

11281  
6



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Expresión y caracterización de proteínas de la zona  
pelúcida humana receptoras de esperma**

Tesis que presenta  
Cecilia Cariño Morales

para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

México, D.F.

Marzo, 2002



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría del Dr. Fernando Larrea, jefe del departamento, y con el apoyo del Programa de Investigación y Desarrollo en Anticoncepción (CONRAD), el National Institute of Health (NICHD/NIH número HD-07495), el Programa de apoyo a los estudios de posgrado de la UNAM (PAEP) número 102309, y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca por estudios de doctorado número 90727.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Indice

<b>Agradecimientos</b>	5
<b>Dedicatoria</b>	6
<b>Lista de abreviaturas utilizadas</b>	7
<b>Resumen</b>	8
<b>Introducción</b>	
I. Generalidades	10
II. Estructura molecular	10
III. Síntesis de la zona pelúcida	14
a. Desarrollo del folículo	14
b. Expresión de las proteínas de ZP durante el desarrollo folicular	14
IV. La ZP como receptora de espermatozoides	16
<b>Objetivos</b>	19
<b>Hipótesis</b>	20
<b>Material y método</b>	
I. Material	21
II. Construcción de los plásmidos	22
III. Cultivo celular	24
IV. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida	24
V. Transfección de Sf9	25
VI. Expresión de cDNAs de las proteínas humanas de ZP en la línea celular Sf9	25
VII. Caracterización del virus recombinante y producción de proteínas	26
VIII. Identificación de los carbohidratos presentes en las proteínas expresadas	27
IX. Selección de anticuerpos para las proteínas recombinantes humanas	28
X. Localización inmunohistoquímica de las proteínas de la ZP en tejidos ováricos	28

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

XI.	Capacitación de espermatozoides	29
XII.	Análisis de unión de las proteínas de ZP recombinantes a espermatozoides	
	a. Unión de espermatozoides a proteínas recombinantes de ZP en membranas de PVDF (espermoblot)	30
	b. Análisis inmunoenzimático (espermoELISA)	31
<b>Resultados</b>		
I.	Expresión de los cDNAs de las proteínas humanas ZP1, ZP2 y ZP3	32
II.	Caracterización del virus y producción de proteínas	33
III.	Identificación del contenido de carbohidratos en las proteínas expresadas	37
IV.	Selección de anticuerpos utilizando epitopos compartidos de proteínas de ZP	37
V.	Localización inmunohistoquímica de proteínas de ZP en tejidos ováricos	38
VI.	Análisis de unión de las proteínas de ZP recombinantes a espermatozoides	45
<b>Discusión</b>		
I.	Expresión y análisis de proteínas recombinantes	50
II.	Función receptora de las proteínas recombinantes	52
III.	Localización de antígenos de ZP en ovarios de mamíferos mediante anticuerpos seleccionados	54
<b>Conclusiones</b>		60
<b>Bibliografía</b>		61
<b>Artículos publicados</b>		67

# Agradecimientos

---

Al Dr. Fernando Larrea por su tutoría durante la realización de esta tesis y su apoyo a lo largo de mi carrera en su laboratorio.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.

A las Dras. Bonnie S. Dunbar, S.V. Mangala Prasad y Sheri M. Skinner del Departamento de Biología Celular del Baylor College of Medicine en Houston, Tx por su asesoría.

Al Departamento de Patología del Hospital General de México por el material biológico proporcionado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Dedicatoria

---

A mi familia, que en el tiempo que realicé esta tesis ha crecido de forma maravillosa.

A mis amigos de siempre y a los de reciente adquisición, por su amistad y apoyo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Lista de abreviaturas utilizadas

---

a.a.	aminoácidos
ASB	albúmina sérica bovina
BV	baculovirus
cDNA	DNA complementario
CHES	50mM ácido 2-[N-ciclohexilamino] etano-sulfónico
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
GFP	proteína verde fluorescente
FIV	fertilización <i>in vitro</i>
FSH	hormona folículo estimulante
MDI	multiplicidad de infección
mRNA	RNA mensajero
PVDF	polivinilfluoruro
pb	pares de bases
SDS	dodecil sulfato de sodio
Sf9	línea celular proveniente de ovarios de <i>Spodoptera frugiperda</i>
ufp	unidad formadora de placa
ZAP-1	zona pellúcida gene activating protein-1
ZP	zona pelúcida
ZP1, ZP2, ZP3	zona pelúcida 1, 2, 3

# Resumen

---

La zona pelúcida (ZP) es una cubierta de glicoproteínas que rodea al ovocito de los mamíferos. Está formada por tres familias de glicoproteínas llamadas ZP1, ZP2 y ZP3, diferentes en sus secuencias de a.a. y en sus propiedades inmunoquímicas y funcionales debido a múltiples modificaciones postraduccionales. Los genes para estas proteínas codifican para dominios estructurales y sitios de glicosilación similares. Estudios llevados a cabo en el ratón han permitido establecer a las proteínas de la ZP como receptores del espermatozoide; sin embargo, no en todos los modelos animales presentan las mismas características funcionales. Hasta hace poco, la experimentación en el campo de la interacción espermatozoide-ovocito humano había estado limitada por la obtención de material biológico. A este respecto, en varios laboratorios se ha iniciado la producción de las proteínas de la ZP humana *in vitro*, lo que ha permitido la exploración de su papel en procesos fisiológicos y clínicos, y se ha abierto la posibilidad de determinar el papel de cada una de las proteínas en relación con su función de reconocimiento y unión del espermatozoide.

Hasta ahora no se conocen las señales hormonales que desencadenan la expresión de los genes de ZP durante la ovogénesis. En el conejo se ha encontrado que la expresión de estas proteínas está de acuerdo con la etapa de desarrollo y cuando las concentraciones de FSH son más altas en la circulación. El sitio de síntesis de la ZP ha sido muy discutido. Algunos investigadores han identificado al ovocito del ratón como el único sitio de su síntesis, mientras que en especies como el conejo, cerdo, vaca, mono Rhesus y el ser humano, las células de la granulosa parecen ser el sitio de expresión de mRNA o proteínas. La clonación de los cDNAs que codifican para estas proteínas y el desarrollo de anticuerpos a componentes específicos de la ZP ha permitido el análisis de una proteína o de un transcrito bajo diferentes condiciones experimentales. En este trabajo de tesis se propone la expresión de material biológico en un sistema *in vitro* para ayudar al esclarecimiento del lugar de síntesis de estas proteínas en el folículo y de su función como receptoras del espermatozoide.

Para realizar este trabajo, se utilizaron las secuencias del cDNA que codifica a cada una de estas proteínas humanas y se expresaron en un sistema de células eucariontes utilizando el sistema de expresión por baculovirus. El tipo de oligosacáridos presentes en las proteínas recombinantes, éstas se analizaron por medio de lectinas específicas. Después se hicieron análisis de unión de estas proteínas con espermatozoides humanos, y se evaluó la unión por medio de la prueba ELISA, y se analizaron los resultados por medio de ANOVA. Por otro lado, se realizaron análisis de inmunohistoquímica en folículos de varias especies de mamíferos utilizando anticuerpos anti ZP de cerdo seleccionados para cada proteína recombinante humana.

El análisis de los productos de expresión de los cDNAs que codifican para ZP1, ZP2 y ZP3 en geles desnaturalizantes de poliacrilamida indicó la presencia de tres bandas con pesos moleculares aparentes de 60kD, 85kD y 55kD, respectivamente. El análisis del contenido de carbohidratos en los productos de expresión de las secuencias de ZP1, ZP2 y ZP3 utilizando lectinas como la concanavalina A, aglutinina de germen de trigo (WGA) y lectina de papa (STL) demostró la presencia de residuos de N-acetilglucosamina y manosa en cada una de ellas. Los análisis de unión a espermatozoides mostraron mayor afinidad por las proteínas ZP1 y ZP3. Estos resultados sugieren un papel de las glicoproteínas ZP1 y ZP3 de la ZP del ovocito humano en la unión primaria durante el proceso de fertilización. Los análisis de inmunohistoquímica de las diferentes especies utilizadas, incluidos los del ser humano, demostraron la presencia de las proteínas en diferentes tipos celulares, ya fueran ovocitos o células de la granulosa y demostraron su localización diferencial dependiendo del estado de desarrollo del folículo.

# Introducción

---

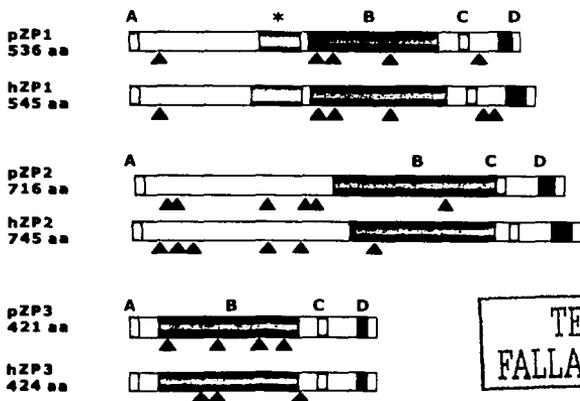
## I. Generalidades

El proceso de la fertilización en mamíferos involucra varios sucesos en los cuales la matriz extracelular del ovocito o zona pelúcida (ZP) tiene un papel fundamental. Su función más importante es la de permitir la interacción del espermatozoide y el ovocito, y cualquier alteración en este proceso conduce a la infertilidad. La ZP posee también diversas funciones. Después de que se realiza la fecundación, la ZP sirve de soporte mecánico para las células en división y dá protección al embrión hasta el momento de la implantación. Después del reconocimiento primario y la unión del espermatozoide, la ZP desencadena la reacción acrosomal o liberación del contenido enzimático del acrosoma del espermatozoide, lo que le permite al espermatozoide digerir las proteínas de la ZP para llegar a la membrana del ovocito. Cuando las membranas de los dos gametos se fusionan, se libera el contenido de los gránulos corticales que se encuentran dentro del ovocito. Estas enzimas modifican la estructura de los carbohidratos de las glicoproteínas de la ZP de tal manera que impiden la entrada de más espermatozoides lo cual evita la polispermia (Wassarman *et al.*, 1999; Yanagimachi, 1994; Yanagimachi y Bhattacharyya, 1988).

## II. Estructura molecular

En la mayoría de los mamíferos la zona pelúcida está compuesta por tres familias de glicoproteínas llamadas ZP1, ZP2 y ZP3. Las tres proteínas reunidas representan el 95% de la masa total de la ZP. Las secuencias de DNA de las proteínas de la se han clonado y caracterizado ZP en varias especies de mamíferos, y se ha observado que en la mayoría de estas especies se presentan las tres proteínas en la matriz extracelular del ovocito (Akatsuka *et al.*, 1998; Castle y Dean, 1996; Chamberlin y Dean, 1990; Dunbar *et al.*, 1981; Harris *et al.*, 1994; Hinsch *et al.*, 1994).

Estos tres componentes son glicosilados en forma heterogénea, lo que es el resultado de modificaciones postraduccionales; sin embargo, cada familia de glicoproteínas presenta un esqueleto polipeptídico con un 50 a 98% de homología en diferentes especies (Dunbar y Raynor, 1980; Epifano y Dean, 1994; Harris *et al.*, 1994; Prasad *et al.*, 1996b). Esta homología se refleja en los dominios estructurales de las tres proteínas en diferentes especies. Los dominios comunes a las tres familias son: a) un módulo ZP o dominio hidrofóbico de 260 aminoácidos y 8 residuos de cisteína que parecen determinar la conformación tridimensional de la cadena de aminoácidos (Bork, 1993), b) un dominio transmembranal hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal, y c) una señal de procesamiento proteolítico anterior al dominio transmembranal (Bork y Sander, 1992; McLeskey *et al.*, 1998). Además presentan sitios similares de glicosilación (fig. 1). Algunos estudios sugieren que las moléculas de carbohidratos en las proteínas de la ZP regulan en parte la interacción entre los gametos durante la fertilización (Bauskin et al, 1999) y también intervienen en la especificidad del reconocimiento entre gametos de la misma especie (Sinowatz *et al.*, 1998, Evans, 2000; Parillo *et al.*, 2000).

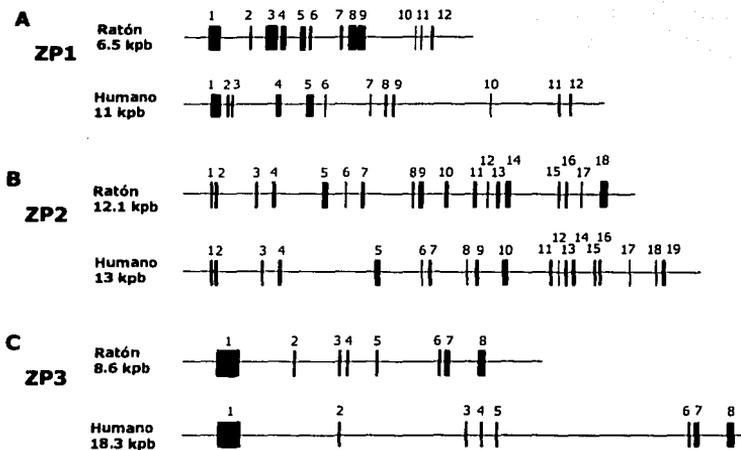


TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Figura 1.** Representación de los dominios estructurales de las proteínas de ZP humana (hZP) y de cerdo (pZP), y la longitud de su secuencia de aminoácidos. **A:** péptido señal; **B:** módulo ZP; **C:** sitio de corte proteolítico; **D:** probable dominio transmembranal; **\***: dominio de plegamiento; □: sitios de N-glicosilación. Tomado de Liang y cols 1990.

El modelo murino ha sido el más utilizado para estudiar las características estructurales y funcionales de la ZP (Bleil y Wassarman, 1983; Chen *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1994; Dean *et al.*, 1989b; Epifano *et al.*, 1995a; Hinsch *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1990; Rankin *et al.*, 1999; Rankin *et al.*, 1998; Rosiere y Wassarman, 1992; Wassarman y Mortillo, 1991). Estos estudios han identificado a la proteína ZP3 como el receptor primario del espermatozoide, además de ser la causa de la reacción acrosomal. En relación a la ZP2, a ésta se le identificó como el receptor secundario, y la ZP1 demostró tener funciones en la conservación de la estructura de la matriz extracelular, además de servir como enlace entre los filamentos formados por ZP2 y ZP3 (Green, 1997). Los conocimientos derivados de esos estudios han sido fundamentales para entender la interacción entre gametos; sin embargo, se ha demostrado que en otros mamíferos el mecanismo de reconocimiento entre el espermatozoide y el ovocito es dado por la proteína ZP1 (Bleil y Wassarman, 1983; Dean *et al.*, 1989a). Estas observaciones, indican que a pesar de que las proteínas de la ZP provienen de un gen ancestro común, no deben considerarse como homólogas en sus funciones específicas y por tanto requieren de un mayor análisis y caracterización individual.

La estructura de las tres familias de glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 humanas se determinó a partir de la zona pelúcida proveniente de ovocitos utilizados en fecundación *in vitro* (FIV). Los pesos moleculares de estas proteínas, obtenidos de acuerdo con su movilidad electroforética bajo condiciones no reductoras, son de 150, 100 y 55-65 kDa respectivamente (Moos *et al.*, 1995). El gen de ZP1 humana tiene 12 exones con un total de 1620 pb que codifican para un polipéptido de 540 aminoácidos (Harris *et al.*, 1994). La ZP1 presenta mayor grado de divergencia a través de la evolución que las otras proteínas, pero aun así, el gen para la proteína ZP1 humana sigue siendo homólogo a otras especies como el gato (72%), el cerdo (75.7%), y el conejo (76.6%). Sin embargo la secuencia del gen de ZP1 humana tiene una región adicional de 7 codones localizada en el extremo carboxilo terminal que la diferencian con otras especies (fig. 2).



**Figura 2.** Mapa de exones de los genes de ZP1, ZP2 y ZP3 de ratón y del ser humano. A) representación del mapa de exones de ZP1 de ratón y su homólogo humano. La longitud de los 12 exones de ratón y seres humanos son idénticos a excepción de los exones 3 y 12, que son mas grandes en ratón. Los dos genes miden 6.5 y 11 kpb respectivamente. B) genes de ZP2 de ratón (18 exones) y humano (19 exones) mide 12.1 y 13 kpb respectivamente. C) genes de ZP3 de ratón (8,5 kpb) y humano (18.3 kpb) que contienen 8 exones, pero el tamaño de sus intrones varía considerablemente. Tomado de Dean, 1991.

El gen para ZP2 humana se encuentra compuesto de 19 exones (uno más que en el ratón) y mide 13 kpb. El tamaño de la proteína codificada es de 745 a.a. Su secuencia es homóloga en diferentes grados a otros mamíferos, desde 68.4% (ratón) hasta 73% (conejo) (Liang y Dean, 1993a). La ZP2 humana contiene una secuencia líder que no se encuentra en otras especies de mamíferos. Al comparar las secuencias genómicas de ZP1 y ZP2 se observan algunas regiones de homología. Estas secuencias homólogas correspondientes a los exones 6, 7 y 8 en ZP1 y los exones 12, 13 y 14 en ZP2 (Lee *et al.*, 1993; Yurewicz *et al.*, 1993a), sugieren que ambas proteínas provienen de un gen ancestro común.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Por último, la secuencia de DNA para ZP3 humana comprende ocho exones. Este gen mide aproximadamente 18.3 kpb, y el tamaño de sus exones se encuentra muy conservado entre las diferentes especies. Existen cuatro secuencias cortas (8-15 pb) dentro de las primeras 250 pb de la región 5' en el gen, que probablemente modulan la expresión de la proteína. También existen regiones 5' y 3' que enmarcan una secuencia codificante para un polipéptido de 424 aminoácidos.

### **III. Síntesis de la zona pelúcida**

#### **a) Desarrollo del folículo**

La interacción entre las células somáticas y las germinales que constituyen al folículo comienza en etapas tempranas del desarrollo fetal que, por otra parte, representa el momento en que aparece la ZP. Al momento de nacer la corteza ovárica de los mamíferos presenta numerosos folículos primarios, cada uno de los cuales contiene un ovocito circundado por una monocapa de células (pregranulosa) rodeadas de una lámina basal y de las que depende el desarrollo folicular. En esta etapa, la ZP se acumula entre la membrana del ovocito y las células foliculares internas. Cuando el ovocito tiene un tamaño adecuado para la ovulación y las células del estroma se acumulan alrededor de la lámina basal se puede observar dentro de ésta, la capa externa de las células de la granulosa y las células de la teca. En esta etapa de desarrollo folicular, el ovocito es una célula localizada en el centro de los folículos preantrales, o en la periferia de los folículos de mayor tamaño. En los folículos preantrales se encuentra un material denso y homogéneo en manchas que corresponde a la ZP en desarrollo, que al fusionarse forma una capa continua alrededor de ellos. Cuando se libera el ovocito del ovario se encuentra rodeado de células de la corona y por la ZP constituyendo así el *microfolículo*. En este momento se inicia la maduración de la ZP, y la reiniciación de la meiosis en el ovocito.

#### **b) Expresión de las proteínas de ZP durante el desarrollo folicular**

La formación de la ZP es un fenómeno complejo que involucra al ovocito y a las células del cumulus. Dado que la formación de la ZP sucede durante etapas específicas del desarrollo folicular durante la ovogénesis, es posible inferir la presencia de factores

de regulación de este proceso. En el conejo la síntesis de estas proteínas parece ser una señal de iniciación para la diferenciación en las células de la granulosa (Lee y Dunbar, 1993; Lee *et al.*, 1993; Maresh *et al.*, 1990). En el ratón la expresión de los genes que codifican para ZP2 y ZP3 desencadena el crecimiento y diferenciación del ovocito. Durante las dos primeras semanas de la ovogénesis anterior a la ovulación, la expresión de mRNA de ZP2 y ZP3 es mayor, a diferencia de la que ocurre posterior a la ovulación cuando los valores de mRNA bajan hasta un 5% (Liang *et al.*, 1990).

Hasta ahora no se conocen las señales hormonales que desencadenan la expresión de los genes de ZP durante la ovogénesis, aunque en conejo se ha demostrado que sucede cuando se encuentran concentraciones circulantes altas de FSH (Maresh *et al.*, 1990). Respecto a las señales de inicio de la transcripción de estas proteínas, se ha estudiado un factor de transcripción llamado ZAP-1 (zona pellucida gene activating protein-1) que controla la expresión específica de estas proteínas en ovocitos de ratón. La actividad de unión a DNA de este factor aparece en ovocitos de embriones de ratón a los 19 días de desarrollo, y su expresión alcanza su máximo nivel a los 10 días después del nacimiento. En ovarios de otras especies como la rata, la zarigüeya y el ser humano se ha encontrado una proteína con actividad similar a la de ZAP-1, lo que sugiere su conservación entre los mamíferos (Millar *et al.*, 1993).

Por otra parte se ha discutido mucho acerca del sitio de síntesis de la ZP. La clonación de los cDNAs que codifican para estas proteínas y el desarrollo de anticuerpos a componentes específicos de la ZP han permitido más investigación en este campo. Sin embargo, aún no se sabe si las proteínas de la ZP se sintetizan en ambos tipos celulares, ovocitos y células de la granulosa. Por medio de inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales a ZP2 murina y policlonales a un péptido de ZP3 murina, se ha identificado en ratón, al ovocito como el único sitio de síntesis de las proteínas de ZP en ratón (Epifano *et al.*, 1995a; Millar *et al.*, 1989; Wassarman y Kinloch, 1992), pero en otras especies como el conejo, el cerdo, la vaca, el mono rhesus y el ser humano se ha demostrado que las células de la granulosa tienen expresión de mRNA y presencia de proteínas en forma tal que la síntesis de proteínas parece ser dependiente del estado de desarrollo del folículo (Grootenhuis *et al.*, 1996;

Kölle *et al.*, 1998; Kölle *et al.*, 1996; Maresh *et al.*, 1990). Dentro de estos estudios se encuentra el de Lee y Dunbar (1993) en el cual por medio de inmunohistoquímica y Northern blot de proteínas provenientes de cultivo de células de la granulosa de conejo informan de la presencia de la proteína ZP1 y de su transcrito en estas células. Por último, en estudios en bovino se demostró que la ZP3 es sintetizada por el ovocito de folículos primarios, y por el ovocito o las células foliculares de los folículos secundarios y terciarios (Kölle *et al.*, 1998). Estos datos indican que la síntesis de la ZP parece ser diferente según la especie de la que se trate, al igual que la estructura de los carbohidratos y la cantidad de glicosilación, lo que da lugar al reconocimiento específico entre especies.

#### **IV. La ZP como receptora de espermatozoides**

Una de las más importantes funciones de las glicoproteínas de la ZP es la de actuar como moléculas receptoras para los espermatozoides. Varios estudios en el ratón concluyeron que la unión entre gametos está determinada por una cadena de oligosacáridos en treonina presentes en ZP3 (Florman y Wassarman, 1985; Wassarman y Litscher, 1995). Sin embargo en otras especies los oligosacáridos unidos en asparagina y en treonina también participan en el proceso de reconocimiento entre gametos (Yonezawa *et al.*, 1995; Yurewicz *et al.*, 1993b; Yurewicz *et al.*, 1991). Dentro de las moléculas de carbohidratos descritas como receptoras de espermatozoides en el modelo del ratón, sobresale la *N-acetilgalactosamina (GlcNAc)*, que se encuentra unida a residuos de treonina en la ZP3 y es sustrato para la enzima espermática  $\beta$ -1,4-galactosiltransferasa de la membrana del acrosoma (Gong *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1992), con lo cual desencadena la exocitosis acrosomal. Su transformación por las enzimas acrosómicas provoca la pérdida de la capacidad de esta proteína de unir espermatozoides y por tanto, establece el bloqueo a la polispermia (Bleil y Wassarman, 1988; Florman y Wassarman, 1985).

En el caso del cerdo y el conejo los oligosacáridos unidos a la asparagina de la familia de la ZP1 son los que tienen función receptora. Esta proteína porcina se une a la membrana del espermatozoide por medio de los oligosacáridos unidos en N localizados

en la región N-terminal de la glicoproteína (Nakano *et al.*, 1996; Yonezawa *et al.*, 1995). En este caso la ZP3 tiene un papel potenciador de la unión del espermatozoide a ZP1, ya que la combinación de las dos proteínas ocasiona mayor capacidad de unión de la ZP1. En otro estudio, Prasad y cols (1996b), utilizando proteínas recombinantes de ZP1 del conejo demostraron su capacidad de unión a la membrana del espermatozoide sin desencadenar la reacción acrosomal.

Debido a la importancia que tiene el estudio de las proteínas de la ZP humana para conocer el proceso de la fecundación, diversos grupos se han dedicado a la caracterización de estas proteínas obtenidas bajo condiciones nativas, utilizando diferentes sistemas de expresión. En estos estudios se ha demostrado la importancia que tienen los residuos de carbohidratos en la función receptora y de activación funcional del espermatozoide. A este respecto, la ZP3 humana expresada en células de ovario de hamster chino (células CHO), y a pesar de tener un peso molecular menor al de la ZP3 humana nativa, es capaz de inducir la reacción acrosomal y de iniciar la fusión de espermatozoides humanos a ovocitos de hamster libres de ZP (Miranda *et al.*, 2000; van Duin *et al.*, 1994). De manera interesante, la ineficacia de ZP3 expresada en sistemas bacterianos para desencadenar la reacción acrosomal sugiere la importante participación de los carbohidratos en la función de esta proteína.

A pesar de la similitud estructural que existe entre las proteínas de ZP, las observaciones realizadas en una especie en particular no pueden extrapolarse a otras, especialmente para el caso del ser humano en donde la información existente es todavía preliminar. Estos pocos casos se deben fundamentalmente a la dificultad de obtener suficiente material de inicio para la purificación y caracterización de la ZP y de sus constituyentes. Esto ha dificultado el conocimiento adecuado de las propiedades y significad biológico de la ZP humana, así como de sus mecanismos de regulación y de sus sitios de síntesis. En la actualidad, y gracias al avance en áreas como la biología molecular aplicada a la biomedicina, es posible obtener productos de expresión génica similares a los producidos en condiciones *in vivo*. Una de las mayores líneas de investigación en este campo es la de utilizar la ZP como antígeno para el desarrollo de

un método anticonceptivo Inmunológico. Sin embargo debido a que existen grandes diferencias en la antigenicidad de las glicoproteínas en las diversas especies, es importante estudiar más profundamente el efecto fisiológico de la respuesta inmunitaria en el desarrollo del ovario. Por otro lado, la identificación de la proteína responsable de la unión de gametos en el ser humano permitirá el estudio de factores hasta ahora desconocidos que interfieren en esta unión durante el proceso de la fecundación. El objetivo del presente proyecto establece la posibilidad de obtener productos de ZP humana con características estructurales y funcionales similares a los producidos *in vivo*, y por otra parte, utilizar estas proteínas para la selección de anticuerpos que permitan la identificación de su sitio de síntesis y la distribución en folículos de mamíferos, incluido al ser humano.

# Objetivos

---

## Objetivo general

El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas de la zona pelúcida del ovocito humano responsable del reconocimiento y unión primaria al espermatozoide, además de determinar la localización tisular de las proteínas de ZP en folículos de varias especies de mamíferos.

## Objetivos específicos

1. Obtención de las proteínas recombinantes de la zona pelúcida humana en el sistema de expresión por baculovirus en células de insecto.
2. Caracterización estructural e inmunológica de los productos de expresión.
3. Identificación por medio de análisis de unión, de la proteína de ZP humana con propiedades de receptor espermático.
4. Localización inmunohistoquímica de las proteínas de la zona pelúcida en el folículo de diferentes mamíferos.

# Hipótesis

---

De acuerdo con nuestros antecedentes, las hipótesis planteadas son:

- El proceso de reconocimiento y unión de los gametos humanos en el proceso de fertilización se realiza por medio de proteínas específicas de la ZP.
- Las proteínas de la ZP se sintetizan en el ovocito y las células de la granulosa del folículo de los mamíferos de acuerdo con la etapa de desarrollo folicular.

# Material y método

---

La estrategia experimental realizada para cumplir con los objetivos planteados fue la expresión de los cDNAs que codifican para las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 humanas utilizando un sistema de baculovirus (BV). Los productos de expresión se caracterizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, y se detectaron con anticuerpos policlonales anti ZP porcina, que muestran reactividad cruzada con ZP humana. La identificación del receptor espermático se realizó por análisis de unión, utilizando preparaciones de las proteínas recombinantes y anticuerpos anti espermatozoide humano. La localización tisular de las proteínas se hizo por inmunohistoquímica en cortes de tejido ovárico de varios mamíferos con anticuerpos anti ZP porcina seleccionados contra epitopos específicos de las proteínas recombinantes.

## Material

El cDNA para la ZP1 humana fue donado por la Dra. Bonnie Dunbar del Depto. de Biología Celular y Molecular del Baylor College of Medicine, Houston, Tx, al igual que el anticuerpo dirigido contra ZP porcina y contra espermatozoides humanos. Los cDNAs para ZP2 y ZP3 fueron donados por el Dr. Jurrien Dean del National Institute of Health de los Estados Unidos de América. La línea celular de insecto Sf9 fue donada por la Dra. Mary Estes del Depto. de Virología Molecular del Baylor College of Medicine, Houston, Tx. Los vectores Biogreen y pAChLT, el estuche de transfección BaculoGold™, el medio TNM-FH con suero fetal de bovino al 10% y la agarosa Agarplaque Plus se obtuvieron de los laboratorios Pharmingen (San Diego, Ca). Las enzimas de restricción *EcoRI*, *XhoI*, *SacI*, y *KpnI* se obtuvieron de New England Labs. Los anticuerpos específicos para la GFP se obtuvieron de Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto, Ca). El rojo neutro, antibiótico-antimicótico 10X, EDTA, glicerol, glutaraldehído, tris base, piruvato de sodio, hidrocloreuro de guanidina, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y ditioneitol (DTT) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo). El dodecil sulfato de sodio (SDS), glicina, TEMED, 2 $\beta$ -mercaptoetanol, persulfato de amonio, tween 20, acrilamida,

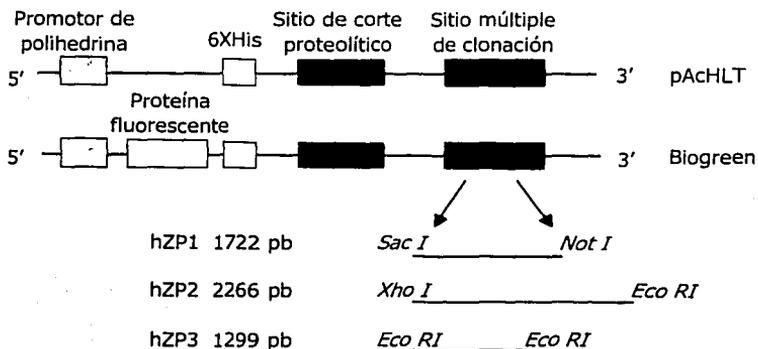
bis N,N'-metilen-bis-acrilamida, azul de bromofenol, ácido 2-[N-ciclohexilamino] etano-sulfónico (CHES), azul de Coomasie y tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina se obtuvieron de los laboratorios BioRad. Los fosfatos básico y monobásico de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, potasio y magnesio, metanol, ácido acético glacial, formalina y glicerol se obtuvieron de J.T. Baker S.A. (México). La proteína A marcada con I<sup>125</sup> y los estándares de peso molecular de DNA se obtuvieron de Amersham Int (Inglaterra). La membrana de polivinildifluorido (PVDF) se obtuvo de NEN Life Sciences (Boston, Ma). Las placas X-Omat se obtuvieron de Kodak Co. (México). Las lectinas concanavalina A, lectina de papa o *Solanum tuberosum* (STL), aglutinina de germen de trigo (WGA) y aglutinina de cacahuete (PNA) y los sistema de biotina-avidina y de peroxidasa se obtuvieron de Vector Laboratories (Burlingame, Ca). El medio de separación y el gradiente de sílice (ISolate), de capacitación BWW (Modified Sperm Washing Medium), congelación (Test Yolk Buffer) se obtuvieron de Irvine Scientific (Santa Ana, Ca). Los ovarios de ratón, de cerdo y de babuino se obtuvieron del bioterio de la universidad de Baylor, los ovarios humanos fueron obtenidos postmortem en el Departamento de Patología del Hospital General de México. Las muestras de semen se obtuvieron del Grupo de Andrología del Methodist Hospital, Houston, Tx.

### **Construcción de los plásmidos**

El cDNA de ZP1 humana que se utilizó, consiste en un fragmento de 1722 pb cuya secuencia corresponde a la publicada por Harris *et al* en 1994. El cDNA para ZP2 (número de acceso de GenBank M90366) de 2266 pb, fue clonado dentro del plásmido Bluescript KS en los sitios *EcoRI-XhoI* (Liang y Dean, 1993a). El cDNA correspondiente a ZP3 (número de acceso de GenBank M35109) consiste en un fragmento de 1299 pb clonado en los sitios *EcoRI* de Bluescript (KS) (Chamberlin y Dean, 1990). La orientación correcta de cada inserto se evaluó por medio de secuenciación o por análisis de los fragmentos de restricción en gel de agarosa. El fragmento de ZP1 se insertó primero en el vector Biogreen en los sitios de restricción *SacI-KpnI*, para monitorear la viabilidad celular y la eficiencia de transfección del sistema celular de Sf9. Este vector

presenta una secuencia adicional que codifica para la expresión de una proteína verde fluorescente (GFP). La presencia de la proteína de fusión con las secuencias aminoacídicas de la GFP y ZP1 se determinó por observación de las células en un microscopio de fluorescencia y por análisis de Western blot del lisado celular utilizando anticuerpos específicos para la GFP (dilución 1:100).

Posteriormente los cDNAs para las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 se insertaron en los vectores de expresión pAChLT de acuerdo a su marco de lectura: ZP1 y ZP3 se clonaron en el vector pAChLT C utilizando los sitios de restricción *SacI-NotI* 1722 pb, y de *EcoRI* 1299 pb respectivamente, y el fragmento de *Xho-EcoRI* 2266 pb para ZP2 fue clonado en el vector pAChLT B (fig. 3). Los vectores con los cDNAs fueron cotransfectados con el virus linearizado tipo silvestre de *Autographa californica* (AcNPV) dentro de las células SF9 utilizando el estuche de transfección BaculoGold™ de acuerdo a las especificaciones dadas por el fabricante.



**Figura 3.** Vectores de expresión pAChLT y Biogreen donde se insertaron los fragmentos de cDNA de las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 de acuerdo con sus sitios de restricción.

## **Cultivo celular**

La expresión de proteínas se realizó en la línea celular de insecto Sf9. Esta línea celular proviene del ovario del estado larvario de la mariposa *Spodoptera frugiperda*. Estas células fueron propagadas en medio TNM-FH con suero fetal de bovino al 10%. Los procedimientos para el cultivo de células, infección viral y el aislamiento de virus recombinantes se realizaron de acuerdo con los descritos por Summers y Smith (1987) y Prasad y cols (1995). Las células se cultivaron en monocapa en cajas de cultivo o en suspensión en frascos bioreactores de 100 a 250 ml. La división del cultivo en monocapa se realizó cada 7 días (o cuando el cultivo llegara a saturación) en 15 ml de volumen total de medio. Al cultivo en bioreactor se le renovó el medio cada 4 días (o cuando la densidad celular alcanzara  $2-3 \times 10^8$ ). Se utilizó el antibiótico-antimicótico para prevenir la contaminación de los cultivos. La expresión de las proteínas recombinantes de ZP humana se determinó por medio de análisis de Western blot.

## **Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida**

La expresión de proteínas se determinó por medio de su separación a partir del lisado celular en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Las células se cosecharon y se resuspendieron en solución de depósito de SDS (CHES pH 9.5, SDS 2%, glicerol 10%). Las muestras se depositaron en geles al 10%, a razón de aproximadamente 50 a 70  $\mu\text{g}$  de proteína por cada carril, y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. Después la membrana fue bloqueada en solución amortiguadora de tris, pH 7.5 con leche descremada al 5%. La identificación de las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 se hizo mediante la incubación de la membrana con anticuerpo anti ZP porcina en una dilución final de 1:500 en la misma solución amortiguadora de tris. Para el análisis de las proteínas recombinantes se utilizaron anticuerpos policlonales producidos contra las proteínas homólogas recombinantes (ZP1) y nativas (ZP3) de conejo. La unión no específica del anticuerpo a las proteínas de membrana fue evaluada utilizando el lisado celular de Sf9 sin transfectar. La identificación del complejo antígeno anticuerpo se realizó por incubación de la membrana con Proteína A marcada con  $I^{125}$  (Dunbar y Bundman, 1987; Timmons y Dunbar, 1990). Las membranas fueron sujetas a

autorradiografía. Se incluyeron estándares de peso molecular conocido para la estimación de la movilidad electroforética de los productos de expresión.

### **Transfección de Sf9**

Los baculovirus recombinantes se obtuvieron por recombinación homóloga mediante la cotransfección en células Sf9 del DNA viral BaculoGold y del vector de transferencia viral pAChLT o Biogreen que contiene los cDNAs para cada proteína de ZP utilizando el estuche de transfección BaculoGold™ de acuerdo a las especificaciones dadas por el fabricante. El método se basa en la precipitación del DNA con cloruro de calcio el cual de esta forma puede ser fácilmente endocitado por las células. Brevemente, se mezclaron 0.5 µg del DNA viral y 2 µg del vector pAChLT conteniendo las secuencias de DNA para cada proteína de ZP humana. Esta mezcla se agregó a  $2 \times 10^6$  células en cajas de cultivo celular de 60 mm. Posteriormente se agregó gota a gota la solución de transfección (HEPES 25 mM pH 7.1, cloruro de calcio 125 mM, cloruro de sodio 140 mM). Las cajas se incubaron durante cuatro horas a 27°C y se retiró el medio de transfección cambiándolo por medio TNM-FH. Al término de cuatro días de incubación se recogió el sobrenadante con el cual se realizaron análisis de placa. Como experimento testigo negativo se realizó una transfección con el virus linearizado y el vector pAChLT sin inserto en las mismas condiciones de la transfección experimental.

### **Expresión de cDNAs de las proteínas humanas de ZP en la línea celular Sf9**

Se infectaron cultivos de células en monocapa con el medio de transfección con los baculovirus recombinantes para realizar **análisis de placa** a diferentes diluciones del virus. Esto se realizó en cajas de cultivo celular de 6 pozos con un total de  $1.5-2.0 \times 10^6$  células por pozo. Las células infectadas se cubrieron con una capa de agarosa Agarplaque Plus al 1%, y se incubaron seis días a 27° C hasta que las placas se desarrollaron. La identificación de las placas de lisis positivas se realizó por tinción con rojo neutro en donde las células infectadas y lisadas no se tiñen y son circundadas por aquellas no infectadas que absorben el colorante y hacen que la placa pueda identificarse a simple vista. Por medio de estos ensayos se realizó la identificación de

las placas recombinantes positivas de la cotransfección del DNA viral y del vector de expresión. Las placas de lisis se seleccionaron y obtuvieron por medio de la punta de una micropipeta y se colocaron en medio de cultivo TNM-FH a 4°C en tubos de microcentrífuga de 1.0 ml para eluir las partículas virales. Con los medios que contienen los virus recombinantes obtenidos de las placas, se realizó un análisis para obtener el primer medio infectante con los virus recombinantes (pasaje-1). Esto se realizó en cajas de cultivo de 25 ml con  $3 \times 10^6$  células, que fueron infectadas con los virus del análisis de placa. Las cajas se incubaron por cuatro días, al término de los cuales se recolectó el medio de infección. Con estos medios de infección del pasaje-1 se realizó una **expresión de proteínas** en  $6 \times 10^5$  células por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos. Posterior a la infección con el virus, se cambió el medio por medio fresco y las cajas se incubaron durante 72 horas a 27°C. Al término de este periodo, las células se cosecharon y se resuspendieron en solución de depósito de SDS para analizarse por Western blot.

### **Caracterización del virus recombinante y producción de proteínas**

Una vez identificadas las placas positivas para la expresión de las proteínas de ZP se amplificó la concentración del virus en el medio infectando  $3 \times 10^6$  células con 500  $\mu$ l del pasaje-1 en frascos de cultivo de 25 ml. Con el medio de infección resultante se determinó el título del virus. El cálculo de la concentración de virus se realizó en un ensayo de placa como ya se describió anteriormente, donde se infectaron las células con diluciones decrecientes del medio con el virus. Una vez obtenidas las placas de lisis, se contaron y se obtuvo la **titulación del virus** de acuerdo al número de células sembradas y de placas formadas. El número resultante es el de unidades formadoras de placas o ufp.

Para optimar la producción de proteínas, se calculó el número necesario de ufp en un cultivo celular o **multiplicidad de infección** (MDI). Para una producción óptima de proteínas la MDI de 3 a 10 es suficiente y debe probarse a diferentes valores para encontrar el nivel máximo de infección y expresión de proteínas. Para realizar este ensayo se siembran  $6 \times 10^6$  células por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos. Cada

pozo se infecta con una concentración de MDI diferente, en un límite de 1 a 10 ufp por pozo, y se completa a 500  $\mu$ l. El volumen necesario de virus para la infección fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{ml requeridos para infección} = \frac{\text{MDI (ufp/cel)} \times \text{num. de cel}}{\text{título del virus/ml}}$$

Una vez establecida la MDI óptima para los cultivos se obtuvo una **curva de tiempo** para determinar el periodo de tiempo al cual se obtiene la mayor expresión de proteínas. Este análisis se realizó en cajas de 24 pozos, donde se sembraron  $6 \times 10^5$  células, y se infectaron con la MDI óptima en un volumen de 200  $\mu$ l. Las células se incubaron en las condiciones de cultivo ya indicadas, y se tomó una muestra de células de cada pozo a diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas.

Se obtuvieron las células de los pozos de cada ensayo (MDI y tiempo) para posteriormente analizar las mejores condiciones de ensayo por medio de Western blot. Establecidas las condiciones óptimas de tiempo y título de virus para la infección, ésta se realizó con aproximadamente  $10^8$  células en cultivos en suspensión y se incubaron cuatro días. Las células se cosecharon por centrifugación a 1,000 x g durante 15 minutos, se lavaron y resuspendieron en solución amortiguadora TBS (Tris 10 mM [pH 7.5], NaCl 130 mM). La lisis celular se realizó por medio de tres ciclos de congelación-descongelación. El homogenizado celular se centrifugó a 12,000 rpm durante 40 minutos, y se analizaron las dos fracciones, soluble e insoluble, para determinar la presencia de las proteínas.

### **Identificación de los carbohidratos presentes en las proteínas expresadas**

La presencia de oligosacáridos en las proteínas recombinantes se estableció mediante la incubación de las proteínas, previamente inmovilizadas en membranas de PVDF, en presencia de diferentes lectinas como ya se describió anteriormente (Prasad *et al.*, 1995). Se utilizó el lisado celular de las Sf9 sin transfectar como el control de

unión no específica. Estas membranas se incubaron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con una concentración de lectinas de 50 µg/ml, y la identificación del complejo lectina-proteína se realizó por medio de una reacción de peroxidasa. Las lectinas utilizadas fueron: concanavalina A, lectina de papa o *Solanum tuberosum* (STL), aglutinina de germen de trigo (WGA) y aglutinina de cacahuate (PNA).

### **Selección de anticuerpos para las proteínas recombinantes humanas**

La fracción insoluble de los lisados celulares de los cultivos infectados con los virus de ZP1, ZP2 y ZP3, además de un cultivo testigo de células sin infectar, se separaron en geles preparativos de poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis los productos separados se transfirieron a membranas de PVDF. Estas membranas se bloquearon con una solución de leche descremada al 5% en TBS y se incubaron por tres horas con el antisuero anti ZP total de cerdo a una dilución de 1:50 (v/v) a 4°C. Al final de la incubación la membrana se lavó exhaustivamente en TBS, y se cortaron los trozos de membrana en donde se localizó la proteína por comparación de pesos moleculares con el estándar. El anticuerpo unido a las proteínas recombinantes se eluyó mediante la incubación de los trozos de membrana con 50 a 300 µl de solución de elución de glicina (glicina 200 mM; NaCl 130 mM, pH 2.7) por cinco minutos con agitación, y esta solución se neutralizó agregando la mitad del volumen de una solución de tris 200 mM. La reactividad cruzada del anticuerpo eluido se determinó por medio de Western blot con las proteínas recombinantes.

### **Localización inmunohistoquímica de las proteínas de la ZP en tejidos ováricos**

Se realizaron análisis de inmunohistoquímica en folículos de ratón, rata, conejo, cerdo, babuino y ser humano utilizando el antisuero policlonal anti ZP total porcina; y los anticuerpos seleccionados por epitopos contra cada una de las proteínas recombinantes de ZP se utilizaron en los ovarios de ratón, cerdo, babuino y ser humano de 14 años. Los ovarios humanos se obtuvieron postmortem en el Depto. de Patología del Hospital General de México. Los ovarios de todas las especies se fijaron en solución de Bouin (750 ml de ácido pícrico acuoso saturado, 250 ml de formol 40%, 50 ml de

ácido acético glacial) o Formalina (100 ml de formol 40%, 6,5 gr de fosfato de sodio dibásico anhidro, 4 gr de fosfato de sodio monobásico monohidratado, 900 ml de agua destilada). Después se embebieron en parafina y se procesaron como ya se ha descrito (Prasad *et al.*, 1996b). Las secciones de ovario de 5  $\mu\text{m}$  se desparafinaron y bloquearon con leche descremada 5% en TBS por dos horas. Después se incubaron con los anticuerpos seleccionados en dilución 1:1 con albúmina sérica bovina (ASB) al 10% durante 12 horas a 4° C. Como control positivo se utilizó el antisuero anti ZP porcina en una dilución de 1:1000 con ASB al 10%. Como control negativo se utilizaron los anticuerpos seleccionados contra las proteínas Sf9 y suero preimmune en la misma dilución. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se incubaron por una hora con el anticuerpo secundario marcado con biotina (dil. 1:200). El complejo se reveló usando el sistema de biotina-avidina y tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina como cromóforo.

### **Capacitación de espermatozoides**

Las características de las muestras de semen de sujetos adultos sanos se encontraron dentro de los siguientes indicadores: densidad celular: 80-250 millones/ml; volumen: 2.5-5.0 ml; movilidad: >60% de células con movimiento lineal lento o circular y progresivo rápido (se descartaron las muestras con mayor porcentaje de células inmóviles o con movimiento *in situ*); morfología: >60% de células con morfología normal y anomalías en cabeza (se descartaron las muestras con mayor porcentaje de células con anomalías en el segmento intermedio y en el flagelo). El eyaculado se almacenó a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta obtener su licuefacción. La separación de los espermatozoides del plasma seminal se realizó por un gradiente de partículas de sílice de 20 a 80% y centrifugación a 750 xg durante 30 minutos. El botón celular con los espermatozoides móviles se resuspendió en medio de capacitación, compuesto por un volumen de medio de lavado de espermatozoides (medio HTF [human tubal fluid] modificado [HEPES] con 5 mg/ml de albúmina sérica bovina) y un volumen de solución con yema de huevo inactivada (Test Yolk Buffer). Los espermatozoides se refrigeraron en esta solución durante 12 horas a 4°C. Las células

en el precipitado formado durante la refrigeración se resuspendió en medio de lavado (BWW) a 37°C complementado con 5% de albúmina sérica humana y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se centrifugaron y resuspendieron en el mismo medio y se incubaron a 37°C durante 60 min. (Gamzu *et al.*, 1994; Bielfeld *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1984; Lanzendorf *et al.*, 1992). Se determinó el número de espermatozoides móviles y se usaron sólo las muestras con los estándares de normalidad mencionados.

### **Análisis de unión de las proteínas de ZP recombinantes a espermatozoides**

Se desarrollaron dos sistemas para determinar la unión de espermatozoides a las proteínas recombinantes de ZP en la fracción soluble y la insoluble del homogenizado de las células Sf9 transfectadas. Estos métodos fueron:

*a) unión de espermatozoides a proteínas recombinantes de hZP en membranas de PVDF (espermoblot):* las proteínas recombinantes se separaron en geles de poliacrilamida como ya se describió, y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas fueron renaturalizadas utilizando un gradiente decreciente de hidrocloreto de guanidina en la siguiente manera: las membranas se incubaron por 10 minutos en 100 ml de la solución desnaturalizante (tris 10mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, hidrocloreto de guanidina 6M, glicerol 5%, pH 7.9). Al término de la incubación se eliminaron 50 ml de esa solución y se agregaron 50 ml de solución renaturalizante (tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, KCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, glicerol 5%, pH 7.9). Este cambio se repitió seis veces, manteniendo las membranas en agitación en cada cambio de solución. Se lavaron exhaustivamente en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y después en medio BWW para equilibrarlas. Luego de estos lavados, las membranas se incubaron durante 30 minutos a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de  $1 \times 10^6$  espermatozoides humanos capacitados/ml de medio BWW. Al finalizar esta incubación las membranas se lavaron suavemente en PBS, y los espermatozoides unidos a las proteínas se fijaron a ellas con solución fijadora (glutaraldehído al 8% en PBS). Después de 60 minutos de incubación en esta solución, la membrana se incubó en leche para bloquear los sitios de unión inespecífica al espermatozoide. El complejo se detectó con un suero policlonal anti espermatozoide

humano. El complejo ZP-espermatozoide-anticuerpo se identificó con proteína A marcada con  $I^{125}$  en autorradiografías en placas de X-Omat. Como testigo se utilizó la incubación de las proteínas inmovilizadas en membranas de PVDF en ausencia de anticuerpos anti espermatozoide. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias de acuerdo con la densidad relativa de cada una de las bandas observadas con el densitómetro *Eagle Eye II Still Video* de Stratagene (EUA).

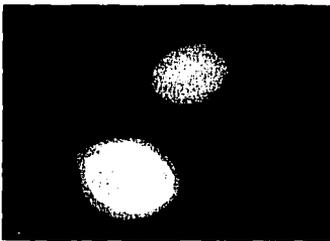
*b) análisis inmunoenzimático (espermo ELISA):* para los análisis de unión por ELISA se utilizaron aproximadamente 50-100  $\mu\text{g}$  de las proteínas recombinantes (en el sobrenadante o fracción soluble de la lisis celular) en 100  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1 M, pH 9.6). Con esta solución se sensibilizaron los pozos de las placas de ELISA por cuatuplicado. La unión homogénea de las proteínas a los pozos se comprobó por incubación de las mismas con anticuerpo anti ZP de cerdo. Los pozos fueron incubados durante 30 minutos en un incubador a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  con espermatozoides humanos capacitados a razón de 100,000 células por pozo en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de medio BWW. Posterior al periodo de incubación se lavó suavemente cada pozo con 200  $\mu\text{l}$  de PBS, y los espermatozoides unidos a la proteína se fijaron con 100  $\mu\text{l}$  de formaldehído 8% en PBS. La identificación de los espermatozoides unidos a las proteínas de la ZP se llevó a cabo por la adición de 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti espermatozoide en una dilución 1:200, incubándolos a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 horas. Este complejo fue incubado en presencia de 100  $\mu\text{l}$  de anti IgG de conejo acoplado con peroxidasa en una dilución 1:1000. La intensidad de la reacción de peroxidasa se evaluó en un lector de ELISA a 450 nm. Se utilizaron incubaciones en ausencia del primer anticuerpo como controles. Se analizaron las densidades ópticas (DO) promedio obtenidas de dos análisis con los valores de las muestras por cuatuplicado por medio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y con la prueba de Fisher para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

# Resultados

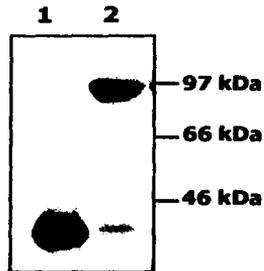
## Expresión de los cDNAs de las proteínas humanas ZP1, ZP2 y ZP3

Como control de transfección y de la viabilidad de este sistema, se transfectaron las células Sf9 con 2  $\mu$ g del vector Biogreen el cual contiene una secuencia codificante para una proteína fluorescente (GFP) con 0.1  $\mu$ g del vector Baculogold. Las transfecciones de este vector con el inserto de ZP1 humana y sin él se realizaron simultáneamente utilizando 2.0  $\mu$ g del vector. El resultado de la expresión de la proteína control o GFP fue un producto con peso molecular de 25 kDa. En la transfección paralela realizada con el vector con el inserto, se expresó una proteína de fusión con la secuencia de la proteína ZP1 y la secuencia de la proteína GFP. El peso molecular de esta proteína fue de 85 kDa, el cual correspondió al peso molecular esperado. La presencia de las proteínas se determinó por medio de Western blot usando un anticuerpo específico para la proteína GFP en una dilución 1:100 (fig. 4).

**A**



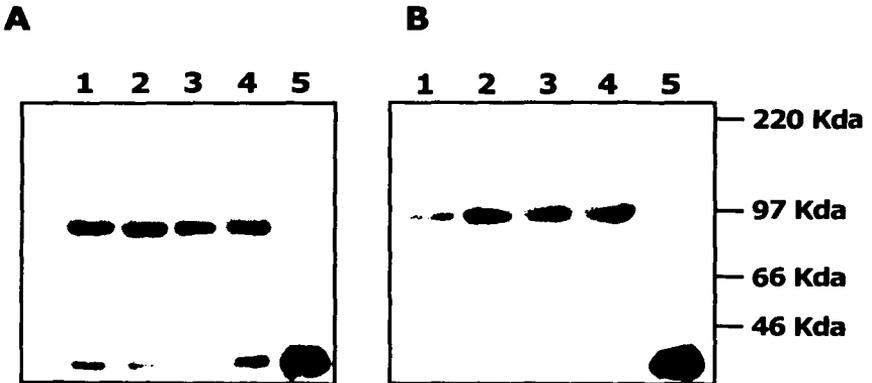
**B**



**Figura 4. A** Células Sf9 transfectadas con el vector Biogreen. Se observa la proteína fluorescente (GFP) en la superficie celular. **B** Western blot del lisado de las células que expresaron la GFP. El anticuerpo utilizado es un monoclonal específico para la secuencia de la GFP. Carril 1: lisado de células Sf9 transfectadas con el vector Biogreen; carril 2: lisado de células Sf9 transfectadas con el vector que contiene la secuencia de la ZP1 humana.

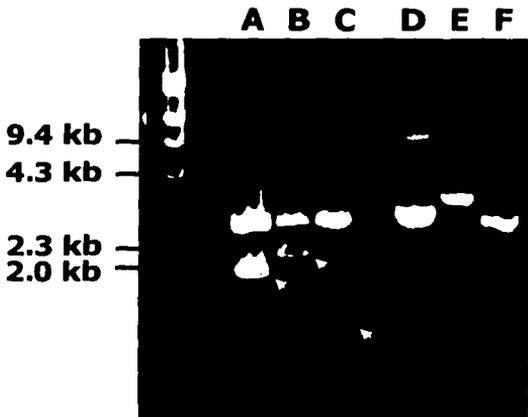
### Caracterización del virus y producción de proteínas

Para establecer las condiciones óptimas de infección celular con los virus se analizaron la multiplicidad de infección (MDI) y la curva de tiempo de infección utilizando el vector con la secuencia de ZP1 humana. Los resultados obtenidos revelaron la concentración necesaria de virus y el tiempo de incubación posterior a la infección al cual se obtuvo mayor producción de proteína en el cultivo celular. Estos resultados se muestran en la figura 5 donde se observa que la MDI óptima fue de 3 a 5 ufp/ml y el periodo óptimo de infección fue de 3 a 4 días.



**Figura 5. A** Western blot que muestra los resultados del análisis para determinar la multiplicidad de infección (MDI) del virus Biogreen con la secuencia de la ZP1 humana. Carril 1, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector que contiene la secuencia de hZP1 en una MDI de 1 ufp; carril 2, MDI de 2.5 ufp; carril 3, MDI de 5 ufp; carril 4, MDI de 10 ufp; carril 5, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector Biogreen sin el inserto de ZP1 humana. **B** Análisis de Western blot mostrando los resultados del análisis de la curva de tiempo de infección. Carril 1, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector conteniendo la secuencia de la ZP1 humana con un tiempo de incubación de 24 hrs; carril 2, tiempo de incubación de 48 hrs; carril 3, tiempo de incubación de 72 hrs; carril 4, tiempo de incubación de 96 hrs; carril 5, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector Biogreen sin el inserto de ZP1 humana. La proteína de fusión con ZP1 y la GFP se localizaron con un anticuerpo específico para GFP en una dilución 1:100, y el complejo fue detectado con proteína A marcada con I<sup>125</sup>.

Una vez establecidas las condiciones de infección para el vector Biogreen con la secuencia de la proteína ZP1, se hizo la clonación de los cDNAs codificantes para las tres proteínas de la ZP humana en el vector pACHLT. El cDNA de 1722 pb correspondiente a la ZP1 humana se introdujo en el vector de expresión pACHLT A utilizando los sitios de restricción *SacI-NotI*. En la clonación de ZP2 se utilizó la secuencia completa de 2266 pb, insertándolo en el vector pACHLT B en los sitios de restricción *XhoI-EcoRI*. La secuencia completa para ZP3 de 1299 pb se insertó en el vector pACHLT A en los sitios de restricción de *EcoRI* (fig. 6).



**Figura 6.** Análisis en gel de agarosa 1% de los fragmentos de cDNA correspondientes a las tres proteínas de la ZP humana. Carril A, cDNA de ZP1 obtenido con *SacI-NotI* a partir del vector pBS, resultando en un fragmento de 1722 pb; carril B, cDNA de ZP2 obtenido con *XhoI-EcoRI* a partir del vector pBS, resultando en un fragmento de 2266 pb; carril C, cDNA de ZP3 obtenido con *EcoRI* a partir del vector pBS, resultando un fragmento de 1299 pb; carril D, vector pBS con el cDNA de ZP1; carril E, vector pBS con el cDNA de ZP2; carril F, vector pBS con el cDNA de ZP3. Las flechas indican los fragmentos de cada cDNA de las proteínas de ZP humana. A la izquierda se indican los estándares de peso molecular de acuerdo al fago  $\lambda$ , digerido con la enzima de restricción *Hind* III.

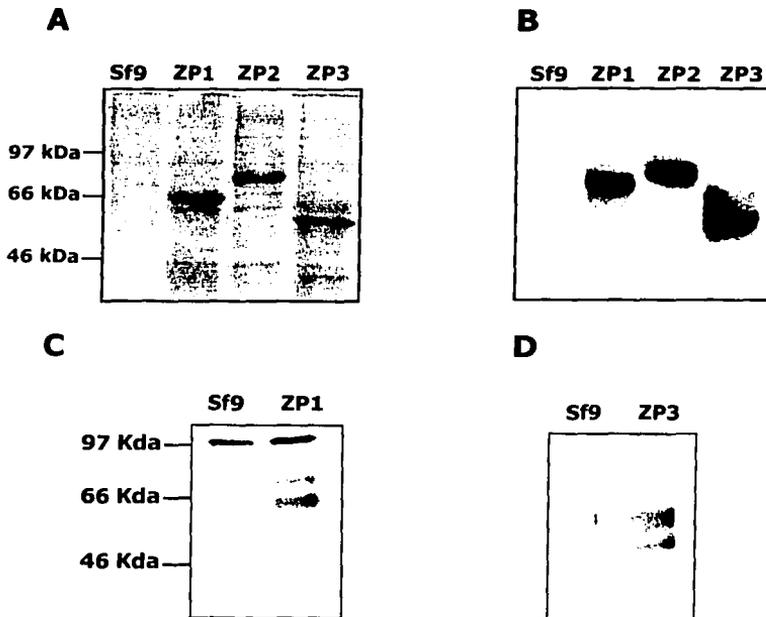
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El medio de infección se analizó para determinar el título de los virus con cada uno de los fragmentos codificantes para las proteínas de la ZP humana. Las determinaciones se realizaron por medio de análisis de placa utilizando para la infección de las células, concentraciones decrecientes del virus en cada pozo. Después de los días de incubación necesarios para desarrollar las placas de lisis, se contó el número de éstas en cada pozo por cada dilución de virus empleada. Con estos números se determinaron las concentraciones de virus por ml. Los resultados de la titulación de los virus de cada una de las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 fueron los siguientes:  $316 \times 10^{10}$  ufp/ml,  $130 \times 10^9$  ufp/ml y  $160 \times 10^{11}$  ufp/ml respectivamente. Las concentraciones de virus que se utilizaron para las infecciones celulares posteriores fueron de  $200 \times 10^{10}$  ufp/ml en cultivos de 100 ml con  $1 \times 10^8$  células/ml.

La expresión de proteínas de la ZP humana a partir de los cDNAs, dio por resultado tres productos correspondientes a ZP1, ZP2 y ZP3 humanas, de los cuales, ninguno fue secretado por las células al medio de cultivo. Después de la lisis de las células por ciclos de congelación y descongelación, se analizó la fracción en la cual se encontraban las proteínas por medio de geles desnaturalizantes de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie. En la fracción insoluble de la lisis celular se observó la presencia de bandas intensamente teñidas, con pesos moleculares semejantes a los esperados para cada una de las proteínas. En el análisis de la fracción soluble de la lisis celular se observó una intensidad menor de estas bandas, con lo que se demostró que el mayor porcentaje de proteínas se encontraba en forma insoluble. Estas bandas no se observaron en el producto de la lisis de células Sf9 sin transfectar. Esto indica que son bandas que corresponden al producto de expresión de los vectores con el inserto de los genes de ZP humana. Los productos de expresión se caracterizaron en Western blot utilizando un antisuero policlonal anti ZP total de cerdo. Con este antisuero se identificó a ZP1 como un polipéptido de 65 kDa, a ZP2 con un tamaño de 75kDa, mientras que ZP3 se identificó como un producto de 55kDa. Los pesos moleculares de estos productos de expresión corresponden a los esperados para cada una de las proteínas glicosiladas humanas que son de aproximadamente 150 kDa, 100 kDa y 55-65 kDa para

ZP1, ZP2 y ZP3 respectivamente (Moos *et al.*, 1995). Las proteínas ZP1 y ZP3 también fueron reconocidas por anticuerpos específicos contra sus homólogas en conejo.

En la figura 7 se observan los resultados de los análisis por geles de poliacrilamida teñidos con Azul de Coomasie y los análisis de Western blot utilizando los diferentes antisueros ya mencionados.



**Figura 7.** Análisis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida de las proteínas humanas recombinantes. **A** gel teñido con azul de Coomasie en el que se muestran las proteínas de la fracción insoluble del extracto celular de Sf9 sin transfectar y las proteínas del extracto celular del cultivo transfectado con los vectores con las secuencias para ZP1, ZP2 y ZP3 humanas. **B** Western blot de las proteínas detectadas con un antisuero anti ZP total de cerdo. **C** Western blot de la ZP1 humana detectada con un antisuero anti ZP1 recombinante de conejo. **D** Western blot de la ZP3 humana detectada con un antisuero anti ZP3 nativa de conejo. Se muestran las proteínas de la fracción celular del cultivo de Sf9, y las proteínas del extracto celular de ZP1, 2 y 3 humanas. En todos los casos, el complejo antígeno-anticuerpo fue detectado con proteína A marcada con  $I^{125}$ . Los pesos moleculares se muestran a la izquierda de las fotografías.

## Identificación del contenido de carbohidratos en las proteínas expresadas

Para estos análisis las membranas de PVDF con las proteínas separadas en geles de poliacrilamida se incubaron con lectinas específicas para residuos de N-acetilglucosamina y de manosa, además de lectinas que reconocen N-acetilgalactosamina. Los resultados de estos análisis se muestran en el cuadro 1.

Lectina	Reconocimiento de carbohidratos	ZP1	ZP2	ZP3
Concanavalina A	N-acetilglucosamina manosa	+	na	+
<i>Solanum tuberosum</i> (STL)	N-acetilglucosamina ácido siálico	+	+	+
Germen de trigo (WGA)	N-acetilglucosamina	+	-	+
Aglutinina de cacahuete (PNA)	N-acetilgalactosamina	-	-	-

**Cuadro 1.** Resultados de los análisis de unión a lectinas de las proteínas recombinantes de ZP humana expresadas en la línea celular Sf9. Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de oligosacáridos del tipo unidos a asparagina con residuos N-acetilglucosamina, manosa y N-acetilgalactosamina. na=no analizado

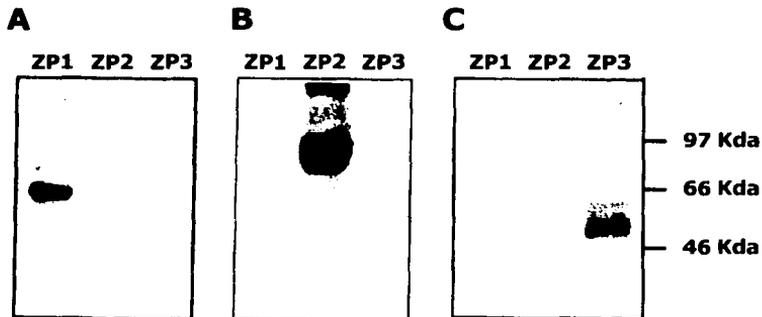
En el caso de las lectinas concanavalina A, lectina de *Solanum tuberosum* (STL) y aglutinina de germen de trigo (WGA), se observó que hubo reconocimiento en las proteínas ZP1 y ZP3, lo que indica la presencia de oligosacáridos del tipo unidos a asparagina con residuos N-acetilglucosamina y manosa. Por otra parte, no hubo reconocimiento de carbohidratos utilizando aglutinina de cacahuete (PNA) lo cual indicó la ausencia de residuos de N-acetilgalactosamina en estas proteínas.

## Selección de anticuerpos utilizando epitopos compartidos de proteínas de ZP

Las proteínas recombinantes de ZP se utilizaron para seleccionar diferentes poblaciones de anticuerpos por medio de epitopos compartidos a partir de suero anti ZP total de cerdo. La especificidad de los anticuerpos eluidos se determinó por Western blot utilizando las tres proteínas recombinantes expresadas en la línea celular de Sf9. En

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

estos análisis se observó que cada uno de los anticuerpos seleccionados con las proteínas recombinantes reconoce a cada proteína específicamente, con excepción de los anticuerpos seleccionados utilizando ZP2, ya que reconocieron, aunque en menor proporción, a la ZP1 (fig. 8). Los anticuerpos seleccionados para las tres proteínas de ZP no reconocieron a las proteínas de las células Sf9 (datos no mostrados). Este análisis demostró que los anticuerpos son selectivos para los epitopos de cada proteína, lo que permitió utilizarlos en los estudios de inmunohistoquímica en el folículo ovárico para localizarlas específicamente.

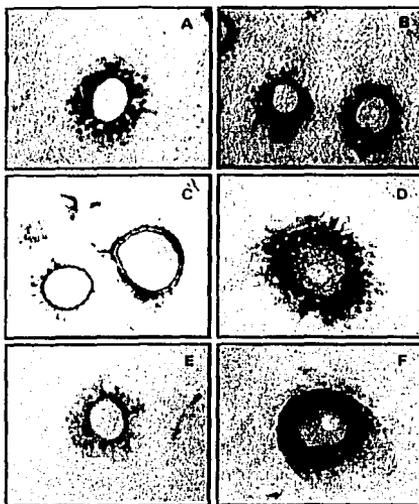


**Figura 8.** Western blot donde se demuestra la selectividad de anticuerpos para las proteínas recombinantes de ZP humana. **A** análisis con anticuerpos seleccionados para ZP1, **B** análisis con anticuerpos seleccionados para ZP2, **C** análisis con anticuerpos seleccionados para ZP3. Carril 1, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector con la secuencia de ZP1; carril 2, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector con la secuencia de ZP2; carril 3, lisado de células Sf9 transfectadas con el vector con la secuencia de ZP3.

### Localización inmunohistoquímica de proteínas de ZP en tejidos ováricos

Utilizando el antisuero policlonal anti ZP porcina se realizaron análisis de inmunohistoquímica en los cuales se demostró su utilidad para detectar antígenos de ZP en todas las especies analizadas, y demostró que los anticuerpos del antisuero anti ZP porcina reconocen antígenos compartidos en varias especies (fig. 9). En estos estudios

por inmunohistoquímica se detectaron los antígenos tanto en el ovocito como en las células de la granulosa de los folículos ováricos. De estas especies, es importante mencionar el reconocimiento de las proteínas en el ovario humano, lo cual permite utilizar el antisuero anti ZP de cerdo para localizar las proteínas recombinantes humanas, y valida la utilización de los anticuerpos en la identificación de los productos de expresión en Sf9.

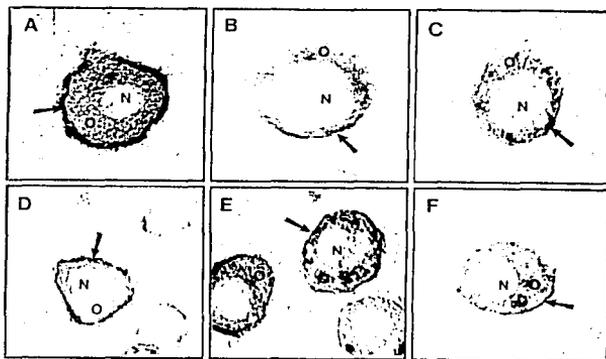


TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 9.** Análisis de inmunohistoquímica utilizando un antisuero policlonal anti ZP de cerdo. **A** folículo de ratón; **B** folículo de rata; **C** folículo de conejo; **D** folículo de cerdo; **E** folículo de babuino; **F** folículo humano.

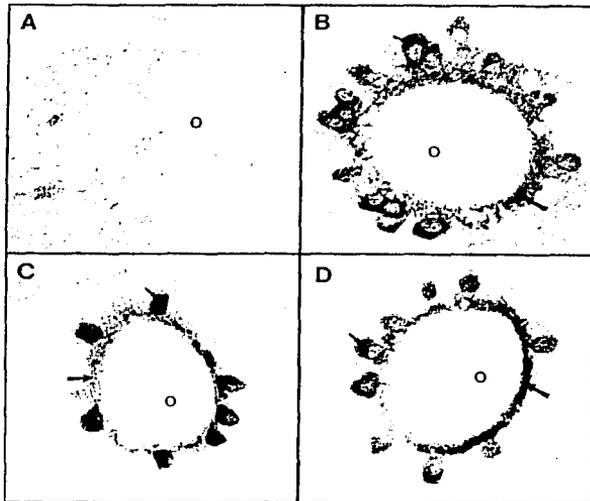
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Posteriormente con la finalidad de localizar los antígenos de cada una de las proteínas recombinantes en folículos ováricos de diferentes especies de mamíferos (ratón, cerdo, babuino y ser humano) se realizó la inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos seleccionados. El tipo de tinción de los anticuerpos en las diferentes células demostró un patrón de desarrollo celular específico de acuerdo a la especie estudiada. En la figura 10 se muestra la localización de antígenos de ZP1, ZP2 y ZP3 en ovocitos de folículos primarios y tempranos en ratón (A-C) y cerdo (D-F). En el caso de los folículos del ratón se observó presencia de proteínas de ZP1, ZP2 y ZP3 dentro de los ovocitos de estadios tempranos, y en manchas de ZP alrededor de ellos. En el caso del cerdo, también se localizaron las tres proteínas dentro del ovocito y en ZP.



**Figura 10.** Análisis de inmunohistoquímica en el que se utilizaron anticuerpos seleccionados por epítopos y se demostró la localización de los antígenos de ZP en ovocitos de folículos primarios. **A** sección de ovario de ratón con anticuerpos anti ZP1; **B** sección de ovario de ratón con anticuerpos anti ZP2; **C** sección de ovario de ratón con anticuerpos anti ZP3; **D** sección de ovario de cerdo con anticuerpos anti ZP1; **E**: sección de ovario de cerdo con anticuerpos anti ZP2; **F** sección de ovario de cerdo con anticuerpos anti ZP3. Las secciones de tejido se incubaron con anticuerpo secundario marcado con biotina (1:200), y la señal fue revelada utilizando el sistema de avidina-biotina y DAB como el cromóforo. Las flechas indican ZP; O= ovocito; N= núcleo.

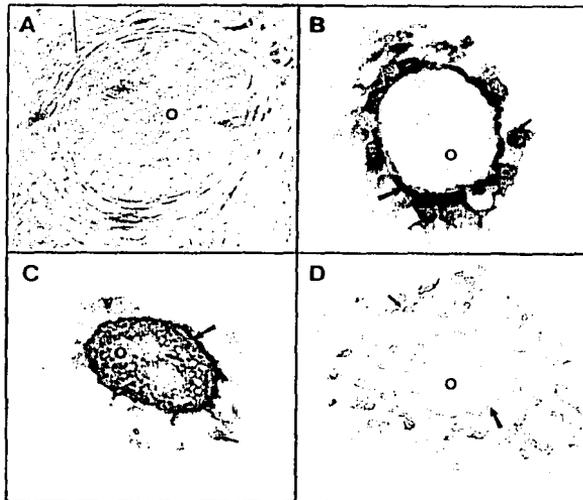
En todas las especies estudiadas, los anticuerpos seleccionados reconocieron antígenos de las proteínas en ZP y en células de la granulosa solo de folículos desarrollados (secundarios y antrales). Sin embargo no se encontraron proteínas en los ovocitos de estos mismos folículos. En el caso del ratón se observó presencia de proteínas de ZP1, ZP2 y ZP3 sólo en ovocitos de folículos de estadios tempranos, y a partir de folículos en estados mas desarrollados las proteínas se localizaron en células de la granulosa y ZP pero no en ovocitos (fig. 11). En ninguno de los cortes de folículo de las diferentes especies se observó señal utilizando los anticuerpos seleccionados contra las proteínas de Sf9 como control (cuadro A de figuras 11 a 14).



**Figura 11.** Análisis de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos seleccionados por epitopos, que demuestra la localización de los antígenos de ZP en el ovocito de ratón. Las secciones de ovario se incubaron con **A**, anticuerpo seleccionado para proteínas de Sf9 como testigo negativo; **B**, anticuerpo seleccionado para proteínas hZP1; **C**, anticuerpo seleccionado para proteínas de hZP2; **D**, anticuerpo seleccionado para proteínas de hZP3, seguido del anticuerpo secundario marcado con biotina (1:200). La señal se reveló utilizando el sistema de avidina-biotina y DAB como el cromóforo. Las flechas grandes indican ZP; las flechas pequeñas indican células de la granulosa; O= ovocito.

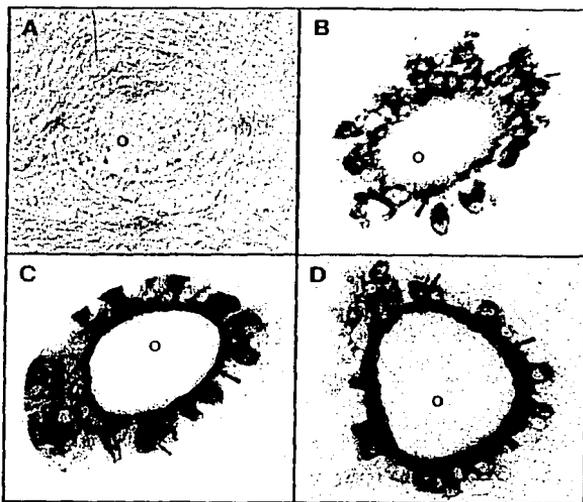
# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En el caso de los folículos de cerdo y utilizando los anticuerpos seleccionados, se localizaron antígenos de ZP1, ZP2 y ZP3 en ovocitos de folículos primarios y tempranos (fig.10). Sin embargo, en folículos desarrollados solamente la proteína ZP2 fue localizada dentro de los ovocitos. Las proteínas ZP1 y ZP3 se localizaron en células de la granulosa. En el caso de la proteína ZP3, se localizó en forma extensa en las células de la granulosa de capas más externas del folículo, a diferencia de la localización de ZP1 y ZP2, que fue únicamente en células de las capas interiores del folículo (fig.12).



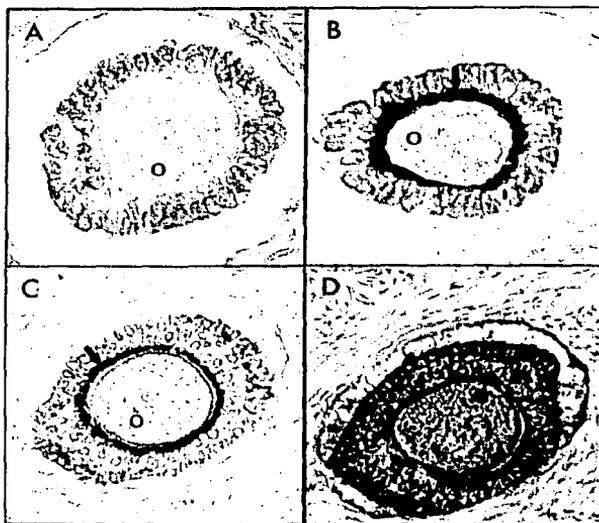
**Figura 12.** Análisis de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos seleccionados por epitopos, en que se demuestra la localización de los antígenos de ZP en el ovocito de cerdo. Las secciones de ovario fueron incubadas con: **A** anticuerpo seleccionado para proteínas de Sf9 como testigo negativo; **B** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP1; **C** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP2; **D** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP3, seguido del anticuerpo secundario marcado con biotina (1:200). La señal fue revelada mediante el sistema de avidina-biotina y DAB como el cromóforo. Las flechas grandes indican ZP; las flechas pequeñas indican células de la granulosa; O= ovocito.

En el babuino (fig. 13), sólo ZP2 fue localizada en la ZP de algunos de los folículos primordiales, mientras que en los folículos desarrollados se localizaron las tres proteínas en la ZP y en las células de la granulosa. La tinción en las células de la granulosa fue observada únicamente en las capas interiores del folículo, adyacentes al ovocito. En ningún caso se observó tinción en los ovocitos independientemente de la etapa de desarrollo en la cual se encontrara el folículo.



**Figura 13.** Análisis de inmunohistoquímica con anticuerpos seleccionados por epitopos, en que se demuestra la localización de los antígenos de ZP en el ovocito de babuino. Las secciones de ovario fueron incubadas con: **A** anticuerpo seleccionado para proteínas de SF9 como testigo negativo; **B** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP1; **C** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP2; **D** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP3, seguido del anticuerpo secundario marcado con biotina (1:200). La señal fue revelada mediante el sistema de avidina-biotina y DAB como el cromóforo. Las flechas grandes indican ZP; las flechas pequeñas indican células de la granulosa; O= ovocito.

Finalmente, en el caso de los folículos humanos (fig. 14), se localizaron antígenos para las tres proteínas en la ZP de folículos en desarrollo, a diferencia de los folículos primordiales o primarios. En esta especie, se detectó ZP3 dentro de los ovocitos de folículos primarios, primordiales y desarrollados. También se detectó esta proteína en la ZP y células de la granulosa de folículos desarrollados. Las proteínas ZP1 y ZP2 sólo fueron localizadas en la ZP y en las células de la granulosa de los folículos desarrollados. Las tres proteínas fueron detectadas tanto en las capas interiores como exteriores de células de la granulosa.



**Figura 14.** Análisis de inmunohistoquímica con anticuerpos seleccionados por epítopos que demuestra la localización de los antígenos de ZP en el ovocito de humano. Las secciones de ovario fueron incubadas con: **A** anticuerpo seleccionado para proteínas de Sf9 como testigo negativo; **B** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP1; **C** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP2; **D** anticuerpo seleccionado para la proteína ZP3, seguido del anticuerpo secundario marcado con biotina (1:200). La señal fue revelada utilizando el sistema de avidina-biotina y DAB como el cromóforo. Las flechas grandes indican ZP; las flechas pequeñas indican células de la granulosa; O= ovocito.

En el cuadro 2 se muestran, a manera de resumen, los resultados obtenidos en la localización de antígenos de ZP en los folículos de las especies estudiadas. En todas estas especies se observó reconocimiento de la ZP por parte de los anticuerpos de forma independiente al estado de desarrollo.

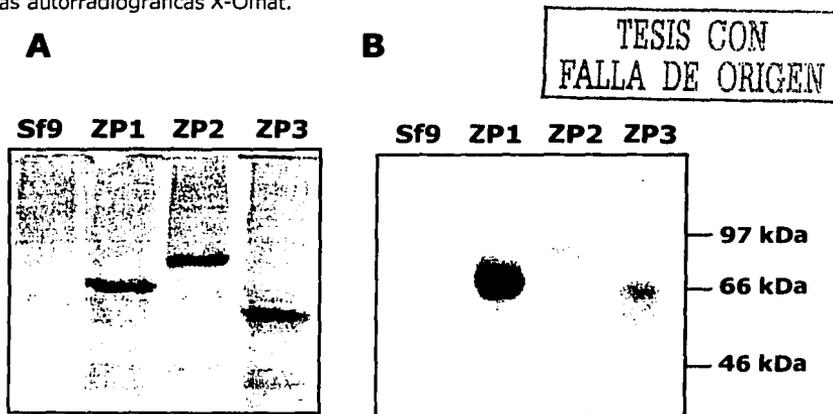
Especie	Folículos tempranos <sup>1</sup>			Folículos desarrollados <sup>2</sup>					
	Ovocito			Ovocito			Células de la Granulosa		
	ZP1	ZP2	ZP3	ZP1	ZP2	ZP3	ZP1	ZP2	ZP3
Ratón	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Cerdo	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Babuino	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Humano	+	-	+	-	+	+	-	+	+

**Cuadro 2.** Comparación de la localización de antígenos de las proteínas de ZP en folículos en diferentes estadios del desarrollo de varias especies. La localización se realizó mediante anticuerpos seleccionados por epitopos para cada proteína recombinante (ZP1, ZP2 y ZP3). <sup>1</sup>Folículos primordiales y primarios con una capa de células de la granulosa. <sup>2</sup>Folículos desarrollados con más de una capa de células de la granulosa.

### **Análisis de unión de las proteínas de ZP recombinantes a espermatozoides**

Las proteínas recombinantes de la ZP humana no se secretaron al medio de cultivo, lo que dificultó su purificación. Por esta razón, se desarrollaron dos sistemas para determinar su capacidad de unión a los espermatozoides. Para esta finalidad, se utilizaron las dos fracciones, soluble e insoluble del homogenizado celular. Los resultados obtenidos con la fracción insoluble (pastilla celular) en los espermoblots demostraron adhesión del espermatozoide humano a las proteínas recombinantes ZP1 y ZP3, y en menor proporción a la proteína ZP2. En estos análisis, las proteínas se separaron en condiciones desnaturalizantes, por lo que se trataron con un gradiente renaturalizante para restablecer su estructura original y no influir en el reconocimiento del espermatozoide. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos. Como puede observarse con la tinción del azul de Coomassie las tres proteínas mostraron la misma

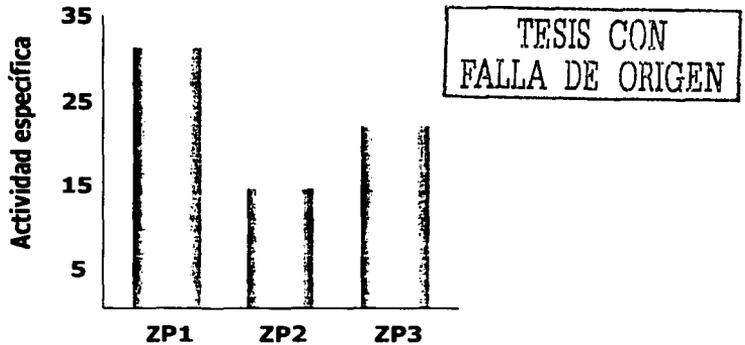
concentración en el gel (panel A). Éstas fueron transferidas a PVDF e incubadas en presencia de espermatozoides capacitados siguiendo el método descrito en la sección de material y método (panel B). Los espermatozoides unidos a las proteínas y fijados con formaldehído se incubaron con un suero policlonal anti espermatozoide humano. El complejo ZP-espermatozoide-anticuerpo se identificó con proteína A marcada con  $I^{125}$  y placas autorradiográficas X-Omat.



**Figura 15.** Análisis de unión de espermatozoides a las proteínas recombinantes de ZP humana. **A** Gel desnaturalizante de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie que muestra las proteínas obtenidas en la fracción insoluble del cultivo de células Sf9 sin transfectar y las proteínas del extracto de la lisis celular del cultivo de Sf9 transfectadas con el cDNA de ZP1, ZP2 y ZP3 humanas. **B** Análisis de espermoblot en membranas de PVDF. Las proteínas renaturalizadas se incubaron con espermatozoides humanos. Posteriormente se incubaron con anticuerpo antiespermatozoide y el complejo ZP-espermatozoide-anticuerpo se identificó con Proteína A marcada con  $I^{125}$  y sujeto a autorradiografía.

Estas placas autorradiográficas se analizaron en un equipo de densitometría *Eagle Eye II Still Video*. El análisis densitométrico obtenido se muestra en la figura 16, donde en el eje de las "Y" se encuentran los valores obtenidos para la actividad específica. Ésta se calculó dividiendo los valores obtenidos para la cantidad de radiactividad (en forma de densidad de la banda en la placa autorradiográfica analizada

con el densitómetro) que representa la unión de las proteínas de ZP con los espermatozoides, contra la abundancia de cada proteína de acuerdo con su tinción con azul Coomassie en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Estos resultados mostraron mayor unión de las proteínas ZP1 y ZP3 al espermatozoide humano que la encontrada para la proteína ZP2. No se observó unión de espermatozoides a las proteínas de Sf9.

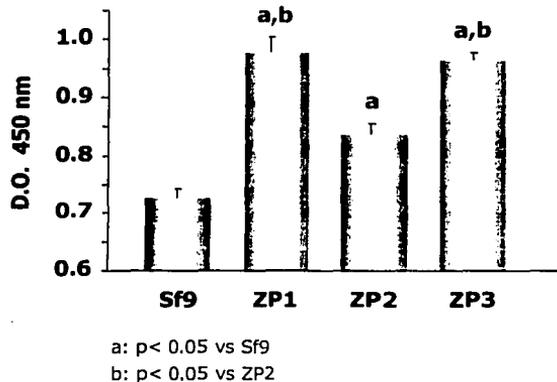


**Figura 16.** Análisis densitométrico de un ensayo representativo de la unión relativa de las proteínas de ZP con espermatozoides (dada por la densidad de la banda en placas autorradiográficas) contra la abundancia de cada proteína (de acuerdo a su tinción con azul de Coomassie en geles desnaturalizantes de poliacrilamida).

Por otro lado se realizaron estudios con el método ELISA utilizando la fracción soluble del homogeneizado celular o sobrenadante para determinar la unión de las proteínas con el espermatozoide. En las figuras 17 y 18 se muestran las gráficas obtenidas a partir de los resultados de dos análisis de este tipo con los valores de las muestras por cuatriplicado.

En un primer espermio ELISA se encontró que el control negativo, las proteínas del extracto celular de Sf9, se unían menos que las proteínas de ZP y, entre éstas, la ZP2 se unía menos que las otras dos. El análisis de varianza de una vía de las

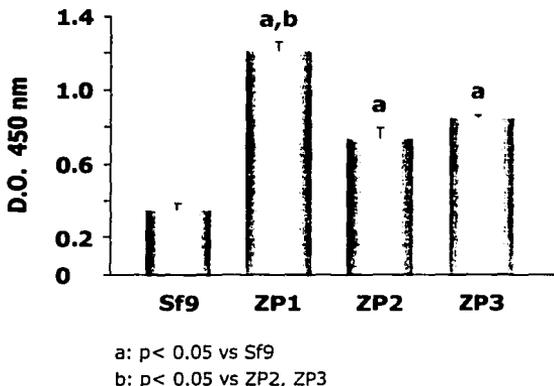
densidades ópticas (DO) promedio obtenidas (4 pozos por proteína) mostró diferencias significativas entre proteínas ( $F_{3,12}=36.389$ ,  $p<0.01$ ). La prueba post-hoc de Fisher mostró que el control negativo, las proteínas de Sf9 daba una DO significativamente menor a todas las proteínas de ZP ( $p<0.01$  en todos los casos) y que la unión de la ZP1 era significativamente mayor que la de la ZP2 ( $p<0.01$ ), lo mismo que la de la ZP3 ( $p<0.01$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las proteínas ZP1 y ZP3.



**Figura 17.** Gráficas de unión de las proteínas recombinantes de la ZP humana con espermatozoides en un ensayo de unión por ELISA. Las diferencias entre los valores obtenidos para las tres proteínas y el testigo fueron significativos, al igual que las diferencias entre los valores de ZP1 y ZP3, y los de ZP2. Las barras de error son +/- 1 error estándar.  $n=4$ .

En un segundo espermio ELISA realizado con espermatozoides de diferente origen, se logró un menor fondo en la unión de las proteínas de Sf9, y una mayor unión de las proteínas de ZP. El análisis de varianza mostró también diferencias significativas entre proteínas en su unión a espermatozoides ( $F_{3,12}=70.032$ ,  $p<0.01$ ). En este caso, las proteínas de Sf9 también mostraron una DO significativamente menor, según la

prueba post-hoc de Fisher ( $p < 0.01$  contra cualquier proteína de ZP) y la ZP1 se unió significativamente más que las otras dos ZP ( $p < 0.01$  en ambos casos). A diferencia de la prueba anterior, ZP2 y ZP3 no mostraron diferencias significativas.



**Figura 18.** Gráficas de unión de las proteínas recombinantes de la ZP humana con espermatozoides en un segundo ensayo de unión por ELISA. Las diferencias entre los valores obtenidos para las tres proteínas y el testigo fueron significativos, al igual que las diferencias entre los valores de ZP1 y los de ZP2 y ZP3. Las barras de error son  $\pm 1$  error estándar.  $n=4$ .

Los resultados anteriores muestran una mayor consistencia en la unión de ZP1, la cual se unió significativamente mejor que la ZP2 en los dos casos y significativamente mejor que la ZP3 en uno de ellos. Estos resultados permiten sugerir fuertemente a la ZP1 como candidata a ser la proteína responsable de la unión del espermatozoide a la ZP en el proceso de fertilización humana.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Discusión

---

## **Expresión y análisis de las proteínas recombinantes**

Hasta hace pocos años la experimentación en el campo de la interacción espermatozoide-zona pelúcida tenía fuertes limitaciones por la dificultad de obtener suficiente material biológico para su análisis. En la actualidad varios laboratorios han iniciado la obtención de proteínas recombinantes de la ZP de varias especies (Dunbar *et al.*, 1994; Epifano y Dean, 1994; McLeskey *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 2000; Wassarman, 1988). De igual manera, en el caso de las proteínas de ZP humana sólo existen algunos informes de sus características obtenidos con estudios de proteínas expresadas en diferentes sistemas. Sin embargo, no en todos los casos se ha podido demostrar alguna función biológica en parte debido a la utilización de sistemas que no realizan modificaciones postraduccionales a las proteínas (Gupta *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1999; Hinsch *et al.*, 1998; Liang y Dean, 1993a).

En este trabajo de tesis se eligió el sistema de expresión en Sf9 debido a su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, que incluyen la capacidad de cortar el péptido señal, la glicosilación, la fosforilación y la acetilación. Dado que las funciones que se atribuyen a las glicoproteínas de la ZP se encuentran directamente relacionadas con el tipo y cantidad de oligosacáridos en su molécula, el utilizar esta línea celular nos permite obtener proteínas similares a las proteínas nativas, pudiendo ser utilizadas en estudios de función biológica. Este sistema en células eucarióticas ha sido utilizado anteriormente para expresar la proteína ZP1 de conejo (Prasad *et al.*, 1995), la cual demostró tener funciones biológicas como la unión al espermatozoide y la capacidad de desencadenar la reacción acrosomal de igual forma que las proteínas nativas.

Los pesos moleculares de las cadenas de aminoácidos de las proteínas de ZP humana obtenidos a partir de las secuencias de oligonucleótidos son de 57 kDa, 82 kDa y 47 kDa para ZP1, ZP2 y ZP3 respectivamente (Chamberlin y Dean, 1990; Harris *et al.*, 1994; Liang y Dean, 1993b), y se demostró que los pesos moleculares para estas

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

mismas proteínas obtenidas de la ZP humana nativa son de 60 a 65 kDa, 70 a 100 kDa y 53 a 65 kDa respectivamente (Gupta *et al.*, 1998; Moos *et al.*, 1995; Shabanowitz y O'Rand, 1988). Los pesos moleculares obtenidos para cada una de las proteínas recombinantes en este trabajo corresponden a los esperados de acuerdo a los de las proteínas nativas, los cuales suman a su peso los carbohidratos añadidos después de la formación de la cadena polipeptídica. La caracterización inicial de los productos de expresión génica se realizó por medio de anticuerpos policlonales generados contra la ZP de cerdo. Estos anticuerpos demostraron, en análisis de inmunohistoquímica, su capacidad para reconocer a las proteínas de ZP de varias especies de mamíferos, incluyendo al ser humano. Los resultados obtenidos en los Western blot sugieren que las proteínas humanas recombinantes comparten epitopos antigénicos con las proteínas del cerdo, lo cual es derivado probablemente de la elevada homología entre las proteínas de las dos especies. En el caso de los resultados obtenidos con los anticuerpos generados contra la ZP1 recombinante y la ZP3 nativa de conejo, se observó el reconocimiento de los anticuerpos por las proteínas recombinantes. La presencia de las dos bandas obtenidas en estos análisis puede deberse al reconocimiento, por parte de estos anticuerpos, de diferentes epitopos que los obtenidos con el antisuero para la ZP total de cerdo. Este reconocimiento de dos productos de las proteínas recombinantes puede deberse de igual manera, a la presencia de productos de degradación de las proteínas o complejos proteínicos que no se desnaturalizaron apropiadamente, o a la presencia de formas de la proteína con diferente nivel de glicosilación.

Los análisis por Western blot también demostraron que las proteínas recombinantes tienen pesos moleculares mayores a los pesos de las cadenas polipeptídicas deducidos a partir de las secuencias génicas correspondientes. Estos resultados demostraron la capacidad del sistema de expresión para realizar modificaciones postraduccionales en estas proteínas como la glicosilación. Este hallazgo fue comprobado posteriormente por los resultados obtenidos con la utilización de varias lectinas. Los carbohidratos que se encontraron presentes en las proteínas fueron identificados como residuos de N-acetilglucosamina y manosa. El análisis para detectar

## TESIS CON FALLA DE ORIGEN

residuos de N-acetilgalactosamina fue negativo. Este tipo de carbohidratos son los mismos que se han encontrado en las proteínas de ZP nativa ). En términos generales, los carbohidratos presentes en las proteínas recombinantes son similares a los descritos en las proteínas de la ZP de varias especies de mamíferos (Bauskin *et al.*, 1999; Bleil y Wassarman, 1988; Dell *et al.*, 1999; Dunbar *et al.*, 1994; Florman y Wassarman, 1985; Litscher y Wassarman, 1996; Nakano *et al.*, 1996; Parillo *et al.*, 2000). Estos resultados permiten concluir que las proteínas recombinantes son similares a las nativas desde el punto de vista estructural e inmunológico.

Las proteínas obtenidas en el sistema de expresión no fueron secretadas al medio de cultivo. Esto pudiera deberse al encapsulamiento de las proteínas en los cuerpos de oclusión de las células lo que provocó que su solubilización y purificación fueran difíciles de realizar. Otro factor puede ser la diferente maquinaria celular en la cual fueron producidas, ya que a pesar de que la línea celular Sf9 realiza la mayoría de las modificaciones postraduccionales no se ha demostrado aún que presente las enzimas que realicen los cortes proteolíticos necesarios en la secreción de las proteínas extracelulares.

### **Función receptora de las proteínas recombinantes**

El conocimiento de los mecanismos que regulan e influyen en el proceso de interacción entre los gametos es fundamental en estudios de fertilización. En estos mecanismos influye el reconocimiento y la unión del espermatozoide a la ZP, así como la capacidad de la ZP de inducir la reacción acrosomal (Castle y Dean, 1999; Chapman *et al.*, 1998; Greenhouse *et al.*, 1999; Hinsch *et al.*, 1998; Tsubamoto *et al.*, 1999; van Duin *et al.*, 1994). Cada una de las proteínas de la ZP se ha postulado en diferentes especies como la molécula responsable del reconocimiento entre gametos. En el caso del ratón, se sabe que la unión entre gametos está determinada por una cadena de oligosacáridos en treonina presentes en ZP3 (Florman y Wassarman, 1985; Wassarman y Litscher, 1995). En *Xenopus* la gp69/64, la proteína homóloga de ZP2, inhibe la unión espermática *in vitro* (Doren *et al.*, 1999). Sin embargo, en el cerdo y el conejo la ZP1 parece funcionar como el receptor primario, y en algunos casos se ha observado que al

formar heteróduplex *in vitro* con la ZP3 se incrementa su capacidad de unión (Yurewicz *et al.*, 1991,1993a,b). En ratones transgénicos con la ZP3 humana se ha demostrado la formación de una matriz quimérica a la que no se unen los espermatozoides humanos, pero si los de ratón (Castle y Dean, 1999; Greenhouse *et al.*, 1999). Estas observaciones no han permitido todavía demostrar de manera satisfactoria las funciones específicas de las proteínas que constituyen a la ZP. Es probable que dependiendo de la especie de mamífero, la familia de las proteínas de ZP que participa en la unión con el espermatozoide sea diferente independientemente de la homología estructural que las caracteriza.;

En el caso del ser humano, se ha informado de la capacidad de la ZP3 humana de inducir la reacción acrosomal. Esta proteína fue expresada en *Escherichia coli* (Chapman *et al.*, 1998) y demostró que induce la exocitosis por reacción acrosomal en espermatozoides humanos capacitados. Al ser expresada en células CHO también se observó la inducción de la reacción acrosomal (van Duin *et al.*, 1994), al igual que al expresarla en células de teratocarcinoma ovárico humano, donde se obtuvo una proteína con capacidad de unión a espermatozoides además de ser inductora de la reacción acrosomal (Dong *et al.*, 2001). Sin embargo, en un estudio utilizando anticuerpos generados para diferentes péptidos de ZP3 (Hinsch *et al.*, 1999) no se afectó la unión de los gametos a pesar de que reconocieron específicamente a la ZP3 humana y murina. Esto sugiere la presencia de dominios en ZP3 que no están relacionados con la unión al espermatozoide.

En este trabajo de tesis la metodología desarrollada en los análisis de unión permitió señalar a las proteínas recombinantes humanas ZP1 y ZP3 como receptoras de espermatozoides humanos capacitados. Estos resultados apoyan los estudios ya mencionados relacionados a las funciones de receptor espermático de la proteína ZP3, y además proponen a la ZP1 como fuerte candidato a receptor espermático, a semejanza de lo que ocurre en el conejo y en el cerdo. En los análisis por ELISA, la proteína unida a una fase sólida permitió una mejor conservación de la estructura protéica que la que pudiera tener en las membranas de PVDF posterior a su separación. Estos resultados comprobaron las observaciones obtenidas en los espermoblots y apoyan la participación

de la ZP1 y ZP3 humanas en los mecanismos de reconocimiento entre los gametos que conducen a la fertilización. Nuestros análisis también revelaron la unión del espermatozoide a la ZP2 aunque en niveles significativamente más bajos que los demostrados para ZP1 y ZP3. Anteriormente se han publicado estudios que demuestran que la ZP2 es receptora de proteínas de la membrana acrosomal interna del espermatozoide, la cual queda expuesta después de la reacción acrosomal (Tsubamoto *et al.*, 1999). La unión de los espermatozoides a ZP2 observada en este trabajo de tesis, pudiera deberse a los espermatozoides que han sufrido la reacción acrosomal en forma espontánea y al exponer los receptores secundarios, éstos podrían unirse a la proteína ZP2 y ser detectados por el sistema.

### **Localización de antígenos de ZP en ovarios de mamíferos mediante anticuerpos seleccionados**

Existe controversia en relación con el sitio de biosíntesis de las proteínas de la ZP durante el desarrollo ovárico. En el ratón, la expresión de estas proteínas es en el ovocito de los folículos durante todo su desarrollo (Epifano *et al.*, 1995b; Liang *et al.*, 1990; Philpott *et al.*, 1987; Wassarman y Kinloch, 1992). Por otra parte, también existen informes de la expresión del mRNA y proteínas en las células de la granulosa de los folículos desarrollados en otras especies (Dunbar *et al.*, 1994; Grootenhuis *et al.*, 1996; Jewgenow *et al.*, 2000; Kölle *et al.*, 1998; Kölle *et al.*, 1996; Lee, 2000; Liang y Dean, 1993b; Martínez *et al.*, 1996; Sinowatz *et al.*, 1995; Totzauer *et al.*, 1998). Por medio de inmunohistoquímica en ovarios de cerdo y de conejo se ha observado la presencia de las tres proteínas de ZP en las células de la granulosa de ovocitos en desarrollo (Wood y Dunbar, 1981). Estas observaciones contradicen los informes de la expresión de proteínas solamente en ovocito (Epifano *et al.*, 1995b; Wassarman y Kinloch, 1992). Estas diferencias se pueden deber a las técnicas de fijación, afinidad del anticuerpo o sensibilidad de los análisis de hibridación. La localización de la ZP1 y ZP3 se ha demostrado en ovocitos y células de la granulosa de folículos en desarrollo de ovarios porcinos y bovinos (Sinowatz *et al.*, 1995; Totzauer *et al.*, 1998). En el conejo la expresión de la ZP se ha demostrado en las células de la granulosa de folículos en

desarrollo utilizando anticuerpos anti ZP1 nativa y ZP1 recombinante (Lee y Dunbar, 1993; Prasad *et al.*, 1996b). También se utilizaron inmuno blots y análisis de Northern blot para demostrar la expresión de la ZP1 y su mRNA en células de la granulosa de folículos primarios y secundarios (Maresh *et al.*, 1990).

En el caso del ser humano, la ZP3 se ha identificado en los ovocitos de folículos primordiales, pero no así en los casos de ZP1 y ZP2. En fecha reciente, y con anticuerpos policlonales a proteínas recombinantes humanas, Eberspaecher y cols (2001) demostraron la localización de las tres proteínas de la ZP en ovocitos de folículos primordiales. También encontraron que los anticuerpos seleccionados para ZP1 y ZP2 reconocen antígenos de ZP en la zona pelúcida de folículos en desarrollo, pero no en células de la granulosa, mientras que la ZP3 se localizó en la ZP y en las células de la granulosa de folículos en desarrollo. Este tipo de localización podría deberse a que ZP1 y ZP2 se expresan en las células de la granulosa mucho más tarde que ZP3. Grootenhuis y col en 1996 demostraron la localización de ZP3 en células de la granulosa de folículos en desarrollo de varias especies entre ellas el ser humano. Estos resultados son diferentes a los datos de Eberspaecher y cols, quienes localizan las tres proteínas en ZP pero no en las células de la granulosa de folículos humanos primarios y en desarrollo fijados en formalina. También informan que la tinción en células de la granulosa se observó sólo en los ovarios fijados con Bouin y no con formalina. Esta diferencia la atribuyen a la solubilización y destrucción de la ZP con el fijador Bouin. Sin embargo en este trabajo de tesis se demostró la localización de los antígenos de ZP en ovocitos, en las células de la granulosa y en la ZP de los folículos primarios y primordiales de ovarios fijados en Bouin sin prueba de algún daño a la matriz extracelular.

En este trabajo se utilizaron anticuerpos seleccionados con cada una de las proteínas recombinantes para evaluar la expresión de los antígenos de la ZP en folículos de diferentes especies de mamíferos incluyendo al ser humano. Los anticuerpos seleccionados se obtuvieron a partir del suero anti ZP total de cerdo. Estos anticuerpos reconocieron específicamente a las proteínas recombinantes para las cuales fueron seleccionados, a excepción de los anticuerpos para ZP2 que reconocieron

también a ZP1. Esto se debe probablemente a la homología existente entre las proteínas ZP1 y ZP2 humanas de alrededor del 58% (Harris *et al.*, 1999). Esto pudo provocar el reconocimiento inespecífico de ZP1 por los anticuerpos a ZP2. Debido a la naturaleza policlonal del suero a partir del cual se seleccionaron los anticuerpos, no se puede descartar la presencia de una población de anticuerpos que reconozcan epitopos comunes en dos proteínas con alta homología.

Los anticuerpos seleccionados para cada una de las tres proteínas recombinantes humanas reconocieron la presencia de antígenos de ZP1, ZP2, y ZP3 en la ZP y en los ovocitos de folículos primordiales y primarios. La localización de estos antígenos fue también evidente en células de la granulosa de los folículos desarrollados del ratón, cerdo, babuino y del ser humano. La señal en células de la granulosa parece estar restringida a cierta población, lo que coincide con informes previos sobre la presencia de dos poblaciones morfológicamente distintas de células de la granulosa que expresan proteínas de la ZP (Grootenhuis *et al.*, 1996; Lee y Dunbar, 1993; Wolgemuth *et al.*, 1984).

Este proyecto demuestra la selectividad de los anticuerpos de las proteínas ZP1, ZP2 y ZP3 humanas para reconocer epitopos de ZP similares en otras especies de mamíferos. Utilizando anticuerpos para cada una de las tres proteínas recombinantes se demostró la expresión de antígenos de ZP1, ZP2 y ZP3 en las células de la granulosa y la ZP de folículos desarrollados de ratón, cerdo, babuino y ser humano. La localización de los antígenos fue evidente en ovocitos y folículos pequeños (primordiales y primarios) con menos señal en los ovocitos de folículos desarrollados. Es interesante la presencia de proteínas de la ZP en las células de la granulosa que parece estar restringida a cierta población de estas células y a su grado de desarrollo. Estas observaciones concuerdan con estudios en los que se ha demostrado la presencia de dos poblaciones distintas de células de la granulosa expresando proteínas de ZP (Lee y Dunbar, 1993; Prasad *et al.*, 1996a; Wolgemuth *et al.*, 1984). Además se han realizado estudios donde, mediante anticuerpos anti ZP3 humana, se ha demostrado su localización en células de la granulosa de folículos secundarios y folículos primordiales de ovario de conejo, mono rhesus y ser humano (Grootenhuis *et al.*, 1996). Estos

estudios son importantes porque sugieren una función de la ZP3 aún antes que el espermatozoide alcance la ZP, es decir desde el momento anterior a la fecundación cuando el espermatozoide atraviesa las células del cumulus. Estas células, que se encuentran dentro de una matriz de ácido hialurónico, provienen de las células de la granulosa del folículo anterior a la ovulación. La ZP3 que se encuentra en las células del cumulus junto con una proteína receptora de progesterona y una glicoproteína de alto peso molecular forman un complejo en la superficie exterior de la ZP (Green, 1993). Este complejo tiene un efecto capacitante en el acrosoma de los espermatozoides unidos a él, ya que una vez que el espermatozoide lo penetra sufre una hiperactivación en donde la frecuencia de los movimientos del flagelo se incrementan considerablemente, y además se liberan pequeñas cantidades de hialuronidasa y acrosina (Takano *et al.*, 1993). Estos movimientos y la digestión enzimática del ácido hialurónico del complejo permiten al esperma atravesar el cumulus sin que se desencadene la reacción acrosomal, la cual será activada hasta que los espermatozoides alcancen la ZP (Cleine, 1996). Aún queda por determinar la posibilidad de que la ZP3 regule la hiperactivación de los espermatozoides y la salida controlada de enzimas sin desencadenar la reacción acrosomal, lo cual explicaría su presencia en las células que rodean el ovocito y la ZP observada en los cortes analizados en este trabajo, y que es mayor a la de las proteínas ZP1 y ZP2.

Por otro lado, no existen estudios suficientes para determinar otras funciones de la ZP en procesos anteriores a la ovulación dado que su aparición sucede durante la diferenciación folicular en el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo del folículo, las células de la granulosa en diferenciación forman dos poblaciones: una en contacto con la membrana basal entre las células foliculares y las de la teca y otra en contacto con el ovocito y la ZP. Algunos estudios proponen una participación de la ZP en el desarrollo folicular ya que existe una expresión coordinada de las proteínas ZP2 y ZP3 del ratón y del bovino. Esta expresión es dependiente del estado del folículo, con mayor presencia del mRNA en las dos primeras semanas de la ovogénesis y que decae posteriormente en estadios más tardíos del desarrollo del ovocito (Grootenhuis *et al.*, 1996; Maresh *et al.*, 1990; Picton *et al.*, 1998; Wolgemuth *et al.*, 1984).

La matriz extracelular del ovocito es probablemente la responsable de la diferenciación coordinada de varios tipos celulares a su alrededor, tal como se ha visto en otras proteínas extracelulares como las integrinas, metaloproteinasas y otras importantes en el desarrollo folicular y embrionario (Behrendtsen *et al.*, 1995; Eckes *et al.*, 1999; Forget *et al.*, 1999; Kanai *et al.*, 1995; Simon-Assmann *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999; Streuli, 1999; Velleman, 1999). Estas observaciones sugieren que la matriz extracelular no actúa únicamente como una estructura pasiva, sino como una estructura que influye en el desarrollo del fenotipo celular. Las proteínas de la ZP podrían interactuar directamente con receptores de la superficie celular estimulando señales de transducción que afecten la función de las células adyacentes.

Basados en los datos que indican que las proteínas de la ZP son sintetizadas y secretadas por ambos tipos celulares (ovocitos y células de la granulosa) y que se expresan dependiendo del estado de desarrollo del folículo, estas proteínas podrían utilizarse como marcadores de etapas tempranas del desarrollo ovárico y de la posible función de las proteínas de ZP como detonadores de la diferenciación celular, haciendo posible su utilización como marcadores en estudios de expresión de la ZP durante el desarrollo folicular. En este estudio se demuestra que los anticuerpos seleccionados para ZP1, ZP2 y ZP3 humanas reconocen epitopos similares en la ZP de otras especies de mamíferos, y que tanto las células de la granulosa como los ovocitos de las especies estudiadas incluido el ratón, expresan proteínas similares desde el punto de vista inmunitario a las de la ZP humana.

El desarrollo de anticuerpos específicos contra estas proteínas también serán de gran utilidad para determinar la región específica de la proteína responsable de la interacción con el espermatozoide. Además este trabajo representa el inicio de la obtención y caracterización de las proteínas de la ZP del ovocito humano. A partir de estos resultados se pretende la estandarización de análisis de unión de los espermatozoides con las proteínas expresadas. Estos análisis son de gran importancia para caracterizar los mecanismos celulares involucrados en las interacciones entre los gametos humanos y sus posibles implicaciones en disfunciones de pacientes infértiles. Actualmente en los laboratorios de fertilización asistida no se cuenta con un análisis

predictivo de la capacidad de unión del espermatozoide a las proteínas de la ZP que se realice como parte de los estudios de diagnóstico de Infertilidad. Los primeros análisis de unión presentados en este trabajo de tesis representan una herramienta de análisis en procedimientos de fertilización *in vitro* y en análisis clínicos de infertilidad masculina causada por defectos en el reconocimiento y unión de gametos atribuibles al espermatozoide.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

# Conclusiones

---

1. Se expresaron los cDNAs para las tres proteínas de ZP de ovocito humano en el sistema de expresión por baculovirus en células Sf9. ZP1 se expresa como una proteína de 65kDa, ZP2 como una proteína de 75kDa y ZP3 como una proteína de 55kDa.
2. Los anticuerpos contra ZP total de cerdo y contra ZP1 y ZP3 de conejo reconocen a las proteínas expresadas, lo que indica que estas proteínas recombinantes humanas comparten sitios antigénicos con proteínas nativas de otras especies.
3. Los análisis de lectinas demostraron que las proteínas recombinantes son similares a las de la ZP nativa, pues presentan carbohidratos del tipo N-acetilglucosamina, manosa y N-acetilgalactosamina.
4. Los análisis de unión de las proteínas recombinantes a espermatozoides humanos sugieren a las proteínas recombinantes ZP1 y ZP3 como candidatas para el reconocimiento de receptores en la membrana del espermatozoide humano.
5. Es posible desarrollar un ensayo con las proteínas recombinantes para análisis predictivos de fertilización *in vitro* y en la detección de defectos en el reconocimiento y unión de gametos atribuibles al espermatozoide.
6. Los anticuerpos seleccionados por cada proteína recombinante localizan proteínas de ZP en células de la granulosa y en ovocitos de ratón, cerdo, babuino y ser humano.
7. Los anticuerpos seleccionados para cada una de las proteínas de ZP pueden utilizarse como marcadores del desarrollo folicular pues localizan a cada una de las tres proteínas en los folículos de acuerdo a su estadio.

# Bibliografía

- Akatsuka, K., Yoshida-Komiya, H., Tulsiani, D. R., Orgebin-Crist, M. C., Hiroi, M., Araki, Y. (1998). Rat zona pellucida glycoproteins: molecular cloning and characterization of the three major components. *Mol Reprod Dev* **51**, 454-67.
- Bauskin, A.R., Franken, D.R. Eberspaecher, U., Donner, P. (1999). Characterization of human ZP glycoproteins. *Mol Hum Reprod* **5**, 534-40.
- Behrendtsen, O., Alexander, C. M., Werb, Z. (1995). Cooperative interactions between extracellular matrix, Integrins and parathyroid hormone-related peptide regulate parietal endoderm differentiation in mouse embryos. *Development* **121**, 4137-48.
- Bielfeld, P., Jeyendran, R.S., Holmgren, W.J., Zaneveld, L.J. (1990). Effect of egg yolk medium on the acrosome reaction of human spermatozoa. *J Andrology* **11**, 260-9
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. (1980). Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 1029-33.
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **95**, 317-24.
- Bleil, J. D., Wassarman, P. M. (1988). Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6778-82.
- Bork, P. (1993). A trefoil domain in the major rabbit zona pellucida protein. *Protein Science* **2**, 669-70.
- Bork, P., Sander, C. (1992). A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-beta type III receptor. *Febs Letters* **300**, 237-40.
- Castle, P. E., Dean, J. (1996). Molecular genetics of the zona pellucida: implications for immunocontraceptive strategies. *J Reprod Fertil Suppl* **50**, 1-8.
- Castle, P. E., Dean, J. (1999). Manipulating the genome to study reproduction. Mice with 'humanized' zonae pellucidae. *Hum Reprod* **14**, 1927-39.
- Chamberlin, M. E., Dean, J. (1990). Human homolog of the mouse sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6014-8.
- Chapman, N., Kessopoulou, E., Andrews, P., Hornby, D., Barratt, C. R. (1998). The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro. *Biochem J* **330** ( Pt 2), 839-45.
- Chen, J., Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (1998). Inactivation of the mouse sperm receptor, mZP3, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6193-7.
- Cheng, A., Le, T., Palacios, M., Bookbinder, L. H., Wassarman, P. M., Suzuki, F., Bleil, J. D. (1994). Sperm-egg recognition in the mouse: characterization of sp56, a sperm protein having specific affinity for ZP3. *J Cell Biol* **125**, 867-78.
- Cleine, J.H. (1988). Fertilization theory; in Bras, M., Lens, J.W., Piederiet, M.H., Rijnders, P.M., Verveld, M., Zeilmaker, G.H. (eds): IVF lab. Laboratory aspects of in-vitro fertilization. Netherlands, 127-145
- Dean, J. (1991). The zona pellucida genes encode essential proteins for mammalian fertilization and early embryogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* **196**, 141-6.

- Dean, J., Chamberlin, M. E., Millar, S., Baur, A. W., Lunsford, R. D. (1989a). Developmental expression of the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Ann N Y Acad Sci* **564**, 281-8.
- Dean, J., Chamberlin, M. E., Millar, S. E., Ringuette, M. J., Philpott, C. C., Baur, A. W., Chamow, S. M. (1989b). Developmental expression of ZP3, a mouse zona pellucida gene. *Prog Clin Biol Res* **294**, 21-32.
- Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Patankar, M., Clark, G. F. (1999). The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 196-205.
- Dong, K. W., Chi, T. F., Juan, Y. W., Chen, C. w., Lin, Z., Xiang X. Q., Mahony, M., Gibbons, W. E., Oehninger, S. (2001). Characterization of the biologic activities of a recombinant human zona pellucida protein 3 expressed in human ovarian teratocarcinoma (PA-1) cells. *Am J Obstet Gynecol* **184**, 835-44.
- Doren, S., Landsberger, N., Dwyer, N., Gold, L., Blanchette-Mackie, J., Dean, J. (1999). Incorporation of mouse zona pellucida proteins into the envelope of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Genes Evol* **209**, 330-9.
- Dunbar, B. S., Avery, S., Lee, V., Prasad, S., Schwahn, D., Schwoebel, E., Skinner, S., Wilkins, B. (1994). The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod Fertil Dev* **6**, 331-47.
- Dunbar, B. S., Liu, C., Sammons, D. W. (1981). 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**, 1111-24.
- Dunbar, B. S., Raynor, B. D. (1980). Characterization of porcine zona pellucida antigens. *Biol Reprod* **22**, 941-54.
- Eberspaecher, U., Becker, A., Bringmann, P., van\_der\_Merwe, L., Donner, P. (2001). Immuno histochemical localization of zona pellucida proteins ZPA, ZPB and ZPC in human, cynomolgus monkey and mouse ovaries. *Cell Tissue Res* **303**, 277-87.
- Eckes, B., Kessler, D., Aumailley, M., Krieg, T. (1999). Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Seminars in Immunopathology* **21**, 415-29.
- Epifano, O., Dean, J. (1994). Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev* **6**, 319-30.
- Epifano, O., Liang, L. F., Dean, J. (1995a). Mouse Zp1 encodes a zona pellucida protein homologous to egg envelope proteins in mammals and fish. *J Biol Chem* **270**, 27254-8.
- Epifano, O., Liang, L. F., Familiari, M., Moos, M. C. J., Dean, J. (1995b). Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* **121**, 1947-56.
- Evans, J.P. (2000). Getting sperm and egg together: things conserved and things diverged. *Biol Reprod* **63**, 355-360.
- Florman, H. M., Wassarman, P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* **41**, 313-24.
- Forget, M. A., Desrosiers, R. R., Beliveau, R. (1999). Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can J Physiol Pharmacology* **77**, 465-80.
- Gamzu, R., Yavetz, H., Lichtenberg, D., Paz, G., Homonnai, Z.T., Yogev, L. (1994). The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida. *Fertil Steril* **62**, 1221-5.

- Gong, X., Dubois, D. H., Miller, D. J., Shur, B. D. (1995). Activation of a G protein complex by aggregation of beta-1,4- galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* **269**, 1718-21.
- Green, D.P. (1993). Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod* **8**, 91-96.
- Green, D.P. (1997). Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev Reprod* **2**, 147-56.
- Greenhouse, S., Castle, P. E., Dean, J. (1999). Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucididae. *Hum Reprod* **14**, 593-600.
- Grootenhuis, A. J., Philipsen, H. L., de Breet-Grijnsbach, J. T., van Duin, M. (1996). Immunocytochemical localization of ZP3 in primordial follicles of rabbit, marmoset, rhesus monkey and human ovaries using antibodies against human ZP3. *J Reprod Fertil Suppl* **50**, 43-54.
- Gupta, S. K., Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Kaul, R., Jethanandani, P., Govind, C. K. (1998). Human zona pellucida glycoproteins: characterization using antibodies against recombinant non-human primate ZP1, ZP2 and ZP3. *Mol Hum Reprod* **4**, 1058-64.
- Harris, J. D., Hibler, D. W., Fontenot, G. K., Hsu, K. T., Yurewicz, E. C., Sacco, A. G. (1994). Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Seq* **4**, 361-93.
- Harris, J. D., Seid, C. A., Fontenot, G. K., Liu, H. F. (1999). Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Prot Expr Purif* **16**, 298-307.
- Hinsch, E., Hagele, W., van der Ven, H., Oehninger, S., Schill, W. B., Hinsch, K. D. (1998). Immunological identification of zona pellucida 2 (ZP2) protein in human oocytes. *Andrologia* **30**, 281-7.
- Hinsch, E., Oehninger, S., Schill, W. B., Hinsch, K. D. (1999). Species specificity of human and murine anti-ZP3 synthetic peptide antisera and use of the antibodies for localization and identification of ZP3 or ZPC domains of functional significance. *Hum Reprod* **14**, 419-28.
- Hinsch, K. D., Hinsch, E., Meinecke, B., Topfer-Petersen, E., Pfisterer, S., Schill, W. B. (1994). Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. *Biol Reprod* **51**, 193-204.
- Jewgenow, K., Rohleder, M., Wegner, I. (2000). Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J Reprod Fertil* **119**, 15-23.
- Johnson, A.R., Syms, A.J., Lipshultz, L.I., Smith, R.G. (1984). Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* **41**, 603-8.
- Kanai, Y., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Yazaki, K., Hayashi, Y. (1995). Effects of extracellular matrix on differentiation of mouse fetal gonads in the absence of mesonephros in vitro. *Microsc Res Tech* **32**, 437-48.
- Kolle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Palma, G. (1998). Differential expression of ZPC in the bovine ovary, oocyte, and embryo. *Mol Reprod Dev* **49**, 435-43.
- Kolle, S., Sinowatz, F., Boie, G., Totzauer, I., Amselgruber, W., Plendl, J. (1996). Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive *in situ* hybridization. *Histochem J* **28**, 441-7.
- Lanzendorf, S.E., Holmgren, W.J., Jeyendran, R.S. (1992). The effect of egg yolk medium on human sperm binding in the hemizona assay. *Fertil Steril* **58**, 547-50.
- Lee, V. H. (2000). Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biol Reprod* **63**, 401-8.
- Lee, V. H., Dunbar, B. S. (1993). Developmental expression of the rabbit 55-kDa zona pellucida protein and messenger RNA in ovarian follicles. *Dev Biol* **155**, 371-82.

- Lee, V. H., Schwoebel, E., Prasad, S., Cheung, P., Timmons, T. M., Cook, R., Dunbar, B. S. (1993). Identification and structural characterization of the 75-kDa rabbit zona pellucida protein. *J Biol Chem* **268**, 12412-7.
- Liang, L. F., Chamow, S. M., Dean, J. (1990). Oocyte-specific expression of mouse Zp-2: developmental regulation of the zona pellucida genes. *Mol Cell Biol* **10**, 1507-15.
- Liang, L. F., Dean, J. (1993a). Conservation of mammalian secondary sperm receptor genes enables the promoter of the human gene to function in mouse oocytes. *Dev Biol* **156**, 399-408.
- Liang, L. F., Dean, J. (1993b). Oocyte development: molecular biology of the zona pellucida. *Vitam Horm* **47**, 115-59.
- Litscher, E. S., Wassarman, P. M. (1996). Characterization of mouse ZP3-derived glycopeptide, gp55, that exhibits sperm receptor and acrosome reaction-inducing activity *in vitro*. *Biochemistry* **35**, 3980-5.
- Maresh, G. A., Timmons, T. M., Dunbar, B. S. (1990). Effects of extracellular matrix on the expression of specific ovarian proteins. *Biol Reprod* **43**, 965-76.
- Martinez, M. L., Fontenot, G. K., Harris, J. D. (1996). The expression and localization of zona pellucida glycoproteins and mRNA in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil Suppl* **50**, 35-41.
- McLeskey, S. B., Dowds, C., Carballada, R., White, R. R., Saling, P. M. (1998). Molecules involved in mammalian sperm-egg interaction. *Internat Rev Cytol* **177**, 57-113.
- Millar, S. E., Chamow, S. M., Baur, A. W., Oliver, C., Robey, F., Dean, J. (1989). Vaccination with a synthetic zona pellucida peptide produces long-term contraception in female mice. *Science* **246**, 935-8.
- Millar, S. E., Lader, E. S., Dean, J. (1993). ZAP-1 DNA binding activity is first detected at the onset of zona pellucida gene expression in embryonic mouse oocytes. *Dev Biol* **158**, 410-3.
- Miller, D. J., Macek, M. B., Shur, B. D. (1992). Complementarity between sperm surface beta-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature* **357**, 589-93.
- Miranda, P. V., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J. A., Mahuran, D. J., Tezon, J. G. (2000). Evidence for the participation of beta-hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction *in vitro*. *Mol Hum Reprod* **6**, 699-706.
- Moos, J., Faundes, D., Kopf, G. S., Schultz, R. M. (1995). Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Hum Reprod* **10**, 2467-71.
- Nakano, M., Yonezawa, N., Hatanaka, Y., Noguchi, S. (1996). Structure and function of the N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* **50**, 25-34.
- Parillo, F., Fagioli, O., Dall'Aglio, C., Verini-Supplizi, A. (2000). Lectin histochemical detection of sulfoglycans in the zona pellucida of mammalian antral oocytes. *Acta Histochemica* **102**, 193-202.
- Philpott, C. C., Ringuette, M. J., Dean, J. (1987). Oocyte-specific expression and developmental regulation of ZP3, the sperm receptor of the mouse zona pellucida. *Dev Biol* **121**, 568-75.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* **145**, 27-37.
- Prasad, S. V., Skinner, S. M., Cariño, C., Wang, N., Cartwright, J., Dunbar, B. S. (2000). Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* **166**, 148-64.

- Prasad, S. V., Mujtaba, S., Lee, V. H., Dunbar, B. S. (1995) Immunogenicity enhancement of recombinant rabbit 55-kilodalton zona pellucida protein expressed using the baculovirus expression system. *Biol Reprod* **52**, 1167-78.
- Prasad, S. V., Wilkins, B., Dunbar, B. S. (1996a). Molecular biology approaches to evaluate species variation in immunogenicity and antigenicity of zona pellucida proteins. *J Reprod Fertil Suppl* **50**, 143-9.
- Prasad, S. V., Wilkins, B., Skinner, S. M., Dunbar, B. S. (1996b). Evaluating zona pellucida structure and function using antibodies to rabbit 55 kDa ZP protein expressed in baculovirus expression system. *Mol Reprod Dev* **43**, 519-29.
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., Dean, J. (1999). Abnormal *zonae pellucidae* in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* **126**, 3847-55.
- Rankin, T. L., Tong, Z. B., Castle, P. E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L. M., Dean, J. (1998). Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* **125**, 2415-24.
- Rosiere, T. K., Wassarman, P. M. (1992). Identification of a region of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3 that possesses sperm receptor activity. *Dev Biol* **154**, 309-17.
- Shabanowitz, R. B., O'Rand, M. G. (1988). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* **82**, 151-61.
- Simon-Assmann, P., Keding, M., De Arcangelis, A., Rousseau, V., Simo, P. (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**, 883-900.
- Sinowatz, F., Amselgruber, W., Topfer-Petersen, E., Totzauer, I., Calvete, J., Plendl, J. (1995). Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development. *Anat Embryol* **191**, 41-6.
- Sinowatz, F., Plendl, J., Kolle, S. (1998). Protein-carbohydrate interactions during fertilization. *Acta Anatomica* **161**, 196-205.
- Smith, M. F., McIntush, E. W., Ricke, W. A., Kojima, F. N., Smith, G. W. (1999). Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil Suppl* **54**, 367-81.
- Streull, C. (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 634-40.
- Summers, M.D., Smith, G.E. (1987). A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. Texas A&M University.
- Takano, H., Yanagimachi, R., Urch, U.A. (1993). Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolema: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* **1**, 79-91.
- Timmons, T. M., Dunbar, B. S. (1990). Protein blotting and immunodetection. *Methods Enzymol* **182**, 679-88.
- Timmons, T. M., Maresh, G. A., Bundman, D. S., Dunbar, B. S. (1987). Use of specific monoclonal and polyclonal antibodies to define distinct antigens of the porcine *zonae pellucidae*. *Biol Reprod* **36**, 1275-87.
- Totzauer, I., Kolle, S., Sinowatz, F., Plendl, J., Amselgruber, W., Topfer-Petersen, E. (1998). Localization of the zona glycoproteins ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in the bovine ovary during pre- and postnatal development. *Anatomischer Anzeiger* **180**, 37-43.
- Tsubamoto, H., Hasegawa, A., Nakata, Y., Naito, S., Yamasaki, N., Koyama, K. (1999). Expression of recombinant human zona pellucida protein 2 and its binding capacity to spermatozoa. *Biol Reprod* **61**, 1649-54.

- van Duin, M., Polman, J. E., De Breet, I. T., van Ginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J., Altken, R. J. (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by chinese hamster ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol Reprod* **51**, 607-17.
- Velleman, S. G. (1999). The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development. *Poultry Science* **78**, 778-84.
- Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H., Williams, Z. (1999). Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zoology* **285**, 251-8.
- Wassarman, P. M. (1988). Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-42.
- Wassarman, P. M. (1990). Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins. *J Reprod Fertil Suppl* **42**, 79-87.
- Wassarman, P. M., Kinloch, R. A. (1992). Gene expression during oogenesis in mice. *Mutation Res* **296**, 3-15.
- Wassarman, P. M., Litscher, E. S. (1995). Sperm-egg recognition mechanisms in mammals. *Curr Topics Dev Biol* **30**, 1-19.
- Wassarman, P. M., Mortillo, S. (1991). Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int Rev Cytol* **130**, 85-110.
- Wolgemuth, D. J., Celenza, J., Bundman, D. S., Dunbar, B. S. (1984). Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev Biol* **106**, 1-14.
- Wood, D. M., Dunbar, B. S. (1981). Direct detection of two cross-reactive antigens between porcine and rabbit *zonae pellucidae* by radioimmunoassay and immunoelectrophoresis. *J Exp Zool* **217**, 423-33.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**, 371-2.
- Yanagimachi, R., Bhattacharyya, A. (1988). Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions. *J Exp Zool* **248**, 354-60.
- Yonezawa, N., Aoki, H., Hatanaka, Y., Nakano, M. (1995). Involvement of N-linked carbohydrate chains of pig zona pellucida in sperm-egg binding. *Eur J Biochem* **233**, 35-41.
- Yurewicz, E. C., Hibler, D., Fontenot, G. K., Sacco, A. G., Harris, J. (1993a). Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 alpha, a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochim Biophys Acta* **1174**, 211-4.
- Yurewicz, E. C., Pack, B. A., Armant, D. R., Sacco, A. G. (1993b). Porcine zona pellucida ZP3 alpha glycoprotein mediates binding of the biotin-labeled M(r) 55,000 family (ZP3) to boar sperm membrane vesicles. *Mol Reprod Dev* **36**, 382-9.
- Yurewicz, E. C., Pack, B. A., Sacco, A. G. (1991). Isolation, composition, and biological activity of sugar chains of porcine oocyte zona pellucida 55K glycoproteins. *Mol Reprod Dev* **30**, 126-34.

# Structure and Function of the Proteins of the Mammalian Zona pellucida

S.V. Prasad<sup>a</sup> S.M. Skinner<sup>a</sup> C. Carino<sup>a</sup> N. Wang<sup>a</sup> J. Cartwright<sup>b</sup>  
B.S. Dunbar<sup>a</sup>

Departments of <sup>a</sup>Cell Biology and <sup>b</sup>Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, Tex., USA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Key Words

Zona pellucida · Glycosylation · Granulosa cells · Sperm receptor · Extracellular matrix

## Abstract

The zona pellucida (ZP) is the extracellular matrix that plays important roles in sperm-egg interaction. The ZP is composed of three major glycoproteins that exhibit heterogeneity due to extensive post-translational modifications including glycosylation and sulfation. Because of these modifications the nomenclature of ZP proteins from different species based on electrophoretic mobilities has been confusing. As the cDNAs and genes encoding the different ZP proteins have been isolated and sequenced, it is now possible to relate these ZP proteins according to gene families. Using the mouse ZP nomenclature, the ZP proteins from different mammalian species can be classified into three protein families: ZP1, ZP2, and ZP3. Although some of the structural domains of the ZP proteins of different species are conserved within each family, they exhibit distinct biological properties. In the mouse it has been established that ZP3 is the primary sperm receptor while ZP2 has secondary sperm receptor properties. In the pig, however, ZP1 has

been shown to have sperm receptor activity similar to that observed in the rabbit and nonhuman primates. It is of interest that the human ZP2 and ZP3 gene families are 60-70% conserved with respect to the mouse ZP amino acid sequence, while the mouse ZP1 is only 39% conserved with respect to human ZP1. Such differences in protein structure and glycosylation may explain the marked species differences in the biochemical, physicochemical and immunochemical properties of the ZP. Studies have now shown that the proteins of the ZP are expressed in a stage specific manner and that there is increasing evidence that ZP proteins are expressed by both granulosa cells and the oocyte and may play a role in granulosa cell differentiation.

Copyright © 2000 S. Karger AG, Basel

## Abbreviations used in this paper

ZP	zona pellucida
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
2D-PAGE	two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
PS1	pig silver-stained zona pellucida protein 1
EBGD	endo- $\beta$ -galactosidase

## KARGER

© 2000 S. Karger AG, Basel

+41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

Accessible online at  
www.karger.com/journal/cto

Dr. Bonnie S. Dunbar  
Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine  
One Baylor Plaza  
Houston, TX 77030 (USA)  
Tel. +1 713 798 6255, Fax +1 713 798 7341, E-Mail bdunbar@bcm.tmc.edu

## The Ovary as an Immune Target

B. S. Dunbar, PhD, S. Prasad, PhD, C. Cariño, MS, and S. M. Skinner, PhD

*The ovary does not have a distinct morphologic barrier between the immune system and the developing gametes. This is in contrast to the testis in which the junctional complexes between the Sertoli cells form the blood-testis barrier. Whereas there are numerous factors, including genetic ones, associated with ovarian dysfunction, the immune factors have frequently been implicated in ovarian dysfunction. Much of our knowledge used to evaluate the immune system of the ovary has come from studies on the expression of the zona pellucida (ZP) proteins during ovarian development. Initial studies by Dunbar and colleagues<sup>1,2</sup> demonstrated that immunization of rabbits with porcine ZP proteins (but not rabbit ZP proteins) would result in the generation of antibodies that inhibit sperm binding to the ZP and interfere with normal ovarian follicular development.*

*In contrast to the rabbit and primate models, immunization of mice or rats with porcine ZP proteins does not have an effect on fertility or ovarian function although immunization of certain strains of mice with mouse ZP peptides and immune activator systems has been shown to result in ovarian pathology. Whereas immune inflammatory reactions have been observed in the mouse models, no such immune reactions have been observed in rabbit, guinea pig, or nonhuman primate models.*

*Subsequent observations in nonhuman primates have shown that immunization of primates with ZP proteins expressed from cDNAs coding for the mouse and rabbit ZP2 (the mouse homologue has 60% amino acid identity with human ZP2) or the mouse ZP3 (the mouse protein has 67% amino acid identity with human ZP3) causes ovarian dysgenesis. In contrast, immunization of primates with recombinant rabbit ZP1 protein (the mouse homologue has 39% amino acid identity with human ZP1) does not affect nonhuman primate ovarian function or follicular development but will elicit antibodies that inhibit sperm binding to the primate ZP. These studies have collectively provided important information concerning the immunologic status of the ovary and demonstrate the species variations in immune responses to different ovarian immunogens. (J Soc Gynecol Investg 2001;8:S43-S48) Copyright © 2001 by the Society for Gynecologic Investigation.*

KEY WORDS: Ovary, immune, oocyte, zona, granulosa.

### OVARIAN DEVELOPMENT AND THE IMMUNE SYSTEM

In the human fetus, the human ovary develops through the differentiation and proliferation of many different cell types that are necessary for the growth, maturation, and protection of the oocyte.<sup>3-6</sup> Although much is known about the hormonal regulation of cells of antral and preovulatory follicles, little is known about the early stages of follicular development in which the oocyte is recruited from meiotic arrest and the single layer of granulosa cells surrounding the oocyte begins to differentiate and proliferate. Even less is known about the functions of the immune system in the ovary.

### Morphologic Barriers and the Immune System of the Ovary

The ovarian follicle is surrounded by a basal lamina that separates the granulosa cell compartment of the follicle from the theca cell layer. It is these two cell types that respond to gonadotrophins to produce follicular estrogen.<sup>6</sup> To date, much of what we have learned with respect to the immune system of the ovary has been through studies to evaluate antibodies against the ZP with respect to infertility and contraceptive vaccine development. The ZP, a unique extracellular matrix, is formed early in ovarian follicular development, and its constituent proteins are synthesized and secreted soon after oocyte recruitment. The expression of these proteins is essential for normal follicular development.<sup>7-9</sup> This matrix plays important roles in the fertilization process and in the preimplantation stages of embryonic development. It also serves as a protective barrier for the oocyte during ovarian follicular development and has been implicated as an immune barrier to protect the oocyte from antibodies as well as immune cells. As this matrix is also known to trap or bind many proteins or other factors,<sup>10</sup>

From the Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Supported by the Mellon Foundation, Contraceptive Research, and Development Program (CONRAD), and NIHHD12347. This research was also sponsored by NIH HD 1911 through cooperative agreement U54 HD-07495 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction Research.

Address correspondence to: Dr. B. S. Dunbar, Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030. E-mail: bdunbar@bcm.tmc.edu

# Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Changning Yan, Pei Wang, Janet DeMayo, Francesco J. DeMayo, Julia A. Elvin, Cecilia Carino, Sarvamangala V. Prasad, Sheri S. Skinner, Bonnie S. Dunbar, Jennifer L. Dube, Anthony J. Celeste, and Martin M. Matzuk

Departments of Pathology (C.Y., M.M.M.), Molecular and Cellular Biology (P.W., J.D., F.J.D., C.C., S.V.P., S.S.S., B.S.D., M.M.M.), and Molecular and Human Genetics (J.A.E., M.M.M.) Baylor College of Medicine Houston, Texas, 77030

Department of Tissue Growth and Repair (J.L.D., A.J.C.) Genetics Institute, Inc. Cambridge, Massachusetts 02140

Knockout mouse technology has been used over the last decade to define the essential roles of ovarian-expressed genes and uncover genetic interactions. In particular, we have used this technology to study the function of multiple members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily including inhibins, activins, and growth differentiation factor 9 (GDF-9 or *Gdf9*). Knockout mice lacking GDF-9 are infertile due to a block in folliculogenesis at the primary follicle stage. In addition, recombinant GDF-9 regulates multiple cumulus granulosa cell functions in the periovarian period including hyaluronic acid synthesis and cumulus expansion. We have also cloned an oocyte-specific homolog of GDF-9 from mice and humans, which is termed bone morphogenetic protein 15 (BMP-15 or *Bmp15*). To define the function of BMP-15 in mice, we generated embryonic stem cells and knockout mice, which have a null mutation in this X-linked gene. Male chimeric and *Bmp15* null mice are normal and fertile. In contrast to *Bmp15* null males and *Gdf9* knockout females, *Bmp15* null females (*Bmp15*<sup>-/-</sup>) are subfertile and usually have minimal ovarian histopathological defects, but demonstrate decreased ovulation and fertilization rates. To further decipher possible direct or indirect genetic interactions between GDF-9 and BMP-15, we have generated double mutant mice lacking one or both alleles of these related homologs. Double homozygote females (*Bmp15*<sup>-/-</sup> *Gdf9*<sup>-/-</sup>) display oocyte loss and cysts and resemble *Gdf9*<sup>-/-</sup> mutants.

In contrast, *Bmp15*<sup>-/-</sup> *Gdf9*<sup>+/-</sup> female mice have more severe fertility defects than *Bmp15*<sup>-/-</sup> females, which appear to be due to abnormalities in ovarian folliculogenesis, cumulus cell physiology, and fertilization. Thus, the dosage of intact *Bmp15* and *Gdf9* alleles directly influences the destiny of the oocyte during folliculogenesis and in the periovarian period. These studies have important implications for human fertility control and the maintenance of fertility and normal ovarian physiology. (Molecular Endocrinology 15: 854-866, 2001)

## INTRODUCTION

Although important molecular events occur during all stages of mammalian ovarian folliculogenesis, few oocyte-expressed regulatory proteins have been identified. Our group and others have used embryonic stem (ES) cell technology to produce mouse models with ovarian abnormalities (for review, see Refs. 1 and 2). These knockout mouse models demonstrate defects in germ cell maintenance, proliferation, and development [e.g. *Dazl* knockout mice (3)], formation of primordial follicles [e.g. *Fign* knockout mice (4)], formation of secondary follicles [e.g. *Gdf9* knockout mice (5)], formation of antral follicles [e.g. *FSH $\beta$*  knockout mice (6)], ovulation [e.g. *cytochrome P-450 $\alpha$*  knockout mice (7) and progesterone receptor knockout mice (8)], or postovulation [e.g. *Mater* knockout mice (9)]. Whereas mutations in oocyte-expressed genes (e.g. *Fign*, *kit* receptor, and *Mater*) result in intrinsic defects in the oocyte or early embryo (4, 9, 10), growth differentiation factor 9 (GDF-9) is the only known oocyte-secreted growth factor that is required for somatic cell

- About us
- Current issue
- Forthcoming issues
- Archived issues
- Abstracts
- Online shopping
- Subscribe
- Special issues & books
- Affiliations
- Events & proceedings
- Techniques

### Localization of species conserved zona pellucida antigens in mammalian ovaries

Cecilia Cariño<sup>1</sup>, Sarvamangala Prasad<sup>2</sup>, Sheri Skinner<sup>2</sup>, Bohn Dunbar<sup>2</sup>, Mi Chirinos<sup>1</sup>, Eric Schwoebel<sup>2</sup>, Fernando Larrea<sup>1</sup>, Bonnie Dunbar<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, The National Institute of Medical Sciences and Nutrition Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico and <sup>2</sup>Department Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA

<sup>3</sup>Correspondence: Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030. Tel: +1 713 798 6255; F +1 713 798 7341; e-mail bdunbar@bcm.tmc.edu

#### Abstract

The mammalian zona pellucida (ZP) consists of three glycoproteins (ZP1, 2 and ZP3), which are variably conserved among species at the genomic amino acid levels. In order to evaluate the expression of ZP during ova development, a population of antibodies was selected that recognize species conserved antigenic domains of the three ZP proteins. Domain specific antibodies were selected from sera of rabbits immunized with all three native ZP proteins by elution of antibodies bound to each of the three human recombinant proteins expressed from cDNAs, using the baculovirus expression system in insect cells. Immunoblot analysis was used to characterize specificity of the antibodies and immunohistochemistry was used to evaluate stage specific expression of ZP proteins during ovarian follicular development in the mouse, baboon and human. This study demonstrates that the conserved domains of all three ZP proteins are localized in the oocyte extracellular matrix as well as in a subset of granulosa cells. However, this expression varies among species with respect to the stage and cell type during early stage ovarian follicular development. These antibodies should serve as excellent markers for evaluating early stages of human ovarian follicular development in the development of contraceptive agents.

**Keywords:** antibodies, baculovirus expression, granulosa cell, oocyte recombinant cDNA, zona pellucida

#### Introduction

The zona pellucida (ZP) is the extracellular matrix that plays important role sperm-egg interaction during the fertilization process (Yanagimachi, 1994). ZP is composed of three major glycoproteins that exhibit heterogeneity due to extensive post-translational modifications including glycosylation (Dunbar, 1994; Wassarman, 1988; Dunbar *et al.*, 1991). Using the mouse ZP nomenclature, ZP proteins from different mammalian species can be classified into three protein families: ZP1, ZP2, and ZP3 (see summary of nomenclature in Table 1). The considerable conservation in the structural domains, number and position of cysteine residues and potential N-linked glycosylation sites as well as intron/exon organization within each protein family from different species (reviews by Dunbar *et al.*, 1994; Epifano and Dean, 1994; Prasad *et al.*, 1997, 1999, 2000; McKleskey *et al.*, 1998).

**Table 1.** Comparison of the homology of ZP proteins from different species to human ZP proteins.<sup>a</sup>



RINCÓN DEL RESIDENTE

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Antígenos de zona pelúcida en el ovocito humano: su importancia en las estrategias anticonceptivas

Cecilia Cariño,\* Lorenza Díaz,\* Isabel Méndez\*

Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

*Zona pellucida antigens of human oocyte. Its relevance in contraceptive strategies*

### ABSTRACT

*The zona pellucida (ZP) is the extracellular matrix surrounding the mammalian oocyte. This matrix consists of three families called ZP1, ZP2 and ZP3. These proteins suffer several posttranslational modifications to give them different immunological and functional properties. In mice has been demonstrated the important role of ZP3 as a receptor of sperm. In the past, research in this field was limited for the difficulty to get enough biological material from different mammalian species, especially from human sources. Recently, several laboratories have expressed ZP recombinant proteins, allowing the study of the proteins under physiologic and pathophysiological conditions, giving the possibility to utilize ZP as a contraceptive target.*

**Key words.** Zona pellucida. Inmuncontracepción. Ovocito.

### GENERALIDADES

El proceso de fecundación en mamíferos comprende varios sucesos en los cuales la zona pelúcida (ZP) que rodea al ovocito, tiene un papel fundamental. Cualquier defecto en la capacidad del espermatozoide de penetrar esta matriz extracelular, conduce a la infecundidad. La ZP se forma alrededor del ovocito de los mamíferos durante los estadios iniciales de la ovogénesis (folículo primario y secundario), y tiene un aspecto fibrinogranular. Sin embargo, a pesar de su aspecto complejo, la ZP está compuesta de sólo tres tipos de glicoproteínas agrupadas en tres familias, que se han denominado como ZP1, ZP2 y ZP3 (Cuadro 1). Cada familia consiste de proteínas con el

### RESUMEN

La zona pelúcida (ZP) es una capa de glicoproteínas que rodea al ovocito de los mamíferos. Esta cubierta está formada por tres familias de glicoproteínas denominadas ZP1, ZP2 y ZP3, que difieren en sus propiedades inmunológicas y funcionales debido a modificaciones postraduccionales. Estudios llevados a cabo en el ratón sugieren que la función de estas proteínas se encuentra relacionada con el reconocimiento del espermatozoide por la ZP, confiriéndole muy probablemente la connotación de receptores. Esta observación ha permitido que varios laboratorios hayan iniciado la producción y obtención de las proteínas de la ZP, permitiendo la exploración de su papel en procesos fisiológicos y clínicos, y ha abierto la posibilidad de utilizarlas en el desarrollo de un método inmunológico anticonceptivo. En la actualidad la posibilidad de obtener anticuerpos específicos contra los constituyentes proteínicos de la ZP representa una estrategia novedosa para el control de la fertilidad en el humano.

**Palabras clave.** Zona pelúcida. Inmuncontracepción. Ovocito.

mismo esqueleto polipeptídico, aunque diferente patrón de glicosilación, lo que es resultado de modificaciones postraduccionales.<sup>15,17,60</sup> Sin embargo, entre las familias de diferentes especies se puede encontrar un alto grado de homología que va desde 50 a 98%.<sup>30</sup> Estas tres familias de proteínas representan el 95% de la masa total de la ZP. En las proteínas de cada familia se han identificado dominios estructurales semejantes. Los dominios comunes a las tres familias de proteínas son: un módulo ZP o dominio hidrofóbico de 260 aminoácidos y ocho residuos de cisteína que probablemente determinan la estructura tridimensional,<sup>8</sup> un dominio transmembranal hidrofóbico localizado en el extremo carboxilo terminal, y una señal de procesamiento proteolítico que se