



Imunocontraceção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães (*Immunocontraception in mammals emphasizing dog population control*)

Cláudio Afonso Pinho Lopes*, **Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro**, **José Ricardo de Figueiredo**

Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil.

* Correspondência: claudioapl@gmail.com

Resumo

A superpopulação de cães constitui um sério problema em diversas cidades do mundo, sendo necessário o desenvolvimento de sistemas de contenção de natalidade baseados no controle da reprodução. Os métodos contraceptivos atualmente disponíveis são inadequados para uso em escala populacional. Neste contexto, a imunocontraceção surge como uma importante perspectiva para a solução desta questão. No presente trabalho, são abordados diferentes métodos de imunocontraceção em mamíferos, baseados no uso de hormônios reprodutivos, antígenos do embrião, da zona pelúcida e do espermatozóide, apresentando seus princípios e os avanços obtidos em seu desenvolvimento.

Palavras-chave: imunocontraceção, imunoesterilização, mamíferos, cães.

Abstract

Dog overpopulation is a serious problem in many cities throughout the world, which requires the development of birth control systems based upon reproduction blocking. Contraception methods available nowadays are not suitable for use in a population scale. In this context, immunocontraception is an important perspective for filling this gap. In this article, immunocontraceptive methods for mammals based on use of reproductive hormones and antigens from embryo, zona pellucida and spermatozoon are reviewed, focusing on their principles and development advances.

Keywords: *Immunocontraception, immunosterilization, mammals, dogs.*

Introdução

A superpopulação de cães constitui um sério problema em diversas cidades do mundo, caracterizado pela existência de uma grande quantidade de animais sem responsáveis que vivem nos espaços públicos. Esses animais compõem um reservatório de zoonoses, e, assim, um risco de agravo à saúde pública, o que implica o dispêndio expressivo de recursos. Neste contexto, as autoridades sanitárias realizam a eliminação sistemática desses animais como estratégia de controle populacional.

Esta abordagem, no entanto, é estritamente paliativa, por não atuar sobre a origem do problema, que consiste das elevadas taxas de natalidade de cães. Além disso, a eliminação dos animais sem responsáveis faz emergirem questões éticas que definem a necessidade de novas estratégias de ação. Assim, um sistema de controle populacional para cães, para ser efetivo, racional e humanitário, deve basear-se no controle de natalidade.

As técnicas contraceptivas atualmente disponíveis para cães não são adequadas para uso em escala populacional. Os métodos cirúrgicos, além do custo elevado e dos riscos inerentes a qualquer procedimento cirúrgico, são logisticamente inviáveis para populações grandes. Os métodos farmacológicos, baseados no uso de hormônios, têm apresentado efeitos adversos. Um novo conceito em métodos contraceptivos, a imunocontraceção, surge como uma importante perspectiva para o desenvolvimento de métodos aplicáveis ao controle da reprodução de cães em larga escala.

Além de cães, outras espécies de mamíferos também encontram-se em superpopulação, como os felinos domésticos em diversas regiões do mundo (Slater, 2001) e, em particular, na Austrália (Bradley *et al.*, 1999), o elefante em alguns países do sul da África (Stout e Colenbrander, 2004) e o cervo de cauda branca (Rutberg *et al.*, 2004) na América do Norte. Problemas de animais em excesso também ocorrem em parques zoológicos, em virtude da reprodução dos animais cativos (Kirkpatrick e Rutberg, 2001). Assim, o uso da imunocontraceção pode ser útil também no controle das populações dessas espécies. Neste contexto, no presente trabalho, serão abordados diferentes métodos de imunocontraceção em mamíferos, baseados no uso de hormônios reprodutivos e de antígenos do embrião, da zona pelúcida e do espermatozóide, apresentando-se seus princípios e os avanços obtidos em seu desenvolvimento.

A imunoconcepção

A imunoconcepção consiste da ligação de anticorpos a moléculas bioativas do sistema reprodutor responsáveis por interações fundamentais ao processo reprodutivo, que, desta forma, é interrompido. Por exemplo, a ligação de anticorpos à superfície da zona pelúcida (ZP) de oócitos torna estes inacessíveis a espermatozóides, impedindo, assim, as interações moleculares necessárias ao processo de fertilização. O efeito contraceptivo é reversível, mantendo-se até que as concentrações (títulos) dos anticorpos específicos, que gradativamente vão decaindo a níveis abaixo de um limiar contraceptivo, ou seja, tornem-se insuficientes para o bloqueio da reprodução. A duração deste efeito varia em função do título inicial de anticorpos contraceptivos, sendo observados períodos de até cinco anos de infertilidade (Brown *et al.*, 1997).

A imunoconcepção tende a ser destituída de efeitos colaterais adversos, uma vez que as moléculas a serem bloqueadas devem desempenhar funções limitadas ao processo reprodutivo. Além disso, a verificação criteriosa do potencial de reatividade cruzada de anticorpos contraceptivos com outros elementos do organismo, em decorrência de algum grau de homologia, deve sempre ser procedida.

Em alguns casos, os anticorpos produzidos e/ou células citotóxicas do sistema imunológico ativadas nas vacinações causam a destruição de elementos não-regeneráveis do sistema reprodutivo, caracterizando-se, assim, um processo de esterilização imunológica, também denominado imunoesterilização.

Diversos antígenos do sistema reprodutor são passíveis de ligação por anticorpos, sendo, portanto, moléculas-alvo em potencial para o desenvolvimento de métodos de imunoconcepção ou imunoesterilização (Fig. 1). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), secretado pelo hipotálamo, controla a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), que, por sua vez, controlam a gametogênese em machos e fêmeas. Assim, a ligação de anticorpos às moléculas desses hormônios ou aos seus receptores resulta na interrupção da ovulação ou da produção de espermatozóides. As glicoproteínas da ZP e determinados antígenos da superfície do espermatozóide, responsáveis pela cascata de reações que constituem o processo de fertilização, também são passíveis de bloqueio por anticorpos. As gonadotrofinas coriônicas (GC), responsáveis pela manutenção da gestação até o desenvolvimento completo da placenta, podem também constituir moléculas-alvo para a imunoconcepção. O bloqueio por anticorpos de proteínas bioativas do embrião pode também ser utilizado como método para interrupção da gestação em seu início.

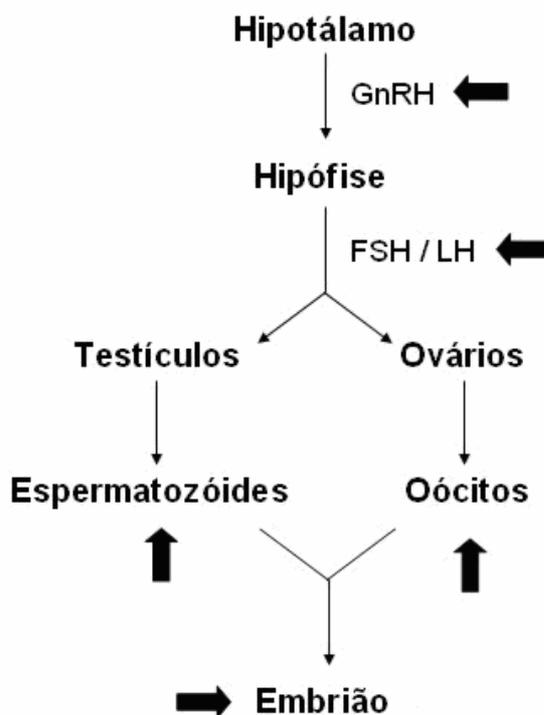


Figura 1. Esquema representativo do processo reprodutivo. As setas espessas indicam elementos com potencial para utilização como alvos em técnicas imunoconcepcionais.

Imunização ativa

Os anticorpos contraceptivos podem ser produzidos por meio de imunização ativa (vacinação), utilizando-se como imunógeno a molécula-alvo a ser bloqueada. Entretanto, em populações com grande diversidade genética, uma parcela significativa dos indivíduos pode não ter capacidade de resposta imunológica a determinados antígenos, o que resulta na redução da eficácia do método.

Imunização passiva

Uma técnica alternativa à vacinação contraceptiva, com potencial de reunir maiores eficácia, segurança e praticidade, consiste da administração de anticorpos contraceptivos pré-formados em outros animais, ou seja, a imunização passiva (soroterapia). A maior eficácia decorre do fato de este método não depender da capacidade de cada indivíduo de responder imunologicamente ao elemento-alvo a ser neutralizado. Esta técnica é ainda mais segura que a vacinação, pois é possível analisar a especificidade dos anticorpos produzidos antes de serem administrados (Talwar, 1999). Outra vantagem deste método é sua praticidade, uma vez que uma única aplicação de anticorpos pode resultar em títulos adequados, enquanto os procedimentos de vacinação, geralmente, requerem diversas aplicações de imunógeno. Os anticorpos de interesse podem ser produzidos pela hiperimunização de plantéis de animais selecionados para a produção de soro, do qual se procede a purificação e a concentração das imunoglobulinas específicas para o antígeno a ser neutralizado, a exemplo dos soros anti-oftídicos produzidos em eqüinos.

Imunoconcepção baseada em hormônios reprodutivos

GnRH

A molécula de GnRH consiste de um decapeptídeo incapaz de desencadear uma resposta imunológica quando utilizado como vacina. Elementos com estruturas pequenas não são capazes de estimular as células do sistema imunológico, ou seja, não são imunogênicos, sendo denominados haptenos (Janeway *et al.*, 2001). Para que uma resposta imunológica seja estabelecida para haptenos, é necessário que estes sejam ligados a proteínas de grandes dimensões, denominadas proteínas carreadoras. Assim, o GnRH tem sido quimicamente conjugado a diversas proteínas, como os toxóides tetânico (TT) e diftérico (TD), para seu uso como agente imunocontraceptivo.

Ladd *et al.* (1994) vacinaram cães com GnRH conjugado ao toxóide tetânico, obtendo uma redução dos níveis séricos de testosterona a limiares observados em animais castrados, o que resultou em azoospermia. Miller *et al.* (2000) analisaram a eficácia de uma vacina constituída por GnRH para o controle reprodutivo de um grupo de cervos machos e fêmeas de cauda branca. Após um esquema de vacinação composto por duas aplicações apenas de imunógeno, observou-se uma redução de 88% da fertilidade das fêmeas, além da interrupção da produção de testosterona pelos machos, com conseqüente perda da libido. Estes efeitos mantiveram-se por até dois anos, sem a necessidade de vacinações de reforço. Robbins *et al.* (2004) vacinaram felinos domésticos machos e fêmeas com GnRH conjugado à leucotoxina A e observaram a produção de anticorpos em títulos imunoneutralizantes que se mantiveram por mais de 20 meses. Neste período, os machos apresentaram supressão da produção de testosterona e da espermatogênese, verificando-se atrofia das células de Sertoli e ausência de espermátides. As fêmeas mantiveram-se em anestro durante o mesmo período, não sendo observada a ocorrência de folículos terciários ao exame histológico dos ovários.

Uma única injeção de anticorpos monoclonais anti-GnRH ao início do proestro suprimiu a ovulação subsequente em fêmeas de rato. Quando administrados a cadelas, estes anticorpos também interromperam o estro, conforme verificado pela avaliação do comportamento, citologia vaginal e perfis de hormônios sexuais (Talwar *et al.*, 1985).

FSH

Nos machos, a ausência de estimulação por FSH afeta significativamente a proliferação de espermatogônias e, assim, a produção quantitativa de espermátocitos primários (Suresh *et al.*, 1995). Além disso, evidências sugerem que a privação de FSH também afeta o processo de espermiogênese, levando à produção de espermatozoides de baixa qualidade ou imaturos, resultando em infertilidade. Dessa forma, a neutralização do FSH por anticorpos pode ser utilizada como técnica imunocontraceptiva (Moudgal *et al.*, 1997a).

Macacos vacinados com FSH ovino (oFSH) apresentaram oligozoospermia e infertilidade (Srivastav e Das, 1992). A administração a macacos, de anticorpos para o FSH ou para o receptor deste hormônio (FSH-R), causou uma inibição da transformação de espermatogônias em espermátocitos primários, bem como do processo de espermiogênese (Aravindan *et al.*, 1993; Suresh *et al.*, 1995). Não houve alteração da produção de

testosterona, observando-se apenas oligozoospermia, mas a qualidade dos espermatozóides foi afetada de forma suficiente ao estabelecimento de infertilidade.

Aravindan *et al.* (1993) observaram que os títulos de anticorpos anti-FSH em animais vacinados com o FSH ovino não duram mais de 90-100 dias, pois estes são rapidamente usados para a bionutralização do FSH, produzido de forma contínua pela hipófise. Assim, uma alternativa de técnica imunoconcepciva para se afetar a espermatogênese consiste do uso de anticorpos para o receptor de FSH. Macacos vacinados com um fragmento recombinante do receptor do FSH apresentaram títulos efetivos de anticorpos para o antígeno utilizado, que se mantiveram por mais de 300 dias após apenas duas a três injeções do imunógeno. Estes anticorpos ligaram-se efetivamente a moléculas do receptor do FSH nos testículos, impedindo a ligação do FSH, o que resultou em inibição da transformação de espermatogônias em espermatócitos primários. Os animais vacinados, ao serem submetidos ao teste de cópula, apresentaram-se inférteis. Não houve qualquer alteração nas concentrações séricas de testosterona (Moudgal *et al.*, 1997b).

LH

A eficácia de vacinas baseadas em LH ovino (oLH) para a interrupção da função testicular foi avaliada em coelhos (Jeyakumar e Moudgal, 1996) e macacos (Suresh *et al.*, 1995). Os anticorpos produzidos foram capazes de se ligar ao LH, resultando em uma redução intensa (~90%) das concentrações séricas de testosterona. A quantificação da população de células germinais por citometria de fluxo mostrou que, 15-18 semanas após a vacinação, a população de espermátides foi reduzida em mais de 90%, e a de espermatócitos primários em mais de 50%. Os autores sugeriram que a azoospermia resultante decorreu da interrupção da meiose, que é controlada pela testosterona testicular. Remy *et al.* (1996) observaram que a vacinação de ratos machos com receptor de LH (LH-R) suprimiu a fertilidade de forma proporcional aos títulos de anticorpos produzidos contra os receptores de LH.

Coelhas vacinadas com receptores de LH bovino produziram anticorpos para este receptor e apresentaram falha de ovulação após cópula, inseminação artificial ou injeção de gonadotrofina coriônica (Singh *et al.*, 1995). Essas coelhas mantiveram-se inférteis por 10 meses após a vacinação, mesmo após repetidas cópulas. Entretanto, a ovulação foi reestabelecida com o declínio dos anticorpos. De modo semelhante, babuínos e macacos rhesus vacinados com receptores de LH tornaram-se inférteis, mas, com o declínio dos anticorpos, retornaram à fertilidade normal (Shukla *et al.*, 1991; Pal *et al.*, 1992).

Cadelas vacinadas com receptores de LH bovino apresentaram redução dos níveis de progesterona, sugerindo-se falha de ovulação e de função do corpo lúteo e não manifestaram sinais de estro. Com o declínio dos anticorpos anti-receptores de LH cerca de 500 dias após a vacinação, os perfis hormonais, a citologia vaginal e os sinais de estro retomaram o padrão normal. Assim, comprovou-se que a vacinação de cadelas com receptores de LH leva a um estado reversível de infertilidade (Saxena *et al.*, 2002).

Imunoconcepção baseada em proteínas embrionárias

Outra modalidade de técnica imunoconcepciva consiste da ligação de anticorpos a moléculas bioativas do embrião, como a proteína transportadora de riboflavina (RCP). A proteína transportadora de riboflavina é o principal mediador do suprimento de vitamina do embrião em desenvolvimento. A vacinação de fêmeas de primatas com a proteína transportadora de riboflavina de galinha resultou na produção de anticorpos que interromperam a gestação, provavelmente durante o estágio peri-implantação do embrião no útero (Adiga *et al.*, 1997). A demonstração por imunohistoquímica da presença da proteína transportadora de riboflavina em oócitos ovulados e embriões em clivagem de fêmeas de rato sugere que estes podem constituir um alvo para a citotoxicidade mediada por anticorpos e processos degenerativos.

Imunoconcepção baseada na Zona Pelúcida

A zona pelúcida é uma estrutura extracelular que circunda e protege oócitos e, subsequentemente, o embrião (Wolgemuth *et al.*, 1984). A zona pelúcida é composta por três glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 e ZP3. As duas últimas se unem para formar filamentos, que são interligados por ZP1 (Greve e Wassarman, 1985). A zona pelúcida desempenha funções fundamentais no processo de fertilização, que é iniciado pela ligação dos espermatozóides à sua superfície (Gupta *et al.*, 1997). Evidências sugerem que, em camundongos, hamsters e no homem, a ZP3 constitui o receptor primário ao qual se ligam os espermatozóides (Moller *et al.*, 1990; Van-Duin *et al.*, 1994). Em suínos, sugere-se que a ZP3 e a ZP1 associadas participem do processo de ligação dos espermatozóides (Yurewicz e Sacco, 1996).

A ligação da ZP3 ao receptor cognato do espermatozóide induz uma cascata de transdução de sinal que determina a reação acrossômica (Gupta *et al.*, 1997). A reação acrossômica resulta na liberação de enzimas proteolíticas necessárias para que os espermatozóides penetrem na estrutura da zona pelúcida e na remodelação

da superfície dessas células para manutenção da adesão à zona pelúcida e para a fusão com a membrana do oócito (Yanagimachi, 1994). Após a reação acrossômica, a ZP2 passa a desempenhar a função de receptor (secundário) para os espermatozoides, mantendo-os aderidos ao oócito (Gupta *et al.*, 1997).

A ZP2 também desempenha uma função importante no mecanismo de bloqueio à polispermia. Após a fusão de um espermatozoide ao oócito, ocorre a clivagem da ZP2 (Moller e Wassarman, 1989). Os fragmentos resultantes permanecem não-covalentemente ligados à zona pelúcida, tornando essa zona resistente à proteólise e, portanto, prevenindo a penetração espermática.

Assim, devido às funções fundamentais das glicoproteínas da zona pelúcida no processo de fertilização, estas tornam-se moléculas-alvo em potencial para a constituição de técnicas imunoconcepcionais. A viabilidade do uso de glicoproteínas da zona pelúcida para a imunoconcepção foi demonstrada pela primeira vez pela vacinação de fêmeas de camundongo com zona pelúcida de hamster, que resultou na produção de anticorpos capazes de se ligar à zona pelúcida endógena, induzindo infertilidade (Gwatkin *et al.*, 1977). Antisoro de hamsters imunizados com ZPA humana recombinante foi administrado a fêmeas de hamster, observando-se uma redução significativa da fecundidade (Koyama e Hasegawa, 2004). Anticorpos produzidos contra um peptídeo sintético correspondente a um segmento da zona pelúcida felina (fZP) foram capazes de bloquear a ligação de espermatozoides a oócitos de gata e a fertilização *in vitro* (Ringleb *et al.*, 2004).

Estudos iniciais de caracterização imunológica revelaram que os anticorpos produzidos para as glicoproteínas da zona pelúcida de uma espécie são capazes de se ligar às glicoproteínas de várias outras espécies (Sacco *et al.*, 1981). Esta reatividade imunológica cruzada deve-se a graus variáveis de homologia das seqüências protéicas, o que estabelece a possibilidade de vacinação heteróloga. Devido à grande disponibilidade de ovários suínos em abatedouros, as preparações de zona pelúcida suína (pZP) tornaram-se os antígenos de escolha (Gupta *et al.*, 2004). A vacinação com zona pelúcida suína mostrou-se efetiva para o controle populacional de cavalos selvagens (Kirkpatrick *et al.*, 1990), várias espécies de animais cativos em zoológicos (Kirkpatrick *et al.*, 1996), cervos de cauda branca (Rutberg *et al.*, 2004) e elefantes-africanos (Fayrer-Hosken *et al.*, 1999).

A vacinação de coelhas com zona pelúcida suína resultou em infertilidade (Wood *et al.*, 1981). O monitoramento subsequente dos animais imunizados mostrou que o efeito foi irreversível. A histologia dos ovários destes animais revelou uma destruição de oócitos em todos os folículos em crescimento e uma depleção severa da população de folículos quiescentes (Skinner *et al.*, 1984). A vacinação de primatas não-humanos com zona pelúcida suína também resultou em infertilidade irreversível associada a alterações de folículos ovarianos (Gulyas *et al.*, 1983). Estes e outros estudos, empregando modelos animais diferentes, demonstraram que a vacinação com zona pelúcida suína resulta em infertilidade mais provavelmente por distrofia do ovário que por um bloqueio da fertilização (Gupta *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm acumulado evidências que indicaram o envolvimento da resposta imunológica celular na histopatologia dos ovários após a vacinação com antígenos da zona pelúcida (Naz *et al.*, 1995). Rhim *et al.* (1992) demonstraram ser possível transferir a ooforite de fêmeas de camundongo vacinadas com peptídeos que continham segmentos da mZP3, para animais normais, através da transferência de linfócitos T CD4+, sem a detecção de anticorpos anti-mZP3 nos receptores. Gu *et al.* (2004), ao infectarem coelhas com um vírus myxoma recombinante que expressa a ZP2 de coelho (MV-ZPB), observaram a produção de anticorpos específicos para esta proteína, que se ligaram à zona pelúcida nativa. Houve uma redução significativa das quantidades de folículos ovarianos terciários e pré-ovulatórios das fêmeas infectadas, sendo observada a infiltração de linfócitos T nos ovários de alguns animais.

Apesar dos diversos indícios de mecanismos imunológicos celulares para a patogênese da redução de folículos ovarianos, em nenhum dos estudos em que foi verificada depleção de folículos primordiais após vacinação com zona pelúcida, observou-se a infiltração de linfócitos T (Aitken, 2002). De fato, não se conhece uma associação entre a ooforite observada após a vacinação com zona pelúcida e a depleção de folículos primordiais (Kerr *et al.*, 1998).

Uma explicação alternativa para a patologia do ovário após a vacinação com zona pelúcida é que a perda de folículos primordiais reflete seu recrutamento acelerado para compor a população de folículos em crescimento que é eliminada devido à ação de anticorpos anti-zona pelúcida (Aitken, 2002). Outra possibilidade é que uma proporção significativa de folículos primordiais expressem níveis baixos de ZP3, sendo destruídos por anticorpos antizona pelúcida por fixação de complemento (Grootenhuis *et al.*, 1996). Em coelhos, foi demonstrado que a resposta imunológica humoral (de anticorpos) pode causar perdas foliculares, provavelmente por meio da ligação de anticorpos aos oócitos, que bloqueia a comunicação entre estas células e as da granulosa (Skinner *et al.*, 1984).

Em cadelas, o potencial do uso de técnicas imunoconcepcionais que têm as glicoproteínas da zona pelúcida como moléculas-alvo tem sido avaliado visando ao controle populacional de cães nas cidades. Mahi e Yanagimachi (1979) demonstraram que anticorpos produzidos contra extratos de ovários de cadela são capazes de inibir a fertilização de oócitos caninos *in vitro*. Em outro estudo, cadelas vacinadas com zona pelúcida de suínos produziram altos títulos de anticorpos capazes de se ligar cruzadamente à zona pelúcida canina (dZP) e apresentaram-se inférteis após acasalamento (Mahi-Brown *et al.*, 1982). A vacinação de cadelas com ZP3 canina

recombinante conjugada ao toxóide diftérico também resultou em infertilidade (Srivastava *et al.*, 2002). A análise histológica dos ovários dos animais imunizados revelou um aumento da taxa de atresia folicular, não sendo observada infiltração por linfócitos. Nosso grupo está avaliando o potencial da imunização passiva com anticorpos antizona pelúcida canina para a imunoesterilização de cadelas.

Imunocontraceção baseada em antígenos espermáticos

Outra estratégia para o desenvolvimento de técnicas imunocontraceptivas que bloqueiam a fertilização consiste da utilização de anticorpos capazes de se ligar às moléculas bioativas da superfície do espermatozoide responsáveis pelas interações que constituem este processo. Alternativamente, estes anticorpos, se presentes no muco cervical, podem causar a aglutinação dos espermatozoides, impedindo-os de acessar o trato reprodutivo superior feminino (Delves *et al.*, 2002). Casos de ocorrência natural de anticorpos aglutinadores de espermatozoides em mulheres de casais inférteis indicam que estas estratégias podem ser efetivas (Van Voorhis e Stovall, 1997) e seguras, pois não se observam quaisquer outros efeitos, além da infertilidade, devido à presença destes anticorpos (Aitken, 2002). Potencialmente, estas técnicas podem ser aplicadas a machos, mas o número de espermatozoides a serem neutralizados ($\sim 10^8$ - 10^9) torna isso um desafio maior que fazê-lo sobre um número limitado (dezenas a centenas) destas células no trato reprodutivo superior feminino (Delves *et al.*, 2002).

A vacinação de cangurus machos com espermatozoides homólogos resultou em produção de anticorpos capazes de penetrar o trato reprodutivo e de se ligar ao acrossoma e à peça intermediária dos espermatozoides, resultando em redução das taxas de fertilização (Asquith *et al.*, 2006).

Dentre os antígenos espermáticos com potencial para servir como moléculas-alvo em técnicas imunocontraceptivas, destacam-se as enzimas hialuronidase (PH-20), lactato desidrogenase C4 (LDH-C4) e o antígeno associado ao espermatozoide-9 (SPAG9). A PH-20 está presente na superfície externa da membrana plasmática que reveste o acrossoma, possibilitando ao espermatozoide penetrar a massa de células do cumulus rica em ácido hialurônico (Sabeur *et al.*, 1997). Homólogos desta molécula têm sido encontrados em uma ampla variedade de espécies e sua eficácia contraceptiva como imunógeno tem sido demonstrada em porcos-da-índia machos. A LDH-C4 é uma enzima específica do espermatozoide de várias espécies (Goldberg, 1986). A vacinação de fêmeas de babuíno com a LDH-C4 resultou em uma redução do índice de fertilidade de 77% (controle) para 29% (Goldberg e Herr, 1999). O SPAG9 é uma molécula presente no acrossoma em espermatozoides humanos e de outras espécies de primatas, que parece participar da adesão destas células a oócitos. Anticorpos produzidos contra SPAG9 recombinante humano (rhSPAG9) mostraram-se capazes de bloquear *in vitro* a ligação entre espermatozoides e oócitos humanos (Jagdish *et al.*, 2005).

Conclusão

A viabilidade do desenvolvimento de técnicas imunocontraceptivas eficazes, demonstrada pelos estudos compilados neste trabalho, constitui uma importante perspectiva para a solução do problema de superpopulação de cães. O controle da reprodução de fêmeas é preferível ao de machos, uma vez que, em programas de contenção de natalidade, poucos indivíduos machos não-controlados são capazes de manter os índices de fertilidade de uma população conforme já foi verificado em alguns casos. Neste contexto, para cadelas, destacam-se as técnicas imunocontraceptivas baseadas no GnRH, receptor de LH, proteína transportadora de riboflavina, zona pelúcida e antígenos espermáticos. Dentre estas, o uso da zona pelúcida para a imunoesterilização através da eliminação dos folículos primordiais é uma técnica bastante promissora.

Referências

- Adiga PR, Subramanian S, Rao J, Kumar M.** Prospects of riboflavin carrier protein (RCP) as an antifertility vaccine in male and female mammals. *Hum Reprod Update*, v.3, p.325-334, 1997.
- Aitken RJ.** Imunocontraceptive vaccines for human use. *J Reprod Immunol*, v.57, p.273-287, 2002.
- Aravindan GR, Gopalakrishnan K, Ravindranath N, Moudgal NR.** Effect of altering endogenous gonadotropin concentrations on the kinetics of testicular germ cells turn over in the bonnet monkey (*Macaca radiata*). *J Endocrinol*, v.137, p.485-495, 1993.
- Asquith KL, Kitchener AL, Kay DJ.** Immunisation of the male tammar wallaby (*Macropus eugenii*) with spermatozoa elicits epididymal antigen-specific antibody secretion and compromised fertilisation rate. *J Reprod Immunol*, v.69, p.127-47, 2006.
- Bradley MP, Eade J, Penhale J, Bird P.** Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J Biotechnol*, v.73, p.91-101, 1999.
- Brown RG, Bowen WD, Eddington JD, Kimmins WC, Mezei M, Patersons JL, Pohajdak B.** Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in grey seals. *J Reprod Immunol*, v.35, p.43-51, 1997.
- Delves PJ, Lund T, Roitt IM.** Antifertility vaccines. *Trends Immunol*, v.23, p.213-219, 2002.

- Fayrer-Hosken RA, Bertschinger HJ, Kirkpatrick JR, Grobler D, Lamberski N, Honneyman G, Ulrich T.** Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology*, v.52, p.835-846, 1999.
- Goldberg E.** Sperm specific lactate dehydrogenase and development of a contraceptive vaccine. In: Clark DA, Croy BA (Ed.). *Reproductive immunology*. New York: Elsevier, 1986. p.137-142.
- Goldberg E, Herr JC.** LDH-C4 as a contraceptive vaccine. In: Gupta SK (Ed.). *Reproductive immunology*. New Delhi: Narosa, 1999. p.309-315.
- Greve JM, Wassarman PM.** Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol*, v.181, p.253-264, 1985.
- Grootenhuis AJ, Philipson HL, de Breet-Grijnsbach JT, van Duin M.** Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil Suppl*, n.50, p.43-54, 1996.
- Gu W, Holland M, Janssens P, Seamark R, Kerr P.** Immune response in rabbit ovaries following infection of a recombinant myxoma virus expressing rabbit zona pellucida protein B. *Virology*, v.318, p.516-523, 2004.
- Gulyas BJ, Yuan LC, Gwatkin RB, Schmell ED.** Response of monkeys to porcine zona pellucida as detected by a solid-phase radioimmunoassay. *J Med Primatol*, v.12, p.331-342, 1983.
- Gupta SK, Jethanandani P, Afzalpurkar A, Kaul R, Santhanam R.** Prospects of zona pellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. *Hum Reprod Update*, v. 3, p.311-324, 1997.
- Gupta SK, Srivastava N, Choudhury S, Rath A, Sivapurapu N, Gahlay GK, Batra D.** Update on zona pellucida glycoproteins based contraceptive vaccine. *J Reprod Immunol*, v.62, p.79-89, 2004.
- Gwatkin RB, Williams DT, Carlo DJ.** Immunization of mice with heat solubilized hamster zonae: production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Fertil Steril*, v.28, p.871-877, 1977.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M.** *Immunobiology*. New York: Garland, 2001. p.681-728.
- Jagadish N, Rana R, Mishra D, Garg M, Chaurasiya D, Hasegawa A, Koyama K, Suri A.** Immunogenicity and contraceptive potential of recombinant human sperm associated antigen (SPAG9). *J Reprod Immunol*, v.67, p.69-76, 2005.
- Jeyakumar M, Moudgal NR.** Immunization of male rabbits with sheep luteal receptor to lutenizing hormone results in production of antibodies exhibiting hormone agonistic and antagonistic activities. *J Endocrinol*, v.150, p.431-443, 1996.
- Kerr LE, Paterson M, Aitken RJ.** Molecular basis of sperm-egg interaction and the prospects for immunoconception. *J Reprod Immunol*, v.40, p.103-118, 1998.
- Koyama K, Hasegawa A.** Effects of passive immunization with zona antigens on ovulation, fertilization and implantation. *Am J Reprod Immunol*, v.52, p.S19, 2004.
- Kirkpatrick JF, Rutberg AT.** Fertility Control in Animals. In: Salem DJ, Rowan AN (Ed.). *The state of the animals, 2001*. Washington: HSUS Press, 2001. p.106-136.
- Kirkpatrick JF, Shideler SE, Turner Jr. JW.** Remotely-delivered immunoconception in feral horses. *Wildl Soc Bull*, v.18, p.326-330, 1990.
- Kirkpatrick JF, Turner Jr. JW, Liu IK, Fayrer-Hosken R.** Applications of pig zona pellucida immunoconception to wildlife fertility control. *J Reprod Fertil Suppl*, v.50, p.183-189, 1996.
- Ladd A, Tsong Y, Walfield A, Thau R.** Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone. *Biol Reprod*, v.51, p.1076-1083, 1994.
- Miller LA, Johns BE, Killian GJ.** Immunoconception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American J Reprod Immunol*, v.44, p.266-274, 2000.
- Mahi-Brown CA, Huang TT Jr, Yanagimachi R.** Infertility in bitches induced by active immunization with porcine zonae pellucidae. *J Exp Zool*, v.222, p.89-95, 1982.
- Mahi CA, Yanagimachi R.** Prevention of in vitro fertilization of canine oocytes by anti-ovary antisera: a potential approach to fertility control in the bitch. *J Exp Zool*. v.210, p.129-135, 1979.
- Moller CC, Bleil JD, Kinloch RA, Wassarman PM.** Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins. *Dev Biol*, v.137, p.276-286, 1990.
- Moller CC, Wassarman PM.** Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol*, v.132, p.103-112, 1989.
- Moudgal NR, Jeyakumar M, Krishnamurthy HN, Sridhar S, Krishnamurthy H, Martin F.** Development of male contraceptive vaccine – a perspective. *Hum Reprod Update*, v.3, p.335-346, 1997a.
- Moudgal NR, Sairam MR, Krishnamurthy HN, Sridhar S, Krishnamurthy H, Khan H.** Immunization of male bonnet monkeys (*M. radiata*) with a recombinant FSH receptor preparation affects testicular function and fertility. *Endocrinology*, v.138, p.3065-3068, 1997b.
- Naz RK, Sacco A, Singh O, Pal R, Talwar GP.** Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. *Hum Reprod Update*, v.1, p.1-18, 1995.
- Pal R, Singh O, Talwar G, Singh M, Saxena, BB.** Active immunization of baboons (*Papio anubis*) with the

- bovine LH receptor. *J Reprod Immunol*, v.21, p.163-174, 1992.
- Remy JJ, Couture L, Rabenosa H, Haertle T, Salesse R.** Immunization against exon 1 decapeptides from the lutropin/choriogonadotropin receptor or the follitropin receptor as potential male contraceptive. *J Reprod Immunol*, v.32, p.37-54, 1996.
- Rhim SH, Millar SE, Robey F, Luo AM, Lou YH, Yule T, Allen P, Dean J, Tung KS.** Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida. *J Clin Invest*, v.89, p.28-35, 1992.
- Ringleb J, Rohleder M, Jewgenow K.** Impact of feline zona pellucida glycoprotein B-derived synthetic peptides on in vitro fertilization of cat oocytes. *Reproduction*, v.127, p.179-186, 2004.
- Robbins SC, Jelinski MD, Stotish RL.** Assessment of the immunological and biological efficacy of two different doses of a recombinant GnRH vaccine in domestic male and female cats (*Felis catus*). *J Reprod Immunol*, v.64, p.107-119, 2004.
- Rutberg AT, Naugle RE, Thiele LA, Liu IKM.** Effects of immunoconception on a suburban population of white-tailed deer *Odocoileus virginianus*. *Biol Conserv*, v.116, p.243-250, 2004.
- Sabeur K, Cherr GN, Yudin AI, Primakoff P, Li MW, Overstreet JW.** The PH-20 protein in human spermatozoa. *J Androl*, v.18, p.151-158, 1997.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG, DeMayo FJ.** Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of the antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA). *Biol Reprod*, v.25, p.997-1008, 1981.
- Saxena BB, Clavio A, Singh M, Rathnam P, Bukharovich Y, Reimers Jr T, Saxena A, Perkins S.** Modulation of ovarian function in female dogs immunized with bovine luteinizing hormone receptor. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.9-17, 2002.
- Shukla K, Chowdury SR, Malaviya B, Rathnam P, Saxena BB.** Active immunization of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) against LH-receptor. *Adv Contracept Deliv Syst*, v.7, p.233-241, 1991.
- Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ.** Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin deficient (hpg) mice. *Endocrinology*, v.136, p.5311-5321, 1995.
- Skinner SM, Mills T, Kirchik HJ, Dunbar BS.** Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. *Endocrinology*, v.115, p.2418-2432, 1984.
- Slater MR.** The role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. *Prev Vet Med*, v.48, p.273-286, 2001.
- Srivastava N, Santhanam R, Sheela P, Mukund S, Thakral SS, Malik BS, Gupta SK.** Evaluation of the immunoconceptive potential of *Escherichia coli*-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction*, v.123, p.847-857, 2002.
- Srivatsav A, Das RP.** Sperm production and fertility of bonnet monkeys (*Macaca radiata*) following immunization with ovine follicle stimulating hormone. *Indian J Exp Biol*, v.30, p.574-577, 1992.
- Stout TAE, Colenbrander B.** Contraception as a tool for limiting elephant population growth; the possible pitfalls of various approaches. In: Symposium on Tropical Animal Health and Production, 15, 2004, Utrecht. Proceedings... Utrecht: Utrecht University Press, 2004. p.7-11.
- Suresh R, Medhamurthy R, Moudgal NR.** Comparative studies on the effects of specific immunoneutralization of endogenous FSH or LH on testicular germ cell transformations in the adult bonnet monkey (*Macaca radiata*). *Am J Reprod Immunol*, v.34, p.35-43, 1995.
- Talwar GP.** Vaccines and passive immunological approaches for the control of fertility and hormone-dependent cancers. *Immunol Rev*, v.171, p.173-192, 1999.
- Talwar GP, Gupta SK, Singh V, Sahal D, Iyer KSN, Singh O.** Bioeffective monoclonal antibody against the decapeptide gonadotropin releasing hormone: reacting determinant and action on ovulation and estrus suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.82, p.1228-1231, 1985.
- Van Duin M, Polman JE, De Breet IT, van Ginneken K, Bunschoten H, Grootenhuis A, Brindle J, Aitken RJ.** Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm egg fusion. *Biol Reprod*, v.51, p.607-617, 1994.
- Van Voorhis BJ, Stovall DW.** Autoantibodies and infertility: a review of the literature. *J Reprod Immunol*, v.33, p.239-256, 1997.
- Wolgemuth DJ, Celenza J, Bundman DS, Dunbar BS.** Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev Biol*, v.106, p.1-14, 1984.
- Wood DM, Liu C, Dunbar BS.** Effect of alloimmunization and heteroimmunization with zonae pellucidae on fertility in rabbits. *Biol Reprod*, v.25, p.439-450, 1981.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p.189.
- Yurewicz EC, Sacco AG.** Porcine zona pellucida glycoproteins: binding of ZPB-ZPC heterocomplexes in boar sperm vesicles. *Biol Reprod*, v.54, p.71, 1996.