

29/30



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Caracterización de Anticuerpos Monoclonales
en contra de la Zona Pelúcida de Ovocitos
de Cerdo por medio de Inmunotransferencia
en papel de Nitrocelulosa
(Western Blot)

Tesis que para obtener el título de BIÓLOGO presenta:

Edmundo Bonilla González

FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

Diciembre, 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	15
HIPOTESIS	15
MATERIAL Y METODOS	16
RESULTADOS	22
DISCUSION	30
APENDICE	36
BIBLIOGRAFIA	40

A B R E V I A T U R A S

Ac	Anticuerpo(s)
AcMc	Anticuerpo(s) Monoclonal(es)
APS	Persulfato de amonio
BSA	Seroalbúmina bovina
°C	Grados Centígrados
cm	Centímetros
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
ELISA	Ensayo Inmuno-Enzimático en fase sólida
g	Gramo
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
HGPRT	Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil-Transferasa
IEF	Isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulina
K	Kilodaltones
M	Molar
ng	Nanogramos
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PEG	Polietilénglicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SPB	Solución amortiguadora para muestras protéicas
TBS	Solución amortiguadora con tris
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFMS	Acido trifluorometansulfónico
TRIS	tris (hidroximetil) amino metano
UAMI	Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
V	Volts
ZP	Zona Pelúcida
ZPDG	Zona Pelúcida Desglicosilada
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrometros

I N T R O D U C C I O N . -

FERTILIZACION.

Los ovocitos de los mamíferos se encuentran rodeados por una matriz extracelular denominada Zona Pelúcida (ZP), la cual tiene variadas y esenciales funciones durante la fertilización y el desarrollo temprano del cigoto. Estas funciones incluyen el reconocimiento especie - específico del espermatozoide (Yanagimachi, 1972), la inducción de la reacción acrosomal, evitar la Polispermia, y ayudar a la implantación del óvulo en el útero para el desarrollo del embrión (Dunbar et al., 1981; Betancourt et al., 1985). Es por esto que ha existido un gran interés en su estudio.

El proceso de la fertilización se inicia al hacer contacto un espermatozoide con la ZP que recubre al ovocito, atraviesa esta estructura y llega al interior de la célula. De esta manera se ponen en contacto los núcleos haploides de los dos gametos para completar así el número cromosómico característico de la especie, dar origen al huevo y posteriormente al desarrollo del nuevo organismo. En términos generales, este proceso puede dividirse en tres etapas: El reconocimiento del espermatozoide por el óvulo, la regulación de la entrada de espermatozoides al óvulo y la activación del metabolismo del óvulo para dar comienzo a la división celular y el desarrollo del embrión (Betancourt et al., 1985).

Florman, en 1983, reporta la existencia de un receptor

específico en la porción más externa de la ZP, por medio del cual ocurre el reconocimiento del espermatozoide por el óvulo. Dicho receptor corresponde, al parecer, a la región glicosídica de una glicoproteína, es además el responsable de prevenir la polispermia (Dunbar et al., 1981) y de evitar que espermatozoides de una especie fertilicen a óvulos de otra (Hanada, 1972), lo que se comprueba al presentarse la fertilización entre diferentes especies cuando se remueve la ZP y por tanto se elimina al receptor de los espermatozoides.

Cuando un espermatozoide se pone en contacto con la ZP, ciertas sustancias de esta capa interactúan con la porción anterior de la membrana plasmática del espermatozoide. Entonces, esta membrana se fusiona con la membrana acrosomal que se encuentra por debajo de la primera y se provoca la liberación de enzimas como la acrosina, la hialuronidasa y algunas proteasas, que le permiten abrirse paso a través de esa estructura y alcanzar la membrana del ovocito. Posteriormente se realiza la reacción cortical que se inicia con la fusión de la membrana de los gránulos corticales con la membrana plasmática del óvulo; los gránulos corticales vierten su contenido en el espacio perivitelino, dicho contenido, que probablemente sea una enzima parecida a la tripsina, parece hidrolizar parcialmente algunas proteínas de la ZP que así origina la alteración de sitios receptivos del espermatozoide e incrementa la resistencia al ataque químico (Szollosi, 1967); De esta manera se evita que más de un espermatozoide fertilice al óvulo. Esta idea ha sido apoyada por Shabanowitz (1988), al observar cambios en la

composición bioquímica de la ZP humana después de realizarse la fertilización.

CARACTERISTICAS DE LA ZP

Al microscopio óptico la ZP se observa como una capa semitransparente con un grosor de 1 a 27 micrómetros (μm) y un diámetro de 60 a 70 μm en promedio, dependiendo de la especie (Dunbar, 1978). Al microscopio electrónico de barrido (Sacco, 1981) así como por técnicas inmunofluorescentes al microscopio óptico (Fierro, 1987) muestra en su superficie una estructura constituida por una red de fibras que presentan poros de varios tamaños.

Con respecto a las características químicas y bioquímicas de la ZP se ha reportado un contenido proteico de 1.8 nanogramos (ng) por ZP en ratón (Shimizu et al., 1983), 5 ng en rata (Repin y Akimova, 1976) y 33 ng en ZP de cerdo (Dunbar et al., 1978). La ZP de ovocitos de cerdo tiene un 71 % de proteínas y un 19 % de carbohidratos esto es, su constitución es principalmente glicoproteica. Entre los carbohidratos más característicos se encuentran los monosacáridos del tipo de la Fucosa, Manosa, Galactosa y el ácido N-acetil glucurónico (Dunbar et al., 1980).

Para el estudio de la composición macromolecular de la ZP, varios grupos de investigación han utilizado la técnica de Electroforesis Bidimensional de O'farrell (1975), ya que con ésta se obtiene una gran resolución de las proteínas al separarlas en cada dimensión con base en criterios diferentes: En la primera

dimensión, llamada Isoelectroenfoque (IEF), las proteínas se separan con base en diferencias en sus puntos Isoeléctricos (PI's) y en la segunda dimensión con base en diferencias en sus Pesos Moleculares.

En el IEF se utiliza un gradiente de pH creado con una mezcla de sustancias anfotéricas llamadas anfólitos, orientado de manera que el pH se incrementa hacia el cátodo. Cuando una proteína es colocada en dicho gradiente a un pH menor que su punto Isoeléctrico (PI), obtiene una carga neta positiva y se moverá hacia el cátodo. Conforme se acerque a su PI la carga neta decrecerá y, finalmente, al alcanzar su PI la carga neta será igual a cero y la migración parará. Si la proteína es colocada en un pH mayor que su PI, su carga neta será negativa y se moverá hacia el ánodo. Del mismo modo, al alcanzar su PI se detendrá.

Una vez que las proteínas se han separado por diferencias en sus PI's, el gel en el que se encuentran es llevado a otro para realizar una segunda separación, ahora por peso molecular (PM) mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970).

Con la ayuda de la técnica de electroforesis bidimensional ahora se tiene una amplia información acerca de la composición macromolecular de la ZP de ovocitos de varias especies: Repin y Akimova (1976) reportan la existencia de 3 familias de

glicoproteínas en la ZP de rata. East y Dean (1984) reportan 3 familias en la ZP de ratón, con PM de 185, 140 y 83 Kilodaltones (K) denominadas ZP-1, ZP-2 y ZP-3, respectivamente; Shabanowitz y O'Rand (1988) reportan que la ZP humana, en condiciones de reducción, se separa en 3 macromoléculas glicoproteicas con un PM de 90 a 110 K (ZP1), 64 a 78 K (ZP2) y 57 a 73 K (ZP3). En condiciones no reductoras, ZP1 y ZP2 co-migran, y presentan un PM de 92 a 120 K.

Con respecto a la ZP de ovocitos de cerdo, en condiciones de no reducción (sin tratamiento con 2-Mercaptoetanol) se obtienen 2 componentes glicoproteicos con PM de 55 y 90 K (Yurewicz et al., 1983). En condiciones reductoras, cuatro componentes glicoproteicos se resuelven, con PM de 25, 55, 65 y 90 K (Hedrick y Wardrip, 1980). Los componentes 25 y 65 K co-migran con el 90K cuando los puentes disulfuro no están reducidos pero en condiciones de reducción se comportan independientemente, de modo que los componentes 25 y 65 K se derivan de la familia de glicoproteínas 90 K. El componente 55K está constituido por 2 glicoproteínas química e inmunológicamente diferentes, llamadas 55K-alfa (PM 37K) y 55K-beta (PM 40K), que electroforéticamente co-migran, pero que pueden distinguirse si se realiza una desglicosilación de la familia 55K. Cuando los carbohidratos de la familia 90 K se eliminan, se obtiene un componente con un PM de 68 K. Se tiene entonces que los dos o cuatro componentes de la ZP de ovocitos de cerdo resueltos por electroforesis se derivan de 3 familias de Glicoproteínas : 90K, 55K-alfa y 55K-beta (Hedrick y Wardrip, 1987).

CORRELACION ENTRE LOS COMPONENTES DE LA ZP DE CERDO
GLICOSILADOS Y DESGLICOSILADOS
(modificado de Hedrick et al., 1987)

Reducidos Glicosilados	Reducidos Desglicosilados
90 K	68 K
65 K	56 K
55 K	40 K
	37 K
25 K	15 K
No reducidos glicosilados	No reducidos desglicosilados
90 K	68 K
55 K	40 K
	37 K

ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los vertebrados poseen un conjunto de mecanismos de defensa llamado sistema inmune que les permite protegerse de los agresores que encuentra en su medio, evitar el desarrollo de células tumorales y eliminar moléculas nocivas originadas en su interior como consecuencia del envejecimiento, las infecciones o el trauma (Rojas, 1985).

Cuando una sustancia extraña se introduce en un vertebrado, el organismo, al no reconocerla como propia, puede desarrollar dos tipos de respuestas: La respuesta inmune celular, que se caracteriza por la presencia de Linfocitos T, los cuales sintetizan linfocinas, y la respuesta inmune humoral, que se

caracteriza por la presencia de Linfocitos B que se transforman posteriormente en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en otras células que guardan la información del antígeno (molécula aislada o presente en micróorganismos o células, capaz de inducir una respuesta inmune) y que por ello son llamados linfocitos de memoria (Rojas, 1985).

En la respuesta inmune humoral, los mecanismos por los cuales los anticuerpos eliminan a las células extrañas son: la neutralización, que consiste en una simple combinación del antígeno con cualquier tipo de anticuerpo, la activación del sistema de Complemento, y la Opsonización, la cual se refiere a la unión del anticuerpo a la sustancia extraña o antígeno, que de este modo se hace más apetecible. Así se favorece su ingestión por las células fagocíticas (Hood et al., 1978).

Los Anticuerpos o Inmunoglobulinas (Ig) son proteínas especializadas que tienen la característica de reaccionar específicamente con el Antígeno. En base a características inmunogénicas y estructurales, se agrupan en cinco clases llamadas inmunoglobulinas A, D, E, G, M, que se abrevian anteponiendo el prefijo Ig. la estructura básica de las Ig es la siguiente: Están formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos de ellas son pesadas, con 440 aminoácidos cada una, las otras dos son ligeras, con 220 aminoácidos cada una. La unión de las cadenas pesadas a las cadenas ligeras, ocurre mediante enlaces disulfuro. Los aminoácidos que constituyen las cadenas presentan

también puentes disulfuro intracatenarios que al unirse forman asas llamadas dominios de aproximadamente 100 residuos. Los aminoácidos que conforman el primer dominio del extremo amino no son constantes en todas las moléculas, por lo que a dicha región se le llama variable, mientras que el resto permanece invariable. A esta región se le denomina constante. Dentro de la región variable existen zonas que se combinan directamente con el antígeno que presentan un grado de variación mayor y que por tanto son llamadas regiones hipervariables. Sin embargo, en las regiones constantes también existen diferencias entre la composición de aminoácidos, lo que caracteriza a cada una de las Ig, así como el número de estructuras básicas, que varía entre uno para IgG y cinco para IgM.

Al inyectar una molécula extraña a un organismo éste empieza a secretar anticuerpos para combatirla, éstos no reconocen a toda la molécula sino sólo a ciertas regiones de ella llamadas determinantes antigénicos, por lo tanto se formarán diferentes tipos de anticuerpos de acuerdo con el número de determinantes antigénicos. Como cada anticuerpo se elabora en una estirpe distinta de linfocitos y células plasmáticas derivadas de ellas el suero contendrá anticuerpos llamados policlonales por provenir de varias clonas celulares. Estos tienen el inconveniente de que no son específicos para un solo determinante antigénico.

La teoría de la Selección Clonal (Burnet, 1961) indica que si se aísla una célula plasmática que produce un anticuerpo específico y se le permite proliferar "in vitro" se originará una

colonia de células idénticas (clona) que producirá grandes cantidades de anticuerpos dirigidos contra un solo determinante antigénico que pueden entonces ser usados por su especificidad como una herramienta importante para identificar y marcar determinadas células o moléculas y poder distinguirlas o separarlas de una mezcla de ellas. A este tipo de anticuerpos que provienen de una sola clona celular se les llama Anticuerpos Monoclonales (AcMc).

Para la producción de AcMc, en un principio se presentó el problema de que las células plasmáticas productoras de éstos tienen una vida media corta en cultivo, de aproximadamente dos semanas. Una serie de estudios tuvieron que realizarse para resolver este problema:

Barsky (1960) al estudiar dos líneas celulares heteroploides de ratón que crecían juntas, encontró la aparición de una nueva línea celular con un número de cromosomas cercano a la suma de las dos en estudio, éstas eran claramente células híbridas que contenían en el núcleo los genomas de las dos parentales. Sin embargo, la formación espontánea de células híbridas es un evento muy poco común en cultivos mixtos de células de cualquier origen.

En 1975 Pontecorvo introduce el polietilenglicol (PEG) como un eficiente fusógeno de células de mamíferos.

Con base en todos estos estudios, Köhler y Milstein en 1975

logran la producción de AcMc por medio de la hibridación celular. Esto lo hicieron mediante la fusión de células tumorales linfocíticas (mieloma) de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con un antígeno específico. Las células híbridas resultantes presentan las características de ambos tipos celulares: la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos y la capacidad de las células de mieloma de proliferar activamente in vitro.

Actualmente el campo de aplicación de los AcMc es muy amplio y se les utiliza en estudios sobre biología celular, biología molecular, bacteriología, biología de la reproducción, etc. (David et al, 1981; Yelton et al, 1982). Con respecto a esto último, se ha encontrado que los AcMc son una herramienta adecuada para el estudio de las funciones de la ZP durante la fertilización (Betancourt et al, 1985).

INMUNOGENICIDAD DE LA ZP.

Shivers y Dunbar (1977) encontraron que algunas mujeres con infertilidad presentan anticuerpos contra su ZP, ellos demostraron en un grupo de 22 mujeres infértiles sin causa anatómica aparente, que cuando su suero era agregado a ovocitos de cerdo, producía reacción cruzada antígeno-anticuerpo medida con la técnica de inmunofluorescencia. En 1980, Nishimoto y colaboradores también detectaron autoanticuerpos contra ZP en 13 de 175 mujeres con infertilidad sin etiología definida; en cambio, en 71 mujeres jóvenes y 39 mujeres embarazadas, no

encontraron ninguna reacción.

Dado que los componentes de la ZP son altamente inmunogénicos, desde hace algunos años se han producido AcMc contra éstos para, por un lado, usarlos como marcadores que permitan esclarecer algunos procesos de la fertilización, y por el otro para emplearlos con la finalidad de controlar la natalidad. La interferencia inmunológica con estos fines se ha investigado muy ampliamente por presentar varias ventajas (Sacco y Shivers, 1978):

- 1) Estos métodos inhiben la fertilización y no son abortivos.
- 2) Es posible bloquear la fertilización por anticuerpos con títulos bajos.
- 3) Los anticuerpos contra la ZP no reconocen a ningún otro tejido, esto es, son tejido-específicos.
- 4) La ZP de varias especies animales presenta reacción cruzada, lo que permite tener una fuente de material antigénico disponible para su purificación y su caracterización.

Una importante cantidad de trabajos en varias especies de animales apoyan estos puntos. Dunbar y cols. (1981) inmunizaron algunas conejas con ZP porcina y a otras con ZP de coneja y posteriormente fueron inseminadas artificialmente. Detectaron anticuerpos contra ZP y en todos los casos hubo infertilidad. Encontraron que la inmunización con ZP porcina fué más efectiva en reducir la fertilidad que la que se hizo con ZP de coneja. Gibson y colaboradores en 1985 realizaron una inmunización pasiva

en conejas: inyectaron AcMc y policlonales contra ZP y encontraron que la fertilidad se redujo en ambos casos.

Sacco et al (1987) inmunizaron 50 hembras de monos ardilla con el componente 55K de la ZP de cerdo que después fueron apareadas. Ninguna hembra inmunizada quedó preñada y aunque ocurrieron algunos disturbios en las funciones del ovario, estos efectos fueron reversibles.

En el laboratorio de Biología Celular de la UAMI se produjeron AcMc contra el componente 55K de la ZP porcina. Se determinó que son específicos contra este componente (Rodríguez, 1984), que son tejido-específicos, que no presentan reacción con corazón, hígado, pulmón, riñón y estroma ovárico de cerdo, y que cruzan con ovocitos de conejo pero no con los de rata o ratón (Fierro, 1986).

Continuando con estos estudios, se produjeron AcMc contra ZP completa solubilizada. Se obtuvieron seis Líquidos Ascíticos (LA) ricos en AcMc. En la presente tesis se realizó la caracterización de estos LA mediante una prueba inmunológica llamada Western Blot (Towbin et al, 1979) para determinar contra cuáles glicoproteínas se encuentran dirigidos. En esta técnica, después de separar los componentes glicoproteicos de la ZP por electroforesis se transfieren a papel de nitrocelulosa para realizar una prueba inmunológica: el papel se incuba con el LA y después se hace un lavado para eliminar los Ac que no se unieron a ningún componente de la ZP. A continuación, para poder observar los componentes que fueron reconocidos por los Ac, el papel es tratado con un Ac

anti-IgG de ratón conjugado a una peroxidasa que al contacto con 4-cloro-1-naftol da una coloración Púrpura.

Como los LA empleados en esta tesis fueron producidos previamente en el laboratorio de Biología Celular de la UAMI, se describe a continuación cómo se obtuvieron.

A ratones de la cepa BALB/c se les aplicó una primera inyección del antígeno (ZPc solubilizada) por vía intraperitoneal. Después de transcurridos treinta días se dió una hiperinmunización con el objeto de incrementar la población de células productoras; tres días después de esta segunda inmunización se hizo la fusión celular por medio de polietilenglicol entre linfocitos del bazo de estos ratones con células de mieloma de ratón de la línea P3X63AG8.653, la cual además de no secretar inmunoglobulinas, es deficiente en la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), (Kearny et al., 1979). Esta enzima se requiere para una de las dos vías de síntesis de nucleótidos, la llamada vía de salvación, por lo que las células de mieloma sólo pueden utilizar la vía "de novo" para esta síntesis. La vía "de novo" puede ser bloqueada con aminopterina (análogo del ácido fólico) con lo cual sólo las células que se hibridicen (hibridomas), al compartir su carga genética, podrán subsistir en un medio con aminopterina.

Basados en lo anterior, los hibridomas así como las células de mieloma y los linfocitos que no se fusionaron (sólo una minoría de las células se fusionan) se colocaron en un medio con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) que permitió solamente

la proliferación de células híbridas resultantes de la fusión de un célula de mieloma con una de bazo. Después se colocaron las células en cajas de cultivo de 96 pozos. Se usaron timocitos de ratón como células acompañantes con la finalidad de tener una densidad celular adecuada para la proliferación de los hibridomas, ya que se ha observado que cuando la densidad celular es baja la proliferación es poco activa.

Aproximadamente dos semanas después de la fusión, el sobrenadante de los pozos en donde se desarrollaron colonias de hibridomas se probó con un ensayo inmuno-enzimático en fase sólida conocido con el nombre de ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos.

Las células de los pozos positivos al ensayo ELISA se clonaron en placas de cultivo de 96 pozos con una a diez células por pozo. Una vez desarrolladas las colonias de células, nuevamente se les practicó la prueba de ELISA. Esta acción se repitió varias veces hasta obtener entre un 80 y un 100% de pozos positivos para asegurar que se tenían líneas estables de hibridomas productoras del anticuerpo. Posteriormente, los hibridomas se expandieron a botellas de cultivo para obtener varios millones de ellas. Hecho esto, aproximadamente dos millones de células se inyectaron a ratones que habían sido previamente inyectados con un aceite mineral para estimular la formación de tumores ascíticos. Entre 20 y 30 días después de inyectados los hibridomas, se apreció ya la presencia del tumor ascítico. El LA se extrajo de los animales y se congeló a -70 grados centígrados hasta su uso.

OBJETIVO GENERAL.-

Realizar la caracterización de AcMc producidos en contra de la ZP de ovocitos de cerdo por medio de la técnica de Inmunotransferencia en papel de nitrocelulosa.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

Determinar las familias de glicoproteínas de la ZP que son reconocidas por los AcMc producidos en contra de ella.

Demostrar si estos AcMc se encuentran dirigidos contra la región proteica o la región glicosídica de la ZP.

HIPOTESIS.-

Dado que la inmunización fué realizada utilizando ZP completa de ovocitos de cerdo y que la macromolécula glicoproteica 55K es el componente mayoritario en ésta, los AcMc producidos reconocerán principalmente a la macromolécula 55K.

Por otro lado, debido a que las proteínas presentan una mayor inmunogenicidad que los carbohidratos, los AcMc producidos estarán dirigidos contra la región proteica de las familias de glicoproteínas que constituyen a la ZP.

MATERIAL Y METODOS.-

OBTENCION DE OVOCITOS.

Se colectaron ovarios de cerdo en el rastro y se almacenaron en congelación a -70°C . Para la obtención de los ovocitos, los ovarios fueron descongelados y posteriormente macerados en un procesador de alimentos. El macerado se filtró a través de varios recipientes con mallas de nylon de diferente tamaño de poro: 1000, 200, 150 y 85 μm , los restos de tejido ovárico quedaron atrapados en los tamices de 150 μm o mayores, mientras que los ovocitos pasaron por éstos, quedando atrapados en el tamiz de 85 μm ya que su tamaño es de 140 μm . Para asegurar que los ovocitos llegaran hasta el tamiz de 85 μm , los tamices de 1000, 200 y 150 μm se enjuagaron varias veces con una solución amortiguadora de fosfatos con EDTA (PBS-EDTA) (ver apéndice). Después, el tamiz de 85 μm se lavó con este amortiguador a presión con una jeringa, para eliminar células de la corona radiada y restos de tejido ovárico que pudieran haber llegado hasta este tamiz.

Los ovocitos se pasaron a una caja de Petri. Se colocó el tamiz de 85 μm invertido sobre ésta y se enjuagó con PBS-EDTA a presión. Se revisó al microscopio estereoscópico y en caso de que aún se encontraran contaminantes, la solución amortiguadora con los ovocitos se pasaba una segunda vez por los tamices de 150 y 85 μm .

OBTENCION Y SOLUBILIZACION DE LA ZP

Los ovocitos se homogeneizaron en un aparato manual Potter-

Elvehjem. Se subió y bajó el émbolo varias veces . De esta manera estallaron los ovocitos y quedaron sólo los "fantasmas" (ZP) de ellos en una solución con los restos de los ovocitos.

El homogeneizado se filtró en una malla de 40 μm para separar la ZP de los restos de los ovocitos. Los fantasmas quedaron atrapados en la malla que a continuación se enjuagó con unas gotas de agua destilada para eliminar el exceso de sales.

La malla de 40 μm con las ZP se colocó en un criotubo con 0.5 ml de bicarbonato de amonio 0.5 mM y se mantuvo en baño de agua a 70° C durante 30 min para su solubilización. Posteriormente la malla se exprimió contra la pared del tubo con unas pinzas de disección y se enjuagó con unas gotas de agua destilada. Nuevamente se exprimió la malla para tener el mínimo de pérdida de proteína.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS

Para la cuantificación de proteína presente en las muestras de ZP solubilizada se empleó el método de Lowry y cols. (1951).

SEPARACION DE LOS COMPONENTES DE LA ZP

Los componentes de esta estructura se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y por electroforesis bidimensional.

Electroforesis SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Se preparó gel de corrimiento al 7-12% (ver apéndice) y se colocó en una cámara de vidrio de 16 por 11 cm con separadores de

teflón de 1.5 mm de espesor hasta una altura de 7 cm. Se cubrió con isobutanol para una rápida polimerización. Una vez que polimerizó, se colocó un separador de teflón para formar carriles (peine) y se agregó el gel de compactación.

Cuando ocurrió la polimerización, se quitaron el peine y el separador de la base y se enjuagó el gel con agua destilada. Se colocó la cámara con el gel en un aparato para electroforesis vertical y se llenaron los reservorios superior e inferior con solución amortiguadora para electrodos.

Se prepararon las muestras de la siguiente forma: a dos volúmenes de la muestra de proteína en SDS al 2% se les añadió un volumen de solución amortiguadora para muestras de proteína (SPB) 3X (ver apéndice), y se dejó hervir por uno o dos minutos.

Se colocaron las muestras en los carriles (16 μ l por carril con 50 - 100 μ g de proteína) y se dejaron correr a 100 V durante 4 hrs aproximadamente, hasta que el frente se encontró un centímetro antes del final del gel.

Cuando el objetivo de la electroforesis fué analítico, los geles se tiñeron con azul de Coomassie de acuerdo con la técnica de Fairbanks (1971): se pusieron toda la noche en la solución A (ver apéndice), cuatro horas en la solución B y finalmente en ácido acético al 10% hasta que las bandas de proteína se apreciaron claramente.

Electroforesis bidimensional (O'Farrell, 1975).

Primera dimensión.

Se prepararon 5 ml de gel para Isoelectroenfoco (gel IEF)

(ver apéndice). Esta solución se colocó en un tubo de vidrio de 0.5 cm de diámetro y 12 de largo (cubierto en uno de sus extremos con parafilm) hasta una altura de 10 cm, se cubrió la solución con isobutanol y se dejó polimerizar.

Para preparar la muestra, se añadió un volumen igual de amortiguador de lisis con 2-mercaptoetanol.

El tubo con el gel IEF se colocó en un aparato para electroforesis vertical. Se llenó el reservorio superior (cátodo) con solución amortiguadora básica (NaOH 0.02M) y el inferior (ánodo) con solución amortiguadora ácida (ácido fosfórico 0.01M). Con una microjeringa se colocó un volumen de la muestra de ZP con 150 - 200 μg de proteína y se corrió el IEF por 17 horas con un voltaje constante de 300 V. Después se ajustó a 500 V por una hora más, para que las bandas quedaran bien delimitadas.

Se inyectó solución de equilibrio (ver apéndice) entre el gel y el vidrio para sacar el gel IEF del tubo y se dejó en esta solución durante media hora

Segunda dimensión

Se preparó gel de corrimiento al 7% y se colocó en una cámara de vidrio de 16 por 11 cm con separadores de teflón de 1.5 mm de espesor hasta una altura de 7 cm. Una vez que polimerizó el gel de corrimiento, se preparó gel de compactación y se colocó encima de éste y se esperó a que polimerizara.

El gel del IEF se colocó sobre el gel de compactación y se le dió un baño de agarosa al 1% para mantenerlo en este lugar. Esta placa se colocó en un aparato para electroforesis vertical, se llenaron los reservorios superior e inferior con solución amortiguadora de electrodos y se corrió con un voltaje de 75 V mientras el frente se encontraba en el gel de compactación y con 100 V una vez que pasó al de corrimiento, durante 4 hrs aproximadamente, hasta que el frente se encontró a 1 cm del final del gel.

Cuando el objetivo de la electroforesis fué analítico, al finalizar el corrimiento se realizó una tinción con azul de Coomassie.

CARACTERIZACION DE AcMc MEDIANTE LA TECNICA DE INMUNOTRANSFERENCIA EN PAPEL DE NITROCELULOSA ("WESTERN BLOT").

El primer paso para el "western blot" es transferir las proteínas que han sido separadas electroforéticamente a un papel de nitrocelulosa (nc). Para esto, se recortó un pedazo de papel de nc con las dimensiones del gel de corrimiento y se puso en agua destilada. Una vez que se hidrató se colocó sobre una fibra de cocina Scotch-Brite de 12 por 8 cm. Encima del papel se colocó el gel de corrimiento donde se realizó la segunda dimensión de la electroforesis y se cubrió con otra fibra. Este "emparedado" se prensó con dos placas de acrílico multihoradado para asegurar que el gel y el papel se mantuvieran juntos durante la transferencia.

El emparedado con el gel y el papel se colocó en la cámara para transferencia de proteínas con el gel del lado del cátodo.

Se llenó la cámara con solución amortiguadora para transferencia y se conectó la fuente de poder a 65 V por una hora.

Al ensayar la técnica, para comprobar si la transferencia había sido correcta, el papel se tiñó con negro amido.

Para realizar la prueba de inmunorreactividad, se bloqueó el papel durante 3 horas en solución amortiguadora en tris-hidroximetil aminometano y azida de sodio (TBS-Azida) con 5% de leche libre de grasa. Con el bloqueo se evita la unión inespecífica de Ac al papel de nc. Posteriormente se incubó durante 15-17 horas con el líquido ascítico diluido 1:10 con solución bloqueadora.

Se lavó el papel con TBS-Tween media hora con 4 cambios de solución. A continuación, el papel se incubó durante 2 horas con anti-IgG de ratón conjugado a una peroxidasa de rábano diluida al 0.2% en TBS con leche al 1%. Al terminar esto, se hizo un lavado con TBS-Tween media hora con dos cambios de solución.

Finalmente, el papel se incubó en una solución de 4-cloro-1-naftol en TBS con peróxido de hidrógeno preparada al momento para revelar los Ac unidos a la proteína. Una vez que se formó suficiente color se detuvo la reacción mediante un lavado con agua por 1-2 min para evitar la formación de color en el fondo.

CARACTERIZACION DE AcMc MEDIANTE LA TECNICA DE "DOT BLOT".

Se recortaron pedazos de papel de nc de 0.8 por 2 cm y se hidrataron en solución amortiguadora de transferencia. Se dejó

secar a temperatura ambiente. Se colocó una gota de antígeno a cada papel con 2-6 μg de proteína, se esperó a que secase al aire y se bloqueó con TBS con 5% de leche sin grasa por 15-20 horas. Después se incubaron los papeles con los líquidos ascíticos diluidos 1:10 con TBS-Tween por una noche. Se eliminó el exceso de LA con un lavado durante media hora con TBS-tween con 4 cambios de solución amortiguadora.

Los papeles se incubaron 2 horas con el conjugado peroxidasa-Anti IgG diluido al 0.2% con TBS-1% de leche, se lavó con TBST media hora con dos cambios de amortiguador y se reveló con 4-cloro-1-naftol fresco en TBS con peróxido de hidrógeno. Cuando las manchas pudieron verse claramente se lavó con agua destilada por 2 min.

RESULTADOS.

En el rastro ABC de Texcoco se tuvo acceso a las vísceras de los cerdos sacrificados. Se cortaron los ovarios de las trompas de falopio. Dos o tres personas en cada sesión de aproximadamente 3 horas pudieron coleccionar de 200 a 300 ovarios en buenas condiciones. Se seleccionaron los ovarios que tenían una mayor cantidad de folículos (fig. 1).

Con respecto a la obtención de ZP, en cada sesión con duración de 4 hrs a partir de 100 ovarios se obtuvieron alrededor de 350 μg de ZP solubilizada, lo que representa un rendimiento aproximado de 100 ovocitos obtenidos por cada ovario (fig. 2).

El macerado de los ovarios mediante el procesador de alimentos se realizó procurando que los fragmentos de ovario no tuvieran un diámetro menor a 5 mm, ya que cuando el macerado es excesivo se produce una gran cantidad de restos de tejido que tapan las mallas y esto hace que el número de ovocitos obtenidos sea escaso.

La homogeneización de los ovocitos fué enérgica para asegurar que la mayoría de los ovocitos estallaran y quedaran solamente sus "fantasmas" (figura 3).

Mediante electroforesis bidimensional se separaron los componentes de la ZP de ovocitos de cerdo en condiciones de reducción (fig. 4). Durante el IEF fué muy importante aumentar el voltaje durante la última hora ya que de esta manera se obtuvo una muy buena definición de las bandas. Para la segunda dimensión se usó un gel al 7%. El componente 25 K en un gel con esta concentración migró con el frente y no fué posible observarlo.

Se logró una adecuada transferencia de proteínas del gel al papel al realizarla a 65 V por una hora. Esto se observó al tefir el papel con negro amido. También se determinó que muy poca proteína se quedaba en el gel mediante tinción con azul de Coomassie después de la transferencia.

El "western blot" de seis LA contra los componentes de la ZP de ovocitos de cerdo resueltos por electroforesis bidimensional en condiciones de reducción (90, 65 y 55 K) reveló que ningún LA reacciona positivamente contra éstos.

Mediante "dot blot" se probó que los LA son funcionales: todos éstos reaccionan positivamente contra ZP completa solubilizada. También por medio de esta técnica se encontró, de acuerdo con lo obtenido por "western blot", que estos LA no reaccionan positivamente contra el componente 55K purificado por electroforesis bidimensional y eluido en la Universidad de California en Davis (UCD), EUA (fig. 5).

Hasta este momento se sabía que los LA eran funcionales, pero no se conocía contra qué componentes o familias se encontraban dirigidos.

Para esto, se hicieron electroforesis SDS-PAGE con ZP completa desglicosilada (la desglicosilación se realizó con el ácido trifluorometansulfónico en la UCD). De este modo se separaron las familias de proteínas 37 y 40 K así como el componente 68 K (fig. 6), ya que mediante electroforesis de este tipo con ZP completa solubilizada no es posible separar a los componentes de la ZP. Una adecuada separación se consiguió en geles al 12% de acrilamida, ya que en concentraciones menores la familia 37K migra con el frente y de esta manera es muy difícil observarla.

Posteriormente los seis LA se probaron contra las familias 37 y 40K, y contra el componente 68K mediante la técnica de "western blot". Se encontró una reacción positiva intensa con la familia 37K y una muy débil en la región correspondiente al

componente 68K, no existiendo reacción con la familia 40K (figura 7).

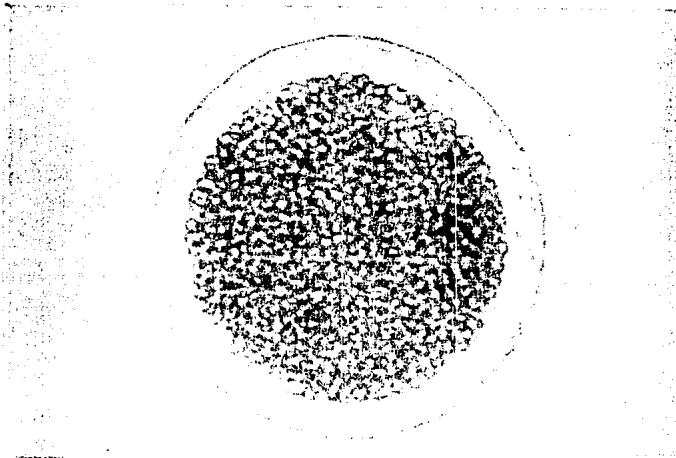
Ahora surgía la siguiente pregunta : ¿ porqué los LA no reaccionan con el componente 55 K si la familia 37 K es parte de éste?. Una diferencia importante entre el "western blot" contra los componentes de la ZP resueltos por electroforesis bidimensional y el "western blot" contra los componentes de la ZPDG resueltos por SDS-PAGE es la preparación de las muestras, ya que en el primero se empleó el agente 2-mercaptoetanol. Este agente rompe puentes disulfuro tanto intercatenarios como intracatenarios, de modo que cuando se emplea se pierde la conformación de los componentes de la ZP que se encuentra determinada por dichos puentes.

Considerando lo anterior se pensó en la posibilidad de que los AcMc probados fueran del tipo conformacional y no secuencial, es decir, que reconocieran una estructura tridimensional determinada por puentes disulfuro, y no una secuencia de aminoácidos. Para probar ésto, se realizó un "western blot" contra los componentes de la ZPDG reducidos con 2-mercaptoetanol con una concentración del 2.5% en la muestra preparada, idéntica a la que se empleó en las muestras resueltas por electroforesis bidimensional. En este caso, la reacción apenas pudo observarse (dato no mostrado).

FIGURA 1
OVARIO DE CERDO



FIGURA 2
OVOCITO OBTENIDO DE OVARIOS DE CERDO



Se observa la ZP como una capa semitransparente que rodea al ovocito. 100X.

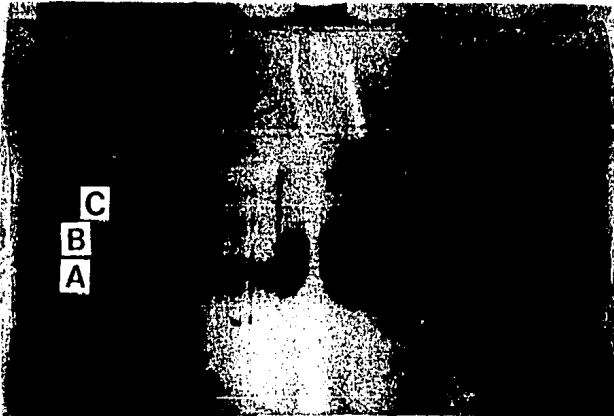
FIGURA 3

"FANTASMA" (ZP) DE OVOCITO. 100X.



FIGURA 4

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE ZP
DE OVOCITOS DE CERDO



Dos geles en los que se realizó IEF fueron colocados sobre un mismo gel en placa para llevar a cabo una segunda dimensión simultánea. Se muestran las glicoproteínas constitutivas en condiciones de reducción. A = 55 K, B = 65 K y C = 90 K.

FIGURA 5

LIQUIDOS ASCITICOS PRBADOS MEDIANTE DOT BLOT
VS ZP COMPLETA SOLUBILIZADA Y VS EL COMPONENTE 55 K

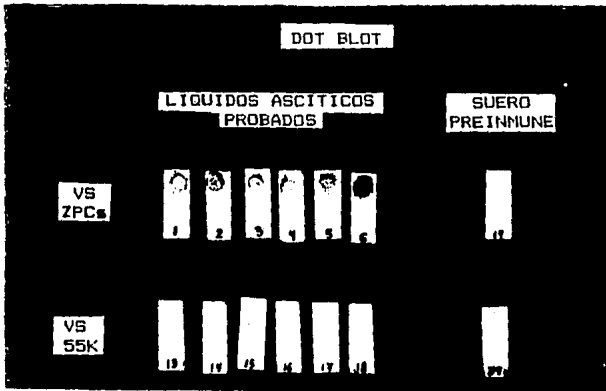
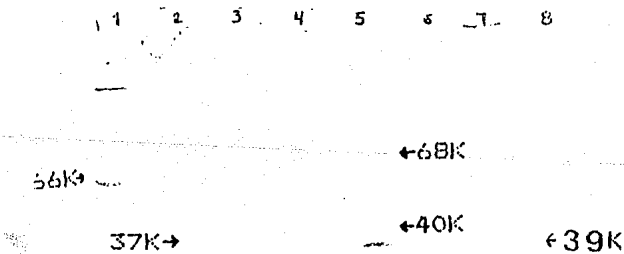


FIGURA 6

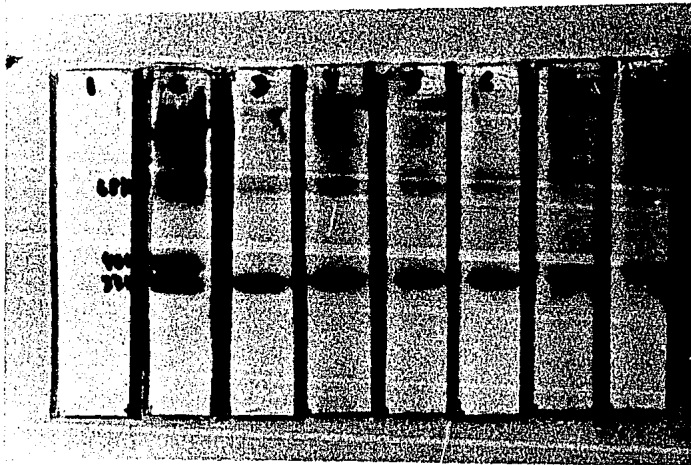
ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE ZP DESGLICOSILADA



Carriles 1 y 2, albúmina sérica de bovino (usado como referencia, con PM de 66K). Carril 3, familia 37 K. Carril 4, familia 40 K. Carril 5, ZP completa desglucosilada. Se observan las familias 37 y 40 K; el componente 68K no se observa claramente en esta fotografía. Carril 7, anhidrasa carbónica (39 K) e inhibidor de tripsina (27 K) usados como referencia.

FIGURA 7

LIQUIDOS ASCITICOS PROBADOS CONTRA ZP
COMPLETA DESGLICOSILADA MEDIANTE WESTERN BLOT



Se muestra reacción después de estar en contacto con Anticuerpos y cloronaftol. 1 = Suero preimmune. 2 = anticuerpo policlonal contra ZP completa. Se observa reacción contra las familias de proteínas 37K y 40K, y contra el componente 68K. 3 a 8 = distintos anticuerpos monoclonales contra ZP completa dilución 1:10. Aunque la familia 40K y el componente 68K están presentes no son reconocidas por los AcMc.

D I S C U S I O N .

En el presente trabajo se logró la caracterización de seis LA ricos en AcMc contra la ZP de ovocitos de cerdo. Las técnicas de "western blot" y "dot blot" empleadas para determinar su especificidad macromolecular muestran que todos los LA probados se encuentran dirigidos contra la parte proteica de las glicoproteínas que constituyen a la ZP dado que cruzan contra ZP desglicosilada.

Cuando se separaron las familias de proteínas 37K, 40K y el componente 68K a partir de ZP desglicosilada mediante electroforesis y se probaron los LA mediante "western blot" se encontró una reacción intensa con la familia de proteínas 37K y una cruza muy débil en la región correspondiente al componente 68K, no existiendo reacción contra la familia 40K.

La débil reacción que se observó en la región del componente 68K seguramente se debe a que durante la desglicosilación de la ZP se forman agregados de los componentes 37 y 40K (Hedrick y Wardrip, 1987) que durante la separación electroforética comigran con la 68 K, de manera que la débil reacción observada contra este componente puede ser debida a contaminación con la familia 37 K.

En los resultados también se observa que los AcMc no cruzan contra el componente 55K separado por electroforesis bidimensional ya sea en dot blot o en western blot. Debido a que si lo hacen con la familia 37K, se esperaría que lo hicieran también con el componente 55K ya que éste se encuentra formado

por las familias 37 y 40K unidas mediante carbohidratos.

Esto llevó a pensar que los AcMc probados son conformacionales, es decir, que reconocen una estructura tridimensional de la ZP que bajo las condiciones en las que se realiza la electroforesis en dos dimensiones se perdería.

La ZP porcina está constituida en un 71% de proteínas que en su forma nativa tienen un arreglo en el espacio determinado por las interacciones que existen entre los aminoácidos que las constituyen. Tales interacciones pueden ser débiles (del tipo no covalente) o fuertes (covalentes); en este caso se encuentran los llamados puentes disulfuro que se forman por oxidación entre los aminoácidos cisteína.

Durante la solubilización de la ZP, la separación electroforética y la transferencia a nitrocelulosa se emplean diferentes agentes que causan su desdoblamiento y desnaturalización dentro de los cuales se incluyen detergentes (como el SDS y el NP-40), calor y compuestos como la urea que rompen los enlaces no covalentes, así como agentes reductores como el 2-Mercaptoetanol que rompen los puentes disulfuro convirtiéndolos en grupos sulfhidrilo (-SH) de cisteína.

En este trabajo los AcMc se probaron inicialmente contra los componentes de la ZP de cerdo separados mediante electroforesis bidimensional. Para esto se emplearon tanto agentes desnaturalizantes que rompen interacciones no covalentes (calor, NP-40, urea, SDS) así como covalentes (2-Mercaptoetanol); en este

caso, no hubo reacción contra ninguno de los componentes.

Posteriormente se probaron mediante la técnica de "dot blot" directamente contra ZP solubilizada. Se encontró ahora una reacción intensa (figura 5). También se encontró mediante "western blot" una reacción intensa contra la 37K al probarse los LA contra ZP completa desglicosilada (figura 7). En este caso, como en el anterior, los LA se probaron contra la ZP desnaturalizada exclusivamente con agentes que rompen enlaces no covalentes. En cambio, cuando se probaron contra los componentes de la ZP separados mediante electroforesis bidimensional se empleó además un agente que rompe enlaces covalentes del tipo de los puentes disulfuro, el 2-mercaptoetanol.

Para observar directamente el efecto del 2-Mercaptoetanol se realizó un "western blot" en el que los LA se probaron contra las familias de ZPDG separadas mediante electroforesis SDS-PAGE con y sin este agente. El resultado (no mostrado) fue que en efecto, cuando se reducen las familias de la ZP el reconocimiento por los AcMc es casi nulo.

Esto lleva a pensar que los AcMc probados reconocen una estructura tridimensional de la ZP que se encuentra determinada por puentes disulfuro, de tal forma que cuando se rompen mediante el agente 2-Mercaptoetanol deja de existir la reacción.

Betancourt y cols. (1989) plantean que el estado conformacional del inmunógeno empleado determina el tipo (conformacional o secuencial) de anticuerpos monoclonales producidos. Estos autores obtuvieron AcMc conformacionales sólo

con líneas inmunizadas con ZP solubilizada. Las líneas inmunizadas con el componente 55K purificado que fué desnaturalizado y reducido produjo AcMc secuenciales.

Lo anterior está de acuerdo con la idea de que los AcMc probados en este trabajo sean conformacionales ya que como inmunógeno se empleó ZP solubilizada. Estos AcMc podrían ser empleados con la finalidad de prevenir la fertilización tanto in vitro como in vivo con una gran probabilidad de que fueran efectivos, ya que el componente 55K induce la reacción acrosomal en espermatozoides de cerdo (Berger et al., 1989a) y quizá una de las dos familias que constituyen a este componente (la familia 37 K o la familia 40K) sea análoga en función al componente ZP3 de la ZP de ratón (Hedrick y Wardrip, 1987), la cual funciona como receptor al espermatozoide e induce la reacción acrosomal (Bleil y Wassarman, 1980). Datos preliminares indican que la familia 40K puede tener actividad de receptor. Sin embargo, la función de los carbohidratos está por dilucidarse tanto para la familia 37K como para la 40 K (Yurewicz et al., 1988).

Al parecer, la actividad receptora de la ZP3 en ZP de ratón se debe al oligosacárido N-acetil-glucosamina (Florman y Wassarman, 1983) y la glicoproteína 55 K es el componente de la ZP de cerdo que contiene mayor cantidad de residuos de N-acetil-glucosamina (Hedrick y Wardrip, 1986). Y aunque los AcMc probados en este trabajo se encuentren dirigidos contra la familia 37 K que por sí sola no induce la reacción acrosomal (Berger et al., 1989a), y se encuentran dirigidos contra la región peptídica y no

contra la región glicosídica, la inhibición de la unión de espermatozoides seguramente ocurriría debido a que la unión de AcMc (que tienen un tamaño relativamente grande) cerca de los sitios de unión de espermatozoides puede bloquear estos sitios (Berger et al., 1989b).

En la actualidad numerosos estudios en varios laboratorios han demostrado lo altamente inmunogénica que es la ZP y han producido anticuerpos monoclonales y policlonales que han mostrado tener un gran poder anticonceptivo (Gibson y cols., 1985; East & Dean, 1986; Sacco y cols., 1987).

Con la demostración de que la ZP humana y la porcina tienen antígenos que cruzan inmunológicamente, un mayor énfasis fué dirigido hacia el uso de ZP de cerdo como base para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva con aplicación en humanos. De esta manera se han realizado inmunizaciones en diferentes especies animales tanto pasivas como activas empleando, respectivamente, ZP completa, sus familias o componentes o bien AcMc o policlonales dirigidos contra cualquiera de éstos.

Algunos trabajos, sobre todo en conejo, muestran que una inmunización activa con ZP de cerdo produce alteraciones en los perfiles hormonales y una reducción drástica en el número de folículos (Dunbar & Wood, 1981; Skinner y cols., 1984). Sin embargo otros reportes indican que no se producen estos efectos o bien que no son tan severos y que son reversibles (Drell y cols., 1984; Sacco y cols., 1987).

Esta controversia trae como consecuencia una serie de investigaciones encaminadas a buscar el inmunógeno de la ZP porcina que produzca anticuerpos que causen infertilidad reversible sin que ocurran efectos secundarios (Sacco, 1987).

Una vez que este componente haya sido identificado y caracterizado podrá ser producido en gran escala con ayuda de la tecnología de ADN recombinante con la que se clonaría y expresaría el gen o la región que codifica para éste componente (Ringuette, 1986).

Pero independientemente de que los AcMc puedan ser empleados o no en un futuro con la finalidad de controlar la natalidad en humanos, no cabe la duda de su importancia en el estudio de las funciones de la ZP y del fenómeno de la fertilización en general.

APENDICE
(soluciones)

Solución amortiguadora PBS-Citrato-EDTA.

NaCl	29.56 g
Na ₂ HPO ₄	8.66 g
EDTA	2.98 g
Citrato de Sodio	2.32 g
Azida de Sodio	0.8 g

Ajustar el pH a 7.3 con HCl y aforar a 4 litros con agua destilada

Soluciones madre para Isoelectroenfoque (IEF)

Acrilamida IEF 30 %

acrilamida(Bio-Rad)	28.38 g
bis-acrilamida	1.62 g

aforar a 100 ml con agua destilada.

Solución amortiguadora ácida 10X (Anodo)

Acido fosfórico	6.8 ml
agua dest.	993.0 ml

Solución amortiguadora básica 10X (Cátodo)

NaOH	8 g
Agua dest.	aforar a un litro

Amortiguador de Lisis (para preparar las muestras de ZP).

urea	0.57 g
anfolitas	50.0 µl
NP-40 10%	100.0 µl
mercaptoetanol o agua	50.0 µl
agua	380.0 µl

Agarosa al 1 % (para la segunda dimensión).

agarosa	1.0 g
tris-HCl pH 6.8	12.5 ml
SDS 10%	1.0 ml
Agua dest.	aforar a 100 ml

Calentar en baño de agua hasta que se disuelva agitando continuamente.

Solución de equilibrio

tris-HCl 1M pH 6.8	1.6 ml
SDS 10%	5.0 ml
glicerol	2.5 ml
mercaptoetanol o agua	1.25 ml
azul de bromofenol 0.05%	0.25 ml

Soluciones madre para SDS-PAGE

Solución amortiguadora de electrodos 5X

Tris	60.55 g
Glicina	288.40 g
SDS	20.00 g
Agua dest.	aforar a 4 litros

Acrilamida 30 %

acrilamida (Sigma)	60.0 g
bis-acrilamida	1.6 g
Agua dest.	aforar a 200 ml

Tris-HCl 0.25M pH 6.8

tris	3.03 g
Agua dest.	aforar a 100 ml
ajustar el pH a 6.8 con HCl	

Tris-HCl 1M pH 6.8

tris	12.1 g
agua dest.	aforar a 100 ml
ajustar el pH a 6.8 con HCl	

Tris-HCl 1.5M pH 8.8

tris	36.3 g
agua dest.	aforar a 200 ml
ajustar el pH a 8.8 con HCl	

Azul de Bromofenol 0.05%

azul de bromofenol	0.025 g
agua dest.	25.0 ml
etanol	25.0 ml

Solución amortiguadora para muestras de proteína (SPB 3X)

tris-HCl 1M pH 6.8	0.188 ml
SDS 10%	0.2 ml
glicerol	0.43 ml
mercaptoetanol o agua	0.15 ml
azul de bromofenol 0,05%	0.03 ml

Preparación de gel para IEF

Urea	2.75 g
Acrilamida IEF 30%	0.67 ml
anfolitas	0.25 ml
NP-40 10%	0.50 ml
agua dest.	1.50 ml
APS 10%	33 μ l
Desgasificar 5 min.	
TEMED	22 μ l

Preparación de gel de corrimiento para SDS-PAGE

	7%	12%
acrilamida 30%	5.83 ml	10.0 ml
agua	12.5 ml	8.36 ml
SDS 10%	0.25 ml	0.25 ml
tris 1.5M pH 8.8	6.25 ml	6.25 ml
APS 10%	160 μ l	160 μ l
desgasificar 1 min.		
TEMED	30 μ l	30 μ l
	<hr/>	<hr/>
total	25 ml	25 ml

Preparación de gel de compactación para SDS-PAGE

acrilamida 30%	1.0 ml
agua dest.	3.8 ml
SDS 10%	0.1 ml
tris HCl pH 6.8	5.0 ml
APS	80 μ l
desgasificar 1 min.	
TEMED	12 μ l
	<hr/>
total	10 ml

Solución Amortiguadora para transferencia de proteínas
(10X)

tris	75.8 g
glicina	360.5 g
agua	aforar a 2.5 litros

Solución amortiguadora de tris-hidroximetilaminometano
(TBS)

tris 4.84 g
NaCl 36 g
agua aforar a 4 litros
ajustar el pH a 7.4 con HCl.

Solución amortiguadora TBS-Azida

Se prepara de la misma manera que la solución TBS, sólo hay que agregar 0.8 g de NaN_3 (azida de sodio).

Solución amortiguadora TBS-Tween

Se prepara de la misma manera que la solución TBS, sólo hay que agregar 4 ml de Tween.

Reactivo de cloronaftol

Se mezclan inmediatamente antes de su uso:

30 mg de cloronaftol en 10 ml de metanol
50 ml de TBS
50 μl de agua oxigenada.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Berger, T., Turner, K. O., Meizel, S., y Hedrick, J.L. Zona-pellicuda-Induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.* 40: 525, 1989a.
- Berger, T., Davis, A., Wardrip, N.J. y Hedrick, J.L. Sperm binding to the pig zona pellicuda and inhibition of binding by solubilized components of the zona pellicuda. *J. Reprod. Fert.* 86:559, 1989b.
- Betancourt, M., Rodriguez, E., Serrano, H., Wardrip, N. y Hedrick, J.L. El uso de anticuerpos monoclonales para estudiar las funciones de la zona pelúcida de óvulos de mamíferos. *Salud Pública Méx.* 27: 203, 1985.
- Betancourt, M., Rodriguez, E., Serrano, H., Wardrip, N. y Hedrick, J. Producción de anticuerpos monoclonales en contra de glicoproteínas de la zona pelúcida de cerdo. *Bioquímica.* 6:1367, 1984.
- Betancourt, M., Serrano, H., Rodriguez, E., Fierro, R., Hedrick, J.L., Wardrip, N. J. y Goldhawk, E.B. The chemical and topographical specificity of monoclonal antibodies against the porcine zona pellicuda. 1989. Artículo en prensa.
- Bleil, J.D. y Wassarman, P.M. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellicidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* 20:873, 1980.
- Burnet, M. The mechanism of immunity. *Sci. Am.* 204:58, 1961.
- Dean, J., e East, I.J. Effects of anti-zona pellicuda monoclonal antibodies on fertilization and early development. In: The Molecular and cellular Biology of fertilization. Advances in experimental Medicine and Biology. (J.L. Hedrick, ed.). Plenum Press (New York). 207:37, 1986.
- Drell, D.W., Wood, D.M., Bundman, D, y Dunbar, B.S. Immunological comparison of antibodies to porcine zonae pellicidae in rats and rabbits. *Biol. Reprod.* 30:435, 1984.
- Dunbar, B.S., Liu, C. y Sammons, D.W. Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellicidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell proteins. *Biol. Reprod.* 24: 1111, 1981.
- Dunbar, B.S., Wardrip, N.J., Hedrick, J.L. Isolation, physicochemical properties, y macromolecular composition of zona pellicuda from porcine oocytes. *Biochemistry.* 2: 356, 1980.
- Dunbar, B.S. y Wood, D.M. Comparison of alloimmunization and heteroimmunization with zonae on the fertility of rabbits. *Biol. Reprod.*(suppl): 111A, 1981.

East, I.J. y Dean, J. Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. *J. Cell Biol.* 98:795, 1984.

Fierro, R. Especificidad de anticuerpos monoclonales en contra de la zona pelúcida de ovocitos de cerdo medida por técnicas inmunofluorescentes. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM, México, 1986.

Florman, H.M. y Wassarman, P.M. The mouse egg's receptor for sperm: involvement of O-linked carbohydrate. *J. Cell Biol.* 95: 26, 1983.

Gibson, R.E., Spilman, C.H., Skinner, S. y Dunbar, B.S. Passive immunization with polyclonal and monoclonal Antibodies to zonae pellucidae. *Biol. Reprod.(suppl)*: 104, 1985.

Hanada, A. y Chang, M.C. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.* 6: 300, 1972.

Hawkes, R., Niday, E. y Gordon, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119:142, 1982.

Hedrick, J.L. y Wardrip, N.J. The macromolecular composition of the porcine zona pellucida. *Fed. Proc.* 39:2081, 1980.

Hedrick, J.L. y Wardrip, N.J. On the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Develop. Biol.* 121:478, 1987.

Hedrick, J.L. y Wardrip, N.J. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes. *Anal. Biochem.* 157:63, 1986.

Hedrick, J.L., Wardrip, N.J. y Berger, T. Differences in the macromolecular composition of the zona pellucida isolated from pig oocytes, eggs, and zygotes. *J. Exp. Zool.* 241:257, 1987.

Hood, L.E., Weissman, I.L. y Wood, W.B. Immunology. The Benjamin Cummings Pub. Co. (San Francisco), 1978.

Kearney, J.F., Rabdroch, A., Liesang, B. y Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123:1548, 1979.

Khöler, G. y Milstein, C. Continuous cultured of fused cells secretive antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495, 1975.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227: 680, 1970.

Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.

Nishimoto, T., Morio, T., Yamada, I. y Nishimura, T. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fertility and Sterility* 34: 552, 1980.

O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007, 1975.

Pontecorvo, G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somat. Cell. Genet.* 1:397, 1975.

Repin, U.S. y Akimova, I.M. Microelectrophoretic analysis of protein composition of zona pellucida on mammalian oocytes and zygotes. *Biokhimiya* 41:50, 1976.

Ringuette, M.J., Sobieski, D.A., Chamou, S.M. y Dean, J. Oocyte-specific gene expression: molecular characterization of a cDNA coding for ZP-3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:4341, 1986.

Rodríguez, E. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de zona pelúcida de cerdo. Tesis de Maestría en Biología Experimental. U.A.M., México, 1984.

Rojas, W.M. Immunología. Fondo Educativo Interamericano (México): 534pp. 1985.

Sacco, A.G. Immunocontraception: consideration of the Zona pellucida as a target antigen. En: Obstetrics and Gynecology Annual, Vol. 10. (R.M. Wynn, ed). Appleton-Century-Crofts. (New York) : 1, 1981.

Sacco, A.G. Zona pellucida: current status as a candidate antigen for contraceptive vaccine development. *AJRIM* 15:122, 1987.

Sacco, A.G. y Moghissi, K.S. Anti-zona pellucida activity in human sera. *Fert. Steril.* 31: 503, 1979.

Sacco, A.G., Pierce, D.L., Subramanian, M.G., Yurewicz, E.C. y Dukelow, R.W. Ovaries remain functional in squirrel monkeys immunized with porcine zona pellucida 55,000 macromolecule. *Biol. reprod.* 36: 481, 1987.

Sacco, A.G. y Shivers, C.A. Immunological inhibition of development. En: Methods in mammalian reproduction. (J.C. Daniel, ed). Academic Press (New York) : 203, 1978.

Shabanowitz, R.B. y O'Rand, M.G. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J. Reprod. Fert.* 82: 151, 1988.

Shimizu, S., Tsuji, M. y Dean, J. "in vitro" biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. J. Biol. Chem. 258: 5858, 1983.

Shivers, C.A. y Dunbar, B.S. Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause of infertility in women. Science 197: 1082, 1977.

Skinner, S.M., Mills, T., Kirchick, H.J. y Dunbar, B.S. Immunization with zona pellucida proteins results in abnormal ovarian follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. Endocrinol. 115:2418, 1984.

Skinner, S.M., Niu, E.M., Bundman, D.S, Lo, C. y Dunbar, B.S. Use of immunoaffinity purified antibodies to zona pellucida to compare alloimmunization of male and female rabbits. J. Reprod. Immunol. 12:81, 1987.

Szollosi, D. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. Anat. Rec. 159: 431, 1967.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. Electroforetic transfer of proteins from poliacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some aplications. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 76:4350, 1979.

Yanagimachi, R. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs "in vitro". J. Reprod. Fertil.28:477, 1972.

Yurewicz, E.C., Sacco, A.G. y Subramanian, M.G. Isolation and preliminary characterization of a purified pig zona antigen from porcine oocytes. Biol. Reprod. 29:511, 1983.

Yurewicz, E.C., Zhang, S., y Sacco, A.G. Preparation and characterization of antibodies directed against syntethic peptides of the two Mr = 55,000 glycoproteins of the porcine oocyte zona pellucida. J. Cell Biol. 107:821a, 1988.