



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD PROVOCADA POR QUITOSANO COMO ADYUVANTE EN UN MODELO DE VACUNA PEPTÍDICA ANTI-GNRH

MARLIES ANTONIETA CORTÉS HINOJOSA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : LEONARDO SAENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO: ULISES VERGARA CASTILLO

SANTIAGO, CHILE
2009

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a mi profesor guía Leonardo Sáenz, que con su entrega, estímulo, disposición y paciencia hizo posible la concreción de este lindo estudio.

A mi amada madre, el gran pilar de mi vida, a quien le debo todo cuanto soy y todo lo que espero llegar a ser. A mi padre que con mucha paciencia ha sido un gran apoyo durante toda la carrera. A mi hermanito que es mi gran ejemplo a seguir, quien toda la vida me ha estado enseñando como vivir.

A mis amigos incondicionales del laboratorio Nori, Cota y Gonzalo, que hicieron del período de tesis uno de los más felices de mi vida, gracias por su cariño, apoyo y disposición, los quiero mucho.

A Christian por todo lo vivido y aprendido juntos, años maravillosos que siempre guardaré en el corazón. También gracias a toda su familia que siempre me acogieron y me hicieron sentir parte de una familia y capaz de lograr todo lo que me propusiera.

A mi Giancarlo querido que llegó hace poco a mi vida, pero es como si nos hubiésemos acompañado de siempre, gracias por ser tú y todo lo que me entregas a diario.

A mis grandes amigas Vale que sabe lo fundamental que es en mi vida, más grande que una hermana, gracias por todo amiga, y a Maquita mi compañera de toda la carrera, hemos vivido muchas experiencias juntas y nos hemos apoyado siempre, te quiero tanto amiga.

A los amigos de siempre Pame, Michelle y Canales gracias por haber sido grandes amigos siempre.

A todo el Laboratorio Biovetec que posee un gran potencial en sus estudios y un gran capital humano que hace que sea un agrado trabajar ahí.

Indice

Agradecimientos	1
Indice	2
Resumen	3
Summary	4
Introducción	5
Revisión Bibliográfica	7
Sistema Inmune.....	7
Vacunas.....	9
Modelo de vacuna peptídica anti-GnRH.....	11
Adyuvantes.....	12
El Quitosano.....	16
El Quitosano como adyuvante.....	17
Hipótesis, Objetivo general y específico	19
Materiales y Métodos	20
Resultados	28
Discusión	40
Conclusiones	45
Bibliografía	46

Resumen

El quitosano es un polímero natural muy estudiado actualmente, este material deriva de la quitina, que es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa y el componente principal del exoesqueleto de crustáceos e insectos, y paredes celulares de algunas bacterias y hongos. El quitosano es también un polisacárido cuya principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino. Este polímero parcialmente desacetilado, está constituido por copolímeros de β -(1-4)-D-glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas).

El quitosano es biodegradable, carece de toxicidad, posee actividad inmunogénica y alta viscosidad, lo que lo hace un excelente candidato como un adyuvante de depósito.

El objetivo de la presente memoria de título fue evaluar la capacidad adyuvante del quitosano por medio de la vacunación de ratas con una vacuna peptídica anti GnRH inoculada parenteralmente. Si bien esto ya se ha realizado en otros estudios, no se habían evaluado anteriormente otras soluciones de quitosano como el quitosano de bajo peso molecular, o el quitosano fosforilado.

Para determinar la inmunogenicidad del quitosano como adyuvante, se inoculó un grupo de ratas macho con la proteína GnRX G/Q (capaz de neutralizar el GnRH, desarrollada en el Laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile) junto con las soluciones de quitosano a evaluar, otro grupo de ratas con Adyuvante completo de Freund (ACF) como adyuvante y otras con la proteína suspendida en PBS como grupo control. Estas ratas fueron inoculadas 2 veces, el día 0 y 30 días después y se les extrajo sangre cada 15 días por 75 días, para medir los niveles de testosterona sérica y estimar la cantidad de inmunoglobulinas por medio de ELISA.

Los resultados revelaron que las tres soluciones de quitosano en estudio fueron superiores en la generación de IgG1 al ACF, y al grupo control. Y quedó en evidencia que la proteína GnRX G/Q no es inmunogénica por si sola. También fue posible demostrar que la vacuna con quitosano como adyuvante disminuye los niveles de testosterona sérica llegando a ser más efectiva que la vacuna con ACF como adyuvante. De esta manera fue posible dar aprobada la hipótesis planteada de que el quitosano mejora la respuesta inmune en un modelo de vacuna peptídica.

Summary

Chitosan is a well studied natural polymer, this material comes from chitin. Chitin is the most abundant biopolymer in nature after cellulose and it is the principal component on the exoskeletons of crustaceans, insects and cellular walls of some bacteria and fungus. Chitosan is also a polysaccharide; its main source is the hydrolysis of chitin in alkaline medium. This polymer is composed of β -(1-4)-linked D-glucosamine (deacetylated unit) and N-acetyl-D-glucosamine (acetylated unit). Chitosan is biodegradable and, lacks toxicity. It has immunologic activity and high viscosity that makes it an excellent candidate as an adjuvant on the form of deposit.

The objective of this study was to evaluate the capacity of Chitosan as an adjuvant through the vaccination of rats with Anti-GnRH peptide vaccine. Even though there have been other studies in the past, they have not been previous studies that evaluated other solutions with Chitosan, such low molecular weight Chitosan or the phosphorylated chitosan.

To determine the immunodeficiency obtained by the Chitosan as an adjuvant we inoculated a group of rats with the protein GnRX G/Q (capable of neutralizing the GnRH, developed in the Biovetec Laboratory of the Department of Veterinary and Bovine Sciences at the University of Chile). Another groups was vaccinated with Freund's complete adjuvant of (FCA) and proteins in PBS as the control group. These rats were inoculated twice at day 0 and day 30. Blood samples were drawn every 15 days to measure serum testosterone levels to determining the quantity of immunoglobulin. This was accomplished through the use of ELISA.

The results revealed that this three solutions of chitosan were superior in the generation IgG1 of that CFA and the control group. This shows that the "GnRX G/Q" protein was not immunogenic it self. It was also demonstrated that the vaccine with chitosan as an adjuvant diminished serum testosterone levels thus showing that it was more efficient than the vaccine with ACF as an adjuvant. As such, the given hypothesis was correct since chitosan improved the immune response in a model of peptide vaccination.

Introducción

Los avances experimentados en la última década en la síntesis de péptidos, la secuenciación de nucleótidos y la ingeniería genética han posibilitado el desarrollo de vacunas bien definidas, compuestas de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes, las denominadas "vacunas de nueva generación". Estas vacunas son más seguras comparadas a las vacunas tradicionales, sin embargo, generalmente son pobres inmunogénicamente. Es por esto que surge la necesidad de encontrar sustancias con actividad inmunopotenciadora, eficaces en la estimulación de la respuesta inmune y desprovistas de propiedades biológicas adversas llamadas adyuvantes.

La definición más amplia del término adyuvante inmunológico se deriva del vocablo latino *adyuvare*, que significa ayudar. Estas sustancias por definición son preparados químicos o biológicos, que incorporados junto al antígeno en un organismo dado hacen más efectiva la respuesta inmune, lo que significa un ahorro de tiempo y antígeno, y una respuesta más rápida, fuerte y duradera. Se ha comprobado que los adyuvantes inmunológicos desempeñan un papel muy importante en los procesos de inducción y activación de la respuesta inmune, al producir el reclutamiento y activación de células accesorias y la inducción de coestimuladores de la respuesta inmune.

La naturaleza, modo de acción y capacidad reactogénica de los adyuvantes es ampliamente variado. En general, el modo de acción consiste en la liberación lenta del antígeno en el sitio de aplicación, el reclutamiento y activación de macrófagos y células dendríticas, la presentación del antígeno al sistema inmune y la producción de diferentes citoquinas, modulando de esta manera la respuesta inmunológica.

La heterogeneidad de los compuestos químicos y biológicos que forman parte de los adyuvantes inmunológicos, pueden explicar los mecanismos de acción y efectos diferenciados que poseen estas sustancias. Se incluyen los que causan depósito en el sitio de inyección, van liberando el antígeno en el tiempo, producen reclutamiento de células inmunocompetentes en el sitio de inoculación y pueden producir granulomas macrofágicos, como por ejemplo los compuestos minerales de aluminio. También están los adyuvantes basados en aceites, como el adyuvante completo de Freund (ACF) e incompleto (AIF) y polímeros sintéticos biodegradables. Otros son los transportadores de antígeno hasta las

células inmunocompetentes (liposomas, proteoliposomas, surfactantes, polímeros no iónicos) y los de acción inmunoestimulante como: ACF, lipidopolisacáridos (LPS), lípido A, citoquinas, proteosomas.

Algunos polímeros han sido propuestos como adyuvantes, dentro de éstos, está el quitosano, un material derivado de la quitina, el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, que forma parte del exoesqueleto de crustáceos e insectos y de la pared celular de algunos microorganismos como levaduras y hongos. Por desacetilación alcalina de quitina se obtienen polímeros de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina de distintos pesos moleculares y diferente grado de desacetilación lo que le confiere propiedades particulares como su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo costo, propiedades fisicoquímicas favorables y de fácil modificación química, que lo hacen un excelente candidato para su uso en diversas aplicaciones en el campo médico y farmacéutico.

Actualmente, se ha demostrado que las proteínas recombinantes tienen un gran potencial como antígenos para vacunas de uso humano y veterinario, pero el gran problema es que generalmente son débiles inmunogénicamente, y la inmunización con estas proteínas puede no desarrollar una respuesta inmune significativa, que reconozca a la proteína nativa. Para esto, es necesario el desarrollo de nuevos adyuvantes lo suficientemente seguros y capaces de maximizar la eficacia de estas nuevas vacunas, o bien las ya disponibles. Dentro de estos, el quitosano pareciese cumplir con todas las exigencias necesarias para su uso como adyuvante.

En la presente memoria de título se estudió la actividad inmunoestimuladora como adyuvante del quitosano, por medio de un modelo de vacunación subcutánea de ratas, con una vacuna recombinante contra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), evaluando la efectividad en la producción de inmunoglobulinas específicas contra el antígeno inoculado y parámetros reproductivos como la disminución en la esteroidogénesis y cambios en la histología testicular, comparándolo con un adyuvante de actividad conocida como es el adyuvante completo de Freund.

Revisión Bibliográfica

Sistema inmune

Actualmente se sabe que la inmunidad innata y el resultante proceso inflamatorio tienen un rol clave en el inicio de la respuesta inmune adaptativa y determina la naturaleza de ésta. Las células del sistema inmune, como células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno (CPA), controlan la respuesta inmune adaptativa por medio de dos puntos correlacionados: reconocen e incorporan el antígeno, lo procesan y presentan como fragmentos peptídicos a los linfocitos T y al mismo tiempo se activan adquiriendo capacidad para proveer una señal secundaria a los linfocitos T, necesaria para su activación. Las señales secundarias constituyen señales coestimuladoras entregadas por interacciones específicas ligando-receptor, y la secreción de citoquinas regulatorias como IL-1, IL-8, IL-12 (Kenney y Edelman; 2004).

Los mecanismos de la inmunidad innata se desencadenan por el reconocimiento de los patógenos a través de receptores específicos tales como los receptores TLR (del inglés "Toll-like receptors"). Los TLRs son una familia de receptores capaces de reconocer estructuras conservadas en diferentes microorganismos, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), entre los que se encuentran componentes de la pared celular bacteriana, proteínas, ácidos nucleicos y lipopolisacáridos, entre otros (Takeda *et al.*, 2003).

Las células dendríticas consideradas las CPA profesionales por su capacidad de activar a los linfocitos T constituyen el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (Kaisho y Akira, 2003). Las células dendríticas expresan TLRs y residen en diferentes órganos y en los tejidos periféricos donde censan el ambiente y capturan los antígenos debido a su gran capacidad fagocítica. Luego, éstas migran a los órganos linfoides secundarios donde presentan los antígenos a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para la activación de los linfocitos T (Kalinski y cols., 1999).

La visión clásica de procesamiento y presentación antigénica plantea que existen dos rutas diferentes, definidas por tres características fundamentales: el origen endógeno o exógeno

del antígeno a ser presentado; el tipo de molécula MHC que presenta al péptido (MHC-I o MHC-II) y el tipo de células T estimuladas que pueden ser células T CD8+ citotóxicas o T CD4+ con función auxiliadora (Wolf y Ploegh, 1995).

Típicamente, las moléculas MHC-I son cargadas con péptidos derivados de antígenos endógenos sintetizados en el interior de la CPA o cualquier célula del organismo. Los complejos MHC-I-péptido resultantes son transportados a la superficie de la CPA para ser reconocidos por células T CD8+ (Heemels y Ploegh, 1995). En contraste, antígenos exógenos como las bacterias son internalizados por la CPA y procesados en el interior de los compartimentos fagolisosómicos. Los péptidos resultantes se unen a las moléculas MHC-II en estos compartimentos del sistema endosomal y son transportados a la superficie celular para ser reconocidos por las células T CD4+ (Wolf y Ploegh, 1995).

Basado en la producción de citoquinas, los linfocitos T CD4+ han sido clasificados como células T “helper” 1 (Th1) o T ”helper” 2 (Th2). Los linfocitos Th1 producen IFN γ e IL2 y median una respuesta inmune celular. Los linfocitos Th2 producen IL4, IL5 e IL10 y median una respuesta inmune humoral (Romagnani, 1991). La respuesta Th1 se caracteriza por inducir la producción de las subclases de IgG fijadoras de complemento, principalmente IgG1 e IgG3 en humanos e IgG2a en ratones. Estos anticuerpos son los mediadores fundamentales de la actividad bactericida y opsonofagocítica del suero.

Las vacunas inactivadas requieren agonistas inmunes (inmunopotenciadores o adyuvantes) para determinar el tipo de inmunidad inducida (Th1 o Th2) y promover la respuesta inmunológica. La caracterización de los receptores tipo *toll* (TLR) en la inmunidad natural y los componentes coestimulantes de la inmunidad adquirida permitió identificar nuevos agonistas, establecer las relaciones entre la estructura y la función y diseñar moléculas con mejores propiedades inmunomoduladoras.

Vacunas

El desarrollo de vacunas ha supuesto una de las mayores contribuciones de la inmunología a la medicina. La primera vacuna contra una enfermedad infecciosa, la viruela humana, fue desarrollada en Tener en 1796. Sin embargo, fue Pasteur quien a finales del siglo XIX estableció la relación entre gérmenes y enfermedades, y realizó grandes avances en inmunoterapia tras realizar numerosos experimentos en vacunas animales. El mecanismo inmunitario de la vacunación fue finalmente aclarado en 1957 por Frank Burneo mediante la teoría de la selección clonal y con el posterior descubrimiento del papel de los linfocitos en 1965 (Lopez *et al*; 2004).

Una vacuna, según la definición tradicional, es una sustancia formada por un microorganismo completo, atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente a dicho microorganismo virulento. La inmunización activa o vacunación es el proceso que permite generar resistencia a una enfermedad infecciosa. El principio general de todas las vacunas consiste en inducir una respuesta inmune adquirida específica frente al agente infeccioso. (López *et al.*, 2005).

Las vacunas tradicionales generalmente son patógenos vivos atenuados, organismos completos inactivados, o toxinas bacterianas inactivadas (toxoides). Estas han sido exitosas principalmente debido a la inducción de buenas respuestas de anticuerpos, que neutralizan virus o toxinas, inhiben la unión de los microorganismos a las células, o promueven su internalización por fagocitos. Sin embargo el desarrollar vacunas contra patógenos más complejos, que generalmente establecen infecciones crónicas, por ejemplo: virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis celular (HCV), tuberculosis, malaria, requieren la inducción de una respuesta inmune celular más poderosa para su control. Las vacunas vivas pueden inducir una potente respuesta celular, sin embargo, existe el riesgo de reversión a la forma virulenta del virus contenido en la vacuna pudiendo causar enfermedad y reacciones graves o fatales como resultado de su replicación

incontrolada. Además, se requiere de pasos repetitivos en cultivo de tejidos para transformar el virus silvestre en un virus atenuado y existen patógenos que son difíciles o imposibles de crecer en medios de cultivo como el HCV.

Las vacunas inactivadas son más seguras, pero debido al proceso de inactivación las vacunas con virus o bacterias muertas generan una respuesta inmune limitada (no generan inmunidad en mucosas o inmunidad mediada por células), pueden ocurrir reacciones adversas post-vacunales las que incluyen desde inflamación en el punto de inóculo, hasta severas reacciones de anafilaxia y muerte. Otra desventaja asociada a estas vacunas es la necesidad de requerir varias aplicaciones para estimular una adecuada producción de anticuerpos (Odeón., 2002).

Como resultado de las limitaciones en vacunas tradicionales, han emergido en décadas recientes nuevos avances en el desarrollo de vacunas, incluyendo vacunas de subunidades protéicas, péptidos sintéticos, conjugados protéicos polisacáridos, y DNA. Mientras estos nuevos avances ofrecen ventajas, el mayor problema es que generalmente son pobres inmunogénicamente. Las vacunas recombinantes son potenciales componentes, más seguros y mejor definidos, para vacunas de uso humano y veterinario. Sin embargo, las vacunas peptídicas suelen generar débil inmunidad y por lo tanto requieren de adyuvantes poderosos para lograr elaborar vacunas efectivas (Stefarin y Martínez, 2000).

El desarrollo de nuevas técnicas en el campo de la genética molecular, la bioquímica, la microbiología y la inmunología abre nuevos horizontes y puede ayudar a resolver algunos problemas pendientes. Al mismo tiempo, la tecnología empleada para la prevención de enfermedades infecciosas, se está aplicando para producir cambios fisiológicos en el campo de la fertilidad, las alergias o el cáncer, y para tratar enfermedades en las que existe una base inmunológica implicada.

Modelo de vacuna peptídica Anti- GnRH

Las capacidades reproductivas de ambos sexos en la mayoría de las especies animales, sufre fluctuaciones cíclicas temporales gracias a los efectos que generan las hormonas sexuales sobre gónadas y sistema reproductor en general. La hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH, juega un rol central en este proceso. El GnRH es producido en neuronas del hipotálamo, luego es transportado vía axonal, por pequeños vasos sanguíneos (vasos portales) en la eminencia media, donde es liberada a la sangre. Los vasos sanguíneos son drenados en la pituitaria anterior, ahí la GnRH se une a receptores en las células gonadotrofas para estimular la liberación de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a la circulación. La secreción pulsátil de GnRH induce la liberación cíclica de LH y en menor medida de FSH (Herbert y Trigg, 2005).

La vacunación contra la hormona GnRH es capaz de bloquear el eje hipotálamo-pituitaria-gonadal, por lo tanto, puede ser usada como una alternativa para la castración y control de la fertilidad. Pero GnRH es un péptido de 10 aminoácidos y lograr una respuesta inmune contra un péptido endógeno tan pequeño, que no es inmunogénico por si mismo, no es sencillo. La inmunidad del antígeno debe ser amplificada para lograr el desarrollo de una vacuna efectiva.

En el Laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile se ha diseñado una vacuna peptídica con la proteína GnRX G/Q capaz de neutralizar la GnRH. En general, con un modelo de vacuna peptídico anti-GnRH se espera que se generen anticuerpos contra los péptidos sintéticos de GnRH, los que neutralizarían la hormona endógena.

Sin embargo, es difícil que un péptido pequeño por si sólo logre desarrollar la respuesta inmune deseada, además la vacunación exitosa contra una molécula requiere un nivel suficiente de anticuerpos neutralizantes durante todo el período de tratamiento. Para esto es necesario que el péptido vaya acompañado de un adyuvante que potencie la respuesta inmune para obtener el efecto deseado (Herbert y Trigg, 2005).

Adyuvantes

La meta central de la vacunación es el desarrollo de una respuesta inmune eficiente, protectora y duradera del sistema inmune adaptativo (O'Hagan *et al.*, 2004). Sin embargo, algunos antígenos, péptidos y DNA por si mismos son insuficientes inmunogénicamente para iniciar una respuesta inmune adaptativa, por lo tanto es necesario que sean entregados con un adyuvante (Singh *et al.*, 1999). En 1925, Ramon demostró que era posible aumentar artificialmente los niveles de anticuerpos específicos contra difteria por la adición de migas de pan, agar, tapioca, aceite de almidón, lecitina o saponina a las vacunas (Kenney y Edelman, 2004). Así los adyuvantes inmunológicos fueron originalmente descritos por Ramon como sustancias que producen una respuesta inmune más robusta que el antígeno solo.

Los adyuvantes funcionan por estimulación del sistema inmune innato, más específicamente por activación de las células presentadoras de antígenos, que permiten así desarrollar una respuesta inmune específica al antígeno más duradera (Reddy *et al.*, 2006). El mecanismo de acción de estas sustancias ha sido objeto de numerosos estudios y, al parecer, existen diversos factores que explican su modo de acción. El antígeno libre normalmente difunde con mucha rapidez desde los tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, y una de las importantes funciones de los adyuvantes es crear un reservorio o depósito de antígenos de larga duración. Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan o estimulan los macrófagos. A su vez, éstos cuando son activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno presentado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos. Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos; pero, en general, éstas funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfoide (Morris *et al.*, 2000).

En 1926, Glenny demostró la actividad adyuvante de los compuestos de aluminio mediante el uso de una vacuna de toxoide diftérico precipitado en aluminio. En la actualidad, los

adyuvantes de aluminio (fosfato e hidróxido de aluminio) continúan siendo los adyuvantes inmunológicos más ampliamente usados.

El aluminio posiblemente actúa a través de la activación de células Th2, formación de depósito y liberación lenta del antígeno seguido de la inmunización, también a través de la formación de granuloma por atracción de las células inmunocompetentes y activación del complemento. Sin embargo el Aluminio también tiene su lado negativo, se han documentado efectos adversos en la administración subcutánea como nódulos pruríticos subcutáneos, hipersensibilidad e inflamación granulomatosa severa. Actualmente también se ha cuestionado por la cantidad de aluminio en macrófagos y la posibilidad de que la acumulación de aluminio sea tóxica ya que ha sido asociada a esclerosis aniotrópica lateral y Alzheimer. Además, algunos estudios muestran que es un adyuvante débil para la inducción de anticuerpos con vacunas de peptídicas (Gupta, 1998), no es efectivo para la inducción de inmunidad de mucosas y puede inducir la producción de IgE, que está asociada a reacciones alérgicas en algunas personas (Relyveld *et al.*, 1998).

En 1936, Freund desarrolló una emulsión de agua en aceite mineral que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muertas, lo que actualmente se conoce como adyuvante completo de Freund (ACF). El ACF es uno de los adyuvantes más poderosos, pero es muy reactogénico para ser usado con fines clínicos. Aun así, el adyuvante incompleto de Freund (AIF), la emulsión sin la adición de la micobacteria muerta, ha sido empleado en formulaciones vacunales en humanos (Aguilar y Leal., 2000). El adyuvante completo de Freund (ACF) ha sido utilizado durante más de 50 años en la producción de antisueros en animales, en investigación y es empleado cuando se dispone de cantidades limitadas de antígenos o cuando presentan una baja inmunogenicidad. La gravedad de su toxicidad fue reconocida inmediatamente, pero los esfuerzos por encontrar opciones igualmente efectivas y menos tóxicas no han resultado del todo exitosos (Morris *et al.*, 1999).

Un punto clave en el desarrollo de adyuvantes es la toxicidad, lo concerniente a seguridad tiene restringido el desarrollo de adyuvantes, desde que el Aluminio fue introducido hace más de 70 años (Kersten y Crommelin; 2003). Es por esto, que a pesar de que muchos

adyuvantes experimentales han demostrado gran potencial, la mayoría han sido tóxicos para su uso rutinario en clínica.

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada o que se quiere evitar, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por el adyuvante. Con fines investigativos, las exigencias más importantes se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y, por supuesto, la disponibilidad comercial.

Hay que tener en cuenta que los beneficios de la incorporación de adyuvantes en formulaciones vacunales para potenciar su inmunogenicidad, deben ser sopesados con el riesgo de reacciones adversas que estos compuestos pueden inducir. El marcado efecto inmunopotenciador de la mayoría de los adyuvantes está relacionado directamente con su toxicidad. La introducción de adyuvantes potentes en los ensayos clínicos, comenzó en relación con las vacunas preventivas y terapéuticas en las que los adyuvantes de aluminio son inefectivos. Uno de los objetivos del desarrollo actual en materia de adyuvantes, consiste en disminuir al máximo su toxicidad sin afectar el efecto inmunopotenciador. En este sentido las regulaciones establecidas para el uso de los adyuvantes novedosos son muy rigurosas (Aguilar y Leal., 2000).

La disponibilidad clínica de adyuvantes adecuados, seguros y efectivos es decisiva en el desarrollo de las nuevas vacunas. De forma ideal, los adyuvantes deben ser materiales no tóxicos, poco inmunogénicos y económicos. Además, deben ser estables, biodegradables y, preferiblemente, deben promover inmunidad tanto humoral como mediada por células, en dependencia del requerimiento de protección del patógeno (Aguilar y Leal., 2000).

Los adyuvantes inmunológicos pueden ser clasificados atendiendo a su fuente de origen, mecanismos de acción y propiedades físicoquímicas. Según Edelman, los adyuvantes pueden ser separados en tres clases amplias: (i) inmunoestimulantes activos, que son agentes que aumentan la respuesta inmune específica contra el antígeno; (ii) portadores, que son proteínas inmunogénicas que proporcionan ayuda de células T; y (iii) adyuvantes tipo vehículo, como las emulsiones oleosas y los liposomas, que sirven como matriz para el

antígeno y para la inmunoestimulación. Esta clasificación tiende a confundir por la propia forma en que se dividen.

También se han dividido en adyuvantes mucosales y sistémicos, teniendo en cuenta que las características fisiológicas en cuanto a la toma y procesamiento del antígeno para ambas vías de inoculación generan procedimientos diferentes de adyuvación.

Actualmente existen diversos tipos de adyuvantes en las vacunas de uso humano y los más conocidos y utilizados son las sales de aluminio. No obstante, mediante la aplicación de nuevas tecnologías, se han mejorado las bases técnicas para el desarrollo de nuevos y más eficaces adyuvantes, de esta manera se logra un mejor perfil de seguridad de las vacunas, y se reduce la cantidad de antígenos necesarios para desencadenar una respuesta inmune satisfactoria. Según las *Guidelines on adjuvants in vaccines for human use*, publicados por la *European Agency for Evaluation of Medicinal Products* (EMA) en 2005, los adyuvantes se clasifican según su composición en:

- Sales minerales: hidróxido o fosfato de aluminio.
- Emulsiones lipídicas: MF59, QS21, ASO2.
- Partículas: ASO4, ISCOM.
- Derivados microbiológicos: MPL.
- Inmunomoduladores humanos endógenos: HGM-CSF, IL-12, C3d.
- Vehículos inertes: partículas de oro.

Los adyuvantes pueden seleccionarse según su mecanismo de acción, por activar en mayor medida la respuesta inmune humoral o bien la inmunidad mediada por células. Esto lo hacen a través de distintas vías, por ejemplo el ACF presenta una respuesta mayormente celular y MHC I, cuando es mezclado con antígenos protéicos, péptidos o virus inactivados. Muchos otros adyuvantes, como sales de aluminio y algunos polímeros desarrollan una respuesta principalmente humoral cuando son combinados con antígenos protéicos u organismos inactivados, quizás por activación de las APC por un mecanismo dependiente de IL-4. Los adyuvantes pueden modular la respuesta inmune por la estimulación preferente de LT CD4+ Th1 o Th2. La respuesta Th1 es acompañada por la secreción de citoquinas IL-2, IFN γ y TNF β , llevando a una respuesta celular, incluyendo activación de

macrófagos y linfocitos T citotóxicos y altos niveles de IgG2a en ratas. La respuesta Th2 es modulada por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que entrega una respuesta mayormente humoral, activando linfocitos B, incluyendo isotipos de IgG1, IgE e IgA en ratas (Kenney y Edelman; 2004).

Según Kenney y Edelmans el efecto de los adyuvantes es fuertemente dependiente de diversos factores como:

- 1.- La naturaleza y dosis del inmunógeno
- 2.- La naturaleza y dosis del adyuvante, carrier o vehículo de inmunización
- 3.- La estabilidad de la formulación
- 4.- Calendario de inmunización
- 5.- Ruta de administración
- 6.- Especie animal
- 7.- La genética y otras variaciones biológicas dentro de especies, incluyendo su estatus inmune.

El Quitosano

El quitosano es un polímero natural muy estudiado actualmente, por su actividad adyuvante demostrada, entre otras de sus cualidades. Este material deriva de la quitina, que es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, es un polisacárido componente principal del exoesqueleto de crustáceos e insectos, y paredes celulares de algunas bacterias y hongos. Como la celulosa es un polisacárido no ramificado basado en glucosa. Difiere de la celulosa en el carbono C2 por tener un residuo acetamido en lugar de un grupo hidroxilo (Senel y McClure, 2004)

El quitosano es también un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente con hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas. Este polímero parcialmente deacetilado de acetilglucosamina, está constituido por copolímeros de glucosamina y N-acetil-D-glucosamina.

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtuvo un producto soluble en ácidos orgánicos. Esta “*quitina modificada*”, como él la llamó, se tornaba de color violeta en soluciones diluidas de yoduro y ácido, mientras la quitina era verde. Mas tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler, quién la denominó “*quitosano*”.

La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido. Sin embargo, cuando la deacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades β (1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucosa y β (1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera “*quitosanos*” con distintas propiedades (Lárez, 2003). En los análisis elementales, el quitosano tiene un contenido de nitrógeno mayor al 7 % y un grado de desacetilación mayor al 60%. (Kumar *et al.*, 2004). El grado de desacetilación influencia las características del quitosano, tales como carga, solubilidad, cristalinidad y degradación, así la diferencia en las propiedades de estos quitosanos puede llegar a ser notable.

El quitosano puede ser fácilmente depolimerizado vía enzimática por una variedad de hidrolasas incluyendo lisozimas, pectinasas, celulasas, hemicelulasas, lipasas, y amilasas, entre otras, mostrando así una peculiar vulnerabilidad a otras enzimas además de las quitinasas. (Kumar *et al.*, 2004)

El Quitosano como adyuvante

El quitosano carece de toxicidad y alergenicidad, además es biocompatible, biodegradable y bioactivo, esto lo hace una sustancia muy atractiva para diversas aplicaciones en el campo médico y farmacéutico (Duman y Senel., 2004)

Pruebas clínicas que promueven los biomateriales basados en quitosano, no han reportado ninguna reacción inflamatoria o alérgica, seguido de su implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano. Su biodegradación lleva a la liberación de

aminoazúcares, que pueden ser incorporados en vías metabólicas de glicosaminoglicanos y glicoproteínas, o excretados

El quitosano posee ciertas características que lo favorecen para su uso como adyuvante, tales como: capacidad de modificar el tamaño de partícula, protección del antígeno de la degradación enzimática, posibilidad de regulación del nivel de liberación, distintas posibilidades de administración, y biodegradabilidad. (Senel y McClure, 2004).

Se ha reportado que quitosano en suspensión o en micropartículas, posee actividad inmunoestimuladora, aumenta la acumulación y activación de macrófagos y polimorfonucleares, induce la liberación de citoquinas, aumenta la respuesta de anticuerpos y mejora la hipersensibilidad tipo retardada (Seferian y Martínez, 2000)

Actualmente ha sido ampliamente investigada su eficacia como adyuvante para vacunas intranasales y orales por sus propiedades de mucoadhesividad, pero estudios sobre su habilidad de adyuvante para vacunación subcutánea son muy escasos. Sin embargo el quitosano posee entre sus características una alta viscosidad, que lo hacen un excelente candidato como adyuvante de depósito para vacunas parenterales, ya que permitiría una liberación más prolongada del antígeno. Zaharoff (2006) reportó que al usar quitosano en solución como adyuvante, vía subcutánea mejora los títulos de anticuerpos específicos contra el antígeno y que produce ambas respuestas, humoral y celular. Al compararlo con adyuvantes de vacunas tradicionales presenta similar eficacia que el adyuvante incompleto de Freund y superior al hidróxido de aluminio. El estudio reveló que el quitosano posee ciertas características que permiten su función como adyuvante, entre ellas que la solución viscosa de quitosano crea un efecto de depósito, específicamente menor al 9% del antígeno proteico, cuando es inoculado con “buffer” fosfato salino, permanece en el sitio de inoculación después de 8 horas, mientras que más del 60% del antígeno proteico cuando es inoculado con quitosano permanece en el sitio de inyección por 7 días.

Hipótesis

Dado que la administración de quitosano ha demostrado inducir una respuesta inmune y que su grado variable de viscosidad y tamaño de partícula regula la liberación de macromoléculas, entonces la administración de quitosano como adyuvante en un modelo de vacuna peptídica anti GnRH, provocará una respuesta inmune efectiva.

Objetivo General

Determinar la inmunogenicidad provocada por soluciones de quitosano como adyuvante en un modelo de vacuna peptídica anti GnRH.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la formación de micropartículas de quitosano más la proteína GnRX G/Q, mediante microscopía electrónica de Barrido (SEM).
2. Evaluar la inmunogenicidad contra la proteína GnRX G/Q con distintas soluciones de quitosano en micropartículas y en solución como adyuvante, mediante la vacunación de ratas.
3. Comparar la inmunogenicidad con ratas vacunadas utilizando el adyuvante completo de Freund como estándar de oro.
4. Determinar la efectividad de la combinación vacuna-adyuvante analizando los parámetros reproductivos de los animales inmunizados, a través de la determinación de sus títulos de testosterona sérica y del análisis histológico de sus testículos.

Materiales y Métodos

Animales experimentales.

Durante el período en que se llevó a cabo este estudio, se utilizaron 16 ratas macho de la cepa Sprague Dawley, que fueron mantenidas según las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de experimentación “Guide for the use of Laboratory Animals” del *National Institute of Health*, en un bioterio de tipo convencional.

Quitosano a utilizar

Los quitosanos son del laboratorio Aldrich, poseen una viscosidad 8000 cps, y un peso molecular variable entre 75 a 350 kDa, según sea de alto o de bajo peso molecular.

Los diferentes quitosanos que se utilizan en este estudio son:

- 1.- Quitosano de alto peso molecular (HMW) con un 83% de desacetilación y un peso molecular de 350 kDa.
- 2.- Quitosano de bajo peso molecular (LMW) con un 75% de desacetilación y un peso molecular de 75 kDa.
- 3.- Quitosano fosforilado de alto peso molecular (p-HMW) con un 83% de desacetilación y un peso molecular de 350 kDa.

Purificación del quitosano

Los diferentes quitosanos fueron purificados para eliminar pigmentos, grasas e impurezas, según el siguiente protocolo:

1. Lavado con acetona.

50 gr. de quitosano de alto peso molecular y 50 gr. de quitosano de bajo peso molecular fueron lavados con 750 ml. de acetona por 2 horas en agitación, y luego 24 horas de secado a 70° C al vacío, para eliminar la acetona.

2. Preparación de soluciones de quitosano de bajo y alto peso molecular al 2% en ácido acético al 5%
40 gr. de los quitosanos lavados fueron disueltos en 1,6 litros de ácido acético al 5%, y se mantuvieron en agitación por 72 horas. Luego se aforaron los 2 litros de solución con ácido acético.
3. Precipitación del quitosano mediante adición gota a gota de la solución de quitosano en hidróxido de sodio al 4% (p/v).
4. Filtrado de la solución de quitosano, con diferentes filtros, al vacío.
5. Lavado con abundante etanol al 80% y etanol absoluto.
6. Secado del quitosano purificado a 37° C al vacío, por 24 horas.

2.- Obtención de las proteína recombinante His-GnRX G/Q

2.1-Inducción de la expresión de His-GnRX G/Q

E. coli BL21 pLys S transformadas con el vector de expresión PQE80L GnRX G/Q, diseñado en el Laboratorio Biovetec de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, fueron inducidas para expresar las proteína recombinante His-GnRX glut. Esto se realizó incubando bacterias transformadas en 500 ml de medio Luria Broth (Peptona, Yeast Extract, NaCl) con Amoxicilina, en agitación orbital durante 6-7 horas. Luego se agregó 0,1 mM de IPTG como inductor de expresión de la proteína recombinante y se incubó nuevamente en agitación orbital durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a 4500 xg durante 20 minutos, se resuspendieron durante 60 minutos en 20 ml en tampón de lisis denaturante (8 M urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris, pH 8,0) a 4°C y se sonicaron durante 3 minutos. Finalmente, el lisado fue centrifugado durante 20 minutos a 13000 xg, obteniéndose un sobrenadante purificado con la proteína de interés.

2.3- Purificación de la proteína recombinante His-GnRXglut

La purificación se realizó utilizando la técnica de cromatografía de afinidad en columnas de níquel que permiten la retención de proteínas con extremo de histidina. De esta forma, 4 ml de resina Ni-NTA fueron equilibradas con 10 volúmenes de tampón de unión, cargados con el sobrenadante obtenido en el punto anterior conteniendo la proteína recombinantes GnRX G/Q. Luego se realizó la elusión de la proteína GnRX G/Q retenida en la columna con tampón de elusión (8 M urea; 0,1 M Na₂PO₄; 0,1 M Tris pH 4,5).

2.4- Identificación de His-GnRXglut recombinante purificada por electroforesis

Alícuotas de proteína recombinante purificada fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles de acrilamida en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE, acrilamida:bisacrilamida 30:0,8% p/v, 1,0 M Tris-Cl pH 8,8, 20% SDS, 10% APS, TEMED). Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de metanol al 50% v/v, ácido acético al 10% v/v y azul de comassie al 1% p/v, a temperatura ambiente por 12 horas. Luego se destiñeron en ácido acético 5% v/v y metanol 25%.

3.- Determinación de la concentración protéica por el método Bradford

Este método se basa en la unión proporcional del reactivo Coomassie a las proteínas. Dentro de un rango lineal en el ensayo (5-25 µg/ml), mientras más proteína esté presente, más Coomassie se une. El ensayo es colorimétrico, mientras la concentración de proteína aumenta, el color de las muestras se vuelve más intenso.

Una solución de 2 mg/ml de BSA fue diluida 4 veces adicionándole 150 µl de agua a 50 µl de esta solución, para obtener 200 µl de una solución de 0,5 mg/ml de BSA.

Se elaboraron las muestras seriadas de BSA para realizar la curva de referencia:

	Vol. muestra, mL	Vol. agua, mL	Vol. Reactivo Bradford, mL
Blanco	0	800	200
BSA Estándar – 5 mcg/mL	10	790	200
BSA Estándar - 10 mcg/mL	20	780	200
BSA Estándar - 15 mcg/mL	30	770	200
BSA Estándar - 20 mcg/mL	40	760	200
BSA Estándar - 25 mcg/mL	50	750	200
Muestra de proteína de interés	50	750	200

4.- Protocolo de vacunación

6 grupos de 2 ratas cada uno fueron vacunados el día 0 con 200 μ l de vacuna anti GnRH-1 vía subcutánea, y recibieron un booster después de 30 días. Los distintos grupos fueron vacunados de la siguiente manera:

- 1.- Antígeno (GnRX G/Q suspendido en PBS)
- 2.- Quitosano HMW, suspendido en PBS
- 3.- Antígeno más adyuvante de Freund
- 4.- Antígeno más quitosano HMW
- 5.- Antígeno más quitosano LMW
- 6.- Antígeno más quitosano HMW fosforilado

5.- Preperación de los inóculos

Se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones de quitosano al 1% en ácido acético con la solución de proteína conteniendo 200 μ g de la proteína GnRX suspendida en solución fosfato tampón salino (PBS), la mezcla se somete a vórtex por 45 segundos, y finalmente esta solución es inoculada a las ratas.

Para los controles de la proteína, se mezcló volúmenes iguales de solución de proteína conteniendo 200 μ g de GnRX G/Q con PBS y se somete a vórtex por 45 segundos. Para el control de quitosano, se mezclaron quitosano HMW en la misma proporción con PBS.

Para el grupo de ratas vacunadas con adyuvante completo de Freund se mezcló volúmenes iguales de la solución de proteína conteniendo 200 µg de His-GnRX G/Q con la solución de adyuvante completo de Freund y se llevó a vórtex.

Cada grupo fue sometido al siguiente esquema experimental

1. **Tiempo 0 (día 0):** Las ratas fueron anestesiadas con isofluorano y se extrajeron 250 µl de sangre vía vena femoral para la obtención de sueros y medición de la cantidad basal de anticuerpos contra GnRX mediante ELISA. Este procedimiento se repitió cada 15 días.
Inoculación de 250-300 µl aproximadamente del inóculo que le corresponda al grupo, vía subcutánea.
2. **Tiempo 1 (día 15):** Extracción de sangre vía vena femoral y medición de anticuerpos contra GnRX por ELISA.
3. **Tiempo 2 (día 30):** Extracción de sangre vía vena femoral para medición de anticuerpos e inoculación de 250-300 µl del inóculo correspondiente al grupo, vía subcutánea.
4. **Tiempo 3 (día 45):** Extracción de sangre vía vena femoral para medición de anticuerpos.
5. **Tiempo 4 (día 60):** Sacrificio de una rata de cada grupo (oreja marcada), con CO₂ y posterior extracción de sangre vía punción cardíaca.
Extracción de sangre vía vena femoral de las ratas restantes.
6. **Tiempo 5 (día 75):** Extracción de sangre vía vena femoral para medición de anticuerpos.
Inoculación de 250-300 µl del inóculo correspondiente al grupo, vía subcutánea.
7. **Tiempo 6 (día 109):** Sacrificio de todas las ratas con CO₂ y posterior extracción de sangre vía punción cardíaca.

Para los análisis posteriores, la sangre fue recolectada en tubos de microcentrifugación de 2 ml y centrifugada, previa formación y retracción del coágulo, a 13000 rpm durante 10 min.

6.- Determinación de las variaciones en los títulos de anticuerpos IgG mediante ELISA

Respuesta de anticuerpo-antígeno específicos en suero fueron medidos cada 15 días después de la primera vacunación, mediante ensayos de ELISA indirecto.

1.- Placas de 96 pocillos de alta capacidad de unión fueron cubiertas con 50 µl por pocillo de solución de la proteína GnRX G/Q diluida en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 11 mMol/L, NaHCO_3 35 mMol/L (pH 9,6)) a una concentración 40 µg/ml y se deja por la noche a 4°C.

2.- Luego los pocillos fueron lavados 3-4 veces con “buffer” de lavado (PBS, 0,05% Triton) y bloqueados con 200 µl por pocillo de buffer de bloqueo (1% de BSA en PBS) por 24 horas a 4°C.

3.- La placa fue lavada 4 veces con buffer de lavado luego se le aplicó cada 100 µl, por duplicado de los sueros a evaluar, diluido a una concentración de 1/200 en diluyente BSA 0,1%, por un período de 1-2 horas a 37°C.

4.- Se vuelve a lavar la placa por 3-4 veces y se incorpora 100 µl del anticuerpo secundario anti-IgG de rata a una concentración de 1/5000 en diluyente, que contiene la enzima HRP (del inglés “horseradish peroxidase”), y se vuelve a incubar por 1 hora a 37°C.

5.- Luego se lava 4 veces más y se les agrega 100 µl del cromóforo TMB, que contiene el sustrato peróxido de hidrógeno que actúa con la enzima HRP, que por oxidación provoca que los pocillos que poseen el anticuerpo buscado cambien de color según su concentración, y se deja 30 minutos más a 37°C.

6.- Finalmente se detiene la reacción con tampón de detención (50% agua destilada, 50% ácido sulfúrico 2 mol/L) y se lee la reacción en un lector de ELISA, a una densidad óptica de 450 nm.

Los resultados permitieron graficar los cambios que ocurren en los títulos de anticuerpos, correlacionándolos con los cambios colorimétricos que ocurren en la placa de ELISA.

7.- Determinación de las variaciones en las concentraciones de testosterona sérica mediante ELISA

Para medir la concentración de testosterona sérica se utilizó el “Testosterone EIA kit” (Cayman).

1.- Se preparan la solución de testosterona estándar diluyendo 100 μ l de la solución estándar de testosterona en 900 μ l de agua ultrapura para que quede a una concentración de 5 ng/ml. Luego en 8 tubos ependorff se alícuota 900 μ l de EIA “buffer” en el tubo 1 y 500 μ l l en los tubos 2 al 8. Se agrega 100 μ l de la solución de testosterona estándar y se mezcla, de esta solución se sacan 500 μ l y se agregan al tubo 2, de este tubo 500 μ l se agregan al tubo 3, y se repite el proceso en los tubos restantes.

2.- En la placa de 96 pocillos que ya viene con el anticuerpo monoclonal de ratón se incorporaron 50 μ l por pocillo de las 8 soluciones estándares de testosterona, en duplicado. Lo mismo con las muestras de suero a analizar, que se diluyeron previamente en la solución tampón EIA a una concentración de 1/100, se agregó 50 μ l l de cada muestra en la placa, en duplicado. A todos los pocillos se le añadieron 50 μ l del Testosterone AChE Tracer (acetilcolinesterasa unida a testosterona), y 50 μ l del antisuero de testosterona. Se deja incubar a temperatura ambiente por 2 horas, en agitación orbital.

3.- Se lavó la placa 5 veces con tampón de lavado, se añadieron 200 μ l a cada pocillo, del reactivo de Ellman, y se dejó incubar por 2 horas a temperatura ambiente en agitación orbital.

4.- La placa fue leída en un lector de ELISA a 420 nm.

Con las densidades ópticas de las muestras estándares de testosterona se construyó una curva calibradora. Esta curva patrón sirve de referencia para el cálculo de las

concentraciones hormonales de las muestras. El ordenador calcula las concentraciones de las muestras problema tomando como referencia las curvas patrón.

Con los datos obtenidos de estos ensayos ELISA se realizaron gráficos para evaluar el cambio que ocurre en las concentraciones de anticuerpos y hormonas en el tiempo, provocado por las vacunas con quitosano como adyuvante.

8.- Histología

109 días posterior al inicio del ensayo las ratas fueron sacrificadas por exposición a CO₂ y ambos testículos fueron extraídos quirúrgicamente, medidos y pesados.

Para realizar el análisis anátomo-histopatológico los testículos y epidídimos fueron fijados en solución de formalina tamponada al 10% (v/v) y posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina, observados y fotografiados en un microscopio Nikon, modelo Eclipse 400, con videocámara incluida.

Resultados

Identificación de His-GnRX G/Q recombinante purificada por electroforesis

Una alícuota extraída desde la purificación a través de la columna de Níquel fue mezclada con tampón SDS para proteínas y corrida en un gel de poliacrilamida al 12%, donde se observó una banda a la altura de 30 kDa correspondiente a la proteína recombinante His GnRX G/Q, como se observa en la figura número 1.

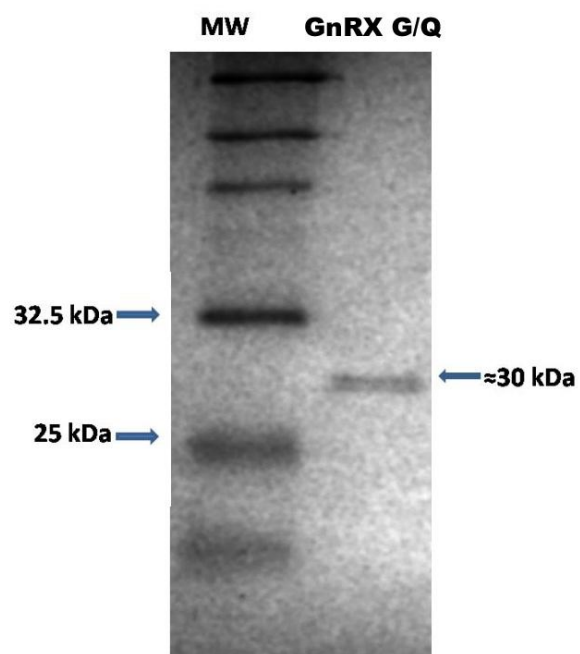


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE al 12% que muestra la expresión de la proteína His GnRX G/Q.

Microfotografías de partículas de quitosano al microscopio electrónico de Barrido.

50 μg de quitosano fueron mezclados 10 μg del plasmidio PGEFP formándose nanopartículas de 50-300 nm como se observa en la figura 2.

En la figura 3 se observa la mezcla de cantidades iguales de una solución de quitosano junto con la proteína BSA (del inglés Bovine serum albumine), formándose micropartículas aglomeradas de 2-10 μm .

En la figura 4 se observa las micropartículas formadas a partir de una solución de quitosano mezclada con la proteína GnRX G/Q, entrecruzada con EDAC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride)

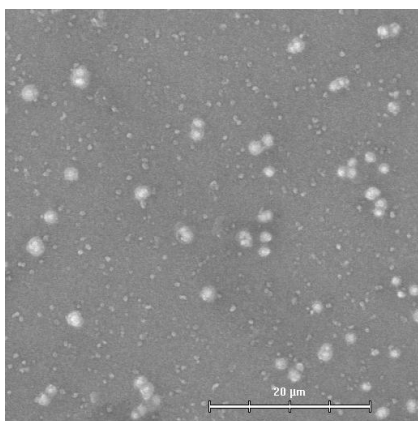


Figura 2. Fotografía en SEM de nanopartículas de quitosano con DNA (PGEFP).

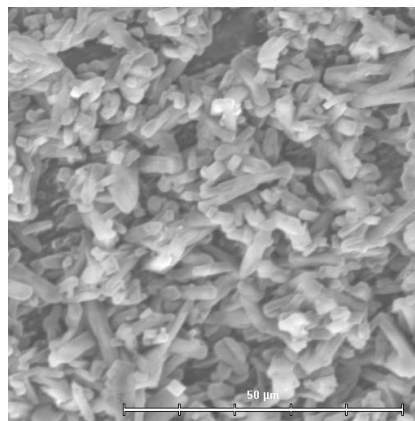


Figura 3. Fotografía en SEM de solución de quitosano con BSA.

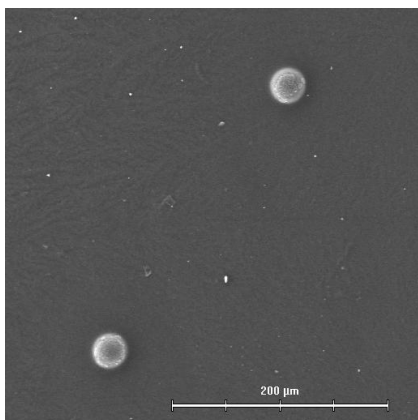


Figura 4. Fotografía en SEM de micropartículas de quitosano entrecruzadas con la proteína GnRX G/Q, usando EDAC.

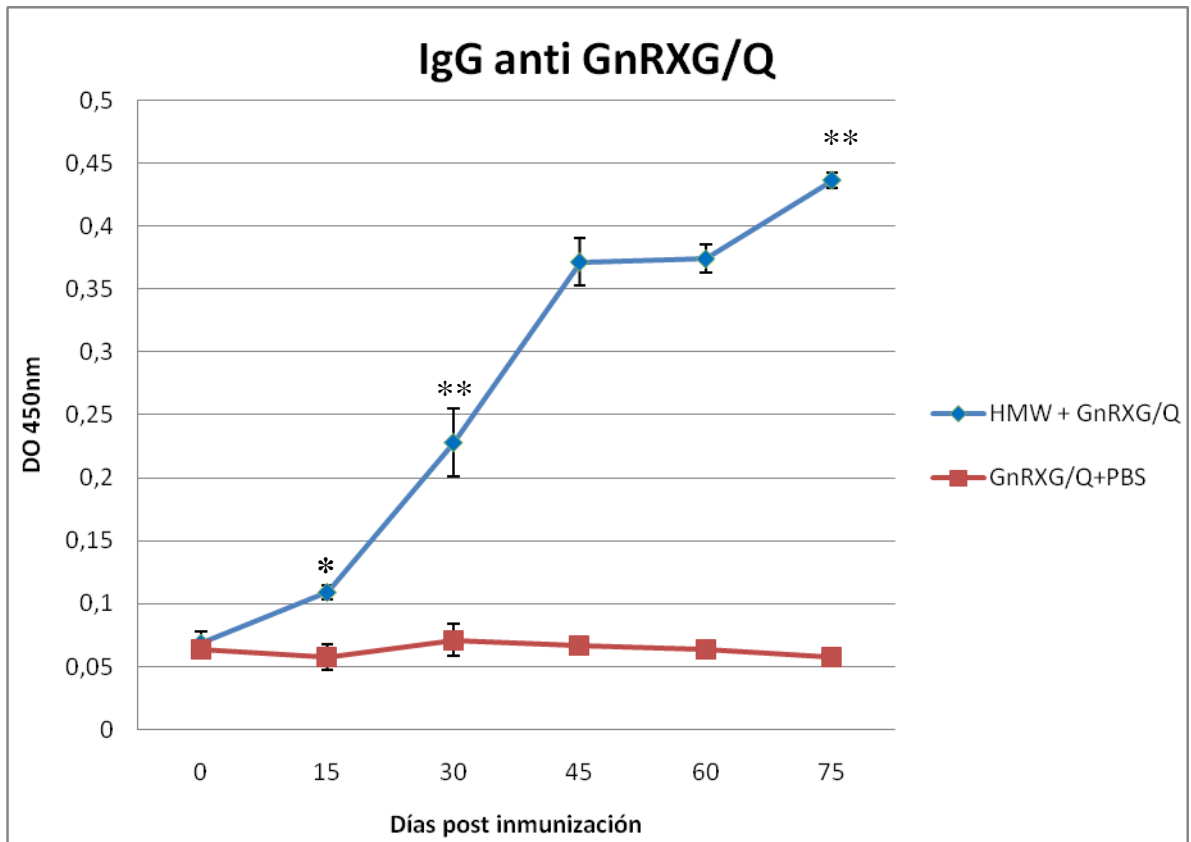


Gráfico 1: Respuesta de IgG contra la proteína GnRX G/Q utilizando quitosano de alto peso molecular (♦) y control GnRXG/Q en PBS (■). Los datos están expresados en valores de densidad óptica ± D.S. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 1 se observan los niveles de IgG para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q. A partir del día 15 se observan diferencias estadísticas significativas entre los animales inmunizados con quitosano y los animales control. Al día 75 se puede observar que la densidad óptica en el grupo de animales inmunizados con quitosano HMW como adyuvante fue aproximadamente 7,5 veces mayor que en el grupo control y se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.0002$)

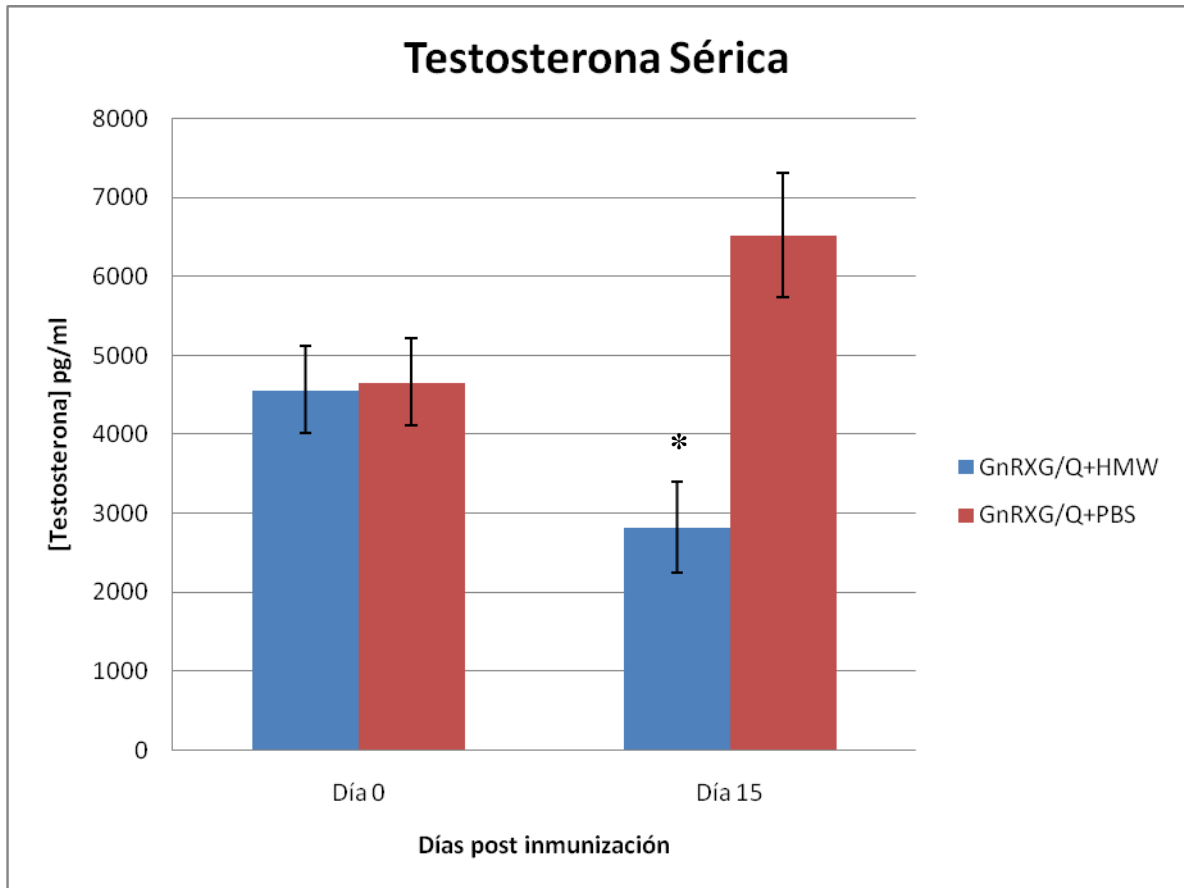


Gráfico 2: Concentración de testosterona sérica en animales inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q en PBS (■) y/o utilizando quitosano de alto peso molecular como adyuvante (■). Los valores de concentración están expresados en pg/ml ± D.S. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 2 se muestran los niveles de testosterona sérica para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q. Al día 15 se puede observó que los valores de testosterona sérica en el grupo de animales inmunizados con quitosano HMW como adyuvante fue aproximadamente 2,3 veces menor que en el grupo control. ($p < 0.05$).

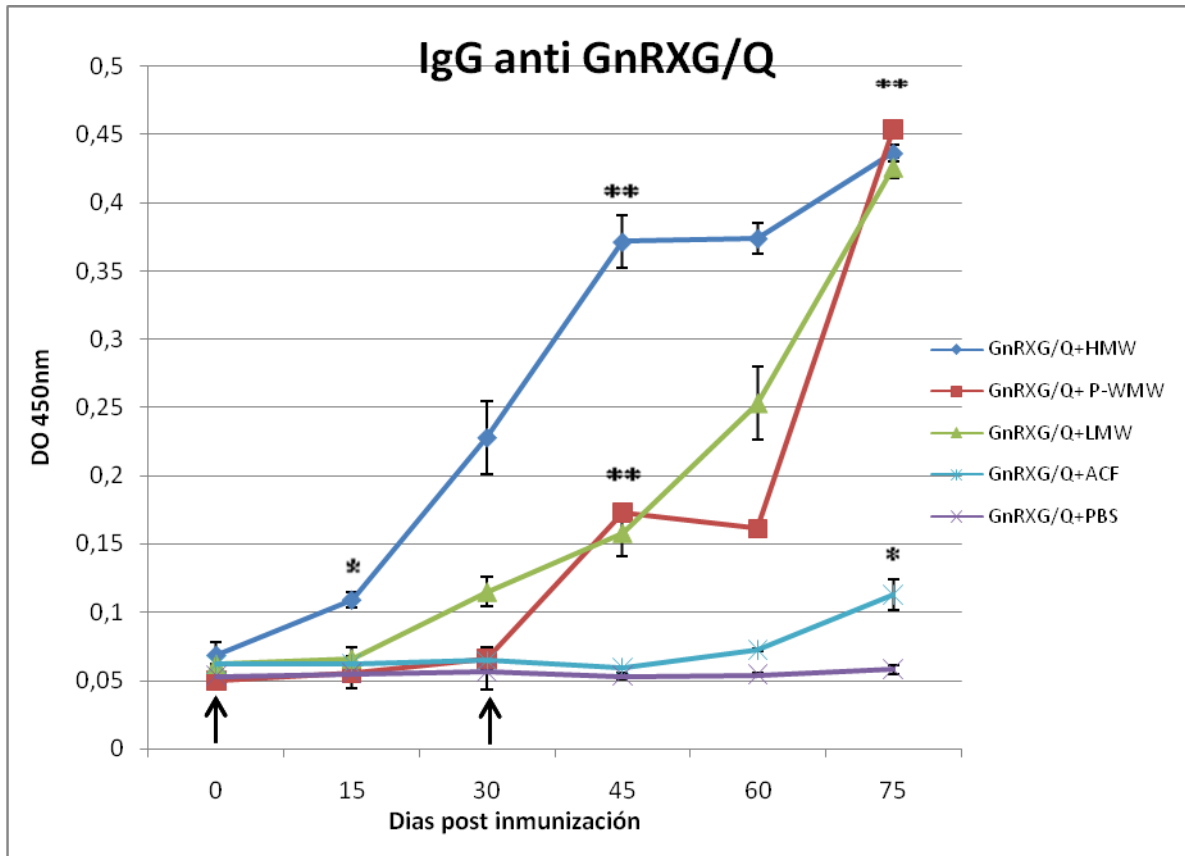


Gráfico 3: Niveles de inmunoglobulinas IgG en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (♦), HMW fosforilado (■), LMW (▲), ACF (*) y en PBS (x). Los valores de densidad óptica están expresados como promedio \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 3 se muestran los niveles de IgG para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q. Al día 45 se puede observar que la densidad óptica en el grupo de animales inmunizados con quitosano HMW como adyuvante fue aproximadamente 5,3 veces mayor que en el grupo control y se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p = 0.002$). Al día 75 los animales inmunizados con cualquiera de los 3 quitosanos como adyuvante presentaron densidades ópticas aproximadamente 12 veces mayores que el grupo control ($p = 0,0001$) y 4 veces mayores que las logradas con el adyuvante completo de Freund como adyuvante, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p = 0,0008$).

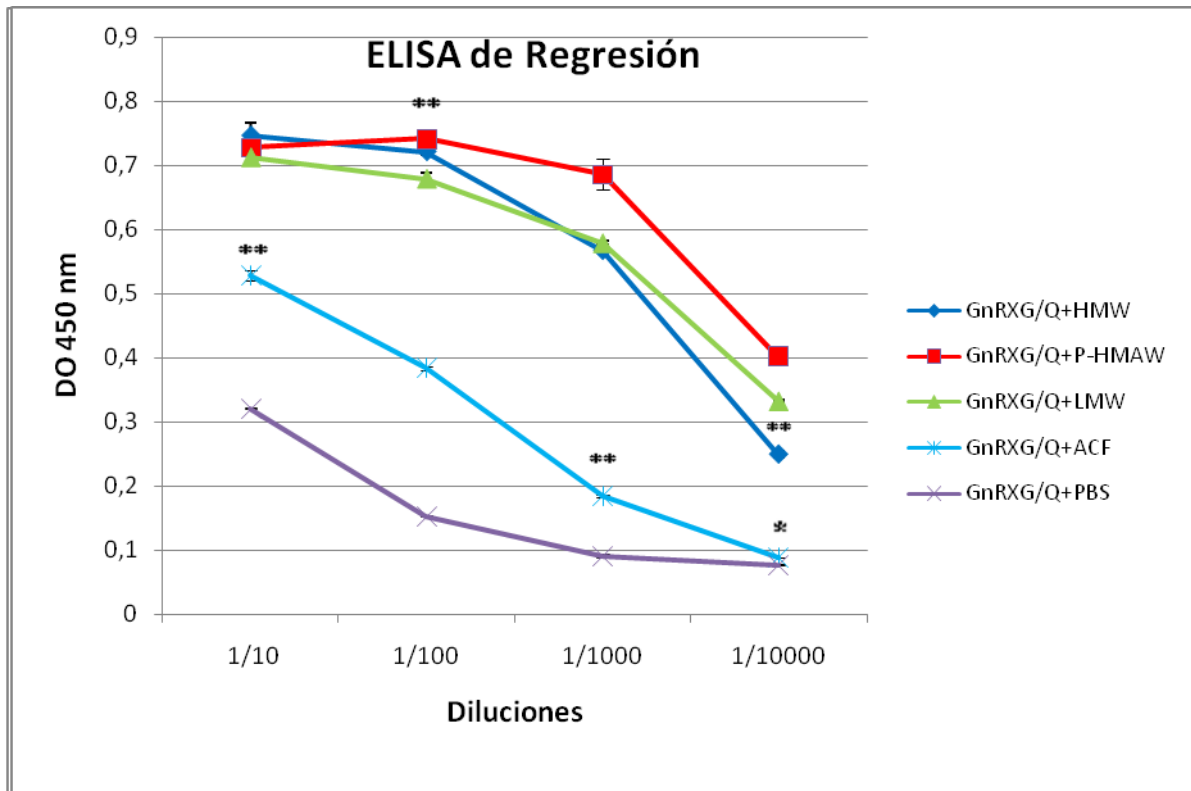


Gráfico 4: ELISA de regresión de los niveles de inmunoglobulinas IgG en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (♦), HMW fosforilado (■), LMW (▲), ACF (*) y en PBS (x), con distintas diluciones del suero de las ratas. Los valores de densidad óptica están expresados como promedio \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 4 se muestran los niveles de IgG para diluciones recíprocas de animales inmunizados al día 75 donde el grupo de animales inmunizados con el adyuvante completo de Freund fue aproximadamente 2,5 veces mayor que en el grupo control a la dilución de trabajo utilizada (1:250) ($p < 0.001$). Y para los animales inmunizados con quitosano como adyuvante la densidad óptica fue aproximadamente 5 veces mayor que el grupo control a la dilución de trabajo utilizada (1:250) ($p < 0.001$).

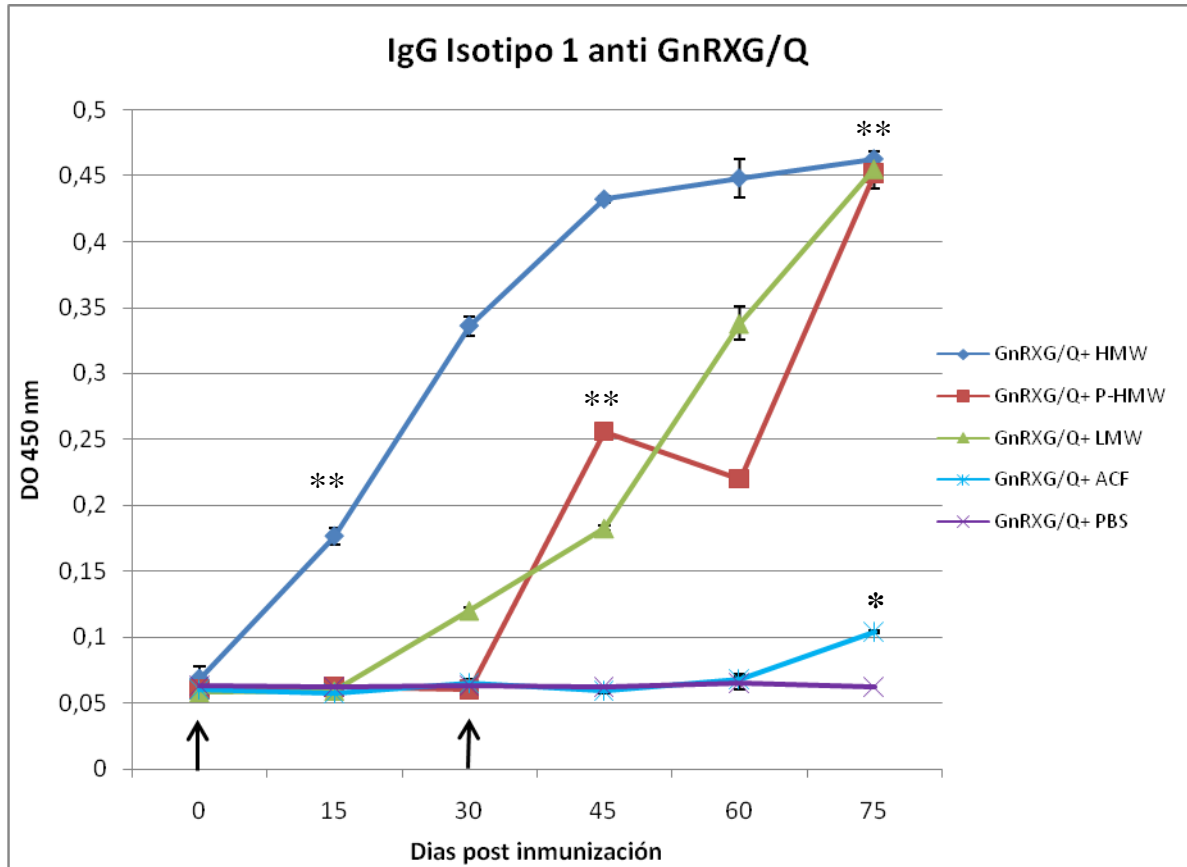


Gráfico 5: Niveles de inmunoglobulinas IgG isotipo 1 en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (♦), HMW fosforilado (■), LMW (▲), ACF (*) y en PBS (x). Los valores de densidad óptica están expresados como promedio \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 5 se muestran los niveles de IgG isotipo 1 para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q. Este gráfico es muy similar al gráfico número 3. Donde el quitosano HMW es el que presenta alzas más rápidas en los niveles de IgG 1 al día 15, presentando ya a esos tiempos diferencias significativas ($p < 0.05$).

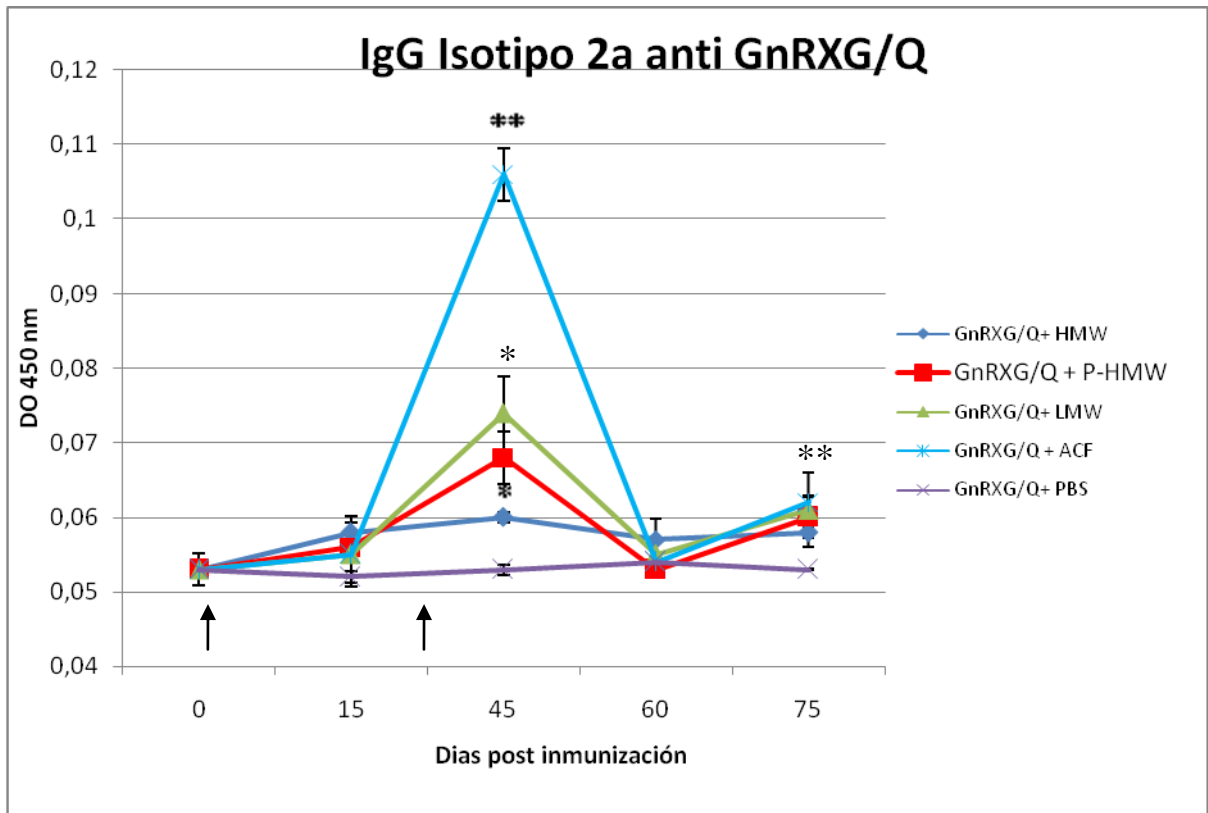


Gráfico 6: Niveles de inmunoglobulinas IgG isotipo 2a en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (♦), HMW fosforilado (■), LMW (▲), ACF (*) y en PBS (x). Los valores de densidad óptica están expresados como promedio \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 6 se muestran los niveles de IgG isotipo 2a para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q, para evaluar los niveles de IgG2a. Al día 45 se puede observar que existe un alza en la densidad óptica de todos los animales. Siendo el ACF el que provoca una mayor alza de IgG2a logrando al día 45 valores 2 veces mayores al control, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p = 0,0072$). Mientras que el quitosano LMW que día 45 logra una densidad óptica 1,4 veces mayor que el control, encontrándose diferencias estadísticas significativas ($p = 0,027$).

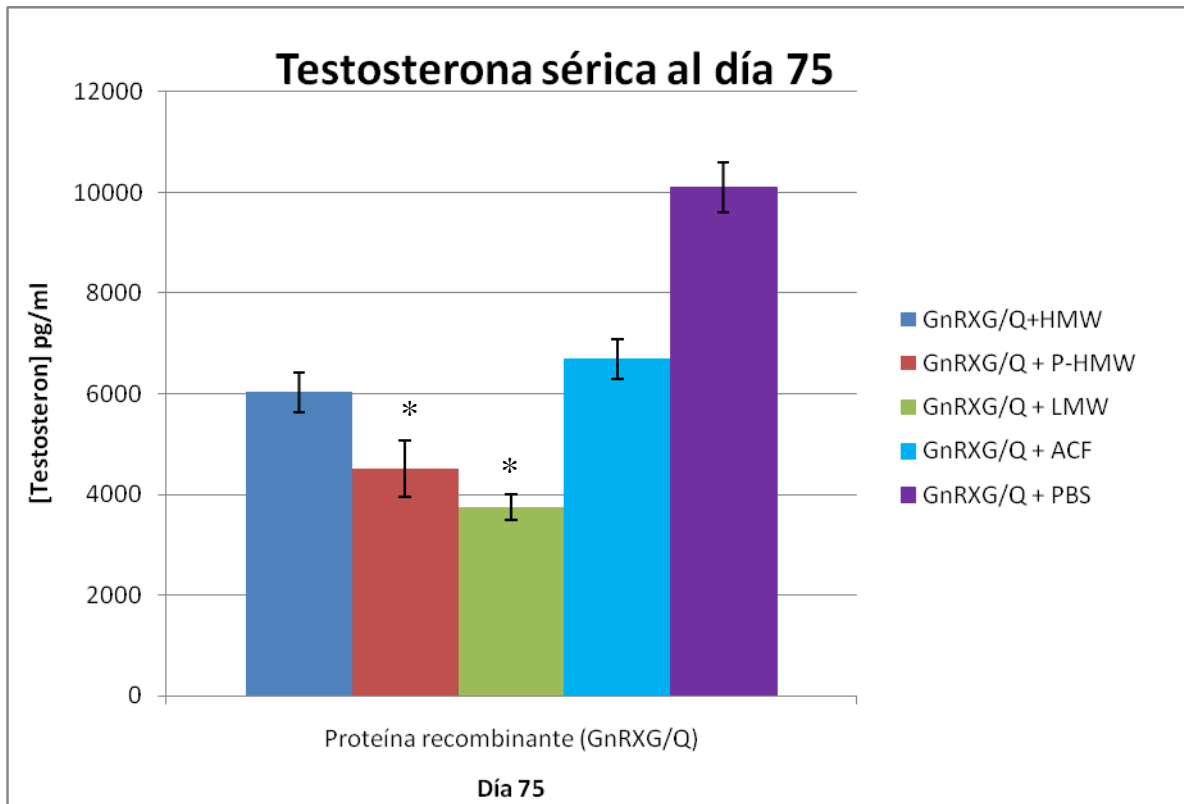


Gráfico 7: Niveles testosterona sérica al día 75 de la primera inmunización, en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (■), alto peso molecular fosforilado (■), bajo peso molecular (■), ACF (■) y en PBS (■). Los valores de concentración están expresados en pg/ml ± D.S. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 7 se muestran los niveles de testosterona sérica al día 75 para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q. Se puede observar que los valores de testosterona sérica de todos los animales en estudio fue menor a los del control, siendo el quitosano LMW el que presentó menores niveles, fue aproximadamente 2,7 veces menor que el grupo control, siendo estadísticamente significativo ($p = 0,023$).

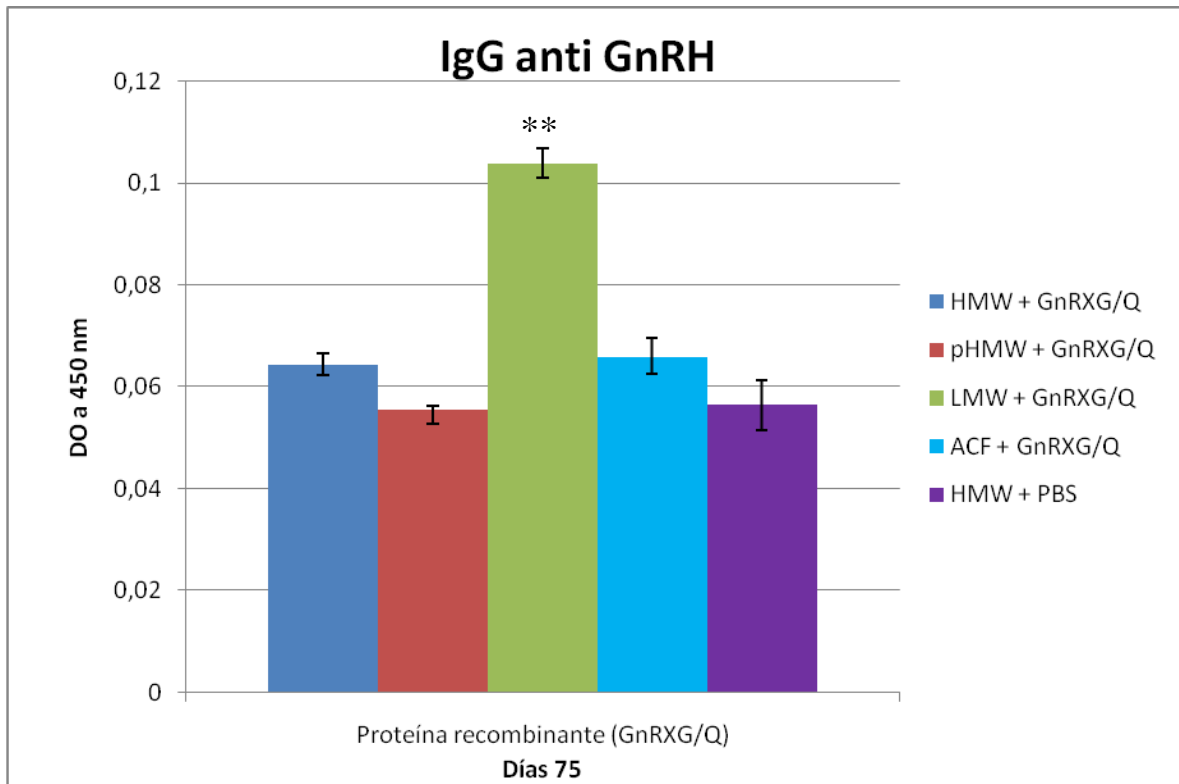


Gráfico 8: Niveles de inmunoglobulinas IgG contra la hormona GnRH, en ratas inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q al día 75 en quitosano de alto peso molecular (◆), HMW fosforilado (■), LMW (▲) o ACF (*). Los valores de densidad óptica están expresados como promedio ± DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.05$ () $p \leq 0.01$.**

En el gráfico número 8 se muestran niveles de IgG para animales inmunizados con la proteína GnRX G/Q, para evaluar si existe inmunidad cruzada con la hormona nativa GnRH. Al día 75 los animales inmunizados con quitosano LMW como adyuvante presentaron densidades ópticas aproximadamente 1,6 veces mayores que el grupo control, siendo estadísticamente significativo ($p = 0,006$).

Estudio histológico

Se realizaron cortes histológicos de los testículos de las ratas al finalizar el estudio.

En algunas ratas inmunizadas con quitosano HMW como adyuvante se observó el epitelio seminífero de un aspecto vacuolado y desorganizado, lumen amplio y estrellado, con restos celulares en el interior, además escasas espermatogonias y espermatozoides, como se puede observar en las figuras 5, 7 y 9.

A diferencia de esto el grupo control presentó un epitelio seminífero normal, con las líneas celulares bien diferenciadas y con gran cantidad de espermatozoides en su interior, como se observa en las figuras 6, 8 y 10.

Los cortes de epidídimo del grupo de ratas inmunizadas con quitosano como adyuvante presentaron una menor cantidad de espermatozoides al compararlos con el grupo control, como se observa en las figuras 11 y 12.

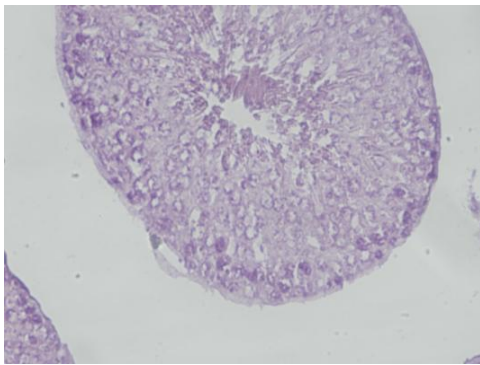


Figura 5. Corte de testículo de rata inmunizada con quitosano como adyuvante. Se observa el epitelio vacuolado y desorganizado. Tinción H/E. 40X.

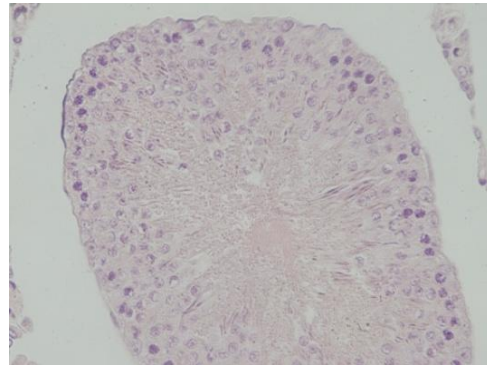


Figura 6. Corte de testículo del grupo control. Tinción H/E. 40X.

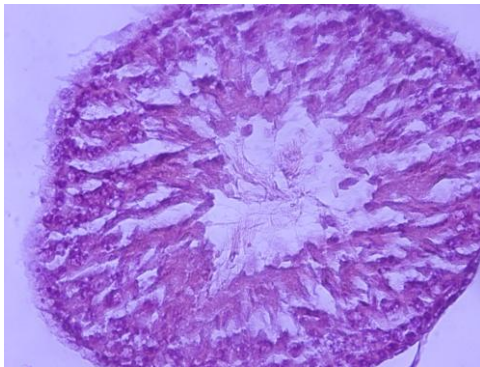


Figura 7. Corte de testículo de rata inmunizada con quitosano como adyuvante. Se observa

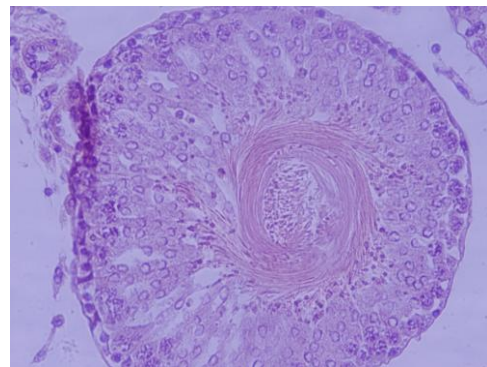


Figura 8. Corte de testículo del grupo control. Tinción H/E. 40X.

lumen amplio y restos celulares. Tinción H/E. 40X.

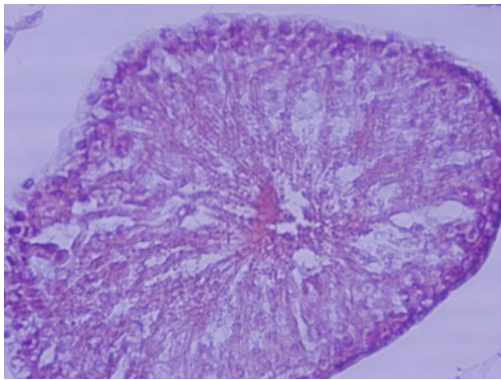


Figura 9. Corte de testículo de rata inmunizada con quitosano como adyuvante. Se observan escasos espermatozoides y Espermatogonias Tinción H/E. 40X.

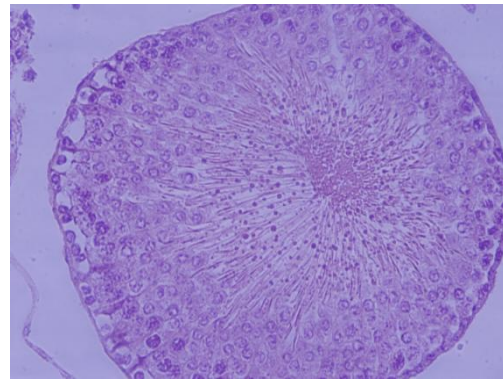


Figura 10. Corte de testículo de rata del grupo. Tinción H/E. 40X.

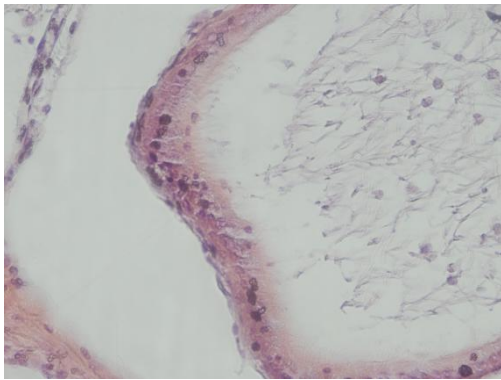


Figura 11. Corte epidídimo de rata inmunizada con quitosano como adyuvante. Se observa escasa cantidad de espermatozoides. Tinción H/E. 40X.

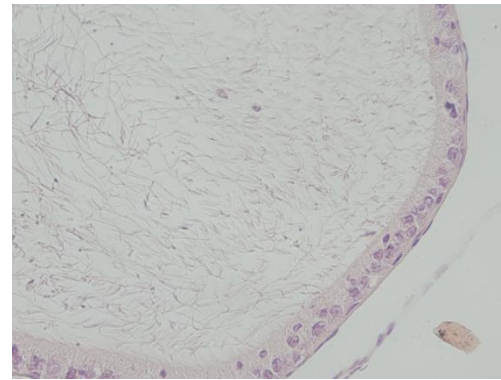


Figura 12. Corte de epidídimo de rata del grupo control. Tinción H/E. 40X.

Discusión

Como resultado de una mejor comprensión de los mecanismos inmunológicos y del desarrollo de requerimientos reguladores más estrictos (Dellepians y cols., 2000), la vacunología moderna se ha encaminado hacia el diseño de vacunas mejor definidas. Una de estas estrategias está basada en el desarrollo de vacunas de sub-unidades que garantiza la seguridad de los compuestos vacunales ya que no está presente el patógeno, pero atenta contra la eficacia de los mismos al eliminar las señales activadoras de la respuesta inmune o PAMPs. Por ello, cobra gran importancia el desarrollo y uso de adyuvantes que aporten estas señales de peligro capaces de activar apropiadamente el sistema inmune (O'Hagan y Valiente, 2003).

El presente estudio permitió evaluar la capacidad de distintas formulaciones de una vacuna peptídica administrada en ratas para activar el sistema inmune, utilizando el polímero natural quitosano como adyuvante junto a una proteína recombinante en un modelo de vacuna peptídico anti-GnRH.

El quitosano posee características policatiónicas que permiten la formación de micropartículas cuando interactúa con sustancias cargadas negativamente. Para formar estas micropartículas se mezclaron cantidades iguales de una solución de quitosano junto con la proteína, sin embargo no se formaron las micropartículas. Esto puede explicarse ya que el quitosano disuelto en una solución ácida, ácido acético en nuestro caso, se vuelve un polímero catiónico por la protonación de los grupos aminos (NH_3^+) en el C2, para que una proteína forme partículas con quitosano en solución su punto isoeléctrico debe ser igual o menor al pKa del quitosano, que es aproximadamente 6.5, ya que la proteína se asociaría al quitosano vía interacciones electrostáticas entre los grupos aminos cargados positivamente del quitosano y los grupos carboxílicos negativos de la proteína. Sin embargo, la proteína recombinante utilizada en este estudio presentó un pKa teórico de 11, por lo tanto sería necesario el uso de un agente entrecruzante que posibilite la formación de micropartículas. (Cuifang, 2007).

Estudios anteriores utilizando quitosano de alto peso molecular como adyuvante (Zaharoff, 2006), demostraron la capacidad inmunogénica de éste. Una solución de quitosano HMW a una concentración de 1,5% fue comparado con Hidróxido de aluminio y con el Adyuvante completo de Freund, resultando poseer el quitosano, una capacidad estimulante del sistema inmune superior al Hidróxido de aluminio y comparable al ACF. A diferencia de los resultados mostrados por Zaharoff en el presente estudio el adyuvante completo de Freund provocó alzas menores en los títulos de anticuerpos en el tiempo, siendo éste el propuesto como estándar de oro para este tipo de modelo de vacunas.

En el presente estudio durante el tratamiento con las distintas formulaciones de la vacuna peptídica anti GnRH utilizadas para vacunar a las ratas, se observó que las ratas inmunizadas con la proteína en quitosano como adyuvante presentaron una notoria alza en los títulos de anticuerpos anti GnRX G/Q a diferencia de las ratas inmunizadas con la proteína disuelta en PBS y con ACF como adyuvante. Estos resultados concuerdan con el estudio reportado por Zaharoff, en el cual el nivel de respuesta máximo se logra entre los días 14 y 21 después de la inoculación que luego disminuye por la degradación del polisacárido, al igual que en nuestros resultados, donde se observa que las mayores alzas en los niveles de Inmunoglobulinas se logra entre las 2^o y 3^o semanas post inoculación, especialmente para el quitosano HMW, ya que los quitosanos LMW y HMW fosforilado tienen un alza más lenta y prolongada en el tiempo. Esto puede ser explicado por lo que menciona Zaharoff en su estudio, que no todo el quitosano se degradará al rango supuesto, que la degradación del quitosano es mediada mayormente por la digestión de lisozimas, la que es dependiente del grado de desacetilación y más aún del peso molecular y concentración de quitosano usada. Esta variabilidad entrega una tremenda oportunidad para la ingeniería de vacunas específicas; por ejemplo, manipulando la viscosidad del quitosano vía peso molecular y concentración, cambiará la densidad de la matriz de quitosano y se esperarían el control de la liberación del antígeno. También por el control del grado de desacetilación del quitosano, se puede controlar la digestión lisozomal y por lo tanto, la liberación vacunal, esta plataforma adaptable puede ser diseñada para degradarse en una semana o varios meses. Es también probable que simples modificaciones químicas del

quitosano afectarían su actividad inmunológica y de esta manera, el tipo y nivel de respuesta vacunal. Lo anterior mencionado en este estudio, no puede ser comprobado, ya que utilizan una única solución de quitosano. Sin embargo, con lo visto en nuestro estudio, queda demostrado que distintas soluciones de quitosano lograrán distintos niveles de respuesta en el tiempo.

Zaharoff en su estudio sostiene que la capacidad inmunoestimuladora del quitosano estaría dada por su viscosidad, pero nuestros resultados sugieren que este no sería el único factor influyente, ya que se analizan dos soluciones de quitosano que presentan la misma viscosidad inicial. El quitosano HMW y el quitosano fosforilado HMW, presentan variaciones en los títulos de anticuerpos muy diferentes. Esto estaría dado por el proceso de fosforilación del quitosano, donde los grupos fosfatos se unirían químicamente a los carbonos 3 y 6 de las unidades N-acetil-D-glucosamina, modificando este grupo químico, sugiriendo que éste podría estar involucrado en la mayor eficiencia de la respuesta inmune presentada por el quitosano.

En otro estudio en que utilizan quitosano como micropartículas y en solución como adyuvante, se plantea que el quitosano puede estimular la respuesta inmune a través de interacciones de subunidades de N-acetil-D-glucosamina y proteína ligadora de glucosa, una proteína que puede activar el complemento, actúa como opsonina y cruza los sistemas de inmunidad innata y adaptativa (Stefarian y Martínez, 2000).

Se sabe que TLR-2 reconoce varias moléculas incluyendo unidades N-acetil-glucosamina, esto provocaría el desarrollo de una respuesta inmune innata más robusta a través de la inducción de citoquinas proinflamatorias, quimoquinas, interferones e inmunoglobulinas, lo que finalmente promueve una mayor respuesta adaptativa (Travassos, *et al*; 2007). Con esto se puede plantear que la efectiva capacidad inmunoestimuladora del quitosano podría ser explicada por dos razones principales, lo primero es su alta viscosidad en solución lo cual lograría provocar una reacción inflamatoria atrayendo células inmunes y permitiendo que el antígeno permanezca en el lugar de inoculación por más tiempo y la segunda razón podría ser que las unidades N-acetil-glucosamina del quitosano activaran a los TLR-2 de las células dendríticas.

También es posible reconocer el tipo de respuesta que presenta el quitosano, según la subclase de IgG predominante. Así queda claro que la respuesta del quitosano es más bien

tipo Th2, ya que la IgG con mayores alzas es la IgG1, a diferencia del ACF, que presenta mayores títulos de IgG2a, es decir una tendencia a una respuesta tipo Th1. Estos resultados difieren con los obtenidos por Zaharoff, que en el análisis de isotipo de anticuerpos se reveló que la naturaleza de la respuesta inmune lograda con quitosano fue una mezcla de respuesta Th1/Th2. Por otro lado, el quitosano LMW presenta un aumento en las IgG2a, que a diferencia de los otros, podría ser por el grado de desacetilación del quitosano LMW, ya que por este tendría más unidades N-acetil-D-glucosamina y se sabe que las células fagocíticas internalizan algunos antígenos por medio de sus receptores de manosa que reconocen carbohidratos de las paredes celulares de bacterias, incluyendo N-acetil-D-glucosamina, y producen citoquinas TH1 tales como IL-12, IL18 y TNF alfa (Zhang., *et al* 2005).

En los gráficos presentados en los resultados también queda en evidencia que la proteína GnRX G/Q no es antigénica por si sola, ya que la curva de inmunoglobulinas de estas ratas se mantiene en niveles basales durante todo el tratamiento.

Al utilizar un quitosano más concentrado, como en el caso de las ratas inmunizadas con quitosano al 2%, ambos animales presentaron altos niveles de IgG anti GnRX, niveles más altos que el control y que los de los animales inmunizados con ACF lo que revalida los resultados mostrados en este estudio.

La proteína recombinante GnRX G/Q fue capaz de inducir una respuesta inmune contra la hormona endógena GnRH, lo que queda en evidencia con las alzas en los títulos de IgG anti GnRH, a pesar de que no son tan notorios como las alzas de IgG anti GnRX, sin embargo para los ensayos ELISA no fue fácil pegar la GnRH a las placas, por ser un péptido tan pequeño, por lo que pudiesen estar subestimadas las concentraciones reales de IgG anti GnRH reales.

Al determinar los parámetros reproductivos los resultados del ELISA que mostraron la concentración sérica de testosterona revelaron marcadas fluctuaciones en los títulos de testosterona sérica de las ratas inmunizadas con quitosano, al igual que con ACF. La

concentración de testosterona en el suero de los animales inmunizados resultó significativamente inferior al de los controles en las semanas 4 ($P < 0,01$) y 16 ($P < 0,05$). Los niveles de testosterona tienden a disminuir cercano al día 15 para el quitosano HMW y mucho más tardío para el quitosano LMW, donde las disminuciones puede apreciar después del día 75 y se mantienen bajos hasta el día 109, lo que concuerda con el esquema de títulos de anticuerpos anti-GnRH nativa, donde el quitosano LMW presenta un aumento en los títulos luego del día 60. Esto se debe probablemente a la capacidad neutralizante de los anticuerpos anti- GnRH sobre la GnRH endógena.

Cercano al día 75 la concentración de testosterona sérica presenta un alza en los animales vacunados con quitosano HMW, ACF y HMW fosforilado, lo que sería explicado por la tolerancia del sistema inmune al péptido GnRX, que ocasionaría el efecto contrario, es decir la liberación de más GnRH y por ende, un aumento en los títulos de testosterona. Está en la literatura que la vacunación exitosa contra una molécula endógena requiere un nivel suficiente de anticuerpos neutralizantes durante todo el período de tratamiento para obtener el efecto deseado, sin embargo está descrito en otro estudio de vacuna anti-GnRH, que luego de un período de tiempo la cantidad de anticuerpos específicos anti-GnRH o su afinidad no son las suficientes para mantener bajos los niveles de testosterona. La neutralización de la GnRH afecta los niveles de testosterona al reducir los niveles de LH. Si la neutralización de GnRH es incompleta, no se reducen los niveles de LH y, por lo tanto, no se inhibirá la producción y secreción de testosterona por las células de Leydig (Hannesdóttir *et al.*, 2004). También puede influir el hecho de que las ratas están en crecimiento, por esto sus niveles de testosterona debiesen ir en aumento en el tiempo. Incluso sucede lo mismo con la vacuna comercial de inmunocastración para cerdos Improvac, que luego de 7 semanas después de la segunda dosis los anticuerpos disminuyen sus niveles de efectividad, permitiendo el regreso de la función testicular.

Conclusiones

- Para la formación de micropartículas de quitosano con la proteína GnRX G/Q u otra que presente carga neta positiva, es necesario un agente entrecruzante.
- En todos los grupos de ratas inmunizadas con el péptido GnRX G/Q los niveles de IgG anti GnRX G/Q medidos mediante ELISA, fueron mayores a los presentados por el grupo control y por el grupo inmunizado con ACF. Por esto podría darse como aprobada la hipótesis de que el quitosano mejora la respuesta inmune en un modelo de vacuna peptídica.
- La respuesta inmune presentada por todas las soluciones de quitosano es del tipo Th2 según la subclase de IgG predominante, que en el caso del quitosano es IgG1, en cambio para el adyuvante completo de Freund predomina la IgG2a, mostrando una respuesta tipo Th1.
- Existe inmunogenicidad cruzada entre la hormona nativa GnRH y el péptido sintético GnRX G/Q que junto con quitosano como adyuvante provoca alzas en los títulos de IgG anti GnRH, sobretodo en el caso de las ratas inmunizadas con quitosano LMW.
- Al utilizar el péptido sintético GnRX G/Q con las soluciones de quitosano como adyuvante, se provocan variaciones en los niveles de testosterona sérica, disminuyendo en diferentes medidas más notoriamente para el grupo de quitosano LMW como adyuvante.

Bibliografía

AGUILAR, J.; LEAL, M. 2000. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada*. 17(3):147-160.

CUIFANG, C. 2007. Biodegradable polymer micro- and nanoparticles as protein delivery systems: influence of microparticle morphology and improvement of protein loading capacity of nanoparticles. <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2007/0537/> [consulta 20-07-2008]

DELLEPIANE, N.; GRIFFITHS, E.; MILSTIEN, B. 2000. New challenges in assuring vaccine quality. *Bull WHO* 78:155-62.

DUMAN, S.; SENEL, S. 2004. Chitosan and its applications in veterinary medicine. *Veteriner Cerrahi Dergisi*. 10:62-72.

GUPTA, R.K. 1998. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 32:155-172.

HANNESDOTTIR, S.; HAN, X.; LUND, T.; SINGH, M.; VAN DER ZEE, R. 2004. Changes in the reproductive system of male mice immunized with a GnRH-analogue conjugated to mycobacterial. *Reproduction* 128,365–371.

HEEMELS, M.; PLOEGH, H. 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem.* 64:463–491.

HERBERT, C.; TRIGG, T. 2005. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal reproduction science*. 88:141-153.

KAISHO, T.; AKIRA, S. 2003. Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr. Mol. Med.* 3: 759-771.

KALLINSKI, P.; HILKENS, C.; WIERENGA, E.; KAPSENBERG, M. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology today*. 20(12):561-7.

KENNEY, R.; EDELMAN, R. 2004. *Adjuvants for the Future. New Generation Vaccines*, 3rd ed. New York.

KERSTEN, G.; CROMMELIN, D. 2003. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*. 21:915-20.

KUMAR, R.; MUZARELLI, R.; MUZZARELLI, C. 2004. . Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev*. 104:6017–84.

LAREZ, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Panamericana de Polímeros*. 4(2).

LOPEZ, M.; MALLORQUÍN, P.; PARDO, R.; VEGA, M. 2004. *Vacunas de nueva generación*. 1º Ed., Genoma España/CIBT-FGUAM, Madrid.

MORRIS, S.; KELLEY, C.; HOWARD, K.; LI, A.; COLLINS, F. 2000. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine*. 18:2156-2163.

ODEON, C. 2002 *Vacunas para el control de las infecciones virales de los bovinos*. <http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciosas/bovinos_en_general/60-vacunas_para_infecciones_virales.htm> [consulta: 30- 07-2008].

O'HAGAN, D.; LEVINE, M.; KAPER, J.; RAPPUOLI, R.; LIU, M.; GOOD M. 2004. Recent developments in vaccine delivery systems. *New Generation Vaccines* 2:259–270.

O'HAGAN, D.; SINGH, M.; ULMER, J. 2004. Microparticles for the delivery of DNA vaccines. *Immunological Reviews* 199(1):191-200.

O'HAGAN, T.; VALIENTE, M. 2003. Current status of Immunological Adjuvants. *Ann. Rev. Immunol.*4:369-388.

REDDY, S.; SWARTZ, M.; HUBBELL, J. 2006 Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends in immunology* 12(27):573-580.

RELYVED, E.; BIZZINI, B.; GUPTA, R.K. 1998. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines. *Trends in immunology.* 12(27):573-580.

ROMAGNANI, S. 1991. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today.* 11:316-319.

SENEL, S.; MCCLURE, S. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 56 (10): 1467-80.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nat. Biotechnology.* 17:1075 1081.

STEFARIAN, P.; MARTINEZ, M. 2000. Immune stimulating activity of two chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine.* 19:661-668.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. 2003. Toll-like receptors. *Ann Rev Immunol.* 21:335–376.

TRAVASSOS, L.; CARNEIRO, L.; STEPHEN, E.; GIRARDIN, I.; BONECA, R.; BOZZA, M.; DOMINGUES, A.; COYLE, A.; BERTIN, J.; PHILPOT, D.; PLOTKOWSKI, M. 2005. Nod1 Participates in the Innate Immune Response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*280(44):36714-36718.

WOLF, P.; PLOEGH, H. 1995. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:267–306.

ZAHAROFF, D.; ROGERS, C.; HANCE, K.; SCHOLM, J.; GREINER, J. 2006. Chitosan solutions enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine.* 25:2085-2094.

ZHANG, C.; YU, S.; GRAN, B.; ROSTAMI, A. 2005. Glucosamine abrogates the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis by induction of Th2 response. *J. Immunol.* 175, 7202-7208.