

Veterinaria México

Volumen 36
Volume

Número 4
Number

Octubre-Diciembre 2005
October-December

Artículo:

Detección de receptores estrogénicos beta (ER β) en testículo de *Desmodus rotundus* mediante el uso de coumestrol

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.medigraphic.com

Detección de receptores estrogénicos beta (ER β) en testículo de *Desmodus rotundus* mediante el uso de coumestrol

Detection of β estrogen receptors (β ER) in *Desmodus rotundus* testis using coumestrol

Juan José Pérez-Rivero* Álvaro Aguilar-Setién** Alejandro Villa-Godoy*** Héctor Serrano†

Abstract

Desmodus rotundus is the most important vector for bovine paralytic rabies (BPR). Campaigns for controlling its population in Mexico are not satisfactory, since the BPR national reports for 2004 show an increase in the number of BPR cases in many states. The current strategy for controlling *D. rotundus* is to kill as many individuals as possible by the application of a warfarin ointment to captured animals, which spread the drug to other members of the colony during grooming activities. At present, a new no-killing culture is predominant throughout the world, for which new control methods are required to maintain populations of pest low. Based on data obtained from rodents, in which reproductive alterations were induced by phytoestrogens, we are developing a method to induce infertility with coumestrol in *D. rotundus*. In this short communication, we are reporting the initial demonstration by fluorescence that coumestrol binds to estrogen receptor β in testis of *D. rotundus*. This finding is an evidence that coumestrol is a potential agent for reproductive control for vampires.

Key words: REPRODUCTIVE CONTROL, *DESMODUS ROTUNDUS*, β ESTROGEN RECEPTOR, COUMESTROL.

Resumen

El *Desmodus rotundus* es el vector más importante de la rabia parálitica bovina (RPB). Las campañas para controlar su población en México no son satisfactorias dado que el informe nacional de RPB de 2004 muestra aumento en el número de casos en varios estados. La estrategia actual para el control de *D. rotundus* es sacrificar tantos individuos como sea posible con aplicación de un ungüento de warfarina a los animales capturados, que diseminan a otros miembros de la colonia durante el acicalamiento. Actualmente predomina una nueva cultura de no sacrificio alrededor del mundo, por lo que se requieren nuevos métodos de control para mantener bajas las poblaciones. Con base en los datos obtenidos en los que se inducen alteraciones reproductivas con fitoestrógenos en roedores, se está tratando de desarrollar un método para inducir infertilidad con coumestrol en *D. rotundus*. En este trabajo se informa la detección inicial por fluorescencia de la unión de coumestrol a receptores estrogénicos β en testículos de *D. rotundus*. Estos hallazgos indican que el coumestrol es un agente con uso potencial para el control reproductivo en vampiros.

Palabras clave: CONTROL REPRODUCTIVO, *DESMODUS ROTUNDUS*, RECEPTOR ESTROGÉNICO β , COUMESTROL.

Recibido el 11 de agosto de 2004 y aceptado el 28 de marzo de 2005.

*Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Correo electrónico: jjperez1_1999@yahoo.com y perivet@terra.com.mx

**Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Pediatría, Avenida Cuauhtémoc 330, 06720, México, D. F.

***Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

†Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. Michoacán y Purísima, s/n, Col. La Purísima, 09340, México, D. F., Tel. 5808-4733, Fax: 5804-4727, Correo electrónico: hser@xanum.uam.mx

Introduction

In spite of the efforts to control bovine paralytic rabies (BPR), transmitted by the vampire bat *Desmodus rotundus*, dissemination of this disease is still growing in Mexico. During 1999, the national cattle numbers were of 30 177 135 animals,¹ from them 19 889 477 were from states in which the BPR fighting campaign were in control phase. According to the International Animal Health Organization,² during 2003 in Mexico, 8 365 829 bovines were vaccinated against the rabies virus and only 272 focuses for cattle and 16 for chiropteran were reported.

Looking at the monthly reports for BPR in 2003 and 2004 from the National Epidemiological Surveillance Office,³ it is clear that far from an established control for this disease, it actually seems to increase since all those reported cases from January through November 2003 were outnumbered only in the period from January up to July 2004; Campeche reported 11 cases in 2003 and 14 for the shortest 2004 term; Chiapas from 8 to 15; Nayarit 1 to 4; Tabasco 15 to 17; and San Luis Potosí a reduction from 54 to 47 in the same periods.

Preventive control methods used at this time for *Desmodus rotundus* were developed during the 70's and are based on chiropteran behavior along with topical treatments with anticlotting agents, mainly warfarine. The chemical paste is applied to captured individuals that after being released, return to their nests and, due to their communal behavior, disseminate the chemical ointment to other individuals.⁴ This relative advantage is also the weakest link of the strategy since many times, the niche is already emptied and can be occupied by individuals infected with the virus.

Official data indicate that these strategies are not enough for an effective *D. rotundus* control; therefore, it is necessary to complete or substitute them with other control parameters that could incorporate criteria as selectivity, effective action, environmental protection and maintenance of occupied ecological niches. This last aspect is relevant to avoid that new rabid vampires invade the niche that was occupied by non rabid vampires killed by the warfarine treatment.⁵

The main research tendency for wild pest fauna management during the 1960's was to look for the fastest and easiest method for their removal with little interest on the consequences this could have, like non target species removal. This tendencies changed in the 1980's when plaguicide chemicals regulation was initiated. For the first time, environmental and ecological impact of any treatment had to be included and, by mid 1990's and early 2000's, need for the development of new non-lethal wild pest animal control

Introducción

Pese a los esfuerzos encaminados al control de la rabia paralítica bovina (RPB) transmitida por el vampiro *Desmodus rotundus*, la diseminación de esta enfermedad continúa en aumento en México.

El número de bovinos en el país en 1999 era de 30 177 135 cabezas;¹ de éstos, 19 889 477 se encuentran en estados donde la campaña contra la RPB está en fase de control. Según la Organización Internacional de Salud Animal, durante 2003 en México² se vacunaron 8 365 829 bovinos contra la rabia y se documentaron 272 focos de rabia en esta especie y 16 focos en quirópteros.

La revisión de informes de casos de RPB de 2003 y 2004, elaborados cada mes por la Dirección de Vigilancia Epidemiológica,³ muestra que lejos de haberse establecido un control de este padecimiento, parece aumentar, pues durante 2004 se superó el número de casos registrados hasta noviembre de 2003; particularmente en algunas entidades como Campeche, donde se registraron 11 casos acumulados y el informe preliminar de julio de 2004 presenta 14 casos; en el mismo periodo, Chiapas registró 8 y 15; Nayarit, 1 y 4; San Luis Potosí, 57 y 47; y Tabasco, 15 y 17 casos, respectivamente.

Las medidas de control del *Desmodus rotundus* empleadas actualmente fueron diseñadas en la década de 1970 y se basan principalmente en el estudio del comportamiento de este quiróptero, así como en el uso de estrategias de tratamientos tópicos con anticoagulantes en forma de pasta, principalmente warfarina, a individuos capturados, para que después de regreso a sus refugios, mediante acicalamiento comunal, diseminen el anticoagulante a otros individuos de la colonia.⁴ Ésta, que parece ser la principal ventaja del esquema de control, al mismo tiempo es una gran desventaja, ya que en muchos casos deja el nicho ecológico vacío que puede ser ocupado por otros individuos infectados con el virus.

Las estadísticas oficiales indican que las estrategias en uso son insuficientes para establecer un control efectivo del *D. rotundus*; por lo que es necesario complementarlas o sustituirlas con otros esquemas de control que incorporen criterios como selectividad, efectividad, protección al ambiente y mantenimiento del nicho ecológico ocupado. Esto último, para evitar que vampiros infectados de rabia, provenientes de otras zonas, ocupen el nicho que ocuparan los vampiros no rabiosos eliminados por la warfarina.⁵

En la década de 1960, la investigación en el manejo de fauna silvestre dañina se encaminó hacia el diseño de la mejor forma de eliminar a los animales, aceptando las consecuencias que esto generara, como la eliminación de especies no blanco. Las tendencias

approach was considered. It has been assumed that a decrement in the pest population, highly diminishes the environmental noxious impact.⁶

Phytoestrogens are naturally occurring plant compounds that are recognized by the estrogen receptors in animal tissues resembling and sometimes eliciting the same responses as endogenous estrogen hormones.⁷ Phytoestrogens are chemically divided into three categories: isoflavones, coumestanes and lignanes. A single plant is able to produce different phytoestrogens. For example, soy beans are enriched in isoflavones, whereas growing soy plants have important amounts of coumestans.⁷ Coumestrol (3,9-dihydroxy-6h-benzofuro[3,2-c][1]benzopyran-6-one) belongs to the coumestan category and binds to the β estrogen receptor (ER β) with a similar affinity to that of estradiol.⁸

Contraception researches in animals are quite diverse and most of them have been adapted to the specie of interest. The ideal contraceptive for *D. rotundus* could be effective, economical, easy to handle and specific. Miller and Fagerstone⁹ proposed that phytoestrogens can be used to induce an infertility status in wild animals. In mice, coumestrol induces persistent vaginal cornification, hemorrhagic ovarian follicles, premature newborn vaginal opening and ovulation rate reduction when 50 to 100 μ g are given orally.¹⁰

Medlock *et al.*¹¹ compared the effect of different doses and classes of phytoestrogens on the development of newborn rat uteri. They found that a concentration-related hypertrophy can be obtained after one to five days, no matter the type of phytoestrogen administered. However, when 100 μ g coumestrol are used for long periods, a significant loss of uteri volume is obtained associated to the estrogen receptor blockade.

Besides structural alterations in the reproductive tract, oral coumestrol induces neuroendocrine alterations in lactating rats and anovulatory cycles in adult rats.¹¹ Similar treatment in adult males resulted in a low weight and low libido.¹²

Miksicek observed the specificity and affinity of coumestrol to estrogen receptors in cell cultures. Coumestrol binding can be followed by fluorescence microscopical methods¹³ and used as a non-isotopic method for characterization and differentiation of α and β estrogen receptors.¹⁴ In this work the presence of β estrogen receptors in *Desmodus rotundus* testis was examined by fluorescence microscopy in order to explore the possibility to use this phytoestrogen in their reproductive control.

Testis from two adult *D. rotundus* individuals were surgically obtained and cut into 1 mm³ fragments. Samples were distributed randomly into the phytoes-

cambiaron en la década de 1980, cuando se inició la regulación de los plaguicidas. Por primera vez se tomaron en cuenta los entornos ecológicos y la calidad del ambiente, y hacia mediados de la década de 1990 y primeros años del nuevo milenio, se planteó la necesidad de desarrollar nuevas estrategias no letales de control de la fauna silvestre nociva. Se asume que al haber menos individuos dañinos, su impacto nocivo al entorno ecológico disminuye considerablemente.⁶

Los fitoestrógenos son compuestos naturales derivados de las plantas, que son reconocidos por los receptores estrogénicos de los tejidos animales, por lo que mimetizan y en algunos casos suplen a los estrógenos endógenos.⁷ Los fitoestrógenos se dividen en tres grandes categorías: isoflavonas, coumestanos y lignanos. Una sola planta es capaz de producir diferentes tipos de fitoestrógenos; por ejemplo, los frijoles de soya son ricos en isoflavonas, aunque las plantas de soya en crecimiento tienen cantidades importantes de coumestanos.⁷ Dentro del grupo de los coumestanos se encuentra el coumestrol (3,9-dihidroxy-6h-benzofuro [3,2-c][1]benzo-pyran-6-one), que se une con afinidad similar a la del estradiol al receptor estrogénico β .⁸

Las líneas de investigación en anticoncepción animal son diversas y han sido adaptadas para la especie de interés. El anticonceptivo ideal para *Desmodus rotundus* será el que sea efectivo, económico, de fácil administración y específico. Miller y Fagerstone⁹ señalan la posibilidad de utilizar fitoestrógenos para inducir infertilidad en animales silvestres. En roedores, el coumestrol induce cornificación vaginal persistente, folículos ováricos hemorrágicos, apertura vaginal prematura en neonatos y reducción de la tasa de ovulación cuando se administra oralmente de 50 a 100 μ g.¹⁰

Medlock *et al.*¹¹ compararon el efecto de diferentes dosis y tipos de fitoestrógenos en el útero de ratas neonatas en desarrollo y encontraron que entre los días uno y cinco de la administración, se presenta una hipertrofia que es más severa de manera dependiente de la concentración y no del tipo de fitoestrógeno utilizado. Sin embargo, cuando se utilizan 100 μ g de coumestrol por un periodo prolongado, produce bloqueo de los receptores estrogénicos con la consecuente disminución del tamaño uterino.

Además de las alteraciones estructurales en el tracto reproductor, el coumestrol administrado por vía oral induce alteraciones en el desarrollo neuroendocrino de ratas lactantes, así como inducción de ciclos anovulatorios en ratas adultas.¹¹ Con tratamientos similares, en machos se ha documentado baja de peso y de la libido.¹²

Miksicek observó en cultivos celulares la especificidad y afinidad del coumestrol a los receptores

trogen treated or control group. The experimental samples were immersed in one of the 7 coumestrol concentrations (1000, 250, 83.3, 27.7, 9.25, 3.08 y 1.028 μg). As a negative control for fluorescence, 0.5 ml of the vehicle dimethyl sulfoxide was used.

Tissues were incubated in a light protected 37°C humid chamber for 30 minutes. For fluorescence microscopy examination, tissues were processed by the conventional squash technique with no fixative added. As contrast stain, a 0.001% methylene blue solution was used. Observations were made by using a Univar fluorescence microscope at 100 diameters total magnification.

Beta estrogen receptors were detected in concentrations as low as 1.028 μg (figure 1) and a 100% relative fluorescence was seen at 27.7 μg coumestrol. The best detection in which equilibrium between estrogen receptor detection and tissue organization was obtained at 25.75 mM coumestrol concentration (1.028 μg) (Figure 2a). In this concentration, β estrogen receptors were detected in all analyzed testicular regions and corresponding to the seminiferous tubules, with no signal in tissue-free zones. The use of the methylene blue contrast facilitates these observations (Figure 2b). No fluorescence was detected in DMSO-treated control samples.

The first step on the development of a specific hormone-based, hormone analogs or inhibitors treatment is to verify the presence of specific receptors the compound could interact with. Besides the phytoestrogen-induced, alterations have been reported in other species, receptor localization studies are scarce.¹⁵ This is due mainly to the heterogeneity of the α and β receptor populations. Few papers were found in which β estrogen receptors were identified in association with the use of coumestrol. These works were done in cultured cells (Cos-7) and human estrogen receptors.^{13,14}

estrogénicos. La unión del coumestrol puede ser evaluada por microscopía de fluorescencia,¹³ que como método no isotópico puede ser útil para la caracterización y diferenciación de receptores estrogénicos α y β .¹⁴ En este trabajo se examinó presencia de receptores estrogénicos β en testículos de *Desmodus rotundus* por microscopía de fluorescencia, para evaluar la posibilidad de utilizar al coumestrol en el control reproductivo de este quiróptero.

Se obtuvieron quirúrgicamente los testículos de dos individuos adultos de *D. rotundus*, que se seccionaron en trozos de 1 mm³. Los fragmentos de tejido fueron distribuidos aleatoriamente en cada uno de los dos tratamientos: testigo negativo y grupo experimental. Éste se trató por inmersión del tejido en siete concentraciones diferentes de coumestrol (1 000, 250, 83.3, 27.7, 9.25, 3.08 y 1.028 μg). Como testigo negativo se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO: 0.5 ml), que fue usado como diluyente del coumestrol.

La incubación se realizó a 37°C en cámara húmeda protegida contra la luz durante 30 minutos. Para la observación al microscopio de fluorescencia, las muestras de tejido se procesaron por la técnica de *squash* convencional, sin agregar fijador. Se utilizó azul de metileno al 0.001% p/v como colorante de contraste. Las observaciones se realizaron con ayuda de un microscopio Univar a 100 diámetros.

La detección de receptores β para estrógenos se obtuvo con concentraciones tan bajas como 1.028 μg (Figura 1); de hecho, se observó 100% de fluorescencia con la concentración de 27.7 μg de coumestrol. La mejor definición de los receptores β , y con ello de las estructuras anatómicas del testículo, se logró utilizando una concentración equivalente a 25.75 mM de coumestrol (1.028 μg) (Figura 2a). En todas las zonas testiculares analizadas con esta concentración fue posible detectar presencia de receptores estrogénicos β en forma congruente con la disposición de los túbu-

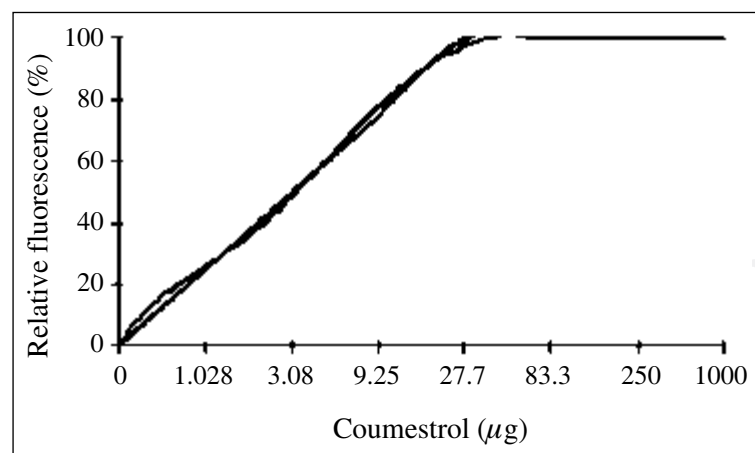


Figura 1: Fluorescencia relativa de coumestrol en testículo de *Desmodus rotundus*. Preparaciones tratadas con coumestrol a diferentes concentraciones se evaluaron al microscopio de fluorescencia. La fluorescencia relativa se determinó arbitrariamente tomando como base las imágenes del testigo negativo y la muestra de mayor contenido de fitoestrógeno como 0 y 100%, respectivamente.

Figure 1: Relative fluorescence of coumestrol in *Desmodus rotundus* testis. Samples with different coumestrol concentrations were evaluated by fluorescence microscopy. Relative fluorescence was arbitrarily determined based on the negative control as 0%, and 100% corresponding to the sample with the highest phytoestrogen content.

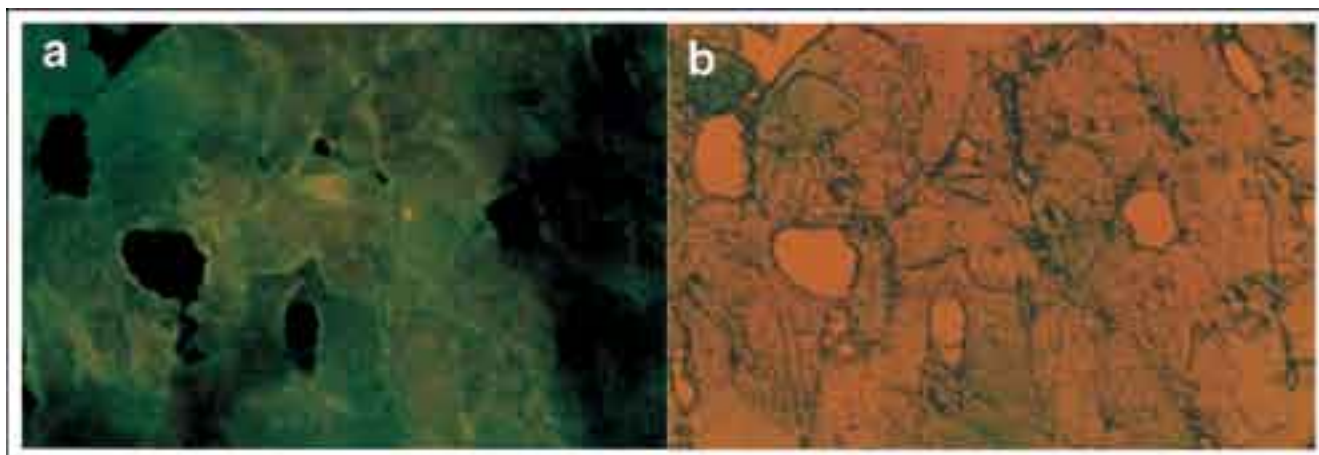


Figura 2. Detección de receptores estrogénicos β en el testículo de *Desmodus rotundus* mediante la unión con coumestrol. *a)* La microfotografía al microscopio de fluorescencia se obtuvo con fluorescencia producida por la unión del fitoestrógeno en la concentración de 1.028 μg . *b)* La definición de la unión del coumestrol a los receptores estrogénicos β en túmulos seminíferos corresponde claramente a la imagen en campo claro contrastada con azul de metileno.

Figure 2: β estrogen receptor detection in *Desmodus rotundus* testis by coumestrol binding. *a)* Microphotography was obtained by the fluorescence signal produced by the phytoestrogen binding at 1.028 μg concentration. *b)* Definition of the bound coumestrol to the β estrogen receptors in seminiferous tubules clearly corresponds to the methylene blue-contrasted bright field view.

In this work, β estrogen receptor detection was made by using coumestrol in *D. rotundus* testis. This results obtained in *D. rotundus* tissues along with others in which coumestrol induces reproductive alterations in several other species, indicate that it is possible to use a coumestrol-based strategy for vampire reproductive control. A main difference with the actual compounds used for *D. rotundus* control is that coumestrol is a natural product that does not contaminate the environment allowing a constant slow population reduction with no empty ecological niches.

Referencias

1. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. Inventario Total de Ganado Bovino, 1997-1999 citado 2004 Jun.10 1(1) Disponible en: URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/FTP/invbt.pdf>
2. Organización Internacional de Salud Animal. Sanidad Animal Mundial en 2003, México, OIE. Hadistatus II. citado 2004 Jun 10 one screen Disponible en: URL: http://www.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=120&c_mald=26#
3. Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección General de Salud Animal, Dirección de Vigilancia Epidemiológica. Situación de cuadros y mapas por enfermedades y estados. Mapa del 5 de Julio 2004 citado 2004 July.15 1 screen Disponible en: URL: http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1130/RPB_050704_MAPA.pdf
4. Linhart SB, Flores-Crespo R, Mitchell GC. Control

los seminíferos, dejando libre de señal fluorescente las zonas carentes de tejido. Estas observaciones se facilitaron por el contraste con el azul de metileno utilizado como colorante vital (Figura 2b). En las preparaciones testiculares del testigo no se observó señal fluorescente.

La primera etapa en el desarrollo de un tratamiento específico mediante hormonas, sus análogos o inhibidores, está asociada con la presencia de receptores con los cuales puedan interactuar. A pesar de que en la literatura aparecen informes de las alteraciones inducidas por fitoestrógenos en distintas especies animales diferentes al vampiro, son pocos los artículos en los que se intenta la localización de receptores.¹⁵ Esto se debe principalmente a la dificultad que implica manejar una población heterogénea, como la de los receptores α y β estrogénicos. En la literatura se encontraron pocos trabajos en los que se identifican los receptores β estrogénicos en asociación con la aplicación de coumestrol. Dichos estudios se efectuaron en cultivos de células (Cos-7) y receptores estrogénicos de origen humano.^{13,14}

En el presente trabajo el coumestrol hizo factible la detección de receptores β estrogénicos en el testículo de *D. rotundus*. Estos resultados generados en tejidos de *D. rotundus*, junto con los de otros artículos que documentan los daños que el coumestrol produce en tejidos reproductivos de otras especies, indican que es factible explorar la posibilidad de utilizar coumestrol en el control reproductivo del vampiro. A diferencia de los

de murciélagos vampiros por medio de un anticoagulante. En: Mitchell GC, Burns RJ, editores. Combate químico de los murciélagos vampiros. México-Buenos Aires: Centro regional de ayuda técnica, Agencia para el desarrollo internacional, 1974 :21-28.

5. Zhang Z. Mathematical models of wildlife management by contraception. *Ecolog Model* 2000;132:105-113.
6. Curnow R D. What are the research needs and skills of the future? Proceedings of the Ninth Wildlife Damage Management Conference; 2001 Oct. 5-8 State College, PA, USA: Pennsylvania State University 2001:18-22.
7. Roselli M, Reinhart K, Imthurn B, Keller PJ, Dubey RK. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum Reprod Update* 2000; 6:332-350.
8. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT *et al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor. *Endocrinology* 1998; 139: 4252-4263.
9. Miller LA., Fagerstone KA. Induced infertility as a wildlife management tool. Proceedings 19th Vertebrate Pest Conference. 2000 March 6-9; San Diego, California. USA: University of California (Davis), 2000: 160-168.
10. Burroughs,CD. Long-term reproductive tract alterations in female mice treated neonatally with coumestrol. *Proc Soc Exp Biol Med.*1995;208:78-81.

compuestos que actualmente se están utilizando en el control de *D. rotundus*, el coumestrol es un compuesto de origen natural, por lo que no contaminaría el ambiente y permitiría un control poblacional paulatino para mantener el nicho ecológico ocupado.

-
11. Medlock KL, Branham WS, Sheehan D.M. Effects of coumestrol and equol on the developing reproductive tract of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*1995;208:67-71.
 12. Whiten PL, Lewis C, Russell E, Naftolin F. Phytoestrogen influences on the development of behaviour and gonadotropin function. *Proc Soc Exp Biol Med*1995;208: 82-86.
 13. Miksicek RJ. *In situ* localization of the estrogen receptor in living cells with the fluorescent phytoestrogen coumestrol. *J Histochem Cytochem* 1993;41: 801-810.
 14. De Boer T, Otjens D, Muntendam A, Meulman E, van Oostijen M, Ensing K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogen receptor subtypes alpha and beta. *J Pharm Biomed Anal* 2004;34: 671-679.
 15. Romero CM, Castellanos MT, Mendoza RM, Reyes RA, García AR. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Mex* 1997; 28:25-30.