

227
63



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Especificidad de Anticuerpos Monoclonales
en contra de la Zona Pelúcida de
Ovocitos de Cerdo Medida por
Técnicas Inmunofluorescentes



T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

Reyna Carmen Fierro Pastrana



México, D. F.

Marzo, 1986



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.

INDICE

	PAG.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	5
OBJETIVOS	23
HIPOTESIS	23
MATERIAL Y METODOS	24
RESULTADOS	34
DISCUSION	49
REFERENCIAS	60

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

AM	Anticuerpo(s) Monoclonal(es)
Cat	Catálogo
EDTA	Acido etilen di amino tetra acético
ELISA	Inmunoensayo enzimático en fase sólida
FITC	Isotiocianato de fluoresceína conjugado a un anticuerpo anti inmunoglobulina G de ratón, producido en cabra.
g	gramo(s)
IgG	Inmunoglobulina G
K	Kilodaltones
LA	Líquido Ascítico
mg	Miligramos
μ g	Microgramos
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
mm	Milímetros
μ m	Micrómetros
N	Normal
ng	Nanogramos
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PBS-C-EDTA	Solución salina amortiguadora de fosfatos-Citrato-Acido etilen di amino tetra acético
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular

Tris	Amortiguador de tri-hidroxi metil amino metano
UAM-I	Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
Xg	Aceleración de la gravedad aplicada en una centrifuga.
ZP	Zona Pelúcida
ZPC	Zona Pelúcida Completa

RESUMEN.-

Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser una herramienta muy útil para la detección de moléculas específicas en diferentes tipos de tejidos y de células, esto debido a su alta especificidad. En el laboratorio de Biología Celular de la UAM-I se ha producido este tipo de anticuerpos, usando como antígeno una de las glicoproteínas que componen a la zona pelúcida de ovocitos de cerdo con el objeto de tratar de determinar cuál es su función en los procesos de la fertilización.

La presente tesis se refiere a las pruebas funcionales de los anticuerpos monoclonales obtenidos, específicamente para probar si ellos reconocen a la zona pelúcida de ovocitos de cerdo en una suspensión, así como para determinar si tienen reacción cruzada con otros tejidos del propio cerdo. Para llevar a cabo lo anterior se usó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta usando isotiocianato de fluoresceína conjugado a un anticuerpo anti inmunoglobulina G de ratón, y revisando los ovocitos y tejidos en un microscopio de fluorescencia.

Se probaron 34 líquidos ascíticos ricos en anticuerpos, de los cuales 23 resultaron ser positivos presentándose la fluorescencia con distribución uniforme en la zona pelúcida, 7 positivos con distribución periférica, y sólo 4 fueron negativos. Con respecto a la prueba de especificidad tisular se observó que no hubo fluorescencia al poner a reaccionar los líquidos ascíticos con cortes de corazón, hígado, pulmón y riñón; sin embargo, al reaccionar con cortes de ovario, se observó fluorescencia únicamente en la parte correspondiente a la zona pelúcida,

no así con el tejido estromático del ovario.

Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos monoclonales probados sí se unen a la zona pelúcida al ponerlos en contacto con ella "in situ", y que además son tejido-específicos.

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

Al introducirse una sustancia extraña en el organismo de un vertebrado pueden ocurrir dos tipos de respuestas: respuesta inmune celular y respuesta inmune humoral. La respuesta inmune celular se caracteriza por la presencia de linfocitos T, los cuales sintetizan linfocinas. La respuesta inmune humoral se caracteriza por la presencia de linfocitos B que se van a transformar posteriormente en células plasmáticas productoras de anticuerpos, y poseen en su membrana determinadas proteínas que los caracterizan (Rojas, 1985).

Los anticuerpos, también llamados Inmunoglobulinas, son proteínas globulares formadas por cuatro cadenas polipeptídicas, las cuales están apareadas de tal manera que la molécula se puede dividir en dos mitades idénticas, cada una con una cadena pesada y otra ligera. Las cuatro cadenas están unidas entre sí por puentes disulfuro del aminoácido cistina, los cuales al unirse forman asas llamadas dominios. 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, llamándosele constante. Dicha molécula de inmunoglobulina también está formada por un extremo amino que se localiza en la porción donde están próximas las cadenas ligeras y pesadas, y el extremo carboxilo que se encuentra en la parte restante, es decir, en donde sólo hay cadenas pesadas (Roitt, 1980; Porter, 1983). En la figura 1 se muestra esquemáticamente la estructura lineal de una molécula de inmunoglobulina en la que se indican sus regiones.

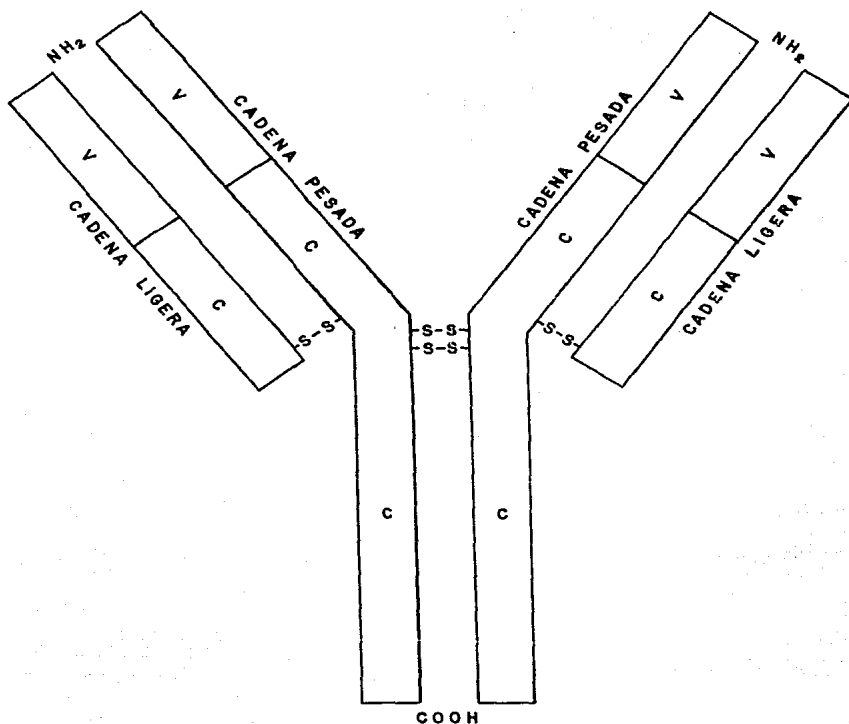


Fig 1.- Estructura lineal de una molécula de Inmunoglobulina. Las dos cadenas pesadas y las dos ligeras están conectadas por puentes disulfuro. Cada cadena tiene un extremo amino (NH₂) y un extremo carboxilo (COOH). Las cadenas se dividen en regiones variables (V) y en regiones constantes (C). (Tomado de Jerne, 1973).

La respuesta inmune puede empezar al entrar en contacto un linfocito con un antígeno. Esto lo induce a dividirse y diferenciarse en células plasmáticas que secretan anticuerpos circulantes, y células de memoria que responden a la reaparición del antígeno (Lerner y Dixon, 1973). Un antígeno o sustancia inmunogénica es toda aquella serie de moléculas que pueden estar presentes tanto en microorganismos o células capaz de inducir a la diferenciación de células especializadas actuando en el conjunto de procesos conocidos como respuesta inmune (Rojas, 1985).

En la respuesta inmune humoral, los mecanismos por los cuales los anticuerpos eliminan a las células extrañas y macromoléculas son: la Neutralización, que consiste en una simple combinación del antígeno con cualquier tipo de anticuerpo, la activación del Sistema de Complemento, y la Oponización; ésta se refiere a la unión del anticuerpo a la sustancia extraña o antígeno, haciéndolo más apetecible y favoreciendo su ingestión por las células fagocíticas (Hood et al., 1978).

Si se inyecta a un animal una sustancia que reconozca como extraña, empieza a secretar un tipo de proteínas que son los anticuerpos; éstos no reconocen a toda la molécula extraña, sino sólo a una porción de ella llamada determinante antigénico, por lo tanto se forman diferentes tipos de anticuerpos dependiendo del número de determinantes antigénicos; así 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 (Bellvé y Moss, 1983). Sin embargo, se sabe que cada anticuerpo se elabora en

una estirpe distinta de linfocitos y células plasmáticas derivadas de ellos, por lo que al separar una célula que fabrica un único anticuerpo específico y ponerlo a proliferar, la progenie será una fuente de grandes cantidades de anticuerpos idénticos dirigidos contra un solo determinante antigénico. Esto se relaciona con la teoría de la selección clonal, la cual establece que al aislar una de dichas células se originará una colonia de células idénticas o clona que producirá un solo tipo de anticuerpos (Burnet, 1961). A este tipo de anticuerpos que provienen de una sola clona celular se les llama Anticuerpos Monoclonales (AM).

Köhler y Milstein en 1975, en un trabajo sobresaliente, lograron fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos de bazo de ratones inmunizados con un antígeno específico. Las células híbridas resultantes expresaban la propiedad del linfocito de producir anticuerpos específicos, y el carácter inmortal de las células de mieloma, además de la posibilidad de clonarse y producir grandes cantidades de un anticuerpo específico contra un solo determinante antigénico (Köhler y Milstein, 1975; Milstein, 1980).

Evidentemente, estos avances técnicos han conducido a numerosos proyectos de investigación en los cuales se han invertido grandes cantidades de recursos económicos, tanto en la industria farmacéutica como en las compañías de productos científicos. Todo esto debido a que los AM han constituido una herramienta importante por su especificidad para identificar y marcar determinadas células o moléculas y separarlas de una mezcla de ellas. En muchos laboratorios se ha tratado de obtener

AM dirigidos contra moléculas biológicas difíciles o imposibles de purificar mediante otro tipo de técnicas (Lipinski y Herzenberg, 1981).

El campo de aplicación de los AM en la investigación 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). En cuanto a este último punto, los AM son de gran utilidad para conocer cada vez un poco más acerca de procesos tan complejos e interesantes como lo es el de la fertilización.

Al interactuar con éxito un óvulo con un espermatozoide, se lleva a cabo el proceso de la fertilización, el cual puede dividirse principalmente en tres etapas que son: el reconocimiento del óvulo por el espermatozoide, la regulación de la entrada de espermatozoides en el óvulo y la activación del metabolismo del óvulo para que se inicie la división celular y el desarrollo embrionario. El reconocimiento del óvulo por el espermatozoide ocurre cuando éste entra en contacto con la capa gelatinosa que envuelve al óvulo, en los invertebrados a dicha envoltura se le llama capa vitelina. Algunos investigadores han observado que al preparar anticuerpos contra las proteínas receptoras y añadirlos a una suspensión de óvulos antes de la adición de los espermatozoides, no se realiza la fertilización (Epel, 1978).

En cuanto a las investigaciones dedicadas a aclarar los mecanismos de la fertilización en vertebrados, la mayoría de ellas se han realizado en anfibios y mamíferos. Desde hace varios años los anfibios han sido considerados como un buen material debido a la gran cantidad de óvulos que produce una sola hembra y por la posibilidad de inducir

la fertilización "in vitro" bajo condiciones bien definidas. Sin embargo, los mamíferos han merecido especial atención debido a su gran importancia desde el punto de vista de la medicina y de la producción animal (Barbieri, 1982).

En los mamíferos una de las primeras barreras que tiene que pasar el espermatozoide para fecundar al óvulo es la Zona Pelúcida (ZP), por lo que actualmente se ha puesto mucha atención al estudio de esta estructura.

La ZP es una matriz extracelular específica del ovocito que está formada por moléculas de glicoproteínas, algunas secretadas por el ovocito y otras por las células cúmulo (Alberts et al, 1983). Durante la ovogénesis, la ZP aparece como una discreta estructura extracelular que rodea al ovocito de mamíferos y después de la fertilización se encuentra rodeando al embrión, permaneciendo así hasta que tiene lugar la implantación (Dunbar, 1983; Shimizu et al, 1983). Esta capa se encuentra formada por finos gránulos y filamentos embebidos en una matriz amorfa; con frecuencia se observa que la atraviesan microvellosidades y reminiscencias de células de la corona radiada (Sathananthan et al, 1982).

Con respecto a sus características, se sabe que la ZP es impermeable a los solutos de alto peso molecular (PM) como polisacáridos y proteínas (Austin y Short, 1982). Se han hecho estudios acerca de los agentes que pueden causar la disolución de la ZP de varias especies. Estas investigaciones demuestran la variedad de proteínas de la ZP de diferentes especies, así como la complejidad de la composición química de dichas proteínas (Dunbar et al, 1980; Dunbar, 1983). Se ha

estimado que la masa de la ZP de un solo ovocito de ratón es de 5 ng, de los cuales aproximadamente el 80% es de proteínas y el resto de carbohidratos; tomando en cuenta el peso seco de la ZP se vio que 1.8 ng corresponden a su contenido protéico (Shimizu et al, 1983; Loewenstein y Cohen, 1964). Las propiedades químicas de la ZP de ovocitos de cerdo se muestran en el cuadro 1, observándose que está constituida en su mayoría por proteínas (71%) y en segundo lugar por carbohidratos (19%), sin embargo, también está formada por otros componentes tales como ácidos urónicos, ácido siálico, acil-ácido graso, sulfato y fosfato (Dunbar et al, 1980).

La ZP que rodea a los ovocitos de ratón está formada por tres familias de glicoproteínas denominadas ZP-1, ZP-2 y ZP-3, con un PM de 185,000, 140,000, y 83,000 daltones respectivamente, encontrándose que la ZP-2 es la más abundante (East y Dean, 1984). En 1981, Dunbar et al reportaron que la ZP de conejo y la de cerdo están formadas por tres familias de glicoproteínas y que difieren entre sí en cuanto a sus PM. Sin embargo, un estudio realizado por Noda y colaboradores muestra que la ZP de cerdo está formada por dos familias de glicoproteínas de PM de 60K y 90K (Noda et al, 1983). Por otra parte, se hizo un análisis de la ZP de cerdo, el cual mostró la presencia de dos familias de glicoproteínas de PM de 90K y 55K, y al hacer una reducción de puentes disulfuro con 2-mercaptoetanol, aparecieron dos familias adicionales de PM 65K y 25K, las cuales se cree que son generadas a partir de la familia de PM de 90K por un proceso proteolítico de la ZP (Wardrip y Hedrick, 1985).

Por lo que respecta a las funciones de la ZP, se sabe que uno de los sitios de mayor especificidad en la fertilización de mamíferos es esta estructura. Cuando es removida, la especificidad de la fertilización se ve reducida, es decir, la ZP media la especificidad de la capacidad del espermatozoide para unirse a los óvulos, por lo que es el bloqueo principal que evita la polispermia. Además, protege al ovocito de daño mecánico, y protege el desarrollo del embrión durante su paso desde el oviducto hasta su implantación en el útero (Shimizu et al, 1983; Yanagimachi, 1984). Muchos investigadores han demostrado que la ZP es un poderoso inmunógeno pues el antisuero contra ella puede bloquear la unión y penetración del espermatozoide a la ZP "in vitro", lo cual ha sido demostrado en hamster (Hartmann, 1983).

En relación a la inmunogenicidad de la ZP, al principio de los estudios en este campo, algunos investigadores usaron tejidos ováricos completos como fuente de material antigénico para caracterizar a la ZP (Shahini et al, 1972), pero la complejidad del material usado generó gran diversidad de anticuerpos con reacción cruzada. Lo anterior fue simplificado posteriormente por absorción del suero inmune con una gran variedad de tejidos animales (Omby y Shivers, 1972). Se reportó que con una sola dosis de 2.5 mg de globulina anti ZP, se inhibe la fertilización en ratones con una efectividad del 100% durante once días y en algunos casos puede prolongarse hasta treinta y tres días; también se observó que la infertilidad es reversible y que este efecto se debe a la maduración, ovulación y fertilización de óvulos cuya ZP no fue afectada, así como por la gradual decadencia del precipitado de anticuerpos

en la ZP (Sacco, 1979).

A principios de la década de los años 80s se llevaron a cabo estudios más detallados usando ZP aislada de ovocitos de conejos y hamsters (Dunbar y Raynor, 1980), lo cual ha demostrado su alto grado de inmunogenicidad. Con este tipo de estudios se lograron producir cuatro tipos de anticuerpos específicos anti ZP usando anti suero de conejo preparado en contra de ZP solubilizada por calor (Dunbar et al, 1980).

Aunqu se han podido obtener anticuerpos anti ZP tejido-específicos, generalmente muestran reacción cruzada cuando son expuestos a ZP de otras especies de mamíferos, por ejemplo anticuerpos obtenidos de ZP humana reaccionan contra la de cerdo y chimpancé entre otras (Sacco, 1981).

Por otro lado, se ha encontrado que algunos grupos de mujeres con infertilidad, presentan anticuerpos en contra de la ZP. Shivers y Dunbar en 1977 demostraron en un grupo de 22 mujeres infértiles sin causa anatómica aparente, que su suero cuando era agregado a ovocitos de cerdo, producía reacción positiva antígeno-anticuerpo medida con la técnica de inmunofluorescencia. También Nishimoto y colaboradores en 1980, encontraron que los sueros de 13 de ciento setenta y cinco mujeres con infertilidad sin etiología definida presentaban anticuerpos en contra de la ZP, en cambio en 71 mujeres jóvenes y de 39 mujeres embarazadas no encontraron ninguna reacción. Estos trabajos muestran que en algunos casos de mujeres infértiles la causa pudiera ser la presencia de autoanticuerpos en contra de la ZP, sin embargo, otros estudios muestran la obtención de una misma frecuencia de la unión de anticuerpos a la ZP en suero

de mujeres infértiles como en el suero de hombres y mujeres fértiles (Sacco y Moghissi, 1979). Dada esta controversia de opiniones, es importante continuar realizando experimentos para tratar de esclarecer este punto.

De diez años a la fecha aproximadamente, se ha puesto gran interés en utilizar como antígeno a la ZP para elaborar una vacuna anticonceptiva basada en sus características inmunogénicas. La inmunización con un antígeno purificado de ZP o de subunidades de ella tiene ciertas ventajas entre las que se encuentran: a) Puede bloquear la fertilización pero sin ocasionar aborto, b) Los antígenos protéicos de la ZP no se han encontrado en ningún otro tejido, c) La fertilización puede ser bloqueada por anticuerpos con títulos bajos, d) Una inmunización constante produciría niveles adecuados de anticuerpos en el líquido folicular para unirse a la ZP, e) Las glicoproteínas de la ZP parecen ser altamente inmunogénicas, f) La ZP de cerdo, vaca, conejo, perro y humano presentan reacción cruzada por lo que pueden ser usadas como fuente de material antigénico disponible para su purificación y su caracterización (Atkinson, 1985; Sacco y Shivers, 1978; Hasebe et al, 1983).

El tratamiento de la ZP con antisueros que contienen anticuerpos dirigidos en contra de ella, produce efectos que pueden ser observados mediante algunas técnicas que permiten detectar la presencia del anticuerpo en la superficie celular; entre ellas se encuentran la aglutinación de ovocitos libres de células cúmulo, formación de una capa de precipitación, inhibición de la lisis de la ZP, inmunofluorescencia directa e indirecta (Lemer y Dixon, 1973; Sacco y Shivers, 1978; Mori et al,

1979).

La técnica de Inmunofluorescencia combina la especificidad inmunológica con la sensibilidad histoquímica y la precisión del microscopio, lo cual no sólo permite la demostración de la reacción antígeno-anticuerpo, sino también su localización exacta. Las aplicaciones del método se extienden desde la virología hasta la micología, y desde la parasitología y patología hasta la botánica. Esta técnica ofrece una ventaja importante en comparación con otros métodos serológicos de investigación pues permite probar la especificidad inmunológica proporcionando los resultados al investigador en un lapso relativamente corto (Wick et al., 1978).

En varios estudios se han obtenido AM en contra de la ZP de ovocitos de conejo y de cerdo demostrándose que aunque son tejido-específicos muestran reacción cruzada que evidencia que estos ovocitos comparten determinantes antigénicos (Drell y Dunbar, 1984). Así mismo se han obtenido otros AM en contra de la ZP de ovocitos de cerdo que muestran reacción cruzada con la ZP de ovocitos de rata, ratón, hamster y humano, bloqueando inclusive la unión del espermatozoide al óvulo (Isojima et al., 1984); otros estudios inmunológicos sugieren que la ZP de humano, mono ardilla y conejo contienen una macromolécula ácida que posee determinantes antigénicos similares a los de la ZP de cerdo purificada (Sacco et al., 1981). Se concluye que la ZP de humano y la de cerdo comparten por lo menos dos determinantes antigénicos diferentes, por lo que se siguen realizando estudios para localizar los determinantes antigénicos que comparten ambas ZP, utilizando como herramienta los AM (Kamada et al., 1983;

Shigeta et al, 1985).

La presente tesis se refiere a las pruebas funcionales de AM producidos en contra de la ZP de ovocitos de cerdo, obtenidos en el propio laboratorio de Biología Celular, para estudios sobre problemas de la fertilización, por lo que es necesario describir brevemente cómo se llegó a obtener dichos AM.

Como antígeno se utilizó la familia de glicoproteínas con PM de 55K proveniente de la ZP de ovocitos de cerdo, la cual fue obtenida y purificada por electroforesis de dos dimensiones en presencia de 2-mercaptoetanol. Con este antígeno se inmunizaron ratones hembras BALB/c de seis a ocho semanas de edad, por vía intraperitoneal, dando una hiperinmunización después de transcurridos treinta días; a los tres días posteriores a esta segunda inmunización, se hizo la fusión celular. La razón por la que se hizo la hiperinmunización fue el incrementar la población de células productoras del anticuerpo específico. En este momento, utilizando polietilenglicol, se fusionaron los linfocitos del bazo de estos ratones con células de mieloma de ratón de la línea P3X63AG8.653, la cual tiene la característica de no secretar inmunoglobulinas, además de ser deficiente en la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT⁻), (Kearny et al, 1979).

Las células producto de esta fusión (hibridomas) se pusieron a proliferar en un medio de cultivo selectivo (medio HAT) que contenía hipoxantina, aminopterina y timidina, el cual permitiría que proliferaran solamente las células híbridas resultantes de la fusión de un mieloma con una célula de bazo.

Aproximadamente después de 15 días de iniciado el cultivo, se obtuvieron colonias con suficiente número de células como para poder determinar si éstas estaban produciendo anticuerpos. Esto se llevó a cabo por medio de un inmunoensayo enzimático de fase sólida conocido como ELISA, el cual utiliza para revelar la presencia de anticuerpos una inmunoglobulina de cabra dirigida contra inmunoglobulina G (IgG) de ratón conjugada con la enzima peroxidasa, el sustrato de ésta, así como un compuesto químico que cambie de coloración en forma proporcional a su estado de oxidación al captar el producto de la reacción enzimática. Bajo estas condiciones, el sobrenadante de las colonias de hibridomas que sintetizaban y secretaban el anticuerpo deseado dieron una coloración verde cuya intensidad era proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en el sobrenadante.

Algunas de las colonias que produjeron los anticuerpos se clonaron en cuatro ocasiones para de esta manera poder obtener un AM. En cada clonación se procuró que la colonia de hibridomas proviniera de una sola célula. Después de cada clonación se fue haciendo la prueba de ELISA para ir seleccionando las colonias celulares con mayor producción de anticuerpos. Esta metodología aseguró por un lado el origen monoclonal del anticuerpo, y por otro lado, al probarlo con el antígeno purificado, que este anticuerpo era específico contra la familia de glicoproteínas 55K de la ZP de ovocitos de cerdo.

En el cuadro 2 se resumen los resultados del porcentaje de colonias de células híbridas producidas, así como la presencia de anticuerpos anti glicoproteína 55K tanto de la fusión como de las clonaciones. En este

cuadro lo que se observa es que la eficiencia de producción de colonias en cada paso fue más o menos constante y el porcentaje de colonias produciendo AM se fue incrementando hasta llegar al máximo posible, lo que indica además, la estabilidad del genoma de la línea celular. Todo esto con respecto a los Líquidos Ascíticos (LA) correspondientes a la primera fusión únicamente.

Células de la segunda, tercera y cuarta clonaciones se dejaron proliferar para producir colonias de varios millones de células, las cuales se inyectaron en cantidades de dos millones a ratones para producir tumores ascíticos, los cuales produjeron grandes cantidades de anticuerpos anti glicoproteína 55K; esto se logró en un intervalo de una semana a un mes después de haber inyectado dichas células. El LA se extrajo de la cavidad peritoneal dando un lavado con solución salina balanceada. Por medio de electroforesis se determinó que la inmunoglobulina producida era de tipo IgG, además de que por la técnica de inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa se demostró la especificidad de los AM en contra de la familia de glicoproteínas 55K (Rodríguez, 1984).

Una vez hecho esto, se hicieron pruebas de ELISA para titular la concentración de AM (Betancourt y Serrano, comunicación personal). Los resultados de esta titulación se muestran en el cuadro 3 donde se puede observar que se produjeron cuatro clones celulares cuyos LA tienen títulos que van desde uno hasta doscientos mil.

Con todo lo anterior se tuvo la posibilidad de plantear el presente estudio como un inicio de una serie de pruebas para determinar la funcionalidad de estos anticuerpos.

CUADRO 1.- COMPOSICION QUIMICA DE LA ZP DE OVOCITOS DE CERDO.

Componente	ng/zona	$\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.	% del total
Proteína	33.00	1000	71.0
Hexosas neutras	8.70	264	19.0
Acidos urónicos	1.10	34	2.4
Acido siálico	1.30	38	2.7
Acil-ácido graso	1.30	38	2.7
Sulfatos	0.59	18	1.3
Fosfatos	0.50	15	1.1
	<hr/>		<hr/>
	46.5		100.2

Tomado de Dunbar et al, 1980.

CUADRO 2.- CRECIMIENTO DE COLONIAS DE HIBRIDOMAS Y POZOS CON ANTICUERPOS ANTI 55K DETECTADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA, (PRIMERA FUSION).

	Pozos con colonias celulares (%).	Presencia de anticuerpos (%).
Fusión	20	06
Clonación I	13	88
Clonación II	38	50
Clonación III	28	98
Clonación IV	36	100

Tomado de Betancourt et al, 1985.

CUADRO 3.- TITULACION DE LA CONCENTRACION DE AM MEDIANTE PRUEBAS DE ELISA.

CLONA	LIQUIDO ASCITICO	FECHA	TITULACION
2A4.2	A1 II	06-02-84	10,000
		06-04-84	200,000
	A3 II	15-02-84	1,000
		10-04-84	200,000
	B10 II	06-02-84	10,000
	C5 II	15-02-84	1,000
		23-02-84	200,000
		30-03-84	200,000
	F2 II	06-02-84	200,000
	F6F2 III	30-03-84	100,000
		20-03-84	10,000
		06-04-84	200,000
	F6F5 III	17-05-84	200,000
	F6C8B3 IV	30-03-84	200,000
		06-04-84	10
	F6C8B12 IV	11-05-84	1
		07-05-84	200,000
17-05-84		No titulado	
F6C8 s/n IV	10-07-84	1	
2A4.1	C6 II	06-02-84	10,000
		20-03-84	100
		26-03-84	200,000

CONTINUACION CUADRO 3.-

CLONA	LIQUIDO ASCITICO	FECHA	TITULACION
2A4.2'	G10C9 III	20-03-84	10,000
		07-05-84	200,000
	G10D9 III	30-03-84	10,000
	G10C12 III	16-04-84	10
H4	A12H4B2F2 III	25-07-84	100
	A12H4B2F3 III	25-07-84	100
	A12H4B2F7 III	05-09-84	1,000
	A12H4B2 s/n III	30-07-84	100
	A12H4A8A2A6 IV	08-10-84	1,000
		24-09-84	1,000
	A12H4C7C6B9 IV	04-10-84	1,000
A12H4C7C6C10 IV	22-11-84	No titulado	

Las fechas corresponden a la extracción del LA de la cavidad peritoneal.

OBJETIVO GENERAL.-

Probar la especificidad de AM en contra de la ZP de ovocitos de cerdo medida por técnicas inmunofluorescentes.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.-

Probar si los AM producidos en contra de la familia de glicoproteínas 55K de la ZP presentan reacción al enfrentarlos a ovocitos íntegros, es decir, si reaccionan "in situ".

Determinar la especificidad que tienen estos AM para diferenciar a la ZP de ovocitos de cerdo de entre otros tejidos.

Demostrar la inexistencia de determinantes antigénicos parecidos entre el estrona ovárico de cerdo y la ZP del mismo.

HIPOTESIS.-

Dado que los AM tienen la capacidad de detectar un solo tipo de determinante antigénico y que en la ZP de ovocitos de cerdo deben existir varios y exclusivos que la diferencien de otros órganos o tejidos; al utilizar una serie de AM que reconocen "in vitro" ciertos determinantes de la ZP, éstos reaccionarán únicamente con aquéllos exclusivos de la ZP.

MATERIAL Y METODOS.-

En el presente trabajo se utilizaron básicamente dos técnicas. La primera es la relacionada con la reacción entre el AM y la ZP de los ovocitos de cerdo. La segunda es la prueba de especificidad tisular de éstos.

Para llevar a cabo la primera técnica, inicialmente se obtuvieron los ovocitos a partir de los ovarios de cerdo, según la técnica de Dunbar et al, (1980). Los ovarios fueron colectados en un rastro de cerdos, y se almacenaron a -40°C en un congelador REVCO. En cada ensayo se tomaron aproximadamente 17 ovarios que se colocaron en cajas de Petri de plástico (fig 2), conteniendo 5 ml de solución salina amortiguadora de fosfatos-Citrato-ácido etilen di amino tetra acético (PBS-C-EDTA), preparada de la siguiente manera:

NaCl	7.39 g
Na_2HPO_4	2.165 g
EDTA	0.745 g
Citrato de Sodio	0.83 g
Azida de Sodio	0.2 g

Estas sales fueron aforadas a un litro con agua destilada y el pH se ajustó a 7.3 con ácido clorhídrico 1N.

El siguiente paso consistió en macerar los ovarios con la ayuda de unas pinzas para sostenerlos y un bisturí para cortar cada uno de los folículos y colectar así los ovocitos, (fig 3).

Posteriormente, la suspensión que contenía los ovocitos, se filtró a través de varios recipientes con mallas de nylon de diferente tamaño de poro: 1,000, 200, 150 y 85 μm , (fig 4), previo lavado escrupuloso



Fig 2.- Ovarios de cerdo contenidos en caja de Petri, inmersos en 5 ml de PBS-C-EDTA.

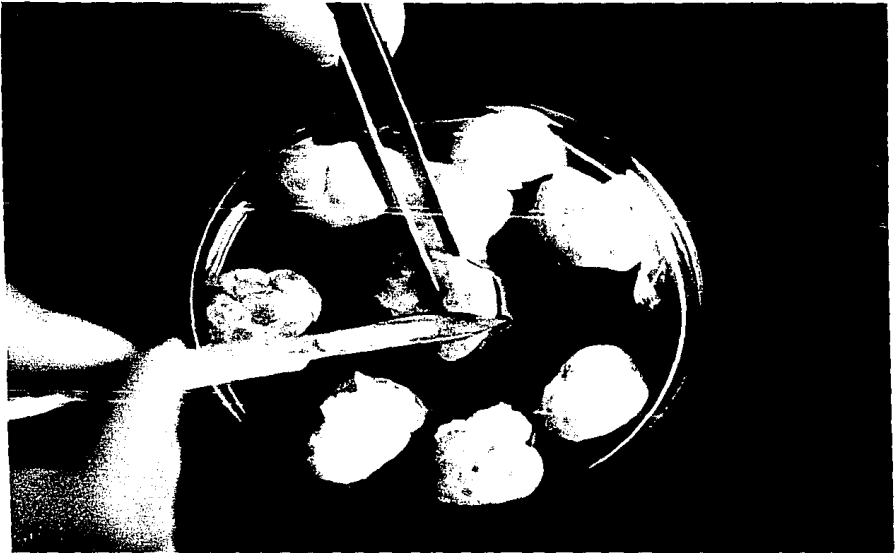


Fig 3.- Maceración de ovarios de cerdo mediante pinzas y bisturí, para la obtención de ovocitos.

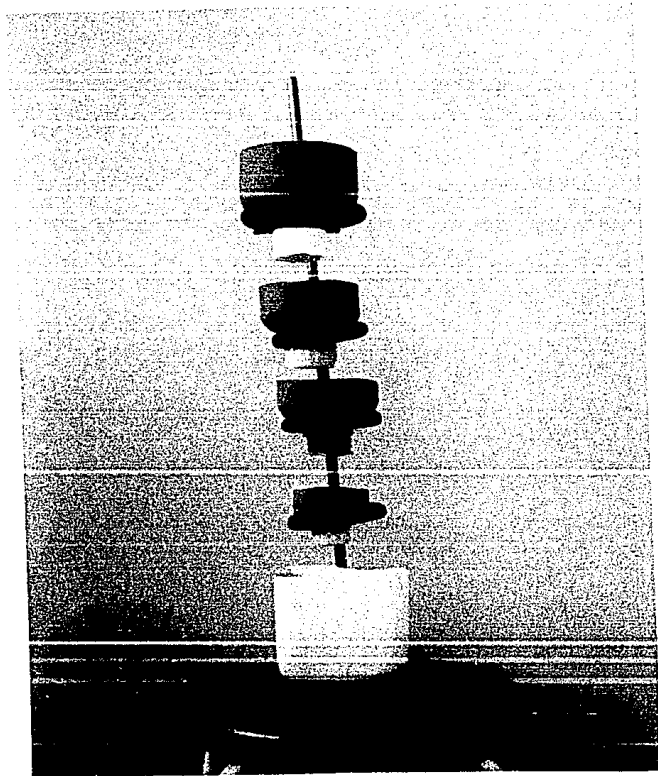


Fig 4.- Filtración progresiva de la suspensión de ovocitos a través de mallas de nylon de diversos tamaños de poro. Dichos tamaños se indican con los números en los recipientes.

de los ovarios con la solución amortiguadora para evitar perder los ovocitos que se hubieran quedado adheridos al tejido. Por medio de una jeringa de plástico de 20 ml, se lavaron a presión todas las mallas con PBS-C-EDTA, excepto la de 1,000 μm para evitar que pasaran los desechos celulares de mayor tamaño a la malla de 200 μm .

En seguida se invirtió el recipiente con la malla de 85 μm , para lavarse a presión con la jeringa, depositando la suspensión de ovocitos en una caja de Petri de plástico. El contenido de dicha caja se filtró nuevamente a través de las mallas de 85 μm . El lavado a presión se repitió una segunda vez, ahora ya con menor cantidad de restos celulares del tejido que circunda a los folículos. Después se contaron los ovocitos con la ayuda de un invertoscopio (Carl Zeiss).

El contenido de la caja de Petri se vertió en un tubo de centrifuga cónico de plástico de 10 ml, centrifugándose a 25 Xg durante cinco minutos en una centrífuga clínica Sol-bat (modelo 2332), con el fin de eliminar más restos celulares, y además, reducir el volumen del amortiguador al mínimo. Finalmente se eliminó el sobrenadante para resuspender el paquete celular en 1-2 ml de solución amortiguadora.

Todas las operaciones se realizaron en recipientes de plástico debido a que los ovocitos son altamente adherentes en los recipientes de vidrio.

La segunda etapa de esta técnica comprende la reacción inmunofluorescente, de acuerdo con lo reportado por East y Dean, (1984), así como por East et al, (1984), con algunas modificaciones.

Se resuspendió el contenido del tubo de centrifuga (ovocitos en

PBS-C-EDTA), colocándose 200 μ l de la suspensión en una microplaca de 96 pozos con fondo plano (Cat 167008, Nunc, Dinamarca), asegurando que en cada uno de los pozos hubiesen de 80 a 100 ovocitos. Esto se hizo con una micropipeta Gilson con capacidad de cero a 200 μ l.

Para sedimentar los ovocitos, se dejó transcurrir un lapso de 5 minutos, retirando la mayor cantidad posible del amortiguador. A continuación, a cada uno de los pozos conteniendo los ovocitos, se les agregaron ya sea 200 μ l de los IA ricos en AM sujetos a prueba, o bien del suero control positivo o de los negativos, los que serán definidos más adelante. Se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente, retirándose la mayor cantidad posible de cada IA. Inmediatamente después se agregaron a los pozos 200 μ l de solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS); dicha solución se preparó de la siguiente manera:

NaCl	3.7 g
Na ₂ HPO ₄	0.4766 g
NaH ₂ PO ₄	0.2583 g

Se aforó a 500 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 7.3 con NaH₂PO₄.

El amortiguador del pozo que contenía los ovocitos se resuspendió tres veces dejándose en reposo durante 5 minutos para que los ovocitos se sedimentaran; después de lo cual se retiró la mayor cantidad posible del amortiguador. Este proceso se llevó a cabo cuatro veces para eliminar la mayor cantidad posible de AM que no se hubiera unido a la ZP.

Posteriormente, a cada pozo se agregaron 200 μ l de Isotiocianato de fluoresceína al 2% conjugado a un anticuerpo anti IgG de ratón,

producido en cabra (FITC). Para obtener la solución de FITC al 2%, se preparó anticipadamente solución reguladora Tris-salina como sigue:

Tris	10 milimolar	1.21 g
NaCl	0.9%	9.0 g
Azida de Sodio	0.02%	0.2 g

Se aforó a un litro con agua destilada, ajustándose el pH a 7.4 con ácido clorhídrico 1N.

De esta solución Tris-salina se tomaron 24.5 ml a los cuales se les agregaron 0.5 ml de FITC para obtener así la solución al 2%. Se hicieron alícuotas de un mililitro en tubos de ensaye de plástico y se depositaron en un recipiente, conservándose en la oscuridad y a -40°C en un congelador REVCO.

Los ovocitos en contacto con FITC, depositados en los pozos, se dejaron reposar de 10 a 15 minutos en ausencia de luz. En seguida se retiró de los pozos la mayor cantidad posible de FITC y se agregaron 200 μl de PBS a cada pozo, dejándose reposar durante 5 minutos, procurando eliminar después la mayor cantidad posible de PBS. Estos lavados se llevaron a cabo cuatro veces.

Finalmente se adicionaron 200 μl de PBS a todos los pozos, dejándose reposar durante 60 minutos, evitando la entrada de luz (Shivers y Dunbar, 1977).

Con una micropipeta se resuspendió el contenido de los pozos para colocarlo entre un portaobjetos y un cubreobjetos. Inmediatamente después, se observó la preparación en un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss) equipado con un filtro Azul-violeta H436 (Carl Zeiss).

Se tomaron fotografías de los ovocitos tanto en campo claro como en fluorescencia, con un rollo Kodachrome 100 ASA, de 135 mm. Esta operación se realizó para cada uno de los IA y los testigos.

Los IA que se probaron fueron treinta y cuatro en total, provenientes de cuatro clonas celulares diferentes. Tres de ellas corresponden a una fusión, y la otra corresponde a una segunda fusión.

En cuanto a los testigos, se tomó como positivo un anticuerpo policlonal anti Zona Pelúcida Completa (ZPC) en una dilución 1:50 (anti suero en solución Tris-salina). Con respecto a los testigos negativos, se utilizó por un lado suero de ratón no inmunizado a una dilución 1:100 (suero concentrado en solución Tris-salina); y por otra parte, se utilizó un AM contra melatonina (Serrano, 1984).

La segunda técnica utilizada para la realización de este trabajo, fue la de inmunofluorescencia relacionada con la Especificidad Tisular de los AM probados con la técnica anterior.

De acuerdo con el reporte de East y Dean (1984), y el de Nishimoto et al (1980), se procedió de la siguiente manera:

En el rastro se obtuvieron los órganos de cerdo a utilizar, los cuales fueron: corazón, hígado, pulmón, riñón y ovario. Cada uno de ellos se procesó en diferente sesión, por lo que fue necesario almacenarlos en congelación, aproximadamente a -10°C .

Con la ayuda de una navaja, se cortaba un pequeño bloque del órgano a probar, de aproximadamente un centímetro cúbico, colocándolo en la platina de un Crióstato (Minot IM-106B), procediéndose a hacer los

cortes, de acuerdo con Isojima et al (1984).

Dichos cortes fueron de 6 μm de grosor, colocándose cinco de ellos en cada portaobjetos, vigilando el buen estado de todos los cortes. Una vez dispuestos en cada uno de los portaobjetos, a unos se les agregaron 300 μl del LA respectivo, y a otros las soluciones de los testigos positivo y negativos; de manera que se tenía un LA diferente para cada preparación.

El anticuerpo se mantuvo en contacto con el tejido durante 30 minutos, y en seguida se eliminó el exceso. Con una pipeta Pasteur se tomó aproximadamente un mililitro de PBS, y se lavó el tejido goteando cuidadosamente para evitar destruirlo. Se repitió la misma operación tres veces más para hacer un total de cuatro lavados.

En seguida se agregaron 300 μl de FITC, se cubrieron las preparaciones para evitar la entrada de luz y se colocaron en un lugar oscuro. Después de un lapso de 10 a 15 minutos se eliminó el exceso de FITC y se procedió a lavar los tejidos con PBS en la forma antes mencionada. Esto se repitió hasta haber obtenido un total de cuatro lavados.

Posteriormente se agregaron 300 μl de PBS a cada una de las preparaciones dejándolas en reposo por una hora, teniendo la precaución de colocarlas en un lugar oscuro.

Después se cubrió la preparación con un cubreobjetos para observarse bajo el microscopio de epifluorescencia. En cada caso se tomaron fotografías en campo claro y en fluorescencia, con un rollo Kodachrome 100 ASA, de 135 mm.

Los LA probados procedían de cada una de las clonas celulares. En

cuanto a los testigos, fueron los mismos que se utilizaron en la técnica antes mencionada. Como testigo positivo se usó suero de ratón inmunizado contra ZPC, dilución 1:50; y como testigos negativos se utilizaron suero de ratón no inmunizado dilución 1:100, y un AM contra melatonina.

Con el fin de asegurar el buen resultado de la técnica, se procedió a probar por segunda vez los IA.

R E S U L T A D O S . -

Al realizar la parte de la técnica referente a la obtención de los ovocitos, se logró obtener un buen número de éstos por cada ovario que se maceró, es decir, se obtenían aproximadamente 50 ovocitos por cada uno de ellos, lo cual a pesar de no ser un número óptimo, brindó la cantidad suficiente de material para realizar los siguientes pasos de la técnica. De acuerdo a lo que reportan Betancourt et al (1984), y Dunbar et al (1980), es posible obtener de 200 a 250 ovocitos por cada ovario.

Al analizar los ovocitos tratados con los diferentes IA se observó que algunos mostraban fluorescencia en diferente intensidad, y al compararlos con los ovocitos tratados con el anticuerpo policlonal utilizado como testigo positivo y con los sueros usados como testigos negativos, los IA se clasificaron como positivos o bien como negativos.

Por otra parte, se observó una diferencia en cuanto a la distribución de la fluorescencia en la ZP, es decir, con algunos IA la ZP mostraba fluorescencia homogénea y debido a esto se les denominó uniformes a los IA; mientras que con otros IA la ZP mostró fluorescencia preferencialmente en la periferia, por lo cual se les llamó periféricos; sin embargo, en ambos casos se puede observar con mucha claridad la fluorescencia de la Z.P.

Con respecto a los IA probados, éstos provienen de cuatro clonas celulares; tres de ellas pertenecen a la primera fusión, las cuales son 2A4.2, 2A4.1 y 2A4.2'; y la cuarta clona celular, H4, pertenece a la segunda fusión. De la primera clona celular (2A4.2) se probaron diecinueve IA, de la segunda (2A4.1) fueron tres, de la tercera (2A4.2')

se probaron cuatro, y finalmente se probaron ocho de la cuarta clona (H4), lo cual hace un total de treinta y cuatro IA.

Como puede observarse en el cuadro 4, de los IA provenientes de la clona 2A4.2, se obtuvieron diecisiete positivos y dos negativos. De los positivos, catorce presentaron distribución uniforme de la fluorescencia y tres la presentaron periférica. En cuanto a los provenientes de la clona 2A4.1, dos resultaron positivos y sólo uno negativo; de los positivos, uno presentó distribución periférica y el otro distribución uniforme.

Aquellos IA provenientes de la clona 2A4.2', los cuatro resultaron positivos y con distribución uniforme. Dando un total de veintiseis IA analizados para la primera fusión.

Por otra parte, en el cuadro 5 se muestran los resultados de los IA probados pertenecientes a la segunda fusión, en donde se puede observar que siete resultaron positivos y solamente uno fue negativo; lo cual hace un total de ocho IA. De los siete IA positivos, cuatro presentaron una distribución uniforme y los tres restantes resultaron periféricos.

En cada prueba de IA se contaba con un testigo positivo que se trataba de un anticuerpo policlonal anti ZPC, con el cual se observaba la ZP muy fluorescente. Así mismo, se tenían dos testigos negativos, uno con suero de ratón no inmunizado dilución 1:100, y el otro se trataba de un AM contra melatonina; en ambos casos la fluorescencia era nula o casi nula.

Además del análisis al microscopio, se tomaron fotografías de los

CLONA	LIQUIDO ASCITICO	FECHA	FLUORESCENCIA	DISTRIBUCION
2A4.2	A1 II	06-02-84	+	Uniforme
		06-04-84	+	Uniforme
	A3 II	15-02-84	+	Uniforme
		10-04-84	+	Uniforme
	B10 II	06-02-84	+	Uniforme
	C5 II	15-02-84	+	Periférica
		23-02-84	+	Uniforme
		30-03-84	+	Uniforme
	F2 II	06-02-84	+	Uniforme
	F6F2 III	30-03-84	+	Uniforme
		20-03-84	+	Uniforme
		06-04-84	+	Uniforme
	F6F5 III	17-05-84	+	Periférica
	F6C8B3 IV	30-03-84	+	Uniforme
		06-04-84	+	Uniforme
	F6C8B12 IV	11-05-84	(-)	

CUADRO 4.- LIQUIDOS ASCITICOS CORRESPONDIENTES A LA PRIMERA FUSION.

CLONA	LIQUIDO ASCITICO	FECHA	FLUORESCENCIA	DISTRIBUCION
2A4.2	F6C8B12 IV	07-05-84	+	Periférica
		17-05-84	+	Uniforme
	F6C8 s/n IV	10-07-84	(-)	
2A4.1	C6 II	06-02-84	+	Periférica
		20-03-84	(-)	
		26-03-84	+	Uniforme
2A4.2'	G10C9 III	20-03-84	+	Uniforme
		07-05-84	+	Uniforme
	G10D9 III	30-03-84	+	Uniforme
	G10C12 III	16-04-84	+	Uniforme

CONTINUACION CUADRO 4.- Líquidos ascíticos probados con la técnica de Inmunofluorescencia para determinar el tipo de reacción con la ZP de ovocitos de cerdo. De éstos, 19 resultaron positivos con distribución uniforme de la fluorescencia, 4 positivos con distribución periférica, y 3 negativos.

CLONA	LIQUIDO ASCITICO	FECHA	FLUORESCENCIA	DISTRIBUCION
H4	A12H4B2F2 III	25-07-84	+	Uniforme
	A12H4B2F3 III	25-07-84	+	Uniforme
	A12H4B2F7 III	05-09-84	+	Periférica
	A12H4B2 s/n III	30-07-84	(-)	
	A12H4A8A2A6 IV	08-10-84	+	Uniforme
		24-09-84	+	Uniforme
	A12H4C7C6B9 IV	04-10-84	+	Periférica
	A12H4C7C6C10 IV	22-11-84	+	Periférica

CUADRO 5.- LIQUIDOS ASCITICOS CORRESPONDIENTES A LA SEGUNDA FUSION.- Al probar los LA con la técnica de Inmunofluorescencia para determinar el tipo de reacción con la ZP de ovocitos de cerdo, 4 resultaron positivos con distribución uniforme de la fluorescencia, 3 positivos con distribución periférica, y uno negativo.

ovocitos tanto en campo claro como en fluorescencia para poder tener una prueba más objetiva tanto de la intensidad de la fluorescencia, como del buen estado de los ovocitos. En la figura 5 se muestra la estructura íntegra del ovocito cubierto por la ZP, la cual evidencia el estado de obtención de la mayoría de los ovocitos en este trabajo. Con estos ovocitos se obtuvieron resultados variados dependiendo del tipo de IA con el que se trataron. En la figura 6 está representada una típica reacción de un IA negativo con fluorescencia casi nula, mientras que en la figura 7 la reacción se llevó a cabo con el control positivo, es decir, con el anticuerpo policlonal anti ZPC, en donde la fluorescencia es mucho mayor.

En cuanto a las figuras 8 y 9, se observa un ovocito puesto a reaccionar con un IA que resultó positivo, con distribución periférica, y un ovocito que reaccionó con un IA positivo con distribución uniforme, respectivamente.

Con respecto a la técnica de inmunofluorescencia en relación a la especificidad tisular, se probaron seis IA con cada uno de los órganos con los que se pusieron a reaccionar, además de los testigos negativos y el positivo para la ZP. De los IA probados, tres de ellos pertenecen a la clona celular 2A4.2, y los tres restantes corresponden a cada una de las otras tres clonas celulares.

Al poner a reaccionar los IA y los sueros testigo con los diferentes tejidos de prueba se obtuvieron resultados positivos y negativos. Por un lado, al probar cortes de corazón, hígado, pulmón y riñón, se obtuvo una reacción negativa, es decir, no se observó fluorescencia

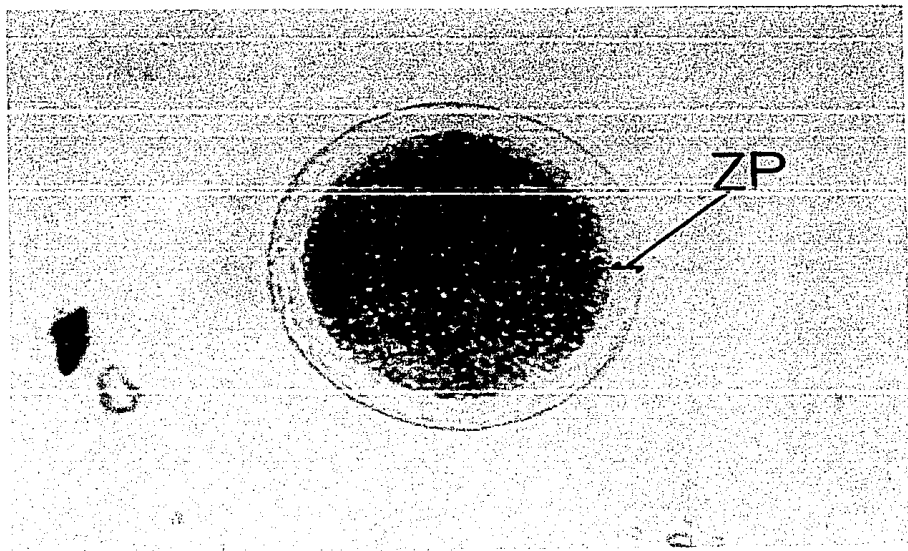


Fig 5.- Ovocito de cerdo en campo claro, rodeado por la ZP. Compárese con la ZP del ovocito mostrado en la fig 9, (125 aumentos).

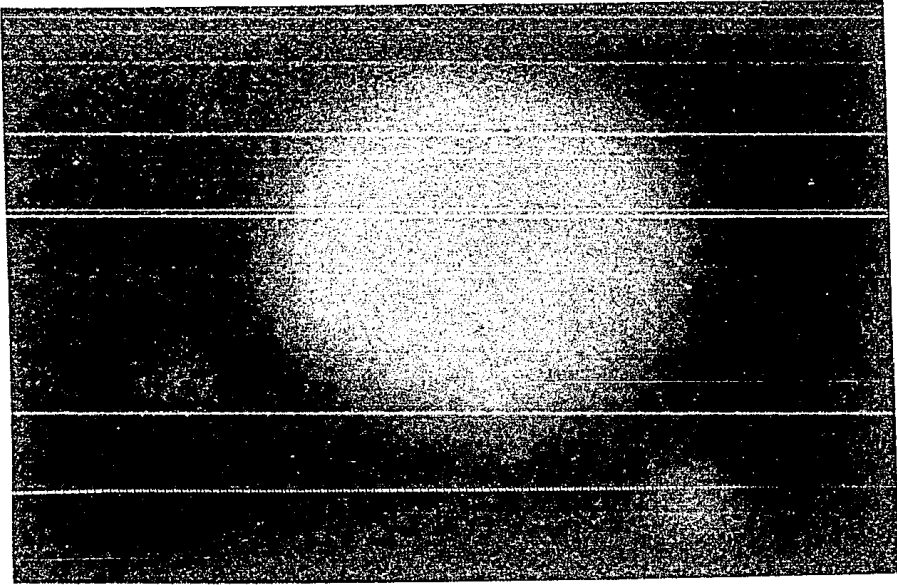


Fig 6.- Ovocito con fluorescencia casi nula después de reaccionar con un IA negativo, (125 aumentos).

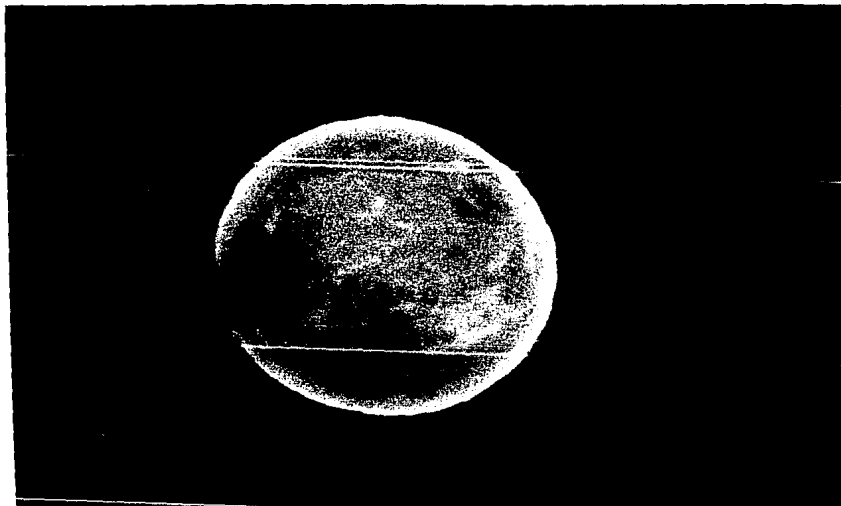


Fig 7.- Ovocito con fluorescencia muy evidente después de reaccionar con el anticuerpo policlonal anti ZPC (control positivo); nótese la estructura reticular de la ZP. Fotografía tomada a 125 aumentos.

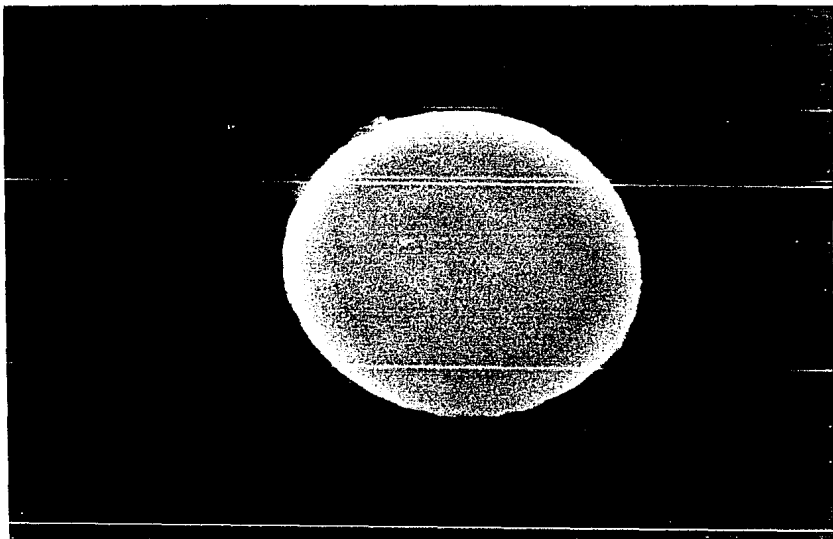


Fig 8.- Ovocito que muestra fluorescencia con distribución periférica después de reaccionar con un IA positivo, (125 aumentos).

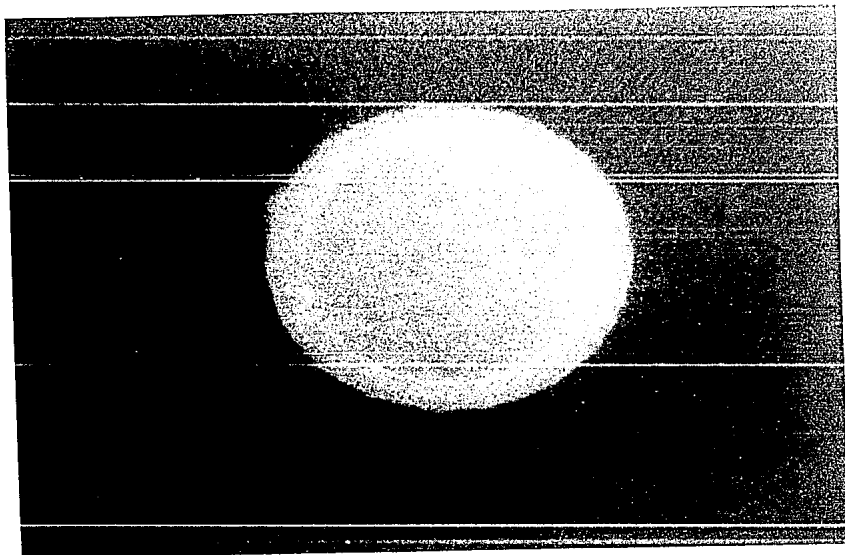


Fig 9.- Ovocito que muestra fluorescencia con distribución uniforme después de reaccionar con un IA positivo, (125 aumentos).

alguna con ninguno de los IA, ni aún con el suero anti ZPC (cuadro 6).

Por otra parte, al ensayar la reacción de los IA en cortes de ovario, se pudo observar cierta fluorescencia en este órgano, sin embargo fue únicamente en las regiones de los folículos donde se encuentra al ovocito rodeado por la ZP. Así pues, se puede decir que de los seis IA probados, sólo el F6C8B12 IV 11-05-84 resultó negativo, corroborando el resultado que se obtuvo con este mismo IA en el ensayo con la suspensión de ovocitos. También se observó que los controles brindaron resultados satisfactorios ya que el control positivo contra ZP reaccionó positivamente sólo en las regiones donde había ZP, mientras que tanto el AM contra melatonina como el suero de ratón no inmunizado no reaccionaron en absoluto.

Así mismo, se tomaron fotografías en campo claro y en fluorescencia para tener una prueba objetiva en cuanto a la "fluorescencia negativa" obtenida en todos los órganos probados excepto en el de ovario, además de corroborar el buen estado de los cortes del tejido. En la figura 10 se observa un corte de ovario y en el centro un ovocito rodeado por la ZP, en campo claro; en la figura 11 se observa el mismo corte pero en fluorescencia, en donde se muestra que sólo fluoresce la ZP y no el tejido circundante.

SUEROS Y IA	FECHA	ORGANO				
		CORAZON	HIGADO	PULMON	RIÑON	OVARIO
Al II	06-04-84	(-)	(-)	(-)	(-)	+
F6C8B3 IV	06-04-84	(-)	(-)	(-)	(-)	+
F6C8B12 IV	11-05-84	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C6 II	26-03-84	(-)	(-)	(-)	(-)	+
G10C9 III	20-03-84	(-)	(-)	(-)	(-)	+
Al2H4C7C6Cl0 IV	22-11-84	(-)	(-)	(-)	(-)	+
Anti ZPC dil. 1:50		(-)	(-)	(-)	(-)	+
Anti melatonina		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Suero de ratón no <u>in</u> munizado dil. 1:100		(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

CUADRO 6.- Al probar la reacción entre los IA y los diferentes tejidos de cerdo, se encontró que: cinco resultaron positivos y sólo uno negativo al ponerse a reaccionar con ovario, específicamente la región correspondiente a la ZP. Con los órganos restantes todos resultaron negativos. Se usaron como testigos negativos suero de ratón no inmunizado y AM en contra de melatonina. Como testigo positivo se usó suero anti ZPC.

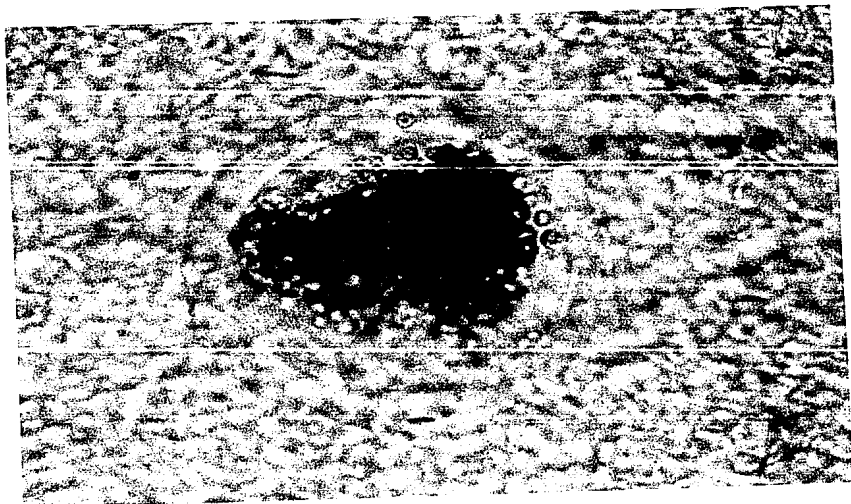


Fig 10.- Corte de ovario en campo claro, que presenta en la parte central un ovocito rodeado por la ZP, (125 aumentos).

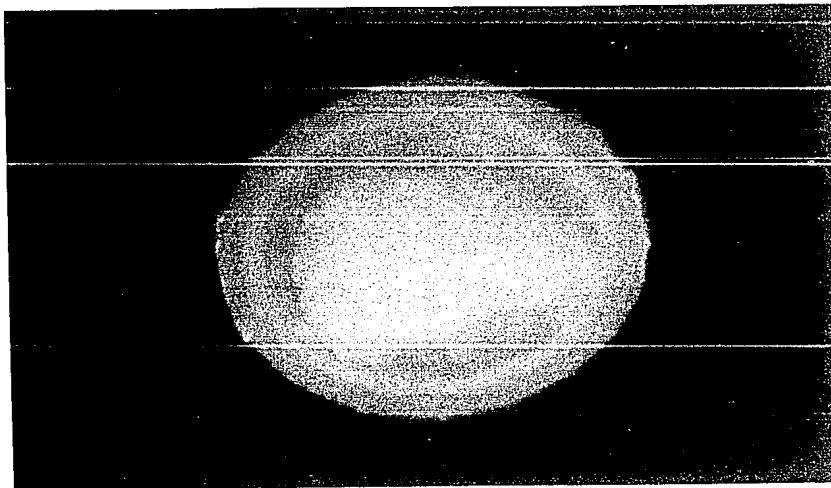


Fig 11.- El mismo corte de ovario de la fig 10, con fluorescencia sólo en la ZP, (125 aumentos).

DISCUSION.-

En el presente trabajo se probó la especificidad de AM contra una de las familias de glicoproteínas que componen a la ZP de ovocitos de cerdo, la cual corresponde a un PM de 55K.

En los resultados obtenidos se observa que algunos LA no reaccionaron al ponerse en contacto con la ZP, es decir, no se observó ninguna fluorescencia, siendo éstos negativos. Con respecto a los IA que resultaron positivos, la mayoría presentó una distribución homogénea de la fluorescencia en la ZP, por lo que se le denominó uniforme, y algunos presentaron distribución periférica, denominada así por mostrar mayor fluorescencia en la periferia de la ZP. Lo anterior parece indicar que la glicoproteína utilizada como antígeno, por sus dimensiones presenta una variedad de determinantes antigénicos definidos como sitios diversos de la glicoproteína que reaccionan para producir un anticuerpo contra ellos, por lo que al tener diversos AM, éstos pueden reaccionar de manera diferente en presencia de la ZPC. Esto podría poner en duda la afirmación de que los AM aquí probados fueran realmente específicos; sin embargo, Chaffotte et al (1985), apoyan este hecho, así como el que un AM no sea específico, ya que ellos demostraron que los híbridos que secretaban AM en contra de la subunidad β_2 de la triptofano sintetasa de Escherichia coli presentaron dos tipos de cadenas pesadas γ_1 y γ_{2b} así como dos tipos de cadenas ligeras que combinaban con ambas cadenas pesadas, lo cual indica que un AM puede estar dirigido contra más de un solo determinante antigénico.

El hecho de que se hayan encontrado IA negativos, puede explicarse

de dos maneras; la primera indicaría que el anticuerpo se encontraba en bajas cantidades como para dar una banda de precipitación aceptable que pudiera hacerse evidente con el conjugado de FITC. Además que el método para extraer el IA implica una dilución del mismo. Por otro lado, el resultado negativo en fluorescencia podría indicar una baja afinidad del AM por la familia de glicoproteínas 55K de la ZP. A juzgar por el título de estos IA, esta segunda explicación parecería más probable ya que estos IA reconocen a la glicoproteína 55K en la prueba de ELISA sólo cuando no están diluidos o bien están diluidos menos de cien veces únicamente.

Sin embargo no se puede descartar el hecho de que los determinantes antigénicos que reconocen los IA o bien estén en bajas concentraciones en la ZP, puedan reconocer un determinante antigénico que sin estar presente en forma nativa en la ZP, durante el proceso de extracción y purificación, se llegue a formar, o por otro lado, que el AM no tuviera acceso a los determinantes que puede reconocer y por lo tanto, dar la reacción que se calificó como negativa.

Se piensa que los AM probados en este estudio muy probablemente sean del tipo secuencial dirigidos contra la parte proteica de la glicoproteína (Rodríguez, 1984). Esta afirmación puede explicarse si se analizan varios puntos del proceso de extracción y purificación de las glicoproteínas así como las evidencias obtenidas en el propio laboratorio. Primeramente, para la extracción y separación de las diferentes familias de glicoproteínas de la ZP se utiliza una mezcla de digestión que contiene 2-mercaptoetanol en concentraciones lo suficientemente altas

como para romper algunos enlaces entre proteínas del tipo de puentes disulfuro alterando por lo tanto la estructura tridimensional de las glicoproteínas, pero exponiendo secuencias de residuos de aminoácidos con mayor accesibilidad (Hedrick, comunicación personal).

Por otro lado, se puede descartar el hecho de que los determinantes que reconocen los AM estén involucrados en la formación de una región en la ZP que involucre la presencia de las otras familias glicoproteicas, ya que al analizar el tipo de reacción de los LA ricos en AM en presencia de las tres familias glicoproteicas transferidas a papel de nitrocelulosa, éstos reaccionan única y exclusivamente con la familia 55K ya sea con sus carbohidratos o tratada con agentes desglicolizantes, lo cual apoya esta afirmación (Rodríguez, 1984). Sin embargo, ambas afirmaciones son ciertas sólo para los AM producto de la primera fusión, ya que aún falta analizar el comportamiento de los AM de la segunda fusión ante las tres familias glicoproteicas en papel de nitrocelulosa.

Con respecto a la prueba de especificidad tisular, se observó que de los seis LA probados, ninguno presentó reacción con los tejidos utilizados que fueron: corazón, hígado, pulmón, riñón y tejido estromático de ovario que rodea al ovocito. La especificidad se demostró en los cortes de ovario, donde se observó fluorescencia al ponerlos en contacto con los LA solamente cuando había ZP presente, pero el tejido de ovario que rodea al ovocito no mostró fluorescencia alguna, lo cual confirma que los AM probados son tejido-específicos. El hecho de que el anticuerpo policlonal tampoco haya reaccionado con los diversos tejidos

puede deberse a que a pesar de su característica policlonal, sea también tejido-específico, aunque no sea específico contra una familia de las glicoproteínas de la ZP como en el caso del AM ya que al probarlo con la técnica de inmunotransferencia, cruzó contra las tres familias de glicoproteínas.

Después de varios intentos, hace dos años (1984) se obtuvieron los primeros AM en contra de la ZP de mamíferos, principalmente en contra de ovocitos de conejo, rata, ratón y cerdo.

East y Dean en 1984 demostraron que la ZP de ratón, al igual que la de cerdo, está formada por tres familias de glicoproteínas con PM promedio de 185K, 140K y 83K, denominando a estas proteínas como ZP-1, ZP-2 y ZP-3, respectivamente. Estos autores trataron, por medio de los anticuerpos, de establecer la distribución de estas glicoproteínas en la ZP, además de determinar si estos anticuerpos eran o no tejido-específicos.

Para este estudio, ellos inmunizaron ratas Wistar con ZP solubilizada, produciendo cinco diferentes tipos de AM, purificándolos por medio de una columna de cromatografía en Sefacril S-200, caracterizándose tres de ellos como IgG2a y dos como IgG1.

Por medio de electroforesis en gel, hicieron un inmunoprecipitado de las glicoproteínas de la ZP, cruzándolas con los AM en donde tres de ellos mostraron reacción específica en contra de la glicoproteína ZP-2, y dos de ellos en contra de la ZP-2 y ZP-3, concluyendo que aquellos que reaccionaron en contra de la ZP-2 y ZP-3 tienen un determinante común, o comparten un sitio que abarca a regiones de ambas

glicoproteínas. Por medio de inmunofluorescencia directa encontraron que en óvulos fecundados, la ZP se teñía completamente mostrando una estructura fibrosa sin poder determinar la localización de las glicoproteínas. Para demostrar la especificidad de estos anticuerpos a otros tejidos, utilizaron el método de inmunofluorescencia indirecta en cortes de piel, cerebro, tiroides, corazón, pulmón, páncreas, hígado y ovario, no habiendo reacción cruzada en ningún caso, excepto en el ovario en las secciones que corresponden a la ZP, al igual que en el presente trabajo.

Estos mismos autores, en un trabajo que es continuación del anterior (East et al, 1984), utilizan los AM producidos para estudiar su efecto durante la fertilización y el desarrollo temprano de óvulos de ratones. Una característica importante de este trabajo es que no usaron AM purificados, sino los IA ricos en anticuerpos. Para observar el efecto de estos anticuerpos sobre la fertilización, inyectaron IA a ratones hembras dos días antes de su apareamiento con los machos, observando que la fertilización se inhibía por completo, ya que hubo cero hembras preñadas en comparación con los testigos, donde se observó fertilización en un 50% de ellas. Cuando el IA se inyectó dos días después del apareamiento ya no hubo efecto inhibitorio de la fertilización, ya que el número de hembras cargadas fue del 50%.

La acción de los AM también se comprobó a nivel de formación de embriones en estado de dos células. Para esto se inyectó el AM dos días antes del apareamiento de los animales, los cuales se sacrificaron 40 horas después, mostrando que en los oviductos de los ratones testigos

el 85% de los huevos estaban en etapa de dos células; en cambio aquellos tratados con los AM prácticamente no presentaron ninguno.

Así pues, estos autores indujeron infertilidad al administrar AM observando que ésta fue reversible, ya que los ratones hembras inmunizados y apareados posteriormente tuvieron descendencia 80 días en promedio después de la inmunización; en cambio, el grupo testigo necesitó un promedio de 23 días para tener descendencia. El período de días en que las hembras tuvieron nacimientos en el grupo tratado fue entre 44 y 117 días, lo que indica un amplio grado de variación individual en la interrupción de la fertilidad.

Por otro lado, Drell y Dunbar (1984), informan el haber producido anticuerpos en contra de ZP de cerdo y ZP de conejo. Ellos produjeron seis líneas celulares híbridas productoras de AM en contra de ZP porcina y siete en contra de ZP de conejo. En este caso también se usó como antígeno ZP solubilizada. Los anticuerpos obtenidos fueron purificados por medio de diálisis en contra de fosfato de sodio y pasados por una columna de DEAE-Sephadex, siendo todos ellos del tipo IgG.

Uno de los hallazgos principales de este estudio fue que en ninguno de los seis anticuerpos obtenidos en contra de la ZP porcina reconocieron determinantes de la ZP de conejo, y por otro lado, solamente un anticuerpo anti-ZP de conejo reconoció la ZP porcina. Otro resultado fue que al igual que los trabajos ya descritos, estos AM fueron tejido-específicos al ser probados en contra de cerebro, pulmón, páncreas, bazo y corazón, utilizando para esto la técnica de ELISA.

En un análisis más detallado del anticuerpo anti ZP porcina y que

cruza con ZP de conejo, usando la técnica de inmunotransferencia en papel de nitrocelulosa, se observó que este anticuerpo reconoce a la familia de glicoproteínas de la ZP de conejo de menor PM a pesar de que su patrón electroforético es totalmente diferente de la glicoproteína de la ZP porcina que también tiene el PM más bajo.

Otro aspecto que se analizó en este estudio es que este anticuerpo que cruza con las dos especies fue el único que reconoció glicoproteínas de ambas especies. Esto es importante, ya que los ratones fueron inmunizados con ZP soluble y en la inmunotransferencia las glicoproteínas se encuentran desnaturalizadas al ser tratadas con 2-mercaptoetanol por lo que los AM probados por medio de la técnica de ELISA deberían ser conformacionales mientras que éste que cruza con ambas especies debe ser un anticuerpo secuencial, explicando esto porqué reconoce a una glicoproteína de una especie de mamífero diferente.

Otra característica presentada por estos anticuerpos (Drell y Dunbar, 1984), es que están dirigidos en contra de la parte peptídica y no en contra de la parte glicosídica de la glicoproteína, al igual que los AM probados en este trabajo, ya que cuando la ZP fue tratada con glicoperoxidasa, el anticuerpo siguió reaccionando, no siendo así cuando la ZP se trató con proteasas. Por último, estos autores indican que cuando los AM se agregaron a una suspensión de ovocitos y después se pusieron en contacto con espermatozoides, hubo una inhibición de la unión de ellos a los ovocitos.

Por otro lado, Isojima y colaboradores, en 1984, produjeron AM en contra de ZP porcina completa y probaron sus efectos inhibitorios

sobre la fertilización. Ellos produjeron una línea de híbridomas que secretaba IgG2a, y cuatro que secretaban IgM; por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta demostraron que los cinco anticuerpos son específicos para ovocitos. Además, la prueba de reacción cruzada con ovocitos de otras especies, tres de las inmunoglobulinas tipo IgM también cruzaron con ovocitos humanos, de hamster, rata y ratón, mientras que el otro sólo cruzó con ovocitos de hamster, en tanto que la IgG2a fue específica a la ZP porcina. En relación a la inhibición de la unión de los espermatozoides al ovocito de cerdo, por estos anticuerpos se observó que cuando se usó el antisuero convencional en contra de la ZP se inhibió por completo la unión, sin embargo, el efecto de los AM fue variado, por ejemplo aquel anticuerpo que fue especie-específico dio la inhibición más efectiva con un intervalo de uno a seis espermatozoides por ovocito, mientras que los espermatozoides que se unieron a los ovocitos sin ningún tipo de antisuero fue de uno a sesenta y cinco.

En cuanto al efecto de estos AM en la fertilización "in vitro", en ovocitos de hamster el antisuero convencional anti ZP porcina la bloqueó completamente, pero ninguno de los AM mostró alguna inhibición en la fertilización "in vitro". Todos estos resultados parecen mostrar la gran diversidad de efectos que pueden presentar AM aparentemente específicos en contra de un antígeno, (Isojima et al, 1984).

Así mismo, Bamezai y colaboradores en 1985 inmunizaron ratones BALB/c con ZP porcina y obtuvieron AM de 10 clonas celulares híbridas, dirigidos en contra de la ZP de cerdo; utilizaron LA ricos en

anticuerpos, los cuales fueron centrifugados a 1,000Xg durante cinco minutos, y fueron filtrados a través de una membrana Milipore de 45 μ m. Por medio de inmunofluorescencia indirecta observaron que todos los AM mostraron fluorescencia al ser expuestos a los ovocitos de cerdo; sin embargo, el patrón de fluorescencia no fue el mismo para todos pues hubo algunos que dieron reacción no homogénea en forma de manchas, otros en forma de anillo, y otros más en forma de anillo no bien definido. Esto sugiere que los determinantes antigénicos reconocidos por los AM tienen una distribución variable en la ZP.

Con el fin de determinar la acción de los AM en la unión de los espermatozoides a los ovocitos, ellos incubaron ovocitos de cerdo con los anticuerpos agregándoles una suspensión de espermatozoides, encontrándose que cinco de los seis AM probados no permitieron la unión de los espermatozoides a los ovocitos "in vitro". La posibilidad de que estos cinco anticuerpos pudieran ser réplicas de la misma clona fue descartada no sólo por la extensa subclonación, sino porque el isotipo de estos anticuerpos fue al menos de dos tipos: IgG1k e IgG2k.

En general estos trabajos indican que los AM producidos por la inmunización de animales con ZP solubilizada son: tejido-específicos, tienen reacción cruzada con ovocitos de otras especies de mamíferos, pueden prevenir la unión de los espermatozoides al ovocito, y algunos de ellos previenen la fertilización "in vivo".

Al comparar los resultados aquí obtenidos con los de los estudios antes mencionados, se observa que las diferencias más importantes son por un lado que el antígeno usado por nosotros fue altamente purificado

(glicoproteína 55K) mientras que los demás autores utilizan ZP solubilizada. Por otro lado, al hacer los estudios de inmunofluorescencia para determinar la presencia del AM en la ZP "in situ", la mayoría de los autores encuentran una distribución uniforme de la inmunofluorescencia; Bamezai y colaboradores (1985) encuentran una distribución diferente que fue en forma de manchas y anillos discontinuos. En cambio en este estudio como ya se indicó, hubo distribución uniforme y distribución periférica.

Drell y Dunbar encontraron que uno de sus AM compartía determinantes entre dos familias de glicoproteínas, y en el presente estudio los anticuerpos producidos fueron específicos para la familia 55K. También estos mismos autores, al igual que en nuestro estudio, obtuvieron un anticuerpo dirigido en contra de la parte peptídica de la glicoproteína.

Finalmente, en donde todos los estudios han coincidido, es en la especificidad tisular de los AM.

Con los resultados que se tienen hasta el momento tanto en el presente trabajo como en los artículos mencionados, los pasos a seguir serían determinar si estos AM impiden la unión de los espermatozoides probados "in vitro"; por otro lado, se deberá contestar la pregunta de que si los AM tienen el mismo efecto en ovocitos inmaduros obtenidos del ovario o de óvulos maduros obtenidos en el útero. Como siguiente paso deberá probarse si estos anticuerpos cruzan con otras especies de mamíferos y en los casos positivos inmunizar a hembras de esas especies para determinar si se produce infertilidad en ellas.

Por otro lado, se deben seguir produciendo AM en contra de otras glicoproteínas de la ZP para ver cuál de ellas tiene mayor efecto en los procesos antes mencionados. Todo lo anterior deberá encaminar a las investigaciones a tratar de producir un anticonceptivo de tipo inmunológico por un lado, y por otro tratar de determinar si la ZP tiene uno o varios sitios receptores específicos para los espermatozoides, lo cual indica que aún hacen falta estudios de investigación básica que nos permitan conocer con mayor detalle los diferentes eventos tanto a nivel molecular como celular de este proceso de la fertilización y su regulación.

REFERENCIAS.-

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D.
Molecular biology of the cell. Garland Pub. Inc. (New York): 789-790, 1983.
- Atkinson, L.E. Opportunities for immuncontraception: zona pellucida and sperm antigens. Family Health International. A view to the future in Immuncontraception. (Proc): 1-29, 1985.
- Austin, R.C. & Short, R.V. Células germinales y fertilización. La Prensa Médica Mexicana. (México): 15-48, 1982.
- Bamezai, A.K., Bhattacharya, A., Band, A.H., Suman & Talwar, G.P.
Diversity of antigenic determinants of porcine zona pellucida revealed by monoclonal antibodies. J. Biosci. 7: 105-113, 1985.
- Barbieri, F.D. Biochemical mechanisms of fertilization. En: Physiopathology of Hypophysial Disturbances and Diseases of Reproduction. (A. De Nicola & C. Blaquier, eds). Alan R. Liss. (New York): 235-250, 1982.
- Bellvé, A.R. & Moss, S.B. Monoclonal antibodies as probes of reproductive mechanisms. Biol. Reprod. 28: 1-26, 1983.
- Betancourt, M., Rodríguez, E., Serrano, H., Wardrip, N. & Hedrick, J.
Producción de anticuerpos monoclonales en contra de glicoproteínas de la zona pelúcida de cerdo. Bioquímica. 6: 1367-1368, 1984.
- Betancourt, M., Rodríguez, E., Serrano, H., Wardrip, N. & Hedrick, J.L.
El uso de anticuerpos monoclonales para estudiar las

- funciones de la zona pelúcida de óvulos de mamíferos. Salud Pública Méx. 27: 203-212, 1985.
- Burnet, M. The mechanism of immunity. Sci. Am. 204: 58-68, 1961.
- Chaffotte, A.F., Djavadi-Chaniane, L. & Goldberg, M.E. Does a monospecific hybridoma always secrete homogeneous immunoglobulins? Biochimie. 67: 75-82, 1985.
- David, G.S., Huang, R., Bartholomeu, R., Sevier, E.D., Adams, T.H. & Greene, H.E. The hybridoma. An immunochemical laser. Clin. Chem. 27: 1580-1585, 1981.
- Drell, D.W. & Dunbar, B.S. Monoclonal antibodies to rabbit and pig zonae pellucidae distinguish species-specific and shared antigenic determinants. Biol. Reprod. 30: 445-457, 1984.
- Dunbar, B.S. Morphological, biochemical and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida. En: Mechanism and control of animal fertilization. (J.F. Hartmann, ed). Academic Press. (New York): 139-175, 1983.
- Dunbar, B.S., Liu, C. & Sammons, D.W. Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zonae pellucidae by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell proteins. Biol. Reprod. 24: 1111-1124, 1981.
- Dunbar, B.S. & Raynor, B.D. Characterization of porcine zona pellucida antigens. Biol. Reprod. 22: 941-954, 1980.
- Dunbar, B.S., Wardrip, N.J. & Hedrick, J.L. Isolation, physicochemical

- properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*. 2: 356-365, 1980.
- East, I.J. & 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: 795-800, 1984.
- East, I.J., Mattison, D.R. & Dean, J. Monoclonal antibodies to the major protein of the murine zona pellucida: effects on fertilization and early development. *Develop. Biol.* 104: 49-56, 1984.
- Epel, D. El proceso de la fecundación. *Investigación y Ciencia*. 16: 62-73, 1978.
- Hartmann, J.F. Mammalian fertilization: gamete surface interactions "in vitro". En: Mechanism and control of animal fertilization. (J.F. Hartmann, ed). Academic Press. (New York): 325-364, 1983.
- Hasebe, H., Irahara, M., Kinoshita, T., Kamada, M., Kushiki, N., Naka, O. & Mori, T. Tissue specificity of porcine zona pellucida antigens in pigs, monkeys and humans. *J. Reprod. Immunol. Suppl.* 23a, 1983.
- Hood, L.E., Weissman, I.L. & Wood, W.B. Immunology. The Benjamin Cummings Pub. Co. (San Francisco), 1978.
- Isojima, S., Koyama, K., Hasegawa, A., Tsunoda, Y. & Hanada, A. Monoclonal antibodies to porcine zona pellucida

- antigens and their inhibitory effects on fertilization. *J. Reprod. Immunol.* 6: 77-87, 1984.
- Jerne, N.K. The immune system. *Sci. Am.* 229: 52-60, 1973.
- Kanada, M., Kinoshita, T., Naka, O., Mori, T., Mori, T. & Kano, K.
Analysis of antigenic cross-reactivity between human and porcine zona pellucida using monoclonal antibodies to porcine zona pellucida. *J. Reprod. Immunol. Suppl.* 24a, 1983.
- Kearny, J.F., Radbruch, A., Liesegang, B. & Rajewsky, K. A new mouse myeloma cell line that had lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548-1550, 1979.
- Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497, 1975.
- Lerner, R.A. & Dixon, F.J. The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228: 82-91, 1973.
- Lipinski, M. & Herzenberg, L. Les hybridomes et leurs applications. *La Recherche.* 12: 952-961, 1981.
- Loewenstein, J.E. & Cohen, A.I. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 12: 113-121, 1964.
- Milstein, C. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 245: 56-64, 1980.
- Mori, T., Nishimoto, T., Kohda, H., Takai, I., Nishimura, T. & Oikawa, T. A method for specific detection of autoantibodies

- to the zona pellucida in infertile women. *Fert. Steril.* 32: 67-72, 1979.
- Nishimoto, T., Mori, T., Yamada, I. & Nishimura, T. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fert. Steril.* 34: 552-556, 1980.
- Noda, Y., Kohda, H., Takai, I., Hayashi, S., Shimada, H., Mori, T. & Tojo, S. Characterization of glycoproteins isolated from porcine zonae pellucidae. *J. Reprod. Immunol.* 5: 161-172, 1983.
- Owby, C.L. & Shivers, C.A. Antigens of the hamster ovary and effects of anti-ovary serum on eggs. *Biol. Reprod.* 6: 310-318, 1972.
- Porter, R.R. La estructura de los anticuerpos. En: Immunología. Ed. Labor. (Barcelona): 33-41, 1983.
- Rodríguez, E. Obtención de anticuerpos monoclonales contra glicoproteínas de zona pelúcida de cerdo. Tesis de Maestría en Biología Experimental. U.A.M. México, 1984.
- Roitt, I.M. Essential immunology. Blackwell Sci. Pub. (Oxford): 245pp. 1980.
- Rojas, W.M. Immunología. Fondo Educativo Interamericano. (México): 534pp. 1985.
- Sacco, A.G. Inhibition of fertility in mice by passive immunization with antibodies to isolated zonae pellucidae. *J. Reprod. Fertil.* 56: 533-537, 1979.
- Sacco, A.G. Immunoc contraception: 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): 1-26, 1981.
- Sacco, A.G. & Moghissi, K.S. Anti-zona pellucida activity in human sera. Fert. Steril. 31: 503-506, 1979.
- Sacco, A.G. & Snivers, C.A. Immunologic inhibition of development. En: Methods in Mammalian Reproduction. (J.C. Daniel, ed). Academic Press. (New York): 203-228, 1978.
- Sacco, A.G., Yurewicz, E.C., Subramanian, M.G. & De Mayo, F.J. Zona pellucida composition: species cross reactivity and contraceptive potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA). Biol. Reprod. 25: 997-1008, 1981.
- Sathananthan, A.H., Trounson, A.O., Wood, C. & Leeton, J.F. Ultra-structural observations on the penetration of human sperm into the zona pellucida of the human egg "in vitro". J. Andrology. 3: 356-364, 1982.
- Serrano, H. Producción de anticuerpos monoclonales contra melatonina. Tesis Profesional, Fac. Ciencias, U.N.A.M. 65pp., 1984.
- Shahini, S.K., Padbidri, J.R. & Rao, S.S. Immunological studies with the reproductive organs, adrenals, and spleen of the female mouse. Int. J. Fert. 17: 161-165, 1972.
- Shigeta, M., Hasegawa, A., Kiyama, K. & Isojima, S. Analysis of common antigens between human and porcine zonae pellucidae using monoclonal antibodies. Amer. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 7: 49a, 1985.

- Shimizu, S., Tsuji, M. & Dean, J. "In vitro" biosynthesis of three sulfated glycoproteins of murine zonae pellucidae by oocytes grown in follicle culture. *J. Biol. Chem.* 258: 5858-5863, 1983.
- Shivers, C.A. & Dunbar, B.S. Autoantibodies to zona pellucida: a possible cause for infertility in women. *Science.* 197: 1082-1084, 1977.
- Wardrip, N.J. & Hedrick, J.L. Pig zona pellucida 25K and 65K glycoproteins are derived from hydrolysis and reduction of the 90K family. *J. Cell Biol.* 101: 1433a, 1985.
- Wick, G., Baudner, S. & Hersog, F. Immunofluorescence. Die Medizinische Verlagsgesellschaft (Marburg, R.F.A.): 120pp. 1978.
- Yanagimachi, R. Zona-free hamster eggs: their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 10: 187-232, 1984.
- Yelton, D.E., Thammana, P., Desaynard, C., Roberts, S.B., Kwan, S-P., Giusti, A., Zack, D.J., Pollock, R.R. & Scharff, M.D. Monoclonal antibodies: the production of tailor-made serological reagents. En: From gene to protein. Translation into biotechnology. (F. Ahmad, J. Schultz, E.E. Smith & W.J. Whelan, eds). Academic Press. (New York): 129-142, 1982.

Impresiones
arles al instante. s.a. de c.v.
REP. DE COLOMBIA No. 6, 1er. PISO
(CASI ESQ. CON BRASIL)
MEXICO 1, D. F.
526-04-72 529-11-19