



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CAMBIOS HISTOLÓGICOS GONADALES E HIPOTALÁMICO-
HIPOFISIARIOS EN RATONES HEMBRA INMUNIZADOS CON UNA
VACUNA PEPTÍDICA CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE
GONADOTROFINAS (GnRH-I)**

RAFAEL SEVILLA REYES

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

**SANTIAGO, CHILE
2013**



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CAMBIOS HISTOLÓGICOS GONADALES E HIPOTALÁMICO- HIPOFISIARIOS EN RATONES HEMBRA INMUNIZADOS CON UNA VACUNA PEPTÍDICA CONTRA LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH-I)

RAFAEL SEVILLA REYES

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: MARÍA SOLEDAD FERNÁNDEZ
PROFESOR CONSEJERO: JULIO LARENAS HERRERA

SANTIAGO, CHILE
2013

Resumen

En el presente estudio se determinaron los cambios histológicos gonadales e hipotalámico-hipofisarios en ratones hembra Balb/c inmunizados con una vacuna peptídica contra la hormona GnRH-I, basada en el antígeno recombinante GnRX/ GQ y quitosano como adyuvante, en una formulación soluble y una estrategia de micropartículas. Los animales inmunizados (días 1 y 30) desarrollaron anticuerpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a contra el antígeno recombinante desde la primera vacunación y contra la hormona nativa GnRH-I desde la revacunación. Se observó una disminución del número de cuerpos lúteos y folículos preovulatorios en el parénquima ovárico de los individuos inmunizados, principalmente en el grupo donde se utilizó quitosano soluble como adyuvante. Por otro lado, en los animales inmunizados se determinó mediante inmunohistoquímica, un aumento de células positivas para GnRH-I en la zona hipotalámico-hipofisaria, sin embargo, en estudios futuros se debe complementar la inmunohistoquímica de encéfalo con un método cuantitativo como qPCR, debido a la difícil estandarización y cuantificación de los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica encefálica en ratones.

Abstract

This study examined gonadal and hypothalamic-pituitary histological changes in female Balb/c mice immunized with a peptide vaccine against GnRH-I, constituted with the recombinant antigen named GnRX / GQ and chitosan as adjuvant, in a soluble and microparticar formulation. The immunized animals (days 1 and 30) developed specific antibodies IgG, IgG1 and IgG2a against the recombinant antigen from the first vaccination and against the native hormone GnRH-I from the booster. There was a decrease in the number of corpus luteum and preovulatory follicles in the immunized mice ovarian parenchyma, mainly in the group where soluble chitosan was used as adjuvant. Increased GnRH-I-positive cells in the hypothalamic-pituitary zone in immunized animals were determined by immunohistochemistry, however, due to the difficult standardization and quantification of the results of the encefalic immunohystochemistry in mice, future studies should complement brain immunohistochemistry with a quantitative method such as qPCR.

INTRODUCCIÓN

Hace muchos años que la búsqueda de tecnologías de regulación de la actividad reproductiva se ha hecho muy importante. Actualmente, lo más utilizado para la supresión de la actividad reproductiva es la castración quirúrgica. La castración es muy utilizada en animales de producción y también en animales domésticos, sin embargo, su implementación presenta varias limitaciones como la necesidad de utilización de instrumental quirúrgico estéril, anestésicos y analgésicos en el post operatorio, así como la necesidad de personal entrenado y capacitado para realizar dicha cirugía. Además, existen algunos riesgos asociados a dicho procedimiento, como la ocurrencia de infecciones post operatorias y otras complicaciones como la aparición de hernias y dolor asociados a la operación. Debido a esto, se han desarrollado métodos alternativos a la castración quirúrgica, siendo uno de los más innovadores la castración inmunológica utilizando vacunas que bloquean la actividad de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-I). Esta técnica presenta diversas ventajas, como los menores costos y tiempos de implementación, la reducción del estrés asociado a la cirugía, así como también, la disminución de los riesgos y las dificultades de implementación de una castración quirúrgica. Además, su uso en especies productivas genera beneficios evidentes en diferentes parámetros productivos, tales como una mejoría en la ganancia diaria de peso (GDP) (Fabrega *et al.*, 2010).

Vacunación contra la hormona GnRH-I

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).

La hormona GnRH-I es un blanco deseable para el control reproductivo debido a que actúa a través de una unión específica y de alta afinidad a los receptores de las células gonadotropas presentes en la adenohipófisis. Es por esto que distintos agentes para el control de la fertilidad basados en GnRH-I han sido importantes objetos de estudio para el control de la reproducción en humanos, animales domésticos y silvestres.

Es así como por varios años, los científicos han intentado inmunoneutralizar la hormona GnRH-I, bloqueando su entrada a la hipófisis, controlando así la esteroidogénesis, ovogénesis y espermatogénesis (Kirkpatrick *et al.*, 2011; Ferro *et al.*, 2004; Geary *et al.*, 2006; Robbins, 2002).

La inmunización contra GnRH-I induce una inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, genera una barrera inmunológica entre el hipotálamo y la hipófisis anterior, debido a que anticuerpos específicos se unen a GnRH-I en la circulación portal hipofisiaria, lo que evita la unión de la hormona a los receptores en los gonadotrofos adenohipofisarios. Esto genera una disminución en la secreción de LH y FSH, inhibiéndose así el desarrollo de esteroides sexuales, gametos y también el comportamiento reproductivo (Herbert y Trigg, 2005; Turkstra y Meloen, 2006; Geary *et al.*, 2006).

Vacunas eficaces contra GnRH-I se han desarrollado en un gran número de especies animales (Kirkpatrick *et al.*, 2011; Ferro *et al.*, 2004; Geary *et al.*, 2006; Robbins, 2002). En comparación con la castración quirúrgica, la inmunocastración es un método menos engorroso, no doloroso, menos invasivo, aplicable a mamíferos de ambos sexos y eventualmente reversible con el tiempo en animales prepúberes y adultos (Basulto *et al.*, 2003). Sin embargo, debido que se trata de un péptido propio y a que posee un bajo peso molecular, la hormona GnRH-I se comporta como un antígeno vacunal débil, lo que hace necesaria su utilización en conjunto con proteínas “carriers” o formulaciones adyuvantes que aumenten su inmunogenicidad (Herbert y Trigg, 2005).

En el laboratorio BIOVETEC de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se ha diseñado, expresado y purificado una proteína recombinante (GnRX G/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 presentadoras de antígeno (CPA) del sistema inmune innato. Sin embargo, al ser un péptido recombinante purificado, necesita la presencia de un adyuvante para tener capacidad inmunogénica y obtener el efecto fisiológico deseado de bloqueo en la actividad reproductiva.

Adyuvantes vacunales

Los adyuvantes vacunales son definidos como sustancias que aumentan respuestas inmunes adaptativas a antígenos. Comprenden un grupo diverso de moléculas definidas o de formulaciones más complejas. Los adyuvantes han sido usados como componentes críticos en vacunas inactivadas contra una gran variedad de enfermedades microbianas por más de un siglo (Schijns y Lavelle, 2011).

Los adyuvantes pueden ser usados con varios propósitos: (i) para aumentar la inmunogenicidad de antígenos altamente purificados o recombinantes; (ii) para disminuir la cantidad de antígeno o el número de inmunizaciones necesarias para una inmunidad protectora; (iii) para aumentar la eficacia de vacunas en recién nacidos, ancianos o personas inmunocomprometidas, o (iv) como sistemas de liberación del antígeno para la captación de este en la mucosa oral y nasal (McElrath, 1995).

El diseño de vacunas comienza con el conocimiento extenso de la respuesta inmune inducida por la vacuna. Por lo tanto, es necesario definir la respuesta inmune requerida para la eficacia de una determinada vacuna y qué tipo de respuesta inmune efectora debe ser inducida por una formulación vacunal (Schijns y Lavelle, 2011).

En este proyecto se utilizó un biopolímero derivado de la quitina llamado quitosano, en una formulación soluble y otra en micropartículas. El quitosano ha demostrado inducir una respuesta inmune mixta, humoral y celular (Zaharoff *et al.*, 2007; Saenz *et al.*, 2009), tanto en su forma soluble como en micropartículas, siendo las micropartículas una estrategia que ha mostrado en recientes estudios muy buenos resultados debido a la inducción de una potente respuesta celular (Senel, 2011), debido a esto, es interesante ver si existen diferencias en los cambios histológicos gonadales e hipotalámico-hipofisarios entre ambas estrategias adyuvantes en relación a los animales no inmunizados, lo que permitiría deducir cual formulación es más eficiente en la alteración del funcionamiento del eje hipotálamico-hipofisario-gonadal.

Sistema inmune: Respuesta inmune humoral y celular

La función del sistema inmunitario consiste en la defensa contra los microorganismos infecciosos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmune. Así mismo, aquellos mecanismos que en condiciones normales protegen de las infecciones y eliminan las sustancias ajenas, en algunas circunstancias también son capaces de provocar una lesión tisular y una enfermedad (Abbas *et al.*, 2012).

Dentro de los componentes del sistema inmune podemos distinguir dos grandes grupos, la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (López *et al.*, 2004). 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).

Existen dos tipos de respuestas inmunitarias adaptativas, llamadas inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad humoral se basa en la acción de anticuerpos neutralizantes que son producidos por los linfocitos B. La inmunidad celular está a cargo principalmente de los linfocitos T (Kuby, 2008). Las células dendríticas (CD) de la inmunidad innata tienen un rol crucial en la activación de los linfocitos T, pudiendo controlar parte importante de la inmunidad adaptativa en respuesta a la internalización y procesamiento de antígenos a través de la vía de moléculas de histocompatibilidad clases I y II (MHC I y MHC II) y la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T colaboradores ($CD4^+$) y citotóxicos ($CD8^+$) (Reddy *et al.*, 2006).

Existen dos subtipos de linfocitos colaboradores o “helper” (Th). El subtipo Th1 es responsable 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), como IgG2a en ratones. El subtipo Th2 estimula la activación y diferenciación eosinófila, proporciona ayuda a las células B y promueve la producción principalmente de IgG1 en ratones (Abbas, 2008; Kuby, 2004).

Por su parte, los linfocitos T $CD8^+$ monitorean constantemente las células del organismo con el fin de eliminar a cualquiera que exhiba un antígeno, como ocurre en células infectadas con virus, células tumorales, células provenientes de transplantes, etc. Las células que expresan un antígeno foráneo en el contexto de una molécula MHC- I son llamadas “células propias alteradas” y son las células diana de los linfocitos T citotóxicos, que poseen la capacidad de destruirlas (Kuby, 2004; Roitt, 2001.).

Además, se ha descrito que en células dendríticas (CDs), péptidos derivados de partículas interanlizadas, pueden ser presentadas de forma cruzada eficientemente por moléculas MHC-I, induciéndose así una respuesta citotóxica contra células propias que presenten un antígeno en particular (Ackerman *et al.*, 2005).

Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I) y funcionamiento del eje hipotálamo hipofisiario gonadal

La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I), es un decapeptido altamente conservado en mamíferos, secretado desde la porción medio-basal del hipotálamo y es responsable de inducir principalmente la liberación de la hormona luteinizante (LH) y en menor medida de la

hormona folículo estimulante (FSH) desde la hipófisis anterior o adenohipófisis, que regulan en conjunto la esteroidogénesis y gametogénesis gonadal (Stanislaus *et al.*, 1998; Wojcik-Gladysz *et al.*, 2009).

La hormona GnRH-I es transportada vía axonal a los pequeños vasos sanguíneos en la eminencia media, donde se libera hacia la sangre. Los vasos sanguíneos están irrigando la hipófisis anterior, permitiendo que la GnRH-I alcance dicha zona en altas concentraciones. En la hipófisis, la GnRH-I se une a sus receptores en las células gonadotrofas para estimular la liberación de FSH y de LH a la circulación. El patrón pulsátil de la secreción de GnRH-I induce la liberación cíclica de LH y en un menor grado de FSH, ya que es más importante en la mantención de los niveles de FSH que en su secreción inicial (Clarke, 2002; Turkstra y Meloen, 2006). En los machos, la LH estimula la síntesis y secreción de los andrógenos, como la testosterona, producidos por las células de Leydig en los testículos. Los niveles de andrógenos, inhiben directa e indirectamente la secreción de LH por un mecanismo de retroalimentación que actúa en la hipófisis y en hipotálamo, donde inhibe la liberación de GnRH-I. La FSH es responsable del inicio de la espermatogénesis, mientras que en adultos puede desempeñar un papel, junto con la testosterona, en la producción sostenida de los espermatozoides. La FSH se une a los receptores específicos en las células de Sertoli estimulando la producción de diversos factores de crecimiento. Por otro lado, en las hembras, 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 GnRH-I y en consecuencia de LH responsable de la ovulación (Turkstra y Meloen, 2006).

En el presente proyecto se plantea que el bloqueo inmunológico de la hormona GnRH-I, inducirá cambios en el parénquima ovárico de los animales inmunizados debido a la ausencia del estímulo de la hormona GnRH-I sobre la adenohipófisis, y por lo tanto, a una disminución de la secreción de las hormonas LH y FSH, responsables del correcto desarrollo del ciclo ovárico y la producción de esteroides gonadales. Pudiendo además, estos cambios inducidos a nivel ovárico, conducir a alteraciones en la expresión de GnRH-I a nivel hipotalámico-hipofisiario debido a alteraciones en el feedback hormonal característico del eje hipotalámico-hipofisiario-gonadal.

HIPÓTESIS

Dado que la inmunización contra GnRH-I induce una respuesta inmune y un bloqueo en la actividad de dicha hormona, el uso de una vacuna anti-GnRH-I generará cambios histológicos en el tejido hipotalámico- hipofisiario y gonadal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios histológicos en hipotálamo-hipófisis y gónadas en los animales inmunizados con una vacuna peptídica contra GnRH-I.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de inmunoglobulinas específicas en animales inmunizados con una vacuna contra la hormona GnRH-I.
2. Evaluar los cambios histológicos en las gónadas de los animales inmunizados.
3. Evaluar los cambios histológicos en la zona hipotalámico-hipofisiaria de los animales inmunizados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Grupos para inmunización

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa Balb/c dispuestos en 3 grupos, cada uno con 3 individuos, siendo cada grupo elegido aleatoriamente.

Grupo 1 control, inoculados sólo con la formulación adyuvante. Grupo 2, vacunados con la proteína recombinante GnRX G/Q en micropartículas de quitosano de bajo peso molecular como adyuvante. Grupo 3, vacunados con la proteína recombinante GnRX G/Q en quitosano soluble de bajo peso molecular como adyuvante.

Antígeno recombinante GnRX/GQ

Proteína de fusión para inmunocastración de 29 kDa (patente WO2010/118547) que comprende la secuencia aminoacídica primaria de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH-I) fusionada a una secuencia teórica, espaciadora que le otorga capacidad inmunogénica. La secuencia del antígeno GnRX/GQ es la siguiente:



Formulaciones adyuvantes

Quitosano soluble

Cien gramos de quitosano de bajo peso molecular (PM: 70 kDa), un porcentaje de desacetilación $\geq 75\%$ y una viscosidad de 20.000 cps (Aldrich), se lavaron con acetona y metanol y secaron hasta un peso constante. Luego, se disolvió 1 gramo de dicho quitosano en 100 mL de ácido acético 5% (pH: 4) y se filtró de forma estéril para ser usado en la formulación de la vacuna en conjunto con el antígeno GnRX/GQ, generándose una dosis de inmunización de 50 μg del antígeno en 200 μL de quitosano.

Micropartículas de quitosano

Las micropartículas de quitosano fueron generadas usando Tripolifosfato (TPP) como agente iónico entrecruzante. Quitosano de bajo peso molecular al 1% p/v en una solución de ácido acético al 0,5%, fue mezclado con el antígeno GnRX/GQ (650 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7.0). Ambos

componentes fueron mezclados mediante agitación orbital por un minuto. Luego se agregó la solución de TPP al 5% (p/v) como agente entrecruzante, en una relación de 15:1:25 de quitosano, antígeno y TPP respectivamente. Las micropartículas fueron examinadas en su forma y tamaño usando microscopía electrónica de barrido (SEM) (TESLA BS 343A) y su potencial zeta usando el equipo Zplus (Brookhaven).

Los animales fueron inmunizados por vía subcutánea con 500 µg de la vacuna anti GnRH-I en las formulaciones adyuvantes ya descritas los días 1 y 30 del estudio y cada 15 días se extrajo una muestra de sangre de los animales para obtener el suero de los individuos y evaluar los niveles de anticuerpos generados contra la vacuna y contra la hormona nativa GnRH-I.

Los procedimientos de administración de la vacuna, extracción de sangre y eutanasia de los animales fueron previamente evaluados y autorizados por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Determinación de los niveles de IgG específicos

Se realizó un ensayo de ELISA en placas de 96 pocillos para determinar los niveles de IgG, IgG1 e IgG2a específicos generados contra el péptido recombinante y la hormona nativa en el suero de los animales inmunizados. Se puso 2 µg de antígeno vacunal en cada pocillo, en 50 µL de tampón de recubrimiento (0,15 M Na₂CO₃, 0,35 M NaHCO₃, pH 9,6) por 2 horas, luego las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado (1x PBS plus, 0,05% Tween-20) y fueron bloqueados con 200 µL de tampón de bloqueo (1x PBS, 1% BSA) y dejados durante la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado y fueron incubadas con 150 µL de suero diluido a 1:250 en tampón de dilución (1x PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% BSA) durante 2 horas a 37 ° C. Después de eso, las placas se lavaron cinco veces con tampón de lavado e incubaron con 150 µL de inmunoglobulinas de conejo anti IgG, de ratón conjugado con inmunoperoxidasa (HRP), en una dilución de 1:5.000 en tampón de dilución a 37 ° C. Finalmente, las placas fueron lavadas y reveladas con 150 µL de 1-Step™, TMB ELISA (Pierce Chemical Company) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 150 µL de 1,5 M H₂SO₄ y la absorbancia se leyó a 450nm.

Preparación de las muestras histológicas

Los animales fueron sacrificados mediante la administración inhalatoria de CO₂. Luego de la eutanasia, se extrajeron quirúrgicamente las gónadas de los ratones inmunizados machos y hembras. Para realizar el posterior análisis anátomo-histológico de los ovarios, estos fueron fijados en solución de formalina tamponada al 10% (v/v), sometidos a técnica estándar, procesadas en un gradiente ascendente de alcoholes en un procesador de tejidos con vacío (Leica TP1020). Cortes de 5 µm de espesor fueron montados y teñidos con hematoxilina-eosina, los cuales se visualizaron en un microscopio óptico para evaluar el estado del parénquima gonadal.

Después del sacrificio, también fue removido el cráneo de los animales inmunizados, el cual luego fue fijado en paraformaldehído 2% + glutaraldehído 0.2% en tampón fosfato 0.1 M.

Posteriormente, los cráneos fueron descalcificados con solución de descalcificación (ácido fórmico al 10% + citrato de sodio al 5%, en una relación 1:1.), luego los cerebros fueron lavados con PBS para eliminar el fijador y sometidos a la técnica de rutina, realizando un gradiente ascendente de alcoholes e inclusión en parafina. Finalmente los cerebros incluidos en parafina fueron sometidos a 30 cortes transversales sucesivos en la zona de interés (cortes transversales aproximadamente 20 mm craneal al cerebelo, realizando los cortes sucesivos hacia craneal), de 5 µm utilizando un micrótopo y montadas sobre portaobjetos de vidrio.

Inmunohistoquímica

Para la inmunohistoquímica se utilizó el “kit” comercial UltraVision LP Large Volume Detection System HRP Polymer (Thermo scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las muestras fueron lavadas con PBS y rehidratadas. Luego, fueron incubadas por 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% y luego en la solución de bloqueo Ultra V Block (Thermo scientific) (suero bovino con albúmina 4%, Triton 0,4% X100 en PBS) por 5 minutos.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas por 20 minutos con el anticuerpo primario anti-GnRH-I (Santa Cruz Biotechnology, Inc) en una dilución de 1:20 en solución de bloqueo a temperatura ambiente, lavadas e incubadas con el Polímero HRP (Anticuerpo secundario asociado a enzima peroxidasa, Thermo scientific) durante 15 minutos. Luego, fueron lavadas e incubadas con el cromógeno DAB (Tecnolab) por 20 minutos. Finalmente, los cortes fueron lavados, teñidos con hematoxilina como tinción de contraste, deshidratados, montados y cubiertos utilizando el medio de montaje Neo-Mount (Merck Millipore).

Todo este procedimiento fue realizado en el laboratorio multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Andrés Bello.

Análisis de las muestras histológicas

Las muestras de ovarios y cerebro fueron analizadas y fotografiadas en un microscopio Nikon eclipse E400 con una cámara Nikon Digital Sight DS-5MC y analizadas con el software Nis-Elements BR versión 3.0.

El análisis de las muestras se basó en la identificación y evaluación de ciertos parámetros relacionados con la funcionalidad del tejido a evaluar comparados con los animales controles sin inmunizar.

Para evaluar el tejido gonadal, se analizó el número de folículos en diferentes estadios de desarrollo folicular y el número de cuerpos lúteos presentes en 20 cortes consecutivos del parénquima ovárico.

Para evaluar el tejido encefálico se compararon las muestras de los animales inmunizados con las de los animales control, evaluando la marcación de células positivas a GnRH-I en la zona hipotálamo-hipofisiaria mediante 30 cortes seriados de un espesor de 5 μm .

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados obtenidos en relación a los títulos de inmunoglobulinas, se utilizaron las siguientes pruebas no paramétricas:

- Mann-Whitney de dos colas: Para la comparación entre cada grupo experimental y el grupo control.
- Kruskal-Wallis: Para evaluar diferencias entre los tres grupos.

El software utilizado para realizar estos análisis fue el Graph Pad Prism. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de micropartículas de quitosano

El tamaño de las micropartículas de quitosano obtenidas fue entre 929,5 y 1001,8 nm, con un promedio de 910,5 nm. El potencial zeta de las micropartículas fue de entre 36,19 y 36,63 mV, con un promedio de 34.95 mV. En la figura 1 se muestran las fotografías obtenidas de la microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de quitosano generadas.

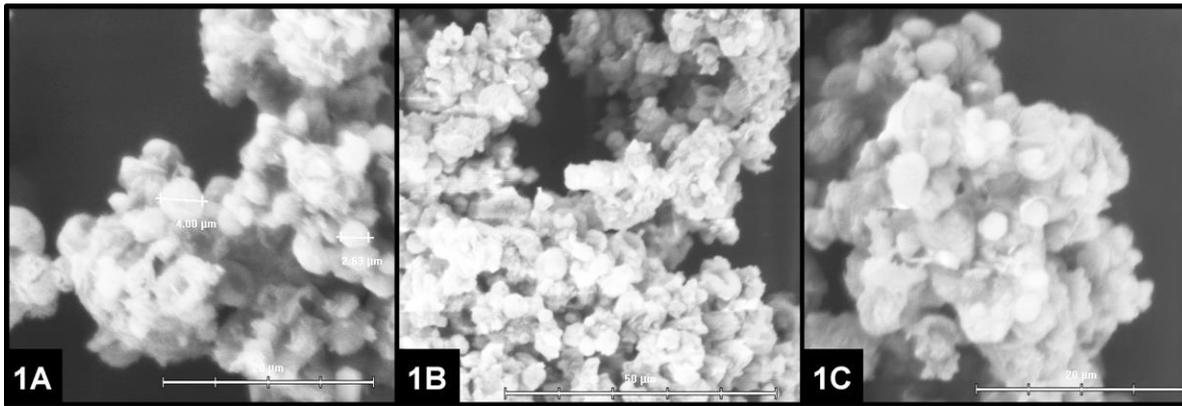


Figura 1. Fotografía de micropartículas obtenida mediante SEM con un aumento de 1700X (A y B) y 3300X (C).

Inmunidad específica inducida por la vacunación

La vacunación de los animales indujo un alza importante en la producción de inmunoglobulinas IgG (Figura 2A), IgG isotipo 1 (Figura 2B) e IgG isotipo 2a (Figura 2C) específicas contra el antígeno GnRXG/Q, esta respuesta fue significativa luego de la primera vacunación, manteniéndose alta durante los 220 días del estudio. Luego, para determinar la generación de inmunogenicidad cruzada debida a la vacunación, se determinó la producción de IgG específica contra la hormona nativa GnRH-I. Como se observa en la figura 2D, desde el día 15 post inmunización se observaron altos niveles de IgG específica contra la hormona GnRH-I, que se hicieron mayores desde el día 45, es decir, después de la revacunación realizada el día 30 del ensayo. Esto indica que luego de la revacunación, se indujo una respuesta inmune más potente y duradera contra la hormona nativa. En todos los casos se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales y el grupo control ($p \leq 0.01$), pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales.

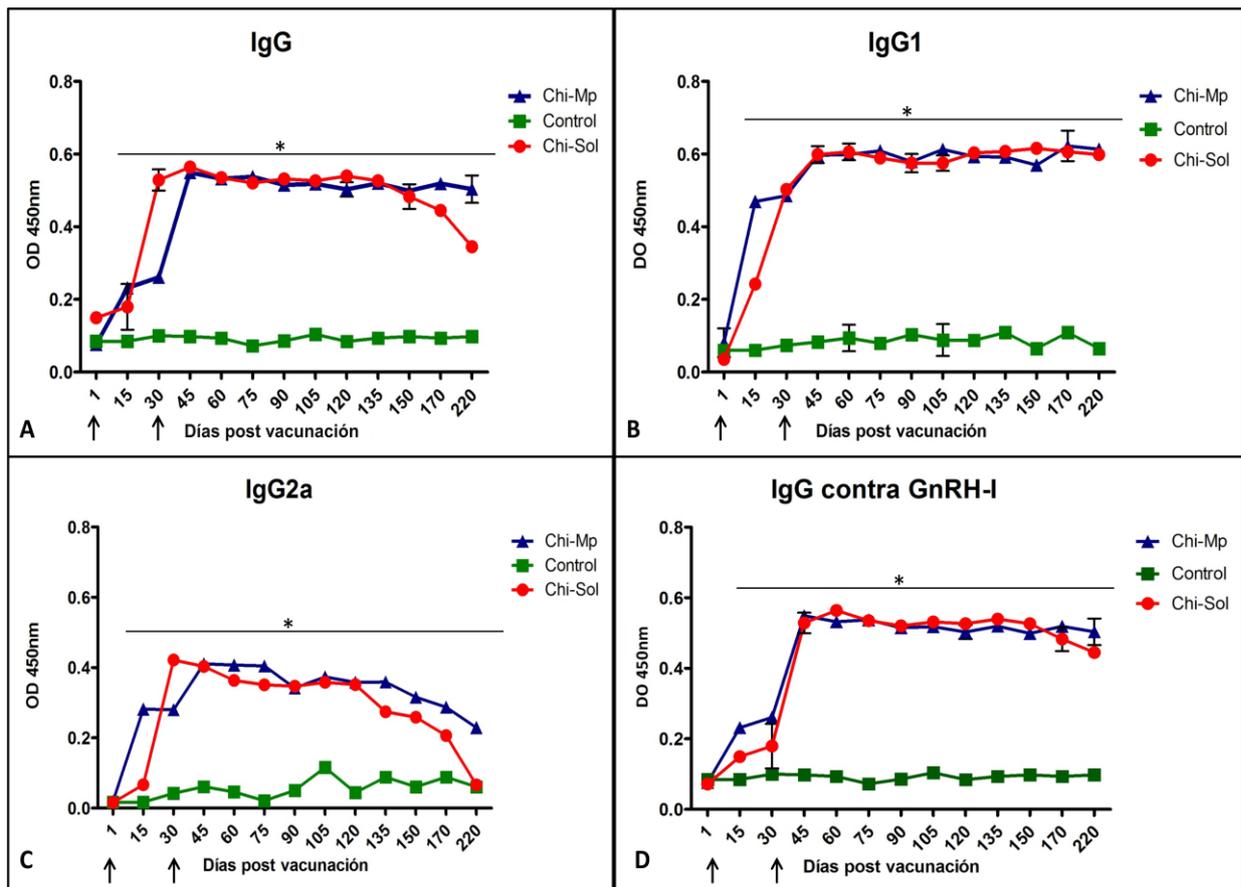


Figura 2. IgG (A), IgG1 (B) e IgG2a (C) contra el antígeno GnRXG/Q y niveles de IgG contra la hormona nativa GnRH-I (D) en animales inmunizados usando micropartículas de quitosano (▲) y quitosano soluble (●) como adyuvante, en relación a los animales control (■). Fue utilizado un pool de sueros de cada grupo (n=3). Las flechas indican los días en que se realizaron las inmunizaciones (1 Y 30). Los datos están expresados en valores promedio de densidad óptica ± DS. El asterisco indica diferencias significativas (*) $p \leq 0.01$.

Por lo tanto, el uso de quitosano soluble y en micropartículas como estrategia adyuvante, fue eficiente en la inducción de inmunogenicidad específica contra el antígeno GnRXG/Q, lo que coincide con resultados obtenidos por otros investigadores, donde el quitosano soluble (Seferian y Martinez 2001; Zaharoff *et al.*, 2007; Saenz *et al.*, 2009) y en micropartículas (Davis 2006; Jiang *et al.*, 2008) indujo una respuesta inmune específica potente contra distintos antígenos vacunales. Además, en concordancia con lo descrito por otros investigadores (Seferian y Martinez 2001; Zaharoff *et al.*, 2007), el quitosano indujo una respuesta de tipo mixta Th1/Th2, con producción de IgG1 asociada a una respuesta de tipo Th1 o celular e IgG2a, asociada a una respuesta de tipo Th2 o humoral (Abbas, 2012). Además, la vacunación fue capaz estimular una inmunogenicidad cruzada, es decir, indujo la producción de anticuerpos específicos contra la hormona nativa GnRH-I, similar a los observado por Sáenz *et*

al., (2009) usando quitosano soluble como adyuvante para el bloqueo inmunológico de la hormona GnRH-I. En relación a esto, se pudo observar que los títulos de anticuerpos contra el antígeno recombinante aumentaron considerablemente desde la primera vacunación, en cambio, los anticuerpos específicos contra la hormona nativa aumentaron preferentemente luego de la revacunación, lo que indica que la respuesta contra la proteína nativa requiere de la revacunación para la generación de células de memoria que permitan una respuesta potente y duradera.

Cambios histológicos gonadales en los animales vacunados

Se realizó el conteo de los folículos y cuerpos lúteos claramente definidos en el parénquima ovárico, analizando 20 cortes consecutivos. En dicho análisis, se pudo determinar que en el caso de las hembras inmunizadas con la formulación que usó quitosano como adyuvante, tanto en la formulación soluble como en micropartículas existe un menor número de folículos en estadios avanzados de desarrollo o antrales, predominando la presencia de folículos en estadios tempranos de desarrollo o folículos primarios, en relación al grupo control (tabla 1). En relación a la presencia de cuerpos lúteos, se encontró una disminución del tejido luteal claramente definido en los ovarios de los animales inmunizados con quitosano soluble como estrategia adyuvante (tabla 1).

Las observaciones realizadas en el tejido gonadal de los animales vacunados se ven representadas en las figura 3, 4 y 5.

Tabla 1: Conteo visual de folículos antrales y cuerpos lúteos claramente definidos observados en el parénquima ovárico en los distintos grupos experimentales. Los resultados representan el promedio del conteo realizado a partir de los distintos cortes histológicos de ovarios de los animales pertenecientes a los tres grupos en estudio.

Grupo Experimental	Folículos antrales o preovulatorios	Cuerpos lúteos
Quitosano Soluble	1	2
Micropartículas de Quitosano	3	5
Grupo Control	6	10

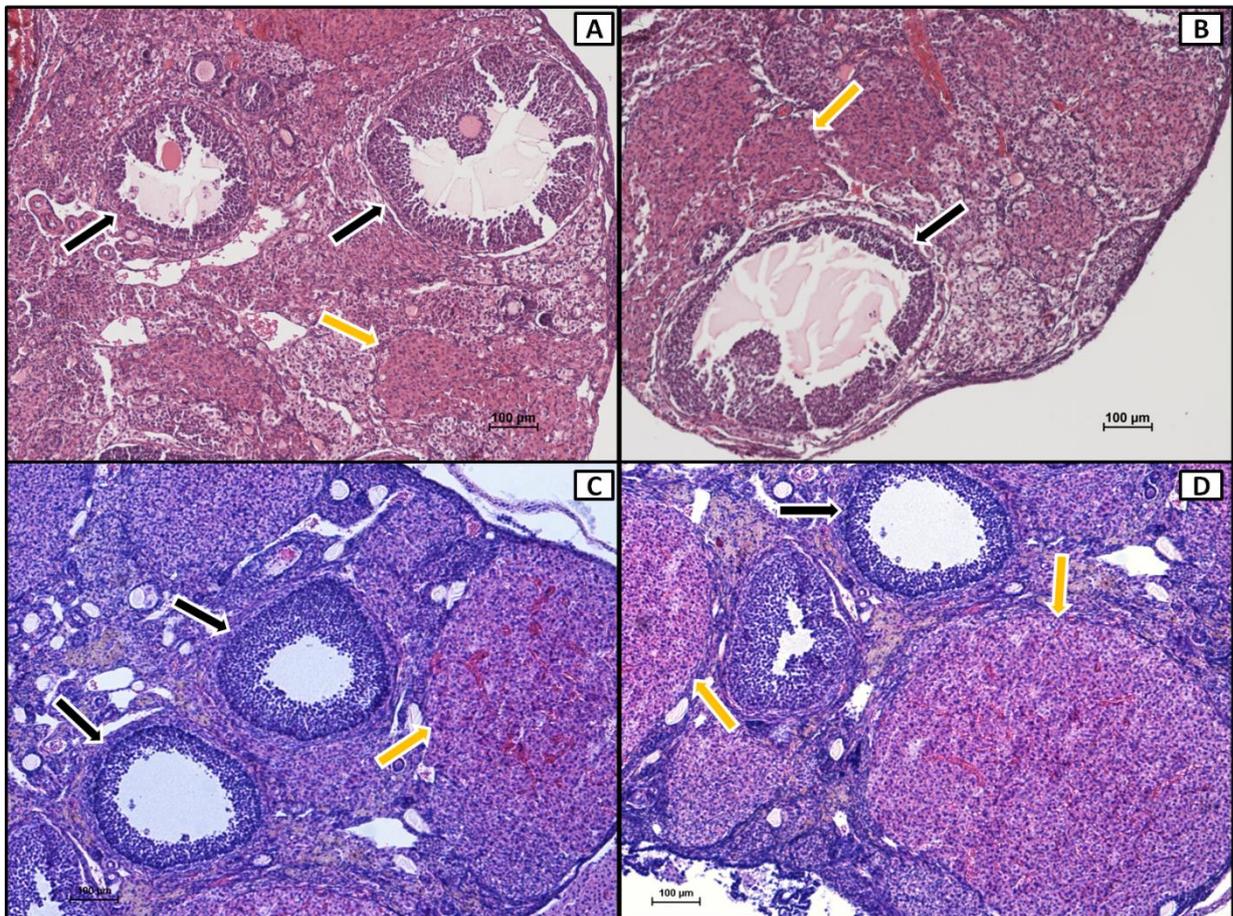


Figura 3. Cortes de ovarios de hembras del grupo control, inoculadas solo con el adyuvante, en ausencia del antígeno. Las flechas negras indican folículos en estadios tardíos de desarrollo o antrales y las flechas amarillas indican tejido luteal en el parénquima ovárico. Tinción H/E 40x. A, B, C y D corresponden a distintos animales del grupo control.

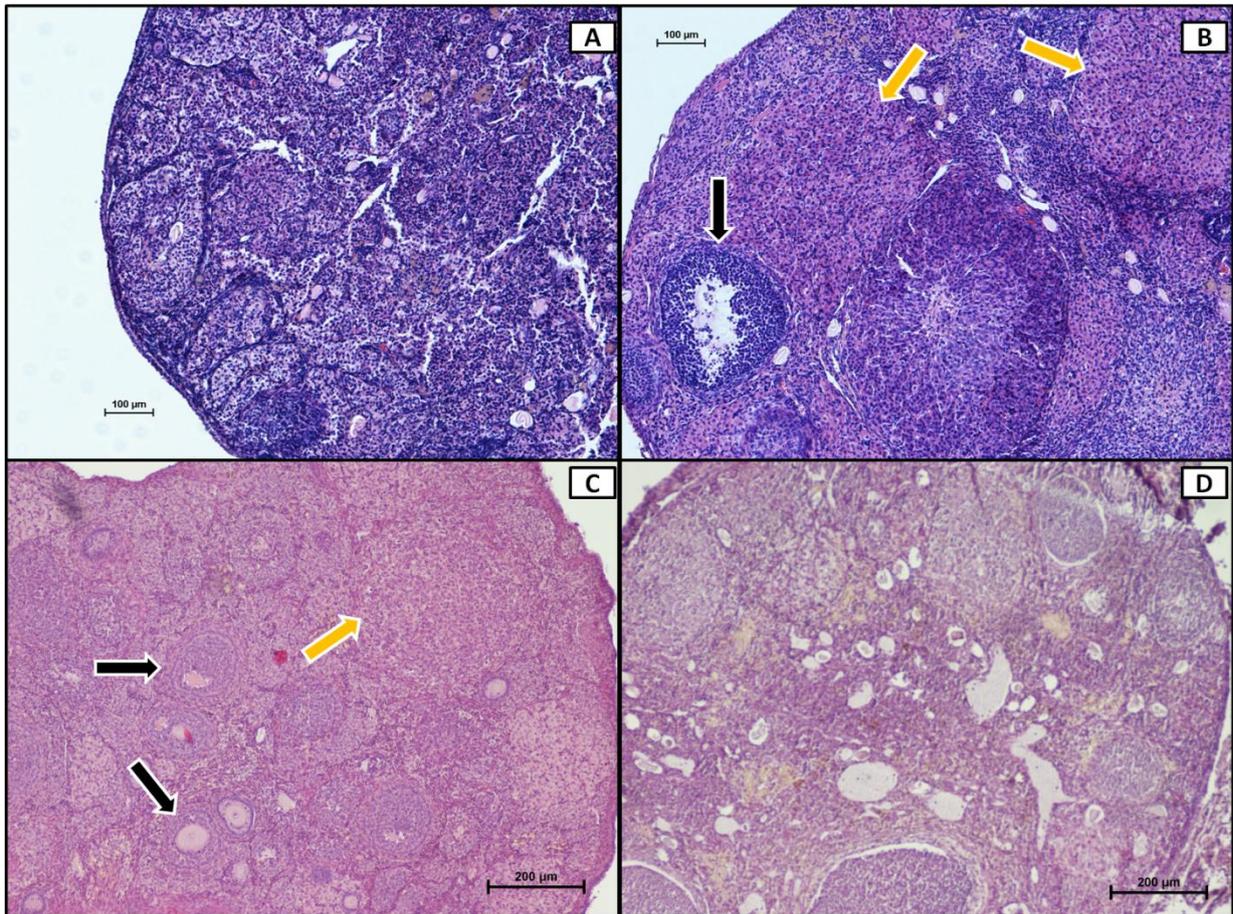


Figura 4. Cortes de ovarios de hembras inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q y quitosano soluble como adyuvante. Las flechas negras indican folículos en estadios tardíos de desarrollo o antrales y las flechas amarillas indican tejido luteal en el parénquima ovárico. Tinción H/E 10x (A, C y D) 40x (B). A, B, C y D corresponden a distintos animales del grupo inmunizado con quitosano soluble. En A y D se observa atrofia ovárica, sin presencia de folículos antrales ni de cuerpos lúteos claramente definidos en el

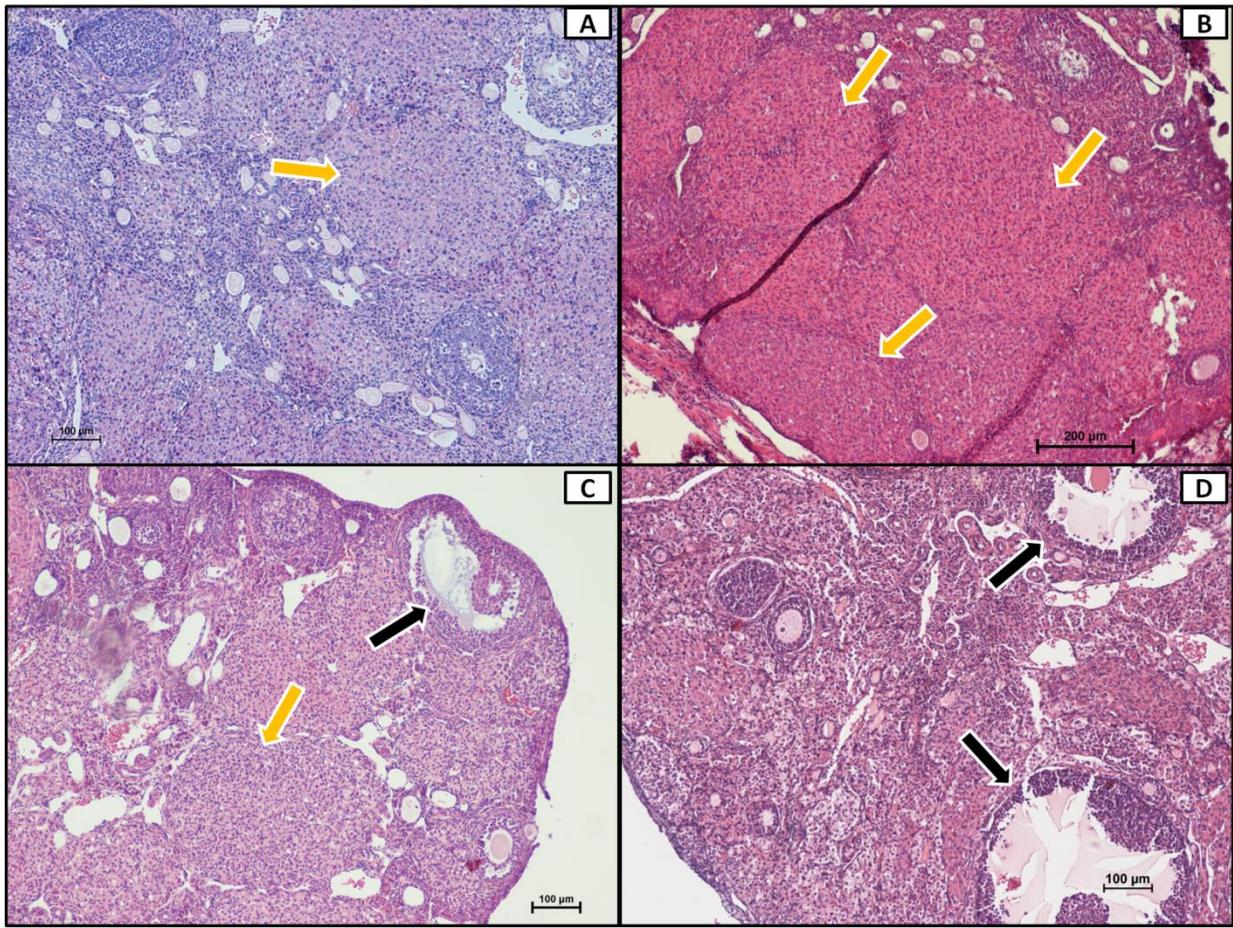


Figura 5. Cortes de ovarios de hembras inmunizadas con la proteína recombinante GnRXG/Q y micropartículas de quitosano como adyuvante. Las flechas negras indican folículos en estadios tardíos de desarrollo o antrales y las flechas amarillas indican tejido luteal en el parénquima ovárico. Tinción H/E 40x (A y D) y 10x (A y B). A, B, C y D corresponden a distintos animales del grupo inmunizado con micropartículas de quitosano.

Tal como se ha observado en otros estudios (Hsu *et al.*, 2000), el bloqueo inmunológico de la hormona GnRH-I induce cambios degenerativos en los ovarios de las hembras inmunizadas. En este sentido, en el presente estudio se observó que el uso de quitosano soluble como estrategia adyuvante indujo mayor atrofia ovárica que la estrategia de micropartículas de quitosano, es decir, la formulación de quitosano soluble resultó más eficiente en el bloqueo de la actividad ovárica de los animales inmunizados.

Sin embargo, es importante considerar en futuros estudios, la realización de la sincronización reproductiva de las hembras antes de la vacunación, lo que facilitaría de forma importante los análisis posteriores realizados en el tejido ovárico y eventualmente en los niveles de progesterona o estrógenos sexuales séricos, principalmente, debido a que el ciclo reproductivo

de los ratones hembras es de 4 a 5 días en promedio (Baligar y Kaliwal, 2002), lo que hace difícil realizar comparaciones con exactitud, ya que es posible encontrar a las hembras en distintas etapas del ciclo reproductivo.

Cambios histológicos hipotalámico-hipofisarios en los animales inmunizados

Esta técnica permitió conocer a nivel celular la localización de la proteína GnRH-I en 30 cortes consecutivos del tejido hipotalámico-hipofisario, para lo cual se utilizó un anticuerpo específico contra la hormona GnRH-I (Santa Cruz Biotechnology, Inc).

La hormona GnRH-I se expresa en distintos órganos diferentes al encéfalo, entre ellos el intestino (Huang *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2003), por lo cual en primer lugar se determinó la expresión de GnRH-I en la lámina propia de intestino delgado como control positivo (figura 6).

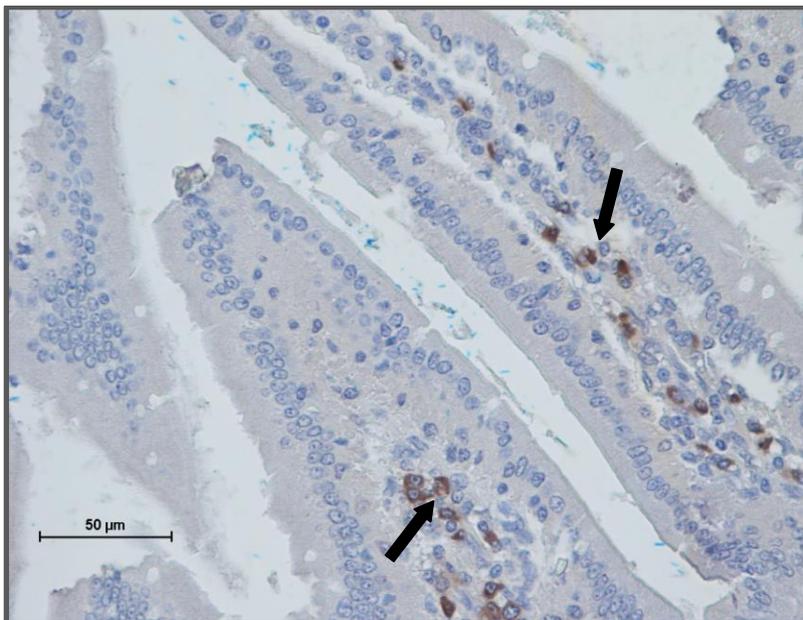


Figura 6. Corte de intestino delgado de ratón sometido a inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti GnRH-I. Las flechas muestran las células positivas. Tinción de contraste Hematoxilina 40x.

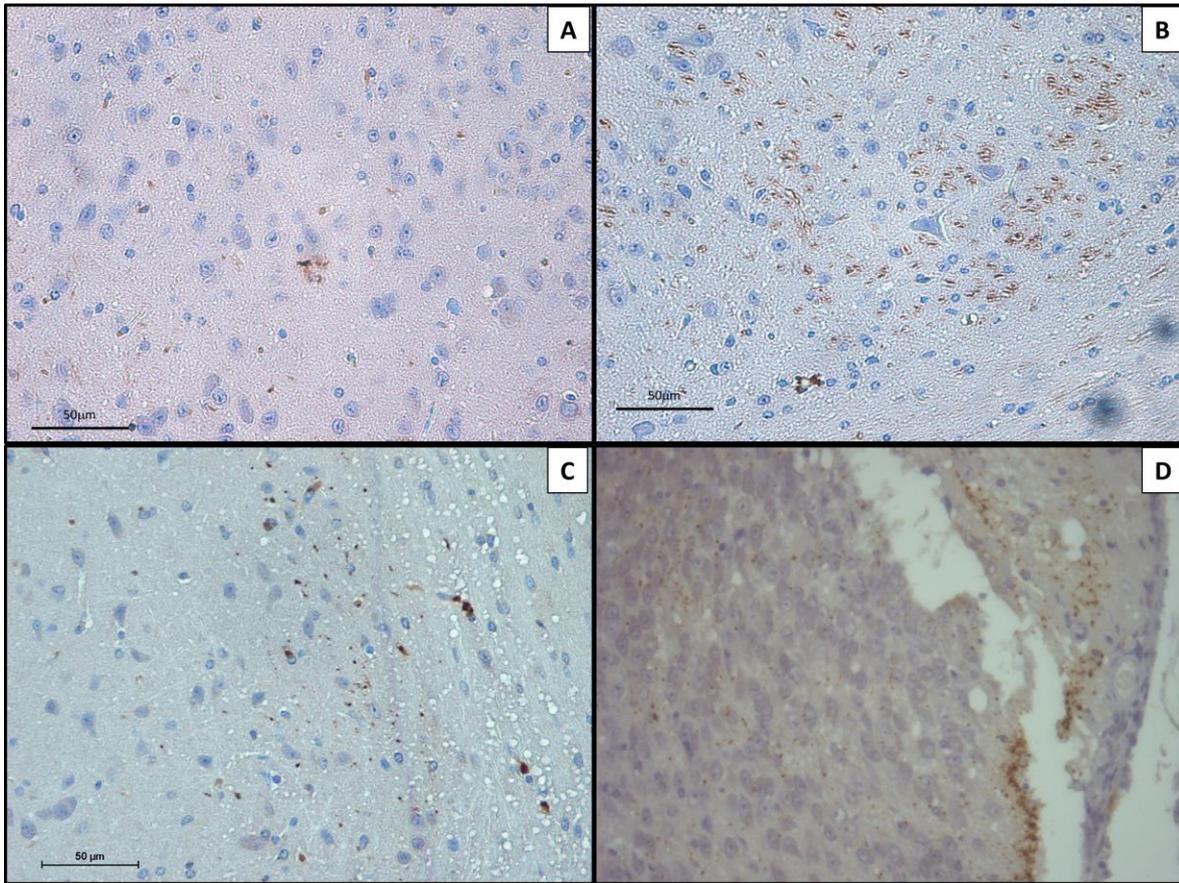


Figura 7. Cortes de encéfalo de ratones del grupo control, inoculados solo con la formulación adyuvante, sometidos a inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti GnRH-I. Las células marcadas en color marrón corresponden a células positivas en la zona de interés. Tinción de contraste Hematoxilina (40X). A, B, C y D corresponden a cortes histológicos de diferentes animales pertenecientes al grupo control.

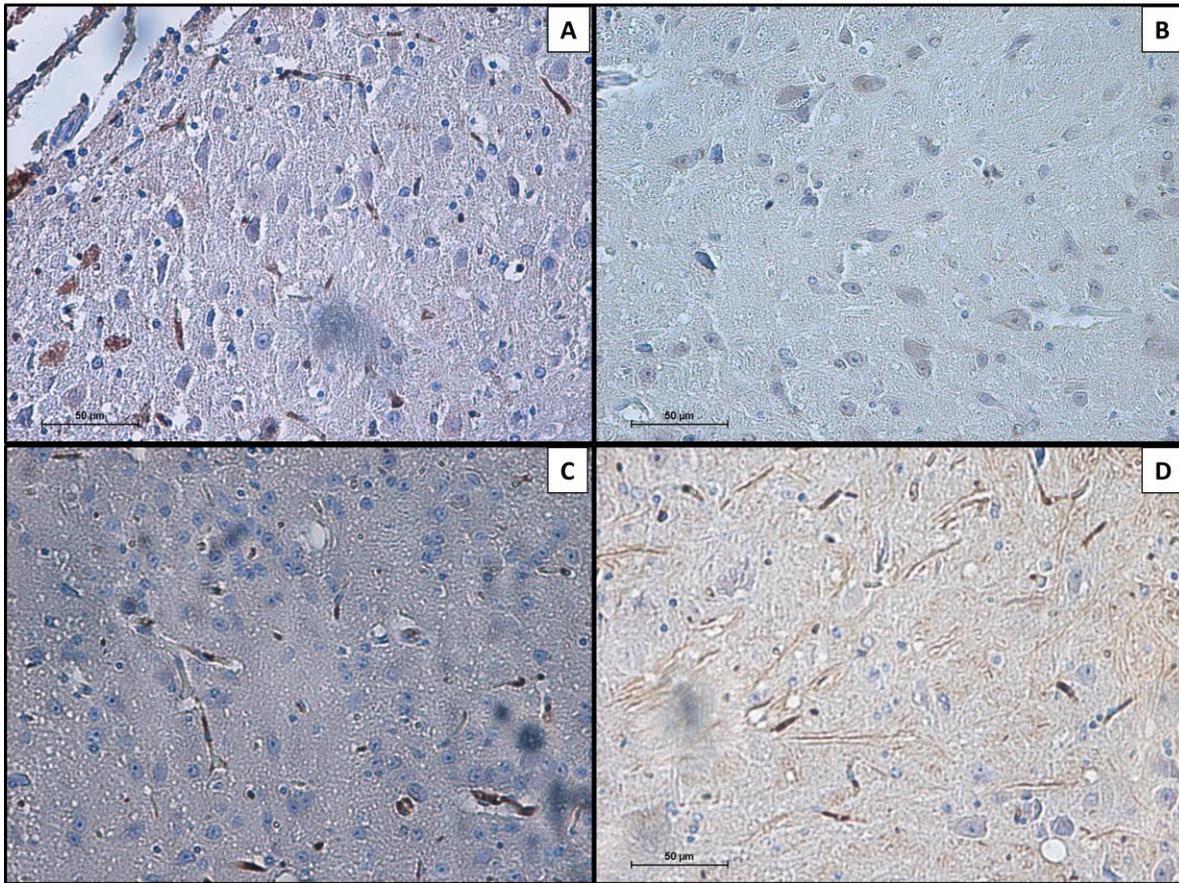


Figura 8. Cortes de encéfalo de ratones del grupo inmunizado con el antígeno recombinante GnRXG/Q y quitosano soluble como adyuvante, sometidos a inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti GnRH-I.. Las células marcadas en color marrón corresponden a células positivas en la zona de interés. Tinción de contraste Hematoxilina (40X). A, B, C y D corresponden a cortes histológicos de diferentes animales pertenecientes al grupo control.

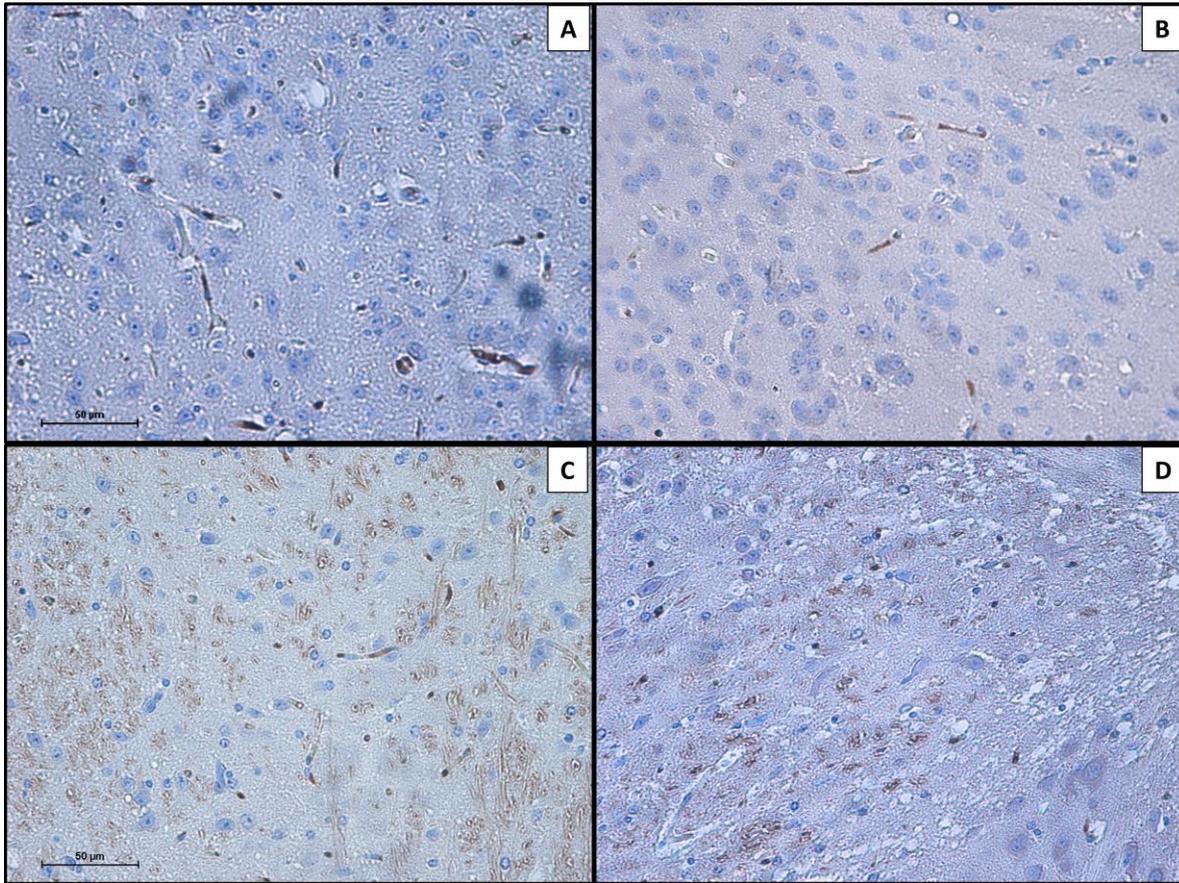


Figura 9. Cortes de encéfalo de ratones del grupo inmunizado con el antígeno recombinante GnRXG/Q y micropartículas de quitosano como adyuvante, sometidos a inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo anti GnRH-I. Las células marcadas en color marrón corresponden a células positivas en la zona de interés. Tinción de contraste Hematoxilina (40X). A, B, C y D corresponden a cortes histológicos de diferentes animales pertenecientes al grupo control.

Al analizar las células positivas a GnRH-I en los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se observó marcaje positivo en los tres grupos de estudio (figuras 7, 8 y 9). Al analizar las muestras de forma cualitativa, se observó mayor cantidad de células positivas en los cortes de animales inmunizados con el antígeno vacunal y quitosano soluble que en los animales inmunizados con micropartículas de quitosano como adyuvante. Además, los cortes de animales de los grupos control (inoculados solo con el adyuvante, sin el antígeno vacunal) presentaron el menor número de células positivas a GnRH-I, en relación a los dos grupos de animales vacunados con el antígeno GnRXG/Q. Esto podría explicarse, debido a que la vacuna indujo alteraciones en el parénquima ovárico, lo que induciría una disminución en la producción de esteroides gonadales, inhibiendo probablemente el feedback negativo que estos realizan a hipotálamo, generándose así una mayor producción de la hormona GnRH-I a nivel

hipotalámico, que no se encuentra sometido al control natural de su secreción, dado por la producción de esteroides gonadales en los animales no inmunizados (Clarke y Pompolo, 2005; Turkstra y Muelen, 2006).

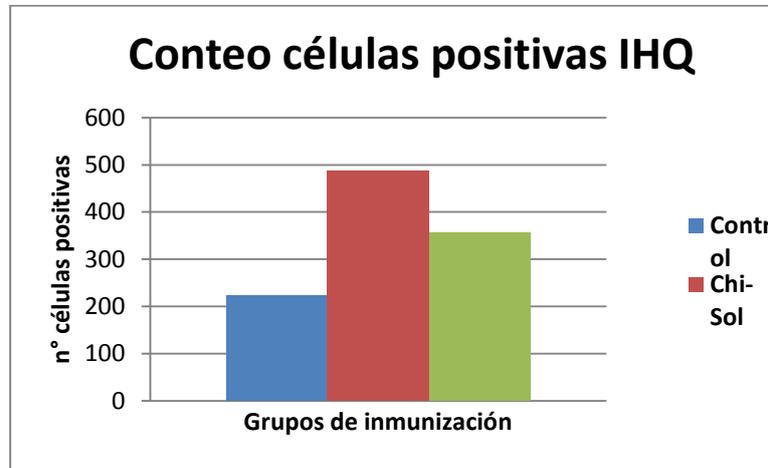


Figura 10. Número de células positivas a GnRH-I en los cortes de encéfalo de los animales control, vacunados con el antígeno GnRXG/Q y quitosano soluble (Chi Sol) o micropartículas de quitosano (Chi Mp) como adyuvante.

Si bien se realizó la cuantificación de células positivas en la zona de interés, se encontraron muchas diferencias entre los distintos cortes de los diferentes animales, por lo cual no se pudo realizar un análisis cuantitativo ni evaluar la significancia estadística de los resultados obtenidos (figura 10). Debido a la dificultad de obtener cortes encefálicos exactamente en la misma zona, que permitan realizar una cuantificación objetiva de las células positivas en los distintos animales de los diferentes grupos experimentales, en futuros estudios que utilicen la determinación de GnRH-I mediante inmunohistoquímica, esta técnica debe ser necesariamente previamente estandarizada en ratones, principalmente en cuanto a las zonas específicas y número de cortes a analizar, para poder realizar un análisis cuantitativo certero de los resultados obtenidos. Además, para entregar más exactitud y objetividad a estos análisis, sería recomendable que en estudios futuros donde se quiera determinar la expresión de GnRH-I en encéfalo, la técnica de inmunohistoquímica sea realizada en conjunto con otro método de tipo cuantitativo, como la reacción de la polimerasa en cadena cuantitativa o en tiempo real (qPCR), ya que la determinación de GnRH-I mediante qPCR ya ha sido estandarizada y realizada con éxito (Giacobini *et al.*, 2007). Esto permitiría hacer un análisis cuantitativo y más certero de los cambios en la expresión de dicha hormona en los animales inmunizados.

CONCLUSIONES

1. La vacunación con el antígeno GnRXG/Q usando quitosano soluble y micropartículas de quitosano, induce una respuesta inmune específica contra el antígeno vacunal en los animales inmunizados, a partir de la primera vacunación.
2. La vacunación con el antígeno GnRXG/Q con ambas formulaciones adyuvantes induce una inmunogenicidad cruzada contra la hormona GnRH-I en los animales inmunizados, siendo esta significativa luego de la revacunación.
3. El perfil de respuesta inmune específica contra el antígeno GnRXG/Q y contra la hormona nativa GnRH-I fue mixta, de tipo Th1/Th2 dado por el isotipo de inmunoglobulinas expresado.
4. Disminuye el número de folículos preovulatorios y de cuerpos lúteos en el parénquima ovárico de los animales inmunizados, siendo esta atrofia ovárica más evidente en el caso del quitosano soluble como estrategia adyuvante. Sin embargo, se sugiere que en futuros estudios se realice la sincronización de las hembras antes de la vacunación para poder determinar de forma fehaciente los niveles de esteroides gonadales y compararlos con los cambios histológicos observados.
5. Existe un mayor número de células positivas a GnRH-I en la zona hipotalámico-hipofisiaria de los animales inmunizados en relación al grupo control, sin embargo, estas diferencias no pueden ser analizadas en términos cuantitativos, por lo que se sugiere que en futuros ensayos se incluya una técnica cuantitativa, como el qPCR para hacer más objetivos dichos resultados y poder realizar un análisis estadístico de los cambios en la expresión de GnRH-I en los animales inmunizados.

BIBLIOGRAFÍA

- **ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S.** 2008. *Inmunología Celular y molecular*. 6ª Edición Geo Consultoría Editorial. Barcelona, España. 566p.
- **ACKERMAN, A.L.; KYRITSIS, C.; TAMPE, R.; CRESSWELL, P.** 2005. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nature Immunology* 6: 107–113.
- **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. *Biotechnología Aplicada*. 20:20-24.
- **CHAVARRIA, A.; ALCOCER-VARELAB, J.** 2004. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmunity Reviews* 3:251-260.
- **CLARKE, I.J.**, 2002. Two decades of measuring GnRH secretion. *Reprod. Suppl.* 59:1-13.
- **CLARKE, IJ.; POMPOLO, S.** 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88: 29-55.
- **DALPKE, A. H.; SCHAFER, M.K; FREY, M.; ZIMMERMANN, M.; TEBBE, J.; WEIHE, E.; HEEG, K.** 2002. Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *Journal of Immunology* 168:4854-4863.
- **DAVIS, S.S.** 2006. The use of soluble polymers and polymer microparticles to provide improved vaccine responses afterparenteral and mucosal delivery. *Vaccine* 24:7-10.
- **FÁBREGA, E., VELARDE, A., CROS, J., GISPERT, M., SUAREZ, P., TIBAU, J., SOLER, J.** 2010. Effect of vaccination against gonadotrophin-releasing hormone, using IMPROVEST, on growth performance, body composition, behaviour and acute phase proteins. *Livestock Production Science* 132:53-59.
- **FERRO, V.A.; COSTA, R.; CARTER, K.C.; HARVEY, M.J.A.; WATERSTON, M.M.; MULLEN, A.B.; MATSCHKE, C.; MANNA, J.F.S.; COLSTON, A.; STIMSON, W.H.** 2004. Immune responses to a GnRH-based anti-fertility immunogen, induced by different adjuvants and subsequent effect on vaccine efficacy. *Vaccine* 22: 1024-1031.
- **FRANK, D.** 2007. Interdog aggression: when to intervene? WSAVA World Congress, Sydney Australia.
- **GEARY, T.W.; GRINGS, E.E.; MACNEIL, M.D.; DEAVILA, D.M.; REEVES, J.J.** 2006. Use of recombinant gonadotropin-releasing hormone antigens for immunosterilization of beef heifers. *Journal of Animal Science* 84:343-350.

- **GIACOBINI, P.; MESSINA, A.; WRAY, S.; GIAMPIETRO, C.; CREPALDI, T.; CARMELIET, P.; FASOLO, A.** 2007. Hepatocyte growth factor acts as a motogen and guidance signal for gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration. *The Journal of Neuroscience* 27:431-445.
- **HERBERT, C; TRIGG, T.** 2005. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science* 88:141-153.
- **HUANG, QW.; YAO, B.; SUN, L.; PU, RL.; WANG, L.; ZHANG, RQ.** 2001. Immunohistochemical and in situ hybridization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract. *Life Sciences* 68:1727-1734.
- **JIANG, HL.; KANG, ML.; QUAN JS, KANG SG, AKAIKE T, YOO HS, CHO CS.** 2008. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29:1931-1939.
- **KENNEY, R.; EDELMAN, R.** 2004. Adjuvants for the Future. *New Generation Vaccines*, 3^o Ed. Myron Levine and others, eds. Nueva York. 2^a Edición. 173-192p.
- **KIRKPATRICK, JF.; LYDA, RO.; FRANK, KM.** 2011. Contraceptive vaccines for wildlife: a review. *American Journal of Reproductive Immunology* 66:40-50.
- **LOPEZ, M.; MALLORQUÍN, P.; PARDO, R.; VEGA, M.** 2004. Vacunas de nueva generación. *Genoma España/ CIBT-FGUAM*, Madrid. 113 p.
- **MCELRATH MJ.** 1995. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Seminars Cancer Biology* 6: 375-385.
- **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.
- **REDDY, S.T.; SWARTZ, M.A.; HUBBELL, J.A.** 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: Developing the next generation of vaccines. *Trends in Immunol* 27:573-579.
- **ROBINS, S.C.** 2002. Active immunization of prepubertal cats against gonadotropin releasing hormone and its effects on gonadal hormone concentration and reproductive function. In: *Proceedings of the International Symposium on Nonsurgical Methods for Pet Population Control*, Georgia, USA, pp. 51-53.
- **ROITT, IM.; BROSTOFF J.; MALE, D.** 2001. *Immunology*. 6^o Edición, Editorial Mosby.
- **SÁENZ, L.; NEIRA-CARRILLO, A.; PAREDES, R.; CORTÉS, M.; BUCAREY, S.; ARIAS, J.L.** 2009. Chitosan formulations improve the immunogenicity of a GnRH-I peptide-based vaccine. *International Journal of Pharmaceutics*. 369:64-71.

- **SENEL, S.** 2011. Chitosan-Based Particulate Systems for Non-Invasive Vaccine Delivery. *Advances in Polymer Science* 243:111-138.
- **STANISLAUS, D; PINTER, JH; JANOVICK, JA; CONN, PM.** 1998. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropinreleasing hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 144:1-10.
- **STORNI , T.; KUNDIG, TM.; SENTI, G.; JOHANSEN, P.** 2005. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:333-355.
- **TURKSTRA, J.; MELOEN R.** 2006. Active immunization against gonadotropin-releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals. <http://www.vetscite.org/publish/articles/000062/print.html> [consulta: 29-3-2010].
- **WOJCIK-GLADYSZ, A.; NOWAK, K.W.; PIERZCHALA-KOZIEC, K.; WANKOWSKA, M.; MISZTAL, T.; POLKOWZKA, J.; NOWAK, M.; KACZMAREK, P.; GORSKA, T.; SZCZEPANKIEWICZ, D.; ZUBEL, J.** 2009. Aspects of central and peripheral regulation of reproduction in mammals. *Reproductive Biology* 6:80-103.
- **YAO, B.; HUANG, QW.; PU, RL.; SUN, L.** 2000. In situ hybridization study of gonadotropin releasing hormone receptor mRNA in rat digestive tract. *Acta Anatomica Sinica* 31:248-252.
- **YAO, B.; HUANG, W.; HUANG, Y.; CHUI, Y.; WANG, Y.; LI, H.; PU, R.; WAN, L.; ZHANG, R.** 2003. A study on the localization and distribution of GnRH and its receptor in rat. *Life Sciences* 72:2895-2904.