

Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocitos de cerdo



Héctor Serrano*

María Dolores García-Suárez**

Abstract

Feral dog population control is not an easy task in highly populated cities, even when there are high cost sterilization campaigns. Mexico City's street dog population increases constantly, invasive sterilization techniques are out of the regular family budget, and an alternative strategy to control this population is needed. Since the early 70's, the acellular egg coat named the zona pellucida has been considered as a target for fertility regulation in human and animal populations. The goal of the present work was to analyze the alterations in the ovarian histology of female dogs actively immunized with porcine ZP₃ protein. Results obtained show that active immunization induces a significant reduction in fertility as indicated by the lower amount of first and second degree follicles, and an increase in leukocyte infiltration in response to the protein inoculation.

Key words: FERTILITY CONTROL, ZP₃, OVARIES, HISTOLOGY ALTERATIONS, FEMALE DOGS.

Resumen

El control de la población canina en ciudades densamente pobladas dista de ser simple a pesar de que se instrumentan costosas campañas de esterilización, la sobre población canina se incrementa constantemente en la ciudad de México. El costo de la esterilización quirúrgica de los animales de compañía de las clases con menos recursos económicos, evita que se use con la frecuencia deseada por lo que se requiere del desarrollo de una estrategia alternativa. Desde principios de la década de los años 70, la zona pelúcida (ZP) que recubre a los ovocitos ha sido considerada como un potencial blanco para la regulación de la fertilidad de poblaciones tanto humanas como animales. En este trabajo, se informa acerca de los efectos que ejerce la inmunización activa con la proteína ZP₃ porcina sobre la estructura del ovario de perras. Los resultados muestran una disminución en el número de folículos primarios y secundarios, así como un aumento en la infiltración de linfocitos de los ovarios de perras tratadas con distintas dosis de proteína.

Palabras clave: CONTROL DE LA FERTILIDAD, ZP₃, OVARIO, ALTERACIONES HISTOLÓGICAS, PERRAS.

Introducción

En la ciudad de México, al igual que en las grandes ciudades o incluso en las islas densamente pobladas, el control de la

población canina es de gran importancia. Esto último se debe no sólo a la competencia por espacio, sino al peligro que representa para el humano el hecho de que sea mordido por un perro y estar expuesto a contraer la rabia.

Recibido el 16 de febrero de 2001 y aceptado el 4 de junio de 2001.

* Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, Apartado Postal 55-535, 09340, México, D.F.

** Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, Apartado Postal 55-535, 09340, México, D.F.

Correspondencia: Héctor Serrano, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, Apartado Postal 55-535, 09340, México, D.F. Tel. 5804-4733, Fax: 5804-4727.

Además, el fecalismo al aire libre de los animales que habitan en la calle o el descuido de las personas que los mantienen en espacios reducidos y que no les permiten tener un lugar en el interior para que realicen sus necesidades fisiológicas, forman un foco de contaminación adicional.

En los países en vía de desarrollo, o en comunidades de bajos recursos, la adquisición de perros como animales de compañía, no implica forzosamente que los animales se encuentren dentro de las instalaciones ocupadas por las familias.

En Amecameca, Estado de México, es aún muy común observar animales que se mantienen en la calle, pero que son alimentados por personas, que se constituyen en el entorno del animal.¹

Podría pensarse que éste es un problema del subdesarrollo. Si bien esto último es parcialmente cierto, los países desarrollados presentan una problemática semejante; sobre todo en la etapa posreproductora de sus animales, pues son descuidados y eventualmente estas personas adquieren más animales de compañía.² La presencia de perros en las calles de las grandes ciudades es el reflejo del descuido tanto en la alimentación como en cuidados que mantiene este tipo de población canina.

Los métodos de control de la fertilidad de poblaciones no humanas que se han tratado de instrumentar son muy variados, van desde los métodos de barrera hasta los de esterilización quirúrgica, pasando por los sistemas hormonales.

En términos generales y con excepción de los métodos quirúrgicos, la eficiencia de estos métodos es muy variable. Así mismo, los costos de la esterilización quirúrgica están alejados del presupuesto de la mayoría de los habitantes de las zonas de bajos ingresos. Aun y cuando la esterilización la realice en las instalaciones del Sector Salud, es muy bajo el número de personas que cubre el importe que representa la esterilización de sus animales.

Desde hace varios años, la utilización de moléculas específicas de gametos ha sido contemplada para utilizarse en la instrumentación de estrategias de control de la fertilidad no sólo de poblaciones caninas, sino de otros animales, como los caballos. La presencia de estas moléculas en sitios inaccesibles al sistema inmune es la Zona Pelúcida (ZP), cubierta compuesta por tres glucoproteínas que sintetizan los ovocitos en crecimiento, es secretada al medio y ensamblada en el espacio que forman el propio ovocito y las células foliculares que le rodean.³ El objetivo del presente estudio fue observar las alteraciones histológicas que promueve la proteína ZP₃ al ser inoculada en perras adultas.

Material y métodos

La producción del inmunógeno se realizó al obtener las proteínas purificadas de acuerdo con la técnica de Hedrick y Wardrip⁴ con variaciones menores. Los ovarios obtenidos de cerdas recién sacrificadas, se trasladaron al laboratorio en solución salina adicionada de gentamicina en baño de hielo. En el laboratorio se maceraron con ayuda de un procesador de alimentos en un amortiguador PBS-citratos-EDTA; el homogenado se filtró en mallas de nailon de apertura decreciente desde 1 000, 500, 250, 125 y 54 μm ; este último se lavó varias veces en amortiguador hasta que el análisis al microscopio reveló la presencia de ovocitos íntegros o fragmentos de zona pelúcida (ZP).

Los filtros de 54 mm se colocaron en agua desionizada estéril por espacio de 30 minutos con el propósito de inducir la osmólisis de los ovocitos; lo anterior se confirmó mediante microscopía.

Las ZP se calentaron 86°C en amortiguador de carbonatos pH 8 durante 30 minutos. La solución se liofilizó y sometió a desglucolización con ácido trifluorometil sulfónico (TFMS), de acuerdo con la metodología de Karp *et al.*⁵ La ZP liofilizada se incubó por seis horas en una mezcla de anisol-TFMS (9:1, v/v) en baño de hielo seco-acetona. La desglucolización se finalizó con piridina. Se dializó contra NH₄CO₃ 5 mM. La proteína ZP₃ se separó mediante electroforesis preparativa en un sistema no reductor de poliacrilamida. La fracción correspondiente a la proteína ZP₃ se cortó y recuperó mediante electroelución.⁴ La proteína recuperada se liofilizó para concentrar y posteriormente se diluyó para cuantificar con la técnica del ácido bicíncónico.⁶

La preparación del inmunógeno se realizó utilizando cantidades diferentes de proteína que mantuvieran un volumen constante de 0.5 ml con solución salina a la que se le agregó un volumen igual de aluminato de sodio y magnesio, que se utilizó como adsorbente. La emulsión se homogeneizó mediante la utilización de una jeringa de doble barril y se inoculó intramuscularmente.

Se utilizaron perras criollas adultas mantenidas en condiciones de semicautiverio en el Retiro Franciscano para animales de compañía localizado en la Carretera México-Toluca. Se hicieron cinco grupos de cuatro animales cada uno, de entre dos a cuatro años de edad, a los cuales se les inoculó 25, 50, 100, 150 μg de ZP₃ por kg de peso. En cada caso, la cantidad de ZP₃ se inoculó en una sola dosis. Al quinto lote se le administró por la misma vía un volumen similar del vehículo en el que se disolvió la ZP₃ y se tomó como grupo testigo.

Los animales fueron dejados en condiciones normales sin evitar el contacto con machos durante un año calendario. Al término del estudio, los animales fueron ovariectomizados bilateralmente bajo tratamiento con clorhidrato de propiomazina* y anestesia con pentobarbital sódico.**

* Combelen, Bayer, México.

** Anestesal, Smith-Kline, México.

Los ovarios se incluyeron en formalina para ser procesados histológicamente. El tejido se deshidrató en alcoholes graduales antes de ser incluido en parafina. Los bloques se cortaron en un microtomo a 15 μ de grosor y los cortes se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina después de haberse rehidratado. Al final de la elaboración de dos laminillas por ovario, se codificaron antes de ser analizadas.

En el análisis al microscopio se tomó en cuenta el número de folículos primarios, en desarrollo y a término. Dentro de los aspectos de patología, se tuvo particular interés en la presencia de quistes e infiltración linfocitaria, ya que son las principales lesiones indicadoras de disminución de la fertilidad.⁷ Se analizaron al menos seis cortes seriados para determinar las características de un determinado folículo. La evaluación estadística se realizó mediante un análisis de Kruskal Wallis para variables discretas.⁸

Resultados

La inmunización con ZP₃ altera la cantidad de folículos en diferente etapa de maduración de los ovarios de las perras inmunizadas en una forma dependiente de la dosis utilizada. En el Cuadro 1 se muestran las cantidades de folículos en diferentes etapas. Como puede verse, los folículos primarios se reducen drásticamente aun en las dosis más bajas. Cuando se trataron a las perras con la dosis de 50 mg/kg de peso, se afectó además a los folículos secundarios. De manera concomitante, la cantidad de folículos infiltrados con leucocitos aumentó significativamente ($P < 0.005$), indicando la alteración inducida en los ovarios de los animales tratados. Por último, el mayor daño coincidente con la disminución de folículos primarios y la ausencia de folículos secundarios o a término, se obtuvo con la mayor dosis utilizada.

Como consecuencia de las alteraciones histológicas inducidas por el tratamiento, ninguna de las hembras utilizadas quedó preñada. En los animales del grupo testigo se presentaron al menos dos ciclos estrales, mientras que en el caso de los grupos experimentales esto no sucedió, aún en los que recibieron 25 mg/kg. Obviamente, el comportamiento característico del celo en las perras y las alteraciones en la conducta que provocan en los machos no se presentaron en el grupo experimental. Dos de los cuatro animales del grupo testigo quedaron preñadas en el primer celo y una más lo hizo en el segundo celo que presentó.

Discusión

La esterilización representa una alternativa para controlar las poblaciones de animales domésticos. Sin embargo, gran cantidad de animales que "viven" en la calle ha hecho ineficientes los esfuerzos para disminuir y mantener en un número intermitente estos animales. Esto último se debe tanto a la práctica de mantenimiento de animales de compañía en México, como al costo que implica la esterilización quirúrgica; este proceso debe ser realizado por personal capacitado y bajo condiciones adecuadas.

En otros países, principalmente en Estados Unidos de América, se ha tratado de controlar poblaciones de animales, silvestres o domésticos, con la aplicación de una estrategia de inmunización activa.⁹ Esta última implica la inyección de extractos de ovarios heterólogos o de ovocitos. La cubierta glicoproteína que rodea a los ovocitos del cerdo ha sido utilizada como principal agente para el desarrollo de vacunas capaces de regular la fertilidad. El método cubierto por la patente de Gwatkin¹⁰ implica la inmunización con zona pelúcida de ovocitos de diversas fuentes para inducir un estado de infertilidad.

Cuadro 1
EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON ZP₃ PORCINA EN OVARIOS DE PERRAS ADULTAS

ZP ₃ (μ g/kg)	Tipo de folículos			
	Primarios	Secundarios	Terciarios	Infiltrados
0	15 (12-16) ^a	12 (10 -15) ^a	1 (0 - 5) ^a	3 (0 - 4) ^a
25	8 (6 - 12) ^b	10 (6 - 15) ^a	1 (0 - 4) ^a	5 (0 - 7) ^b
50	6 (5 - 10) ^b	4 (0 - 6) ^b	0 (0 - 3) ^b	20 (15 - 38) ^c
100	6 (5 - 8) ^b	2 (0 - 5) ^b	0 (0 - 3) ^b	43 (35 - 58) ^d
150	6 (3 - 9) ^b	0 (0 - 3) ^c	0 (0 - 1) ^b	60 (55 - 70) ^e

Nota: Se inoculó ZP₃ en aluminato de sodio en una dosis única a lotes de cuatro animales. Después de un año calendario, las perras de cada grupo fueron ovariectomizadas y los cortes histológicos se analizaron. Los resultados son la moda de los ocho ovarios por grupo y el rango en el que se distribuyeron los datos individuales. Los subíndices diferentes en cada columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.005$)

Cuando este método de purificación se utiliza en perras, se obtienen títulos altos de anticuerpos específicos,¹¹ con ciclos estrales anormales¹² y sangrados prolongados.¹³ Las estrategias alternativas de inmunorregulación de la fertilidad en animales domésticos han comprendido igualmente la utilización de antisueros antiidiotípicos,¹⁴ sin embargo, su efectividad es muy reducida.

La zona pelúcida porcina ha sido utilizada en diferentes especies para la inmunorregulación de la fertilidad. En conejas, la histología ovárica se altera de manera similar a la que se indujo en los grupos experimentales,¹⁵ aunque la diferencia en el presente caso fue la utilización de sólo una de las tres glicoproteínas que componen a la zona pelúcida.

En yeguas¹⁶ la inoculación en varias aplicaciones da resultados prometedores. Sin embargo, para poder llegar a una infertilidad de al menos un año, se deben hacer al menos tres inmunizaciones. Para este caso, la aplicación de dosis relativamente altas de glicoproteína en una sola aplicación, es suficiente como para alterar el estado reproductivo en perras, si bien es necesario ampliar el periodo de observación.

Una de las alternativas que se tiene en este momento para la producción a escalas adecuadas con el propósito de utilizar a la ZP₃ como inmunógeno, es mediante la producción a partir de los genes clonados en bacterias¹⁷⁻¹⁹ o expresada como glicoproteína recombinante en cultivos de células de insecto.²⁰ Los resultados obtenidos en diferentes especies utilizando estas estrategias indican que la glicoproteína, que actúa como receptor primario o secundario del espermatozoide, es capaz de regular la fertilidad de especies tan diferentes como el ratón²¹ o el conejo.²² La dosis de proteína con la que se obtuvo mejores resultados fue de 100 mg/kg de peso.

Referencias

1. Ambriz-García D, Hernández-Hernández A, Juárez-Jiménez J. Encuesta de población y condiciones de los cánidos en Amecameca, Estado de México. Memorias del IV Encuentro de Intercambio para la Investigación Agropecuaria en Biología de la Reproducción; 1994 octubre 6-7; México (DF). México (DF): Universidad Autónoma Metropolitana, 1994:55-60.
2. Olson PN, Moulton C. Pet (dog and cat) overpopulation in the United States. *J Reprod Fertil* 1993;47:433-438.
3. Wassarman PM, Albertini DA. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neil JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994:79-122.
4. Hedrick JL, Wardrip NJ. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal Biochem* 1986;157:63-70.
5. Karp DR, Atkinson J, Schreffler DC. Genetic variation in glycosylation of the fourth component of murine complement. Association with hemolytic activity. *J Biol Chem* 1982;257:7330-7335.
6. Smith K, Krohn RI, Hermanson GT, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.
7. Barber MR, Fayer-Hosken RA. Evaluation of somatic and reproductive immunotoxic effects of the porcine zona pellucida vaccination. *J Exp Zool* 2000;286:641-646.
8. Canavos GC. Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos. México (DF): McGrawHill-Interamericana, 1988.
9. Artois M. Managing problem wildlife in the "Old World": a veterinary perspective. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:17-25.
10. Gwatkin RBL. Anti-fertility vaccine comprising solubilized zona pellucida and anti-serum. Washington (DC) Patent 4996297, November 16th 1976.
11. Mahi-Brown CA, Huang TTF, Yanagimachi R. Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zona pellucida. *J Exp Zool* 1982;222:89-95.
12. Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Hoffman JC, Huang TTF. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zona pellucida. Use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. *Biol Reprod* 1988;32:761-772.
13. Henderson CJ, Hulme MJ, Aitken RJ. Contraceptive potential of antibodies to the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 1988;83:325-343.
14. Grimes S, Benjamini E, Gevas P. Method for contraception by immunization against the zona pellucida. Washington (DC) patent 4795634, January 3rd. 1989.
15. Skinner SM, Mills T, Kirck HJ, Dunbar BS. Immunization with zona pellucida proteins result in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* 1984;115:2418-2432.
16. Kirkpatrick JF, Liu MK, Keiper R. Long-term effects of porcine zona pellucida immunocontraception on ovarian function in feral horses (*Equus caballus*). *J Reprod Fertil* 1992;94:437-444.
17. Dunbar BS. Recombinantly expressed rabbit zona pellucida polypeptides. patent 4996297, February 16. Washington, DC, U.S.A., 1991.
18. Serrano H, Mendoza-Perez JA, Vázquez-Granados JA, Casas E, Betancourt M. cDNA library expressing pig ovarian zona pellucida genes. *J Cell Biol* 1991;115:462.
19. Yurewicz EC, Hibler H, Fontenot GK, Sacco AG, Harris J. Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3a a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochem Biophys Acta* 1993;1174:211-214.
20. Schwoebel E, Prasad S, Timmons TM, Cook R, Kimura H, Niu EM, et al. Isolation and characterization of a full-length cDNA encoding the 55-kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem* 1991;266:7214-7219.
21. Sun W, Lou Y-H, Dean J, Tung KSK. Contraceptive peptide vaccine targeting sulfated glycoprotein ZP2 of the mouse zona pellucida. *Biol Reprod* 1999;60:900-907.
22. Kerr PJ, Jackson RJ, Robinson AJ, Swan J, Silvers L, French N, et al. Infertility in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) alloimmunized with the rabbit zona pellucida protein ZPb either as a purified recombinant protein or expressed by recombinant myxoma virus. *Biol Reprod* 1999;61:606-613.