INMUNOLOCALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPÍA CONFOCAL DE LA PROTEÍNA DISULFURO ISOMERASA A1 (PDIA1) EN OVOCITOS Y ZIGOTOS PORCINOS

Romar[1], R., Saavedra[1], M.D., Coy[1], P. y Avilés[2], M.
[1]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria
[2]Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina
30071 Campus Espinardo, "Campus Mare Nostrum". IMIB (Instituto Murciano de Investigación Biomédica). Universidad de Murcia. Murcia. España. rromar@um.es

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, las proteínas disulfuro isomerasas (PDI) son una amplia familia de proteínas residentes en el retículo endoplásmico (RE), donde se encargan del procesado y maduración de las proteínas secretoras, catalizando la formación, ruptura y reorganización de puentes disulfuro gracias a sus dominios tiorredoxina (Hatahet y Ruddock, 2009). Las PDI han sido asociadas con muchas funciones biológicas en prácticamente cualquier compartimento celular aunque se desconoce cómo "escapan" del RE para realizar estas funciones (Turano et al., 2002). Es por ello que algunos autores consideran las PDI no sólo un marcador de RE sino un marcador de la liberación de contenidos intracelulares (Reinhardt et al., 2008).

En ovocitos, el bloqueo de la polispermia tras la fecundación está mediado por la reacción cortical (liberación del contenido de los gránulos corticales) y el endurecimiento de la zona pelúcida (Coy et al., 2008). Precisamente, la formación de puentes disulfuro, una de las principales funciones de las PDI, se ha sugerido como uno de los mecanismos de endurecimiento de la zona (Iwamoto et al., 1999). Aunque hasta la fecha no se ha descrito la presencia de proteínas PDI en el contenido de los gránulos corticales, sí se ha sido sugerido que tras la fecundación se liberan vesículas secretoras distintas a los gránulos, aunque se desconoce su contenido (Ducibella et al., 1988; Tutuncu et al., 2004). Nuestra hipótesis de trabajo es que tras la fecundación podrían liberarse vesículas secretoras conteniendo PDI, que participarían en el bloqueo de la polispermia, tal y como sugieren resultados previos de nuestro laboratorio con otras proteínas chaperonas (Romar et al., 2013).

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar la presencia y localización de la proteína PDIA1 en ovocitos porcinos madurados *in vitro* y en zigotos tras la fecundación, mediante el uso de un anticuerpo específico y su visualización mediante microscopía confocal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos se obtuvieron de cerdas prepúberes (Landrace x Large White) mediante la aspiración de los folículos entre 3-6 mm de diámetro y se transfirieron a medio de maduración NCSU-37 siguiendo los protocolos de nuestro laboratorio (Coy et al., 2008). Una vez maduros (42-44 h), se denudaron, se lavaron en medio TALP y se transfirieron a pocillos conteniendo 250 µl de medio TALP para ser inseminados (50 ovocitos/pocillo). Los espermatozoides, procedentes de la fracción rica del eyaculado de verracos de fertilidad probada, se diluyeron 1:20 v/v en BTS (Pursel y Johnson, 1975) y se centrifugaron (700g, 30 min) en una gradiente 45-90% v/v de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (Coy et al., 2008). El pellet obtenido se diluyó en medio TALP, se centrifugó de nuevo (100g, 10 min) y el sedimento se diluyó en medio TALP para añadirse a los pocillos conteniendo los ovocitos, a una concentración final de 10^5 espermatozoides/ml. Los gametos se co-cultivaron 18-20 h.

Para el estudio mediante microscopía confocal, las muestras (ovocitos madurados *in vitro* y cigotos) se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron en los correspondientes anticuerpos y con Hoechst 33342 (#B-2261; Sigma-Aldrich, Madrid, España) para teñir el ADN. Además, los cigotos se incubaron con lectina PNA (*Arachis hypogaea*, peanut agglutinin) para confirmar la exocitosis de los gránulos corticales. El PBS utilizado para todo el proceso fue PBS sin Ca^{2+}-Mg^{2+} suplementado con 1% (p/v) de BSA (abreviadamente PBS) y tras cada

paso siempre se realizaron tres lavados en este medio. Las muestras se fijaron 30 min en paraformaldehído al 3,7% (p/v), se permeabilizaron 10 min con Tritón X-100 al 0,1% (v/v) y se incubaron 1 h en cámara húmeda y a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PDIA1 (#ADI-SPA-891; Enzo Life Sciences, Lausana, Suiza) diluído 1:1000 (v/v). Los ovocitos se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (#12-506; Millipore, California, EEUU) mientras que en el caso de los cigotos el secundario iba conjugado a isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) (#ab6786; Abcam, Cambridge, Reino Unido), ambos anticuerpos diluídos 1:400 (v/v) y durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Seguidamente los cigotos se incubaron 30 min con 10 ug/ml de lectina PNA conjugada a FITC (#L-7381, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Finalmente, ovocitos y cigotos se incubaron 30 min con 1 ug/ml de Hoechst y se montaron en portaobjetos. Las muestras se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su visualización en un microscopio láser confocal TCS NT (Leica) bajo un objetivo de aceite 63X. Se capturaron imágenes de las regiones del ecuador y el cortex. La maduración nuclear y la penetración espermática fue confirmada con el Hoechst. Se visualizaron 10 ovocitos y 10 zigotos de dos replicados diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron un marcaje positivo para la proteína PDIA1 en los ovocitos madurados *in vitro,* apareciendo en todos los ovocitos maduros (metafase II) un punteado fino y homogéneo en la periferia celular, inmediatamente por debajo del oolema, mientras que en el resto del ooplasma no se observó marcaje para esta proteína. En la región del cortex ovocitario se observó la PDIA1 a modo de punteado fino combinado con agregados. Las células del *cumulus oophorus* también mostraron marcaje positivo para PDIA1 distribuido uniformemente por todo el citoplasma. Aunque no existen estudios sobre PDIA1 en ovocitos de otras especies, el patrón de distribución observado en ovocitos maduros no coincide completamente con el descrito para otras PDI. Recientemente Ohashi et al., (2013) han situado a la PDIA2 no sólo en la periferia de ovocitos porcinos sino también distribuida por todo el citoplasma, al igual que ocurre en ovocitos humanos para otras PDI (Mondéjar et al., 2007). Las diferencias entre distintas especies pueden estar relacionadas con la distinta morfología del RE y, en ovocitos porcinos, con la identificación de distintos miembros de la familia A de las PDI (PDIA1 en este estudio y PDIA2 en el de Ohashi et al., 2013). Respecto a los cigotos, no se observó marcaje para PDIA1 en ninguno de ellos. La exocitosis de los gránulos corticales se produjo en todos los cigotos, como demostró la ausencia de tinción con lectina PNA-FITC.

Nuestros resultados sugieren que PDIA1 se localiza en la periferia de los ovocitos en metafase II y que desaparece tras el proceso de fecundación. Esta liberación de proteínas con actividad chaperona, formadora y reductora de puentes disulfuro podría tener implicaciones en la interacción entre gametos que requiere de estudios futuros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., Matás, C. & Avilés, M. 2008. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105: 15809-15814. • Ducibella, T., Rangarajan, S., & Anderson, E. 1988. Dev Biol 130: 789-792. • Hatahet, F., & Ruddok, LW. 2009. Antioxidants and Redox Signaling 11: 2807-2850. • Iwamoto, K., Ikeda, K., Yonezawa, N., Noguchi, S., Kudo, K., Hamano, S., Kuwayama, M. & Nakano, M. 1999. J Reprod Fertil 117: 395-402.• Mondéjar, I., Jiménez-Movilla, M., Castells-Mora, M.T., Fernández-Colom, P., Romeu, A., Ballesta-Germán, J., & Avilés, M. 2007. Revista ASEBIR 12: 164-174. • Ohashi, Y., Hoshino, K., Tanemura, K. & Sato, E. 2013. Anim Sci J 84: 15–22. • Pursel, V.G. & Jonson, L.A. 1975. J. Anim. Sci. 40: 99–102. • Reinhardt, C., von Bru, M.L., Manukyan, D., Grahl, L.L., Altmann, B., Dlugai, S., Hess, S., Konrad, I., Orschiedt, L., Mackman, N., Ruddock, L., Massberg, S., & Englemann B. 2008. J Clin Invest 118: 1110–1122. • Romar, R., Soriano-Úbeda, C., Saavedra, M.D., Gadea, J., Avilés, M., & Coy, P. 2013. Reprod Fertil Dev 25: 261 (abst.). • Tutuncu, L., Stein, P., Ord, T.S., Jorgez, C.J., & Williams, C.J. 2004. Dev Biol 270: 246-260. • Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., & Ferraro. 2002. J Cell Physiol 193: 154–163.

Agradecimientos: trabajo financiado por el MEC-FEDER (AGL2009-12512-C02-01) y el MINECO (AGL2012-40180-C03-01-02).

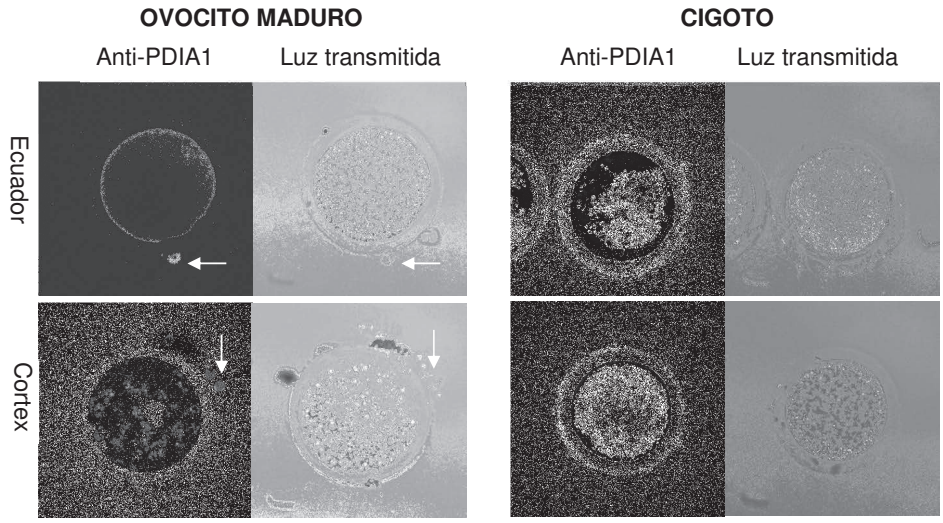


***Figura 1**. Marcaje de la proteína PDIA1 en ovocitos (panel izquierda) y cigotos porcinos (panel derecha) a nivel del ecuador y cortex. Las imágenes de fluorescencia (anti-PDIA1) han sido transformadas a escala de grises para una mejor visualización. Las flechas señalan las células del cumulus oophorus.*

IMMUNOLOCALIZATION BY CONFOCAL MICROSCOPY OF PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE A1 (PDIA1) IN PIG OOCYTES AND ZYGOTES

ABSTRACT: Protein disulfide isomerase (PDI) protein compresses a numerous family of proteins residing at the endoplasmic reticulum where they catalyze disulfide bond formation, breakage, and rearrangement in all nonnative protein and peptide substrates. They are also involved in a wide range of other biological functions, although it is unclear for many of these reactions how they escape the ER. It has been indicated that PDI is also a marker for the release of intracellular contents. In oocytes, disulfide bond formation is in part responsible of the zona pellucida hardening and thus of preventing polyspermy. In case PDI were released from oocytes at fertilization time they might have a role in gamete interaction so, we studied PDIA1 distribution in pig oocytes and zygotes. After *in vitro* maturation and fertilization, oocytes and zygotes were fixed, permeabilized and stained with a primary anti-PDIA1 antibody followed by a secondary antibody. Visualization of oocytes under confocal microscopy revealed that PDIA1 protein is located at the periphery, under oolema level, with a uniform punctuate pattern. At cortex level aggregates of protein were also observed. Interestingly the protein staining disappeared in zygotes suggesting that PDIA1 is released at fertilization time. Its likely role in fertilization needs further study.

Keywords: PDIA1 protein, oocyte, zygote, porcine