



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS Y
CITOQUINAS INF- γ , IL-2, IL-4 E IL-10, EN ANIMALES INMUNIZADOS
CON UNA VACUNA PEPTÍDICA CONTRA LA HORMONA
LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH-I) USANDO
QUITOSANO COMO ADYUVANTE**

DANIELA ROCÍO SIEL SIEL

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

PROFESOR GUÍA
LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA

**SANTIAGO, CHILE
2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS Y CITOQUINAS INF- γ , IL-2, IL-4 E IL-10, EN ANIMALES INMUNIZADOS CON UNA VACUNA PEPTÍDICA CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GNRH-I) USANDO QUITOSANO COMO ADYUVANTE

DANIELA ROCÍO SIEL SIEL

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA
PROFESOR CONSEJERO:	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZÚÑIGA MARTI

**SANTIAGO, CHILE
2010**

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar, a mi profesor guía, el Doctor Leonardo Sáenz, por su paciencia y dedicación constante, por guiarme y por entregarme cada día el apoyo y motivación necesarios. A todo el grupo de trabajo de los laboratorios BIOVETEC y CIMAT por todos los buenos momentos, en especial a Sonia Vidal por su ayuda y apoyo incondicional, tanto en el desarrollo de mi tesis como en lo personal. Agradezco profundamente haber desarrollado mi tesis con un grupo de trabajo tan maravilloso.

Sin lugar a dudas agradezco a mi madre, porque ha sido el pilar de mi vida, porque es una mujer admirable, mi ejemplo a seguir. Tengo que agradecerle además por ser una mamá maravillosa, por entregarme siempre toda la fortaleza, entusiasmo y amor posibles. Finalmente mis logros son también suyos.

Agradezco a mi Rafita, por estar conmigo siempre, en los buenos y en los malos momentos, por compartir conmigo esta etapa y por todas las que compartiremos en nuestra vida, por todo el amor incondicional que me entrega cada día.

Quiero agradecer además a mis amigas del alma, Javi, Xime y Maca, por estar conmigo siempre, en esta etapa y en todas las que he tenido que sortear.

Finalmente, quiero agradecer a todos los profesores y funcionarios de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, que alguna vez dedicaron su tiempo a colaborar de una u otra manera en mi formación profesional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. Historia y características generales de las vacunas.	3
2. Vacunas y respuesta inmune.....	5
3. Células T _H 1 y T _H 2.	8
4. Adyuvantes.	12
5. Quitosano como Adyuvante.	16
6. Vacunación contra la hormona GnRH-I en mamíferos.	18
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Animales a utilizar.....	22
2. Obtención de la proteína recombinante GnRXG/Q.....	22
3. Formulaciones adyuvantes utilizadas.	23
4. Protocolo de vacunación de los ratones.....	24
5. Preparación de las vacunas.	24
6. Esquema experimental.....	24
7. Determinación de los niveles de IgG total, IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a desde el suero de los animales inmunizados, mediante ELISA indirecto.	25
8. Extracción y separación de los linfocitos desde esplenocitos obtenidos de los animales previamente inmunizados.....	28
9. Cultivo Primario de las células linfocitarias.....	30
10. Determinación de los niveles de citoquinas IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-10 desde cultivos primarios inducidos con el péptido <i>in vitro</i>	30
11. Determinación de la proliferación celular de las células cultivadas.....	31
12. Estudio histológico de los ovarios de los individuos inmunizados:	32
13. Análisis estadístico de los datos:	32
RESULTADOS	33
1. Identificación de la proteína GnRXG/Q recombinante por electroforesis.	33
2. Niveles de IgG total, IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a anti-GnRXG/Q desde el suero de los animales inmunizados.....	34
3. Proliferación celular de las células cultivadas.....	46
4. Niveles de citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2 desde cultivos primarios inducidos la proteína recombinante <i>in vitro</i>	48
5. Cambios histológicos gonadales en los individuos inmunizados.....	53
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN

La inmunocastración surge como una herramienta valiosa para el control de la fertilidad y la actividad reproductiva en animales de producción, silvestres y de compañía.

El objetivo de la presente memoria de título fue evaluar el patrón de inmunidad adquirida en animales inmunizados con una vacuna peptídica contra la hormona GnRH-I (proteína recombinante GnRXG/Q) inoculada por vía parenteral, analizando las inmunoglobulinas y citoquinas producidas. Se utilizaron tres estrategias adyuvantes distintas. Un grupo de ratones hembras de la cepa Balb/c fue vacunado con la proteína recombinante y quitosano de alto peso molecular como adyuvante (HMW), en un segundo grupo se utilizó la proteína recombinante y quitosano de bajo peso molecular como adyuvante (LMW) para la vacunación y en el tercer grupo la inmunización con la proteína recombinante y adyuvante incompleto de Freund (IFA). El grupo control fue inoculado solo con quitosano. Las inmunizaciones fueron realizadas en los días 0 y 30. Se realizaron extracciones de sangre cada 15 días, obteniendo el suero de los animales inmunizados para la determinación de los niveles de inmunoglobulinas mediante una prueba de ELISA indirecto. Al día 90 del estudio se realizó el sacrificio de los animales, con el objetivo de obtener sus linfocitos, los cuales fueron llevados a un cultivo celular primario que permitió la posterior determinación del patrón de citoquinas producidas por cada grupo experimental mediante una prueba de ELISA tipo “sándwich”. Al momento de la eutanasia se realizó también una ovariectomía para el posterior estudio histológico del parénquima ovárico.

Los resultados obtenidos revelaron que al utilizar quitosano HMW se induce una respuesta inmune de tipo T_H2 , debido a que se observaron mayores niveles de IgG isotipo 1 y un patrón de citoquinas con mayores niveles de IL-10 e IL-4. En cambio, al usar quitosano LMW como adyuvante, la respuesta inmune obtenida fue de tipo T_H1 , con un mayor nivel de IgG isotipo 2a y un patrón de citoquinas con mayores niveles de IFN- γ e IL-2. EL adyuvante incompleto de Freund (IFA) produjo una respuesta de tipo T_H1 , pero con niveles de IgG isotipo 2a contra la hormona GnRH-I menores que los obtenidos al usar quitosano LMW. Los cambios histológicos en el parénquima ovárico sugieren que la vacunación con la proteína recombinante GnRXG/Q genera una inhibición en la actividad ovárica, efecto que fue más marcado al usar quitosano LMW como estrategia adyuvante.

SUMMARY

The immunocastration arise as a valuable tool to control the fertility and reproductive activity in animal production, wildlife and pets. The purpose of this investigation was to evaluate the type of adaptive immunity in immunized animals with a peptide vaccine against GnRH-I (recombinant protein GnRXG / Q) inoculated by subcutaneous way, and analyzing the production of immunoglobulins and cytokines. We used three different adjuvant strategies. A group of female Balb/c mice was vaccinated with the recombinant protein in high molecular weight chitosan as adjuvant (HMW), in a second group we used the recombinant protein in low molecular weight chitosan as adjuvant (LMW), a third group was immunized with the recombinant protein in Freund's incomplete adjuvant (IFA). The control group was inoculated only with chitosan. Immunizations were performed on days 0 and 30. Every 15 days until day 60, the blood was extracted, obtaining serum from immunized animals for the determination of immunoglobulin levels by indirect ELISA assay. At day 90 of the study the animals were euthanized to obtain their lymphocytes, which were taken as a primary cell culture that allowed the subsequent determination of the pattern of cytokines produced by each experimental group by a "sandwich" ELISA assay. Ovaries were extracted to analyzed the presence of corpus luteum and oocytes in growth.

The results show that the HMW chitosan is able to induce a T_H2 type immune response, with high levels of IgG isotype 1 and cytokine pattern with high levels of IL-10 and IL-4. In contrast, using LMW chitosan as adjuvant, immune response was T_H1 type, with a high level of IgG isotype 2a and a pattern of cytokines with high levels of IFN- γ and IL-2. Freund's incomplete adjuvant (IFA) produced T_H1 type immune response, but with levels of IgG isotype 2a against the hormone GnRH-I, lower than the obtained using LMW chitosan as adjuvant.

Histological changes in the ovarian parenchyma suggest that vaccination with the recombinant protein GnRXG/Q generates a reduction of ovarian activity. This effect was major when using LMW chitosan as adjuvant.

INTRODUCCIÓN

En la última década ha habido un gran avance en el desarrollo de vacunas de última generación, como es el caso de los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes (Abbas *et al.*, 2008) Dichas vacunas han sido generadas gracias a los últimos desarrollos en biotecnología e ingeniería genética, para dar solución a diversas problemáticas planteadas en relación al tratamiento de enfermedades, prevención de infecciones y la reproducción.

El control de la actividad reproductiva y la fertilidad en especies silvestres, animales con fines productivos, animales de compañía y humanos, ha sido importante objeto de estudio hace ya varios años. En animales de producción la castración quirúrgica resulta una de las prácticas más comunes, debido a la necesidad de eliminar el efecto indeseado de las feromonas en la calidad de la carne y facilitar el manejo de los machos en el plantel productivo. Esta situación se da principalmente en los machos enteros que presentan agresividad y comportamiento sexual que debe ser evitado. Lo mismo ocurre en los equinos, donde la castración quirúrgica es también una herramienta bastante utilizada en ejemplares deportistas y con comportamiento agresivo. En los animales de compañía la castración quirúrgica es utilizada para el control de la población canina y felina principalmente (Turkstra y Meloen, 2006).

Frente a esta gran necesidad de controlar la fertilidad y la actividad reproductiva de las distintas especies, surgen métodos alternativos a la castración quirúrgica. Dentro de los más innovadores y llamativos se encuentra el uso de la vacunación contra la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I) presente en mamíferos. Esta vacuna induce un cese en la actividad reproductiva, mediante el bloqueo de la expresión y secreción de las hormonas Folículo estimulante (FSH) y Luteinizante (LH) desde la glándula hipófisis, inhibiendo la secreción de esteroides gonadales. El uso de esta vacuna permitiría facilitar el manejo animal, así como disminuir el estrés que significa un procedimiento quirúrgico para las distintas especies, tema que no deja de ser importante sobre la rentabilidad de un sistema productivo si se toma en cuenta que el estrés producido por dicha intervención quirúrgica disminuye el consumo de alimento, reduciendo así la ganancia diaria de peso del animal y por lo tanto el peso final de éste a la venta, una menor cantidad de carne vendida y

consecuentemente, una menor ganancia final para el productor (Turkstra y Meloen, 2006; Oliver *et al.*, 2003).

Para que una vacuna sea eficaz, debe ser capaz de generar una respuesta inmune suficiente y eficiente en el individuo vacunado, esto es logrado en el caso de las vacunas peptídicas, como la vacuna contra GnRH-I, mediante el uso de adyuvantes que posean capacidad inmunogénica (Herbet y Trigg, 2005). En este sentido, resulta de gran interés conocer el tipo de respuesta inmune inducido en el individuo vacunado al utilizar un determinado adyuvante, pudiendo diferenciarse el tipo de anticuerpos producidos en mayor cantidad y el tipo de citoquinas que predomina al usar una vacuna con diferentes estrategias adyuvantes (Seferian y Martínez, 2002; Palomo *et al.*, 2002; Kuby, 2004; Abbas *et al.*, 2008).

En la presente memoria de título se evaluó la respuesta inmune generada en ratones inmunizados con una vacuna peptídica contra la hormona GnRH-I usando tres estrategias adyuvantes diferentes, mediante la determinación del patrón de inmunoglobulinas y citoquinas producidas por esplenocitos re-estimulados *in vitro* y los cambios histológicos producidos en el tejido gonadal.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Historia y características generales de las vacunas.

En 1796 Edward Jenner dio un salto enorme en la lucha contra las enfermedades infecciosas al demostrar la capacidad que posee el ser humano de desarrollar una respuesta protectora frente a una infección, inoculando en un niño el contenido de las lesiones vesiculares de una ordeñadora que padecía una enfermedad causada por viruela en bovinos, el menor no desarrolló la viruela humana a pesar de la exposición al agente infeccioso por medio de la variolización. A esta práctica se le denominó vacunación y dio inicio a la profilaxis en la era moderna (Franco *et al.*, 2004)

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 aclarado finalmente por Frank Burneo en el año 1957 mediante la teoría de la selección clonal y con el posterior descubrimiento del papel de los linfocitos en 1965 (López *et al.*, 2004).

El desarrollo de vacunas ha sido una de las mayores contribuciones de la inmunología a la medicina (López *et al.*, 2004). La vacunación es una de las estrategias de salud pública con mayor impacto puesto que ha permitido el control e incluso la erradicación de múltiples enfermedades infectocontagiosas (Franco *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.*, 2004).

La inmunización implica el reconocimiento de una parte del antígeno que induce una respuesta inmune efectora y de memoria (Franco *et al.*, 2004).

Las vacunas proporcionan protección contra las infecciones mediante la estimulación del desarrollo de células efectoras de vida prolongada y de células de memoria. La mayoría de las que se utilizan de forma sistemática en la actualidad actúan induciendo la inmunidad humoral y se están haciendo intentos de estimular las respuestas inmunitarias celulares mediante vacunaciones (Abbas, *et al.*, 2008).

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 niveles protectivos de anticuerpos, que neutralizan virus o toxinas, inhiben la unión de los microorganismos a las células, o promueven su internalización por fagocitos (Odeón, 2002).

Las células del sistema inmune innato reconocen patrones comunes y constantes en la superficie de los microorganismos denominados MAMPs (del inglés “Microorganism-associated molecular patterns”, antes denominados PAMPs), que son reconocidos por los receptores reconocedores de patrones (PRR) que se expresan fundamentalmente en las células epiteliales y en las células presentadores de antígenos (CPA) (Moreno y Sanchez, 2003). Además, estos MAMPs, están presentes en compartimientos intracelulares, fluidos tisulares y torrente sanguíneo; algunos de éstos son el lipopolisacárido, ácido teicoico, secuencias de ADN CpG no metiladas, manosa y ARN bacteriano o viral (Moreno y Sanchez, 2003). Estos MAMPs están presentes solo en los microorganismos, lo que permite que el sistema inmune innato solo reconozca lo extraño (Corado, 2005). Los MAMPs se caracterizan por su habilidad de activar células del sistema inmune innato, principalmente células dendríticas (CD) y otras CPA. Los MAMPs interactúan con los PRR que se expresan en dichas células y entre los que se destacan la familia de los “Toll like receptor” (TLR) (Franco *et al.*, 2004).

En este sentido, es importante considerar que las vacunas que no poseen microorganismos o partes de ellos en su formulación, carecen de estos MAMPs, lo que hace que deban ser usadas junto a otras herramientas para generar una respuesta inmune en el organismo (Seferian y Martínez, 2000).

Como resultado de las limitaciones de las vacunas tradicionales, han emergido en décadas recientes nuevos avances en el desarrollo de vacunas, incluyendo vacunas de subunidades proteicas, péptidos sintéticos, conjugados glicoprotéicos y ADN (Seferian y Martínez, 2000). Mientras estos avances ofrecen múltiples ventajas, el mayor problema es que generalmente son poco inmunogénicos (Seferian y Martínez, 2000).

Las vacunas que utilizan tecnología recombinante tienen un gran potencial como antígenos en humanos y animales, pero poseen una inmunogenicidad débil, por lo tanto, la inmunización con vacunas peptídicas podría no generar una respuesta inmune significativa que reconozca la proteína nativa. En ese sentido, los adyuvantes cobran gran importancia (Seferian y Martínez, 2000). El estudio del mecanismo de acción de los adyuvantes es importante, no solo para la aplicación en la inmunopprofilaxis de enfermedades infecciosas, sino además, porque constituyen una herramienta para comprender el proceso de activación y regulación del sistema inmune innato (Franco *et al.*, 2004).

2. Vacunas y respuesta inmune.

El sistema inmune es parte de los mecanismos biológicos destinados a mantener la integridad estructural y funcional de los individuos. Sus componentes celulares y moleculares se han separado tradicionalmente en componentes naturales o innatos y componentes adquiridos o específicos. El sistema inmune innato funciona como una alerta para el sistema inmune adaptativo y puede determinar el tipo de respuesta adquirida, ya sea humoral o celular y capacita al sistema inmune adaptativo para responder apropiadamente (Palomo *et al.*, 2002). Actualmente, se sabe que la inmunidad innata y el resultante proceso inflamatorio, tienen un rol clave en el inicio de la respuesta inmune adaptativa por medio de dos puntos correlacionados: las células de la inmunidad innata reconocen e incorporan los antígenos, los 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 (Kenney y Edelman., 2004). Las señales secundarias constituyen señales coestimuladoras entregadas por interacciones específicas ligando-receptor y la expresión de citoquinas regulatorias que también pueden entregarse de esta forma (O'Hagan *et al.*, 2004). Por lo tanto, existen interconexiones entre los mediadores solubles y celulares de ambos sistemas, que interactúan aumentando la eficacia

de la respuesta, dentro de estos mediadores cabe destacar el importante rol que cumplen las citoquinas (Palomo *et al.*, 2002).

A principios de 1970, los inmunólogos habían aprendido a generar linfocitos T citotóxicos específicos para las células infectadas con un virus objetivo. Por ejemplo, cuando ratones fueron infectados con el virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCM), ellos produjeron células T citotóxicas capaces de lisar células infectadas con el virus LCM *in vitro*. Pero los linfocitos T citotóxicos fallaron en atrapar al virus LCM o a los antígenos virales libres. ¿Por qué las células T citotóxicas no fueron capaces de captar al virus libre o a los antígenos libres directamente como si lo hicieron las inmunoglobulinas? La respuesta comenzó a surgir con los experimentos clásicos de R. M. Zinkernagel y P.C. Doherty in 1974. Estos estudios demostraron que el reconocimiento antigénico de las células T es específico, no para el antígeno viral solo si no que para el antígeno viral asociado a moléculas del “Complejo mayor de histocompatibilidad” (MHC, del inglés “Major histocompatibility complex”). Dichos estudios mostraron que las células T reconocen el antígeno solo cuando es presentado en la membrana, por las moléculas MHC propias. Este atributo, llamado “Restricción MHC”, distingue entre el reconocimiento antigénico de las células B y las células T. En 1996 a Doherty y Zinkenargel se les concedió el premio Nobel por este trabajo (Kuby, 2004).

Las células dendríticas consideradas las CPA profesionales por su capacidad de activar linfocitos T, constituyen la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa (Kaisho y Akira., 2003). Las células dendríticas captan las señales de “peligro” o “alarma” y en función de su maduración, características fenotípicas, y de su localización, se comportan como una célula inmunogénica o tolerogénica. Para ello esta célula, expresa moléculas que le permiten adecuar su respuesta en función del tipo de señal que recibe: si la misma es de “peligro” o “alarma” la respuesta será de resistencia. Si la señal no es de “peligro” la respuesta será de tolerancia (Corado, 2005).

Las células dendríticas expresan TLRs y residen en diferentes órganos y tejidos periféricos donde censan el ambiente y capturan antígenos debido a su gran capacidad fagocítica.

Luego, estas migran a los órganos linfoides secundarios donde presentan los antígenos a través de las moléculas MHC para la activación de los linfocitos T (Kalinski *et al.*, 1999).

La visión tradicional del 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 las células T CD8+ citotóxicas o CD4+ auxiliaadoras (Wolf y Ploegh, 1995).

El rechazo frente a un “tejido extraño” es el resultado de una respuesta inmune a moléculas de la superficie celular, ahora llamados Antígenos de Histocompatibilidad, idea que se originó en el trabajo de Peter Gorer a mediados de 1930, en ratones. En el curso de sus estudios, él identificó cuatro grupos de genes, designados del I al IV, codificados en los antígenos de células sanguíneas. Durante el trabajo realizado entre los años 1940 y 1950 por Peter Gorer y George Snell, se estableció que los antígenos codificados a partir de estos genes designados en el grupo II, tuvieron participación en el rechazo en trasplantes, tumores y otros tejidos. Ellos llamaron a estos genes “genes de histocompatibilidad”. Así se define que el complejo MHC corresponde a un grupo de genes ubicados ordenadamente dentro de una extensión larga y continua de ADN, ubicado en el cromosoma 6 en humanos y en el cromosoma 17 en ratones (Kuby, 2004).

Las vías celulares del procesamiento del antígeno están diseñadas para generar péptidos que tienen las características estructurales necesarias para asociarse a moléculas del MHC, así como para colocar estos péptidos en la misma localización celular que las moléculas adecuadas del MHC que cuentan con hendiduras de unión a dichos péptidos. La unión del péptido a las moléculas MHC ocurre antes de la expresión en la superficie celular y es un componente integral de la biosíntesis y el ensamblaje de las moléculas del MHC. De hecho, la asociación del péptido es necesaria para el ensamblaje estable y la expresión en la superficie de las moléculas del MHC de las clases tanto I como II (Abbas *et al.*, 2008). 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 linfocitos T CD8+. 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 linfocitos T CD4+ (Heemels y Ploegh, 1995).

3. Células T_H1 y T_H2.

Las citoquinas son proteínas producidas o expresadas en forma transitoria por efecto de un estímulo, por una gran variedad de células. Gracias a ellas, las células reconocen lo que está ocurriendo a su alrededor y establecen en consecuencia una respuesta. Participan en la inmunidad innata y la reacción inflamatoria, en la inmunidad específica o adquirida y en la hematopoyesis. El patrón de citoquinas predominante determina el tipo de respuesta inmune inducida. Los linfocitos T, B y macrófagos responden a la estimulación antigénica produciendo una variedad de citoquinas las cuales pueden estimular o inhibir células efectoras de la respuesta inmune (Palomo *et al.*, 2002).

Las células T CD4+ ejercen la mayoría de sus funciones mediante la secreción de citoquinas, que actúan sobre ellas mismas de forma autocrina o modulan la respuesta de otras células de forma paracrina. Aunque los linfocitos T CD8+ también secretan citoquinas, su variedad de citoquinas generalmente es más restringida que la de los linfocitos T CD4+ (Kuby, 2004).

A través de una estimulación antigénica, las células T CD4+ vírgenes (células primarias o T_H0) se diferencian principalmente a tres subtipos celulares T_H1, T_H2 y T_H17, siendo los más descritos los subtipos T_H1 y T_H2 (células T helper de tipo 1 y de tipo 2) (Abbas *et al.*, 2008). Basándose en la producción de citoquinas, los linfocitos T CD4+ o colaboradores han sido clasificados principalmente como células T “helper” 1 (T_H1) o T “helper” 2 (T_H2). Las citoquinas producidas por los linfocitos T activados dependen de las señales que recibe del microambiente constituido por las CPA y células accesorias de la respuesta inmune (Palomo *et al.*, 2002). Los linfocitos T_H1 producen IL-2 e IFN- γ y median una respuesta inmune celular. Los linfocitos T_H2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 y median una respuesta inmune humoral (Abbas *et al.*, 2008).

En relación a la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B, las células T_H1 regulan principalmente la producción de IgG isotipo 2a en ratones, mientras que los

linfocitos T_{H2} regulan la producción de IgG isotipo 1. Además, los linfocitos T_{H2} son células probablemente colaboradoras para los linfocitos B (Palomo *et al.*, 2002).

El subtipo T_{H1} es responsable entonces de muchas funciones mediadas por células (como la hipersensibilidad retardada y la activación de células T citotóxicas) y de la producción de anticuerpos IgG promotores de la opsonización (anticuerpos que se unen con alta afinidad a los receptores Fc de los fagocitos e interactúan con el sistema del complemento). Este subtipo es asociado también a la estimulación de inflamación excesiva e injuria tisular.

El subtipo T_{H2} estimula la activación y diferenciación eosinofílica, proporciona ayuda a las células B y promueve la producción de cantidades relativamente altas de IgM e IgE y la activación principalmente de IgG isotipo 1. Este subtipo T_{H2} también actúa como apoyo en las reacciones alérgicas (Kuby, 2004).

Las diferencias en las citoquinas secretadas por las células T_{H1} y T_{H2} determinan las diferentes funciones biológicas de estos dos subtipos. Por definición, la citoquina del subtipo T_{H1} , el IFN- γ , activa macrófagos, estimulándolos a aumentar la actividad microbicida, además, regula positivamente el nivel de moléculas MHC-II y a la secreción de IL-12 que induce la diferenciación de las células T_{H0} a diferenciarse a células T_{H1} . El IFN- γ es la principal citoquina activadora de los macrófagos y tiene funciones fundamentales en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa frente a los microorganismos intracelulares. Aunque tiene cierta actividad antivírica, no es una citoquina antivírica potente, y actúa principalmente como activador de las células efectoras del sistema inmunitario (Abbas *et al.*, 2008). La secreción de IFN- γ por parte de las células T_{H1} , induce la generación de anticuerpos de clase IgG (como la IgG isotipo 2a en ratones) que apoya la fagocitosis y fijación del complemento. El IFN- γ y el TNF- α son citoquinas que median la inflamación y su secreción explica la asociación de las células T_{H1} con fenómenos inflamatorios como la hipersensibilidad retardada. Las células T_{H1} producen las citoquinas IFN- γ e IL-2 que promueven la diferenciación completa de linfocitos T citotóxicos desde los precursores CD8+. Este patrón de citoquinas hace que el subtipo T_{H1} este particularmente hecho para responder a infecciones virales y patógenos intracelulares. Finalmente, el IFN- γ inhibe la expansión de la población T_{H2} (Kuby, 2004).

La IL- 2 es un factor de crecimiento, supervivencia y diferenciación para los linfocitos T, y tiene una función importante en la regulación de las respuestas de los linfocitos T mediante

su acción sobre los linfocitos T reguladores. Debido a su capacidad de favorecer la proliferación de los linfocitos T estimulados por el antígeno, la IL-2 se denominó inicialmente el factor de crecimiento de los linfocitos T. Actúa sobre las mismas células que la sintetizan o sobre células adyacentes, es decir como factor de crecimiento y supervivencia autocrino o paracrino (Abbas *et al.*, 2008).

La secreción de IL-4 e IL-5 por parte de las células del subtipo T_H2 induce la producción de IgE y apoya el ataque mediado por eosinófilos frente a infecciones por helmintos. La IL-4 promueve el patrón de translocación de clases de IgG que no activan el complemento (por ejemplo, IgG isotipo 1 en ratones). La IL-4 también incrementa el grado en el cual las células B cambian de IgM a IgE. Este efecto en la producción de IgE se complementa con la activación y proliferación de eosinófilos por la IL-5, porque los eosinófilos poseen gran cantidad de receptores Fc que se unen a IgE. A pesar de las acciones beneficiosas de la IgE, ésta es también la clase de Ig responsable de las alergias.

La IL-10 es un inhibidor de los macrófagos y células dendríticas activadas y, de esta forma, participa en el control de las reacciones inmunitarias innatas y de la inmunidad celular, particularmente en las que participan los macrófagos (Abbas *et al.*, 2008). Se sabe IL-4, IL-5 e IL 10 suprimen la expansión de la población de células T_H1 (Kuby, 2004).

En los últimos años se ha estudiado el efecto regulatorio de la IL-10. Se sabe que la IL-10, junto a componentes de la familia TGF- β (Factor transformador de crecimiento), estimula la síntesis de células T reguladoras, lo que representa una interesante alternativa a la hora de combatir enfermedades autoinmunes, dado que éstas en conjunto, tienen un potente efecto supresor sobre los linfocitos T activados, es por esto que son consideradas citoquinas inmunoreguladoras. La adición de manera exógena de IL-10 y TGF- β suprime fuertemente la respuesta inmune antígeno específica, y esto en una persona con un cuadro infeccioso, puede contribuir a que la infección que lo afecta perdure en el tiempo (Monteleone, *et al.*, 2004; Castillo e Ibacache, 2008).

Además, IL-10, al igual que el TGF- β , inhibe la proliferación y producción de citoquinas por parte de los linfocitos T. Esta citoquina inhibiría la expresión de moléculas coestimuladoras, como las moléculas CD80, CD86 e incluso moléculas MHC-II, alterando la capacidad de las CPA para activar a los linfocitos T (Levings, *et al.*, 2002).

En relación al tipo de respuesta adaptativa predominante, está claro que las dos subpoblaciones de Linfocitos T CD4⁺ pueden regularse entre sí, una vez que un subconjunto se hace dominante, siendo difícil cambiar la respuesta al otro subgrupo. Una razón para esto es que las citoquinas inhiben la activación de la otra, es así como por ejemplo, la IL-5, producto de los linfocitos TH2, pueden inhibir el desarrollo de las células TH1, actuando sobre la célula presentadora de antígeno, mientras que el IFN- γ , producto de las células TH1, puede prevenir la activación de los linfocitos TH2. Si un subconjunto se activa primero o de preferencia en una respuesta, se puede suprimir el desarrollo del otro subgrupo. El efecto general es que ciertas respuestas están dominadas por cualquiera de las respuestas, ya sea humoral o mediada por células. Sin embargo, en muchas circunstancias, in vivo, hay una respuesta TH1 y TH2 mixta (Janeway., 2001).

Las vacunas en general y por tanto también las que utilizan tecnología recombinante, son capaces de dirigir, según las características de su formulación, al sistema inmunitario hacia una respuesta TH1 o TH2. Esto tiene gran importancia debido a que determina si la respuesta inmunitaria a la vacuna será con predominio humoral o celular. Se debe considerar también que la respuesta TH2 podría estar asociada a reacciones de hipersensibilidad debido al incremento en la producción de IgE. Por otro lado, diversos estudios sugieren que la respuesta de tipo TH1 perdura por un tiempo más prolongado que la respuesta inmunitaria de tipo TH2, lo que sería beneficioso si el objetivo es lograr una vacuna inmunogénicamente efectiva por un tiempo adecuado (Seferian y Martínez, 2000). Diversos autores, como Sefferian y Martinez (2000) sugieren que sería beneficioso obtener una combinación TH1/TH2, mediante el uso de un adyuvante adecuado que permita dicho efecto.

Algunos antígenos, como péptidos y ADN por si mismos son insuficientes inmunogénicamente para iniciar una respuesta inmune adaptativa, por lo tanto, es necesario que sean formulados como vacunas usando un adyuvante adecuado (Singh *et al.*, 1999).

4. Adyuvantes.

Los adyuvantes son parte de un grupo de compuestos estructuralmente heterogéneos, utilizados para incrementar la respuesta inmune en vacunas no replicativas. La palabra adyuvante se deriva del verbo en latín *adyuvare* que significa ayudar o auxiliar.

A mediados de 1920, partiendo de la observación de que los caballos desarrollaban abscesos en el sitio de inoculación de toxoide diftérico presentaban títulos más elevados de antitoxinas comparados con los caballos que no desarrollaban abscesos, se llegó a la conclusión de que la diferencia entre ambos grupos radicaba en la presencia de sustancias extrañas contaminantes que al ser inyectadas junto con el toxoide, aumentaban el título de anticuerpos antitoxinas; estas sustancias fueron denominadas adyuvantes inmunológicos (Franco *et al.*, 2004).

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 (Morris *et al.*, 2000).

Las sustancias adyuvantes pueden actuar incrementando la inmunogenicidad de los antígenos, aumentando la velocidad y duración de la respuesta inmune, modificando el balance T_H1/T_H2 , modulando la avidéz, especificidad, isotipo o la distribución de las subclases de anticuerpos, estimulando la inmunidad mediada por células, promoviendo la inmunidad de mucosas, incrementando la capacidad de respuesta en el sistema inmunológico inmaduro o senescente y disminuyendo la cantidad de antígeno necesaria para una respuesta inmune adecuada (Franco *et al.*, 2004).

Los adyuvantes funcionan por estimulación del sistema inmune innato, más específicamente por activación de las CPA, permiten así desarrollar una respuesta inmune específica al antígeno más duradera (Reddy *et al.*, 2006). Los adyuvantes pueden aumentar la infiltración celular y la inflamación, permitiendo particularmente el tráfico de las CPA al sitio de aplicación, promoviendo en ellas la expresión de señales coestimuladoras, moléculas MHC o la activación de vías de señalización relacionadas con la presentación antigénica (Franco *et al.*, 2004). Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes estimulan o activan a los macrófagos y estos al ser activados estimulan la respuesta inmune por un incremento en la cantidad de antígeno presentado en su membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El

macrófago libera también factores solubles, como las citoquinas, 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, éstos funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladores al tejido linfoide (Morris *et al.*, 2000).

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 (Morris *et al.*, 2000).

El adyuvante ideal sería el que genera una respuesta inmune alta, persistente y de calidad frente a un antígeno, además debe ser no tóxico, biodegradable, biocompatible y químicamente definido para su reproducción (Zaharoff *et al.*, 2006).

La importancia de la eficacia de los adyuvantes queda demostrada en el hecho de que hay muchos sistemas de adyuvantes siendo desarrollados (Seferian y Martínez, 2000).

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*, publicadas por la European Agency for Evaluation of Medicinal Products (EMA) en el 2005, los adyuvantes se clasifican según su composición en:

- Sales minerales: hidróxido y fosfato de aluminio.
- Emulsiones lipídicas: MF59, QS21, ASO2.
- Partículas: ASO4, ISCOM.
- Derivados microbiológicos: MPL.
- Inmunomoduladores humanos endógenos: HGM-CSF, IL-2, C3d.
- Vehículos inertes: partículas de oro, etc.

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

El aluminio posiblemente actúa a través de la activación de células del tipo T_H2 , con 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 posee limitaciones y desventajas, se han documentado efectos adversos en su administración subcutánea, como nódulos pruríticos subcutáneos, hipersensibilidad e inflamación granulomatosa severa (Gupta, 1998). La principal limitación de estas sales es su capacidad de inducir respuestas inmunes caracterizadas por la producción de IgE, asociada a reacciones alérgicas en humanos. Además, algunos estudios muestran que el aluminio es un adyuvante débil tanto para la inducción de anticuerpos como para la inmunidad mediada por células (Franco *et al.*, 2004). Por lo tanto, el aluminio no es efectivo para la producción de inmunidad en mucosas y puede inducir la producción de IgE (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 (CFA). El CFA es uno de los adyuvantes más poderosos pero es muy reactogénico para ser usado con fines clínicos. Ha sido utilizado por más de 50 años en la producción de antisueros en animales de investigación y es empleado cuando se disponen cantidades limitadas de antígenos o cuando éstos presentan una baja inmunogenicidad (Morris *et al.*, 1999). Sin embargo, actualmente CFA no se utiliza como adyuvante debido a su gran reactogenicidad y a las lesiones necróticas locales producidas en los animales inoculados con dicho adyuvante. Aún así, el adyuvante incompleto de Freund (IFA), la emulsión sin la micobacteria muerta, ha sido empleado en formulaciones vacunales en humanos (Aguilar y Leal., 2000).

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales

inducidos por el adyuvante. Con fines de investigación, las principales exigencias se relacionan con una elevada eficacia, un amplio espectro de aplicación, una fácil manipulación y, por supuesto, su disponibilidad comercial (Aguilar y Leal, 2000).

Además, los adyuvantes pueden seleccionarse según su mecanismo de acción, por activar en mayor medida la respuesta inmune humoral o la respuesta inmune celular. Además, distintos adyuvantes pueden inducir diferentes respuestas inmunes, por la estimulación preferente de linfocitos T CD4+ de tipo T_H1 o T_H2 (Kenney y Edelman., 2004).

Según lo postulado por Kenney y Edelman el año 2004, el efecto de los adyuvantes es fuertemente dependiente de diversos factores como:

- Naturaleza y dosis del inmunógeno.
- Naturaleza y dosis del adyuvante, transportador o vehículo de inmunización.
- Estabilidad de la formulación.
- Calendario de inmunización.
- Ruta de administración.
- Especie animal.
- Genética y otras variaciones biológicas dentro de las especies, incluyendo su estatus inmune.

La disponibilidad clínica de adyuvantes adecuados, seguros y efectivos es decisiva en el desarrollo de nuevas vacunas. En síntesis, 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 (Aguilar y Leal., 2000).

Frente a las desventajas que presentan los adyuvantes tradicionales, surgen nuevas alternativas para la formulación de vacunas en medicina humana y veterinaria, una de estas alternativas es el uso de quitosano.

5. Quitosano como Adyuvante.

El quitosano fue descubierto por Rouget en 1859, quién encontró que al tratar la quitina con una solución de hidróxido de potasio se obtenía 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. Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler, quién la denominó “*quitosano*” (Kumar *et al.*, 2004).

El quitosano es una molécula proveniente del citoesqueleto de crustáceos e insectos y también de hongos. Derivada de la desacetilación parcial de la quitina. Se caracteriza por ser no tóxico, biocompatible y biodegradable. (Porporatto *et al.*, 2007).

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 desacetilado de acetilglucosamina, está formado por copolímeros de glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (Kumar *et al.*, 2004).

Comparado con otros polisacáridos naturales, el quitosano es altamente degradable, posee una baja toxicidad y no es irritante ni alergénico para los humanos (Seferian y Martínez, 2000).

El quitosano posee ciertas características que favorecen 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).

En los últimos años, ha sido utilizado para la vacunación intranasal y oral, debido a su gran capacidad de mucoadhesividad, existiendo poca evidencia de su uso por vía parenteral. Al utilizarlo por vía oral, se ha determinado que el quitosano ayuda a mantener la homeostasis intestinal y a modular a nivel local y sistémico la inmunidad dirigida a un antígeno proteico (Porporatto *et al.*, 2007).

En relación a su uso por vía parenteral, por su característica de alta viscosidad el quitosano generaría un depósito del antígeno en el lugar de inyección y una liberación prolongada de éste desde aquel sitio, característica favorable para la vacunación parenteral. Además, se describe que al administrarlo por vía subcutánea, estimularía las respuestas inmunes celular y humoral, aumentando los niveles de anticuerpos específicos. Se afirma que los derivados

de la quitina en general, incluyendo al quitosano, son activadores potentes de macrófagos y células NK (del inglés “Natural Killer”). Se describe además, que al compararlo con otros adyuvantes clásicos como son el hidróxido de aluminio y el adyuvante incompleto de Freund (IFA), el quitosano demuestra ser similar al IFA y superior al hidróxido de aluminio (Zaharoff *et al.*, 2006).

Se ha reportado que el 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 de tipo retardada (Seferian y Martínez, 2000)

Según el estudio realizado por Seferian y Martínez (2000), al usar la molécula de quitosano como adyuvante en ratas, en el suero se obtiene una mezcla de inmunoglobulinas de las subclases IgG isotipo 2a, IgG isotipo 2b e IgG isotipo 1 como respuesta a β -galactosidasa como antígeno vacunal. Los autores concluyeron que al usar quitosano como adyuvante, éste aumenta los títulos de las inmunoglobulinas IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a, generando así una combinación de respuestas T_{H1} y T_{H2} .

El estudio de Zaharoff (2006) 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 del antígeno luego de su inoculación. Cuando el antígeno proteico fue inoculado con un tampón fosfato salino, el depósito fue solo del 9% del antígeno y permaneció en el sitio de inoculación por 8 horas, en cambio, al usar quitosano como adyuvante, más del 60% del antígeno proteico permaneció en el sitio de inyección por 7 días.

Sin embargo, en la investigación realizada por Sáenz (2009), sus resultados sugieren que la viscosidad del quitosano no sería el único factor involucrado en el aumento de la respuesta inmune asociada a una vacuna peptídica. Dicha conclusión se basó en que dentro de sus resultados se obtuvo una respuesta inmune reducida en el quitosano fosforilado de alto peso molecular en relación a la inducida por un quitosano de alto peso molecular pero no fosforilado, ambos con la misma viscosidad. Esto estaría dado por el proceso de fosforilación del quitosano, donde los grupos fosfato se unen químicamente a los carbonos

3 y 6 de las unidades de N-acetil- D-glucosamina, esta modificación del grupo químico se asociaría a la disminución en la respuesta inmune del quitosano fosforilado.

Además, en relación a la respuesta inmune inducida, en el estudio realizado por Sáenz (2009), el quitosano de alto peso molecular fue capaz de estimular una respuesta inmune efectiva de tipo T_H2 , medida por IgG isotipo 1 y el quitosano de bajo peso molecular resultó capaz de estimular un incremento significativo de los niveles de IgG isotipo 2a, concordante con una respuesta inmune tipo T_H1 .

6. Vacunación contra la hormona GnRH-I en mamíferos.

La hormona GnRH-I es altamente conservada en mamíferos machos y hembras, por lo que las tecnologías para el control de la fertilidad, basadas en esta hormona, tienen un amplio rango de aplicaciones en diferentes especies (Turkstra y Meloen, 2006).

Además del decapeptido clásico conocido como GnRH-I (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-GlyNH₂), existen 2 isómeros, encontrados principalmente en vertebrados inferiores y en mamíferos, incluyendo al humano (GnRH-II y GnRH-III). Sin embargo, su rol fisiológico aún no ha sido descrito. Por esto, se reconoce a la GnRH-I como la hormona más importante en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, por lo que se ha representado clásicamente como GnRH (Naz et al 2005).

La hormona GnRH-I es producida por neuronas hipotalámicas y es transportada por vía axonal a los pequeños vasos sanguíneos en la eminencia media, donde es liberada hacia la circulación portal-hipofisiaria. Los vasos sanguíneos están irrigando la pituitaria anterior, permitiendo que la GnRH-I alcance esta zona en altas concentraciones. En la pituitaria, la GnRH-I se une a los receptores para GnRH-I en las células gonadotrofas estimulando la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) a la circulación. El patrón pulsátil de la secreción de GnRH-I induce la liberación cíclica de LH y en un grado inferior de FSH (Turkstra y Meloen, 2006).

En los mamíferos machos, la LH estimula la síntesis y secreción de los andrógenos, como la testosterona, desde las células de Leydig en los testículos. La FSH se une a receptores específicos en las células de Sertoli para estimular los diversos factores como la proteína de unión a andrógenos (ABP) que es necesaria para mantener altas concentraciones de testosterona en los túbulos seminíferos, uniéndose a este andrógeno.

En los mamíferos hembra, la FSH induce el crecimiento folicular y posteriormente la secreción de estradiol e inhibina por las células de la granulosa. Los altos niveles de estradiol, producidos por los folículos maduros, conducen a una retroalimentación positiva en el hipotálamo durante la etapa de proestro, que causa la oleada de LH responsable de la ovulación (Turkstra y Meloen, 2006).

La vacunación contra la hormona GnRH-I es capaz de bloquear la actividad del eje hipotálamo- hipófisis- gonadal. Disminuye la producción y secreción de las hormonas FSH y LH, disminuyendo así la síntesis de esteroides gonadales. Estos efectos hacen que pueda ser utilizada como alternativa a la castración quirúrgica para el control de la fertilidad. Esto se ha descrito en animales de compañía, de campo y silvestres. En humanos se ha usado en desórdenes asociados a la fertilidad y cánceres dependientes de esteroides gonadales (Turkstra y Meloen, 2006). La inmunización contra GnRH-I resulta de especial interés en animales de producción, donde es importante el control de la fertilidad, como también la conducta sexual y agresiva (De los Reyes, 2002). En animales de campo, la vacunación contra GnRH-I, podría ser una alternativa a los métodos convencionales de castración usados para prevenir el comportamiento sexual en los animales. Se necesita urgente una alternativa a la castración quirúrgica de verracos jóvenes, ya que dicho procedimiento se realiza sin anestesia, lo que lo hace un método cruento y doloroso para los animales. En los toros y vaquillas existen problemas asociados a la pubertad: los toros muestran un comportamiento agresivo y sexual, mientras que las vaquillas desarrollan comportamiento de estro, generándose estrés y gestaciones no deseadas. En machos ovinos y caprinos, se utilizan varios métodos de castración para prevenir la disminución en la tasa de crecimiento, causada por el comportamiento sexual y agresivo. Este tipo de vacunas se ha utilizado principalmente en empresas de producción de carne de cerdo, donde los machos son castrados con el propósito de disminuir el olor sexual, que no es deseado en la carne, dado principalmente por el escatol (3-metilindol) y la androsterona (5α -androst-16-en-3 α -on) (Oliver *et al.*, 2003).

En los caninos domésticos, se requiere de métodos de castración para el control de la natalidad y de la población canina vagabunda (Turkstra y Meloen, 2006). Se ha reconocido además que en los perros, los andrógenos tienen un efecto facilitador en la expresión de la agresividad (Overall, 1997). Además, la testosterona estimula el “vagabundeo”, el marcaje

de territorio mediante orina y facilita las peleas. Aunque la castración realmente disminuye estas conductas y, pareciera ser efectiva en la disminución de la agresividad en un 60% de los perros, no resuelve todos los casos de violencia entre perros (Frank, 2007).

La hormona GnRH-I es un péptido pequeño que no induce la formación de anticuerpos por sí misma, ya que posee tan solo 10 aminoácidos. La generación de una respuesta eficaz, esto es, el cese completo de la generación de esteroides gonadales, a partir de este péptido tan pequeño resulta difícil ya que no es capaz de montar una respuesta inmune satisfactoria por sí mismo.

La vacunación exitosa contra la molécula requiere un nivel 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).

Es posible generar una disminución efectiva de la esteroidogénesis y espermatogénesis en animales inmunizados con tres formulaciones de quitosano usado como adyuvante y un péptido sin propiedades inmunogénicas, que tiene inserta una secuencia repetida en “tándem” de GnRH-I, sin transportadores moleculares o epitopos asociados a patógenos (Sáenz *et al.*, 2009).

En el laboratorio biotecnológico BIOVETEC se ha diseñado, expresado y purificado una proteína recombinante (GnRXG/Q) con una estructura primaria repetida en tándem, que incorpora la secuencia aminoacídica de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I) fusionada a una secuencia espaciadora que facilita la presentación al sistema inmune innato. Esta molécula, por tener una estructura repetida en tándem, posee un tamaño que le permite ser reconocida y presentada por las células del sistema inmune innato. Sin embargo, al ser un péptido recombinante purificado, necesita la presencia de un adyuvante para demostrar capacidad inmunogénica y obtener el efecto fisiológico deseado de bloqueo en la actividad reproductiva.

HIPÓTESIS

El uso del quitosano como adyuvante en una vacuna peptídica contra la hormona GnRH-I, permitirá gatillar una respuesta inmune efectiva mixta, vale decir, de tipo T_H1/T_H2 , determinada por el perfil de inmunoglobulinas y citoquinas expresadas en el individuo vacunado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de inmunoglobulinas, citoquinas y cambios histológicos producidos en animales inmunizados con una vacuna peptídica contra la hormona GnRH-I utilizando quitosano como adyuvante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el perfil de inmunoglobulinas producido por los animales inmunizados.
2. Determinar la expresión de citoquinas INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en linfocitos cultivados *in vitro*, extraídos desde individuos inmunizados.
3. Evaluar los cambios histológicos producidos en el parénquima ovárico de los individuos inmunizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales a utilizar.

A lo largo del período de estudio se utilizaron 12 ratones hembra de 7 semanas de edad, de la cepa Balb/c. Estos fueron mantenidos en un bioterio convencional ubicado en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. Para su mantención se siguieron las recomendaciones para manejo y cuidado de animales de laboratorio de CONICYT y del comité de bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

2. Obtención de la proteína recombinante GnRXG/Q.

2.1 Inducción de la expresión de GnRXG/Q

E. coli BL21 pLys S transformadas con el vector pQE 80L GnRXG/Q diseñado en el Laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile fueron inducidas para expresar el péptido recombinante GnRXG/Q. Esto se realizó incubando bacterias transformadas en 500 ml de caldo Luria, en agitación orbital durante 6-7 horas hasta un OD₅₉₅ de 0.6. Luego se agregó 0,1 mM de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (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 G durante 20 minutos, luego se resuspendieron durante 60 minutos en 20 ml de tampón de lisis denaturante (8 M Urea, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris pH 8,0) a 4 °C y se les aplicó ultrasonido durante 3 minutos para producir la ruptura de las bacterias y por lo tanto, la obtención de sus proteínas. Finalmente, el lisado se centrifugó a 12000 G durante 20 minutos, obteniéndose un sobrenadante purificado con las proteínas de interés.

2.2 Purificación del péptido recombinante GnRXG/Q

La purificación se realizó utilizando la técnica de cromatografía de afinidad en columnas de níquel que permiten la retención de proteínas y péptidos con cola de histidina, como es el caso de la proteína GnRXG/Q. De esta forma, 4 mL de resina Ni-NTA fueron equilibradas con 10 volúmenes de tampón de unión (20Mm NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 20-40mM Imidazol,

pH 7,4), cargados con el sobrenadante obtenido en el punto anterior conteniendo las proteínas recombinantes de interés y lavados posteriormente con 10 mL de tampón de unión. La elusión de las proteínas retenidas en la columna se realizó con tampón de elución (20mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl, 500mM Imidazol, pH 7,4).

2.3 Identificación mediante electroforesis de la proteína GnRXG/Q recombinante purificada

Las alícuotas de proteína recombinante purificada fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles de acrilamida en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) al 12,5%. Los geles fueron fijados y teñidos con una solución de metanol al 50% v/v, ácido acético al 10% v/v y azul de Coomassie al 1% p/v, a temperatura ambiente por 12 horas. Luego se destiñeron en ácido acético 5% v/v y metanol 25%.

2.4 Determinación de la concentración proteica 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 reactivo de Coomassie se une. El ensayo es colorimétrico, al aumentar la concentración de la proteína, el color de las muestras se vuelve más intenso.

Una solución de 2mg/ml de BSA (albúmina sérica bovina) fue diluida cuatro 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 para realizar la curva de referencia.

3. Formulaciones adyuvantes utilizadas.

Quitosano alto peso molecular (HMW): peso molecular de 750 KDa y desacetilación mayor al 83%.

Quitosano bajo peso molecular (LMW): peso molecular de 70 KDa y desacetilación mayor al 75%.

Adyuvante incompleto de Freund (IFA): adyuvante oleoso. Utilizado como estándar de oro.

4. Protocolo de vacunación de los ratones.

Los 12 ratones fueron distribuidos en 4 grupos de 3 individuos cada uno. Dichos grupos fueron inmunizados de la siguiente manera:

- Grupo 1: Antígeno GnRXG/Q en quitosano de bajo peso molecular (LMW).
- Grupo 2: Antígeno GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (HMW).
- Grupo 3: Antígeno GnRXG/Q en adyuvante incompleto de Freund (IFA).
- Grupo control: Inoculación solo de quitosano.

Los animales fueron inmunizados a los días 0 y 30 con 200 μ l de vacuna (que contenían 50 μ g de la proteína recombinante), con las formulaciones descritas, mediante inyección subcutánea en la zona lumbar utilizando jeringas de 1 ml con aguja fina.

5. Preparación de las vacunas.

Se mezclaron volúmenes iguales de la proteína recombinante GnRXG/Q suspendida en tampón de elución con cada formulación de adyuvante al 1% (400 μ l del adyuvante correspondiente para cada grupo con 400 μ l de la proteína), esta mezcla se sometió a agitación en vórtex por 15 segundos para ser posteriormente inoculada a los ratones. En el caso del adyuvante incompleto de Freund, debido a su consistencia oleosa, se debe formar una emulsión al mezclarlo con la proteína, esta solución fue homogenizada usando una jeringa, a través de la cual se hizo pasar la mezcla repetidas veces hasta formar una emulsión completamente homogénea.

6. Esquema experimental.

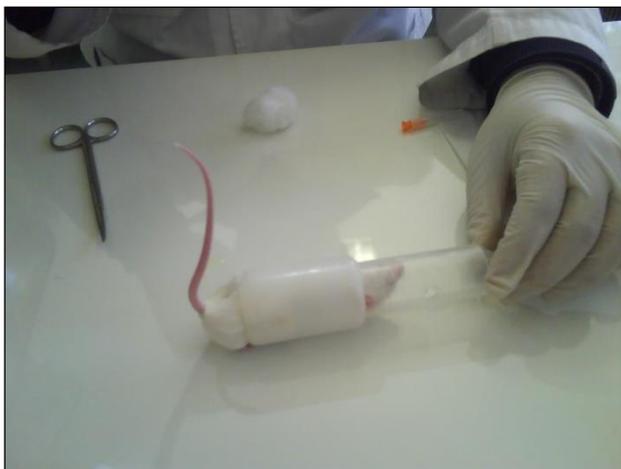
- 1) Tiempo 0 (día 1): Se extrajeron 50 μ l de sangre a cada ratón desde la vena safena externa, para la obtención de sus sueros para la medición basal de anticuerpos contra GnRXG/Q y GnRH-I nativa, mediante un ensayo de ELISA indirecto. Se realizó la inoculación de 200 μ l de la vacuna correspondiente para cada grupo, vía subcutánea en el área lumbar.
- 2) Tiempo 1 (día 15): Extracción de 50 μ l de sangre a cada ratón para la medición de

anticuerpos mediante ELISA indirecto.

- 3) Tiempo 2 (día 30): Extracción de 50 µl de sangre a cada ratón para la medición de anticuerpos mediante ELISA indirecto.
Inoculación de 200 µl de la vacuna correspondiente para cada grupo, vía subcutánea en el área lumbar (Booster).
- 4) Tiempo 3 (día 45): Extracción de 50 µl de sangre a cada ratón para la medición de anticuerpos mediante ELISA indirecto.
- 5) Tiempo 4 (día 60): Extracción de 50 µl de sangre a cada ratón para la medición de anticuerpos mediante ELISA indirecto.
- 6) Tiempo 5 (día 75): Extracción de 50 µl de sangre a cada ratón para la medición de anticuerpos mediante ELISA indirecto.
- 7) Tiempo 6 (día 90): Se realizó el sacrificio de los ratones utilizando CO₂ por vía inhalatoria, luego se llevó a cabo la esplenectomía para comenzar el aislamiento y cultivo primario de linfocitos y la ovariectomía para el posterior estudio histológico.

7. Determinación de los niveles de IgG total, IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a desde el suero de los animales inmunizados, mediante ELISA indirecto.

Cada 15 días desde la primera vacunación, se extrajeron 50 µl de sangre desde la vena safena de los animales. No fue necesario anestesiarse a los animales, solo se utilizó un adecuado método de sujeción usando un tubo de 50ml con orificios para permitir su respiración, en el cuál se ingresaba al animal, dejando la extremidad a puncionar fuera del tubo, tal como se muestra en la fotografía 1:



Fotografía 1: *Método de sujeción de los ratones para ser vacunados.*

La sangre obtenida de los animales fue recolectada en tubos de microcentrifugación con un sistema capilar en su interior, que permite la obtención de la sangre por capilaridad al puncionar suavemente la vena del animal. Previa formación y retracción del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 20 °C a una velocidad de 10.000 G durante 5 minutos. Luego de la centrifugación el suero fue separado y guardado en tubos de microcentrifugación limpios a -80 °C para la posterior realización de ensayos de ELISA indirecto:

- 1) Se usaron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc) de alta capacidad de unión. Cada pocillo de la placa fue cubierto con 50 µl de la proteína GnRXG/Q diluida en tampón de recubrimiento (0,15 M Na₂CO₃, 0,35 M NaHCO₃, pH 9,6) a una concentración de 40 µg/mL e incubados toda la noche a 4°C.
- 2) Los pocillos fueron lavados 3 veces con 200 µl tampón de lavado (1x PBS, 0,05% Tween-20) y bloqueados con 200 µl de tampón de bloqueo (solución BSA al 1%) y dejados durante la noche a 4°C.
- 3) Los pocillos fueron lavados 3 veces con tampón de lavado y se les aplicó a cada uno y en duplicado, 100 µl de los sueros a evaluar, como anticuerpo primario. Los sueros fueron preparados a una concentración de 1/1000 en solución BSA al 0,1% y dejados incubar por 2 horas a 37 °C.

- 4) Se lavó la placa 5 veces con tampón de lavado y se agregaron 100 µl por pocillo del anticuerpo secundario anti-IgG, anti-IgG1 o anti-IgG2a (Jackson ImmunoResearch), según sea el caso que contiene la enzima HRP (del inglés “horseradish peroxidase”). Este se usó a una concentración de 1/5000 en diluyente BSA 0,1%. Se dejó incubar la placa por 45 minutos a 37°C.
- 5) Se lavaron los pocillos 5 veces y se agregaron 100 µl por pocillo de la “solución sustrato TMB” (tetrametil benzidina), que contiene el sustrato peróxido de hidrógeno que actúa con la enzima HRP del anticuerpo secundario produciéndose un proceso de oxidación del sustrato TMB, que hace que los pocillos que poseen el anticuerpo buscado cambien de color según su concentración. Esto se incubó a 37 °C por 15 minutos.
- 6) Se detuvo la reacción con 100 µl de tampón de detención (50% agua destilada y 50% de ácido sulfúrico 2 mol/L) por pocillo.
- 7) Finalmente, la reacción fue leída en un lector de ELISA, a una densidad óptica de 450nm, para el posterior análisis de los resultados.

Para la realización del ELISA para medición de anticuerpos contra la hormona GnRH-I nativa, se realizó el mismo procedimiento, pero cubriendo al principio los pocillos con la proteína GnRH-I, en vez de utilizar la proteína recombinante.

8. Extracción y separación de los linfocitos desde esplenocitos obtenidos de los animales previamente inmunizados.

8.1 Esplenectomía:

Los animales fueron sacrificados con CO₂ administrado por vía inhalatoria. Luego fueron embebidos en etanol 70% y ubicados en un mesón limpio dentro de un gabinete de bioseguridad en decúbito dorsal para empapar nuevamente su abdomen con etanol al 70 %. Se realizó una incisión en la zona ventral del animal con la ayuda de tijeras quirúrgicas y bisturí. Posteriormente la piel se arrastró hacia atrás exponiendo el peritoneo. Con tijeras se hizo una incisión de alrededor 2 cm en el saco peritoneal, en la misma dirección que la incisión en la piel. Luego se procedió a extraer útero y ovarios para el posterior estudio histológico. Posteriormente, se procedió ampliando la incisión hacia el lado izquierdo del animal para tomar el bazo utilizando una pinza estéril para sacarlo a través de la incisión en el saco peritoneal. Mientras se sostenía el bazo con una pinza, el tejido conectivo debió disgregarse utilizando tijeras quirúrgicas.

8.2 Preparación de la suspensión de células esplénicas:

Cada bazo fue puesto cuidadosamente sobre una placa petri estéril para ser macerado y disgregado con ayuda de un bisturí y el émbolo de una jeringa, además, se fueron agregando lentamente 2 mL de solución salina balanceada, lo que permitió finalmente separar el tejido esplénico de los trozos de cápsula esplénica, para así quedarnos con alrededor de 2 mL de muestra con las células esplénicas totales.

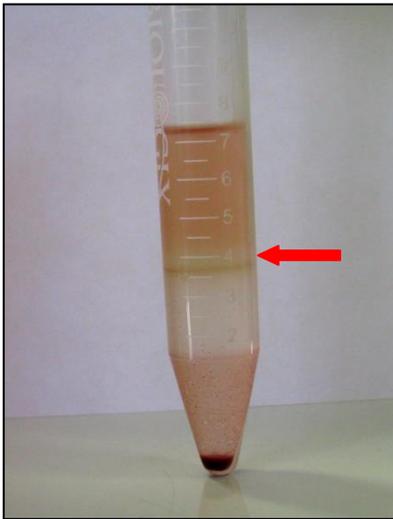
8.3 Aislamiento de Linfocitos desde las células esplénicas totales:

Para esta etapa se utilizó Ficoll- Paque Plus (GE healthcare) antes de comenzar se debió invertir la botella de Ficoll varias veces para la homogeneización del producto. Posteriormente se agregaron 3 mL de Ficoll en tubos de 15 mL, luego se agregaron al tubo 2 mL de muestra, esto se realizó con extremo cuidado, para que la muestra quede sobre el Ficoll, sin mezclarse con él, tal como se observa en la fotografía 2:



Fotografía 2: *Tubo con muestra de esplenocitos totales sobre el Ficoll, formando dos fases.*

Luego, los tubos fueron centrifugados a 400 G por 35 minutos a 19 °C. Después de la centrifugación se obtienen en el tubo diferentes capas de células, arriba se encuentra el plasma, luego en la capa central están los linfocitos y finalmente al fondo del tubo los granulocitos, como se observa en la fotografía 3:



Fotografía 3: *Tubos con Ficoll y la muestra de esplenocitos totales después de la centrifugación. Se observan los distintos tipos celulares obtenidos ubicados en diferentes fases dentro del tubo. La flecha roja indica la fase de Linfocitos.*

Los linfocitos fueron extraídos cuidadosamente desde la fase media del tubo, tomando las precauciones necesarias para no contaminar la muestra con plasma ni con granulocitos. Luego, los linfocitos fueron puestos en un tubo limpio y se les agregó 6 mL de solución salina balanceada, mezclando suavemente con una pipeta. Posteriormente, estos tubos son

centrifugados a 400 G por 10 minutos. De dicha centrifugación se obtuvo un sedimento en el que se encuentran los linfocitos que fueron resuspendidos en 600 µl de medio de cultivo completo RPMI (10% de suero fetal bovino, 2 nM de l-glutamina, 1mM de piruvato de sodio y 2,5 g/L de bicarbonato de sodio), poniendo en cada pocillo de la placa de cultivo, 200 µl de esta solución.

9. Cultivo Primario de las células linfocitarias.

Los linfocitos fueron cultivados en placas de cultivo celular de 12 pocillos (Nunc) en medio completo RPMI a 37 °C, 5% de CO₂ por 24 horas.

Al día siguiente, los linfocitos fueron re-estimulados por 3 días seguidos con 50 µg/mL del antígeno recombinante GnRXG/Q y tampón de elución para los controles negativos (no re-estimulados). Luego de esto, el medio de cultivo con las citoquinas expresadas fue recolectado y guardado a -80 °C hasta su determinación. Algunos de los pocillos fueron utilizados para medir proliferación celular usando por pocillo 1 mg de MTT en 200 µl de PBS.

10. Determinación de los niveles de citoquinas IFN γ , IL-2, IL-4 e IL-10 desde cultivos primarios inducidos con el péptido *in vitro*.

- 1) Se realizó un ELISA tipo “sándwich” de 96 pocillos. Cada pocillo fue recubierto con 100 µL de anticuerpo de captura suspendido en tampón de recubrimiento (en una relación 1:250). La placa fue incubada toda la noche a 4°C.
- 2) Los pocillos fueron lavados 3 veces con 250 µL de tampón de lavado (1x PBS, 0,05% Tween-20) por pocillo. Removiéndose luego los residuos de tampón con papel absorbente. Se realizó el bloqueo de los pocillos con 200 µL de “Assay diluent” (PBS con 10% suero fetal bovino, pH 7.0), utilizado como tampón de bloqueo. La placa se incubó por una hora a temperatura ambiente y se realizaron nuevamente los 5 lavados.
- 3) Se agregaron 100 µL por pocillo de los estándares o de las muestras con los linfocitos obtenidos desde el cultivo primario, según corresponda, ambos

preparados y suspendidos en “Assay diluent”. Esto se incubó 2 horas a temperatura ambiente.

- 4) Se lavaron 5 veces los pocillos y se agregaron 100 μL de la solución de detección constituida por el Anticuerpo de detección y la enzima SAV-HRP (“Streptavidin-horseradish peroxidase”) suspendidos en “Assay diluent”. La placa fue incubada por una hora a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 7 lavados de los pocillos, dejando la placa en rotación orbital durante 1 minuto entre cada lavado.
- 5) Se agregaron 100 μL de la “solución sustrato TMB” (tetrametil benzidina) a cada pocillo. Se incubó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para luego agregar 100 μL por pocillo de tampón de detención (50% agua destilada y 50% de ácido sulfúrico 2mol/L).
- 6) Finalmente la placa se leyó en un lector de ELISA a 450 nm.

11. Determinación de la proliferación celular de las células cultivadas.

Se realizó un ensayo colorimétrico rápido para determinar la proliferación de los linfocitos cultivados, utilizando el colorante 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT).

- 1) En la placa de cultivo, fueron agregados a cada pocillo en el que se midió proliferación celular, 1mg de MTT disuelto en 200 μL de PBS.
- 2) Los pocillos fueron incubados por 3 horas en la estufa de cultivo (37 °C, 5% CO_2).
- 3) El contenido de cada pocillo fue centrifugado a 2500 G por 10 minutos a 15 °C.
- 4) El sedimento obtenido fue resuspendido en 250 μL de tampón de lisis y se dejó lisar por 5 minutos.
- 5) En una placa de ELISA de 96 pocillos, fueron puestos 125 μL de las células lisadas. Los pocillos “blanco o control” se dejaron solo con tampón de lisis.
- 6) La placa fue leída a 550 nm y 655 nm, para realizar el análisis de los resultados.

12. Estudio histológico de los ovarios de los individuos inmunizados:

El día 90 del ensayo, los individuos inmunizados fueron sacrificados utilizando CO₂ por vía inhalatoria y luego, se realizó la ovariectomía a cada uno de los ratones para realizar el análisis histológico de los ovarios. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10%, teñidas con Hematoxilina-Eosina, observadas y fotografiadas utilizando un microscopio Nikon, modelo Eclipse E400, con cámara Nikon Digital Sight DS-5MC incluida. El Software usado para el análisis de las imágenes obtenidas fue Nis-Elements BR

13. Análisis estadístico de los datos:

Las diferencias y significancias estadísticas se determinaron mediante la prueba de T de Student. Valores con un $p \leq 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

1. Identificación de la proteína GnRXG/Q recombinante por electroforesis.

Alícuotas de la proteína recombinante purificada fueron separadas mediante electroforesis monodimensional en geles de acrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12,5%. Como muestra la figura número 1, aproximadamente a la altura de los 30 kDa se observó una banda correspondiente a la proteína recombinante GnRXG/Q.

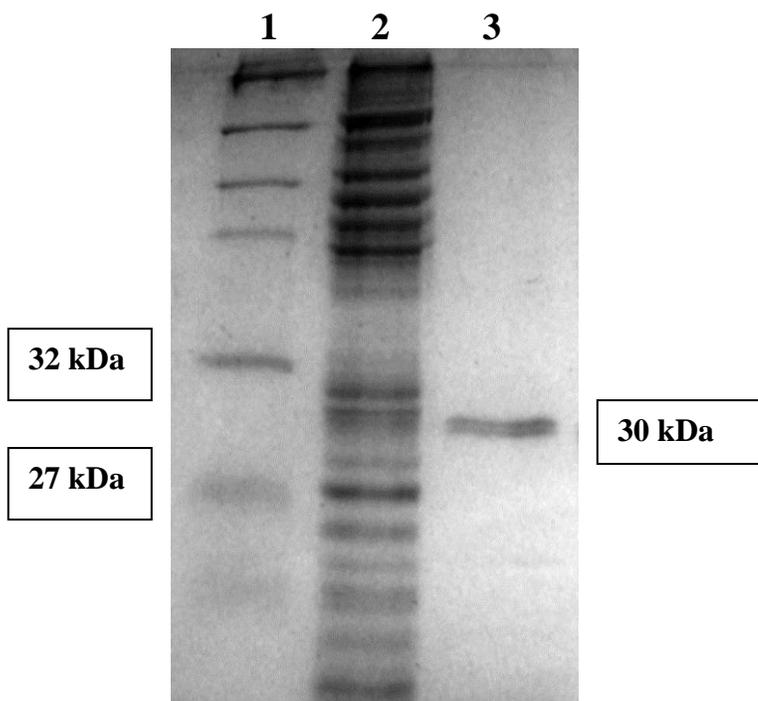


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE al 12,5% que muestra la expresión de la proteína recombinante GnRXG/Q. Línea 1: marcador de peso molecular, Línea 2: extracto total proteico de lisis bacteriana, Línea 3: proteína recombinante GnRXG/Q purificada mediante cromatografía de afinidad.

2. Niveles de IgG total, IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a anti-GnRXG/Q desde el suero de los animales inmunizados.

Para la determinación de los niveles de inmunoglobulinas en los animales inmunizados se realizó una prueba de ELISA indirecto utilizando el suero de dichos individuos. Como se muestra en los siguientes gráficos, la inmunización con la proteína recombinante GnRXG/Q indujo un alza importante en la producción de inmunoglobulinas IgG, IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a, esta respuesta fue notoria después de la primera inoculación y se mantuvo bastante estable en los días posteriores del estudio.

En la figura 2, se observa lo que ocurre al inmunizar con la proteína GnRXG/Q usando quitosano de alto peso molecular (HMW) como adyuvante y se grafica también lo que ocurre en el grupo control (no inmunizado). A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$), dichas diferencias se mantuvieron a lo largo del estudio.

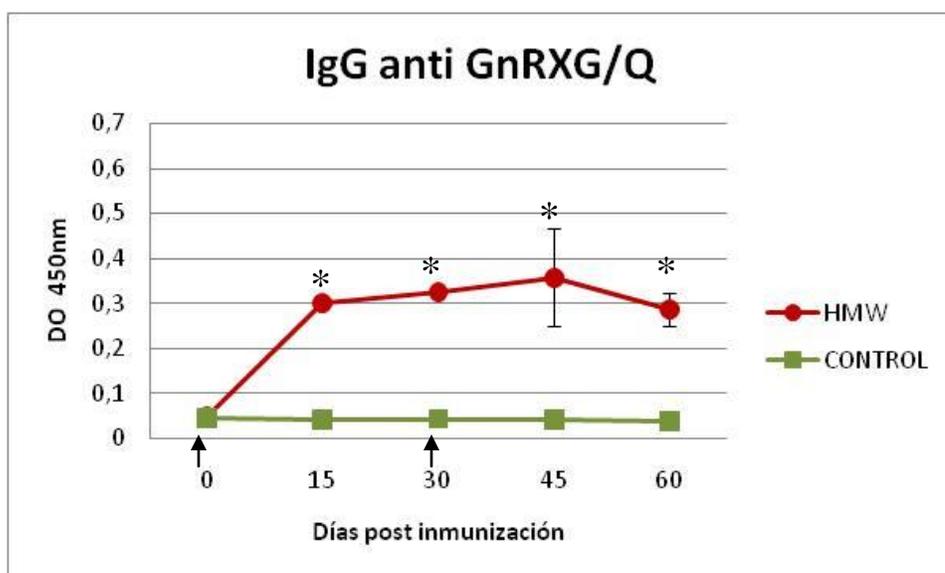


Figura 2. Respuesta de IgG contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano de alto peso molecular como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano HMW (●) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$).

En la figura 3 se observan los niveles de IgG total en los individuos inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q usando quitosano de bajo peso molecular (LMW) como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$).

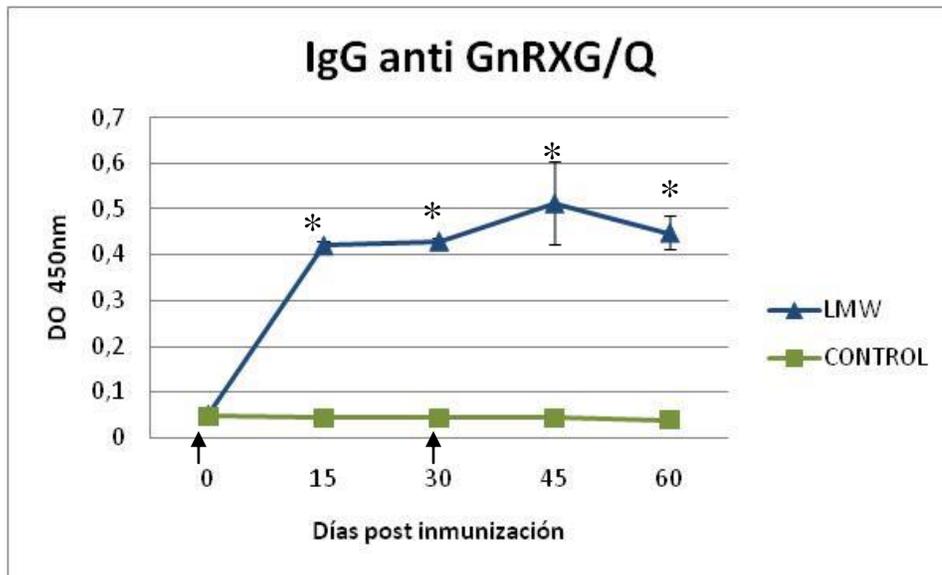


Figura 3. Respuesta de IgG contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano de bajo peso molecular (LMW) como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano LMW (▲) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 4 se observan los niveles de IgG total en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando el adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observó un alza paulatina de los niveles de IgG hasta el día 60 de estudio, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$).

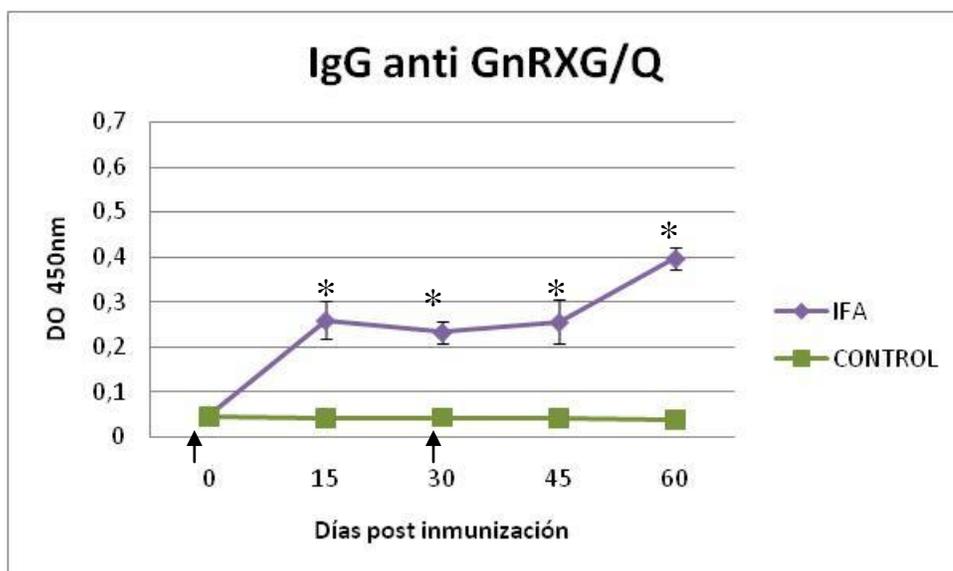


Figura 4. Respuesta de IgG contra la proteína GnRXG/Q utilizando el adyuvante incompleto de Freund (IFA). Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en IFA (♦) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 5 se observan los niveles de IgG isotipo 1 en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando quitosano HMW como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con quitosano HMW fue aproximadamente 12,7 veces mayor que en el grupo control.

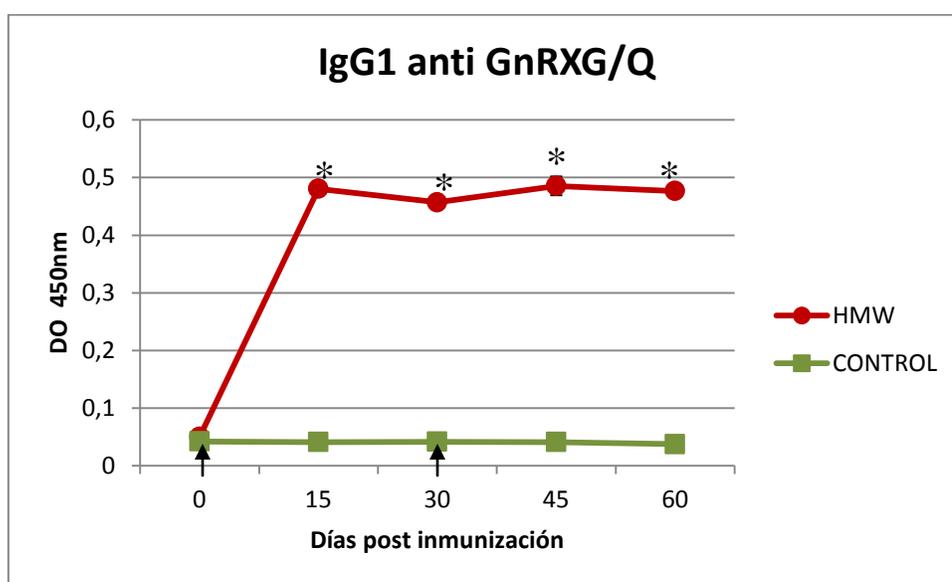


Figura 5. Respuesta de IgG isotipo 1 contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano de alto peso molecular como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano HMW (●) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 6 se observan los niveles de IgG isotipo 1 en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando quitosano LMW como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con quitosano LMW fue aproximadamente 9,6 veces mayor que en el grupo control.

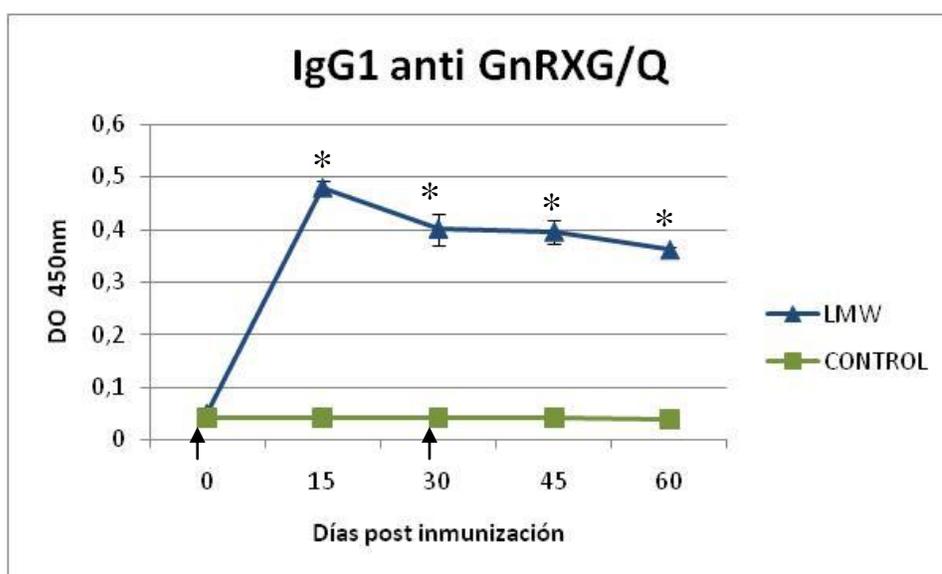


Figura 6. Respuesta de IgG isotipo 1 contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano LMW como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano LMW (▲) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$).

En la figura 7 se observan los niveles de IgG isotipo 1 en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando IFA como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con IFA fue aproximadamente 7,2 veces mayor que en el grupo control.

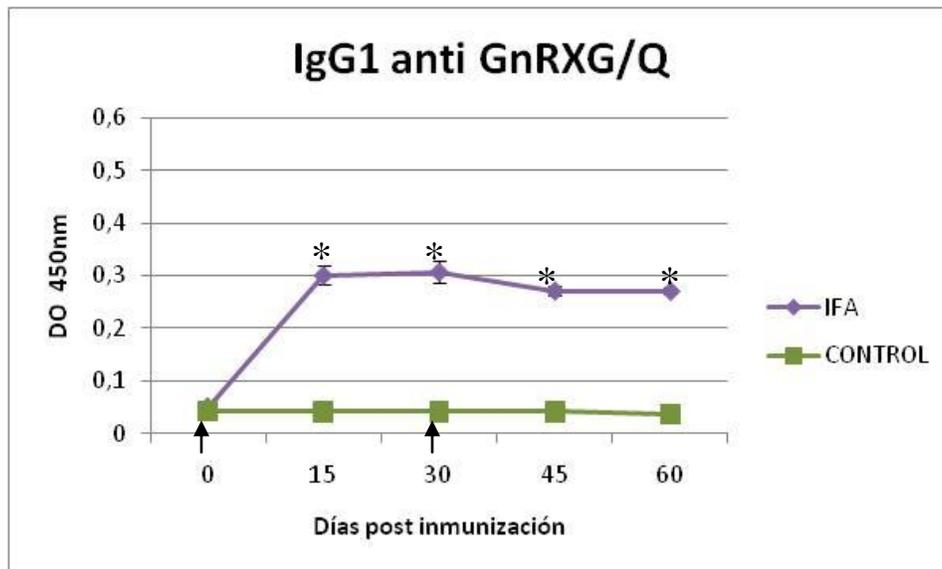


Figura 7. Respuesta de IgG isotipo 1 contra la proteína GnRXG/Q utilizando IFA como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en IFA (◆) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 8 se observan los niveles de IgG isotipo 2a en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando quitosano HMW como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con HMW fue aproximadamente 10,1 veces mayor que en el grupo control.

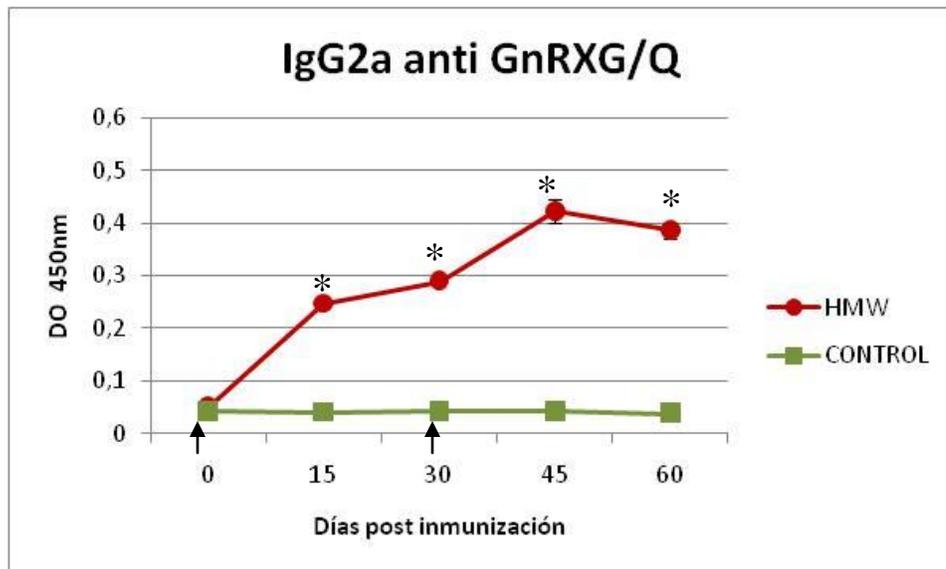


Figura 8. Respuesta de IgG isotipo 2a contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano HMW como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano HMW (●) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 9 se observan los niveles de IgG isotipo 2a en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando quitosano LMW como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con LMW fue aproximadamente 12,5 veces mayor que en el grupo control.

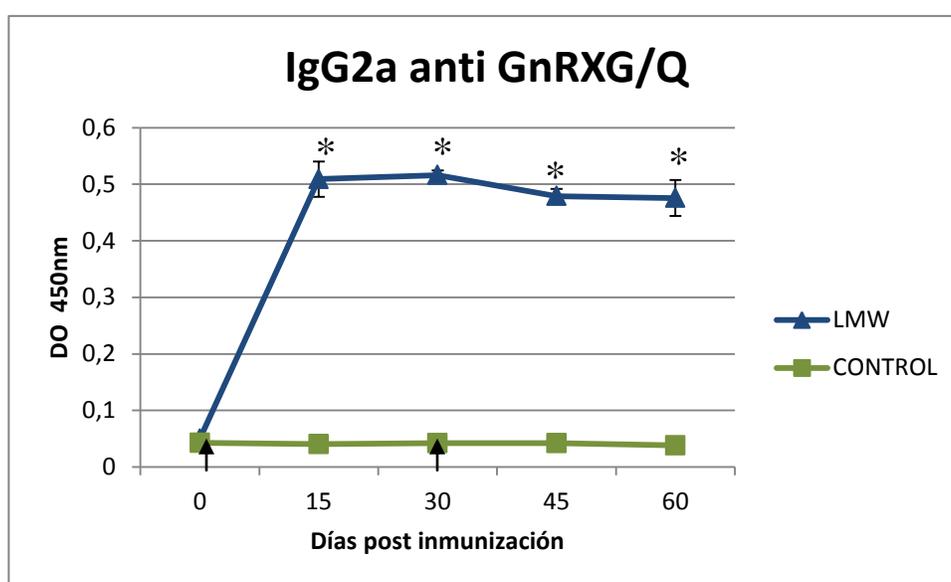


Figura 9. Respuesta de IgG isotipo 2a contra la proteína GnRXG/Q utilizando quitosano de bajo peso molecular (LMW) como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano LMW (▲) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En la figura 10 se observan los niveles de IgG isotipo 2a en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q usando IFA como adyuvante, comparados con el grupo control. A partir del día 15 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p \leq 0.01$). Al día 60, la DO en el grupo con IFA fue aproximadamente 15,5 veces mayor que en el grupo control.

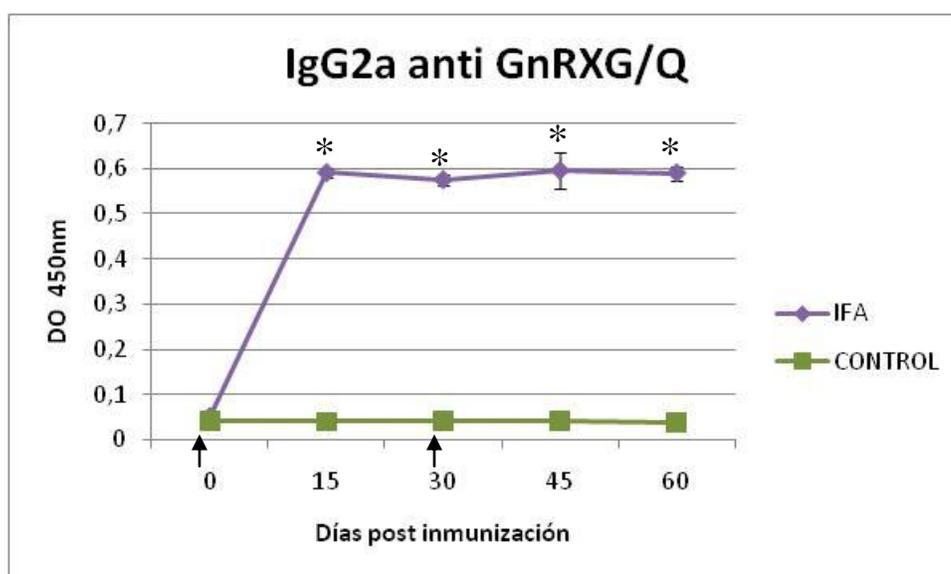


Figura 10. Respuesta de IgG isotipo 2a contra la proteína GnRXG/Q utilizando IFA como adyuvante. Los individuos del grupo experimental fueron inmunizados en los días 0 y 30 del estudio con la proteína recombinante GnRXG/Q en IFA (♦) (grupo experimental) y los individuos control no fueron inmunizados durante el estudio (■) (grupo control). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo ($n=3$). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

En las figuras 11 A y B se observan los niveles de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a respectivamente, en los individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q, con las tres formulaciones adyuvantes, como se puede observar en el gráfico A, los valores de IgG isotipo 1 son similares en el caso del quitosano HMW y LMW, pero son bastante menores en el caso de IFA. En el caso de los niveles de IgG2a, los niveles resultaron mayores en IFA, seguido del quitosano LMW y más abajo se encontraron los niveles del quitosano HMW, tal como se muestra en la figura.

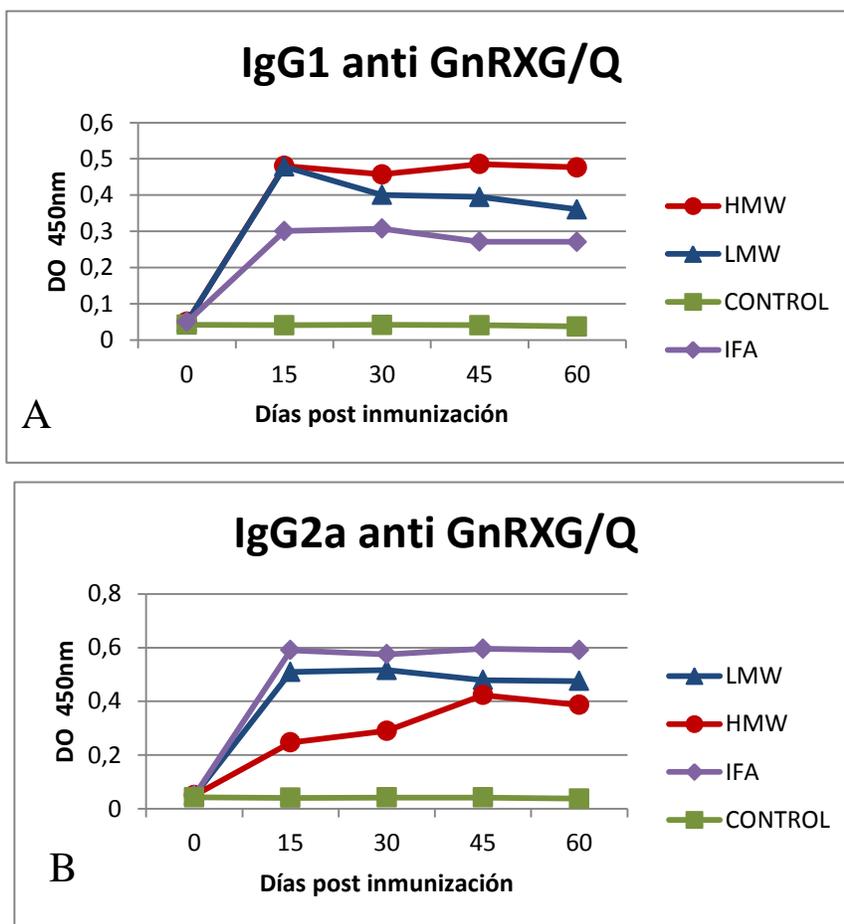


Figura 11. Comparación de los niveles de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a producidos por los animales inmunizados con las tres formulaciones adyuvantes utilizadas y en los animales control. Se utilizó un pool de sueros de cada grupo para las determinaciones (n=3). A: Niveles de IgG isotipo 1 en los animales inmunizados con las tres formulaciones adyuvantes distintas (quitosano HMW, quitosano LMW e IFA).

B: Niveles de IgG isotipo 2a en los animales inmunizados con las tres formulaciones adyuvantes distintas (quitosano HMW, quitosano LMW e IFA). Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica.

En las figuras 12 A y B se representa la producción de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a contra la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I nativa) en los individuos inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres formulaciones adyuvantes, al día 60 de estudio. En todos los grupos experimentales se observaron diferencias significativas en la producción de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a en relación al control ($p \leq 0.01$).

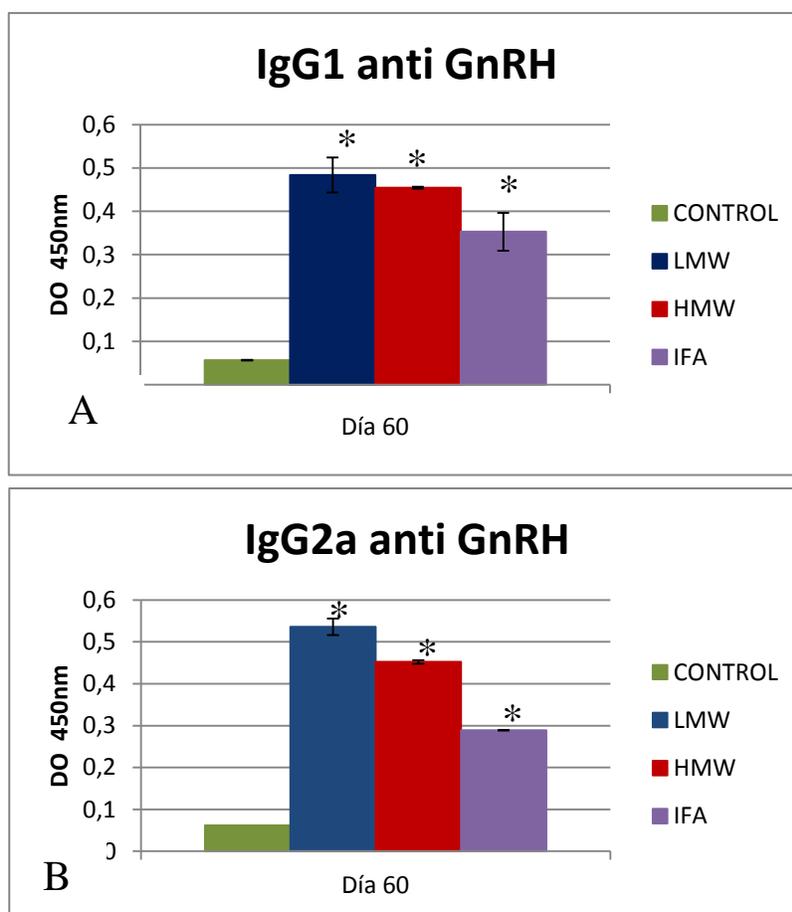


Figura 12. Determinación de los niveles de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a anti GnRH-I al día 60 de estudio. Se utilizó un pool de sueros de cada grupo experimental ($n=3$). A: Niveles de IgG isotipo 1 contra GnRH-I en individuos inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (HMW), quitosano de bajo peso molecular (LMW) y en adyuvante incompleto de Freund (IFA,) en relación al grupo control, al día 60 del estudio. B: Niveles de IgG isotipo 2a contra GnRH-I en individuos inmunizados con la proteína GnRXG/Q en quitosano de alto peso molecular (HMW), quitosano de bajo peso molecular (LMW) y en adyuvante incompleto de Freund (IFA), en relación al control, al día 60 del estudio. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica \pm DS. Los asteriscos indican diferencias significativas con el control ($*$) $p \leq 0.01$.

En las figuras 13 A y B se representa la relación o radio existente entre los niveles de inmunoglobulinas IgG isotipo 2a e IgG isotipo 1 contra la proteína recombinante GnRXG/Q y contra la hormona nativa GnRH-I respectivamente, producidas en los individuos inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q. Dicha relación permite establecer el predominio celular presente en la respuesta inmune generada por la vacunación, para así clasificar dicha respuesta como principalmente de tipo T_H1 o de tipo T_H2 . En los gráficos se evidencia que la relación IgG2a/IgG1 anti GnRXG/Q y anti GnRH-I son similares en el caso del quitosano HMW y en el quitosano LMW, en cambio en el caso del IFA, la relación es muy diferente para GnRXG/Q y para GnRH-I, dicha relación es mucho menor cuando se consideran las IgG isotipo 2a e IgG isotipo 1 anti GnRH-I.

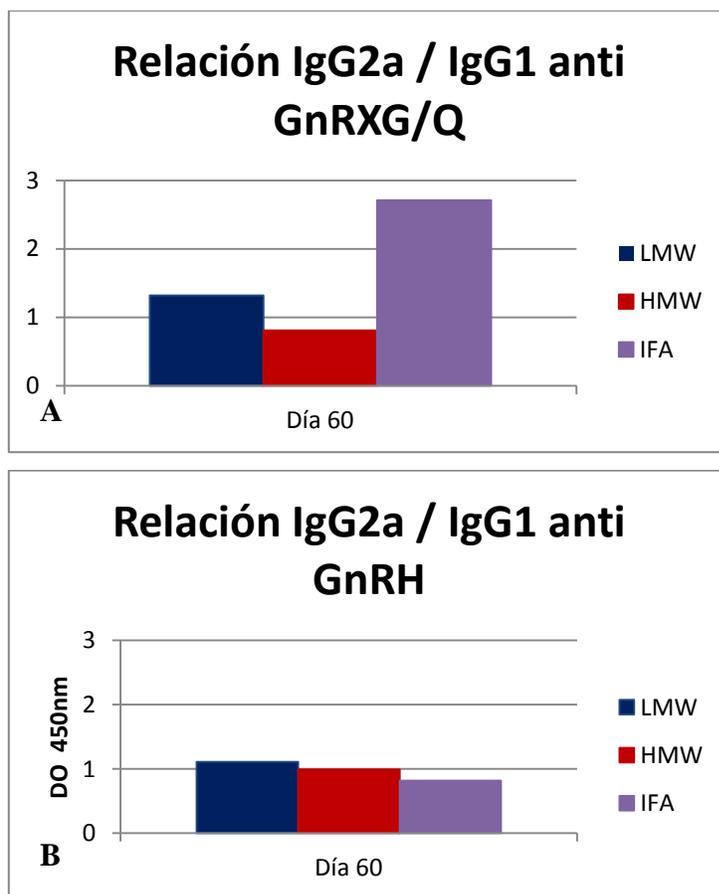


Figura 13. Tasa IgG2a/IgG1 anti GnRXG/Q y anti GnRH-I producida por los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q al día 60 del estudio. Se utilizó un pool de sueros de cada grupo experimental (n=3). A: Relación IgG2a/IgG1 anti GnRXG/Q producida por lo animales inmunizados con la proteína recombinante al día 60 del estudio. B: Relación IgG2a/IgG1 anti GnRH-I producida por los animales inmunizados con la

proteína recombinante al día 60 del estudio. Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica.

3. Proliferación celular de las células cultivadas.

Para determinar la proliferación de los linfocitos cultivados se realizó un ensayo colorimétrico, utilizando el colorante 3-(4,5 dimetiliazol-2-il) 2,5 bromuro difeniltetrazolio (MTT).

Los datos obtenidos en este ensayo fueron utilizados para el cálculo del número de linfocitos de cada muestra grupal, a través de la interpolación de datos, utilizando la ecuación lineal obtenida a partir de una curva de linfocitos, tal como se observa en la figura 14.

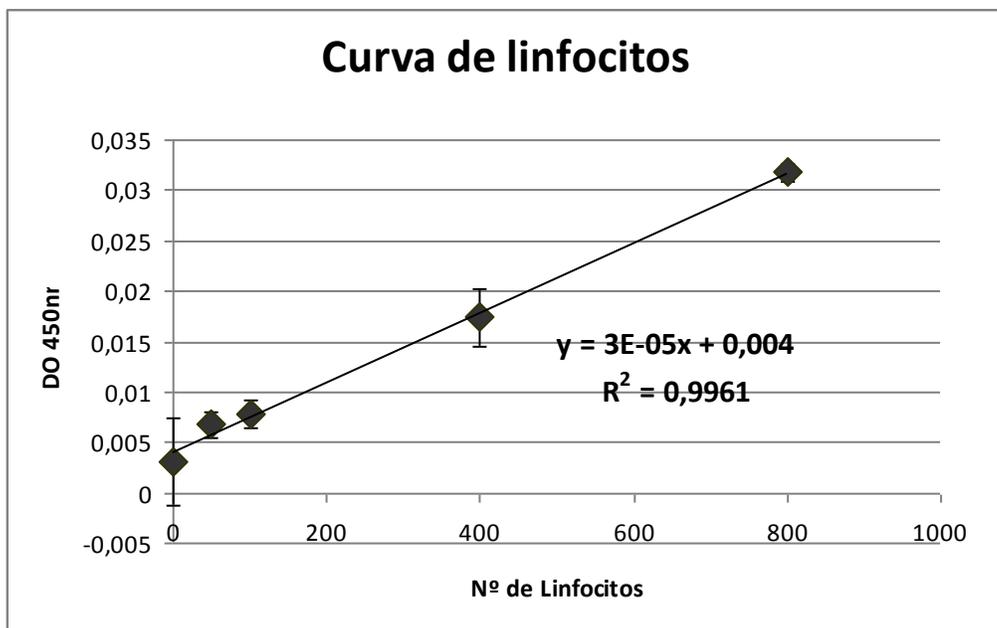


Figura 14. Curva de linfocitos donde se relacionan los distintos valores de densidad óptica obtenidos en los ensayos de proliferación celular, con un determinado número de células linfocitarias.

En relación a la proliferación linfocitaria y al número de linfocitos finales, las diferencias fueron significativas ($p \leq 0.05$) entre cada grupo experimental y su grupo control.

En las figuras 15 se muestra el número de linfocitos cultivados, obtenidos desde los individuos inmunizados con las tres formulaciones adyuvantes utilizadas. La diferencia entre los grupos HMW y LMW fue estadísticamente significativa, obteniéndose un $p \leq 0.05$. Las diferencias entre dichos grupos (HMW y LMW) no fueron estadísticamente significativas en relación al grupo IFA.

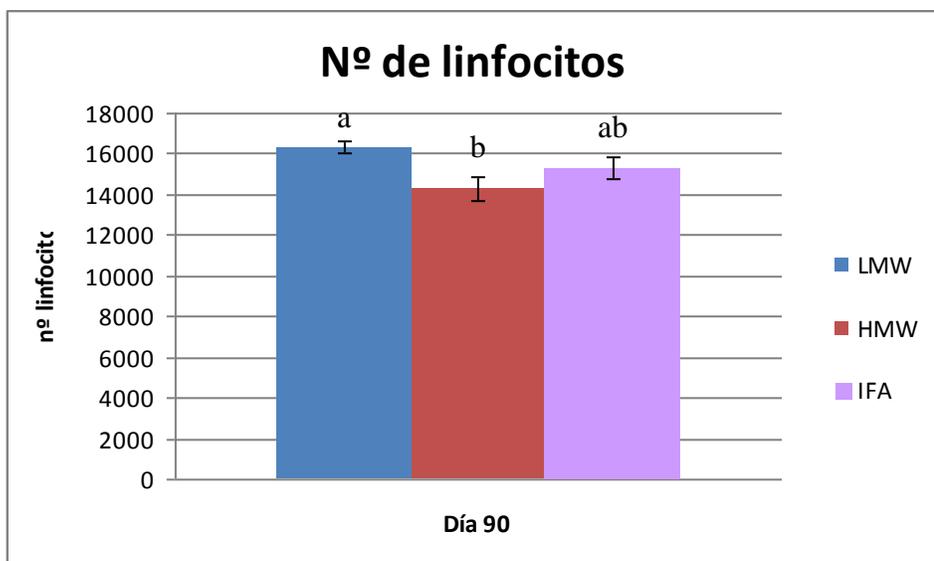


Figura 15. Número de linfocitos obtenidos del cultivo celular de células linfocitarias provenientes de los animales inmunizados con las tres estrategias adyuvantes y re-estimuladas con el antígeno recombinante GnRXG/Q. Los datos están expresados en n° total de linfocitos \pm DS. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

4. Niveles de citoquinas IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-2 desde cultivos primarios inducidos la proteína recombinante *in vitro*.

Se realizó un ELISA tipo “sándwich” de las citoquinas secretadas al medio de cultivo por los linfocitos reestimulados con la proteína GnRXG/Q en el cultivo celular. Los linfocitos de cada individuo inmunizado fueron divididos en dos pocillos distintos (cada uno en duplicado) para generar dos grupos diferentes, uno experimental en el cual los linfocitos fueron reestimulados con la proteína GnRXG/Q y otro grupo control donde no hubo reestimulación y se agregó solo PBS.

Para poder comparar la producción de citoquinas (pg/ML) , se realizó la corrección de la producción de citoquinas en cada grupo, con el número de linfocitos obtenidos a partir de la proliferación linfocitaria de cada uno de ellos.

En todos los casos, la producción de citoquinas fue mayor en el grupo experimental inducido con la proteína recombinante GnRXG/Q, que en el grupo control, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$).

En las figuras 16, 17, 18 y 19 se muestran los valores de producción de las citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4, obtenidos a partir del cultivo primario de linfocitos de los animales inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes (quitosano HMW, quitosano LMW e IFA).

En la figura 16 se muestra la producción de IFN- γ en los tres grupos experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de quitosano HMW y quitosano LMW ($p \leq 0.01$) y, entre los grupos quitosano HMW e IFA ($p \leq 0.01$). Por el contrario, las diferencias entre los grupos IFA y quitosano LMW no resultaron estadísticamente significativas.

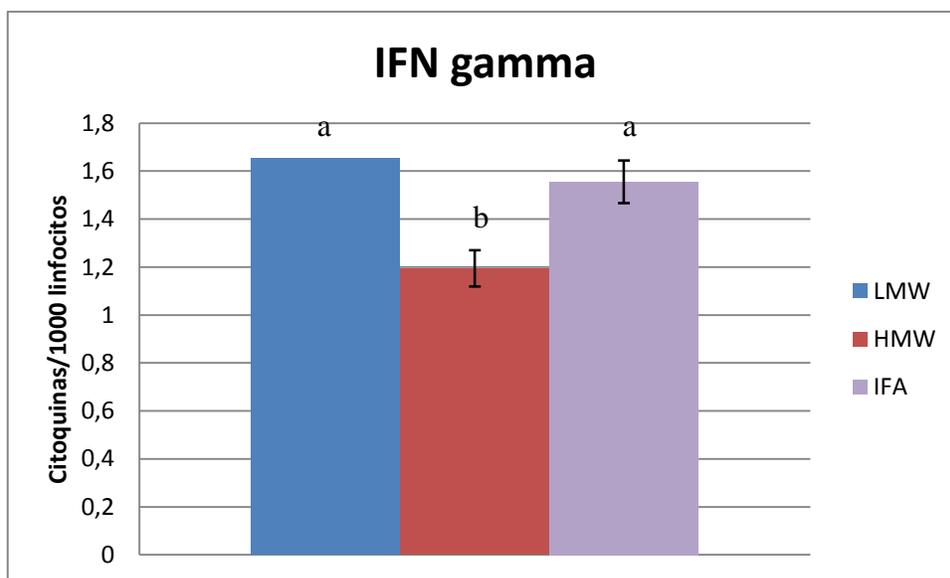


Figura 16. Niveles de IFN- γ producidos por individuos previamente inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes. Se utilizó un pool de citoquinas de cada grupo experimental ($n=3$). Los datos están expresados en pg de citoquinas/1000 linfocitos \pm DS. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$ en el caso de HMW-LMW y $p \leq 0.05$ en el caso de HMW-IFA).

En la figura 17 se muestra la producción de IL-2 en los tres grupos experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de quitosano HMW y quitosano LMW ($p \leq 0.01$) y, entre los grupos quitosano HMW e IFA ($p \leq 0.01$). Por el contrario, las diferencias entre los grupos IFA y quitosano LMW no resultaron estadísticamente significativas.

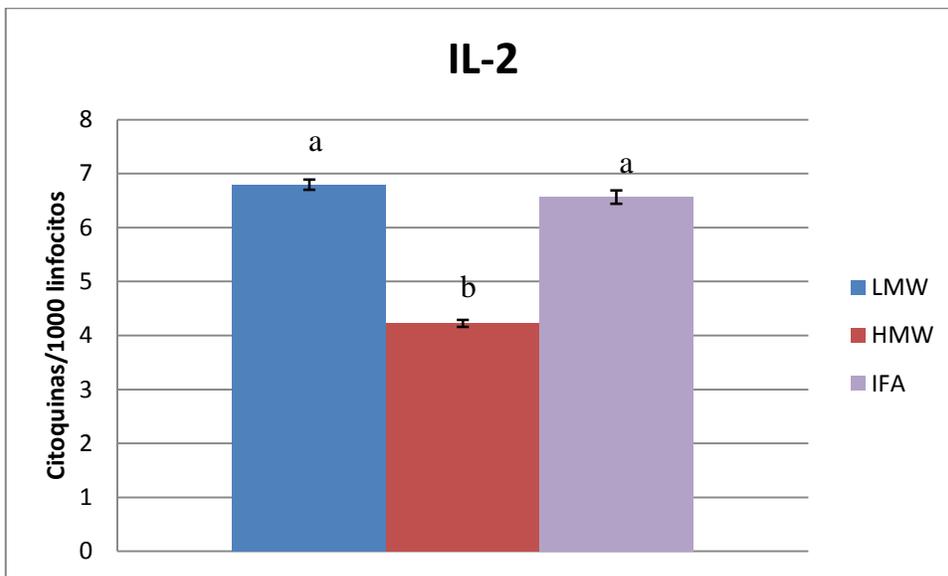


Figura 17. Niveles de IL-2 producidos por individuos previamente inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes. Se utilizó un pool de citoquinas de cada grupo experimental ($n=3$). Los datos están expresados en pg de citoquinas/1000 linfocitos \pm DS. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$).

En la figura 18 se muestra la producción de IL-10 en los tres grupos experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de quitosano HMW y quitosano LMW ($p \leq 0.01$) y, entre los grupos quitosano HMW e IFA ($p \leq 0.05$). Por el contrario, las diferencias entre los grupos IFA y quitosano LMW no resultaron estadísticamente significativas.

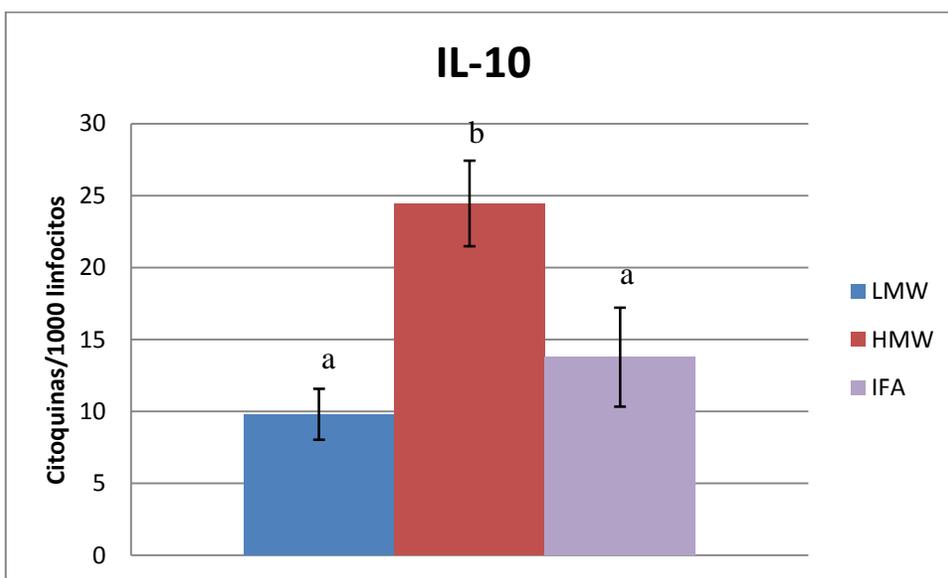


Figura 18. Niveles de IL-4 producidos por individuos previamente inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes. Se utilizó un pool de citoquinas de cada grupo experimental ($n=3$). Los datos están expresados en pg de citoquinas/1000 linfocitos \pm DS. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$ en el caso de HMW-LMW y $p \leq 0.05$ en el caso de HMW-IFA).

En la figura 19 se muestra la producción de IL-4 en los tres grupos experimentales (inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos experimentales ($p \leq 0.01$).

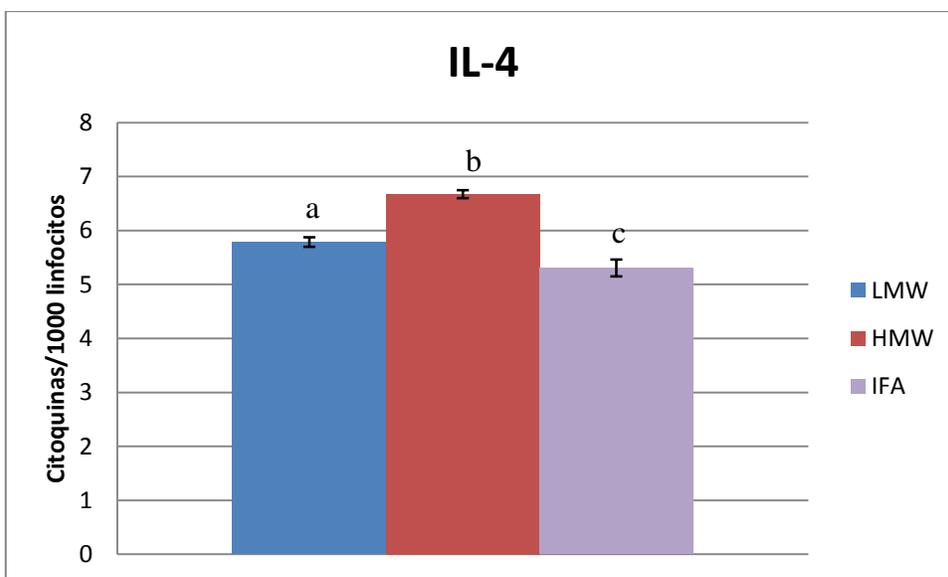


Figura 19. Niveles de IL-4 producidos por individuos previamente inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q y las tres estrategias adyuvantes. Se utilizó un pool de citoquinas de cada grupo experimental ($n=3$). Los datos están expresados en pg de citoquinas/1000 linfocitos \pm DS. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.01$)

5. Cambios histológicos gonadales en los individuos inmunizados.

Para estudiar las características histológicas del parénquima ovárico de los animales inmunizados, éstos fueron sacrificados al día 90 de estudio, utilizando CO₂ por vía inhalatoria. Luego, se realizó la ovariectomía a cada uno de los ratones para realizar el posterior análisis histológico. Las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10%, teñidas con Hematoxilina-Eosina y fotografiadas en un microscopio Nikon, modelo Eclipse 400, con cámara Nikon incluida.

Se realizó un análisis cuantitativo de las estructuras evidenciables en los cortes ováricos, es decir, se realizó un conteo de los folículos y cuerpos lúteos claramente definidos en el parénquima ovárico. En dicho análisis, se pudo determinar que en el caso de las hembras inmunizadas con la formulación que usó quitosano LMW como adyuvante, existe un menor número de folículos que en las otras dos formulaciones adyuvantes, como se puede observar en la tabla n°1.

Además se encontró que en el caso del quitosano LMW los folículos hallados estaban en un menor grado de desarrollo que en las otras dos formulaciones adyuvantes y no se encontró la presencia de cuerpos lúteos claramente definidos, a diferencia de lo que ocurrió con el control y con IFA (donde se pudo determinar la presencia de cuerpos lúteos claramente definidos en el parénquima ovárico) y similar a lo observado con quitosano HMW (donde se observan zonas con posible tejido luteal remanente, pero casi no se observaron cuerpos lúteos propiamente tales). Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre los grupos HMW y LMW en relación al grupo control, tanto en la determinación del número de folículos, como de cuerpos lúteos. En cambio, las diferencias entre el grupo IFA y el grupo control no resultaron significativas.

Estos hallazgos se pueden observar en la tabla n°1

Grupo Experimental	Folículos	Cuerpos lúteos
CONTROL	54	8
HMW	34 *	2 *
LMW	18 **	0 **
IFA	41	10

Tabla 1: *Conteo visual de las estructuras ováricas más importantes que se encontraron claramente definidas en el parénquima ovárico en los distintos grupos experimentales. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación al grupo control, (*) $p \leq 0.05$ y (**) $p \leq 0.01$*

En las figuras 20, 21, 22 y 23 se pueden observar fotografías de los hallazgos obtenidos en las muestras histológicas de los distintos grupos en estudio.

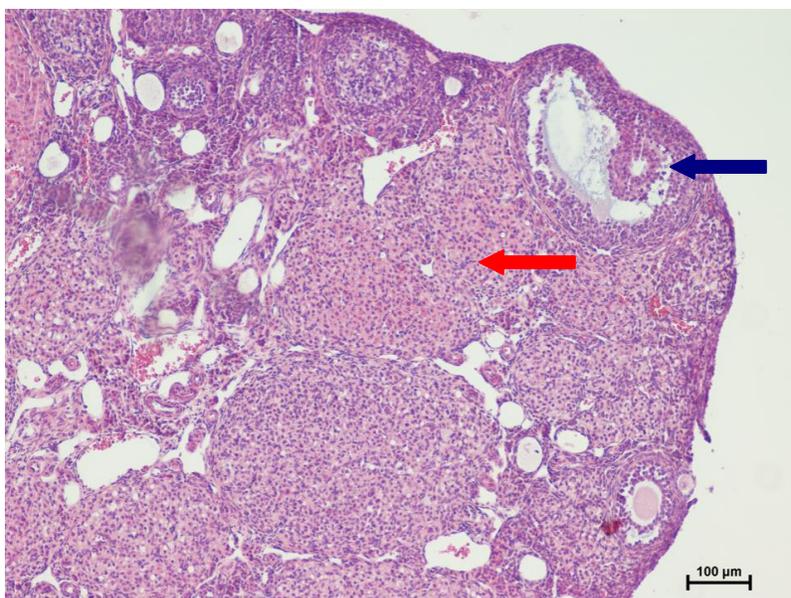


Figura 20. *Corte de ovario de hembra control (no inmunizada). La flecha azul muestra un folículo en un estado avanzado de desarrollo y la flecha roja un cuerpo lúteo presente en el parénquima ovárico. Tinción H/E 10x.*

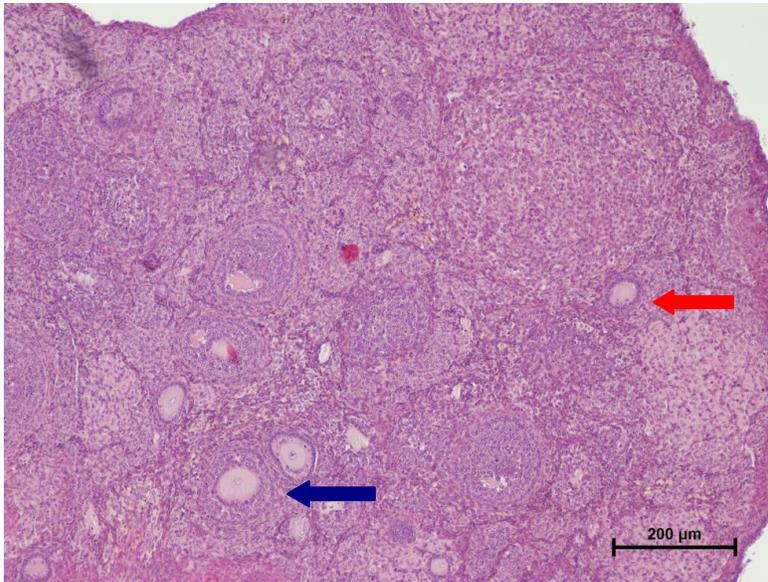


Figura 21. Corte de ovario de hembra inmunizada con la proteína recombinante GnRXG/Q y quitosano HMW como adyuvante. La flecha azul muestra un folículo en un estado medio de desarrollo y la flecha roja un folículo en una etapa temprana de desarrollo presentes en el parénquima ovárico. No se observan cuerpos lúteos claramente definidos. Tinción H/E 10x.

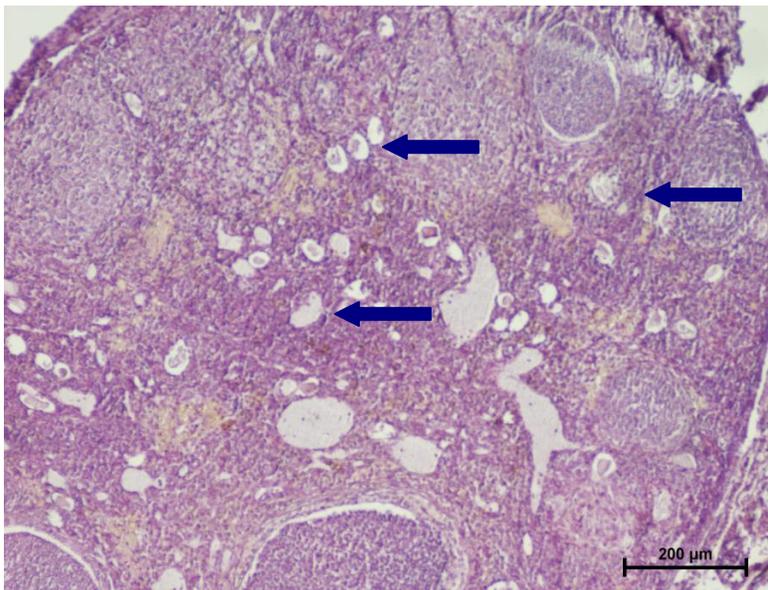


Figura 22. Corte de ovario de hembra inmunizada con la proteína recombinante GnRXG/Q y quitosano LMW como adyuvante. Las flechas azules muestran folículos en etapas tempranas de desarrollo presentes en el parénquima ovárico. No se observan cuerpos lúteos claramente definidos. Tinción H/E 10x.

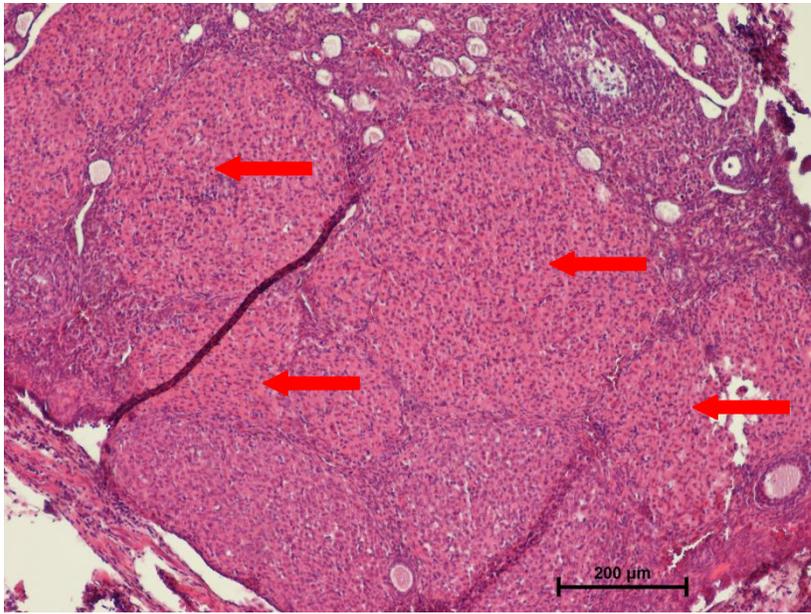


Figura 23. Corte de ovario de hembra inmunizada con la proteína recombinante GnRXG/Q e IFA como adyuvante. Las flechas rojas indican cuerpos lúteos presentes en gran número en el parénquima ovárico. Tinción H/E 10x.

DISCUSIÓN

Hace varios años ha aumentado el interés por el control de la actividad reproductiva en animales domésticos, silvestres y de producción. Frente a esto, se han desarrollado diversas herramientas como la vacunación contra la hormona GnRH-I, que surge como una alternativa a la castración quirúrgica. Para que esta vacuna genere el cese de la actividad reproductiva deben producirse, en los animales inmunizados, títulos neutralizantes de anticuerpos contra la hormona GnRH-I nativa. Debido a la naturaleza proteica y a la ausencia de MAMPs en el antígeno vacunal, para que la inmunización contra GnRH-I sea efectiva, este antígeno debe ser asociado necesariamente a un adyuvante adecuado (Herbert y Trigg, 2005).

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran: el tipo de respuesta deseada, la especie vacunada, la ruta de administración y los efectos colaterales inducidos por el adyuvante (Aguilar y Leal, 2000).

En este estudio, utilizamos como estrategias adyuvantes, quitosano, polímero natural derivado de la quitina en dos pesos moleculares distintos y diferentes grados de desacetilación (HMW: peso molecular de 350 KDa y desacetilación mayor al 83%; LMW: peso molecular de 70 KDa y desacetilación mayor al 75%) y un compuesto de naturaleza oleosa, el adyuvante incompleto de Freund (IFA), como estándar de oro.

El quitosano es un polímero altamente degradable, posee una baja toxicidad y no es irritante ni alergénico en humanos ni animales (Seferian y Martinez, 2000). Dichas características del quitosano fueron evidenciadas en nuestro estudio, ya que con ninguna de las dos formulaciones de quitosano (HMW y LMW) se evidenciaron reacciones adversas tóxicas ni sistémicas, en los animales inmunizados.

Por otra parte, IFA es un adyuvante oleoso que no se emplea actualmente en humanos debido a que ocasiona reacciones locales colaterales como la formación de granulomas e inflamación local (Aguilar y Leal, 2003). Los efectos indeseados descritos para esta emulsión, coinciden con lo observado en nuestro estudio. En los animales inmunizados con IFA como adyuvante, pudimos observar reacciones inflamatorias cutáneas de tipo granulomatosas en el sitio de inyección, dichas lesiones perduraron durante varios días e incluso semanas.

Además de considerar los posibles efectos nocivos que conlleva la utilización de un adyuvante en particular, la selección de éste es muy importante debido a que los distintos adyuvantes son capaces de dirigir la inmunidad adaptativa del individuo vacunado, hacia una respuesta de tipo T_H1 o T_H2 . Las subpoblaciones de linfocitos colaboradores T_H1 y T_H2 se distinguen fundamentalmente por las citoquinas que sintetizan. El IFN- γ es la citoquina característica de los linfocitos T_H1 , quienes además producen IL-2. Por otra parte, la IL-4 y la IL-5 son las características de los linfocitos T_H2 , quienes producen también IL-10 (Abbas, 2008).

En este estudio, al usar quitosano HMW se obtuvo una mayor producción de IL-4 e IL-10, en cambio al usar quitosano LMW obtuvimos como citoquinas predominantes IFN- γ e IL-2. Por lo tanto, en relación a la producción de citoquinas, se observa claramente una polarización del tipo de respuesta inmune al usar dos formulaciones de quitosano con distinto peso molecular y diferente grado de desacetilación. En este sentido, el quitosano HMW estaría demostrando una respuesta preferentemente de tipo T_H2 y en el caso del quitosano LMW, al igual que lo observado al utilizar IFA como adyuvante, se encuentra una respuesta preferentemente de tipo T_H1 .

Es importante considerar que en los últimos años se ha estudiado el rol inmunoregulator que posee la IL-10. Esta citoquina al principio fue considerada, al igual que la IL-4 y la IL-5, como una citoquina característica de la respuesta de tipo T_H2 . Sin embargo, hoy se sabe que la IL-10 tiene la capacidad de estimular el desarrollo de linfocitos T reguladores y de inhibir la producción de citoquinas y proliferación de los linfocitos T activados, todo esto, en conjunto con otra familia de citoquinas llamada TGF- β (Monteleone, *et al.*, 2004; Castillo e Ibacache, 2008). Esta función regulatoria de la IL-10 no fue evaluada en este estudio, sin embargo, sería importante considerarla en trabajos posteriores, determinando además TGF- β , ya que la acción conjunta de ambas citoquinas es la que generaría una potente inhibición de la respuesta inmune antígeno específica (Levings, *et al.*, 2002).

Al analizar la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos podemos también diferenciar, según la naturaleza de éstas, el tipo de respuesta preferentemente inducida en el individuo vacunado. En este sentido, se sabe que la IgG1 es característica de las respuestas

preferentemente humorales, es decir, de tipo T_{H2} , en cambio, cuando la respuesta presente es preferentemente celular, o tipo T_{H1} , la inmunoglobulina predominante es la IgG2a en ratones (Palomo *et al.*, 2002).

En nuestro estudio, al analizar el patrón de inmunoglobulinas producidas por los individuos inmunizados, encontramos que al utilizar quitosano HMW como estrategia adyuvante, existe una mayor producción de IgG1, en cambio al usar quitosano LMW e IFA como formulaciones adyuvantes, la inmunoglobulina que predomina en cuanto a su producción es la IgG2a. Es decir, en relación a la producción de inmunoglobulinas, el quitosano HMW estimularía una respuesta de tipo T_{H2} y el quitosano LMW y el IFA direccionarían la respuesta inmune hacia el tipo T_{H1} .

Por lo tanto, los patrones de citoquinas e inmunoglobulinas resultaron coincidentes entre sí, mostrándonos principalmente que al usar quitosano con diferente peso molecular es posible inducir diferentes respuestas inmunes en los individuos vacunados, lo que es fundamental al momento de elegir qué estrategia adyuvante resultaría más beneficiosa, según el objetivo de la inmunización a realizar.

Es importante destacar que en nuestros resultados, tanto de citoquinas como de inmunoglobulinas, pudimos observar predominancia de un tipo de respuesta inmune en relación a otra (T_{H1} o T_{H2}) pero en ambas formulaciones de quitosano se encontró también la respuesta contraria, aunque en una proporción menor. Esto concuerda con lo sostenido por Seferian y Martinez (2000) quienes observaron una respuesta inmune mixta T_{H1}/T_{H2} al usar quitosano como adyuvante en ratas.

En relación a la capacidad inmunogénica las formulaciones adyuvantes utilizadas, en trabajos previos como el Zaharoff (2006), se determinó que el quitosano posee una inmunogenicidad mayor que el hidróxido de aluminio y equivalente al adyuvante incompleto de Freund (IFA). Nuestros resultados, nos permitieron observar que si bien, IFA produjo menos IgG1 que el quitosano HMW y más IgG2a que el quitosano LMW, la seroconversión de IgG2a contra la hormona GnRH-I nativa fue bastante menor en el caso de IFA. Por el contrario, la seroconversión resultó muy eficiente al usar quitosano LMW y HMW como adyuvante, obteniéndose además, una relación IgG2a/IgG1 similar contra la proteína recombinante GnRXG/Q y contra GnRH-I. Es decir, al utilizar quitosano, se

obtuvo una inmunogenicidad cruzada mayor entre nuestra proteína recombinante y la hormona nativa que al usar IFA como estrategia adyuvante. Con los antecedentes recopilados en este estudio, no es posible conocer con certeza la razón de que ocurra esto al usar IFA, sin embargo, posiblemente se deba a que al utilizar IFA como adyuvante se produjo una mayor inmunotolerancia, probablemente debido a la generación de un mayor número de linfocitos T reguladores en dichos individuos. Sin embargo, para determinar certeramente la causa de la baja inmunogenicidad cruzada entre nuestro antígeno y la hormona nativa al usar IFA, deben realizarse otras determinaciones en trabajos posteriores.

Se han desarrollado distintas explicaciones para la alta inmunogenicidad mostrada por el quitosano. En estudios previos como el realizado por Seferian y Martínez (2000) se utilizó quitosano en micropartículas como adyuvante. En dicha investigación, se plantea que al usar quitosano estimula la respuesta inmune debido a la interacción entre las subunidades de N-acetil-D-glucosamina del quitosano y la proteína ligadora de manosa, una proteína que tiene la capacidad de activar al sistema del complemento, actúa como opsonina y es capaz de ligar la inmunidad innata y la adaptativa. Además, las unidades de N-acetil-D-glucosamina al parecer son reconocidas por receptores tipo toll de las células presentadoras de antígeno pertenecientes a la inmunidad innata (Travassos, 2007), lo que potenciaría la respuesta inmune adaptativa generada al usar quitosano como adyuvante. Esto es coincidente con lo encontrado por Sáenz (2009) donde se postula que las diferencias inmunogénicas encontradas en quitosanos con diferentes grados de fosforilación, se debería a que los grupos fosfatos se unirían a los carbonos 3 y 6 de la N-acetil-D-glucosamina, disminuyendo así la capacidad inmunogénica de la formulación.

Por su parte, Zaharoff (2006) sostiene que la inmunogenicidad del quitosano se debería fundamentalmente a su viscosidad, lo que se contrapone a lo postulado en los estudios realizados por Seferian y Martínez (2000) y Sáenz (2009) quienes postulan que si bien la viscosidad es un factor importante en la capacidad inmunogénica del quitosano, serían las unidades de N-acetil-D-glucosamina las que tendrían un papel fundamental en este sentido.

Para que una vacuna contra la hormona GnRH-I sea realmente eficaz, debe generar un cese en la actividad reproductiva del individuo vacunado, es decir, debe ser capaz de bloquear el

eje hipotálamo-hipófisis-gonadas para así inhibir la esteroidogénesis y finalmente la producción de gametos femeninos y masculinos.

En la investigación realizada por Sáenz (2009), se obtuvo que ambos tipos de quitosano (HMW y LMW) fueron capaces de disminuir la esteroidogénesis y la espermatogénesis en machos inmunizados con la proteína recombinante GnRXG/Q. Esto se observó también, aunque en menor proporción, al usar el adyuvante completo de Freund (CFA).

En el presente estudio, se observaron diferencias significativas en la actividad ovárica de los grupos inmunizados con quitosano LMW y quitosano HMW como adyuvante, en relación al grupo control (siendo mayor la diferencia en el caso del quitosano LMW). Por el contrario, las diferencias no resultaron significativas entre las estructuras ováricas encontradas en los animales inmunizados con IFA como adyuvante, en relación a lo observado en el grupo control.

En relación a esto, considerando que el ciclo estral de los ratones hembra tiene una duración de 4 a 5 días en promedio (Baligar y Kaliwal, 2002), en las hembras donde se utilizó quitosano (LMW y HMW) como estrategia adyuvante, la inmunización habría sido capaz de interrumpir el ciclo ovárico de dichos individuos, disminuyendo la actividad folicular y luteal, lo que se evidencia por el escaso desarrollo de sus folículos y por la aparente ausencia de cuerpos lúteos, esto indicaría que no se produjo la ovulación en los últimos ciclos, probablemente, debido a la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas producida por la vacunación.

CONCLUSIONES

- Al inmunizar animales con la proteína recombinante GnRXG/Q se produce un aumento en la producción de IgG contra GnRXG/Q desde el día 15 del estudio.
- Al usar quitosano de alto peso molecular (HMW) como adyuvante es posible direccionar la respuesta inmune hacia el tipo T_H2 , representada por una mayor producción de IgG isotipo 1 y citoquinas IL-4 e IL-10. En cambio, al usar quitosano de bajo peso molecular (LMW) y adyuvante incompleto de Freund (IFA), la respuesta inmune se direcciona hacia el tipo T_H1 , con una mayor producción de IgG isotipo 2a y citoquinas IFN γ e IL-2.
- Existe una inmunogenicidad cruzada entre la hormona nativa GnRH-I y la proteína recombinante GnRXG/Q que se evidencia de forma importante al usar quitosano como adyuvante, donde se producen aumentos en los títulos de IgG isotipo 1 e IgG isotipo 2a en relación al grupo control. Esta seroconversión es menor en el caso de IFA.
- La inmunización con la proteína recombinante GnRXG/Q es capaz de disminuir la actividad luteal y folicular en el tejido ovárico, principalmente al usar quitosano LMW como adyuvante.
- La estrategia adyuvante con quitosano LMW, permite detener el ciclo ovárico y evitar la ovulación en las hembras inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S.** 2008. Inmunología Celular y molecular. 6º Ed. Geo Consultoría Editorial. Barcelona, España. 566p.
- **AGUILAR, J.; LEAL, M.** 2000. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada*. 17(3):147-160.
- **BALIGAR, P.; KALIWAL, B.** 2002. Reproductive Toxicity of Carbofuran to the Female Mice: Effects on Estrous Cycle and Follicles. *Industrial Health*. 40:345-352.
- **BASULTO, R.; MILANES, C.; ROJAS, A. FUENTES, F.; IZQUIERDO, N.; BERTOT, J. HERNÁNDEZ, H.; SÁNCHEZ, D.; CALZADA, L.; JUNCO, J.** 2003. Efectos de la inmunización contra GnRH sobre la estructura y función testicular en perros adultos. *Biotecnología Aplicada*. 20:20-24.
- **CASTILLO, J.L.; IBACACHE, M.** 2008. Supresión de células T activadas. *Revista latinoamericana de actualidades médicas*. Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Concepción, Chile. Vol 2. ISSN 0718-4743.
- **CORADO, J.** 2005. Células dendríticas, respuesta inmunitaria y señales de peligro. *Gac Med Caracas*. 113(4):474-484.
- **DE LOS REYES, M.** 2002. Métodos inmunológicos en la regulación de la reproducción de los animales.
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9605%2526ISID%253D469,00.html> [consulta: 15-08-2008].
- **FRANCO, D.; GIRALDO, M.; PATIÑO, P.** 2004. Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.

17(3): 280-289.

- **FRANK, D.** 2007. Interdog aggression: when to intervene? In: WSAVA World Congress, Sydney Australia.
- **GUPTA, R.K.** 1998. Aluminium compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 32:155-172.
- **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.
- **JANEWAY, JR.** 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98:7461-7468.
- **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):561-567.
- **KUBY, O.; KINDT, G.** 2004. *Inmunología.* 5º Ed. McGrawhill Interamericana. México. 554p
- **KUMAR, R.; MUZARELLI, R.; MUZARELLI, C.** 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 104:6017-6084.
- **KENNEY, R.; EDELMAN, R.** 2004. Adjuvants for the Future. *New Generation Vaccines*, 3º Ed. Myron Levine and others, eds. Nueva York. 2ª Edición. 173-192p.

- **LEVINGS, M.; BACCHETTA, R.; SCHULZ, U.; RONCAROLO, M.G.** 2002. The role of IL-10 and TGF- β in the differentiation and effector function of T regulatory Cells. *Int Arch Allergy Immunol.* Milán, Italia. 129 (4): 263-276.

- **LOPEZ, M.; MALLORQUÍN, P.; PARDO, R.; VEGA, M.** 2004. Vacunas de nueva generación. *Genoma España/ CIBT-FGUAM*, Madrid. 113 p.

- **MONTELEONE, G.; PALLONE, F.; MACDONALD, T.** 2004. Smad7 in TGF- β -mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunology.* 25: 513-517.

- **MORENO, C.; SÁNCHEZ A.** 2003. Receptores tipo Toll: Bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Revista Médica Universidad de Navarra.* 47(3): 29-33.

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

- **NAZ K.; TALWAR.** 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini-review. *Human Reproduction.* 20(12):3271-3283.

- **ODEON, C.** 2002. Vacunas para el control de las infecciones virales de los bovinos. http://www.produccionanimal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/infecciones_as/bovinos_en_general/60-vacunas_para_infecciones_virales.pdf [consulta: 17-10-2009].

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

- **OLIVER, A.; GISPERT, M., DIESTRE, A.** 2003. Acceptability of boar meat by consumers depending on their age, gender, culinary habits, and sensitivity and

- appreciation of androstenone odour. IRTA-Centro de Tecnología de la Carne. Monells, Spain. *Journal Meat Science*. 64: 433-440.
- **OVERALL, K.** 1997. *Clinical Behavioral Medicine Small Animals: Taking the behavioral history*. Mosby, St. Louis, 544 p.
 - **PALOMO, I.; FERREIRA, A.; SEPÚLVEDA, C.; ROSEMBLATT, M.; VERGARA, U.** 2002. *Fundamentos de inmunología básica y clínica*. Editorial Universidad de Talca. Talca, Chile. 807 p.
 - **PORPORATTO, C.; BIANCO, I.; CORREA, S.** 2007. Modulation of the mucosal immune system with polysaccharides basis for an attractive therapeutic alternative. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000200003&lng=pt&nrm=iso [consulta: 16-08-2008].
 - **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.
 - **SÁENZ, L.; NEIRA-CARRILLO, A.; PAREDES, R.; CORTÉS, M.; BUCAREY, S.; ARIAS, JL.** 2009. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide-based vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*. 369: 64-71.
 - **SEFERIAN, P.; MARTÍNEZ, M.** 2000. Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine* 19: 661-668.
 - **SENEL, S.; MCCLURE, S.** 2004. Potential applications of chitosan in veterinary

medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(10):1467-1480.

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

- **TURKSTRA, J.; MELOEN R.** 2006. Active immunisation against gonadotropin-releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals.
<<http://www.vetscite.org/publish/articles/000062/print.html>>
[consulta: 20-10-2009].

- **TRAVASSOS, L.; CARNEIRO, L.; STEPHEN, E.; GIRARDIN, I.; BONECA, R.; BOZZA, M.; DOMINGUEZ, 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 T_H2 response. *Journal of Immunology.* 175:7202-7208.