO, C.R. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 34:211-219, 2001.

VLADUTIU, A.O.; ROSE, N.R. Autoimmune murine thyroiditis relation to histocompatibility (H-2) type. *Science*, 174:1137-1139, 1971.

WANDELER, A.I.; BUDDE, A.; CAPT, S.; KAPPELER, A.; MATTER, H. Dog ecology and dog rabies control. *Rev. Infec. Dis.*, 10:684-688, 1988.

WASSARMAN, P.M.; LIU, C.; LITSCHER, E.S. Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *J. Cell. Sci.*, 109:2001-2004, 1996.

WOOD, D.M.; LIU, C.; DUNBAR, B.S. Effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbits. *Biol. Reprod.*, 25:439-450, 1981.

WSPA - WORLD SOCIETY FOR THE PROTECTION OF THE ANIMALS. *Stray dog control*. London, 53p, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Expert Committee on Rabies – Eighth Report. *WHO Technical Report Series 824*, GENEBRA, 84p, 1992.

ANEXO

ARTIGO: Potencial de um imunógeno baseado no hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) para uso como vacina contraceptiva

[Potential of an immunogen based on gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) for use as contraceptive vaccine]

Autores: Cláudio Afonso Pinho Lopes; Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro; Renato de Azevedo Moreira.

PUBLICADO: Revista Universidade Rural – Série Ciências da Vida. ISSN 0104-7264. V.23, n.1, p.99 - 100, 2003.

POTENCIAL DE UM IMUNÓGENO BASEADO NO HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH) PARA USO COMO VACINA CONTRACEPTIVA

[Potential of an immunogen based on gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) for use as contraceptive vaccine]

CLÁUDIO AFONSO PINHO LOPES¹; DIANA CÉLIA SOUSA NUNES-PINHEIRO²;
RENATO DE AZEVEDO MOREIRA³

ABSTRACT

An immunogen composed of GnRH coupled to bovine serum albumin at an initial 1:1 ratio was tested for its capability for induction of anti-GnRH antibodies production. Mice were immunized and boosted 21 days later with 100 µg of the conjugate. ELISA was used to detect anti-GnRH antibodies in the sera of the immunized mice. All animals were positive compared to controls ($p \leq 0,05$).

KEY WORDS: Contraception, Vaccine, GnRH.

INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães e de gatos em centros urbanos é um grave problema de saúde pública e uma questão de bem-estar animal em todo o mundo¹. As populações de animais sem responsáveis, que sobrevivem nos logradouros públicos, são numericamente mantidas por proles abandonadas de animais com responsáveis². Assim, evidencia-se o caráter paliativo das atividades de extermínio de animais de rua, amplamente difundidas. Um sistema de controle populacional efetivo, racional e humanitário deve, portanto, contemplar a contenção da natalidade³. Os métodos contraceptivos atualmente disponíveis têm seu uso em massa inviabilizado para este propósito por razões culturais, econômicas e/ou de

¹ Mestrando do PPGCV/FAVET/UECE, 60.740-000, Fortaleza, Ceará; bolsista DS-CAPES.

² Faculdade de Veterinária, UECE, 60740-000, Fortaleza, Ceará.

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, 60451-970, Fortaleza, Ceará.

segurança⁴. A imunização ativa com o GnRH, resultando na produção de anticorpos capazes de neutralizar a forma endógena deste hormônio fundamental ao processo reprodutivo, é uma técnica contraceptiva em potencial bastante promissora⁵. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a eficácia de um imunógeno composto por GnRH conjugado à albumina sérica bovina (BSA) para a produção de anticorpos anti-GnRH em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração do imunógeno baseou-se no método descrito por Kerdelhué *et al.*⁶, adaptado para conjugação de GnRH à BSA. Brevemente, 2 mg de GnRH sintético e 2 mg de BSA foram dissolvidos em 1 ml de salina-tampão fosfato 0,01M pH 7,4 (PBS). A mistura foi homogeneizada e mantida sob leve agitação contínua em um agitador magnético, sendo então adicionados 10 µl de solução de glutaraldeído a 2%. Após 1 h a 25°C, adicionou-se à mistura 1 ml de solução de glicina 200 mM. Após 1 h a 25 °C, a mistura foi submetida à diálise contra PBS, sendo realizadas quatro trocas com intervalos de quatro horas, seguindo-se uma dosagem de proteínas do conjugado pelo Método de Bradford⁷. A solução obtida foi então fracionada em alíquotas de 100 µg, às quais adicionaram-se 1 mg de Al₂(OH)₃ e 0,2 ml de solução salina fisiológica q.s.p. (1 dose). Foram utilizados 10 camundongos Swiss machos com idades e pesos variando de 6 a 8 semanas e de 25 a 35 g respectivamente, que foram mantidos em condições controladas de temperatura (23-25°C) e luz (5:00-19:00), recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em dois grupos (n=5): grupo A, teste, no qual os animais foram imunizados por via subcutânea (SC), recebendo uma dose de reforço no 21^o dia; grupo B, controle, no qual os animais receberam 0,2 ml de solução salina fisiológica com 1 mg de Al₂(OH)₃ SC, placebo, paralelamente ao primeiro grupo. Imediatamente antes da 1^a aplicação e 10 dias após a última, procedeu-se uma coleta de sangue para a detecção de anticorpos anti-GnRH no soro, através de ELISA indireto. A uma microplaca de 96 poços adicionaram-se 50 µl/poço de solução de GnRH 20%, seguindo-se uma incubação a 37°C por 1 h e lavagem com solução de Tween 20 a 0,1% em PBS. Foram então adicionados 200 µl/poço de solução de leite em pó a 3% (p/v) em PBS, seguindo-se incubação e lavagem. Adicionaram-se 50 µl/poço das

amostras de soros-teste, procedendo-se incubação e lavagem. Foram adicionados 200 µl/poço de conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase, seguindo-se uma incubação por 45 min a 37°C e uma lavagem somente com PBS. Adicionaram-se 200 µl de solução de orto-fenilenediamina (OPD). A reação foi interrompida 5 min depois pela adição de 50 µl/poço de H₂SO₄ 10%. A placa foi então submetida a um leitor de ELISA, utilizando um filtro de 492 nm. Foram considerados positivos para a presença de anticorpos anti-GnRH os soros dos poços que apresentaram densidade óptica superior à média daquelas verificadas nos poços dos controles-negativos, nos quais se adicionaram todos os reagentes, exceto os soros-teste. Os dados foram analisados utilizando-se o teste t de Student ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Todos os soros dos animais do grupo A, teste, apresentaram-se positivos para a presença de anticorpos anti-GnRH, sendo verificada uma densidade óptica média de 0,234, superior àquela observada nos controles-negativos do teste, que foi de 0,023 ($p < 0,05$) (Figura 1). Os soros dos animais do grupo B, controle, por sua vez, apresentaram-se negativos, com densidade óptica média de 0,024, não diferindo daquela verificada nos controles-negativos do ensaio.

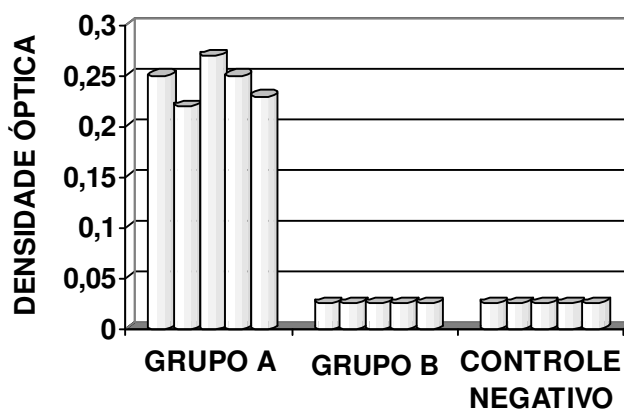


Figura 1. Densidades ópticas detectadas no ELISA indireto dos soros de animais imunizados com GnRH-BSA (grupo A), placebo (grupo B) e dos controles-negativos do ensaio.

DISCUSSÃO

Para a obtenção de uma resposta imune humoral efetiva à exposição de um antígeno, é fundamental que este possua, além de epítomos para células B, determinantes antigênicos para linfócitos Th2, que possibilitam uma resposta B-dependente de T. Moléculas detentoras de epítomos para células B, mas desprovidas de epítomos para Th2, denominadas haptenos, requerem conjugação a outro tipo de molécula que contenha epítomos para Th2, de modo que possam ser imunogênicas e induzir a síntese de anticorpos específicos⁸. Arimura *et al.*, ao imunizarem coelhos com seis doses mensais de GnRH adsorvido em polivinilpirrolidona (PVP) e em adjuvante completo de Freund, obtiveram títulos de anticorpos anti-GnRH muito baixos⁹. Neste estudo, com apenas um reforço, obteve-se uma resposta humoral significativa, sugerindo-se, assim, que esta formulação de imunógeno pode ser utilizada para a indução de anticorpos anti-GnRH.

LITERATURA CITADA

1. OLSON, P. N.; JOHNSTON, S.D. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **202**: 904-909, 1993.
2. WANDELER, A. I. *Rev. Inf. Dis.* **10**: s684-s688, 1988.
3. DELVES, P. J.; LUND, T.; ROITT, I. M. *Trends Immunol.* **23**: 213-219, 2002.
4. KERDELHUÉ, B.; CATIN, S.; KORDON, C.; JUTISZ, M. *Endocrinol.* **98**: 1539-1549, 1976.
5. BRADFORD, M. M. *Anal. Biochem.* **722**: 248-254, 1976.
6. TIZARD, I. *Immunology: an introduction*, Saunders Col. Pub., Orlando, 546p, 1995.
7. ARIMURA, A. ; SATO, H.; KUMASAKA, T.; WOROBEK, R.B.; DEBELJUK, L.; DUNN, J.; SCHALLY, A.V. *Endocrinol.* **93**: 1092-1103, 1973.