IDENTIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A LA GESTACIÓN (PAGs) EXPRESADAS EN RUMIANTES DOMÉSTICOS ANTES DE LA IMPLANTACIÓN

B. Serrano[1], B. Aguilar[1], F. López-Gatius[2] y J.M. Garbayo[1]
1: Dpto. Tecnología en Producción Animal, CITA-Gobierno de Aragón.
2: Dpto. Producción Animal, ETSIA, Universidad de Lérida.
jmgarbayo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

La formación del blastocisto atribuye las células de la mórula a dos linajes, el botón embrionario, que dará lugar al feto y parte de la placenta y el trofoectodermo, que originará la capa más externa de la placenta. Un embrión o feto con todas sus membranas y estructuras accesorias se denomina concepto. En rumiantes el trofoectodermo se caracteriza por la presencia de hasta un 20% de células binucleadas que se fusionan con las células del epitelio uterino para formar células gigantes trinucleadas (vaca) ó un sincitio (ovejas y cabras) dando lugar a una forma limitada de invasión. Los productos de secrección de las células binucleadas, entre los que se encuentran el lactógeno placentario y muchas PAGs, alcanzan la circulación general de la madre y, en el caso de las PAGs, su detección en sangre se ha utilizado como diagnóstico de gestación y de bienestar fetal. Entre los productos segregados por las células mononucleadas del trofodermo se encuentra el interferón τ, responsable del reconocimiento materno de la gestación y algunas PAGs.

Las PAG son una familia multigénica, relacionada con las proteasas aspárticas, expresadas en el trofoectodermo de la placenta de Artilodáctilos (rumiantes y suidos) (Xie y col.1991, Xie y col.,1997). En rumiantes, el lugar de expresión y análisis filogenéticos sencillos permiten clasificar las PAGs en dos grandes grupos (Green y col., 2000). El grupo I, muy abundante, se expresa en las células binucleadas. Son un grupo de origen evolutivo reciente, sometido a evolución positiva de manera que está favorecida su diversificación, posiblememente relacionada con una mayor capacidad de unir diferentes péptidos, lo que podría estar relacionado con la tolerancia inmunológica del feto. Las PAGs del grupo II, en menor número, se expresan de manera más uniforme por todo el trofectodermo, son más cercanas a las proteasas aspárticas y, en general, tienen conservado el centro activo, por lo que no se puede descartar una función proteolítica.

Los objetivos de este trabajo fueron detectar el comienzo de la expresión de PAG, utilizando para ello conceptos preimplantacionales, identificar el tipo de PAGs expresadas y posibilitar la clonación de nuevas PAGs.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de embriones

En ovino y caprino, los celos se sincronizaron mediante la inserción de esponjas vaginales de FGA (Intervet) durante 12 días y la aplicación de 440UI de PMSG (Foligon, Intervet) en el momento de la retirada. Se realizó una cubrición controlada y los conceptos se recogieron 12 (n=4) ó 14 (n=4) días después en ovino, y 12 (n=5), 14 (n=3), 15 (n=2), 16 (n=5) ó 18 (n= 4) días después en caprino. En bovino, las vacas se inseminaron artificialmente y los conceptos se recuperaron los días 15 (n=3) ó 18 (n=1) después del celo.

Transcripción inversa y PCR (RT-PCR)

Se extrajo el ARN total de los conceptos con TRI-REAGENT™ (Sigma) y éste se utilizó para la transcripción inversa (RT+), con la enzima Superscript™ II Rnase H⁻ (Invitrogen), siguiendo el protocolo recomendado para la enzima. Como cebadores se utilizaron oligo dT ($p(dT)_{15}$, (Roche) o random primers (3µg/µl, Invitrogen), en un volumen final de 20µl. Como control de contaminación genómica se realizó una reacción paralela sin transcriptasa inversa (RT-), y de control positivo se utilizó ARN extraído de placenta ovina de mitad de gestación, que expresa un gran abanico de PAGs.

El cDNA se amplificó con un cebador general derecho, boPAG1-5', cuya secuencia se encuentra conservada en la mayoría de las PAGs clonadas, y varios cebadores reversos específicos de distintas PAGs: ovPAG2-3', boPAG2-3' y PAG1-3'. En un volumen final de 25µl se utilizó 1µl de reacción de transcripción inversa (RT+ y RT-), 50µM de cada dNTP, 0.06µM de cada cebador, 0.5µl de DNA Polimerasa (1U/µl) que contenía pfu polimerasa en proporción 9:1 y tampón con 2mM de $MgCl_2$. La reacción de PCR constaba de 40 ciclos de desnaturalización a 94º C (30 seg), hibridación entre 58ºC y 65ºC (30 seg) y elongación a 72º C (1 min). Los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa al 1% y se visualizaron y digitalizaron con Gel Doc 2000 (Bio-Rad). El tamaño esperado de los fragmentos era entre 1.1 y 1.2 Kb.

Los productos de PCR, después de purificados con el kit Real Clean Matrix (Durviz), se subclonaron en E. Coli mediante el empleo de pGEM®-T Easy Vector System (Promega). De cada producto de PCR clonado se seleccionaron 10 colonias. El aislamiento de plásmidos se realizó con el kit Wizard® Plus (Promega), controlándose la presencia de inserto mediante digestión con EcoRI. Los plásmidos recombinantes se secuenciaron con el cebador plasmídico m13 derecho. La identidad de los insertos se comprobó mediante la búsqueda en el banco de genes. Secuencias similares, con más del 98% de identidad, se alinearon con Bio Edit (Tom may, IbisTherapeutics, Carlsbad, CA) y se estableció una secuencia consenso. Aquellos insertos cuyas secuencias tenían menos del 98% de identidad con otras conocidas se secuenciaron completamente por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ovino, se recuperaron 5 (día 12) y 10 (día 14) conceptos. En ambos casos, se generaron productos de PCR con los cebadores reversos ovPAG2 y boPAG2, pero no con PAG1. La secuencia consenso obtenida a partir de insertos de ambos productos era idéntica a ovPAG2 (NM_001009782), única PAG del grupo II identificada hasta el momento en ovino. Se han clonado lo que podrían considerarse homólogos funcionales de ovPAG2 tanto en caprino (caPAG2, AF191327) como en bovino (boPAG11, NM_176623) (Xie y col., 1997).

En bovino, se obtuvo expresión de PAG a partir de conceptos de 15 (n=3) y de 18 días (n=1) con los cebadores reversos boPAG2-3´ y PAG1-3´, pero no con ovPAG2-3´. Los productos de PCR procedentes del concepto de 18 días se subclonaron y se secuenciaron. Veinte de los 21 insertos secuenciados eran similares entre sí y la secuencia consenso era idéntica a boPAG2 (NM_176614). BoPAG2 es una PAG del grupo II y podría representar un factor que se une al receptor de la LH del cuerpo lúteo (Xie y col., 1994). El inserto restante resultó ser una nueva PAG que se denominó boPAG22 (AY911498) por orden de clonación y que presentaba la mayor homología con boPAG2 (97% nt y 94,6% aa). Este sería el primer caso en que se detecta diversificación muy reciente de una PAG del grupo II.

A diferencia de lo que ocurrió en ovino, en caprino no se detectó expresión de PAG a partir de conceptos de 12 (n=6), 14 (n=9) y 15 (n=2) días, pero sí en los de 16 (n=5) y 18 (n=4) días. Hay que señalar que, a diferencia de lo que ocurrió en ovino, los conceptos de 12 y 14 días de cabra no estaban elongados. Se generaron productos de PCR a los 16 y 18 días con los tres cebadores reversos, aunque en mucha menor cantidad cuando se utilizó boPAG2-3'. La secuencia consenso proveniente del producto de PCR generado con ovPAG2-3' fue similar a caPAG2 (AF191327), perteneciente al grupo II, excepto por 5 nucleótidos que se tradujeron en 3 aminoácidos diferentes. Estos mismos aminoácidos se encuentran en ovPAG2, posible homóloga funcional de caPAG2, y las diferencias con la caPAG2 clonada a partir de placenta (Garbayo y col., 2000) podrían ser debidas a que se utilizaron razas de cabras diferentes (Blanca Celtibérica en embriones vs. Alpina en placenta) y que la raza de la que se obtuvieron los embriones sea más próxima genéticamente a la oveja.

Todos los tránscriptos provenientes del producto de PCR obtenido a partir de PAG1-3' fueron similares entre sí y diferentes (<90%) a cualquier PAG identificada hasta el momento, por lo que uno de ellos se secuenció completamente por duplicado. La nueva PAG, que se denominó caPAG12 (AY911497), presentó la mayor homología con boPAG15 (90% nt, 83% aa; AF192332). Por proximidad genética así como por la conservación del sitio de escisión del propéptido (ISF⇓RGS), característico de las PAGs pertenecientes al grupo I, se asignaría caPAG12 a este grupo. No obstante, esto confinaría con mayor probabilidad su lugar de expresión a las células binucleadas del trofectodermo pero Wango y col. (1990) no observaron la aparición de células binucleadas en cabras hasta 18 días después de la cubrición. Así pues, resultaría muy interesante el estudio del lugar de expresión de esta nueva PAG caprina.

En todas las especies en estudio se detectó expresión simultánea de PAGs y de interferón τ (datos no mostrados).

En resumen, este trabajo ha permitido conocer que los rumiantes domésticos expresan un número limitado de PAGs antes de la implantación, la mayoría pertenecientes al grupo II. Además se han clonado dos PAGs nuevas, una en bovino, boPAG22 y otra en caprino, caPAG12.

BIBLIOGRAFÍA

Garbayo, J. M., y col., (2000). "Caprine Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAG): their cloning, expression, and evolutionary relationship to other PAG." Mol. Reprod. Devel. **57**: 311-322.

Green, J. A., y col., (2000). "Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy." Biol. Reprod. **62**: 1624-1631.

Wango, E. O., y col., (1990). "The role of trophoblast binucleate cells in implantation in the goat: a quantitative study." Placenta **11**: 381-394.

Xie, S., y col., (1991). "Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 10247-10251.

Xie, S., y col., (1994). "A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophectoderm." Biol. Reprod. **51**: 1145-1153.

Xie, S., y col., (1997). "The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 12809-12816.

Este estudio ha sido financiado por el proyecto INIA RTA-02-094.