

Validación de un modelo experimental para el uso de conejos hembra en pruebas de eficacia de la vacuna anti-GnRH como método de inmunocastración

**Carlota Fernández-Pacheco. María José Rojas Gutiérrez.
Beatriz Monsalve Roquero. Elena Nevado Artanz.**

Avenida de Puerta de hierro S/N. Licenciatura en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
carlo.vet@hotmail.com

Pilar Millán Pastor¹. Pilar García Rebollar².

¹Avenida de Puerta de hierro S/N. Departamento de Fisiología Animal. Licenciatura en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. ²Senda del Rey s/n. E.T.S.I Agrónomos. Dpto. Producción Animal UPM
pmillanp@vet.ucm.es

Resumen: la inhibición del eje hipotálamo-hipófisis a partir de la administración de una vacuna frente a GnRH (IMPROVAC® Pfizer Animal Health S.A) para evitar el desarrollo de los órganos sexuales es ya una realidad en animales de producción. Paralelamente a un estudio llevado a cabo en machos, se ha realizado una valoración del modelo experimental en conejos hembra para saber si éstos animales son viables a la hora de realizar pruebas de funcionalidad de dicha vacuna. Para ello, se han empleado 18 animales repartidos en dos grupos: 8 control y 10 vacunados. Se les administraron dos dosis vacunales, la primera a las 11 semanas de vida y la segunda, 4 semanas más tarde. Cada semana se realizaron extracciones de sangre para controlar las variaciones de hormona luteinizante (LH) y de progesterona (P4) en sangre mediante ELISA. Las conejas se sacrificaron a las 24 semanas de vida y se les extrajeron los ovarios; uno se usó para realizar un estudio histológico de las posibles alteraciones microscópicas que pudiera haber generado la vacuna y con el otro se realizó un homogeneizado que se sometió a una prueba ELISA para cuantificar la cantidad de P4 que había en comparación a los animales control. Las diferencias entre los animales vacunados y controles fueron enormes tanto en los resultados de las pruebas de ELISA como en el análisis microscópico de los cortes histológicos de los ovarios, demostrando que la vacuna es eficaz en conejos y que este animal es adecuado para el modelo experimental.

Palabras clave: inmunocastración. Conejos. IMPROVAC®. Eje hipotálamo-hipófisis.

INTRODUCCIÓN

Uno de los sistemas para producir una inmunoesterilización es el basado en la administración de una vacuna anti-GnRH que inhibe el eje hipotálamo-hipófisis, responsable de la síntesis de hormonas esteroides, fundamentalmente progesterona y LH, que juegan un papel fundamental en el desarrollo y maduración sexual de los mamíferos. Dentro de los diferentes sistemas inmunocontraceptivos, la vacuna anti-GnRH se emplea de forma satisfactoria en la inmunocastración en cerdos de producción. La vacuna (IMPROVAC®, Pfizer Animal Health S.A. España) contiene un análogo sintético de la GnRH natural que se conjuga con una proteína, de tal manera que el organismo reacciona inmunológicamente estimulando la producción de anticuerpos específicos contra la GnRH hipotalámica impidiendo que ésta se una a sus receptores y bloqueando así el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Al no ejercerse la acción de la GnRH no se estimula la producción hormona folículo-estimulante (FSH) ni hormona luteinizante (LH) hipofisarias, que son las encargadas del desarrollo reproductivo y sexual, que inducen la maduración de las gónadas, la producción esteroideogénica y el establecimiento del ciclo reproductivo en las hembras ⁽¹⁾

La dosis inicial se encarga de crear células de memoria, pero no estimula una producción de anticuerpos activos. Al administrar la segunda dosis, el organismo reconoce el antígeno y se produce una respuesta incrementando la producción de anticuerpos. Es conveniente aplicar esta vacuna en animales jóvenes, antes de que se produzca el completo desarrollo reproductivo, dado que esto asegura una mayor eficacia ⁽¹⁾. Sin embargo, si no se lleva a cabo una revacunación continuada, algunos estudios apuntan a que el nivel de anticuerpos desciende y el efecto de la vacuna pasa a ser reversible ⁽¹⁾. En este estudio se pretende valorar si es posible utilizar el conejo como modelo experimental para evaluar la eficacia de esta vacuna y sus consecuencias sobre hormonas de origen hipofisario como la LH y Progesterona (P4). Además se ha querido analizar los efectos sobre el tejido ovárico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 18 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) hembras híbridos (Neozelandés blanco x Californiano) divididos al azar en 2 grupos, el primero llamado CH o hembras control estaba formado por 8 animales que no recibieron ningún tratamiento y un segundo grupo denominado VH, formado por hembras vacunadas con 10 animales a los que se les administró anti-GnRH. Los animales fueron alojados en ambiente controlado en el Animalario del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria (Nº Registro EX-011-U).

La administración de la vacuna se llevó a cabo en dos dosis (1ml/conejo s.c.), la primera a las 11 semanas de vida y la segunda 4 semanas después (fase prepuberal).

En la semana 23 (fase puberal), a todos los animales se les suministró un análogo de GnRH, gonadorelina acetato, a una dosis de 1 mL/ animal i.m. (Inducel GnRH, Laboratorios Ovejero. España). A todos los animales se les tomó una muestra sanguínea cada 7-15 días, que fue centrifugada para separar el suero. Éste fue alícuotado y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis. El día de la estimulación hipofisaria, se tomaron 4 muestras sanguíneas a los 0, 60, 120 y 180 minutos post inyección con gonadorelina.

Al sacrificio de los animales, a las 24 semanas de vida, se procedió a la extracción de los ovarios. Tras su pesado, el ovario derecho se congeló inmediatamente a -20 °C para su posterior homogeneizado y análisis. El ovario izquierdo se introdujo en formaldehído al 4% para su posterior parafinado, cortado y teñido con hematoxilina/eosina para su estudio histológico. Para determinar Progesterona en el ovario, se tomó una cantidad determinada del tejido y se maceró utilizando un homogeneizador de vidrio disolviendo el tejido en PBS (Tampón fosfato, pH 7,4). Posteriormente se congeló y descongeló 3 veces para romper las células y favorecer la salida de la P4 de las mismas. Tras centrifugar el homogeneizado, se separó el sobrenadante y congeló a -20°C.

Para determinar progesterona en suero y homogeneizado de ovario, se empleó un kit comercial (P4 ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Germany) basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal específico antiprogestero. A los pocillos se les añaden una cantidad determinada de estándares y suero de las muestras e inmediatamente se añade el conjugado (P4-HR-peroxidasa) la progesterona de las muestras o estándares, compiten con el conjugado por los lugares de unión al anticuerpo. Después de la incubación el conjugado no unido se separa por lavado de la placa. En el siguiente paso se añade el sustrato y cromógeno (TMB) que reaccionará con la peroxidasa provocando un cambio de color cuya intensidad es inversamente proporcional a la cantidad de hormona natural que tenga la muestra.

La determinación de LH se realizó utilizando una técnica ELISA específica de conejo desarrollada en el Dpto. de Fisiología Animal, Veterinaria UCM (2). Dicha técnica utiliza antígenos y anticuerpos específicos de conejo, así como un anticuerpo secundario. Se basa en una reacción de competición entre la LH de la muestra y estándar con un conjugado formado por LH de conejo unido a biotina que reaccionará con estreptavidina unida a HRP. Las placas se leyeron en un espectrómetro de microplacas (Stat Fax® 3200, Awareness Technology, Inc.USA) y las absorbancias fueron procesadas utilizando un software (Miraibio Inc. USA) que tras utilizar un algoritmo de 4 parámetros logísticos para ajustar la curva estándar, proporciona la concentración de LH y progesterona en ng/mL.

Todos los resultados fueron analizados con un test ANOVA. Se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera dosis vacunal se administró a las 11 semanas de vida y la segunda a partir de las 15 semanas. En las semanas posteriores, se observó que en los animales controles, los niveles séricos de LH (Fig. 1) mantenían en principio una similitud entre el grupo control y el vacunado. Progresivamente fueron aumentando en el grupo control observándose un incremento estadísticamente significativo en la semana 18 de vida. Este incremento parece indicar la entrada en pubertad de las conejas donde se producen aumentos puntuales (2), que posteriormente bajan a niveles basales. Sin embargo, en el grupo vacunado la LH mantenía unos niveles basales. A las 23 semanas se inyectó a todos los conejos GnRH exógena para valorar la respuesta hipofisaria y ovárica. A los 60 y 90 minutos de la estimulación con gonadorelina, los niveles séricos de LH de los animales control se incrementan considerablemente (pico de la LH) manteniéndose a los 90 minutos y llegando a valores basales a los 180 minutos (2). Estas concentraciones de LH inducen la estimulación folicular y la ovulación. Sin embargo, en los animales vacunados los niveles de hormona no sufren apenas cambios. En la valoración de la P4 (Fig. 2), los niveles se observan muy bajos en ambos grupos, control y vacunadas, hasta el momento de la estimulación con gonadorelina. Se apreció un incremento brusco y progresivo de los niveles de P4 de las hembras control consecuentes a la respuesta a la LH, y una ausencia completa de respuesta de las hembras vacunadas.

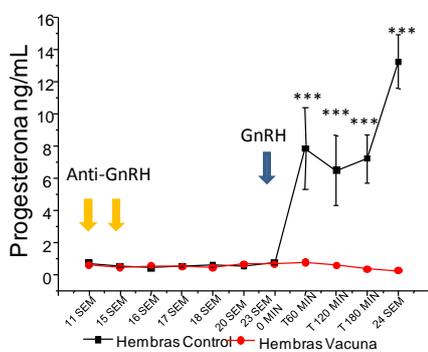


Figura 1.

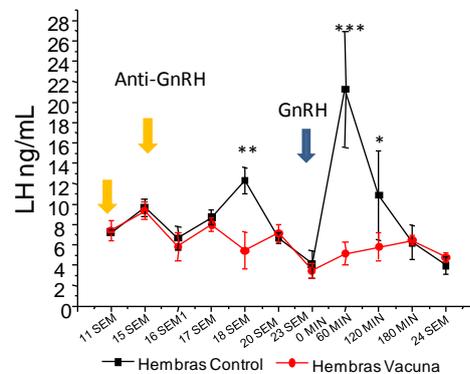


Figura 2.

El estudio de los niveles de progesterona en los homogeneizados ováricos (Fig. 3) también señaló que existían marcadas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) entre las hembras vacunadas y las control.

Se observó que los niveles de progesterona en hembras control eran de 500ng/g, mientras que en las hembras vacunadas los niveles de la hormona son muy inferiores, de 50ng/g, al final de la experimentación.

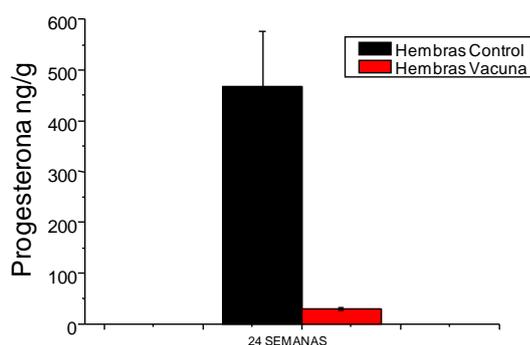


Figura 3.

Paralelamente al estudio de las variaciones hormonales, se realizó un estudio histológico de los ovarios para comprobar microscópicamente si existían diferencias estructurales destacables entre ambos grupos de animales. Se observó una evidente atrofia del parénquima, habiendo una falta de desarrollo de folículos en distintos grados de maduración de los conejos vacunados (Fig. 4) respecto a los controles (Fig. 5). Además, en las conejas vacunadas tampoco se observaron folículos preovulatorios o cuerpos lúteos, presentes en los animales control.

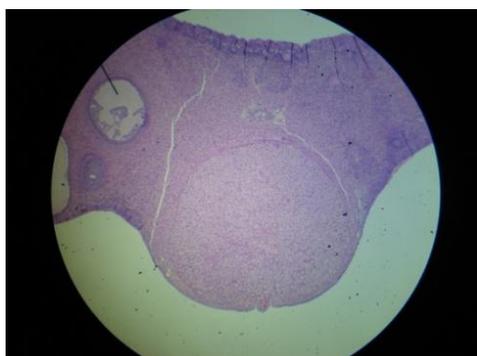


Figura 4. Cuerpo Lúteo y folículo de ovario de coneja control.

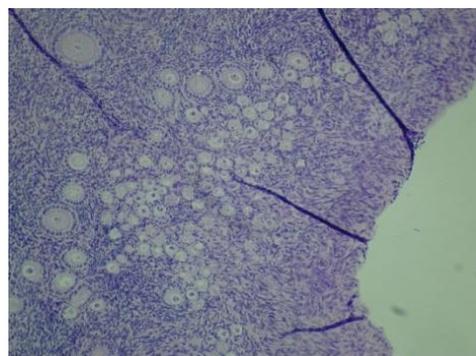


Figura 5. Folículos primordiales en ovario de coneja vacunada.

CONCLUSIÓN

Después de analizar los niveles de las principales hormonas sexuales en hembras y ver que los niveles de progesterona y LH de las conejas vacunadas eran mucho menores que los de los controles y después de observar diferencias tanto funcionales como estructurales, queda más que demostrado que la vacuna es eficaz en conejos y que éstos sirven para analizar la funcionalidad de la misma en experimentos futuros y por tanto, puede ser un modelo experimental válido para el estudio del efecto inhibitor del eje hipotálamo-hipófisis-testículo, que era el objetivo de nuestro experimento.

BIBLIOGRAFÍA

1. M. Arias-Álvarez, R.M. García-García, P.G. Rebollar, L. Revuelta, P. Millán, P.L. Lorenzo Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology* 72 (2009) 612–623
2. P.G. Rebollar A. Dal Bosco, P. Millán, R. Cardinali, G. Brecchia, L. Sylla, P.L. Lorenzo, C. Castellini. Ovulating induction methods in rabbit does: The pituitary and ovarian responses *Theriogenology* 77 (2012) 292–298
3. Dal Bosco, A., et al. Ovulation induction in rabbit does: Current knowledge and perspectives. *Anim. Reprod. Sci.* (2011)
4. Julie Bakker and Michael J. Baum. Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21 (2000) 220-262
5. X.Y.Zenget. et Al. Effects of active immunization against GnRH on serum LH, inhibin A, sexual development and growth rate in Chinese female pigs. *Theriogenology* 58 (2002) 1315-1326
6. Boiti, C., Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does. In: *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress– Puebla, Mexico*, pp. (2004) 186–206.
7. J.Bakker, M.J. Baum Neuroendocrine Regulation of GnRH Release in Induced Ovulators (*Department of Biology, Boston University, 5 Cummington Street, Boston, Massachusetts 02215*)
8. A. Dal Boscoa, P.G. Rebollarb, C. Boiti, M. Zeranid, C. Castellini Ovulation induction in rabbit does: Current knowledge and perspectives.

Recibido: 7 noviembre 2013.

Aceptado: 24 febrero 2014.