

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
Y LA PRODUCCIÓN ANIMAL

**“Evaluación de la respuesta inmune en perras tratadas con
un péptido derivado de la zona pelúcida de cerda
conjugado a la subunidad Beta de la toxina del
cólera (oZP - CTB)”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MARIANNA MEDINA ARZATE

TUTOR PRINCIPAL

HÉCTOR FERNANDO SERRANO

COMITÉ TUTORAL:

CARLOS ESQUIVEL LACROIX

JORGE LECUMBERRI LOPEZ

MÉXICO, D.F.

2006

M. 203222



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatorias

A **Dios** por ser siempre una realidad en mi vida, ser la fuerza y la capacidad para emprender y concluir mis proyectos.

A mi **Esposo** gracias corazón mío por tus ganas por tu confianza en mi capacidad, y por estar a mi lado, te amo este logro es de los dos.

A mi **Hijo** Luis Mariano gracias mi amor por ser un bebé tan hermoso, gracias por escogerme para ser tu mamá, espero heredarte un buen ejemplo.

A mi **Madre**, chito gracias a tu ejemplo y apoyo llegue hasta aquí, aun si todo el mundo perdiera su confianza en mi se que tu seguirías creyendo en mi te adoro mamita.

A toda mi **Familia**: Troy, Rafa, Vicky, Jorguito, Melissa, Ximena, Annita, Santiago, papá Abel y Jorge Valerio.

A mis **Amigos** incondicionales: Elia Dalman, Liz y Manuel (mis queridos compadres), gracias.

A mis **Suegros** su apoyo fue clave para lograr esto, espero darles con este logro una pequeña recompensa a todo lo que me han brindado.

Y a dos personas que desde el cielo me acompañan y ven este esfuerzo convertido en una realidad

Mamá Raquel.†
MVZ. Miguel Ángel Cisneros Puebla (mi pa).†

Agradecimientos

Al Dr. Serrano, no habrá agradecimiento suficiente para expresarle lo que significó para mí su confianza.

Así como a mi Comité Tutorial, Carlos Esquivel su conocimiento y apoyo fueron esenciales para conseguir este objetivo.

Un agradecimiento especial al Dr. Mario Pérez Martínez, por su amistad y consejos en los momentos más difíciles de estos dos años.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Molecular de la Fertilización y Desarrollo Embrionario Temprano de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Al Laboratorio de Biología Tisular de la Reproducción “Rosa Emilia Lavielle” del departamento de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

“Evaluación de la respuesta inmune en perras tratadas con un péptido derivado de la zona pelúcida de cerda conjugado a la subunidad Beta de la toxina del cólera (oZP-CTB)”

Resumen

El perro es la especie animal, de compañía por excelencia, sin embargo su importancia en la salud pública es relevante debido a que los cánidos cuyos hábitos reproductivos y sanitarios no están controlados, se han identificado como vectores y reservorios de diferentes procesos infecciosos. Este aspecto hace del control reproductivo de la especie un tema que requiere, la implementación de estrategias y aplicación de metodologías enfocadas particularmente al sector no domiciliado de la población canina. La inmunización con antígenos provenientes de la zona pelúcida (ZP), bloquea efectivamente la interacción ovocito-espermatozoide, induciendo un estado de infertilidad. Idealmente, es necesario identificar la proporción mínima de los componentes de (ZP), por lo que los anticuerpos dirigidos contra ella sean capaces de inhibir únicamente la interacción entre gametos sin alterar otras funciones. Se ha podido identificar a la subunidad Beta de la toxina de cólera (CTB), como proteína transportadora que estimula la respuesta inmune sin ser tóxica. En este estudio se utilizó la inmunización de un grupo experimental de 5 perras con un péptido sintético derivado de la zona pelúcida porcina conjugado a CTB para inducir la formación de anticuerpos específicos. Un grupo más inmunizado con el acarreador (CTB), los grupos se trataron al día 0, 15 y 30. La síntesis de anticuerpos se evaluó mediante la técnica de ELISA y su efecto se valoró mediante la cuantificación de las alteraciones histológicas. Los resultados obtenidos indican que el grupo tratado con oZP - CTB, con dos aplicaciones, permite el desarrollo de anticuerpos específicos y que el tratamiento afecta el desarrollo folicular de las hembras. Los resultados aportan valiosa información para el desarrollo de la estrategia inmunocontraceptiva en la especie canina.

Palabras clave: inmunocontracepción, zona pelúcida, control reproductivo, canideos.

Abstract

Besides dogs are the classical pet animal, Human Health is at risk mainly for those homeless dog populations since they can carry and transmit several diseases. These aspects need not only a basic research approach but the development and implementation of specific strategies focused on the homeless dog. Active and passive zona pellucida (ZP) immunization effectively disrupts sperm-egg interaction giving rise to an infertile period maintained as long as the antibody level is maintained. Even when the ovarian alterations are quite dissimilar, this approach is a viable alternative for reproductive control. Since the minimal structure from the ZP is non-immunogenic, a protein carrier is needed, an aspect covered by the beta subunit of the cholera toxin (CTB). Here we use a synthetic oligopeptide from ZP coupled to CTB to induce the synthesis of specific antibodies as evaluated by ELISA in bitches. Our data indicate that a two week treatment induces the production of specific antibodies that alters the follicular development in treated animals.

Key words: Immunocontraception, zona pellucida, reproductive control, bitches.

Contenido

Resumen y Abstract.....	V
Introducción.....	1
Material y Métodos	15
Resultados.....	21
Discusión.....	27
Literatura citada.....	35
Anexo Metodológico.....	41

Introducción

El perro (*Canis familiaris*) es la especie vinculada al ser humano con mayor antigüedad. Se han encontrado restos de tumbas del México Precolombino en donde fueron enterrados Xoloescuintles como parte de las ofrendas (Matos-Moctezuma, 1990). Esta asociación ha tenido razones tan variadas que van desde la alimentación como el caso del Xoloescuintle, hasta nuestros días con el cuidado de discapacitados, como lo ejemplifican los lazarillos educados como auxilio para las personas que sufren de debilidad visual. (Asociación Canófila Mexicana, 2005)

La relación del humano con la especie canina no siempre se lleva a cabo de manera adecuada e incluso implica un riesgo, particularmente en aquellas personas de nivel socioeconómico bajo, ya que en esas condiciones es común la falta de orientación y conocimiento adecuado acerca de los cuidados necesarios en sanidad, reproducción, adecuación de despacio, vacunación, y manutención de los animales de compañía manteniendo la crianza ancestral de una semi-domicialización que implica, para el caso de los perros, que la mayor parte del día deambulen libremente sin supervisión por lo cual están expuestos a contagios y a una reproducción no controlada que afecta no solo a los propietarios, cuando estos existen, sino que motiva un aumento en la población de animales no domiciliados, con el consiguiente impacto negativo en la salud pública y el ambiente (Feldman, 1974) (Pliego, 1996) (OMS, 1992) (Ortega y colaboradores, 2003).

Los perros pueden transmitir numerosas enfermedades, destacando entre ellas brucelosis, leptospirosis, tuberculosis, giardiasis, etc. De la misma forma, son

portadores de ectoparásitosis como infestaciones por pulgas, sarnas zoonóticas, así como dermatomicosis y procesos alérgicos (García y colaboradores, 2004).

El perro callejero ha sido considerado como el principal vector y reservorio del virus de la rabia; los programas de vacunación intensiva han controlado dentro de ciertos márgenes esta transmisión. Como resultado de la aplicación de alrededor de 10 millones de vacunas antirrábicas, por campaña en el lapso entre 1994 y el año 2000, la Secretaría de Salud en México reportó solamente 265 casos de rabia humana asociada a mordeduras por perros infectados (Galindo, 2000). Sin embargo, un aspecto poco considerado en este tipo de estudios son los costos inducidos por traumatismos por mordedura en donde se requiere desde cirugía reconstructiva hasta apoyo psicológico, principalmente en la población infantil que por su talla presentan lesiones faciales con mayor frecuencia (Domínguez, 2001).

Diversos estudios realizados en urbes alrededor del mundo han permitido establecer que el impacto de la sobrepoblación canina y en general de los animales de compañía, en la salud humana es muy importante pues no solo permiten mantener la potencial propagación de enfermedades específicas, sino que incluso son responsables de un repunte en la prevalencia de enfermedades que se consideraban controladas (Warner, 2002). Aunado a lo anterior es de considerar el impacto ambiental que produce la contaminación por los desechos de la población canina, ya que en México un alto porcentaje de perros orinan y defecan en la vía pública (García, 2004).

Un estudio, estimó que el 73% de la población canina del Distrito Federal deambula por las calles y que cada perro defeca en promedio de 200 gramos de

heces por lo que se generan cientos de toneladas de excremento diariamente. Si además se considera que un perro orina 500 ml al día, la cantidad de orina producida sería superior al millón de litros (Faulkner, 1994).

Si se toman los datos obtenidos por diversos autores, son aparentes las fluctuaciones de la población de perros no domiciliados o “callejeros” y la población humana. Hacia 1974 se estimó una proporción de un perro por cada 10 habitantes (Higuera, 1974); Un lustro después esta proporción fue de 1 perro por cada 6 habitantes (Fuentes y cols, 1981).

La distribución de estos animales no es uniforme. En 2000, mientras que la Delegación Iztapalapa presento una relación 1:4.4, esta proporción en Ciudad Nezahualcóyotl fue de 1:8 (Romero, 2001).

Al igual que en el caso de la zona metropolitana de la Ciudad de México, la distribución en diferentes regiones del país es notoria, no-solo la proporción sino incluso la forma en que se mantienen las poblaciones caninas. En un estudio elaborado por la Secretaría de Salud en 1993, se comparo la población canina de 158 localidades de Oaxaca y la zona metropolitana de Cuernavaca, Morelos. En el primer caso, se encontró una proporción de un perro por cada 6.6 habitantes, la mayoría de los animales con características de no domiciliado o semi-domiciliado. En el estado de Morelos, se reportó que el 84.9% de viviendas contaban con perro, es decir domiciliados. Esto refleja también las restricciones que implica la adaptación a las condiciones urbanas en las cuales, mientras disminuye el nivel socioeconómico y cultural aumenta el número de viviendas con perro (Romero, 2001).

En el ámbito mundial, es posible encontrar una distribución similar. Así, en una publicación de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1995) se indican proporciones variables desde 1 perro por cada 6 y hasta 10 habitantes en países americanos y europeos respectivamente. En otros estudios realizados en California (Schneider, 1970) y Santiago de Chile, (Morales, 1993) esta razón es incluso mayor llegando a tenerse una razón 1:10 y 1:17, respectivamente.

Por todo lo anterior existen razones para implementar estrategias de control, sin embargo esto no siempre ocurre en regiones densamente pobladas. En este sentido, la sobrepoblación canina en islas o en urbes cuya población presenta una falta de cuidado e incluso abandono de los animales de compañía se requiere de la intervención y la búsqueda de una solución.

Durante la década de 1980, la proliferación de perros no domiciliados en Hawai llegó a un extremo en el cual, se le incluyó dentro de la fauna nociva, junto con plagas como roedores e insectos que afectan los cultivos de piña, etc (Mahi-Brown, 1985) (Mahi Brown, 1989).

Estrategias de control

Dentro del Programa de Reformas de 1994-2000 el Sector Salud del Gobierno de México, se responsabilizó del control de la sobrepoblación canina en el ámbito regional a través de los centros especializados, que a su vez contemplan actividades como son: Programas permanentes de esterilización quirúrgica, así como campañas de información para impedir “camadas indeseadas” y con ello evitar el problema de sobrepoblación (Robles, 2000) (Secretaría de Salud, 1994).

Sin embargo el costo de la esterilización quirúrgica de los animales de compañía de las clases sociales con menos recursos económicos, evita que se use con la frecuencia deseada, por lo que se requiere de técnicas alternativas (Serrano y García-Suárez, 2001). Existen otras estrategias para el control reproductivo de esta especie, como son los métodos farmacológicos, sin embargo esta solo es posible en el sector de la población canina con propietario “responsable” es decir domiciliada, por el manejo clínico que implican. (Shille, 1980)(Garza, 1996)(Ibarra, 2000) (Dharmacelan, 2000) (Rodasky, 2001) (Tamada, 2003) (Kutzler, 2003) (Fayrer-Hosken, 2000). También ha sido explorado el uso de moléculas reguladoras del proceso reproductivo. En particular, la utilización de hormonas gonadotrópicas o los péptidos que las liberan como el factor liberador de hormonas gonadotrópicas (GnRH) que representan un blanco adecuado para explorar. Es conocido que tanto la hormona estimulante del folículo (FSH) como la hormona luteinizante (LH) intervienen en el proceso de foliculogénesis y maduración folicular que permite finalmente la liberación de un óvulo maduro capaz de ser fecundado. Si se interrumpe ya sea su liberación o su acción, este proceso se encuentra alterado y por ende el potencial reproductivo del animal.

Con esta base, se están desarrollando metodologías aplicables en animales de compañía (Trigg, 2002).

Otra metodología es la que se ha venido desarrollando desde principios de la década de los años 70, que considera la zona pelúcida como potencial blanco para la regulación de la fertilidad de poblaciones tanto humanas como animales. La zona pelúcida (ZP) es una capa de glicoproteínas que rodean al ovocito de los mamíferos y constituyen la matriz extracelular del ovocito y sus constituyentes se depositan totalmente durante la foliculogénesis temprana. La ZP es la región de interacción inicial entre el ovocito y el espermatozoide para que se lleve a cabo la fertilización. Las evidencias experimentales han demostrado que la ZP es altamente selectiva para los espermatozoides de la misma especie, es pobremente aloantigénica pero fuertemente xenoantigénica, es decir tiene una potente respuesta inmune cuando se utiliza ZP de una especie para inmunizar otra (Wassarman y Albertini, 1994).

Se ha reportado que la inmunización pasiva (Naz, 2005) y /o activa con proteínas de la zona pelúcida (ZP) resulta en la alteración de estructuras y funciones ováricas afectando directamente la fertilidad. Esto ha llevado al desarrollo de estrategias basadas en la inmunización con proteínas de la zona pelúcida. Dicha inmunización, induce una respuesta del sistema inmune que resulta en cambios en la histoarquitectura ovárica, induciendo un estado de infertilidad. (Skinner, 1984) (Mahi Brown, 1988) (Jones, 1992) (Lou, 1995) (Paterson, 1996) (Paterson, 2002).

Se han observado, alteraciones en el ciclo reproductivo de las hembras, post inmunización, con disminución en el número de folículos primarios y

secundarios, así como un aumento en la infiltración de linfocitos de los ovarios a distintas dosis de proteína (Serrano, 2001) (Bagavant, 1997) (Rath, 2005).

En un estudio realizado por Hasegawa, en el cual se demostró la capacidad de inhibir la fertilización *in vitro* cuando se generan anticuerpos inducidos por la inyección del péptido sintético CTYVLDPENLTLKAPYEA correspondiente a los residuos 50 a 67 de la glicoproteína ZP₃β del cerdo. Al comparar la de la proteína homóloga de conejo, humano y ratón, se encontró que la secuencia entre el conejo y humano al nivel de los aminoácidos 54 - 61 es casi idéntica variando únicamente en la posición 58 en el cual se presenta un residuo de lisina (K) en el humano que es reemplazada por asparagina en el conejo. Este cambio de un aminoácido polar grande por uno polar pequeño es suficiente para explicar la unión de uno u otro tipo de espermatozoides a la zona pelúcida correspondiente y que al mismo tiempo explica la alta afinidad de los anticuerpos para zona pelúcida (Hasewaga, 2002).

Otros estudios en diversos modelos animales han demostrado que las proteínas de la ZP son altamente inmunogénicas e incluso la presencia de anticuerpos contra constituyentes de la ZP explica la infertilidad de parejas humanas. Este enfoque puede explicar incluso aquellos casos de infertilidad en la hembra en la cual las moléculas pertenecientes al espermatozoide o al óvulo actúan como autoantígenos con lo que se previene ya sea la unión de los gametos cuando son las moléculas del óvulo las autoantigénicas (Serrano y García-Suárez, 2001) o la implantación, cuando son las del espermatozoide (Yanagimachi, 1994).

Como se muestra en la Tabla 1*, existen variaciones en el tipo de alteración inducida por el uso de los componentes de la ZP. En general, es evidente que este tipo de inmunógenos alteran funciones ováricas adicionales, lo que disminuye su uso potencial. De manera ideal es necesario identificar la proporción mínima de algunos componentes capaces de unirse específicamente al espermatozoide por lo que anticuerpos dirigidos contra ella inhiban únicamente la unión sin alterar otras funciones (Maresh, 1987) (Tesarik, 1995) (Sacco, 1997) (Carino, 2002) (Barber, 2000) (Gupta, 2004)

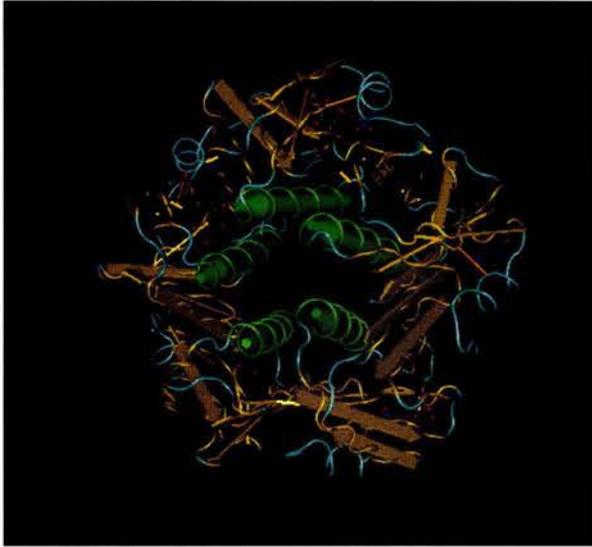
Si se tomara únicamente ese epítotope es posible que no sea inmunogénico, por lo que se requiere de la presencia de una proteína acarreadora que le brinde al hapteno la posibilidad de inducir la formación de anticuerpos pero que a su vez por sí sola no estimule la respuesta inmune por lo que la molécula específica actuaría como el epítotope inmunodominante del complejo acarreador-hapteno.

Tratando de disminuir este efecto, se han desarrollado diferentes investigaciones en las cuales se hace uso de proteínas acarreadoras que mejoran la respuesta inmune a las cuales se acoplan los péptidos sintéticos (Dunbar, 1989) (Hasegawa, 2002). La proteína acarreadora más utilizada es la albúmina bovina por su disponibilidad. Sin embargo, se ha intentado incorporar características particulares de las proteínas acarreadoras tratando de tomar ventaja de ello. La hemocianina de semillas pirú (KLH) tiene actividad de lectina estimulante de la respuesta inmune y particularmente de los macrófagos por lo que los péptidos acoplados a ella serán preferentemente procesados y el propio macrófago actúa como célula presentadora ante los linfocitos B. Esta estrategia permite el

* Modificada de Dunbar BS, Kaul G, Prasad M, Skinner. 2002.

desarrollo de diversos tipos de inmunoglobulinas y ha sido utilizado eficientemente con péptidos de ZP (Hasegawa y cols, 2002). Por otro lado, el uso de la subunidad beta de la toxina de cólera (CTB), como proteína transportadora que estimula la respuesta inmune sin ser tóxica. Uno de los enfoques para el desarrollo de vacunas consiste en hacer uso de CTB como acarreador de epitopes foráneos, y el conjugado resultante es utilizado para inducir una respuesta inmune (Mckenzie, 1984) (Sánchez, 1992) (Xin, 1997) (Chhabi, 2002).

Características de la subunidad beta de la toxina de cólera



• Figura 1. Subunidad beta de la toxina de cólera

Es una proteína membranal de la bacteria *Vibrio cholerae*. Como se puede observar en la figura, es una proteína con amplias regiones alfa helicoidales separadas por pequeños segmentos de hélice al azar. La subunidad beta (CTB) tiene un arreglo de anillo pentamérico con cinco sitios que actúan como receptores de unión (receptor binding pockets) con gran capacidad de asociación a residuos de carbohidratos de las glicoproteínas de las células blanco. Se encuentra asociada a la cadena A y su anclaje en la membrana bacterial se hace gracias al residuo del gangliósido GM1. La estructura, composición y especificidad para interactuar con células derivadas del endodermo le permiten inducir una potente respuesta inmune sin ser tóxica. Tras su administración se ha comprobado una respuesta de anticuerpos sistémica (Douglas, 2001).

Desarrollo de estrategias basadas en zona pélucida

Las estrategias fundamentadas en el inmunocontrol se han estudiado en diversos modelos animales, como aquellas que tienen como objetivo el control de especies de vida silvestre o en aquellos que representen una posibilidad de convertirse en fauna nociva (Kirkpatrick, 1996). Hardy y colaboradores (2002), inmunizaron ratones de vida silvestres con un péptido de zona pelúcida de ratón mZP₃, logrando reducir en 50% la fertilidad respecto al grupo control.

Cuando se inoculó ZP de cerdo en una sola toma y en cuatro años consecutivos en yeguas de Mustang, se demostró que la disminución en la fertilidad del grupo tratado tenía una correlación con los títulos altos de anticuerpos circulantes y a pesar de que se presentaba una disminución importante en los niveles de estrógenos, esto no redundaba en un daño ovárico importante (Kirkpatrick, 1996).

En 10 especies de felinos de zoológico, la sola aplicación de 65 µg de ZP porcina indujo la síntesis de anticuerpos cuyos títulos persistieron hasta por más de un año, sin encontrar evidencia de inflamación o daño ovárico. (Harrenstien, 2004).

En felinos, no solamente la ZP porcina es capaz de inducir la síntesis de anticuerpos específicos pues se han inmunizado con proteínas de zona pelúcida de vaca (bZP), felino (cZP) canino (dZP) y chinchilla (mZP) encontrando títulos de anticuerpos, sin embargo y a diferencia de ZP porcina, las hembras tratadas quedaron gestantes (Levy, 2005). Esto indica que no es suficiente contar con un buen título de anticuerpos, sino que es necesario que al menos de manera

estereoscópica puedan ocultar los determinantes presentes en la ZP del individuo tratado con los cuales interactuarían los espermatozoides.

Hasta el momento las investigaciones realizadas alrededor del mundo, y en diferentes modelos animales, no han reflejado una alternativa viable para el control reproductivo de las poblaciones tratadas (Kirpatrick, 1992) (Barber, 2000) (Gorban, 2002) (Sivapurapu, 2005) (Sun, 1999).

Se ha tratado de mejorar las preparaciones de ZP con las cuales se hace la inmunización. La inoculación a ratas, ratones y macacos de una preparación combinada de ZP porcina y ZP de ratón que causa un aumento de folículos atrésicos, relacionado a niveles hormonales que sugieren una disfunción ovárica (Mahi Brown 1992).

El uso de las proteínas constituyentes de la ZP porcina para evaluar su potencial capacidad anticonceptiva ha permitido que preparaciones conteniendo las familias ZP₃ a y ZP₃ β parcialmente desglicosiladas disminuyan el número de folículos primarios, secundarios y terciarios en relación directa a la concentración de proteínas que se esté utilizando (Jones, 1992).

Una de los cambios concurrentes en los diferentes estudios es que si bien se está tratando de bloquear específicamente la interacción entre el ovocito y el espermatozoide, el procesamiento del antígeno requiere de la participación de los linfocitos T, que de manera adicional induce una ooforitis autoinmune que resulta en disminución de la fertilidad (Lou, 1995).

Por otro lado Paterson (2002), encontró títulos de anticuerpos capaces de suprimir la interacción espermatozoide-ovocito hasta en un 60% *in vitro*. Sin embargo este autor, menciona la importancia de identificar los epitopes de la zona

pélucida, que induzcan infertilidad reversible y ausencia de disfunciones ováricas. Lo que se considera necesario para darle al método la característica de reversible.

Para poder desarrollar un modelo de vacuna, Dunbar (2002), propone evaluar la inmunización de diferentes especies animales, considerando, las diferentes fuentes de zona pelúcida, ya sea de forma nativa, purificada o desarrollada a partir de ingeniería genética. Por su parte Gupta (2004), propone el uso de esta estrategia para el control de fauna silvestre, mencionando la conveniencia de reversibilidad del método.

El presente trabajo está enmarcado dentro de las estrategias de control reproductivo con base en la utilización de la zona pelúcida y está encaminado al potencial desarrollo de una estrategia fundamentada que permita su utilización posterior en el control de la población canina no domiciliada.

Hipótesis

La inoculación de perras con el conjugado oZP-CTB, induce la producción de anticuerpos específicos contra el péptido que alteran la morfología del ovario

Objetivos

- Determinar la respuesta inmunológica en perras tratadas con un péptido derivado de zona pelúcida de cerda conjugado a la subunidad Beta de la toxina del cólera, mediante la cuantificación de anticuerpos específicos contra el péptido.
- Evaluar el efecto de la inmunización con el péptido derivado de zona pelúcida de cerda conjugado a la subunidad Beta de la toxina de cólera mediante el análisis de las características histológicas de los folículos ováricos.

Justificación

El problema de la sobrepoblación canina requiere de la implementación de estrategias, viables que regulen la reproducción de la especie de manera eficiente y que representen inocuidad para la población tratada. Los estudios fundamentados en el principio de inmunocontracepción, basado en la administración de proteínas derivadas de zona pelúcida, representan importantes avances para esta metodología. Y a largo o mediano plazo su aplicación resultara en un impacto positivo, en materia de salud pública. Ya que es el control efectivo de la reproducción de esta especie, lo que puede minimizar la problemática generada por el sector no domiciliado de esta especie.

Materiales y Métodos

Los animales de experimentación fueron obtenidos en la vía pública, en el área camino a Desierto de los Leones, deambulaban libremente sin supervisión o identificación alguna, ninguno de los animales fue capturado utilizando algún tipo de agresión o maltrato físico. Fueron atraídos por alimento, se sociabilizó con ellos y se procedió a su traslado. Se les proporciono agua y alimento, pasados 7 días, se les realizó una evaluación clínica descartando procesos infecciosos o de otra naturaleza que afecten su reproducción.

La muestra animal incluyó 15 perras, y se aplicaron los siguientes criterios de selección:

- Criterio de inclusión: Perras en edad reproductiva, que en esta especie esta considerada, desde los 12 meses hasta aproximadamente 8 años, todas las perras se observaban, clínicamente sanas.
- Criterio de exclusión: Se excluyeron perras que a su evaluación presentaran hallazgos clínicos que afectaran su salud reproductiva, como fuera el caso de resultar positivas a la prueba de microaglutinación para diagnostico de leptospirosis, a la que fueron sometidas antes de iniciar el estudio. O perras en las que se encontrara evidencia (cicatriz quirúrgica) de ovariectomía (OVH).

Se llevó a cabo una evaluación reproductiva para todos los animales mediante citología vaginal exfoliativa, siguiendo los lineamientos para esta especie citados en la literatura. (Shutte, 1967) (Jeffcoate, 1989) (Tammer, 1994).

Las perras seleccionadas, se mantuvieron en perreras individuales de cemento y techadas con buena ventilación, mismas que se ubicaron en el poblado de "Santa Rosa" Km. 23 de la carretera Desierto de los Leones, México, Distrito Federal, por un periodo de 12 meses. Fueron habituadas al manejo, se mantuvieron en observación clínica y posteriormente se les brindó medicina preventiva y se registró su peso corporal, antes de iniciar el estudio. Las características particulares del manejo de los animales experimentales se encuentran en el anexo metodológico.

Para el desarrollo experimental, las perras se distribuyeron de manera aleatoria en 3 grupos de 5 animales cada grupo. El grupo 1, se inoculó con el conjugado (oZP - CTB); Al grupo 2, se inyectó con el acarreador (CTB) y finalmente un grupo 3, que sirvió como testigo de manipulación el cual recibió únicamente solución salina. Los grupos recibieron su respectivo tratamiento a los días 0, 15 y 30. Y todos los tratamientos fueron administrados vía intramuscular (IM), en volumen de 1 ml.

La conjugación del péptido sintético de 18 aminoácidos derivado de zona pelúcida porcina (oZP) a la subunidad beta de la toxina de cólera (CTB) se realizó mediante el procedimiento de dos pasos del glutaraldehído según lo reportado por McKenzie (1984). Esta metodología consiste en la activación de la cadena beta de la toxina mediante la incubación a temperatura ambiente con glutaraldehído.

Después de retirar el exceso de glutaraldehído, se agregó el péptido en un amortiguador que facilita la formación de uniones covalentes. Finalmente, se neutralizó los sitios reactivos no ocupados por el péptido y el conjugado se resuspendió y congeló hasta su uso. La técnica en extenso, citada por McKenzie (1984) se presenta en el anexo metodológico.

Inmunización y obtención de muestras

En el grupo experimental 1, las perras fueron tratadas con el conjugado (oZP - CTB) recibieron una inyección intramuscular que contenía 200 µg en 1 ml y libre de adyuvantes; el grupo experimental 2 tratado con el acarreador (CTB) recibió una inyección con 200 µg de la proteína en volumen de 1 ml. Finalmente, el grupo 3 testigo recibió únicamente 1 ml de solución salina fisiológica. Este procedimiento se realizó en los días 15 y 30, contado a partir de la primera inyección denominado el día 0.

Al iniciar el experimento y posterior a cada inyección, se obtuvieron 3 ml, de sangre venosa por punción radial. Y una vez colectada la muestra fue transportada en refrigeración para su procesamiento en el laboratorio, donde se obtuvo el suero por centrifugación y mantenido en refrigeración hasta su utilización para determinar la síntesis de anticuerpos por técnica de ELISA.

La titulación de los anticuerpos presentes en el suero de los animales tratados y testigos, se evaluó por duplicado mediante la variación de doble sándwich de ELISA. Se adhirieron por evaporación 0.5 µg del péptido o CTB en un pozo de una placa de ELISA. Se colocaron 100 µl de suero, en diluciones triples seriadas y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. El exceso de anticuerpos se retiró mediante el uso de una solución amortiguadora con Tween-20.

La detección de los anticuerpos dirigidos contra el péptido o la proteína (CTB), se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG de perro conjugado a peroxidasa de rábano. La unión consecutiva de estos dos anticuerpos se reveló

mediante el uso de una solución 40 mM de ABTS en amortiguador de citratos y conteniendo 10 mM de H₂O₂.

El cambio de coloración del ABTS se evaluó espectrofotométricamente con un lector para ELISA a 405 nm. Para la obtención del título funcional se graficaron las absorbancias de las diferentes diluciones después de haberseles restado la oxidación espontánea del ABTS y obteniendo la ecuación de la recta de mejor ajuste e interpolando la absorbancia al 50%.

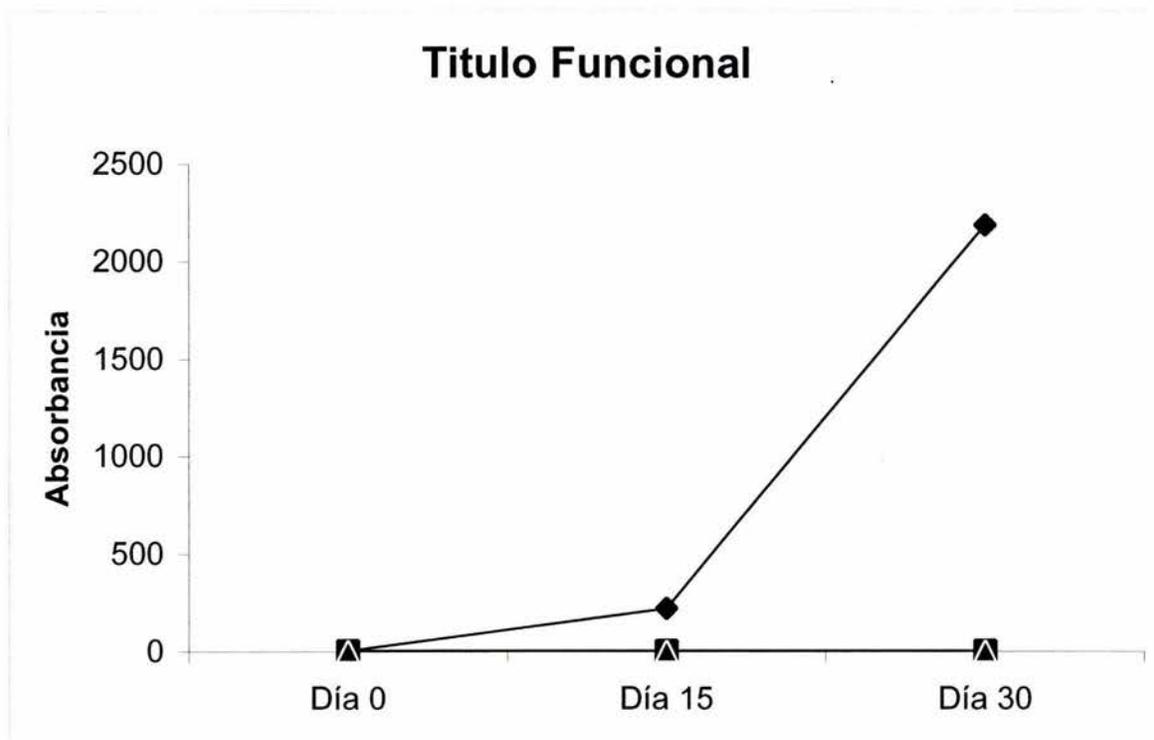
Histología de ovarios

Concluido el experimento los animales se sacrificaron de manera humanitaria con sobredosis de anestesia (Pentobarbital sódico) y de inmediato se obtuvieron los ovarios de cada animal para realizar su estudio histológico. Las muestras de tejido ovárico se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% (pH 7.4) y posteriormente se procesaron en un histoquinete automático y se incluyeron en bloques de parafina. A continuación se realizaron cortes histológicos de 6 μm de grosor los que se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para determinar las condiciones de fijación del tejido. En cortes pareados se realizó una tinción tricrómica de Gomori para evaluar la estructura histológica ovárica (Banks, 1993). La evaluación de la histología ovárica se efectuó con un analizador de imágenes (Motic® images 2000; adquirido con PAPIIT IN212101) que incluye una cámara conectada a un microscopio fotónico (axiostar-Zeiss, PAPIIT IN212101) mediante la observación de 5 campos microscópicos en la corteza ovárica con el objetivo 10X (0.1 mm^2 por campo). En estos campos, se identificó el tipo de folículos presentes (folículos primarios, secundarios, terciarios y atrésicos) y posteriormente se efectuó el conteo de los mismos. Los resultados histológicos obtenidos se sometieron a análisis estadístico "t de student", con el objeto de identificar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo testigo.

RESULTADOS

Como se muestra en la gráfica 1, los animales del grupo experimental 1 inmunizados con el conjugado (oZP - CTB), desarrollaron anticuerpos detectables pasados 15 días, de la primera inmunización. En los 5 animales pertenecientes a este grupo persistieron los títulos hasta el día 30 post-tratamiento. En la gráfica se muestran las variaciones en el título funcional promedio del grupo experimental 1 (oZP - CTB). Cada suero fue evaluado por duplicado, por lo que cada punto representa el promedio de 10 observaciones por día / por grupo. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar obtenidas.

A pesar de que es posible detectar anticuerpos en todas las muestras, del grupo 2 tratado con (CTB) y al grupo testigo, estos no son significativos Y dada la escala en que se encuentran no son visualizados en la gráfica.



Gráfica. 1. Determinación del título funcional de los anticuerpos dirigidos en contra del péptido oZP presentes en el suero de perras. El título funcional se obtuvo por interpolación al 50% de las absorbancias obtenidas por cada animal en muestras por duplicado. Cada punto representa el promedio de 10 determinaciones por día / grupo. ♦ Conjugado; ? Proteína acarreadora (CTB). † Testigo.

Efectos de la inmunización en la estructura ovárica

Los folículos de las perras del grupo testigo presentaron una estructura histológica característica, con un número abundante de folículos en diferentes estadios de maduración (figura 2A y 2B). Por el contrario, los folículos de las hembras tratadas con el conjugado presentaron una morfología alterada. Los folículos con características de terciarios, presentaron un antro poco estructurado, con una proliferación escasa de las células cúmulo y con las células que podrían conformar la corona radiada del ovocito no estructuradas (figura 2C). Asimismo, los folículos secundarios contenían ovocitos poco turgentes, con el contenido citoplásmico basófilo y en su mayoría con células de la teca separadas (figura 2D).

En la gráfica 2, se muestra un concentrado de los hallazgos histológicos. Si se toma como histoarquitectura normal al grupo testigo como el 100% de los distintos tipos de folículos presentes en un ovario, el efecto principal del tratamiento con el conjugado fue un aumento en la cantidad de folículos primarios y un descenso en el número de folículos secundarios y terciarios. El tratamiento con CTB la proteína acarreadora también induce cambios en la distribución de los folículos presentes en los ovarios de las perras, sin embargo, mientras que se presentó un aumento en la cantidad de folículos primarios, este aumento no es tan importante como el que se presentó en el grupo experimental 1, tratado con el conjugado (oZP - CTB).

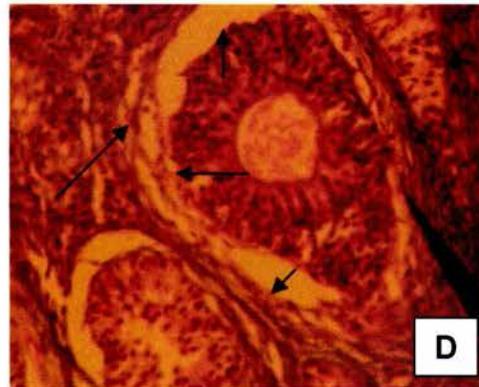
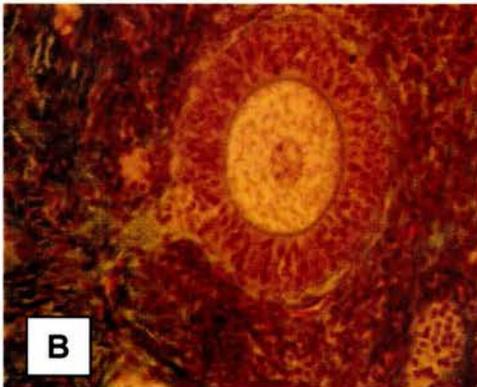
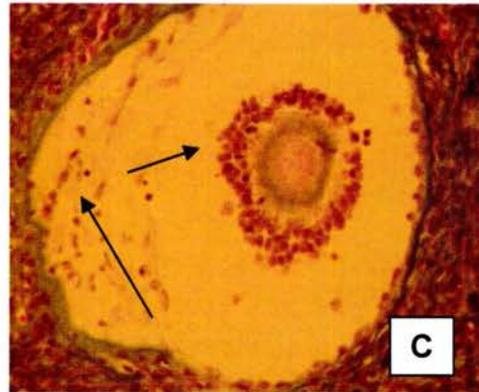
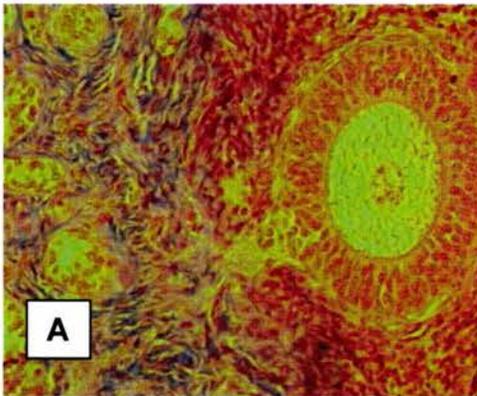
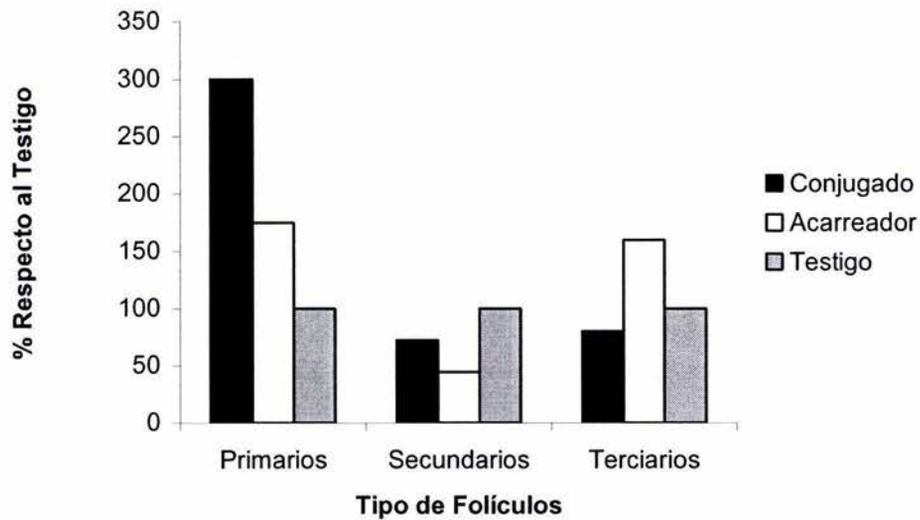


Figura 2. Efecto de la inmunización activa con el conjugado oZP-CTB. La estructura de los folículos de perras del grupo testigo (A y B) es característica de folículos en crecimiento dentro del ciclo normal de foliculogénesis ovárica. Los ovarios de las perras del grupo experimental presentaron folículos atrésicos, en folículos terciarios (C) y secundarios (D). Las flechas indican las principales alteraciones en cada folículo. Observaciones realizadas con el objetivo 10X.

En la tabla 2. Se muestran las variaciones en el número de folículos atrésicos inducidos en el grupo experimental 1, por el tratamiento con el conjugado (oZp-CTB) y el grupo experimental 2, tratado con la proteína acarreadora (CTB). Estos resultados histológicos, sometidos a un análisis estadístico, muestra que en ningún caso, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$).



Gráfica 2. Estadios de maduración de los folículos ováricos de perras tratadas con el conjugado (oZP-CTB) o contra la proteína acarreadora (CTB). Los ovarios se procesaron para su evaluación histológica como se describe en material y métodos. Se cuantificó el número de folículos presentes en 5 campos microscópicos tomados al azar de ambos ovarios. Cada barra corresponde al promedio de 10 ovarios.

Grupo	Tipo de Folículos Atrésicos	
	Secundarios	Terciarios
Testigo	3.8 ± 2.6	0.8 ± 1.8
Acarreador	2.2 ± 3.9	1.4 ± 1.1
Conjugado	4.2 ± 3.27	0.8 ± 0.8

Tabla 2. Alteraciones en el número de folículos atrésicos inducidas por el tratamiento con el conjugado (oZP - CTB) y la proteína acarreadora (CTB). Los ovarios de los animales experimentales se trataron como se describe en materiales y métodos. Se observaron 5 campos aleatorios por ovario, para hacer la evaluación y se determinó por conteo los folículos atrésicos presentes en esos campos. Los resultados son el promedio y desviación estándar de 10 ovarios por grupo.

Discusión

El tratamiento con zona pelúcida ya sea en forma solubilizada, a partir de fragmentos, de sus proteínas constituyentes e incluso de proteínas cuyos genes fueron clonados y las proteínas expresadas en bacterias, ha demostrado su utilidad y capacidad antigénica. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la potencialidad de utilizar péptidos pequeños que a pesar de ser sintetizados mediante métodos químicos, son capaces de inducir la formación de anticuerpos específicos, y además sugieren la capacidad de inducir alteraciones en la manera en que se estructura el órgano en el cual se presentan los determinantes antigénicos particulares. El péptido obtenido comercialmente que se utilizó en este trabajo también es inmunogénico, de manera similar al péptido aislado de ZP porcina utilizado en otros estudios (Millar, 1989). En su estudio, Millar y colaboradores demostraron su eficacia en ratones inmunizados con un péptido de 16 aminoácidos correspondientes a ZP₃. El péptido utilizado en nuestro estudio corresponde a la fracción central de ZP₃ β de la zona pelúcida porcina.

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los obtenidos por Gupta, (1994). Al igual que en nuestro caso, este autor utiliza un péptido sintético de solo 19 residuos que corresponde a ZP₃ unido covalentemente a la toxina diftérica. En su estudio, a pesar de que en algunas especies se detectan anticuerpos, en el caso de las perras tratadas con su preparación, no se detectan anticuerpos específicos. Esta diferencia puede deberse tanto a la secuencia específica, además de la diferencia en el tipo de proteína acarreadora que se utilizó.

Si bien en este estudio pareciera que hay un exceso de proteína inmunizada, Serrano y García-Suárez (2001) encontraron una relación entre el daño histológico y la concentración de ZP solubilizada utilizada, en perras y, si bien los efectos pueden presentarse utilizando 150 µg de ZP / kg de peso, esta cantidad difiere de la dosis utilizada en este estudio. En nuestro caso, se inocularon 200 µg de proteína total (hapteno-acarreador) / animal, incluyendo el péptido sintético sin necesidad de utilizar un adyuvante adicional cuyos efectos pueden ser nocivos, para cualquier especie tratada.

El aluminato de sodio utilizado por Serrano y García-Suárez, si bien es menos agresivo que el adyuvante completo o incompleto de Freund, no evita el manejo posterior del inmunógeno.

Cabe señalar que tras la inmunización, no se observó ningún tipo de lesión generada por el tratamiento. Esta estrategia brinda entonces la ventaja adicional de carecer de efectos secundarios, relacionadas a la utilización del adyuvante de Freund. Están bien documentados sus efectos colaterales tras la aplicación intramuscular, incluso han indicado cambios conductuales como irritabilidad y agresión asociada a las lesiones post-inmunización (Harrenstien 2004). Estas consideraciones permiten proponer que CTB podría utilizarse como un acarreador e inmunomodulador eficiente en lugar del adyuvante completo e incompleto de Freund, disminuyendo con ello lesiones locales y efectos debidos al propio adyuvante. Una de las posibles limitaciones para el uso de CTB es la posibilidad de que pueda ser tóxica al organismo. Sin embargo, es necesario recordar que la toxicidad de la toxina de cólera se debe a la subunidad alfa y no a la beta.

El hecho de que en este estudio hubiésemos encontrado la presencia de anticuerpos capaces de reconocer a CTB, indica que son necesarios estudios posteriores, enfocados a la inducción de una respuesta, que no solo neutralice la inmunización sino que incluso pueda poner en riesgo la integridad del organismo, sobre todo con el uso repetido y prolongado.

Al igual que en el caso de Hardy y colaboradores (2002), la respuesta generada por el conjugado, nuestro péptido comercial es equivalente al conjugado de un péptido sintético de zona pélcida de ratón derivado de mZP₃ a la proteína acarreadora KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin). Al igual que CTB, KLH interactúa con células del sistema inmune y principalmente con macrófagos. Esta característica permite un procesamiento eficiente del inmunógeno. En el caso de la utilización de KHL, es necesario adicionar un adyuvante aumentando entonces las variaciones que se requieran hacer al agente básico, y los riesgos de un efecto colateral indeseable, entre los aspectos más relevantes.

Las estrategias para desarrollar un inmunógeno adecuado han sido muy variadas, incluso utilizando las ventajas que proporcionan las herramientas de la Biología Molecular. Ejemplo de esto es el estudio realizado por Zhang (1997) en el cual se utilizó la clonación de los genes de ZP en una cepa de *Salmonella typhimurium* atenuada es decir, no virulenta, La estrategia se basaba en que cuando se expresaran las proteínas de ZP, las proteínas podrían localizarse en la superficie de la bacteria por lo que al ser administradas por vía oral, el organismo estaría siendo vacunado. Esta estrategia se aplicó para el control reproductivo de roedores. Los resultados aunque interesantes, son poco prometedores pues si

bien se detectaron IgG séricos, e IgA en secreciones vaginales, su efecto fue solo en tres de los 6 animales utilizados (Zhang, 1997).

La alteración en la estructura del ovario, la constitución de los folículos son algunos de los efectos, que se han observado cuando se introducen como inmunógeno componentes de ZP. Inmunizando activamente con ZP porcina solubilizada o parcialmente purificada a perras, se presentan además de ciclos estrales anormales, quistes foliculares (Mahi-Brown, 1988). Estos quistes se correlacionaban con el tipo de preparación utilizada, el grupo inmunizado con ZP solubilizada presentó quistes foliculares con una delgada capa de células de la granulosa, el grupo inmunizado con ZP purificada presento quistes con células cúmulo luteinizadas. En nuestro estudio, no se presentaron quistes, sino alteraciones indicadoras de atresia folicular. Al igual que en nuestro caso, en el estudio de Mahi-Brown (1988) se observaron ovocitos en los folículos primarios. En su estudio Mahi-Brown, demostró pérdida de uniones comunicantes entre el ovocito y las células de la granulosa. El uso del conjugado oZP-CTB aparentemente permite el establecimiento de las uniones comunicantes, pero no permite la acumulación de material extracelular del tipo del ácido hialurónico que permita formar arreglos multicelulares como la corona radiada que debería rodear al ovocito en los folículos en desarrollo.

Una explicación que pueda basarse en la formación restringida de las uniones comunicantes permite establecer el posible origen de la disgénesis folicular pero no permite explicar la razón de encontrar básicamente folículos primarios. Una posibilidad sería que hubiese un efecto inductor que permitiera la estructuración de folículos primarios. Sin embargo, y dado que está perfectamente

establecido que al nacimiento las hembras de los mamíferos cuentan con una cantidad limitada de ovocitos cuya división meiótica se encuentra detenida en dictiado, la posibilidad de proliferación y estructuración puede restringirse. Una explicación alternativa podría ser que el efecto del conjugado interrumpe la foliculogénesis y el desarrollo folicular posterior deteniendo a los ovocitos dentro de los folículos primarios. Esta interrupción no implicaría que el ovocito no pueda iniciar las etapas posteriores en respuesta al estímulo hormonal, sino que se ve impedido en mantenerlo por lo que los folículos secundarios y terciarios que se hubiesen formado tendrán finalmente un desarrollo anómalo que les forzará a iniciar el proceso apoptósico con lo que se obtendrían la morfología clásica de la atresia folicular.

Como se mencionó con anterioridad, las metodologías de ADN recombinante permiten visualizar el posible uso de proteínas o péptidos provenientes de organismos transformados genéticamente para el desarrollo de vacunas específicas. En este sentido, Govind (2002), utiliza la unión del péptido derivado del gen ZP₃ con proteínas de *E. coli*. Sin una evaluación inmunológica de su aplicación, se encontró un efecto de degeneración ovárica y aumento de folículos atrésicos, razón que explica la infertilidad de los animales utilizados. Analizando los resultados de estos dos últimos estudios, la producción del inmunógeno, pareciera relativamente económica, las etapas iniciales de clonación, selección y análisis que involucra la ingeniería genética, requieren de una inversión en infraestructura y consumibles importante, además de la capacitación particular del personal que intervenga.

Por otro lado, el desarrollo de una metodología que permita la obtención de insumos prefabricados para que puedan unirse con un método simple permite no solo su uso en el laboratorio de investigación, sino incluso puede escalarse a planta piloto o proceso industrial.

Un punto negativo de la estrategia que se utilizó en este estudio radica en la disponibilidad de CTB. Dado que forma parte de un agente tóxico, CTB tiene un uso y fabricación restringidos, sobre todo después de los atentados terroristas en países como Estados Unidos y España. Sin embargo, actualmente se cuenta tanto en estos dos países y otros, incluyendo México, laboratorios en los cuales se está utilizando el gen clonado de CTB para acoplarle determinantes antigénicos específicos como el gene E2 del virus del papiloma humano, causante del Cáncer cérvico uterino, por lo que su producción a nivel industrial es posible (Choi, 2005).

Conclusiones

La información obtenida en este estudio es valiosa ya que se comprobó la eficiencia inmunogénica del péptido sintético conjugado a la toxina, y sugiere que esta estrategia es adecuada. La técnica de conjugación empleada es eficiente, por lo menos en lo que respecta a la respuesta inmune generada en los animales tratados con el conjugado.

Se concluye que la dosis de péptido sintético oZP derivado de ZP₃ porcina unido covalentemente a la CTB como eficiente acarreador, es capaz, de generar una respuesta por parte del sistema inmune.

De manera general se concluye que la síntesis de anticuerpos generada en la perra, post-inmunización, se presenta en las dos primeras semanas. La inmunización activa, sugiere la capacidad del conjugado de inducir cambios morfológicos en los ovarios que pudieran repercutir en la fertilidad de las perras.

Lo que representaría un avance importante en el control reproductivo de esta especie ya que, esta variante le confiere a la estrategia basada en el inmunocontrol la característica de no generar efectos colaterales indeseables por lo cual se puede esperar una mejor aceptación por parte de los propietarios, así como de las asociaciones protectoras de animales, por las problemáticas antes mencionadas que implica el control reproductivo de esta especie ya sea farmacológico o quirúrgico.

Recomendaciones y Sugerencias

En el presente estudio se evaluó únicamente la respuesta inmune y su efecto a nivel estructural en el ovario. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones acerca del posible efecto del tratamiento sobre la función esteroidogénica del ovario, la integridad del eje hipotálamo-gónada, la reversibilidad de las alteraciones, el efecto que tiene estas sobre la conducta reproductiva, los posibles efectos sobre la periodicidad del estro así como la relación entre las alteraciones histológicas, sobre la fertilidad de las perras tratadas cuando sean cubiertas por un macho de fertilidad probada, atendiendo tanto el nivel conductual, de fertilidad temprana *in vitro* e *in vivo*, así como los efectos en el desarrollo embrionario temprano.

Es importante mencionar que el uso de CTB como proteína acarreadora genera la problemática en cuanto a su disponibilidad y bioseguridad por lo que es necesario explorar el uso otras proteínas acarreadoras, que representen posibilidades viables para la generación de una vacuna que permita regular la fertilidad en perras no domiciliadas.

Referencias

1. Matos- Moctezuma E. Trabajos arqueológicos en el Centro de la Ciudad de México, INAH, Serie Arqueología, segunda edición, México, 1990.
2. Asociación Canófila Mexicana. El cobrador de Labrador. Disponible en el URL <http://www.perrosdemexico.com.mx/especiales/labrador/index.html>
3. Feldmann B. The problem of urban dogs (editorial) Science, 1974; 41 (55):903.
4. Pliego SE. Evaluación de programa para el control de la fauna canina en el Distrito Federal en 1994 (tesis de licenciatura). México (D.F): Fac. Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
5. Organización Mundial de la Salud. Comité Mixto FAO-OMS. Expertos en zoonosis 3^{er} informe. México (D.F): OMS, 1992.
6. Ortega PA, Acevedo AM, Sauri CA, Bolio GM, Gutiérrez B. Prevalencia de tumor venéreo transmisible en perros callejeros de la ciudad de Mérida, Yucatán México. Rev Biomed 2003;14: 83-87.
7. García AN, Medina BG, Reinares OJ. Zoonosis emergentes ligadas a animales de compañía en la comunidad de Madrid: Diseño de un método para establecer prioridades en salud pública. Rev. Esp Salud Pública 2004; 78: 389-398.
8. Galindo CM. Contribución al estudio de la rabia en perros callejeros de la Ciudad de México a través de la determinación de anticuerpos antirrábicos en suero y líquido cefalorraquídeo (tesis de maestría). México (D.F): Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
9. Domínguez J. La responsabilidad de tener un perro. Revista AMMVEPE. 2001; 12 (3):68.
10. Warner R. Occurrence and impact of zoonosis in pet dogs and cats at US air Force bases. Am J. of Publ. Hlth.2002; 74:1239-1243.
11. Faulkner L. Dimensions of the pet population problem. J. Am Vet. Med. Assoc. 1994; 166: 477-478.
12. Higuera B. Aspectos generales de la rabia en México. Rev. Salud Pública en México. 1974; 16: 379-383.
13. Fuentes MR, Cárdenas LJ, Aluja AS. Cálculo de la población canina en la ciudad de México, determinación de sus condiciones de atención y destino. Vet Méx 1981; 12:59-71.

14. Romero López JA. Estudio de estructura poblacional en perro de la Delegación Álvaro Obregón, D.F. (tesis de maestría). Fac de Med. Vet y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. 2001.
15. Organización Mundial de la Salud OMS. Guidelines for Dog population management. WHO/ZOON/90.165.Geneva, May 1995.
16. Schneider R. Survey of canine and feline populations: Alameda and Contra Costa Counties, California, 1970. JAVMA, Vol. 166, No.5, 481-486 (March/1970).
17. Morales M. Caracterización de la población canina y sus cambios en la comuna de Santiago. Avances en ciencias veterinarias 1993; 8 (1): 29-32 .
18. Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Hoffaman JC, Huang TT Jr. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine zonae pellucidae: Use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. Biol Reprod 1985; 32 (4):761-772.
19. Mahi-Brown CA. Prospects for control of fertility in female dogs by active immunization with porcine zona pellucida proteins. Cell Immunol 1989;124:368-379.
20. Robles MS. Estudio costo beneficio para campañas de esterilización de perros en la Delegación Coyoacán (jurisdicción sanitaria IV) (tesis de maestría). México D.F Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
21. Secretaria de Salud-OPS: Tercera Reunión internacional sobre avances en la investigación para el control de rabia en las Américas.1994.Resumen.
22. Serrano H, García -Suárez MD. Alteraciones en ovarios de perras por inmunización activa con proteínas de ovocitos de cerdo. Vet. Méx 2001; 32:221-224.
23. Shille VM, Stabenfeldt G. Current concepts on reproduction of the dog and cat. Adv. Vet Sci. Comp. Med 1980; 2: 211-246.
24. Garza MV. Control farmacológico del ciclo reproductivo de la perra (tesis de licenciatura). México (D.F): Fac. Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, 1996.
25. Ibarra LM, Morales MM, Alvarado JC. Fertility control in dogs by use of the proligestona. Av. Ciencias Veterinarias 2000;15 :1-2.
26. Dharmacelan S, Ganesht N. Esterilization in bitches; comparison of three techniques. Indian Journal of Veterinary Surgery 2000; 21(2):65-68.
27. Rodaski S, Weiss RR. Esterilization in dogs. Archives of Veterinari-Sciencez. 2001; 6:17-29.

28. Tamada H, Kawate N, Inaba T, Sowada T. Long term prevention of estruos in the bitch using chlormadinone acetate. *Canadian Veterinary-Journal* 2003; 44: (5) 416-417.
29. Kutzler MA, Root Kustritz MV. Contraception and pregnancy termination. *Small Animal. Theriogenology* 2003; 125-164.
30. Fayrer-Hosken RA. Immunocontrol in dogs. *Animal Reproduction Science* 2000; 60-61 (Special-Issue) :365-373.
31. Trigg TE. The practical Application of GnRH agonist for contraception in dogs and cats. *International symposium on nonsurgical methods for pet population control.* April.2002.
32. Naz RK, Rajesh C. Passive immunization for immunocontraception: lessons learned from infectious diseases. *Drugs* 2005; 65 (5): 593-603.
33. Wassarman, PA, Albertini, DA. 1994. The mammalian ovum. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil, JD Neil, eds).
34. Skinner SM, Mills T, Kirck HJ, Dunbar BS. Immunization with zona pellucida proteins in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology* 1984; 115:2418-2432.
35. Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Nelson ML, Yanagimachi H, Palumbo N. Ovarian histopathology of bitches immunized with porcine zona pellucida. *Am J Reprod Immunol. Microbiol.*1988; 18 (3):94-103.
36. Jones GR, Sacco AG, Subramanian MG, Kruger M, Zhang S, Yurewwics EC, Moghissi KS. Histology of ovaries of female rabbits immunized with deglycosylated zona pellucida macromolecules of pigs. *J Reprod Fertil* 1992; 95 (2): 513-525.
37. Lou Y, Ang J, Thai H, Mc Elveen F, Tung KS. A zona pellucida 3 peptide vaccine induces antibodies and reversible infertility without ovarian pathology. *J Immunol* 1995; 155 (5): 2715-2720.
38. Paterson M, Wilson MR, Van-Duin M, Aitken RJ. Evaluation of zona pellucida antigens as potential candidates for immunocontraception. *J Reprod. Fertil. Suppl.* 1996; 50:175-182.
39. Paterson M, Jennings ZA, Wilson MR, Aitken RJ. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol* 2002; 53 (1-2):99-107.
40. Serrano, H., García-Suárez, MD. 2001. Molecular aspects of mammalian fertilization. *Asian J. Androl.*2001; 243-251.
41. Bagavant H, Fusi FM, Baisch J, Kurth B, David CS, Tung SK. Immunogenicity and contraceptive of a human zona pellucida 3 peptide vaccine. *Biol Reprod* 1997; 56:764-770.

42. Rath D, Petersen TE, Michelmann HW, Schwartz P, Ebeling S. Zona pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 15; 63 (2):352-362.
43. Hasegawa A, Hamada Y, Shigeta M, Koyama K. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA). *J Reprod Immunol* 2002; 53:91-98.
44. Yanagimachi, R. 1994. Fertilization in mammals. In: *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil, JD Neil, eds)
45. Dunbar BS, Kaul G, Prasad M, Skinner SM. Molecular approaches for evaluation of immune responses to zona pellucida (ZP) and development of second- generation ZP vaccines. *Reprod Suppl.* 2002; 60:9-18.
46. Maresh GA, Dunbar BS. Antigenic comparison of five species of mammalian zonae pellucidae. *J. Exp. Zool* 1987; 244:299-307.
47. Tesarik J. Targeting the zona pellucida for immunocontraception: a mini review. *Hum Reprod.* 1995; 10 Suppl 2:132-139.
48. Sacco AG, Afzalpurkar A, Yurewicz EC, Gupta SK. Induction of native protein reactive antibodies by immunization with peptides containing linear B cell epitopes defined by anti porcine ZP3 B monoclonal antibodies. *J Reprod Immunol* 1997; 33:113-125.
49. Carino C, Pradas S, Skinner S, Dunbar B, Chirinos M, Schwoebel E, Laerrea F. Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries. *Reprod Biomed Online.* 2002; 2:116-126.
50. Barber MR, Fayer-Hosken RA. Evaluation of somatic and reproductive immunotoxic effects of porcine zona pellucida vaccination. *J Exp Zool* 2000; 286: 641-646.
51. Gupta SK, Choudhury S, Sriastava N, Ravi C. Zona pellucida glycoproteins based immunocontraceptive vaccines: strategies for development and their applications. *Indian J Exp Biol.* 2004; 41 (7): 682-693.
52. Dunbar BS, Lo BAC, Powell BSJ, Stevens CV. Use of a synthetic peptide adjuvant for immunization of baboons with denatured and deglycosylated pig zona pellucida glycoprotein. *Fertility and Sterility* 1989; 52:311-318.
53. McKenzie SJ, Halsey JF. Cholera Toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J Immunol.* 1984; 133:1818-1824.
54. Banks, W.J., 1993. *Applied Veterinary Histology.* 3th ed. Mosby Year Book. USA., 529 pp.
55. Sánchez J, Solórzano RM. Desarrollo de vacunas orales basadas en proteínas recombinantes derivadas de la toxina de cólera. *Salud Pública de México* 1992; 34 (3):287-291.

56. Xin Z, Lou YH, Koopman M, Doggett T, Kenneth SK, Tung, Curtiss R. Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. *Biol Reprod* 1997; 56:33-41.
57. Chhabi K, Govind, Srivastava NS, Gupta. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *E. Coli* expressed recombinant non human primate ZP glycoproteins in homologous animal model. *Vaccine* 2002; 21:78-88.
58. Douglas MG, Hirst RT, Snider DP. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun* 2001; 4:3476-3482.
59. Kirkpatrick JF, turner JW Jr, Liu IK, Fayrer-Hosken R. Applications of pig zona pellucida immunocontraception too wildlife fertility control. *J Reprod Fertil Suppl.* 1996; 50:183-189.
60. Hardy CM; Have JFM, Mobbs, Hinds LA. Assessment of the immunocontraceptive effect of a zona pellucida 3 peptide antigen in wild mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002; 14: 151-155.
61. Harrenstien LA, Munson L, Chassy LM, Liu IK, Kirpatrick JF. Effects of zona pellucida immunocontraceptives in zoo felids. *J Zoo Wild Med.* 2004; 35:271-279.
62. Harrenstien LA, Munson L, Chassy LM, Liu IK, Kirkpatrick JF. Effects of porcine zona pellucida immunocontraceptives in wild animals. *J Zoo Wild Med* 2004; 35 (3): 271-279.
63. Levy JK, Mansour M, Crawford PC, Pohajdak B, Brown RG. Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology.* 2005; 15; 63 (5):1334-1341.
64. Kirkpatrick JF, Liu IM, Turner JW, Jr, Naugle R. Long-term effects of porcine zonae pellucidae immuno contraception on ovarian function in feral horses (*Equus caballus*). *J. of Reprod and Fertil.* 1992; 94: 437-444.
65. Gorban SP, Levy JK, Hampton AL, Collante WR, Harris AL, Brown RG. Evaluation of porcine zona pellucida vaccine for the immunocontraception of domestic kittens. *Theriogenology* 2002; 58 (1):135-149.
66. Sivapurapu N, Upadhyay A, Hasegawa A, Koyama K, Gupta SK. Native zona pellucida reactivity and in vitro effect on human sperm-egg binding with antisera against bonnet monkey Zp1 and Zp3 synthetic peptides. *J Reprod Immunol* 2002; 56(1-2):77-91.
67. Sun W, Lou YH, Dean J, Tung KSK. Contraceptive peptide vaccine targeting sulfated glycoprotein ZP2 of mouse zona pellucida. *Biol Reprod* 1999;60: 900-907.
68. Mahi-Brown CA, Mc Guinness RP, Moran F. The cellular immune response to immunization with zona pellucida antigens. *J Reprod immunol* 1992; 21(1): 29-46.

69. Lou IK, Turner JW, Van Lecuwen EM, Flanagan DR, Hedrick JL, Murata K, Lane VM, Morales-Levy MP. Persistence of anti zona pellucida antibodies following a single inoculation of porcine zona pellucida in the domestic equine.
70. Sacco AG. Zona pellucida as a candidate for contraceptive vaccine development. American J. Reprod. Immun. and Microbiology 1987;15; 122-130.
71. Schutte AP. Canine vaginal cytology. Technique and cytological morphology. J Small Anim Pract 1967; 8 (6):301-06.
72. Schutte AP. Canine vaginal cytology. Cyclic changes. J Small Anim Pract 1967; 8 (6):307-311.
73. Schutte AP. Canine vaginal cytology. Compilation and evaluation of cellular indices. J Small Anim Pract 1967; 8 (6):313-317.
74. Jeffcoate IA, Lindsay FE. Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of vagina in domestic bitches. J Reprod Fertil Suppl 1989; 39:277-287.
75. Tammer I, Blendinger K, Sobiraj-Bostedt H. The use of exfoliative vaginal cytology for the gynecological evaluation of the bitch. Tierarztl Prax 1994; 22 (3):199-207.
76. 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.
77. Naz RK, Chauha SC. Human sperm-specific peptide vaccine that causes long-term reversible contraception. Biol Reprod 2002; 67: 674-680.
78. Mahi-Brown CA. Primate response to immunization with a homologous zona pellucida peptide. J Reprod and Fertility 1996; 50:165-174.
79. Mahi-Brown CA, Yanagimachi R, Hoffman JC, Huang TTF. Fertility control in the bitch by active immunization with porcine pellucida: Use of different adjuvants and patterns of estradiol and progesterone levels in estrous cycles. Biol of Reprod 1988; 32:761-772.
80. Hasegawa A, Tsubamoto H, Hamada Y, Koyama K. Blocking effect of antisera to recombinant zona pellucida proteins (r-ZP) on in vitro. Am J Reprod Immunol 2000; 44(1):59-64.
81. Govind CK, Srivastava N, Gupta SK. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli* expressed recombinant non human primate zona pellucida glycoproteins in homologous animal model. Vaccine 2002; 22 (1-2):78-88.
82. Choi YP, Kang S, Hongs S, Xio X, Cho NH. Analysis of progressive factors in uterine cervical cancer. Proteomics. 2005; 18 (6) :1481-1493.

Grupos Experimentales

Grupo	Conjugado (oZP-CTB)	Acarreador (CTB)	Testigo (Solución Salina)
Características			
Número de Animales	5	5	5
Peso en Kg ($\bar{x} \pm d.s$)	13.2 ± 8.78	13.4 ± 3.57	17.8 ± 2.77
Tratamiento Dosis	200 μ g	200 μ g	Solución salina fisiológica
Volumen	1 ml	1 ml	1 ml
Número de sangrados	3	3	3

Se presenta el promedio y desviación estándar obtenida por el registro de peso en kilogramos de los animales de experimentación. La dosis de tratamiento de cada grupo, fue dosis total no por μ g / kg de peso vivo. La toma de muestras se realizó durante un periodo de 30 días, realizando tres colecciones de suero con intervalo de 15 días.

Manejo de los animales de experimentación

Las perras fueron alojadas individualmente. Se les habituó al manejo por parte de las personas encargadas de su cuidado favoreciendo su socialización, se pasearon semanalmente, y se mantuvieron aseadas. El área fue previamente desinfectada y se realizó un control de roedores 20 días antes de su ingreso a las instalaciones, se les proporcionaron, platos, cubetas y collares que permitieran en su momento hacer más sencillo su manejo y su identificación.

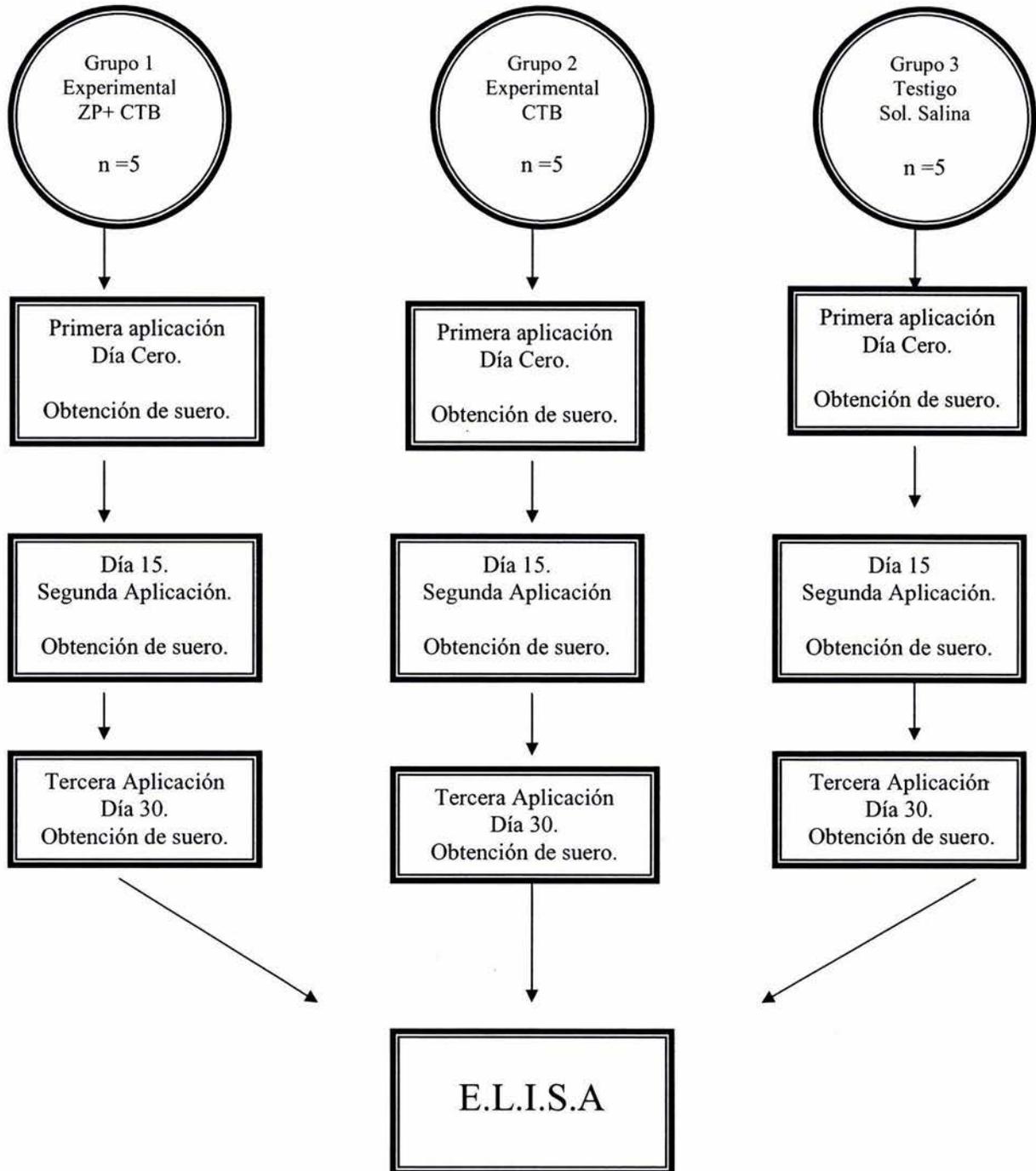
Se mantuvieron en observación por periodo de 30 días, Y durante este periodo únicamente se les habituó a la presencia humana, realizando como único manejo la rutina de pasear en las instalaciones donde se mantuvieron, esto con el propósito de disminuir el estrés, generando confianza en los animales, en este tiempo se realizaron observaciones clínicas con el fin de descartar cualquier proceso infeccioso.

Se utilizó dieta comercial para mantenimiento, con 26 % de proteína, administrando 500 gramos diariamente, dos veces al día y proporcionando agua limpia *ad libitum*.

Se les proporcionó tratamiento antihelmíntico con mebendazol a dosis de 22 mg / kg, cada 24 horas durante 3 días vía oral, repitiendo el tratamiento a los 21 días. Posteriormente se inmunizaron contra la rabia, y se realizó examen clínico general a cada una de ellas. Con el fin de descartar cualquier alteración de carácter reproductivo, se realizaron citologías vaginales exfoliativas, de manera seriada por un periodo de 4 meses. Además de tener especial cuidado en observar cualquier cambio físico o conductual que requiriera atención médica.

Se realizó colección de muestras serológicas para realizar la prueba de aglutinación microscópica con el objetivo de descartar leptospirosis, ya que dicha enfermedad además de ser zoonótica afecta directamente la fertilidad. El resultado de estos análisis fue negativo para todos los animales que participaron en el proyecto. Se hizo un registro de los pesos de todos los animales al iniciar los tratamientos este registro se realizó tras la aplicación de la primera inmunización. Para dicho manejo fue necesaria una sedación ligera administrando clorhidrato de xilacina a dosis efecto.

Diseño Experimental



Características de la subunidad beta de la toxina de cólera

Esta estrechamente relacionada en estructura y actividad con la enterotoxina termo lábil producida por *E. coli*. Ambas se reportan como fuertemente inmunogénicas por la vía oral, nasal y parenteral encontrándose una rápida respuesta con la producción de anticuerpos anti-toxina tras su administración. La toxina de cólera es reconocida tanto como potente adyuvante en la administración de tratamientos orales tanto responsable de la respuesta inmune asociado o coadministrado con otros antígenos. La toxina es un complejo hetero-oligomérico, un complejo enzimático, la subunidad A y cinco unidades idénticas que rodean a la subunidad A, denominada subunidad B. La subunidad A es la responsable del incremento de los niveles de adenosin mono fosfato cíclico cAMP, produciendo la pérdida de fluidos característica de la enfermedad del cólera.

La subunidad B muestra diferentes fases de actividad inmunomoduladora, estas actividades incluyen la elevación de Th1 y Th2 tipo citotóxicos CD8+, CD4+, activación del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MCH II), moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM), CD 25, CD 40. Y modulan la presentación del antígeno por células B y macrófagos. Así la subunidad B, se ha encontrado como buen estimulante para la producción de anticuerpos, donde la GM₁ cumple con la función acarreadora lo que le otorga sus características inmunogénicas y su actividad como adyuvante. (Douglas, 2001).

Metodología de Conjugación

Se recibió el péptido en presentación de liofilizado con un peso molecular de 20.36 kDa, y una pureza de 78%, con propiedades hidrofóbicas, y puede ser detectado a una lectura 214 nm. Fue manejado bajo las indicaciones del laboratorio fabricante almacenado a -20°C y por sus características hidrofóbicas fue disuelto en un volumen mínimo de DMSO, teniendo la alternativa de utilizar cualquier solvente orgánico que fuera compatible con el experimento.

El péptido sintético de 18 aminoácidos derivado de zona pelúcida porcina (ZPp) en 100 μl de DMSO, del cual, se tomaron 2.63 μl con una concentración de 400 μg , y se agregaron a 200 μl de buffer de fosfatos ($\text{PO}_4^3\text{Buffer}$) con pH 6.8. Se disolvieron por agitación, añadiendo 10 μl de glutaraldehído al 25%, la mezcla se mantuvo por un periodo de 18 horas, en ausencia de luz y temperatura ambiente.

La subunidad beta de toxina de cólera (CTB) se reconstituyó quedando a una concentración de 1 mg/100 μl , a la mezcla se le agregaron 40 μl con una concentración de 400 μg de CTB y 200 μl de buffer pH 9.5 después de agregar la toxina se dejó en agitación 24 horas a 4°C . Pasado este periodo se agregó Biogel G-100, hidratado en 2 ml de buffer pH 9.5 y se agregaron a la vacuna 615 μl , manteniendo en agitación para remover el glutaraldehído. Para la eliminación de los reactivos se agregó Sephadex G-100 (Sigma) sometiendo la mezcla a agitador magnético a 4°C por 1 hr, posteriormente a centrifugación a 1000 Xg/5 min., Considerando el sobrenadante (conjugado) y el precipitado (los reactivos utilizados para la conjugación). (McKenzie, 1984). Se realizó la lectura de conjugado en el espectrofotómetro (spectrometer lamda 2 UV/ VIS).

Después de los cálculos de la concentración de proteínas contenidas en el conjugado, se calculó la dosis para cada grupo, por lo cual se prepararon soluciones madre, con cada tratamiento hasta su dilución, al momento de ser aplicadas.

Detección de anticuerpos por técnica de ELISA.

Se realizó la prueba de ELISA indirecta para detección de anticuerpos. Se preparo una solución con una concentración de .5 μg de antígeno en 50 μl de agua desionizada. Se colocaron 50 μl en cada pozo de la placa, para cada dilución se incubó a 37° C hasta evaporación por 14-16 horas, pasado este periodo se reconstituyo y lavo con .1% de BSA en PBS.

Se agregó 100 μl del suero problema diluida apropiadamente 1:100 en la solución para diluir anticuerpo y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente sin agitación, lavando nuevamente con tween 20 en agua destilada agregando 50 μl de solución conteniendo el anticuerpo anti IgG de perro producido en conejo, incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente nuevamente sin agitación. Preparando diluciones decuples seriadas con un volumen final de 100 μl . Lavando nuevamente y se agregó 100 μl de la solución del sustrato. Incubando por 30 minutos, en los pozos positivos esperando una coloración verde claro, la intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado revelado. Posteriormente se utilizó el lector de ELISA a 405 nm. Obtenidos estos resultados, se graficaron y se obtuvieron los títulos funcionales para cada tratamiento.

No. cuenta

50301235-5

tel 01 322 297 ~~54~~ 66

medinamarlanna@hotmail.com