

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

070126

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA
GLICOPROTEINAS DE ZONA PELUCIDA DE CERDO

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

Tesis que presenta el BIOLOGO NICOLAS ERNESTO DE
JESUS RODRIGUEZ AGUILERA, para obtener el Grado de
MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL.

México, D.F.

1984

30-VI-87 *Ru*

070126

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Miguel -- Betancourt Rule y la asesoría de los Doctores : - Ruben Darío Martínez (Facultad de Medicina UNAM) y Jesús Calderón Tinoco (Biología Celular CINVESTAV.)

Este trabajo fué parcialmente apoyado por
el subsidio de CONACyT : ICCBXN-001838.

A mis padres

Con cariño

A mis hermanos

A Virginia

por su apoyo, comprensión
y entusiasmo demostrados.

A Viky y Ernestito
mis queridos hijos

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Miguel Betancourt, compañero y amigo, su apoyo para la realización del presente estudio.

C O N T E N I D O

I INTRODUCCION

II MATERIAL Y METODO

III RESULTADOS

IV DISCUSION

V CONCLUSIONES

VI APENDICE

VII BIBLIOGRAFIA

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

A	Aminopterina
ABTS	Acido 2,2'-Azino-di(3 etil-benzotiazolin sulfónico)
APS	Persulfato de Amonio
BSA	Seroalbumina Bovina
CFA	Adjuvante completo de Freund
d	daltones
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Acido etilen di amino tetra acético
ELISA	Ensayo Inmuno Adsorvente con Enzima acoplada
FCS	Suero fetal de ternera
FITC	Isotiocianato de Fluoresceina
g	Fuerza de la gravedad
GLN	Glutamina
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
HGPRT	Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil-Transferasa
HT	Hipoxantina-Timidina
IEF	Isoelectroenfoque
IP	Intraperitoneal
Kd	Kilodalton
lb	Libras
M	Molar
mA	Miliamperes
NaN	Azida de sodio
NP 40	Nonidet P 40
PAGE	Electroforesis en gel de Poliacrilamida
PBS	Solución reguladora salina de fosfatos
PEG	Polietilenglicol
p/v	Peso a volumen
pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto isoeléctrico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPB	Solución reguladora de preparación de la muestra

SSB	Solución salina balanceada
TEMED	Tetrametiletildiamina
TK	Timidín cinasa
TRIS	Tris (hidroximetil)amino metano
UV	Ultravioleta
V	Volts
ZP	Zona Pelúcida
2-ME	2-Mercaptoetanol
ul	Microlitros
ug	Microgramos
+	Reducido con 2-ME
-	No reducido.

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

En 1975, Kohler y Milstein fusionando mieloma y células plasmáticas obtienen un hibridoma capaz de crecer en laboratorio, además de producir anticuerpos de una especificidad predefinida, a los cuales llaman anticuerpos monoclonales, por provenir las colonias de una sola célula, lo cual marca una nueva etapa en la inmunología, por la gran utilidad que esto representa para identificar células o moléculas. (Kohler y Milstein, 1975).

Los anticuerpos son proteínas globulares, con un peso molecular promedio de 150,000. Están formadas por cuatro cadenas peptídicas unidas entre sí por enlaces disulfuro. De las cuatro cadenas, cada par es idéntico entre sí, dos cadenas tienen un peso molecular de 25,000 y son llamadas cadenas ligeras y las otras de peso molecular promedio de 50,000 son llamadas cadenas pesadas. Esquemáticamente (fig. 1), la molécula se representa en forma de Y, de acuerdo a observaciones realizadas en microscopía electrónica (Roitt, 1980). El extremo amino se localiza en la porción donde se encuentran próximas las cadenas pesadas y ligeras y el extremo carboxilo en la base de la Y, donde solo se encuentran las cadenas pesadas.

Los aminoácidos que constituyen las cadenas presentan enlaces disulfuro intracatenarios que al unirse forman asas de aproximadamente 110 residuos. A cada asa se le da el nombre de dominio. Los aminoácidos que se localizan en el primer dominio del extremo amino varían de una molécula a otra, en tanto el resto permanece invariable, por lo que a la primera región se le denomina variable y al resto constante. Dentro de la región

variable existen zonas que se combinan directamente con el antígeno y que presentan un grado de variación mayor y que por tanto son llamadas regiones hipervariables.

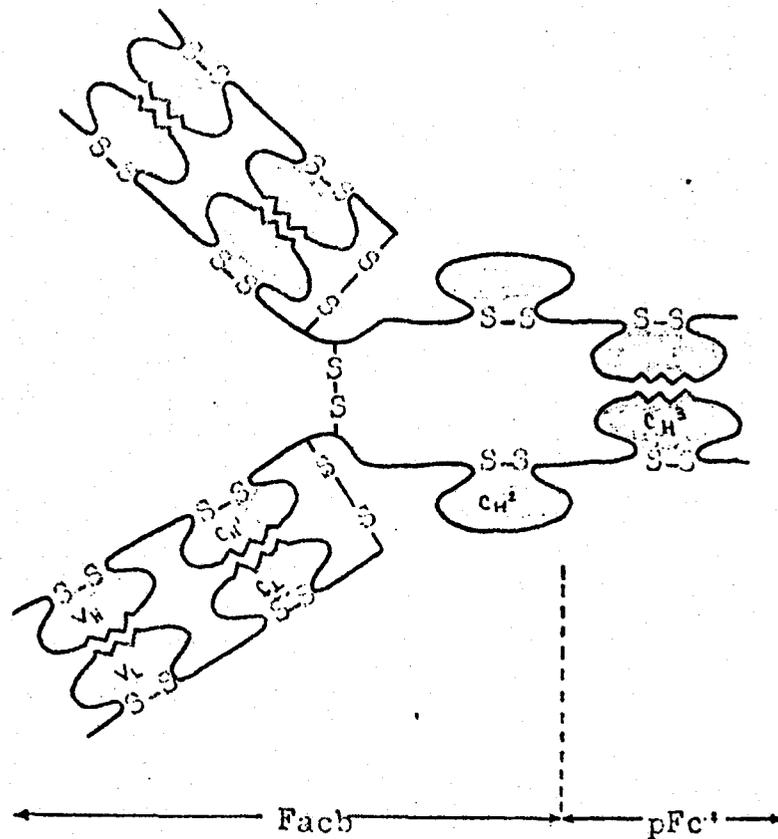


Fig. 1 Molécula de Inmunoglobulina G
(tomado de Roitt, 1980)

Sin embargo, también se pueden encontrar variaciones en la porción constante de las cadenas pesadas y por tanto en cuanto al tipo de aminoácidos; con base en estas diferencias se agrupan en cinco clases llamadas inmunoglobinas A, D, E, G, M, que se abrevian como: IgA, IgD, IgG, IgE, e IgM. La porción

constante de las cadenas ligeras puede ser de dos tipos, llamadas kappa (κ) y lamda (λ), (Roitt, 1980).

Los anticuerpos constituyen una importante herramienta en la investigación, ya que gracias a su especificidad permiten marcar e identificar moléculas aunque con el inconveniente de ser policlonales, ya que al inyectar a un animal con una sustancia extraña para él, el organismo al no reconocerla como propia empieza a secretar una familia de proteínas para combatirla, éstas proteínas son las inmunoglobulinas o anticuerpos, ellos no reconocen a toda la molécula extraña, sino solo una porción de ella llamada determinante antigénico, por lo que se forman tantos anticuerpos como determinantes posea el antígeno, lo que causa que el suero contenga una gran variedad de anticuerpos.

Los anticuerpos se producen cuando los linfocitos B entran en contacto con el antígeno y con mediadores de los linfocitos derivados del timo, sufren una serie de cambios morfológicos transformándose en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en otras células que guardan la información del antígeno y que por ello son llamadas linfocitos de memoria. (Lerner y Dixon, 1973).

La entrada de sustancias extrañas al organismo puede ocasionar dos tipos de respuestas: Una que se caracteriza por la producción y llegada al torrente sanguíneo de una gran cantidad de anticuerpos, llamada respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular que se caracteriza por la presencia de linfocitos T "sensibilizados" y que sintetizan linfocinas.

Cuando una célula de mamífero encuentra un antígeno por primera vez se da lugar a una respuesta primaria, la cual muestra una cinética que se puede apreciar en la fig. 2. Sin embargo, si el organismo encuentra posteriormente al antígeno, su respuesta será más rápida y de mayor magnitud. Esto es debido a que los linfocitos durante la respuesta primaria producen no solo células efectoras sino también células de memoria, las cuales retienen la capacidad de producir una progenie posterior de células tanto efectoras como de memoria al ser estimuladas por el antígeno original (Hood et al, 1978).

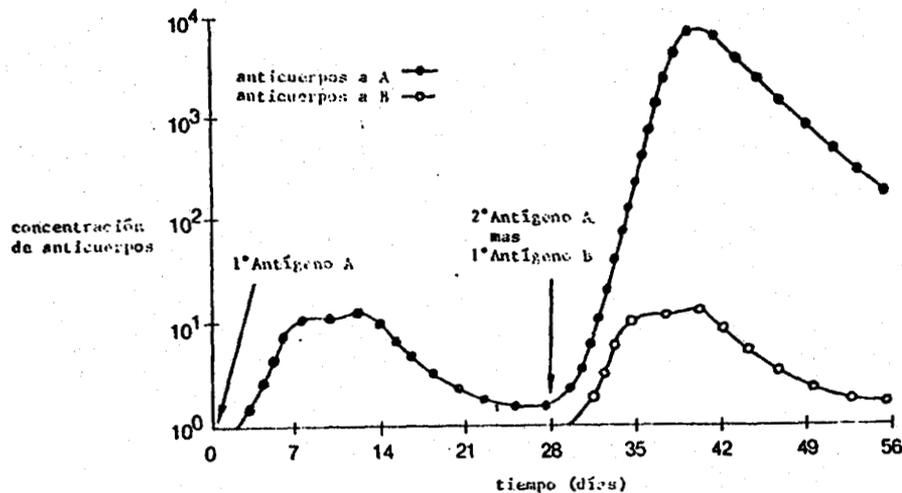


Fig.2 Cinética de la aparición de inmunoglobulinas en el suero, debido a una inmunización primaria y secundaria.

(Basado en Hood et al, 1978)

La teoría de la selección clonal indica que cada célula plasmática tiene la información necesaria para fabricar un determinado anticuerpo, por lo que al aislar una de ellas se originará una colonia de células idénticas o clona, la cual producirá un solo tipo de anticuerpos denominados monoclonales;

aunque aquí el problema que se presenta es la dificultad para mantener creciendo "in vitro" células plasmáticas productoras de anticuerpos, durante largo tiempo, ya que su vida media en cultivo es relativamente corta, aproximadamente de dos semanas. Una solución a este problema era el conocimiento de los mielomas, ya que estos se reproducen activamente y secretan un solo tipo de anticuerpo, sin embargo no es posible conocer contra que antígeno se sintetizan dichos anticuerpos. Teniendo así dos tipos de células, las plasmáticas productoras de anticuerpos y las d mieloma capaces de proliferar activamente "in vitro", una solución era la hibridización para tener en una sola "célula" las dos características es decir, el mantener las clonas durante largos periodos y el conocimiento de la especificidad de los anticuerpos sintetizados.

La hibridación celular no era desconocida pues Barsky (1960) la pudo observar cuando estudió dos líneas celulares heteroploides de ratón que crecían juntas, encontró la aparición de una nueva línea celular con un número de cromosomas cercano a la suma de las dos en estudio, estas eran claramente células híbridas que contenían en el núcleo los genomas de las dos parentales. Sin embargo, la formación espontánea de células híbridas es un evento muy poco común en cultivos mixtos de células de cualquier origen.

Harris y Watkins (1965) descubren y publican el uso del virus Sendai para aumentar la frecuencia de la fusión celular de diferentes especies como son las humana (HeLa) y la del ratón, con lo cual se logran formar híbridos de multiplicación indefinida. Cuando se requiere aislar las colonias de células híbridas de las progenitoras, se recurre al empleo de medios selectivos que permitan el crecimiento únicamente de las híbridas.

En 1964 Littlefield basado en estudios de genética microbiana desarrolla un medio selectivo para células de ratNon, una resistente a la 8-azaguanina y por tanto deficiente en la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) y otra resistente a la 5-bromodesoxiuridina y por tanto deficiente en la enzima timidin cinasa (TK), dichas enzimas se requieren para una de las dos vías de síntesis de nucleótidos, la llamada vía de salvación, por lo que ambas solo pueden utilizar la vía "de novo" para esta síntesis. Dicha vía es susceptible de ser bloqueada por la aminopterina (A), (análogo del ácido fólico) con lo cual solamente las células que se hibridicen, al compartir su carga genética, podrán subsistir en un medio con A (fig. 3)

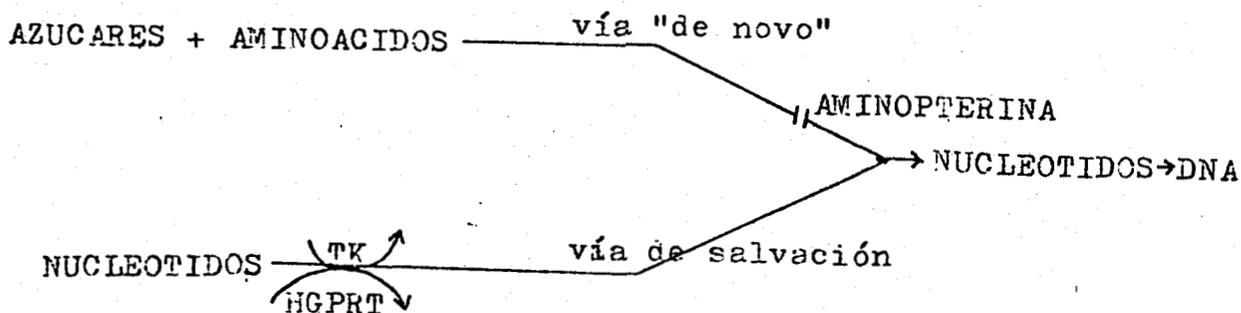


Fig. 3 Vías de la síntesis de nucleótidos
(Adaptado de Ephrussi, 1972)

Basados en este sistema de selección, Davidson y Ephrussi (1965) desarrollaron un sistema semiselectivo en el que se emplea solo una célula HGPRT y otra normal y se crecen los híbridos en presencia de A (Ephrussi, 1972).

En 1975 Pontercorvo introduce el polietilen glicol (PEG), el cual demuestra ser un eficiente fusógeno de células de mamíferos. Se han probado variaciones a la técnica de uso del PEG, como la adición de dimetilsulfoxido (DMSO) en porcentajes bajos (Norwood, et al, 1976); la fusión en presencia de lectinas (Mercer y Schlegel, 1979) y el hacerlo en medios libres de calcio (Schneiderman et al, 1979), todo esto con la idea de incrementar el porcentaje de fusión celular y reducir el tiempo de exposición al PEG dada su citotoxicidad.

La hibridación de células somáticas ha sido muy útil para distinguir las diferentes expresiones de los genes humanos y localizar su posición en los respectivos cromosomas, para distinguir los productos de diferentes especies y ha sido una herramienta muy importante en el mapeo genético (Ruddle y Kucherlapati, 1974), pero en la actualidad su uso se ha extendido a diversos campos de la investigación, desde que la hibridación celular es la base para la obtención de anticuerpos monoclonales y estos se sintetizan en contra de una amplia variedad de antígenos (cuadro 1).

Una característica de las células híbridas es su tendencia a perder cromosomas hasta que se estabilizan, por lo cual el número cromosómico de un hibridoma es menor al número esperado de la combinación de los progenitores. La pérdida de cromosomas se realiza al azar, con lo cual pueden perderse los homólogos de cualquiera de las dos células originales, lo que puede provocar la presencia de hibridomas que no subsistan en medio selectivo, así como otros que dejen de sintetizar

el anticuerpo deseado, por lo que periódicamente se habrá de probar contra el antígeno la clona que está produciendo el

anticuerpo deseado y subclonando las colonias positivas.

Con esta metodología se pueden obtener anticuerpos de una sola estirpe contra prácticamente cualquier molécula con propiedades antigénicas o contra haptenos conjugados con un acarreador, lo cual explica el auge de los anticuerpos monoclonales.

CUADRO 1

ANTIGENOS EN CONTRA DE LOS QUE SE HA LOGRADO PRODUCIR ANTICUERPOS MONOCLONALES.

RECEPTORES DE MEMBRANA

Acetilcolina Nicotínico (Gómez et al, 1979 y Lennon
et al, 1980)

Estrofilina (Greene et al, 1980)

Acetilcolina (Lennon y Lambert, 1980; Moshly-R et al,
1979 y Tzarton y Lindstrom, 1980)

PROTEINAS

Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Dao et al, 1982)

Serotonina (Chan-Paly, 1979)

Glicoproteínas de membrana (Edwards, 1980)

Colágena (Linsenmayer et al, 1979 y Linsenmayer
y Hendrix, 1980)

Albúmina (Doyen et al, 1981)

Transferrina (Bartek et al, 1982)

Glicolípidos (Young et al, 1979)

ANTIGENOS DE SUPERFICIE CELULAR

De histocompatibilidad y H-2 (Askonas y Webster, 1980)

Retina (Barnstabel, 1980)
 Eritrocito A y HLA (Barnstable et al, 1980)
 Sangre periférica (Eisenbarth et al, 1980)
 Membrana plasmática (Eisenbarth et al, 1979)
 H -2 (Epstein et al, 1980)
 de ratón (Hämmerling, 1978)
 Histocompatibilidad (Lemke, 1978)
 HLA-A2 (Parham y Bodmer, 1978)
 Linfocitos T (Le Bien y Kersey, 1980)

MICROORGANISMOS

Toxoplasma gondii (Sethi et al, 1980)
 Schistosoma mansoni (Verwaerde et al, 1979)

VIRUS

Cápside viral (Droszlan y Nowinsky, 1980)
 Herpes simplex (Balachandran et al, 1982 y Zweig et al,
 1979)
 Leucemia (Nowinski et al, 1980 y Lostrom et al, 1979)
 Rabia (Wiktor y Koprowski, 1978)
 Nucleocápside (Flamand et al, 1980)
 Glicoproteína viral (Flamand et al, 1980b y Frankel
 et al, 1979)
 SV-40 (Gurney et al, 1980)
 Epstein-Barr (Hoffman et al, 1980)

VARIOS

RNA-Ribosomal (Eliat, 1980)
 DNP (Eshhar et al, 1980 y Liu et al, 1980)
 Teratocarcinoma (Goodfellow et al, 1979)
 DNA Hann et al, 1980)
 Hormona de crecimiento (Ivanyi y Davies, 1980)
 Inteferon (Scher y Burke, 1980 y Hochkeppel et al, 1982)
 Carbohidratos (Bundel et al, 1982)

FERTILIZACION.

En mamíferos, la reproducción se lleva a cabo cuando un espermatozoide llega hasta el óvulo, atravesando la gruesa capa que lo recubre para alcanzar la membrana plasmática, poniéndose de esta manera en contacto los núcleos haploides masculino y femenino para completar así el número cromosómico característico de la especie y dar origen al huevo, el cual por sucesivas divisiones dará lugar a un nuevo ser.

El proceso de la fecundación puede dividirse en tres fases principales: El reconocimiento del óvulo por el espermatozoide, la regulación de la entrada de espermatozoides al óvulo y la activación del metabolismo del óvulo para dar comienzo a la división celular y el desarrollo embrionario (Epel, 1977).

El reconocimiento del espermatozoide y el óvulo, requiere de la previa asociación de éstos, lo que involucra una unión preliminar del espermatozoide a un receptor específico, localizado en la porción más externa de la cubierta del óvulo y que aparentemente es la porción glúcida o una glicoproteína (Florman, 1983), dicho receptor es responsable de prevenir la polispermia y que espermatozoides de la especie no fertilicen a otra (Hanada, 1972), lo que se comprueba al presentarse la fertilización entre diferentes especies cuando se remueve la capa gelatinosa que cubre al óvulo y con ello al receptor (Yanagimachi, 1972).

Al entrar en contacto el espermatozoide con la capa

gelatinosa, ó zona pelúcida, que recubre al óvulo, ciertas sustancias de esta capa interactúan con la porción anterior de la membrana plasmática del espermatozoide, llamada acrosoma, la cual a consecuencia de su interacción libera enzimas: acrosina, hialuronidasa y proteasas, que le permiten abrirse paso por una abertura de la capa que envuelve al óvulo y llegar hasta la membrana plasmática (Epel, 1977; Dunbar et al, 1981).

Los ovocitos de muchas especies estan rodeados por envolturas que incluyen la zona pelúcida (ZP), en mamíferos (Austin, 1961 y Piko, 1969) y peces (Nakano, 1969) y la envolutra vitelina en invertebrados (Heller, 1976 y Glabe, 1977) y anfibios (Wolfe, 1976). La ZP en mamíferos es la estructura glicoproteica extracelular que rodea los ovocitos; es formada durante el desarrollo del ovocito, rodea al embrión después de la fertilización y permanece en este sitio hasta la implantación (Dunbar, 1983). La ZP desempeña varias funciones como son: El reconocimiento especie específico del esperma (Yanagimachi, 1972), la prevención de la polispermia (Dunbar et al, 1981) la protección mecánica del óvulo en el ovario (Sacco, 1981), del embrión durante su paso a través del oviducto (Gwatkin, 1963), la regulación osmótica del huevo y del embrión, el mantenimiento de un patrón de división normal y la prevención de la fusión del huevo (Mintz, 1962), así como la prevención de la adhesión del huevo en el oviducto (Modlinski, 1970).

Cuando el espermatozoide se pone en contacto con la superficie del huevo, en algunas especies se origina la reacción cortical que principia con la ruptura de los gránulos corticales, la fusión del espermatozoide con la membrana

plasmática del huevo y la liberación del material de los gránulos corticales en el espacio perivitelino (Szollosi, 1967) este material que probablemente sea una enzima parecida a la tripsina, parece hidrolizar parcialmente ciertas proteínas de la ZP, originando la destrucción o alteración de sitios receptivos espermáticos, además de incrementar la resistencia de la zona al ataque químico.

Dada la importancia de esta estructura durante la fecundación, ha despertado interés el conocer más a fondo cual es su composición química y morfológica y que cambios se presentan durante este proceso, así se han hecho estudios bioquímicos estructurales que indican que su composición química y estructural son complejas. Al verse bajo microscopía de luz aparece como una membrana traslúcida con un grosor de 1 a 27 μm (Dunbar, 1983), como se puede apreciar en el cuadro 2 y con un diámetro de 60 a 70 μm (Dunbar et al, 1978) dependiendo de la especie.

Existen diferencias entre las especies en esta estructura, en tanto en algunas especies es homogénea como en el cerdo, (Fig. 4B). En otros se pueden apreciar dos o más capas concéntricas diferentes en densidad y apariencia como en el caso de la ZP de conejo (Fig. 4A). Cuando hay varias capas la más granulosa que otras (Sacco, 1981).

La microscopía electrónica de transmisión, muestra una intrincada estructura filamentosa. Desde que se desarrolla el primer cuerpo polar se retraen las vellosidades y se forma el espacio perivitelino.

CUADRO 2

TAMAÑOS RELATIVOS DE ZONA PELUCIDA
DE ALGUNAS ESPECIES DE MAMIFEROS.

Especie	Grosor de la Zona (um)	Referencias
Zarigüeya (Com. Pers.)	1-2	J.M. Bredfor
Ratón 1964	5	Lowenstein y Cohon
Hamster	8	Austin, 1961
Humano	13	Austin, 1961
Oveja (maduro)	14.5	Wright, 1977
Oveja (inmaduro)	14.5	Wright, 1977
Conejo	15	Austin, 1965
Cerdo publicado	16	J.M. Dunbar, no
Vaca	27	Wright, 1977

Tomado de Dunbar, 1983.

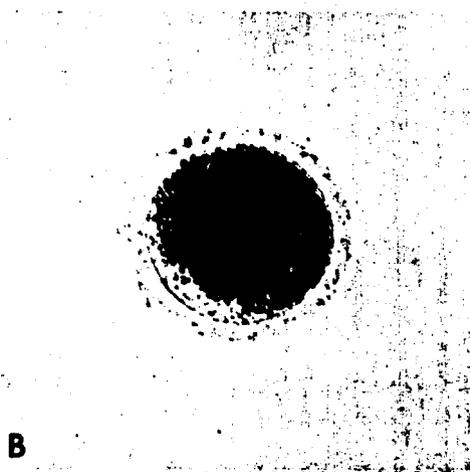
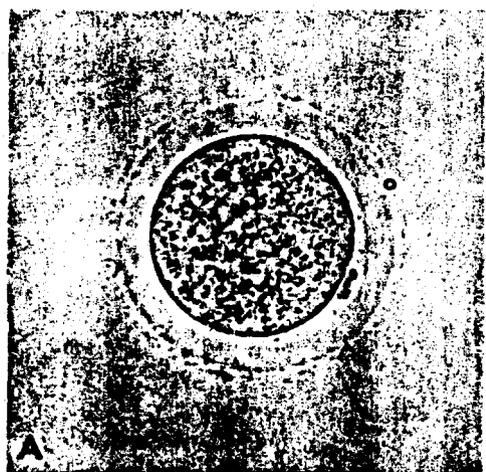


Fig. 4 Ovocito de: A Conejo B Cerdo

La microscopía electrónica de barrido muestra que la ultraestructura de su superficie consta de una red de fibras que presentan numerosos poros de varios tamaños. Estos poros son mayores en la superficie externa y decrecen hacia el interior (Dudkiewicz, 1977 y Sacco, 1981) (fig. 5).

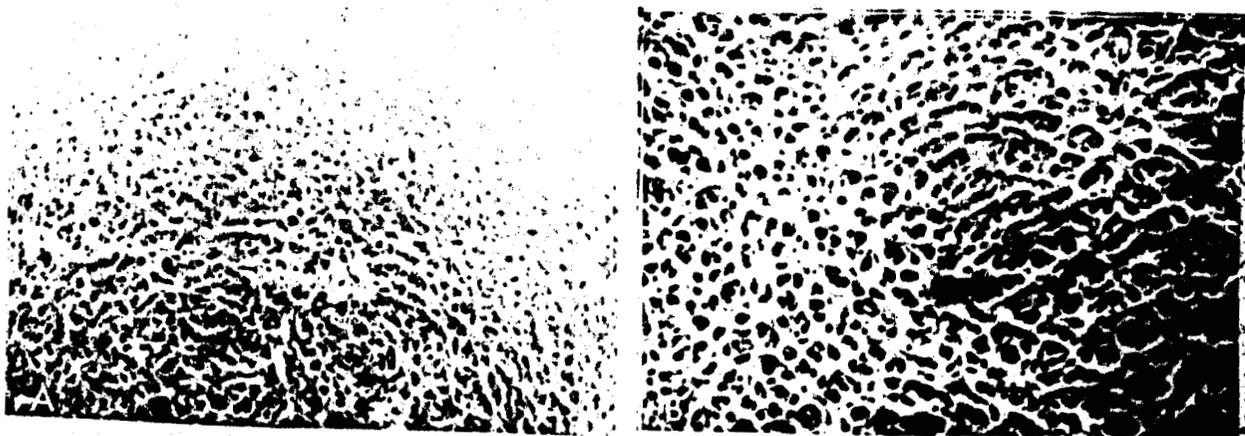


Fig. 5 Microscopía electrónica de barrido de la zona pelúcida

de ratón. A) 6,800 X B) 17,000 X

(Tomado de Sacco, 1981).

Los estudios sobre las propiedades fisicoquímicas de la ZP habían avanzado lentamente debido al pequeño tamaño del ovocito (157 μm), el reducido grosor de la zona y la dificultad para obtener suficiente cantidad de material no contaminado para proceder a su análisis, pero gracias a una técnica desarrollada por Dunbar et al (1980) ha sido posible obtener una mayor información. Así se sabe actualmente a partir de estudios realizados en ZP porcina, que esta se compone principalmente de una 71% de proteínas y un 19% de

carbohidratos (Dunbar et al, 1980); entre los monoscáridos encontrados estan los que normalmente se encuentran en las glicoproteínas: fucosa, manosa, galactosa y ácido N-acetil glucorónico, así como ésteres de sulfato y fosfato. (cuadro 3)

Se han reportado contenidos protéicos de 1.8 a 4.8 ng. en ZP de ratón, 5 ng. en rata y 33 ng. para ZP de cerdo (Lowenstein y Cohen, 1964; Bleil y Wasserman, 1978; Repin y Akimova, 1976 y Dunbar et al, 1978).

CUADRO 3

CARACTERISTICAS QUIMICAS DE LA ZONA PELUCIDA DE CERDO.

Componente	ng./zona	Proteína ug/mg	Total %
Proteína	33	1,000	71
Hexosas Neutras	8.7	264	19
Acidos Urónicos	1.1	34	2.4
Acido Siálico	1.3	38	2.7
Acil-ácido graso	1.3	38	2.7
Sulfatos	0.59	18	1.3
Fosfato	0.50	15	1.1
Total	46.5		100.2

Aunque hay un reporte (Noda et al, 1983), en que solo se obtienen dos glicoproteínas de peso molecular 60,000 y 96,000, los experimentos realizados por Sacco et al (1981) y los realizados por Dunbar et al (1980), con electroforesis bidimensional en gel con dodecilsulfato de sodio (SDS) indican que la ZP porcina esta compuesta por tres familias de glicoproteínas (fig. 6). Cuyos miembros presentan pesos moleculares muy similares, un pH ácido y con un pI variable (Hedrick y Wardrip, 1981), y que la interacción de estas macromoléculas forman complejos supramoleculares. Se sugiere que las interacciones no covalentes entre las macromoléculas glicoproteicas mantienen la integridad estructural gruesa de la zona y que la ruptura de estos puentes por calor, cambios de pH o de fuerza iónica, dan como resultado una preparación de ZP solubilizada compuesta de complejos supramoleculares. La integridad de estos complejos se mantiene por fuerzas covalentes que pueden ser eliminados por agentes reductores como el mercaptoetanol y el SDS, para producir preparaciones monoméricas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida, de preparaciones de zona solubilizada, ha revelado de tres a cinco macromoléculas en la ZP de ratón (Bleil y Wassarman, 1978 y Repin y Akimova, 1976), tres de la ZP de rata (Repin y Akimova, 1976) y tres principales en la ZP de cerdo (Dunbar et al, 1980).

Los miembros de una familia dada tienen la misma cadena polipeptídica como lo muestran los estudios de mapeo peptídico utilizando proteólisis limitada (Hedrick y Wardrip, 1981).

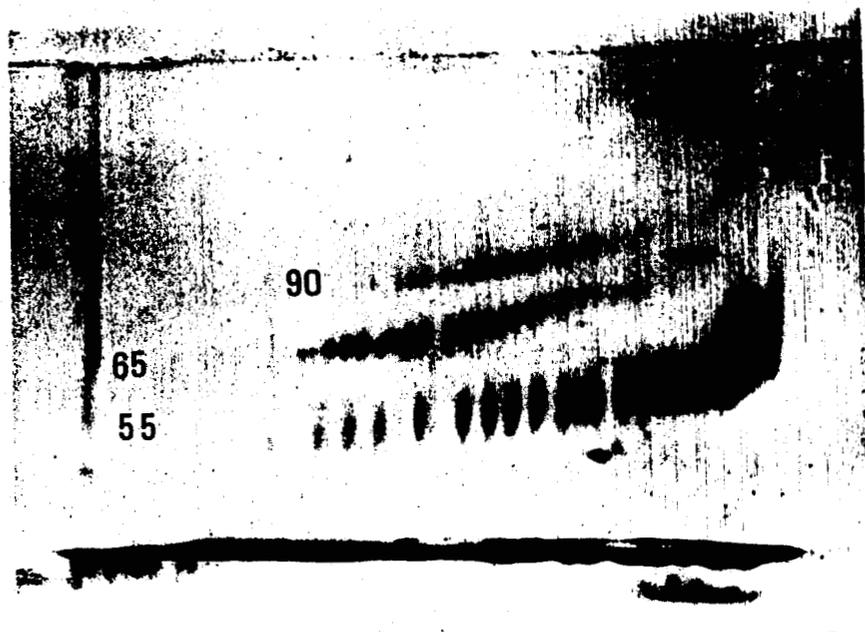


Fig. 5 Electroforesis bidimensional de ZP porcina solubilizada, mostrando las tres familias de glicoproteínas de peso molecular 55,65 y 90 Kd.

Trabajando con electroforesis bidimensional puede apreciarse que tanto la ZP de conejo como la de cerdo y la de humano están compuestas por tres familias principales de glicoproteínas debilmente ácidas, con pesos moleculares promedio de 55,000, 65,000 y 90,000 daltones (Sacco et al, 1981 y Hedrick y Wardrip, 1981); en tanto que el mono ardilla presenta 4 familias y sólo dos fueron observadas en la ZP de ratón (Sacco et al, 1981), aunque se desconoce su distribución topográfica "in situ" (C. Davis 4).

CUADRO 4

PESOS MOLECULARES DE MACROMOLECULAS PRESENTES
EN ZONA PELUCIDA DE VARIAS ESPECIES.

especies	Macromolécula	Rango de peso molecular
Cerdo	1	82,000-118,000
	2	58,000- 96,000
	3	40,000- 74,000
Humano	1	80,000-120,000
	2	73,000
	3	59,000- 65,000
Mono ardilla	1	63,000- 78,000
	2	63,000- 70,000
	3	47,000- 51,000
	4	43,000- 47,000
Conejo	1	100,000-118,000
	2	83,000-110,000
	3	80,000- 92,000
Ratón	1	116,000-122,000
	2	90,000- 92,000

(Tomado de Sacco et al. 1981)

En términos de sus propiedades inmunológicas, la ZP presenta un gran interés, ya que anticuerpos preparados en contra de ella inhiben la unión con el espermatozoide, impidiendo o reduciendo la fertilización tanto "in vitro" como "in vivo" (Dunbar y Raynor, 1980) lo cual ya ha sido demostrado en varias especies e incluso otros investigadores han sugerido que estos anticuerpos puedan estar involucrados en algunos casos de infertilidad en la mujer, lo cual reviste particular interés, ya que se han encontrado autoanticuerpos contra zona pelúcida en mujeres estériles. (Mori et al, 1979 y Bousquet et al, 1982), dichos anticuerpos fueron detectados en el suero del 72% de un grupo de mujeres infértiles (Shivers y Dunbar, 1977) así como también en mujeres de edad avanzada (Nishimoto et al, 1980), lo que sugiere su participación en algunos casos de infertilidad.

El concepto de interferencia inmunológica, en los procesos reproductivos con fines de control de la fertilidad, han sido investigados desde hace varios años, ya que presentan varias ventajas, porque:

- i) No son abortivos pero inhiben la fertilización
- ii) La fertilización puede ser bloqueada por anticuerpos a títulos bajos
- iii) Los anticuerpos de ZP son tejido-específicos
- iv) La ZP de varias especies animales presenta reacción cruzada, lo que permite tener una fuente de material antigénico disponible para su purificación y su caracterización (Shivers, 1977; Dunbar y Shivers, 1976 y Sacco y Shivers, 1978).

Los anticuerpos producidos en contra de la ZP alteran su superficie de tal forma que los sitios receptores no pueden

ser utilizados por los espermatozoides, ya que los anticuerpos ocupan la ZP que cubre al óvulo, formandose una capa de precipitación en la superficie externa, impidiendo la adhesión del espermatozoide, así como la lisis de la zona y por tanto inhibiendo la fertilización. Finalmente en el caso de huevos fertilizados, estos anticuerpos previenen el escape del embrión por la zona con lo cual se impide la implantación.

Se ha observado que existe una reacción cruzada entre la ZP de varias especies; en particular entre ZP porcina y humana, (Shivers y Dunbar, 1977), de ahí que la ZP porcina resulte un modelo ideal para el estudio de la topografía de la misma, permitiendo una aproximación a la humana en cuanto a su respuesta a los anticuerpos y en cuanto a la infertilidad relacionada con éstos.

La detección de anticuerpos contra ZP ha sido restringida principalmente a métodos de microscopía de luz como la inmunofluorescencia, pruebas de precipitación de la ZP, el decremento de la disolución de la ZP por proteasas y a la inhibición de la unión con el espermatozoide y por tanto de la fertilización (Dunbar y Raynor, 1980); por lo anterior se antoja la utilización de una herramienta de marcaje específico para tratar de profundizar más en este problema. El uso de anticuerpos monoclonales específicos contra una sola familia de glicoproteínas de las que componen la ZP, pudieran servir como marcadores para ubicar su localización topográfica "in situ".

OBJETIVO:

Obtener anticuerpos monoclonales en contra de una familia de glicoproteínas de la ZP, que puedan ser utilizados como marcadores y para conocer su localización "in situ".

HIPOTESIS:

Si los anticuerpos monoclonales que se obtengan, reaccionan solamente contra una de las familias de glicoproteínas, de las que componen en un 90% la ZP del óvulo del cerdo, entonces será posible emplearlos como marcadores específicos para conocer su localización en la ZP del óvulo.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

OBTENCION DEL ANTIGENO:

El antígeno usado se obtuvo a partir de ovarios de cerdo.

Los ovocitos se extrajeron según el método de Dunbar et al, (1980), en el cual ocho litros de ovarios se pasaron dos veces por un cortador manual hecho a base de hojas de afeitar para abrir los folículos de Graff y dejar en libertad los ovocitos, los cuales se pasaron a través de una malla de "nylon" a un recipiente con ocho litros de solución reguladora de PBS-Citrato-EDTA a 4°C. La solución fué filtrada a través de mallas de "nylon" con orificios de 210, 149 y 74 um de diámetro, para recoger en los dos primeros los restos celulares y el material lipídico, partículas y contaminantes solubles y en el tercero los ovocitos completos. El filtrado es eliminado. Las mallas se lavaron con solución reguladora a presión para ayudar al proceso de filtración.

Los ovocitos retenidos en la malla de 74 um se pasaron a través de una malla de 150 um y el filtrado fué colectado nuevamente en una malla de 74 um; este proceso se repite de 5 a 7 veces con el fin de obtener una muestra cada vez más pura y en un volúmen menor. Cada vez se analizó el material al microscopio de disección para asegurar la presencia de los ovocitos.

Una vez obtenidos los ovocitos se homogenizaron en un aparato manual Potter-Elvehjem de teflon, metiendo y sacando el émbolo suavemente varias veces con el fin de destruir el ovocito y separar la ZP del mismo, el homogenado fué colectado

en un filtro de papel con poro de 50 μ m y lavado con la misma solución.

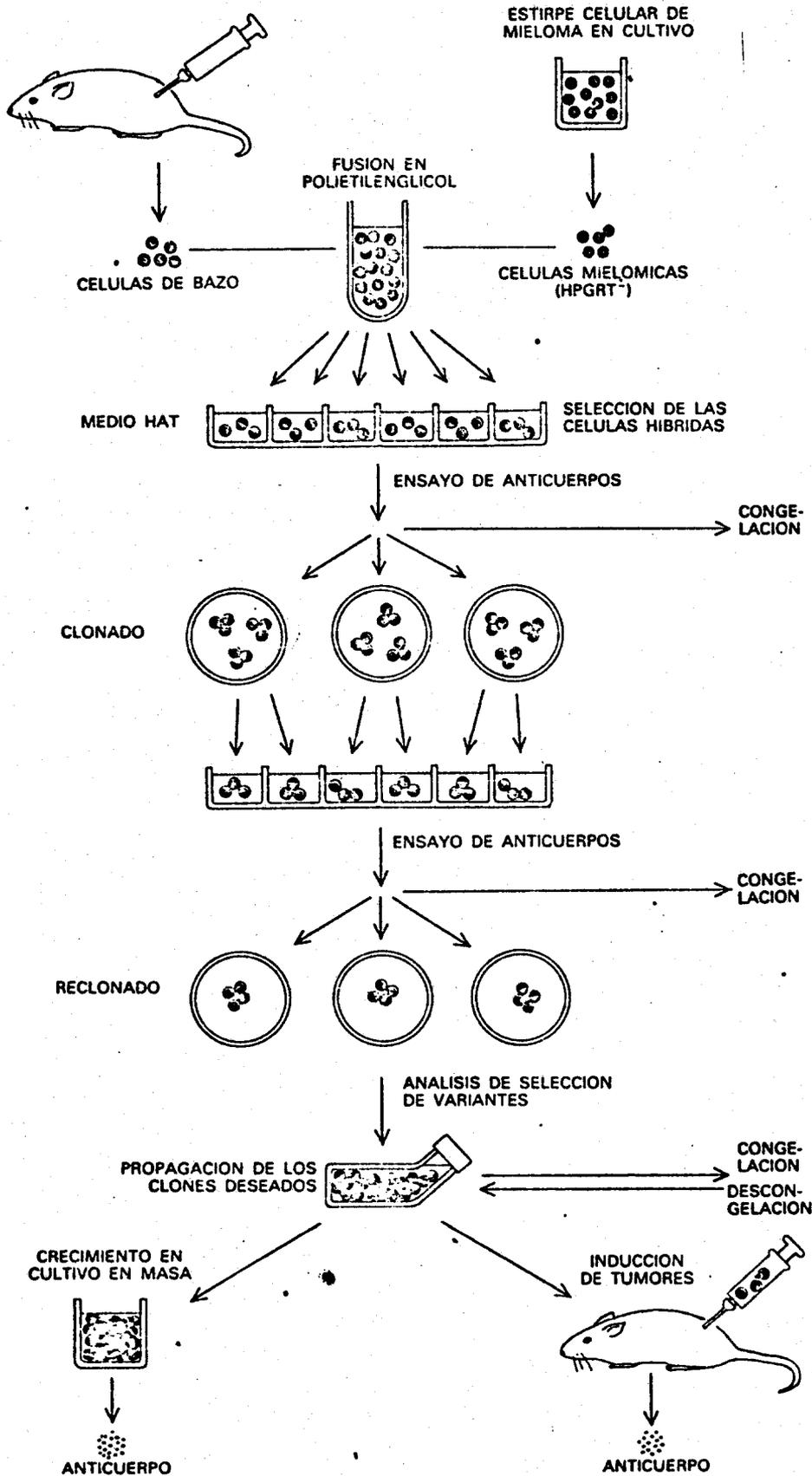
La ZP aislada se solubiliza con calor (70°C por 30 minutos) en 5 ml. de NH₄ HCO₃ 5mM. La concentración de proteína de esta solución fue de 2.4 mg/ml medida por el método de Lowry. De esta solución se diluyeron 2mg en 1 ml de solución reguladora para lisis, reductora y sin 2-mercaptoetanol (2-ME), con lo cual se reducen o no los enlaces disulfuro. La electrofóresis bidimensional se realiza por el método de Laemmli (1970), con el fin de identificar las glicoproteínas que componen la ZP. Para la primera dimensión se practicó un isoelectroenfoque (IEF) en el que se corrió una tira (slab) de 2 x 8.5 x 0.3 cm de acrilamida, urea y anfolinas durante 18 hrs. a 300 volts, en el cual las proteínas se separan de acuerdo a su pI. (O'Farrell, 1975).

La separación de proteínas por su peso molecular se hizo en un gel de poliacrilamida al 7%, con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), y un gel para equilibrar la muestra; el PAGE se prepara según el método de Laemmli (1970). La placa se corrió 18 hrs. y se pasó al gel de "equilibrio" donde se dejó por 30 minutos con agitación constante.

Para el SDS-PAGE se preparó primero el gel de corrimiento y sobre él, una vez que polimerizó se colocó el gel de "compactación" (stacking gel), una vez que se polimerizó éste, se colocó sobre él la tira de la primera dimensión sujetandola con una solución de agarosa al 1%, se aplicó una corriente de 70 V y se dejó correr por cuatro horas.

Las glicoproteínas ya separadas, se pueden hacer visibles usando el método de precipitación con acetato de

OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.



Esquema general para la obtención de anticuerpos monoclonales.

sodio (Higgins y Dahmus, 1979) el cual no requiere de tinción, de esta manera no se alteran las proteínas con colorantes u otros agentes, el gel corrido bidimensionalmente se pasa a una solución de acetato de sodio 4 M para precipitar el gel, excepto donde haya proteínas, por lo que con luz indirecta es posible localizarlas y marcarlas, para después cortar el gel con una navaja y eluirlas según el método de Gerton et al (1982), en donde se colocan las proteínas separadas en el aparato para elución electroforética, el cual se coloca en un dispositivo para electrofóresis con circulación entre los dos reservorios para la solución reguladora, mediante bomba peristáltica a una velocidad de 3ml/min. Se usó una solución de glicina, tris y SDS a pH 8.3, se tapó y se conectó el ánodo en el tanque superior dejándose correr por 18 hrs. con una corriente constante de 125 V, lo cual fué suficiente para recuperar la proteína. Hecho esto se retiró la tapa y se tomó el eluido con una pipeta Pasteur, de la cámara de colección, esta se ejuagó con 200 ul de buffer para incrementar la cantidad de proteína colectada, se dializó para eliminar el SDS y se cuantificó la concentración de proteína por el método de Lowry et al (1950) y se desecó la muestra en un liofilizador.

OBTENCION DE ANTICUERPOS:

CELULAS:

Se trabajó con células de mieloma de ratón de la línea P3X63Ag8.653 obtenidas cuatro años atrás por Köhler y Milstein (1975). La línea de Kearney tiene la ventaja de no ser secretora ni productora de cadenas de inmunoglobulina, además de ser deficientes en la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPGRT), la cual es metabólicamente requerida para la síntesis de purinas (Littlefield, 1964 y Ephrussi, 1972). Estas células se mantuvieron proliferando en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal de

ternera (Microlab), glutamina (Microlab), piruvato (Merck) aminoácidos no esenciales (Microlab), 2-ME (Merck) y antibióticos, en una atmósfera húmeda con 10% de CO₂ en aire.

INMUNIZACION:

El método de inmunización usado fue el descrito por Vaitukaitis et al (1971) con ligeras modificaciones: Treinta días antes de la fusión, se tomaron 40 ug de antígenos ZP en 0.25 ml de solución salina balanceada (SSB)(Microlab), emulsificándola con 0.25 ml de adjuvante completo de Freund (CFA) (Difco) e inyectándose por vía intraperitoneal (IP) en ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad.

La inmunización se repite tres días antes de la fusión celular sin usar CFA.

ANTIGENOS:

Se utilizó la glicoproteína de peso molecular 55,000 (55 Kd), una de las que componen la zona pelúcida de cerdo, reducida con 2-ME (55 K +).

LINFOCITOS:

Los ratones inmunizados 30 y 3 días antes, fueron sacrificados por dislocación cervical para extraer el bazo, el que se obtuvo de tres ratones para que al mezclarlos se tuviera una mayor probabilidad de obtener células productoras de anticuerpos. Los bazos se transfirieron a una caja de Petri con 5 ml de SSB y se maceraron con un émbolo de jeringa sobre una malla de metal y se pasó el homogenado a un

tubo estéril para centrifugarlo a 112 x g por 10 min. en una centrífuga Sorvall GLC-2; El botón celular se lavó con 5 ml de SSB, se centrifugó nuevamente y se contó el número de linfocitos en una cámara de Neubauer.

TIMOCITOS:

Se utilizaron a los timocitos como células "acompañantes" de los hibrodomas. Para obtenerlos se sacrificó un ratón BALB/c de 3 a 4 semanas de edad, y se extrajo el timo, el cual se maceró con un émbolo de jeringa de vidrio sobre una rejilla de metal, la suspensión obtenida se pasó a un tubo estéril, centrifugando a 112 x g por 10 min., en una centrífuga Sorvall GLC-2. El botón celular se resuspendió con DMEM HAT al 2%.

POLIETILENGLICOL:

Se preparó una solución al 50% p/v en DMEM mínimo. Antes de mezclar las células se esterilizó el PEG (de peso molecular 1540 daltones Baker) a 20 lb de presión por 20 minutos (Geftter et al, 1977 y Davidson et al, 1976). El pH se alcalinizó con NaOH 0.1 N estéril (Norwood, 1982).

FUSION:

Se llevó a cabo por el método de Galfre et al (1977), básicamente se tomaron 5×10^6 células de mieloma en fase de crecimiento logarítmico y 1.5×10^6 linfocitos de bazo, se centrifugaron 10 minutos a 112 x g para eliminar el medio de cultivo y sobre la pastilla celular se agregó 1 ml de PEG (Kennett et al, 1978 y Pontecorvo, 1976) durante dos minutos

agitando suave y constantemente, después se diluyó el PEG con 9 ml de DMEM agregándolo en 3 y medio min., se centrifugó durante 10 min. a 112 x g para eliminar el PEG; el botón se resuspendió en 5 ml de medio HAT y se agregaron los timocitos. Inmediatamente después de la fusión se colocaron en placas de titulación de 96 pozos (Linbro), colocando 0.1 ml de la suspensión con aproximadamente un millón de células en cada pozo. Siete días después se agregaron 0.1 ml de medio HT a cada pozo y siete días después se practicó el ensayo para la determinación de anticuerpos en los sobrenadantes, donde se apreciaron colonias.

DETERMINACION DE ANTICUERPOS:

Los pozos que presentaron buena proliferación celular fueron probados mediante un ensayo enzimático de fase sólida (ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Engvall y Perlmann, 1972). Se agregó a una placa, 0.5 ul de antígeno en cada pozo y se dejó por 18 hrs. hasta la evaporación total a 37C. La placa fue lavada tres veces con Solución salina de fosfato (PBS) 0.01 M pH8 y se añadieron 50 a 100 ul del sobrenadante de los pozos con colonias celulares, se incubó 20 min. a temperatura ambiente, se lavaron las placas diez veces con tween 80 al 0.05% en PBS. Se adicionaron a cada pozo 50 ul de solución de IgG de cabra anti-ratón conjugada a peroxidasa diluida 1:500 (Cappel) dejándose reaccionar por 10 min., las placas se lavaron diez veces con tween 80 al 0.05% en PBS y se adicionaron 100 ul de sustrato (ABTS-H₂O). Cada pozo fue analizado a simple vista o en un lector de ELISA (Dynatech) a 408 nm (Borrebaeck, 1981).

CLONACION:

Las células de los pozos que tuvieron una

mayor concentración de anticuerpos, se analizaron por la técnica de ELISA, fueron clonadas por dilución limitante según la técnica de Mc. Kearn (1981), colocándose de 30 a 50 células en cada pozo de la placa de microtitulación (Limbro) en cuatro ocasiones, utilizando timocitos como células "acompañantes".

EXPANSION:

A partir de la segunda clonación, las células con buena proliferación se expandieron, primero a placas de 24 pozos, luego a placas de 12 pozos y posteriormente a botellas de cultivo de 25 cm de superficie (Nunc), finalmente dos millones de hibridomas fueron inyectados por vía IP en ratones BALB/c de 6 semanas de edad, los cuales habían sido inyectados por vía IP siete y diez días antes con 0.5 ml de Pristan (2,6,10,14-tetrametilpentadecano Aldrich) que produce un tumor ascítico y facilita la obtención de anticuerpos en cantidades de 10 a 12 mg/ml (Potter, 1962).

CONGELACION:

Las células híbridas se mantuvieron en congelación para conservar la línea. Para esto 5×10^6 de células fueron centrifugadas a $112 \times g$ durante 10 min en una centrífuga Sorvall GLC-2 para formar un botón celular, se separó el sobrante y el botón fué resuspendido con 1 ml de dimetilsulfoxido (DMSO) al 10% en suero fetal de ternera (FCS) y colocado en un criotubo (Nunc), este se dejó una semana a $-70^{\circ}C$ en un congelador REVCO dentro de una caja de poliuretano y después se pasó a un recipiente con nitrógeno líquido, donde se conservaron las células hasta el momento de usarlas. La descongelación se hizo en baño María a $37^{\circ}C$ por uno a dos minutos y se centrifugaron a $112 \times g$ durante 10 min, se

resuspendieron las células en 5 ml de medio de cultivo y se guardaron en la incubadora a 37C (Kennett, 1981).

OBTENCION DEL LIQUIDO ASCITICO:

De diez a veinte días después de haber inyectado los hibridomas, se apreció el tumor ascítico en el ratón. Para obtener el líquido de ascitis se inyectó 5 ml de SSB (Microlab) por vía IP y se recobraron nuevamente con la misma jeringa obteniendo de esta manera el fluido ascítico, el cual se almacenó a -70C dentro de una caja de poliuretano.

ANALISIS DEL LIQUIDO ASCITICO:

El fluido ascítico se probó con las técnicas de Western Blott (Towbin, 1979) y electrofóresis (Laemmli, 1970).

Para probar la especificidad de los anticuerpos del fluido ascítico, se practicó la técnica de Western Blott que consistió en una electroforesis transversal. Para esto se acopló entre dos láminas de esponja (3 M) una hoja de papel de nitrocelulosa y el gel de poliacrilamida conteniendo las glicoproteínas de la ZP separadas por electrofóresis bidimensional, esto se prensó con dos placas perforadas de acrílico sujetándolas con dos ligas de hule, y en el sentido del gel hacia el papel se hizo pasar una corriente eléctrica. Hecho esto se tomó el papel de nitrocelulosa y se incubó una hora a temperatura ambiente en una solución de BSA-TRIS salino dejándose en agitación, se enjuagaron los "blotts" con solución TRIS-salina y se incubaron con 10 a 20% de líquido ascítico en solución (1 a 2 ml de líquido ascítico + 8 a 9

ml de BSA-TRIS-salino) y se dejó en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se recobró la solución con el fluido ascítico y se enjuagó el papel de nitrocelulosa con la solución durante 30 min (tres cambios de 10 min cada uno). Las muestras se incubaron 60 min en agitación, con 1.5 ml de anticuerpos anti IgG de ratón conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se lavó la muestra con solución amortiguadora TRIS-salino durante 30 min (tres cambios) con agitación y se examinaron bajo una fuente de luz ultravioleta (UV).

Para el análisis electroforético, se prepararon 70 ul de la muestra conteniendo 100 ug de proteína del fluido ascítico, en 45 ul de SDS al 2%, más 22.5 ul de solución de preparación de la muestra (SPB).

Se preparó un gel de poliacrilamida al 7% (Laemmli, 1970) y se depositó en el soporte, se agregó una pequeña capa de isobutanol saturado con agua y una vez que polimerizó se lavó y se agregó el gel de compactación, colocando el peine para hacer los carriles. Se pusieron las muestras en cada carril y se llenaron los pozos con solución reguladora.

Se dejó correr por dos a tres horas a 25 mA. Una vez que el frente del solvente estuvo a 1 cm del extremo inferior del gel, se sacó y se pasó a la solución de tinción A y se dejó toda la noche en agitación suave. Al día siguiente se pasó a la solución de tinción B, donde se dejó de cuatro a seis horas en agitación, después se pasó a una solución decolorante de ácido acético al 10% y se conservó en ésta.

ANALISIS CROMOSOMICO:

A una botella de cultivo con células en periodo de crecimiento logarítmico se le agregó colcemida (Microlab) a una concentración final de 0.4 ug/ml. Después de una hora de incubación, el contenido de los frascos de cultivo se pasó a tubos de centrifuga, se centrifugaron 10 min a 112 x g, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con una solución hipotónica de KCl 0.075 M, se llevó a un volumen final de 5 ml y se incubaron así a 37°C durante veinte minutos, se centrifugó nuevamente a 112 x g por 10 min, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió con solución fijadora Carnoyd (Metanol-ácido acético 3:1) a un volumen final de 5 ml; el material de fijación se dejó durante 15 min, trascurrido este tiempo se centrifugó y el paquete celular se lavó con solución fijadora hasta que se obtuvo un sobrenadante transparente. Finalmente el paquete celular se resuspendió en 0.5 ml de fijador para hacer las preparaciones, estas se realizaron mediante la técnica de secado a la flama. Los portaobjetos se lavaron previamente y se sumergieron en agua destilada fría con hielo, se agregaron tres gotas de la suspensión celular dejándolas caer de una altura aproximada de 30 cm, se les sopló lateralmente y se secaron a la flama. Se tiñeron con Giemsa (Merck) al 5% durante 4 min y posteriormente se montaron con resina sintética (Sigma) para su posterior análisis. (Moorhead, 1960).

R E S U L T A D O S

CELULAS:

Se trabajó con la línea de mieloma P3X63Ag8.653, debido a que estas células tienen la característica de no ser secretoras de anticuerpos, de esta manera se tiene la seguridad de que los anticuerpos monoclonales producidos son exclusivamente los condicionados por las células paternas de bazo y por tanto los que interesan para este estudio, lo cual se pudo confirmar en las bandas obtenidas en la electroforesis (Fig. 10).

ANTIGENO:

Poniendo en práctica la técnica que citan Dunbar et al (1980), se pudo obtener a partir de ovarios de cerdo una preparación de ovocitos con la zona pelúcida que los rodea; la pureza estimada fué de un 95% en las observaciones en el microscopio de disección, parte de esta pureza fué debida al uso de material de plástico, ya que la ZP tiene la peculiaridad de adherirse al vidrio y en cambio sustancias contaminantes como los lípidos tienen la tendencia a adherirse al plástico, por esto el uso de vasos y mallas de plástico durante la obtención y la filtración, incrementa el rendimiento en cuanto a ovocitos y la pureza debida a la retención de lípidos conaminantes por el plástico.

se pueden observar los ovocitos rodeados por una capa gruesa de material gelatinoso transparente en el microscopio de luz (Fig. 8), dicha capa

corresponden a la ZP, la cual es aproria íntegra y rodeando a cada uno de los ovocitos, el grosor de la ZP del ovocito de cerdo fué de 16 μm (Dunbar, 1983). Los ovocitos homogenizados que se lograron romper, dejaron en libertad la ZP íntegra la cual se observó como "fantasmas".

A partir de 2,000 ovarios de cerdo se obtuvieron aproximadamente 500,000 ovocitos de los cuales se extrajeron al rededor de 400,000 ZP, o sea un promedio de 200 ZP por ovario, que es una cantidad apropiada para trabajar; además es relativamente rápida pues en aproximadamente 5 hrs se obtienen las ZP a partir de los ovarios.

La concentración de proteína en la ZP obtenida fué de 3 mg/ml, lo que corresponde a 15 mg de ZP completa en un volumen final de 5 ml.

Los componentes de la ZP fueron separados de acuerdo a su punto isoeléctrico, primero y después de acuerdo a su peso molecular, lo cual se pudo apreciar claramente mediante la técnica de Higgins y Dahmus (1979), éste al precipitar el gel donde no hay proteínas, permitió apreciar tres zonas cristalinas en el gel de poliacrilamida-SDS, mismas que contenían las proteínas de la ZP, la mayor de estas zonas correspondió a una familia de glicoproteínas de peso molecular promedio de 55,000 Daltones (55 K), la familia que le siguió en tamaño fue la de peso molecular promedio de 65,000 (65 K) y la de menor dimensión correspondió a la de peso molecular de 90,000 Daltones (90 K).

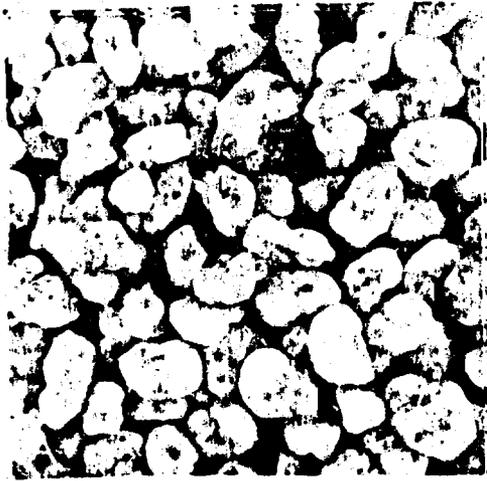


Fig. 7 Ovarios de cerdo
(Sacco, 1981)

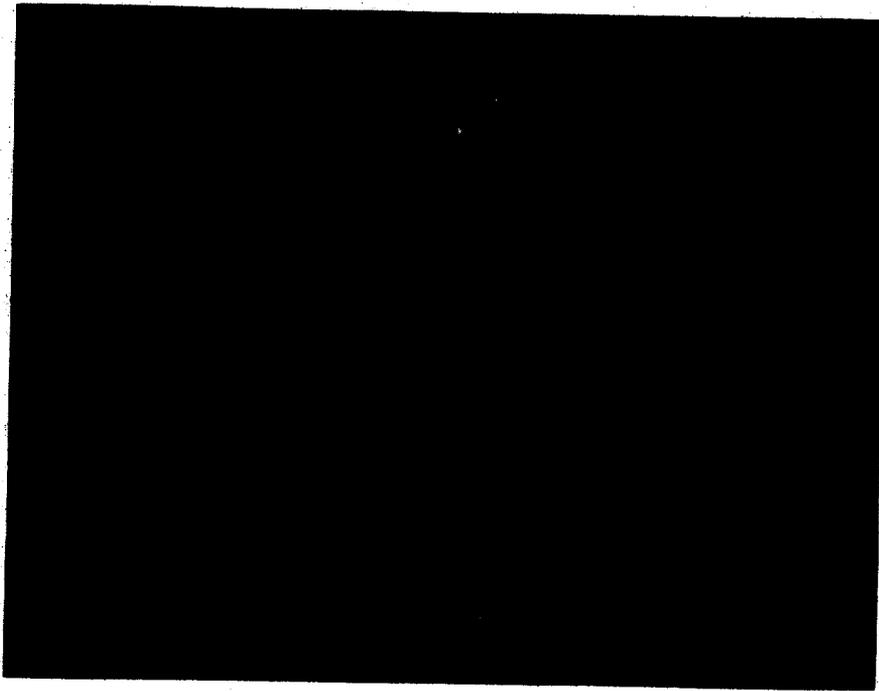


Fig. 8 Ovocitos de cerdo
obtenidos por la técnica
antes mencionada.

La elución de las fracciones se practicó en un aparato diseñado para este fin en el laboratorio del Dr. Hedrick (Gerton et al, 1982) acoplado a un aparato de electroforesis con la corriente ascendente (conectando el ánodo en el tanque superior y el cátodo en el inferior) y teniendo la precaución de colocar una membrana de diálisis entre el fin de la columna (cámara de colección) y el tanque superior, con lo que se logró el flujo de la solución pero se impidió el paso de la proteína, la cual se pudo coleccionar al día siguiente en la cámara de colección y fué liofilizada posteriormente. Con este procedimiento se obtuvo un 60% de la familia de glicoproteínas de peso molecular 55 K, un 30% de la familia de 65 K y un 20% de la familia de 90 K.

MEDIOS DE CULTIVO:

La línea de mieloma P3X63Ag8.653 creció adecuadamente en el medio de cultivo DMEM, suplementado con 20% de FCS, aminoácidos, 2-ME, insulina y antibióticos. Este medio resultó ser el mas apropiado dentro de las variaciones usadas (ver apéndice).

En este medio las células duplican su población cada 24 hrs. El volumen de células creciendo varió entre 3×10^5 a 2×10^6 ; las cajas de cultivo se diluyeron cada dos o tres días para evitar una sobrepoblación que puede conducir a la muerte de todas las células. Se cambiaron de botella cada siete a diez días para evitar la contaminación.

LINFODENOS:

El bazo se encontró hipertrofiado por efecto de la hiperinmunización y la concentración promedio de células fué de 80,000,000 por bazo.

TIMOCITOS:

La cantidad óptima de células tímicas fué de 125×10^6 timocitos por placa de 96 pozos y los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó timo de ratón de 3 a 4 semanas de edad.

OBTENCION DE COLONIAS HIBRIDAS Y COLONIAS SECRETORAS DE ANTICUERPOS:

Como resultado de la fusión, se obtuvo un 20% de pozos con crecimiento de colonias perfectamente apreciables al microscopio de luz. Los sobrenadantes de estos pozos fueron probados por el método de ELISA, obteniendo en un 6% de ellos una reacción positiva, a partir de ellos se realizó la primera clonación de donde en el 13% de los pozos proliferaron las células adecuadamente y de ellos el 88% dió positiva la reacción de ELISA. La segunda clonación con timocitos, como células "acompañantes" dió un 38% de pozos con colonias positivas, de estos el 50% tuvieron anticuerpos. Al practicar la tercera clonación el porcentaje de proliferación, fué del 28% y el 98% presentó anticuerpos. En la cuarta clonación, a partir de los pozos con mayor positividad y de una sola colonia en ellos, se obtuvo un 36% de crecimiento y la reacción de ELISA fué positiva en el 100% de los pozos, (Cuadro 5).

CUADRO 5

Crecimiento de colonias de células híbridas y positividad de anticuerpos por la reacción de ELISA.

	POZOS CON COLONIAS CELULARES	PRESENCIA DE ANTICUERPOS
FUSION	20%	6%
CLONACION I	13%	88%
CLONACION II	38%	50%
CLONACION III	28%	98%
CLONACION IV	36%	100%

DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN EL LIQUIDO ASCITICO:

Las células híbridas de la segunda, tercera y cuarta clonaciones se expandieron a pozos cada vez mayores y a cajas de cultivo de 25 cm² y de 75 cm² de superficie, con lo que se obtuvo un número mayor de hibridomas, de éstos, 5.5×10^6 se congelaron y 2×10^6 de células se inyectaron a ratones BALB/c previamente inyectados con pristan, con lo cual en un período de 12 a 25 días se pudo observar el desarrollo de un tumor en el ratón, de él se extrajo el líquido ascítico que se almacenó a -70°C; al probarlo por ELISA esta fué positiva, sin embargo para hacer esta prueba más específica se trató con papel de nitrocelulosa en el cual se había practicado la técnica de Western Blot a partir de geles de poliacrilamida de segunda dimensión conteniendo las tres familias de glicoproteínas las cuales pasaron al papel de nitrocelulosa; en contacto con este papel se colocaron los líquidos ascíticos, se dejaron toda la noche y después de enjuagar el papel con solución reguladora se adicionó el FITC conjugado al anti IgG de ratón, observando ahora que la inmunofluorescencia solo se aprecia en la familia 55 K, sobre todo hacia el extremo ácido en algunos casos; no se presentó positividad en ninguna de las otras dos familias. Se cruzó el mismo papel con anticuerpos contra ZP total para corroborar la presencia de las otras dos familias dando positiva ahora, la inmunofluorescencia contra las tres familias de glicoproteínas (Fig. 9).

Se practicó con el líquido ascítico un corrimiento electroforético en SDS-PAGE, con el fin de determinar si el anticuerpo obtenido era de clase IgG, por lo que se corrió en un pozo una muestra de IgG como control. En un caso se usaron las muestras sin reducir y en otro se redujeron previamente con 2-ME. En esta electroforesis se pudo observar el patrón de corrimiento

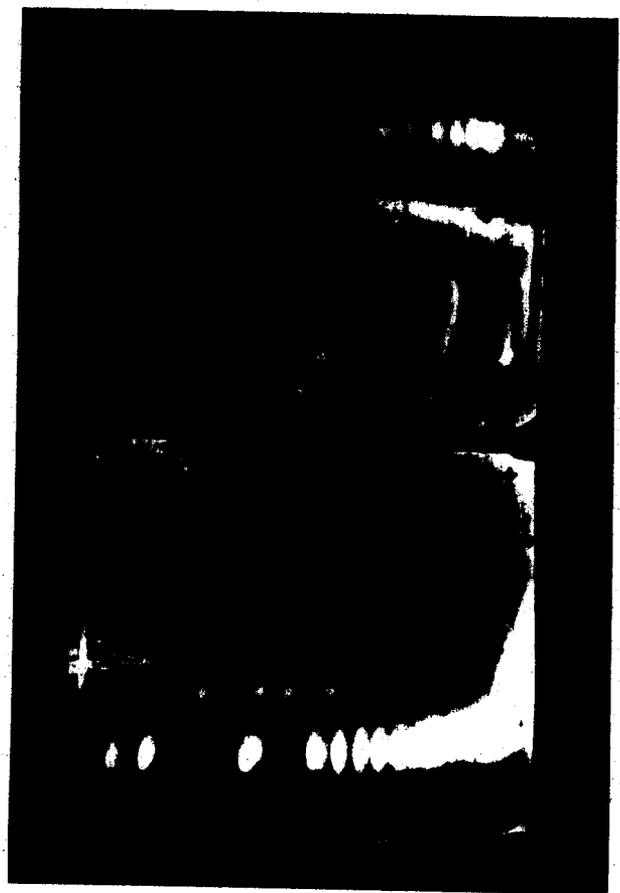
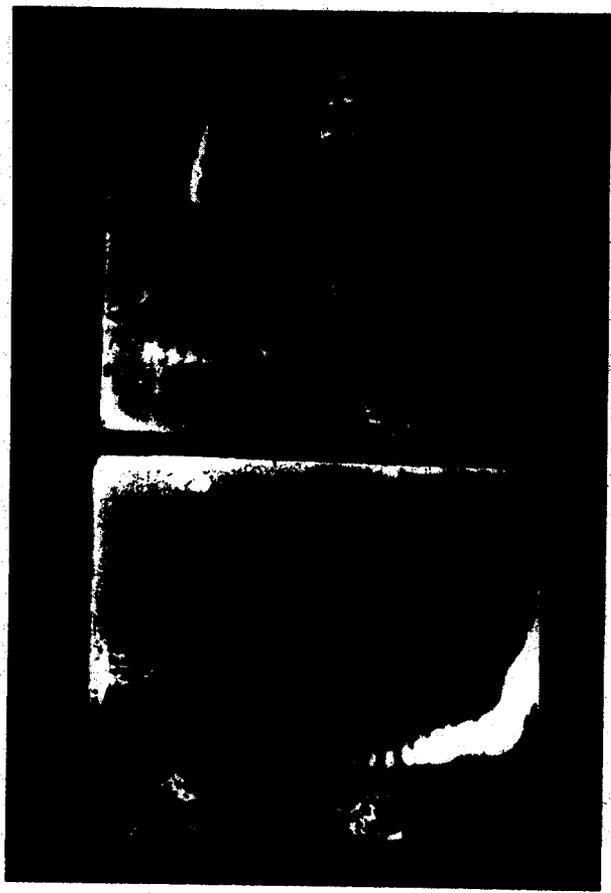
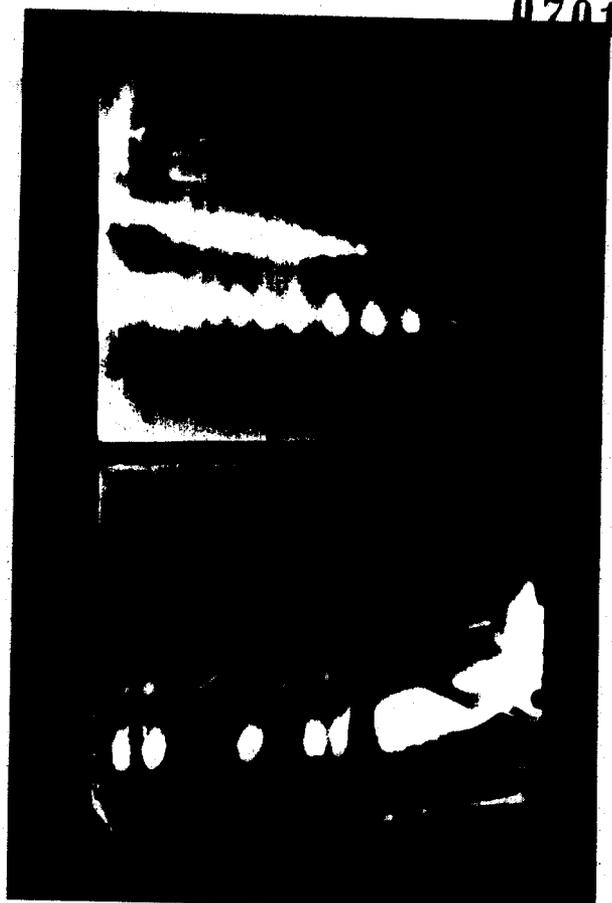
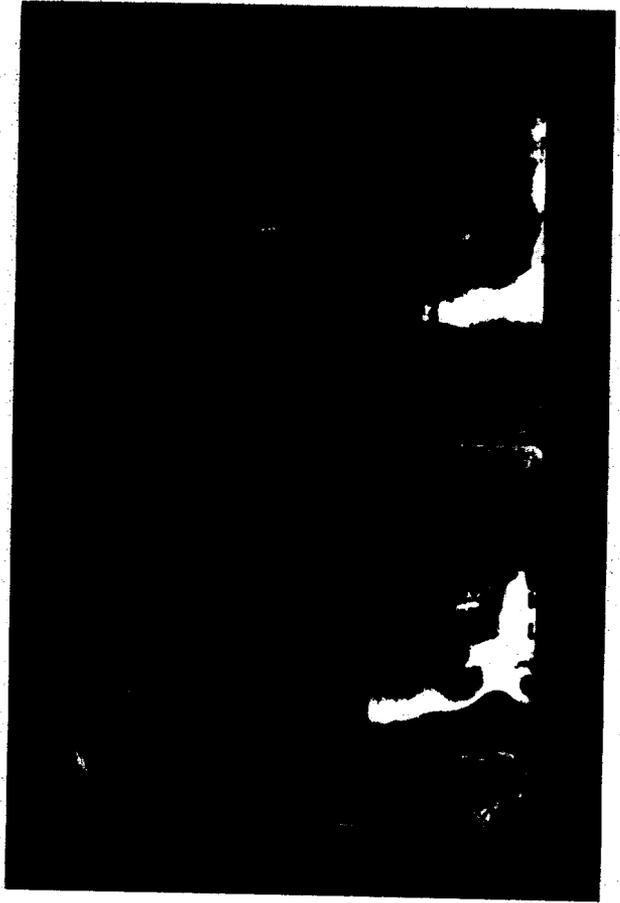
característico de las IgG (Fig. 10), que son las más abundantes en la respuesta inmune secundaria. Se puede apreciar en la banda B una IgG de ratón obtenida por cromatografía (Fig. 10) y que sirve como patrón para indicar la presencia de este tipo de inmunoglobulina en los corrimientos correspondientes a los líquidos ascíticos.

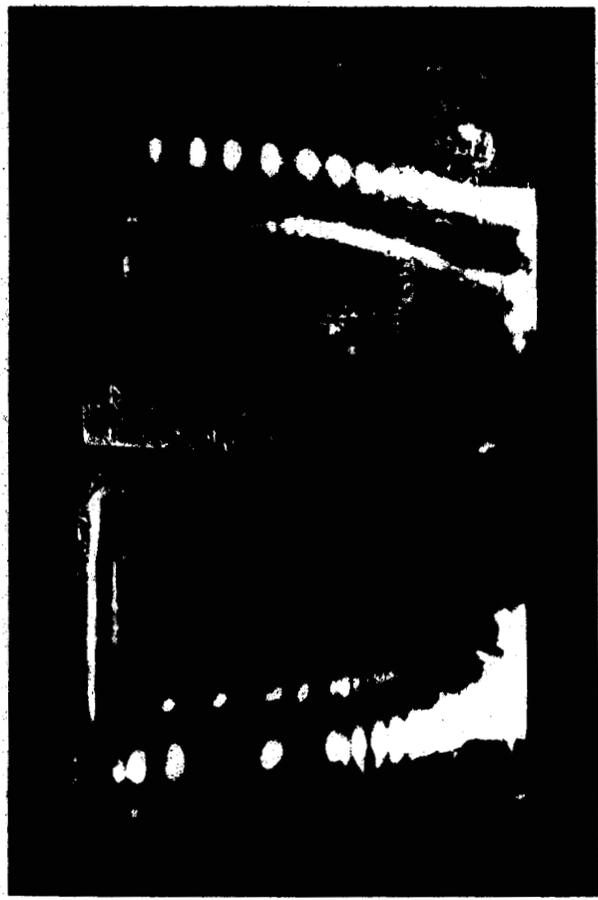
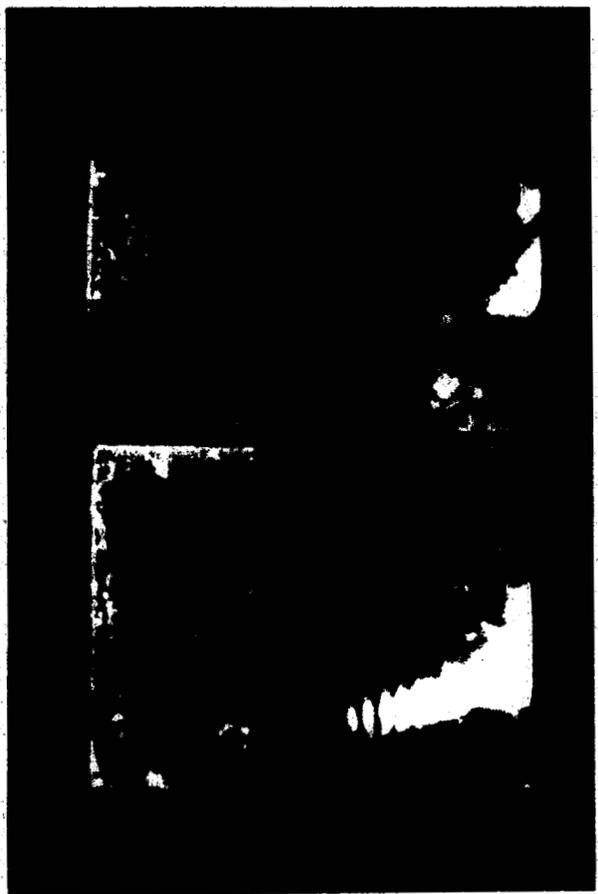
ANÁLISIS CROMOSÓMICO DE LOS HIBRIDOMAS:

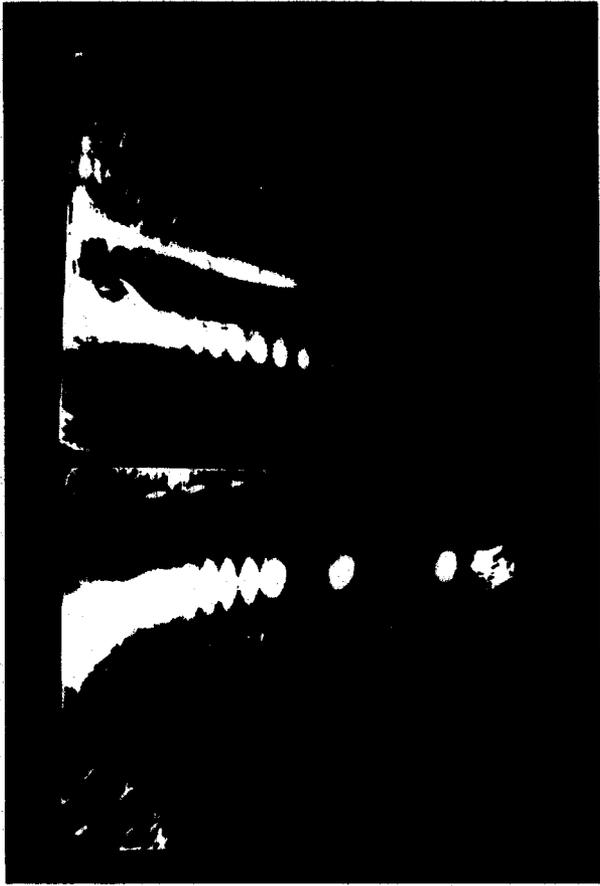
Al hacer el análisis cromosómico de las preparaciones obtenidas de hibridomas por la técnica de Moorhead et al (1960), se pudo observar un número cromosómico modal de 81, estos hibridomas proceden de parentales con número cromosómico 60 para el mieloma y 40 para los linfocitos del bazo de ratón.

Figura 9: En las siguientes páginas se pueden apreciar 6 parejas de fotografías de papel de nitrocelulosa, tratado el de la izquierda con líquido ascítico (con anticuerpo monoclonal) y el de la derecha con ZP completa como control.

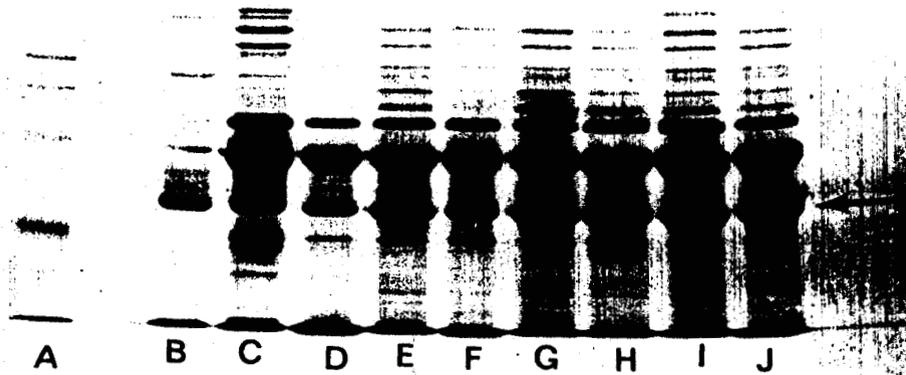
Los de la izquierda muestran fluorescencia en la zona correspondiente a la glicoproteína 55 K, en tanto los de la derecha la muestran en las tres familias de glicoproteínas.



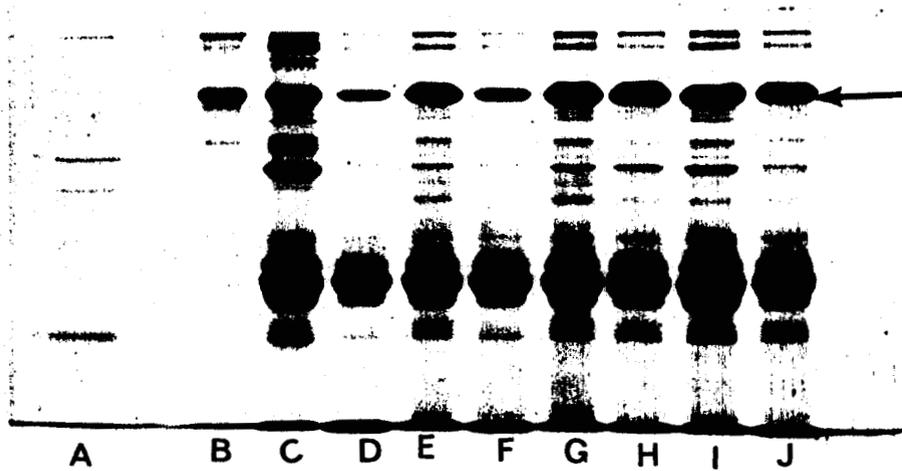




ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE
LIQUIDO ASCITICO CON ANTICUERPO MONOCLONAL



a) Reducida



b) No reducida

Figura 10. Elctroforesis en SDS-PAGE, mostrando los componentes de los líquidos ascíticos de la segunda clonación. A: Estándar de alto peso molecular; B: IgG de ratón; C: Suero de ratón; los siguientes corresponden a muestras de líquido ascítico; D: A3 1502; E: F2 602; F: C5 1502; G: C6 602; H: 810 602; I: A1 602; J: C5 2302. La flecha indica el lugar de la Ig en (b) y de la cadena pesada en (a).

D I S C U S I O N

En este trabajo se logró obtener anticuerpos monoclonales en contra de ZP porcina; aunque existe un trabajo reciente sobre la obtención de anticuerpos en contra de dos de las familias de glicoproteínas que componen la ZP en ratón (East y Dean, 1983 y 1984) estas familias corresponden a las dos de más alto peso molecular a diferencia de la obtenida en el presente estudio que es la de menor peso molecular.

El estudio de las glicoproteínas que componen la ZP de cerdo, durante muchos años fue obstaculizado, primero por la dificultad para obtener una cantidad apropiada de muestras de ZP para proceder a su análisis, y después por no contar con un marcador apropiado para este estudio.

Actualmente gracias a la técnica desarrollada por Dunbar et al (1980) que permite la obtención de ZP purificada para proceder a su análisis y a la técnica desarrollada por Köhler y Milstein (1975) que por la técnica de hibridación celular, facilita la obtención de inmunoglobulina monoclonal, es posible obtener, estos anticuerpos monoclonales, que permiten el marcaje e identificación de antígenos con un alto grado de selectividad.

En este estudio se utilizaron las técnicas mencionadas para obtener primero el antígeno (una familia de glicoproteínas) y después el anticuerpo monoclonal de la clase IgG contra dicho antígeno.

Se sabe que las características de la respuesta inmune pueden depender tanto del esquema de inmunización como de la naturaleza del antígeno y que durante la respuesta inmune primaria la mayoría de los antígenos inducen inicialmente la formación de anticuerpos de la clase IgM, seguidos de la producción de los de la clase IgG, en tanto que en la respuesta secundaria se produce preferencialmente anticuerpos de la clase IgG (Hood et al, 1978), con base en lo anterior se utilizó un protocolo de inmunización, consistente en una primera inyección de antígeno y posteriormente a los treinta días, cuando va decreciendo la respuesta inmune primaria, una segunda inmunización para inducir la respuesta secundaria.

La línea celular que se utilizó en la fusión (P3x63Ag8.653), tiene la característica de no secretar cadenas ligeras ni pesadas de inmunoglobulinas, por lo que el empleo de estas células impide la formación de moléculas nuevas de inmunoglobulinas, por lo que queda excluida la posibilidad de asociación entre cadenas ligeras y pesadas de ambas líneas progenitoras, como ocurre con las cadenas híbridas provenientes de mielomas secretores.

En este trabajo se utilizó PEG 1540 como agente inductor de la fusión celular, ya que con él se superan algunas limitaciones que se presentan con el uso de los virus y las lecitinas, tales como la frecuencia de hibridación y la baja reproducibilidad, el PEG es un agente fusógeno adecuado, sobretodo cuando se encuentra a la concentración y PH apropiados para obtener un mínimo de toxicidad y un máximo de frecuencia de fusión.

Con respecto a la clonación por dilución limitante, dadas las características del suero con que se trabajó, no fue posible clonar una sola célula, sin embargo, al seguir la formación de las colonias, pudieron detectarse aquellos pozos en los que a partir de una sola célula se obtuvo una colonia única en un solo pozo, en la cual se detectó mediante la técnica de ELISA la síntesis del anticuerpo deseado. Bajo estas condiciones se seleccionó el pozo a clonar cada vez, por lo que se puede decir que se tuvo un anticuerpo monoclonal por el tipo de selección utilizado.

El hecho de haber encontrado la presencia de las dos familias (65 y 90 K) restantes de glicoproteínas en el papel de nitrocelulosa al ponerlo en presencia de anticuerpos en contra de ZP completa, indica que efectivamente se obtuvo un anticuerpo contra la familia 55K.

Al analizar los líquidos ascíticos por electroforésis (SDS-PAGE) tanto reductora como no reductora, se observó que junto con las bandas correspondientes de inmunoglobulinas, se presentan otras bandas debidas a la composición del líquido ascítico ya que la proteína no fue purificada. A pesar de esto, se pudo detectar la reacción específica contra la familia 55K(+).

Habiendose obtenido un anticuerpo específico en contra de una de las familias de glicoproteínas que componen la ZP del óvulo del cerdo, se considera que estamos en posibilidades de localizar la ubicación topográfica de la misma "in situ", tanto antes como después de la fertilización, lo cual permitirá conocer si existen o no cambios estructurales durante la fecundación a nivel de esta molécula.

Esto podría marcar el inicio de un estudio tendiente al conocimiento integral de la estructura, ya que pueden obtenerse anticuerpos monoclonales en contra de las otras dos familias de glicoproteínas detectadas hasta ahora como integrantes de la ZP, con lo cual podría profundizarse en el estudio de la fecundación y del fenómeno fertilidad e infertilidad.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede afirmar que se obtuvieron líneas celulares híbridas, ya que estas son capaces de crecer en un medio selectivo como el HAT, además de presentar un número cromosómico menor a la suma de los dos parentales. Lo cual es característico de las células híbridas.

Estos hibridomas secretan un anticuerpo contra el antígeno utilizado como se pudo observar al practicar la técnica de ELISA. Dicho anticuerpo es específico para la glicoproteína de peso molecular 55,000, lo cual se demostró al cruzar específicamente con dicha molécula en el papel de nitrocelulosa.

además por el corrimiento electroforético pudo demostrarse que esta inmunoglobulina presenta la misma movilidad electroforética que la IgG, por lo que se postula que sea IgG, lo cual corresponde a lo esperado, ya que proviene de una respuesta inmune secundaria.

A P E N D I C E
(soluciones)

Solucion amortiguadora PBS-citrato-EDTA.

NaCl	147.8 g
Na ₂ HPO ₄	43.3 g
EDTA (sal disódica)	14.9 g
Citrato de sodio	16.6 g
Azida de sodio	4.0 g
Ajustar a pH 7.2-7.4	
Agua destilada c.b.p.	20 L

Solución de gel para isoelectroenfoque
(Vol. final 10 ml.)

Urea	5.5 g
Acrilamida IEF 30%	1.33 ml
Anfolinas 40%	0.5 ml
NP-40* 10%	1.0 ml
Agua destilada	3.0 ml

*Nonidet P40 (Detergente no iónico

relacionado con el Tritón X-100, ambos son alquil (octil) fenol etoxilados. NP-40 contiene 7 a 9 moles relativos de enlaces etoxi y el Triton de 9 a 10 (Ames, 1976).

Solución amortiguadora para lisis de O'Farrell.

Urea	0.57 g
------	--------

Anfolinas 40%	50.0	μl
2-ME	50.0	μl (opcional)
NP-40 10%	100.0	μl
Agua destilada c.b.p.	1.0	ml

Gel SDS-PAGE

a) Gel de corrimiento al 7%

Acrilamida 30 % (Sol. madre).	2.33 ml
Agua destilada	1.24 ml
SDS 10 %	0.10 ml
TRIS/Cl 0.75 M pH 8.8	5.0 ml
TEMED 0.75 %	0.67 ml
APS 0.75 %	0.67 ml

	10.0 ml

Acrilamida 30 % (Sol. madre)

Acrilamida 30 %	15.0 g
Bis-Acrilamida 0.8 %	0.4 g

Llevar a 50 ml con agua destilada

SDS 10 %

Dodecilsulfato de sodio	10.0 g
Agua destilada	90.0 ml

Nota: SDS cristaliza a baja temperatura (4°C)

TRIS/Cl 0.75 M pH 8.8

TRIS 9.0825 g

Llevar a 100 ml con agua destilada

Ajustar pH 8.8 con HCl.

TEMED 0.75 %

Nota: Para mejores resultados prepararla fresca cada vez (refrigerese).

Gel SDS-PAGE

b) Gel de compactacion

Acrilamida 30% (Sol. madre)	1.0	ml
Agua destilada	1.9	ml
SDS 10 %	0.1	ml
TRIS/Cl 0.25 M pH 6.8	5.0	ml
TEMED 0.75 %	1.0	ml
APS 0.75 %	1.0	ml

	10.0	ml

Solución para equilibrar el gel

TRIS/Cl 1 M pH 6.8	6.4	ml
SDS 10 %	6.8	ml
Glicerol	10.0	ml
2-ME	5.0	ml
Azul de bromofenol	1.0	ml
Agua destilada	70.8	ml

	100.0	ml

Solución de agarosa 1 %

TRIS/Cl 1 M pH 6.8	12.5	ml
SDS 10 %	1.0	ml
Agarosa	1.0	ml
Agua destilada c.b.p.	100.00	ml

Solución reguladora de Glicina-TRIS-SDS pH 8.3 (Sol. 5X)

TRIS	60.6 g
Glicina	288.4 g
SDS	20.0 g

Ajustar a 4 l con agua destilada

Medio de Cultivo

DMEM (Microlab)	74.5 ml
FCS (lote 818 Microlab)	20.0 ml
L-Glutamina 100 mM (Microlab)	2.0 ml
Piruvato de sodio (Merck) 50 mM	1.0 ml
Aminoácidos no esenciales 100X	1.0 ml
2-ME (Merck) 10 mM	0.05 ml
Insulina bovina 80 UI (Lilly)	0.25 ml
Penicilina/Estreptomina	
(Antibac, Microlab)	0.1 ml
Fungisona (Microlab) 100X	1.0 ml
Gentamicina 10 mg/ml	
(Garamicina, Sheramex)	0.1 ml

100.0 ml

Nota: Antes de suplementarse el medio se acidifica con un burbujeo de CO₂. Ya suplementado se guarda en refrigeración y se usa dentro de las cuatro siguientes semanas.

Medio HAT

Medio de cultivo suplementado	98 %
Solución HAT 50X	2 %

Solución HAT 50X

Solución HT 100X 100 ml

Solución de Aminopterina 1000X 10 ml

Agua bidestilada 90 ml

Nota: Esterilizar la solución por filtración en membrana de 0.2 μ m de poro (Millipore) y almacenar en alícuotas a -20 °C.

Solución HT 100X

Hipoxantina (Sigma) 0.1361 g

Timidina 0.0388 g

Agua bidestilada caliente

70-80°C c.b.p. 100.0 ml

Solución Aminopterina 1000X

Aminopterina 17.6 mg

Agua bidestilada 80.0 ml

Nota: Si no se disuelve agregue algunos mililitros de NaOH 0.1 M y lleve a 100 ml con agua bidestilada.

Almacenar en alícuotas a -20 °C y proteger de la luz.

ELISA (Soluciones)

PBS

NaCl 2.22 g

Na₂HPO₄ (Na HPO .7 H O 5.4 g) 0.286g

NaH₂PO₄ 0.155g

Ajustar a 300 ml con agua destilada

Solución enzimática 1:500

Diluir la enzima en 0.5 M de NaCl y 10 mM de Na₂HPO₄, ajustar el pH a 8.0 y agregar Tween 20 u 80 a tener 0.1 %.

Solución para diluir el Anticuerpo

Na₂HPO₄ 25.0 mM
NaN₃ 0.02 %
Ajustar pH a 7.4

Sustrato

a) Acido cítrico pH 4.0 0.05 M
b) ABTS 40 mM (Conservese a 4°C en la oscuridad)
c) Peróxido de Hidrógeno 0.5 M
Mezclar 5 ml (a) + 20 µl (b) + 25 µl (c)

Solución reguladora TRIS-salina

TRIS/Cl 10 mM pH 7.4 4.84 g
NaCl 0.9 % 36.0 g
NaN₃ 0.02 % 0.8 g
Ajustar a 4 l con agua destilada

BSA-TRIS-salina

Solución de BSA al 3 % en solución reguladora TRIS-salina
Ajustar el pH a 7.4

FITC 2 %

FITC conjugado a anticuerpo de cabra
contra IgG de ratón 2 %
Suero de cabra 10 %
BSA-TRIS-salina 88 %

Solución reguladora de preparación de la muestra (SPB)

Muestra en 2 % de SDS

Agregue la mitad del volumen de la muestra de una solución de:

TRIS/Cl 1 M pH 6.8	0.188 ml
SDS 10 %	0.200 ml
Glicerol	0.430 ml
2-ME	0.150 ml
Azul de bromofenol 0.05 %	0.030 ml
Agua destilada	0.020 ml

Hervir durante 90 seg.

Solución de tinción "A"

(Fairbanks Coomassie Blue "A")

Alcohol isopropílico	1000.0 ml
Azul Coomassie R	2.0 g
Acido acético	400.0 ml
Agua	2600.0 ml

Solución de tinción "B"

(Fairbanks Coomassie Blue "B")

Alcohol isopropílico	400.0 ml
Azul Coomassie R	0.1 g
Acido acético	400.0 ml
Agua	3600.0 ml

Solución reguladora para elución

Glicina	0.048 M
TRIS	0.006 M
SDS	0.1 %

Ajustar el pH a 8.3

B I B L I O G R A F I A

- 1.- AMES, G.F. & NIKAIDO, K. Two Dimensional Electrophoresis of Membrane Proteins. *Biochem* 15:616 (1976).
- 2.- ASKONAS, B.A. & WEBSTER R.G. Monoclonal antibodies to hemagglutinin and to H-2 inhibit the cross-reactive cytotoxic T cell population induced by influenza. *Eur. J. Immunol.* 10:151 (1980).
- 3.- AUSTIN, C.R. The mammalian egg. Thomas, Springfield, Illinois, E.U.A. (1961).
- 4.- BALACHANDRAN, N., BACCHETTI, S. & RAWLS, W.E. Protection against lethal challenge of BALB/C mice by passive transfer of monoclonal antibodies to five glycoproteins of Herpes Simplex virus type 2. *Infect Immun.* 37:1132 (1982).
- 5.- BARNSTABLE, C.J. Monoclonal antibodies wich recognize different cell types in the rat retina. *Nature*, 286:231 (1980)..
- 6.- BARNSTABLE, C.J., BODMER, W.F. & BROWN, G. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes HLA and other human cell surface antigens-new tols for genetic analysis. *Cell* 14:9 (1978).
- 7.- BARTEK, J., VIKLICKY, V, FRANEK, E. ANGELISOVA, P, DRABER, P., JAROSIKOVA, T. NEMEC, M. & VERLOVA, H. Monoclonal antibodies against transferrin, precipitating mixtures and lack of inter-species crossreactivity. *Immunol. Lett* 4:231 (1982).
- 8.- BLEIL, J.D. & WASSARMAN, P.M. Identification and characterization of the proteins of the zona pellucida. *J. Cell Biol.* 79:173 (1978).

9.- BORREBAECK, C.A.K. & ETSLER, M.E. Production and characterization of monoclonal antibody against the seed lectin of the dolichos biflorus plant. J. Biol. Chem. 256:4723 (1981).

10.- BOUSQUET, D., ST-JACQUES, S., ROBERTS, K.D. CHAPDELAIN, A. & BLEUAU, G. Zona pellucida antibodies in a group of women with idiopathic infertility. Am. J. Reprod. Immunol. 2:73 (1982)

11.- BROCKHAUS, M., MAGNANI, J. L., HERLYN, M., BLASZCZYK, M. STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H. & GINSBURG, V. Monoclonal antibodies directed against the sugar sequence of lacto-N-fucopentose III are obtained from mice immunized with human tumors. Arch. Bioch. Biophys. 217:647 (1982).

12.- BUNDLE, D.R., GIDNEY, M.A.J., KASSAM, N. & RAHMAN, F.R. Hybridomas specific for carbohydrates; synthetic human blood group antigens for the production, selection, and characterization of monoclonal typing reagents. J. Immunol. 129:678 (1982).

13.- CHAN, PALAY, V. Combined immunocytochemistry and autoradiography after "in vivo" injections of monoclonal antibody to substance P and 3H-serotonin. Anat. Embryol. 156:241 (1979).

14.- DAO, M.L., JOHNSON, B.C. & HARTMAN, P.E. Preparation of a monoclonal antibody to rat liver glucose-6-phosphate dehydrogenase and the study of its immunoreactivity with native and inactivated enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 79:2860 (1982).

15.- DAVIDSON, R.L., D'MALLEY, K.A. & WHEELER, T.B. Polyethylen Glycol-induced mammalian cell hybridization: Effect of polyethylen glycol molecular weight and concentration. Som. Cell Genet 2:271 (1976).

16.- DOYEN, N., PESCE, A.J. & LAPRESLE, C. Specificity of two anti-human albumin monoclonal antibodies. Immunol. Lett. 3:365

(1981).

17.- DUDKIEWICZ, A.B. & WILLIAMS, W.L. Fine structural observations of the mammalian zona pellucida by scanning electron microscopy. En: Scan Electron Microscopy 2. Proceedings of the workshop biomedical application 317 (1977).

18.- DUNBAR, B.S. & SHIVERS, C.A. Immunological aspects of sperm receptors on the zona pellucida of mammalian eggs. En: Immunology of Receptors. B. Cinander (Ed) : 509 Dekker, New York, E.U.A. (1976).

19.- DUNBAR, B.S., WARDRIP, N.J. & HEDRICK, J.L. Isolation and physicochemical properties of porcine zona pellucida. J. Cell Biol. 79:163 (1978).

20.- DUNBAR, B.S., WARDRIP, N.J. & HEDRICK, J.L. isolation physicochemical properties and macromolecular composition fo zona pellucida from porcine oocytes. Biochem. 2:356 (1980).

21.- DUNBAR, B. & RAYNOR, B.D. Characterization of porcine zona pellucida antigens. Biol. Rep. 22:941 (1980).

22.- DUNBAR, B., LIU, C & SAMMONS, D.W. Identification of the three major proteins of porcine and rabbit zona pellucida by high resolution two-dimensional gel electrophoresis: comparison with serum, follicular fluid and ovarian cell proteins. Biol. Rep. 24:1111 (1981).

23.- DUNBAR, B.S. Morphological, Biochemical and Immunochemical Charaterization of the mammalian zona pellucida. En: Mechanism and control of animal fertilization J.F. Jartman (Editor) Academic Press USA (1983).

24.- EDWARDS, P.A. monoclonal antibodies that bind to the human erythrocyte-membrane glycoproteins glycophorin A and Band 3. Biochem. Soc. Trans. 8:334 (1980).

25.- EAST, I.J. & DEAN, J. Structure and functions of the murine zona pellucida: analysis with monoclonal antibodies specific for ZP-2 and ZP-3. J. Cell Biol. 97:183 (1983).

26.- EAST, I.J. & DEAN, J. Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. J. Cell Biol 98:795 (1974).

27.- EILAT, D., ASOFKY, R. & LASKOV, R. A hybridoma from an

autoimmune NZB/NZW mouse producing monoclonal antibody to ribosomal-RNA. J. Immunol. 124:766 (1980).

28.- EISENBARTH, G.S., HAYNES, B.F. & SCHRÖDER, J.A. Production of monoclonal antibodies reacting with peripheral blood mononuclear cell surface differentiation antigens. J. Immunol. 124:1237 (1980).

29.- EISENBARTH, G.S., WOLFEN F.S. & MIRENBERG, M. Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:4913 (1979).

30.- EPHRUSSI, B. Hybridization of somatic cells. Princeton University Press, New Jersey, EUA (1972).

31.- EPSTEIN, S.L., OZATO, K. & SACHS, D.H. Blocking of allogeneic cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to H-2 antigens. J. Immunol. 125:129 (1980).

32.- ENGVALL, E & PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-coated tubes. J. Immunol. 109:129 (1972).

33.- EPEL, D. The program of fertilization. Sci. Am. 237:128 (1977).

34.- ESHKAR, Z., OFARIM, M. & WAKS, T. Generation of hybridomas secreting murine reagenic antibodies of anti-DNP specificity. J. Immunol. 124:775 (1980).

35.- FLAMAND, A., WIKTOR, T.J. & KOPROWSKI, H. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins I: The nucleocapsid protein. J. Gen. Virol. 48:97 (1980).

36.- FLAMAND, A., WIKTOR, T.J. & KOPROWSKI, H. Use a hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies-related virus protein II The glyco-protein. J. Gen. Virol. 48:105 (1980).

37.- FLORMAN, H.M. & WASSARMAN, P.M. The mouse egg's receptor for sperm: involvement of o-linked carbohydrate. J. Cell Biol. 95:26 (1983).

38.- FRANKEL, M.E., EFFROS, R.B. & DOHERTY, P.C. A monoclonal antibody to viral glycoprotein blocks virus-immune effector T

cells operating at H-2 Dd but not at H-2 Kd 1. *J. Immunol* 123:1438 (1979).

39.- GALFRE, G., HOWE, S.C., MILSTEIN, C., BUTCHER, G.W. & HOWARD, J.C. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature*, 266:550 (1977).

40.- GEFTER, M.L., MARGULIES, D.H. & SCHARFF, M.D. A simple method for polyethylene-glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Som. Cell Genet* 3:231 (1977).

41.- GERTON, G.L., WARDRIP, N.J. & HEDRICK, J.L. A gel eluter for recovery of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 126:116 (1982).

42.- GLABE, C.G. & VACQUIER, V.D. Isolation and characterization of the vitelline layer of sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 75:410 (1977).

43.- GOODFELLOW, P.N., LEVINSON, J.R. & WILLILAMS, V.E. Monoclonal antibodies reacting with murine teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76:377 (1979).

44.- GOMEZ, C.M. RICHMAN, D.P. & BERMAN, P.W. Monoclonal antibodies against purified nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 88:575 (1979).

45.- GREENE, G.L., FITCH, F.J. & JENSEN, E.V. Monoclonal antibodies to estrophilin: probes for thje study of estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7:157 (1980).

46.- GURNEY, E.G., HARRISON, R.O. & FENNO, J. Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens: evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among non viral T antigens. *J. Virol.* 34:752 (1980).

47.- GWATKIN, R.B.L. Studies on the zona pellucida of the mouse egg. *J. Reprod. Fertil* 6:325 (1963).

48.- HANN, B.H., EBLING, F. & FREEMAN, S. Production of monoclonal murine antibodies to DNA by somatic cell hybrids. *Arthritis Rheum* 23:942 (1980).

49.- HAMMERLING, G.J., LEMKE, H. & HEMMERLING, U. Monoclonal antibodies against murine cell surface antigens anti H-2, anti Ia and anti T cell antibodies. *Curr Top Microbiol. Immunol.* 81:100 (1978).

50.- HANADA, A & CHANG, M.C. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. Biol. Reprod. 6:300 (1972).

51.- HARRIS, H. & WATKINS, J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature 205:640 (1965).

52.- HEDRICK, J.L. & WARDRIP N. Microheterogeneity in the glycoproteins of the zona pellucida is due to the carbohydrate moiety. J. Cell Biol. 91:177 (1981).

53.- HELLER, E & RAFTERY, M.A. The vitelline envelope of eggs from the giant keyhole limpet. Megathura crenulata II. Product formed by lysis with sperm enzyme and dithiothreitol. Biochem. 15:1199 (1976).

54.- HIGGINS. R.C. & DAHMUS, M.E. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. 93:257 (1979).

55.- HOCHKEPPEL, H., MENGE, U. & COLLINS, J. monoclonal antibodies against human fibroblast interferon. Eur. J. Biochem. 118:437 (1981).

56.- HOFFMAN, G.J. LAZAROWITZ, S.G. & HAYWARD, S.D. Monoclonal antibody against a 250,000-dalton glycoprotein of Epstein-Barr virus identifies a membrane antigen and a neutralizing antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2979 (1980).

57.- HOOD, L., WEISSMAN, I.L. & WOOD, W. Immunology. The Benjamin Cummings Publishing Co. USA (1978).

58.- IVANYI, J. & DAVIES, P. Monoclonal antibodies against human growth hormone. Mol. Immunol. 17:287 (1980).

59.- KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B. & RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. J. Immunol. 123:1548 (1979).

60.- KENNETT, R.H. Fezzing of hybridoma cells. En: Monoclonal antibodies. Hybridomas. A new dimension in Biological Analysis. Kennett, R.H., McKearn, T.J. & Bechtol, K.B. (Ed) Plenum Press, New York U.S.A. (1981).

61.- KENNETT, R.H., DENIS, K.A., TUNG, A.S. & KLINMAN, N.R. Hybrid plasmacytoma production: Fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal cells and human spleen cells

in lymphocyte hybridomas. Springer-Verlag Berlin, 77, (1978).

62.- KOHLER, G & MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495 (1975).

63.- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227:680 (1970).

64.- LEBIEN, T. & KERSEY, J.H. A monoclonal antibody (TA-1) reactive with human T Lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* 125:2208 (1980).

65.- LEMKE, H., HAMMERLING, G.J. & HOHMANN, C. Hybrid cell lines secreting monoclonal antibody specific for major histocompatibility antigens of the mouse. *Nature* 271:249 (1978).

66.- LENNON, V.A. & LAMBERT, E.H. Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature* 285:238 (1980).

67.- LENNON, V.A., THOMPSON, M. & CHEN, J. Properties of nicotinic acetylcholine receptors isolated by affinity chromatography on monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 255:4395 (1980).

68.- LERNER, R.A. & DIXON, F.J. The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228:82 (1973).

69.- LINSEMYER, T.F. & HENDRIX, M.J. Monoclonal antibodies to connective tissue macromolecule Type II collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:440 (1980).

70.- LINSEMYER, T. F., HENDRIX, M.J. & LITTLE, C.D. Production and characterization of a monoclonal antibody to chicken type I collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 76:3703 (1979).

71.- LITTLEFIELD, J.W. Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145:709 (1964).

72.- LIU, F.T. , BOHN, J.W. & FERRY E.L. Monoclonal dinitrophenyl-specific murine IgE antibody: preparation isolation and characterization. *J. Immunol.* 124:2728 (1980).

73.- LOSTROM, M.E., STONE, M.R. & TAM, M. Monoclonal antibodies against murine leukemia viruses. *Virology* 98:336 (1979).

74.- LOWENSTEIN, J.E. & COHEN, A.I. Dry mass, lipid and protein

content of the intact and zona-free mouse ovum. J. Embryol. Exp. Morph. 12:113 (1964).

75.- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the folim phenol reagent. J. Biol. Chem 193:265 (1951).

76.- MERCER, W.E. & SCHLEGEL, R.A. Photohemagglutinin enhancement of cell fusion reduces polyethylene glycol cytotoxicity. Exp. Cell Res. 120:417 (1979).

77.- MCKEARN, T. Cloning of Hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase. En: Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A new dimension in Biological Analysis Kennet, T.hj., McKearn, T.J Bechtol, K.B. (Ed) Plenum Press, New York USA (1981).

78.- MINTZ, B. Experimental study of the developing mammalian egg. Removal of the zona pellucida. Science 138:594 (1962).

79.- MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIS, D.M. & HUMGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 20:613 (1960).

80.- MOSHLY-ROSEN, D., FUCHS, S. & ESHHAR, Z. Monoclonal antibodies against defined determinantes of acetylcholine receptor. FEBS Lett 106:389 (1979).

81.- MODLINSKY, J.A. The role of zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. J. Embryol. Exp. Morphol. 23:539 (1970).

82.- MORI, T., NISHIMOTO, T., KOHDA, H., TAKAI, I., NISHIMURA, T. & OKAWA, T. A method for specific detection of autoantibodies to the zona pellucida in infertile women. Fertility and sterility 32:67 (1979).

83.- NISHIMOTO, T., MORIO, T., YAMADA, I & NISHIMURA, T. Autoantibodies to zona pellucida ;en infertile and aged wcmen., Fertility and Sterility 34:552 (1980).

84.- NODA, Y., KOHDA, H., TAKAI, I., HAYASHI, S., SHIMADA, H. MORI, T. & TOJO, S. Characterization of glycoproteins isolated from porcine zona pellucidae. J. Rep. Immunol. 5:161 (1983).

85.- NORWOOD, T.J., ZEIGLER, C.J. & MARTIN, G.M. Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene glycol-mediated cell fusion. Somatic Cell Genetics 2:263 (1976).

86.- NORWOOD, T.H. & ZEIGLER, C.J. The use of dimethyl sulfoxide in mammalian cell fusion. En: Techniques in somatic cell genetic. Shey, J.W. (Ed) Plenum Publishing Co. (1982).

87.- NOWINSKI, R.C., PICKERING, R., O'DONNELL, P.V., PINTER, A. & HAMMERLING, U. Selective neutralization of ecotropic murine leukemia virus by monoclonal antibodies. Virol. 111:84 (1981).

88.- O'FARRELL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins J. Biol. Chem. 250:4007 (1955).

89.- OROSZLAN, S. & NOWINSKI, R.C. Lysis of retroviruses with monoclonal antibodies against viral envelope proteins. Virol. 101:296 (1980).

90.- PARHAM, P. & BODMER, W.F. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. Nature 276:397 (1978).

91.- PIKO, L. Gamete structure and sperm entry in mammals. En: Fertilization. C.B. Metz y A. Monrey (Ed) 2:325. Academic Press, New York (1969).

92.- PONTECORVO, G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. Somat. Cell Genet. 1:397 (1975).

93. - POTTER, M. Immunoglobulin producing tumor and myeloma proteins of mice. Physiol. Rev. 52:631 (1972).

94.- REPIN, V.S. & AKIMOVA, I.M. Microelectrophoretic analysis of protein composition of zona pellucida on mammalian oocytes and zygotes. Biokhimiya 41:50 (1976).

95.- ROITT, I. Essential Immunology (4a. edicion) Blackwell Scientific Publications, England (1980).

96.- RUDDLE, F.H. & KUCHERLAPATI, R.S. Hybrid cells and human genes. Sci. Am. 231:36 (1974).

97.- SACCO, A.G. & SHIVERS, C.A. Immunological inhibition of development. en: Methods in mammalian reproduction J.C. Daniel (Ed) 203:227 Academic Press N.York USA (1978).

98.- SACCO, A.G. Immunocontraception: Consideration of the zona pellucida as a target antigen. En: Wynn, R.M. (Ed) Obstetrics and gynecology Annual 10:1 Appleton Century-Crofts (1981).

99.- SACCO, A.G. , YUREWICZ, E.C., SUBRAMANIAN, M.G. & DE MAYO, F.J. Zona pellucida Composition: Species Cross Reactivity and

Contraceptive Potential of antiserum to a purified pig zona antigen (PPZA) Biol. Rep. 25:997 (1981).

100.- SACCO, A.G., YUREWICZ, E.C. & ZHANG, S. Immunoelectrophoretic analysis of the porcine zona pellucida. J. Reprod. Fert. 68:21 (1983).

101.- SECHER, D.S. & BURKE, D.C. A monoclonal antibody of large-scale purification of human leukocyte interferon. Nature 285:446 (1980).

102.- SETHI, K.K., ENDO, T. & BRANDIS, H. Hybridomas secreting monoclonal antibody with specificity for *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 66:192 (1980).

103.- SHIVERS, C.A. The zona pellucida as a possible target in immunocontraception. En: Immunological influence on human fertility. B. Boettchen (Ed) 13 Academic Press, N. York, USA (1977).

104.- SHIVERS, C.A. & DUNBAR, B.S. Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause for infertility in women. Science 197:1082 (1977).

105.- SACHNEIDERMAN, S., FARBER, J.L. & BARSERGA, R. A simple method for decreasing the toxicity of polyethylene glycol in mammalian cell hybridization. Somat. Cell Genet. 5:263 (1979).

106.- SZOLLOSI, D. Development of cortical granules and the cortical reaction in rat and hamster eggs. Anat. Rec. 159:431 (1967).

107.-TOWBIN,H.STAEHELIN,T &GORDON,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets:Procedure and some aplications.Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:4350 (1979).

108.-TZARTOS,S.J.& LINDSTROM,J.M. Monoclonal antibodies used to probe acetilcholine receptor structure: Localization of the main immunogenetic region and detection of similarities between subunits .Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:755(1980).

109.-VAITUKAITIS,J.,ROBBINS,J.B.,NIESHLAG,E. & ROSS,G.T. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33:988 (1971).

110.-VERWAERDE,C.,GRZYCH,J.M. & BAZIN,H. Production d'anticorps

monoclonaux anti Schistosoma mansoni. C.R. Acad.Sci 289:725 (1979).

111.-WIKTOR,T.J. & KOPROWSKI,H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization detection of antigenic variants . Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78:3938 (1978).

112.- WOLF,D.P.,NISHIHARA,T. WEST,D.M., WYRICK,R.E. & HEDRICK,J.L.. Isolation physicochemical properties and the macromolecular of the vitelline and fertilization envelopes from Xenopus laevis eggs. Biochem. 15:3671 (1976).

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

114.-YOUNG,W.W.,McDONALD,E.M.& NOWINSKY,R.C. Production of monoclonal antibodies specific for two distinct steric portions of the glycolipid ganglio-N-triosylceramide (asialo GM-2). J. Exp. Med. 150:1008 (1979).

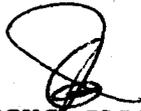
115.-ZWEIG,M.,HEILMAN,C.J.& RABIN,H. Production of monoclonal antibodies against nucleocapsid proteins of Herpes simplex virus types 1 and 2. Virol. 32:676 (1979).

EL JURADO DESIGNADO POR LA DIVISION DE CIENCIAS
BIOLOGICAS Y DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA - IZTAPALAPA, APROBO ESTA TESIS A
LOS VEINTE DIAS DEL MES DE JULIO DE MIL NOVECIE-
TOS OCHENTA Y CUATRO.



DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

(TUTOR)



DR. JESUS CALDERON TINOCO



DR. RUBEN DARIO MARTINEZ