



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Identificación de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) en
extractos parcialmente purificados de placenta ovina.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Giovanna León Legaspi

ASESORES

MVZ Griselda Valdéz Magaña

BIOL. José Gerardo Perera Marín



Ciudad Universitaria, Cd. Mx 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

DEDICATORIA

Cada una de mis horas de trabajo, desvelo y estudio invertidas en esta tesis se las dedico a mis mascotas: a mis gatos Pato y Lulú; mis perritos Bruno, Led y Tormenta, a mis conejos Gildise, Canela y Piloncillo. Ellos me han dado la fuerza y la inspiración para continuar el nindo que elegí.

AGRADECIMIENTOS

Somos un collage de todas las personas que conocemos, la carrera la cursé yo, pero no lo hice sola, fue gracias al apoyo, amor y cuidado de mi familia, especialmente de mi madre Angela Legaspi, mi padre Francisco León y mi hermano Octavio León, a la compañía, empatía y complicidad de los amigos que encontré a lo largo de los semestres dentro y fuera de la carrera y a la paciencia, empeño y conocimiento de las y los docentes en cada clase que llegué a este punto.

Aprendí mucho de todos ustedes, hoy en día los recuerdo a cada uno y llevo un poquito de todos conmigo, lo que me ha permitido crecer y mejorar cada día y por eso siempre les estaré muy agradecida.

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco ampliamente a: la Dra Silvia Ivonne Mora Herrera responsable de la Unidad de Metabolómica y Proteómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM por su colaboración en el desarrollo de la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), resultado valioso para la corroboración del punto isoeléctrico de las PAGs identificadas mediante el cromatofoco.

Al Dr. José Gerardo Perera Marín quiero expresar mi más sincero reconocimiento y gratitud por su invaluable apoyo durante todo el proceso de desarrollo y redacción de mi tesis.

A la Dra Griselda Valdéz Magaña, responsable de los proyectos PAPIIT IA208418 “Identificación de Biomarcadores para diagnóstico de gestación temprana en borregas y del proyecto PAPIIT IN213521 “Desarrollo de un sistema de ELISA para el diagnóstico de gestación temprana en ovejas empleando genes sintéticos, vacunas de ADN y proteínas recombinantes” por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto y que aun estando a distancia y con 7 horas de diferencia se mantuvo en contacto conmigo y estuvo pendiente de mi progreso, siempre siendo accesible y paciente con mis avances.

A los doctores Antonio Ismael Porras Almeraya, Jorge Hernández Espinosa, Mario Pérez Martínez y Vicente Octavio Mejía Villanueva quienes formaron parte del jurado por su valiosa participación como miembros del jurado en la evaluación de mi tesis. Sus aportaciones y observaciones han desempeñado un papel fundamental en el perfeccionamiento y complemento de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
3 HIPÓTESIS	7
4 OBJETIVO GENERAL	7
5 MATERIAL Y MÉTODOS	8
6 RESULTADOS	15
7 DISCUSIÓN	21
8 CONCLUSIÓN	26
9 REFERENCIAS	27
10 ANEXOS	37

Esquema

Esquema 1. Procedimiento de extraccion y purificacion de PAG tomado de Nava K <i>et al</i> 2019. modificado en este estudio.....	9
---	---

Figuras

Figura 1.	10
Figura 2.	10
Figura 3.	11
Figura 4.	15
Figura 5.	16
Figura 6.	17
Figura 7.	18
Figura 8.	19
Figura 9.	20

Imágenes

Imagen 1. Placenta sinepiteliocorial de rumiante con cotiledones.	40
Imagen 2. Capas histológicas entre la madre y el feto presentes durante la gestación de rumiantes.....	40
Imagen 3. Diagnóstico de gestación en ovino. Sugerencias de técnicas para diagnóstico de gestación en ovinos dependiendo de tiempo te preñez.	42

Tablas

Tabla 1. Características de la placenta ovina.....	41
Tabla 2. Historia de PAG.....	44
Tabla 3. Peso molecular y punto isoeléctrico de PAG. *Molécula predominante	45

RESUMEN

GIOVANNA LEÓN LEGASPI. Identificación de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAGs) en extractos parcialmente purificados de placenta ovina (bajo la dirección de la Dra. Griselda Valdéz Magaña y el Dr. José Gerardo Perera Marín)

Las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAGs) se expresan en la placenta como una serie de isoformas. El presente estudio tiene como objetivo aislar isoformas e identificar mediante el sistema Western blot, PAGs de diferente peso molecular en extractos parcialmente purificados de placenta ovina. Previo al desarrollo del estudio, se obtuvieron las glicoproteínas presentes en placentomas de 100 días de gestación mediante una precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una concentración final del 40% (PAG40). Este precipitado de proteínas fue purificado en el intercambiador iónico DEAE-Sephacel mediante un gradiente escalonado de NaCl (20, 40, 80, 160 y 1000 mM). A partir de este momento, las fracciones recuperadas con 80 y 160 mM de NaCl se repurificaron mediante el cromatofoco utilizando al intercambiador iónico PBE-118 equilibrado a pH 11. Las fracciones obtenidas de esta corrida cromatográfica se eluyeron con un gradiente de pH (3.5 a 11.0) y se analizaron mediante la técnica de Western blot, utilizando el anticuerpo primario PAG1-NBP2-56541 a una dilución 1:1000 que se incubó por 20 horas a 4 °C. El inmunodiagnóstico se determinó con la aplicación de un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución 1:5000 y el revelado de las bandas de proteína se llevó a cabo con un estuche comercial (Bio-Rad). Con los procedimientos, el cromatofoco y el Western blot, se logró identificar tres proteínas inmunoreactivas a PAGs con peso molecular de 130.0, 53.0 y 28.0 kDa con una predominancia de la proteína de 53.0 kDa que presentó un punto isoeléctrico de 4.96.

Palabras clave: Glicoproteínas asociadas a la gestación (PAGs); Inmunotransferencia; Cromatofoco.

1 INTRODUCCIÓN

Las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG's por sus siglas en inglés) se identificaron y estudiaron inicialmente en la especie bovina, estas proteínas recibieron el primer nombre como "proteínas específicas de la preñez del tipo B (PSPB)" o "proteínas específicas de la preñez con peso molecular de 60,000 Da (PSP60)" (Butler *et al.* 1982, Sasser *et al.* 1986, Zoli *et al.* 1991, 1992, Mialon *et al.* 1993, 1994). En la actualidad, las evidencias científicas muestran claramente que las PAG's están integradas en una familia de glicoproteínas con características fisicoquímicas particulares que se comparten entre especies, entre ellas conservan sus sitios específicos de glicosilación.

Esta familia de glicoproteínas desde el punto de vista filogenético se divide en dos clases, las llamadas "antiguas" que incluye a PAG 2 y PAG 8, se estima que tienen más de 80 millones de años de existencia, se expresan en células mono y binucleadas del trofoblasto; la clase de las "modernas" o "recientes" que incluyen PAG 1, PAG 3, PAG 4, PAG 5, PAG 6, PAG 7, PAG 9, PAG 10 y PAG 11 con 52 millones de años (Hughes *et al.* 2000; Green *et al.* 2000, Tandiyá *et al.* 2013) expresadas únicamente en células binucleadas; aunque ambos grupos de glicoproteínas coexisten dentro del trofotodermo. Para el caso particular de los rumiantes, el grupo de PAG's modernas predominan (Telugus *et al.* 2009).

Como miembro de la familia de la proteína aspártica (Davies 1990, Dunn 2002) el gene de la familia de las PAG's se considera como una duplicación y expansión del gene de la pepsina y da origen a una secuencia de aminoácidos similar en un 50% con la catepsina D y E que surgió de la duplicación de un gen ancestral similar al pepsinógeno A (Hughes *et al.* 2003). A pesar de contar con similitud a proteínas aspárticas, las primeras PAG clonadas de la placenta con una estructura bi-lobulada, con un sitio específico similar a pepsina capaz de unir pequeños péptidos, presentaron un sitio catalítico enzimáticamente inactivo, sin embargo existen evidencias que señalan que durante la preñez esta actividad puede estar presente (Guruprasad *et al.* 1996; Xie *et al.* 1997).

En lo que respecta a la especie ovina, las primeras PAG's identificadas se denominaron SBU-3 (Gogolin Ewens *et al.* 1986) y posteriormente PAG (Mialon *et al.*

1994). Su peso molecular oscilo en un rango de 43 a 70 kDa con puntos isoeléctricos entre 4.0 a 6.8 (Xie *et al.* 1995, El Amiri *et al.* 2004). Al momento se han caracterizado al menos 11 tipos de ADN complementarios que designan a cada miembro como ovPAG1 a ovPAG 11. Cada una de estas glicoproteínas están presentes a lo largo de la gestación, pero en distintos momentos y concentraciones, por ejemplo, ovPAG2 parece ser la única en expresarse al día 13, ovPAG5 y 7 son detectables al día 16, en tanto que ovPAG 3, 6, 8 y 9 se expresan más tardíamente (Ranilla *et al.* 1994). La revisión de Szafranska 2006 describe un panorama más claro de este fenómeno y evidencias descritas por Ujjawala Tandiya 2013 confirman este comportamiento en la especie caprina.

La expresión y localización de la familia de las PAG's indica claramente que están presentes principalmente en tejido placentario; por ejemplo, en los rumiantes que se caracterizan por presentar una placenta de tipo sinepiteliocorial o sindesmocorial, integrada por dos principales grupos de células: las células mono y binucleadas del trofoblasto, ambos tipos celulares son responsables de sintetizar, almacenar y secretar dichas glicoproteínas. A este respecto, estudios de hibridación *in situ* por Garbayo *et. al.* 2000 y Green *et. al.* 2000, muestran claramente la expresión de algunos miembros de PAG's en placentomas de rumiantes, particularmente en células mono y células grandes binucleadas del trofoblasto. Esta serie de estudios supondría un patrón de distribución diferencial entre isoformas, sin embargo con el empleo de anticuerpos primarios específicos para cada miembro de la familia de PAG's se demostró que no es un evento tan simple, por ejemplo, algunas PAG's como PAG 4, PAG 5 y PAG 10 aunque están presentes en todas las células del trofoblasto, se restringen únicamente en las células binucleadas (Brandt *et al.* 2007), mientras que otro miembro como la PAG 8 se encuentra exclusivamente en las células mononucleadas (Wallace *et al.* 2015).

En conclusión, podemos señalar que como grupo de glicoproteínas, las PAG's se encuentran a lo largo del periodo de gestación con una presencia espacio-temporal característica de cada una de ellas. El perfil de expresión de cada PAG puede diferir sustancialmente entre ellas y entre especies (Patel *et al.* 2004, Telugu *et al.* 2009, Touzard *et al.* 2013). Finalmente, el nivel de complejidad estructural se da entre una variedad de PAG

de rumiantes entre la expresión de células-específicas (mononucleadas vs. binucleadas) y su localización.

1.1 CARACTERÍSTICAS DE PAGs OVINAS

Las PAG's sintetizadas y secretadas por la placenta de la especie ovina cuentan con solo ocho genes identificados (Barbato *et al.* 2013; Garbayo *et al.* 2008). Los estudios que describen el proceso de obtención y purificación de estas proteínas mediante métodos convencionales de purificación a partir de placentomas colectados en diferentes periodos de gestación nos indican la presencia de distintas isoformas. A este respecto, Atkinson *et al.* 1993 identifica y aísla de placentomas de 100 días de desarrollo al menos tres variantes de carga de estas proteínas con pesos moleculares de 57.0, 62.0 y 69.0 kDa con una similitud entre ellas del 61 y 78% en la región del amino terminal. Por su parte Xi *et al.* en 1997, identifica en cortes histológicos de placenta de borrega de 100 días de gestación cuatro PAG's con diferente peso molecular 55.0, 60.0, 61.0 y 65.0 kDa respectivamente. El Amiri y colaboradores en el 2003, reportan el aislamiento y la purificación de tres variantes de glicoproteínas con peso molecular de 55.0, 57.0 y 59.0 kDa con secuencias de aminoácidos distinta pero un patrón similar en la secuencia consenso de los sitios de sulfatación y glicosilación a otras PAG's. Para 2004, el mismo grupo (El Amiri *et al.* 2004) aísla y caracteriza ocho PAG's presentes en los placentomas de 60 y 100 días de gestación, los datos indicaron proteínas de 55.0 a 66.0 kDa, en donde cada una de ellas presentó isoformas con puntos isoeléctricos que oscilaron entre 4.0 y 6.8. El análisis de secuencias N-terminal de estas proteínas confirmó que cuatro de ellas coincidieron con PAG's previamente reportadas y las otras cuatro restantes no se habían identificadas en ese momento.

1.2 FUNCIONES DE LAS PAGs

Al igual que el lactógeno placentario y proteínas relacionadas con la prolactina, las PAG's se localizan dentro de los gránulos secretorios de células mono y binucleadas del trofoblasto (Duello *et al.* 1986, Faria *et al.* 1990, Xie *et al.* 1991, Green *et al.* 2000, Patel *et al.* 2004a). Su liberación de los gránulos secretorios permite establecer un contacto al tejido conectivo útero-materno para desempeñar su función, por otro lado en muchas de ellas pasan

al torrente circulatorio de la madre hasta llegar a su órgano blanco. (Sasser *et al.* 1986, Zoli *et al.* 1992, Green *et al.* 2005).

Las funciones de la familia de las PAGs no son del todo conocida, sin embargo, algunos estudios indican su potencial participación en el desarrollo de la placenta, mantenimiento de la gestación, prevalencia del embrión, también se cree que su acumulación a lo largo de la gestación podría servir como un puente molecular (Wooding *et al.* 2005). Con respecto a la actividad proteolítica es clara la relacionada con los factores de crecimiento (Munger *et al.* 1998, Rifkin *et al.* 1999, Moussad *et al.* 2002) y también esta proteína participa en la modulación inmune e hipotetizada como un regulador local inmunosupresivo, efecto que puede estar involucrado en el fenómeno de histocompatibilidad en la unidad feto-materno. (Dosogne *et al.* 2002; Telugu *et al.* 2010; Pohler *et al.* 2013). Otra posible actividad es la luteotrópica según Del Vecchio *et al.* 1996 y Weems *et al.* 1998, esta glicoproteína inicia la liberación de prostaglandina E2 y progesterona de células lúteas y células endometriales.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las opciones para realizar un diagnóstico de gestación son diversas y se ajustan a las posibilidades y necesidades de cada productor. Una estrategia reciente consiste en la cuantificación de las PAG's presentes en diferentes fluidos biológicos como el suero, la orina y la leche de animales gestantes. Esta cuantificación se ve favorecida por el hecho de que esta serie de glicoproteínas se presentan de forma muy temprana en la gestación y también se ha asociado sus niveles con el estado del feto, su viabilidad y tipo de sexo (Barbatos *et al.* 2022). Luego entonces es evidente suponer una gran ventaja para los ovinocultores ya que el diagnóstico de gestación temprana permite reducir los días abiertos, y evitar así mandar hembras gestantes no detectadas al rastro y darle seguimiento de forma oportuna a hembras primerizas.

Sin embargo, existen desventajas de este método, por ejemplo, falta de desarrollo y accesibilidad por sus altos costos, aunque existen estuches comerciales que miden PAG en diferentes fluidos biológicos estos son especie-específicos lo que reduce la confiabilidad cuando se analizan entre especies heterólogas. Por otro lado, la familia de las PAGs cambia

de tipo de isoforma, concentración y estructura a lo largo de la gestación, por lo que las PAGs que se presenten al inicio de la gestación muy probablemente en el último tercio de la gestación habrán disminuido su concentración y una PAG distinta será la predominante.

Por lo tanto, con el intento de desarrollar un sistema de diagnóstico que permita ser usado de manera rutinaria en el campo necesitamos primeramente obtener y caracterizar PAGs de extractos de placenta que nos sirvan como referencia para generar sus correspondientes anticuerpos y así poder desarrollar un sistema de diagnóstico que pueda ser utilizado fácilmente a nivel del campo.

3 HIPÓTESIS

Con la técnica de Wester-blot, se podrán identificar proteínas de diferente peso molecular inmunorreactivas a las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) en extractos purificados de placenta ovina.

4 OBJETIVO GENERAL

Identificar glicoproteínas asociadas a la gestación de diferente peso molecular en extractos parcial y purificados de placenta ovina.

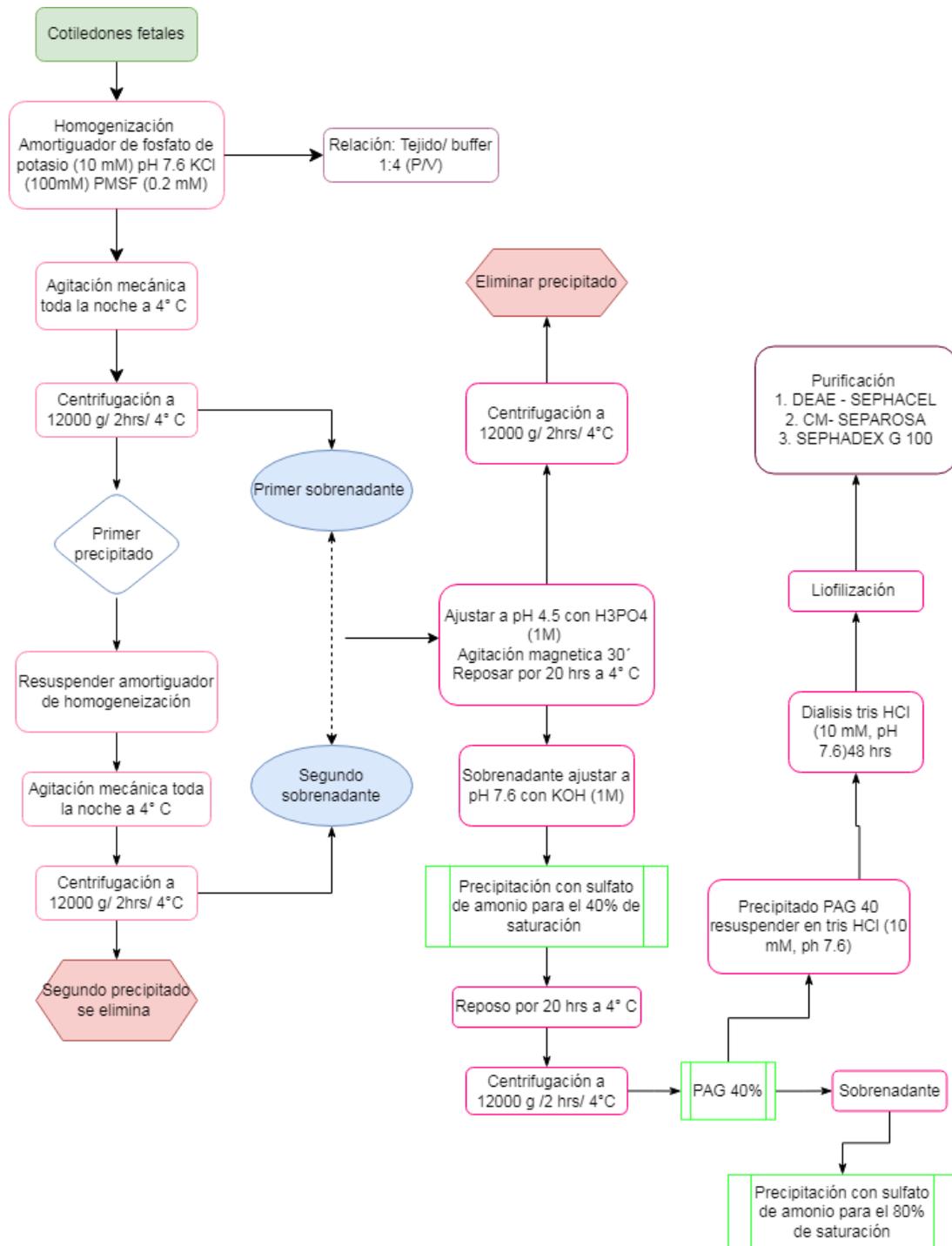
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar la técnica de Wester Blot o inmunotrasferencia a partir de fracciones de proteína purificada de placenta ovina.

Desarrollar la técnica de cromatoenfoco para la identificar el punto isoelectrico de las proteínas.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo desarrollo la técnica de inmunotransferencia o Western Blot y el cromatoenfoco a partir de proteínas que fueron extraídas y purificadas con anterioridad en el Laboratorio de Endocrinología del Departamento de Reproducción de la de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (FMVZ- UNAM), siguiendo el método de El Amiri (2003) y modificado por Nava *et al.* (2019), ver **Esquema 1**. En breve, a partir de una placenta ovina de 100 días de gestación, se disecaron aproximadamente 50 cotiledones, los cuales se homogeneizaron con una solución de fosfato de potasio (10 mM), pH 7.6 que contenía KCl (100 mM) y fenil-sulfonil-metil-fluoruro (20mM). Las proteínas presentes en el extracto placentario se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una solución al 40% y 80% de saturación, fracciones llamadas PAG40 y PAG80, respectivamente. La fracción de proteína PAG40 se purificó en el intercambiador iónico DEAE-SEPHACEL a 4°C, pH 7.6 (ver **Figura 1**) y cuyo patrón electroforetico de cada fracción obtenida durante el gradiente de NaCl se presenta en la **Figura 2**. Las fracciones de PAG40 que obtuvieron con 80 y 160 mM de NaCl (PAG 40-80 y PAG 40-160 mM, respectivamente) se analizaron mediante la técnica de inmunotransferencia o Western blot. Una vez obtenido el patrón, las fracciones se purificaron en una cromatografía de exclusión molecular (ver **Figura 3**) y una vez recuperada la fracción pura se analizó mediante el cromatoenfoco para obtener e identificar isoformas de la proteína que se identificaron mediante la inmunotransferencia.



Esquema 1. Procedimiento de extracción y purificación de PAG tomado de Nava et al 2019, modificado en este estudio.

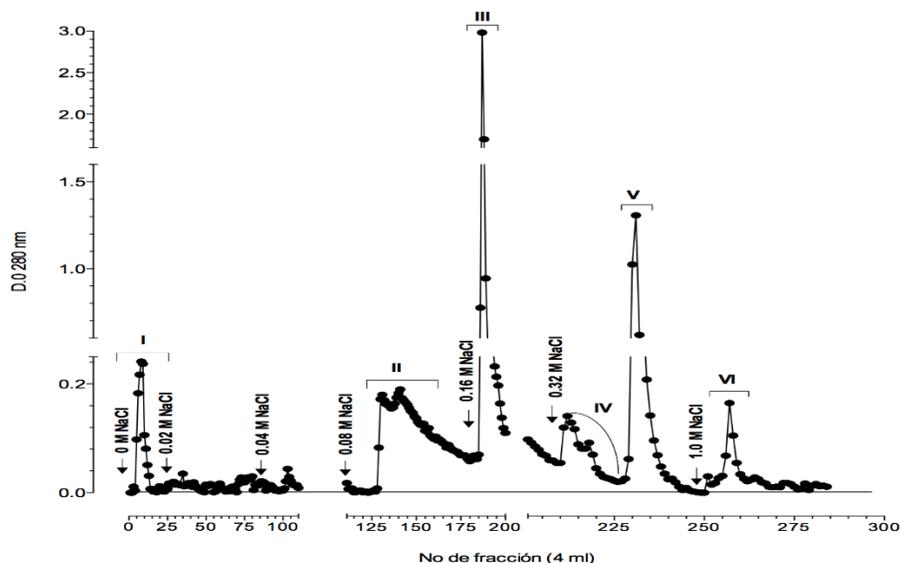


Figura 1: Patrón cromatográfico de la fracción PAG40 en el intercambiador aniónico (DEAE-Sepharcel). La columna (1.5 di x 27 cm) se equilibró con Tris-HCl 0.010 M, pH 7.6 con un flujo de 60 ml/h. La columna recibió 39 mg de proteína que se eluyeron con un gradiente escalona de NaCL, cuyo patrón de elución de la proteína se monitoreo a 280 nm. Fracciones de 4 ml se colectaron. La fracción de proteína no retenidas en la columna (pico I) eluyó con el amortiguador de equilibrio; las fracciones de la II a la VI se obtuvieron con el gradiente de NaCL (20, 40, 80, 160, 320 y 1000 mM, respectivamente). Al término de la corrida cromatográfica, cada pico de proteína se dializó (cut-off 12-14kDa) contra bicarbonato de amonio 0.005M, pH 8.0 por 48 horas con cambios cada 8h y finalmente se liofilizó.

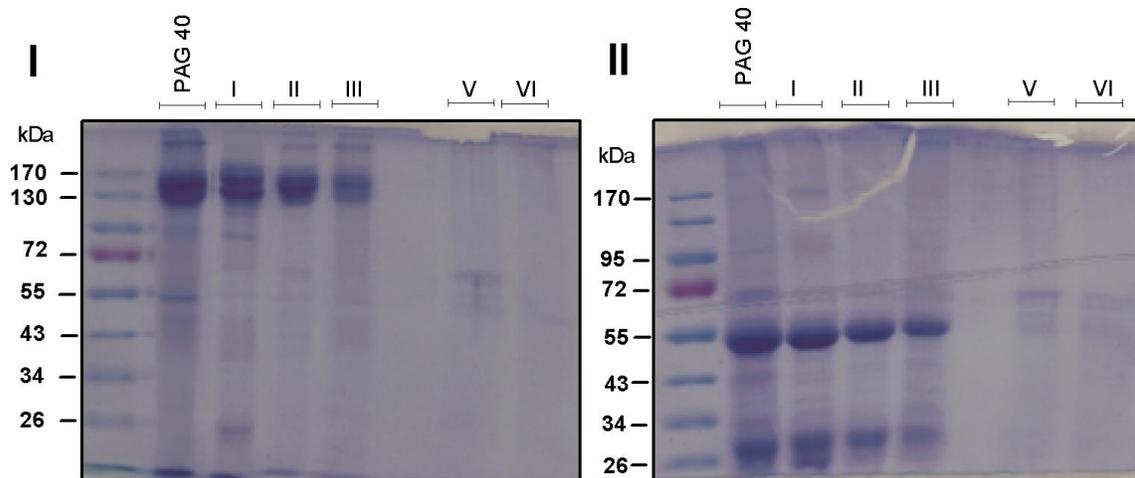


Figura 2. Patrón electroforético de las fracciones de proteínas recuperadas durante a purificación de la PAG40. Electroforesis discontinua (SDS-PAGE) al 10% pH 8.6. Patrón electroforéticos de las fracciones de proteínas recuperadas durante la purificación de la PAG40 en DEAE-Sepharcel. El recuadro I corresponde al patrón en ausencia de agente reductor; el recuadro II muestras en presencia de agente reductor. Cada fracción correspondió a 10 ug de proteína. La tinción se realizó con azul brillante de Comassie. Las marcas negras a la izquierda señalan los pesos moleculares (KDa) de algunas proteínas de referencia.

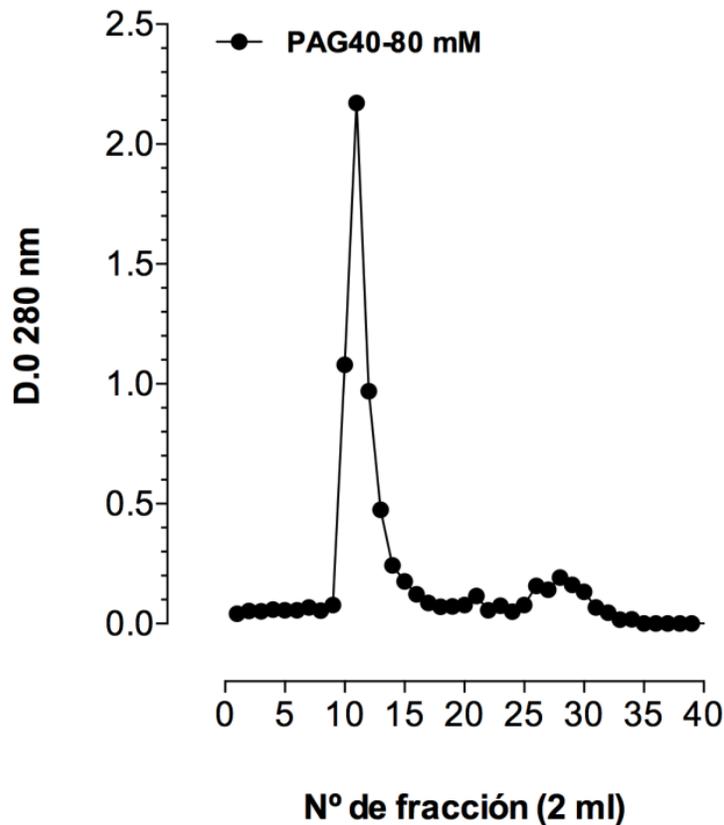


Figura 3. Cromatografía de la fracción PAG40-80. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100) de la fracción PAG40-80 mM de NaCl. La columna (1x 65 cm) se equilibró previamente con bicarbonato de amonio 5 mM, pH 7.5 y se aplicó un flujo de 0.5 ml/min. La elución de la proteína se monitoreó con una longitud de onda de 280 nm y se colectaron fracciones de 2 ml cada una.

5.1 CROMATOENFOQUE

Una vez obtenida la fracción con alta pureza se procedió al desarrollo de la técnica del cromatoenfoco para ello, las fracciones recuperadas con 80 y 160 mM de NaCl provenientes de la fracción PAG40 purificada en DEAE-sephacel, y repurificadas en Sephadex G-100 se pasaron a una columna de intercambiador iónico (PBE-118, Pharmacia) de acuerdo con el método de Perera-Marín (2005). En breve, cada muestra de proteína se resuspendió en amortiguador Pharmalyte (pH 8.0-10.5)-HCl, diluido 1:45 con agua desionizada y ajustado el pH a 7.0. Una vez resuspendida cada muestra se colocó en columna de vidrio de 0.7 cms de diámetro interno por 27 cms de longitud que contenían previamente el intercambiador iónico (PBE-118) equilibrado a pH 11.0 con trietilamina 0.025M. Cada

fracción proteica en la columna se eluyó con un flujo de 7 ml/h y se midió el pH de cada fracción colectada; Cuando se registró un pH de 7.0 en más de 10 fracciones, el amortiguador Pharmalyte se sustituyó por el amortiguador polybuffer 74 (Pharmacia Biotech), diluido 1:8 con agua desionizada y ajustado a pH 3.5, con este amortiguador se colectaron fracciones de proteínas que eluyeron entre el rango de pH de 7.0 a 3.5. Una vez que se observó el pH estable de 3.5, nuevamente el amortiguador se sustituyó por una solución de 1.0 M de NaCl para recuperar las proteínas retenidas en la columna. Cada fracción colectada con el primer amortiguador se neutralizaron con Tris-HCl (1.1M), en tanto que las fracciones eluidas con polybuffer 74 y NaCl se neutralizaron con 1.1 M de imidazol. Todos los amortiguadores utilizados se desgasificaron previamente. Para identificar el patrón de elución de la fracción proteica, cada fracción eluida en la columna se monitoreo en un espectrofotómetro a una longitud de 280 nm. Al término, cada pico de proteína se agrupo para iniciar una diálisis contra bicarbonato de amonio 0.005M pH 8.0 por 48 horas con cambios de solución cada 24 horas y al término de la diálisis cada pico se liofilizó.

5.2 INMUNOTRANSFERENCIA O WESTERN-BLOT.

5.2.1 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Previo a la identificación de las bandas inmunoreactivas a PAG mediante la inmunotransferencia se desarrolló el sistema de gel electroforesis (SDS-PAGE). En breve, el patrón electroforético se desarrolló sobre un gel de acrilamida al 10% de acuerdo a lo descrito por Laemmli et. al.1970, aplicando concentraciones de proteína de PAG40 de 5, 10 y 20 µg tanto en condiciones no reductoras como en presencia de β-mercaptoetanol (reductoras). El gel electroforesis se corrió a 70 volts durante la migración de la muestra en el gel concentrador y luego a 100 volts durante el gel separador. Simultáneamente se aplicaron estándares de bajo peso molecular preteñidos como referencia (Thermo Scientific). Al final de la cada corrida electroforética, los geles se tiñeron con azul brillante de Comassie. La determinación del peso molecular aproximado de las proteínas se determinó comparando la movilidad electroforética relativa de cada proteína con la movilidad relativa generada de proteínas con peso molecular conocido. La movilidad relativa (Rf) fue determinada por dividir la distancia (mm) de la proteína de interés entre la distancia del frente del gel que

correspondió al azul de bromofenol. Una vez obtenido el Rf de cada banda de proteína, se desarrolló una gráfica formada por el Rf de las proteínas de peso molecular conocido ($x=Rf$) y el logaritmo del peso molecular de cada proteína conocida ($y=\text{Log PM}$). Así, la línea de referencia sirvió para extrapolar el Rf de las muestras desconocidas y obtener el peso molecular (Bollag and Edelstein,1996).

5.2.2 INMUNOTRANSFERENCIA

Una vez conocido el patrón adecuado de las bandas de proteína se procedió a identificar la o las proteínas inmunoreactivas a PAG en un gel de electroforesis de SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida en una dimensión aplicando una concentración de proteína de 10 μg por carril. Para ello, una vez concluida la electroforesis y con el mejor patrón de proteínas presentes en el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm trans, blot, Millipore) usando un sistema húmedo de mini-protean (Bio-Rad, USA) aplicando 100 mA por 60 min (Tombin *et al.* 1979). Para verificar la calidad de las proteínas transferidas, la membrana nitrocelulosa se tiñó con una solución de rojo de Ponceau S. Para desteñir la membrana se aplicaron varios lavados con agua desionizada. Después se aplicó un lavado con 0.05% Tween-20 en una solución de 137 mM NaCl y 20 mM Tris a pH 7.5 (TTBS) y la membrana se incubó con amortiguador de bloqueo (TTBS) que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 3% por 1 hora a temperatura ambiente. Tiempo después, la membrana se incubó por 20 horas a 4°C con amortiguador de bloqueo que contenía 1% de BSA y el anticuerpo primario (anti- PAG1, NBP2-56541) a una dilución 1:1000 de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Al término, la membrana se lavó con TTBS y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario generado en cabra y dirigido contra IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch) a una dilución 1:1000 a temperatura ambiente durante dos horas. El revelado de las bandas inmunoreactivas se realizó con el estuche comercial (AP-Conjugated Sustrate kit, BIO-RAD) aplicando 125 μl del agente color A (azul de tetrazolio en dimetilformamida [DMF]), 125 μl de agente de color B (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en DMF), disueltos en 12.5 ml de amortiguador TRIS (0.1 M).

Para el análisis de los resultados obtenidos mediante el Western Blot se tomaron imágenes que se transfirieron a software Imagen J y se analizaron las bandas de proteína. Este proceso se llevó a cabo al menos dos veces por cada imagen obtenida.

6 RESULTADOS

Previo al análisis de las fracciones PAG40-160 mM y PAG40-80 mM en el cromatoenfoco fue necesario estudiar la concentración de proteína requerida para lograr un patrón electroforético óptimo y con ello lograr la identificación de bandas inmunoreactivas de proteína. En el panel A de la **Figura 4** se ejemplifica el patrón electroforético de la fracción PAG 40-160 mM a diferentes concentraciones de proteína en presencia y ausencia de un agente reductor (beta mercaptoetanol). Como se aprecia el patrón de bandas de proteínas tanto en condiciones no reductoras (NR) como reductoras (R) resulta mejor definido conforme se disminuye la concentración de proteína. Siendo la concentración de 10 μ g de proteína la que se consideró como la más adecuada. El análisis por medio de la inmunotransferencia (panel B) nos indicó claramente que podemos trabajar con 10 o 5 μ g de proteínas en donde se aprecian la banda inmunoreactivas a PAG.

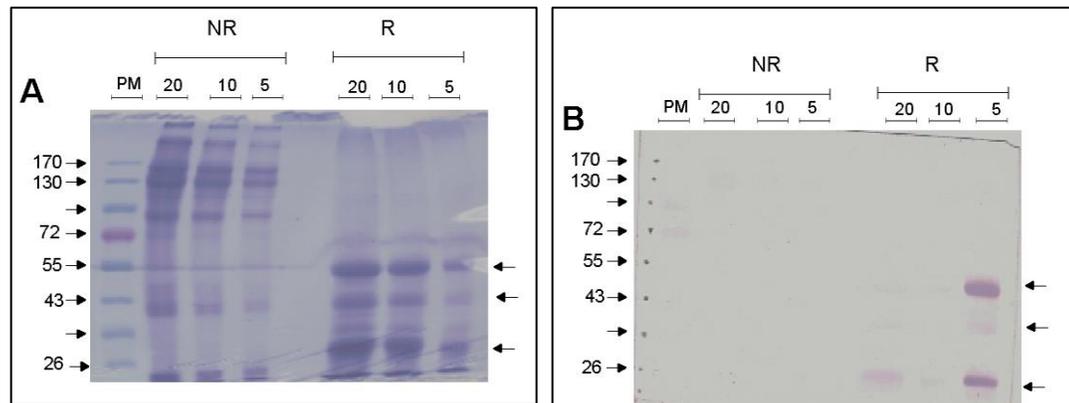


Figura 4. Patrón electroforético de la fracción PAG40-160. Panel A) Patrón electroforético de la fracción PAG40-160 obtenida con 160 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sephacel. La electroforesis en SDS-PAGE al 10% se corrió bajo diferentes concentraciones de proteína en ausencia (NR) o presencia (R) de agente reductor. PM se refiere a las proteínas con peso molecular conocido que se indica en el lado izquierdo de la fotografía. Las flechas de la derecha muestran las bandas de proteína predominantes con peso molecular de 53, 42 y 28 kDa. Panel B) Bandas inmunoreactivas a PAG. Para el desarrollo del Inmunoblot se probó el anticuerpo 1:1000 por 20 horas a 4°C y el segundo anticuerpo 1:5000.

Una vez establecidas las condiciones para PAG40-160 mM, se procedió a realizar una electroforesis utilizando la fracción obtenida con 80 mM de NaCL. Para ello, se tomó como referencia la concentración de 10 μ g de proteína establecida previamente, así como en presencia del agente reductor (**Figura.5**). En la **Figura 5** se presenta el patrón electroforético

de PAG40 previa a la purificación en DEAE-Sephacel así como la fracción obtenida con 80 mM de NaCl. Para confirmar la reproducibilidad de la técnica se aplicó en tres carriles la misma concentración. Como se aprecia en el recuadro superior el patrón electroforético fue similar destacando la banda de proteína de peso molecular de 53.0 kDa y una menor de 28.0 kDa. Este mismo patrón se repitió en el estudio de la inmunotransferencia (**Figura 5**. Panel B) en donde las bandas inmunoreactivas coincidieron a lo establecido previamente.

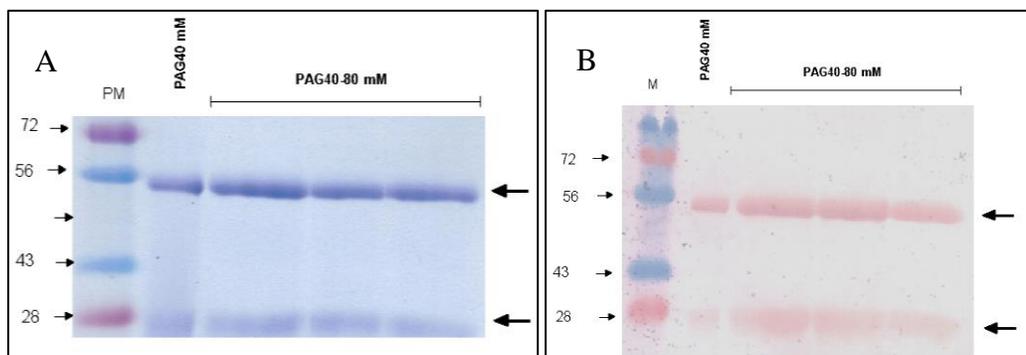


Figura 5: Patrón electroforético de la fracción PAG40-80. Patrón electroforético de la fracción PAG40-80 obtenida con 80 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sephacel. La electroforesis en SDS-PAGE al 10% se corrió con 10 μ g de proteína en presencia (R) de agente reductor. PM se refiere a las proteínas con peso molecular conocido que se indica en el lado izquierdo de la fotografía. Las flechas de la derecha muestran las bandas de proteína predominantes con peso molecular de 53 y 28 kDa. Panel B: Bandas inmunoreactivas a PAG. Para el desarrollo del Inmunoblot se probó el anticuerpo 1:1000 por 20 horas a 4°C y el segundo anticuerpo 1:5000.

Una vez establecidas las condiciones de la electroforesis y su análisis por el Western blot se procedió al análisis de las muestras mediante el cromatofoco. En la **Figura 6** se presenta el patrón de elución de la fracción PAG 40-80 mM. En la corrida cromatográfica se aprecia un pico de proteína cercano a pH 10, y una fracción de proteína de pH 4.96 y finalmente un pico a un pH de 5.6. Debido al bajo rendimiento de proteína en los pico de pH 10.0 y 5.6 de pH no se logró conocer el análisis electroforético, en contraste la fracción eluida a pH 4.6 mostró un patrón electroforético similar a la fracción de origen (PAG40) en donde se apreció una banda de proteína de 53.0 kDa y una pequeña de 28.0 kDa, respectivamente (**Figura7** panel A).

En la **Figura 7** panel B se muestran las fracciones de proteína que resultaron inmunoreactivas a PAG.

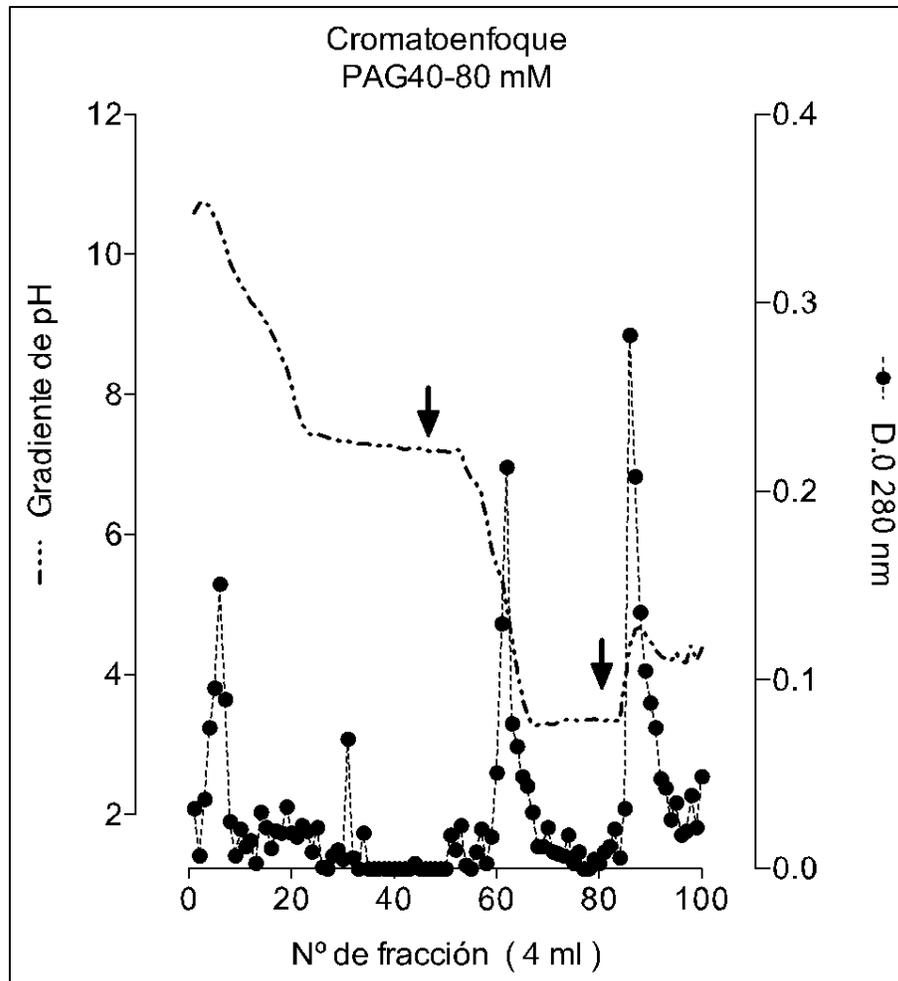


Figura 6. Patrón representativo de distribución de PAG40-80 (fracción recuperada con 80 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sephacel) a través del cromatoenfoco. La columna cromatográfica con el intercambio iónico PBE-118 se equilibró previamente con 0.025M de trietilamina a pH 11.0 y después la columna recibió 6.7 miligramos de proteína. La columna se eluyó con un gradiente de pH que corrió desde pH 11.0 hasta 3.5 y se colectaron fracciones de 4 ml cada una. La flecha inicial en la figura indica el momento del cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y la segunda flecha después de la aplicación de 1.0 M de NaCl.

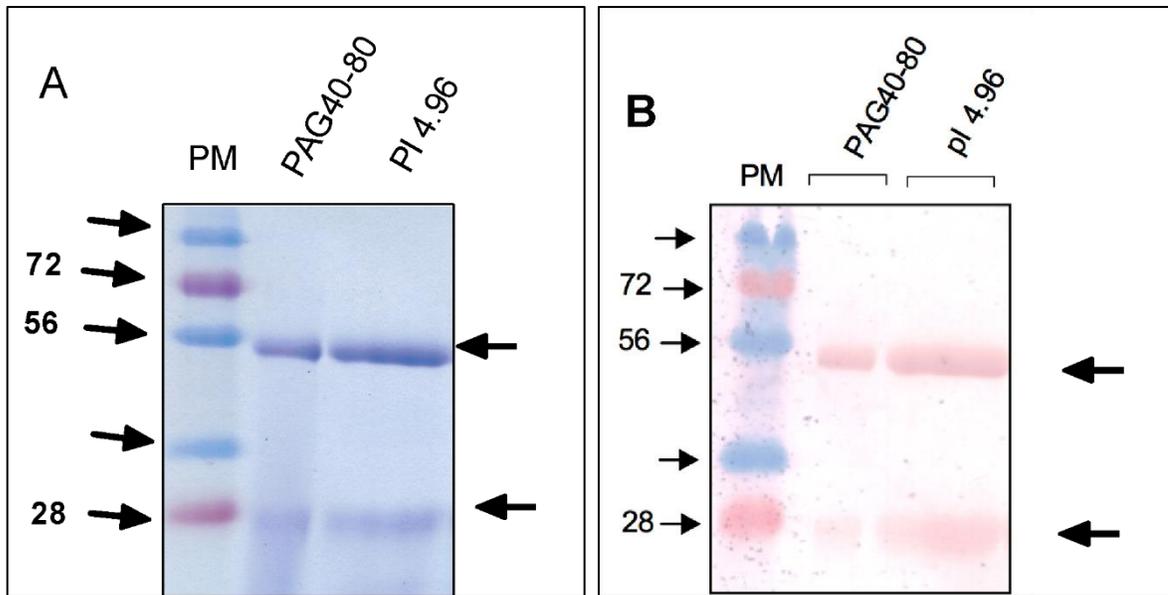


Figura 7. Patrón electroforético PAG40-80. Panel A) Patrón electroforético en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de la isoforma predominante (pI 4.96) recuperada durante el cromatoenfoque. PM= indica el peso molecular de las proteínas de referencia y con flechas internas las bandas de proteína predominantes (53.0 y 28 kDa). Panel B) Patrón inmunoelectroforético de la fracción PAG40-80 mM antes y después del cromatoenfoque. Cada fracción se analizó con una concentración de 10 μ g de proteína y la presencia de la glicoproteína asociada a la gestación (PAG) se detectó con el anticuerpo primario PAG1 (antibody, NBP2-56541, Novusbio), diluido 1:1000 durante 20 h a 4°C y la banda se reveló en presencia del anticuerpo secundario generado en cabra y dirigido contra IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch) acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:5000 a través del estuche comercial (AP-Conjugated Substrate kit, BIO-RAD). La flecha señala las proteínas de referencia con su respectivo peso molecular.

Por otro lado, el patrón de elución de la fracción PAG 40-160 mM analizado mediante el cromatoenfoque se presenta en la **Figura. 8**. Como se aprecia, se observó únicamente un pico de proteína pH 4.96, y una pequeña fracción de proteína a un pH de 5.6. Debido al bajo rendimiento de proteína en los picos de pH 5.6 de pH no se logró conocer el análisis electroforético. En contraste la fracción eluida a pH 4.96 mostró un patrón electroforético similar a la fracción de origen (PAG40) en donde se apreció una banda de proteína de 53.0 kDa y una pequeña de 28.0 kDa, respectivamente (**Figura. 9**, Panel A), mismas fracciones de proteína que resultaron inmunoreactivas a PAG como se aprecia en el recuadro B de la misma figura.

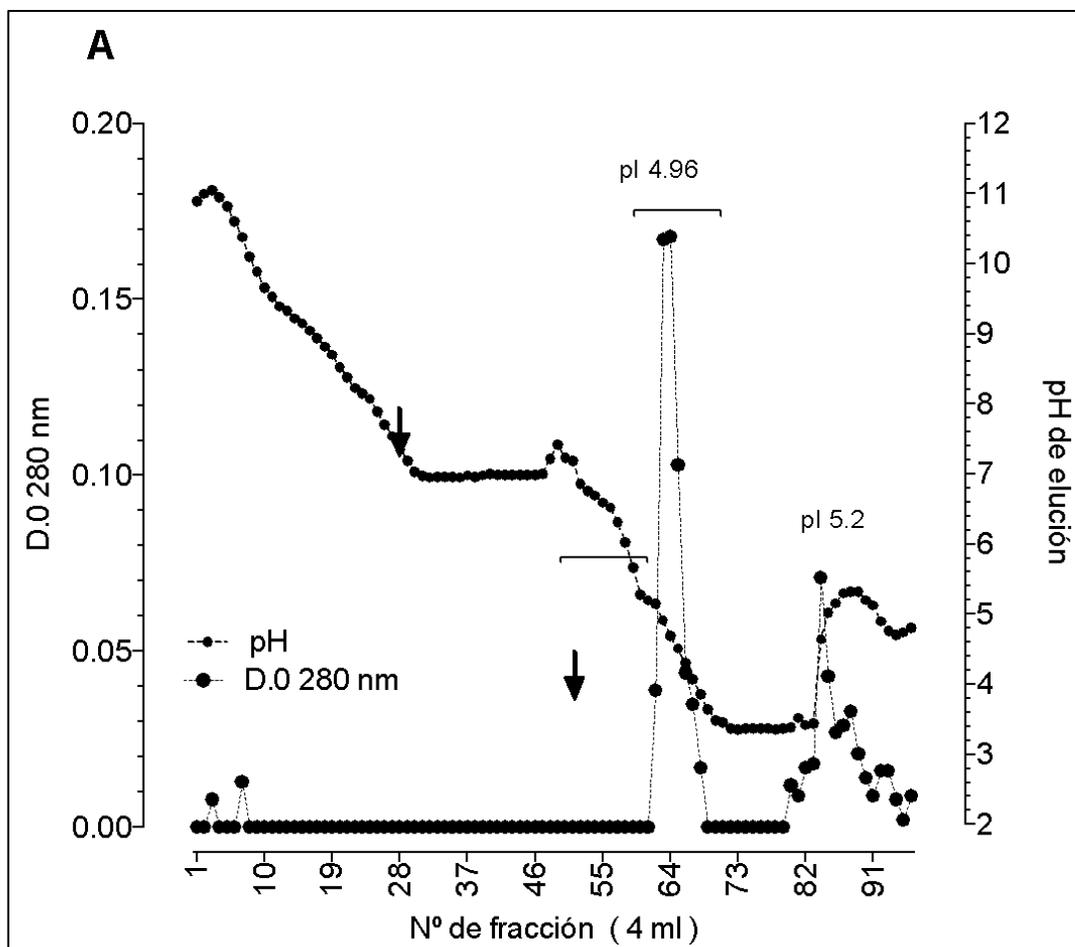


Figura 8. . Patrón representativo de distribución de PAG40-160. Patrón representativo de distribución de PAG40-160 (fracción recuperada con 160 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sephacel) a través del cromatoenfoco. La columna cromatográfica con el intercambio iónico PBE-118 se equilibró previamente con 0.025M de trietilamina a pH 11.0 y después la columna recibió 6.7 miligramos de proteína. La columna se eluyó con un gradiente de pH que corrió desde pH 11.0 hasta 3.5 y se colectaron fracciones de 4 ml cada una. La flecha inicial en la figura indica el momento del cambio del amortiguador durante la evaluación cromatográfica y la segunda flecha después de la aplicación de 1.0 M de NaCl.

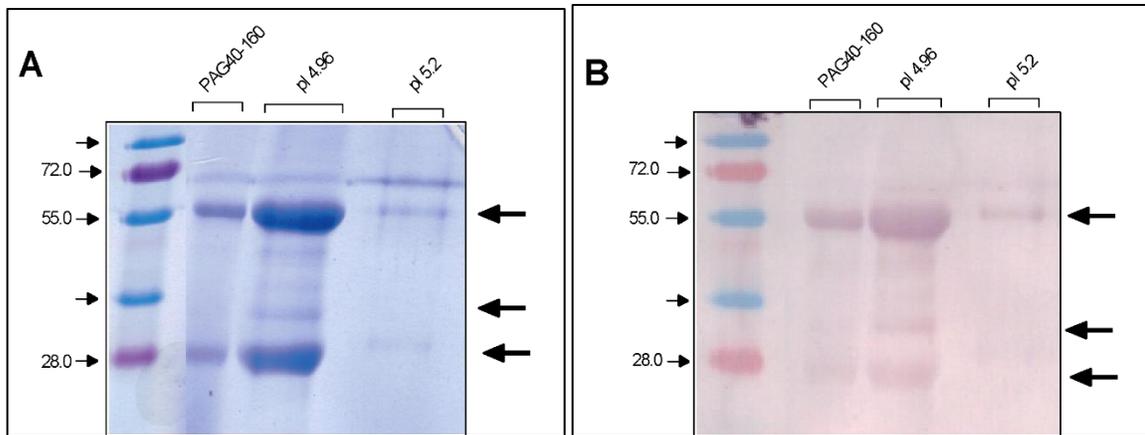


Figura 9. Patrón electroforético PAG40-160. Panel A) Patrón electroforético en SDS-PAGE bajo condiciones reductoras de la isoforma predominante (pI 4.96 y 5.2) recuperadas durante el cromatoenfoque. PM= indica el peso molecular de las proteínas de referencia y con flechas internas las bandas de proteína predominantes (53.0 y 28 kDa). Panel B) Patrón inmunolectroforético de la fracción PAG40-160 mM antes y después del cromatoenfoque. Cada fracción se analizó con una concentración de 10 μ g de proteína y la presencia de la glicoproteína asociada a la gestación (PAG) se detectó con el anticuerpo primario PAG1 (antibody, NBP2-56541, Novusbio), diluido 1:1000 durante 20 h a 4°C y la banda se reveló en presencia del anticuerpo secundario generado en cabra y dirigido contra IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch) acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:5000 a través del estuche comercial (AP-Conjugated Sustrate kit, BIO-RAD). La flecha señala las proteínas de referencia con su respectivo peso molecular.

7 DISCUSIÓN

Las proteínas provenientes de un extracto de origen ovino de placentomas de 100 días de gestación se precipitaron con una solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una fracción de proteína del 40% (PAG40), fracción de proteína que se purificó en el intercambio iónico DEAE-Sepharcel para recuperar fracciones de proteína con 80 y 160 mM de NaCl (datos no publicados, Nava K. *et al.* 2019). Estas últimas fracciones se analizaron mediante la técnica de inmunotransferencia o Western blot y el producto final de cada fracción de purificación se analizó mediante el cromatofoco para obtener e identificar isoformas de la proteína. Con estos dos últimos procedimientos se logró identificar la presencia de tres proteínas inmunoreactivas asociadas a la gestación de la especie ovina con el predominio de la isoforma de 53.0 kDa con un punto isoeléctrico 4.96.

Para el desarrollo del sistema de inmunodetección se recurrió al empleo del anticuerpo primario policlonal generado en conejo en contra de la secuencia de los aminoácidos:

KCHQSRELPRIPPESAVDTMLTARSVDGDQGLGMEGPYEVVKDSSSQENMVEDCL
YETVKEIKEVAAAHAHLEKGHSGKA, correspondiente a la PAG 1 de origen humano (NBP2-56541), el empleo de este anticuerpo permitió identificar proteínas inmunoreactivas a PAG de origen ovino con distinto peso molecular.

El hecho de que las PAG's se consideren como glicoproteínas con distinto contenido de oligosacáridos, establece un panorama de múltiples bandas cuando se ejecuta la electroforesis en SDS-PAGE, este evento supone que la presencia de proteínas con peso molecular de 100-130 kDa; 53.0 y 28.0 kDa corresponden a variantes de masa de PAG.

A este respecto, los resultados de este estudio (**Figura. 8**) y previo al desarrollo del Western-blot demuestran que la fracción PAG40-160mM, fracción obtenida con 160 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sepharcel muestra un patrón electroforético bajo condiciones no reductoras (en ausencia de β -mercaptoetanol) que se caracterizó por la presencia de proteínas predominantes con alto peso molecular (100 a 138 kDa) y que resultaron inmunoreactivas a PAG. También se observó una escasa presencia de bandas de

proteínas de 53.0 y 28.0 kDa, respectivamente. En contraste, cuando las muestras fueron sometidas a un calentamiento y al agente reductor, el patrón electroforético denoto que la banda de 100-130 kDa casi desaparece en su totalidad y se enriquecieron la proteínas de 53.0 y 28.0 kDa, este resultado sugiere que la banda de alto peso molecular correspondió a formas agregadas de la proteína nativa de PAG, evento que se ha documentado y descrito para otras glicoproteínas de origen hipofisario (Perera *et al.* 2004); sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se trate de una variante hiperglicosilada de la proteína dado que en extractos purificados de placenta de bisonte americano (Kiewisz *et al.* 2008) y europeo (Szafranska *et al.* 2005; Kiewisz 2009) se demostró la existencia de una proteína nativa de PAG con peso molecular entre 72.0 a 76.0 kDa y de 70.0 a 90.0 kDa, respectivamente, peso molecular cercano al descrito para la PAG observada en este estudio. En apoyo a esta evidencia, se sabe que el incremento en el peso molecular de estas proteínas depende de la presencia de diferentes sitios de glicosilación, por ejemplo, la familia de proteínas para la especie ovina, bovina y caprina cuentan con siete sitios posibles de glicosilación (Xie *et al.* 1997; Garbayo *et al.* 2000), a diferencia de la especie porcina en donde solo se han descrito tres sitios de glicosilación (Szafranska *et al.* 2006) (Szafranska *et al.* 1995; Panasrewicz *et al.* 2004; Szafranska *et al.* 2004) Luego entonces, el incremento de sitios de glicosilación como ocurre en la especie ovina se puede correlacionar positivamente con el incremento del peso molecular de la proteína observada de 130 kDa, y por lo tanto indica que la posible presencia de una forma hiperglicosilada esté presente en el SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.

La proteína con peso molecular relativo de 53.0 kDa (**Figura 8** y **Figura 9**) que se identificó en este estudio bajo condiciones reducidas (en presencia de β mercaptoetanol) resulto ser la más abundante y al comparar su peso molecular con resultados previos en la misma especie (El Amiri *et al.* 2003; 2004) y otras especies como la bovina (Xi *et al.* 1997; Zoli *et al.* 1991), la caprina (Barbato *et al.* 2008) confirmó la existencia y similitud a una variante de masa y que se encuentra dentro del rango de pesos moleculares de 42.0 a 62.0 kDa de otras especies (Panasrewicz *et al.* 2019; Souza *et al.* 2002). Por lo tanto, estos resultados son un indicativo claro de una variante de masa para esta especie presente en extractos de placenta ovina de 100 días de gestación.

En concordancia al resultado anterior, esta proteína resulto ser inmunoreactiva a PAG mediante el análisis por Western blot. Este resultado coincidió de manera precisa al patrón electroforético reportado para la proteína de 53.0 kDa y descrita en el instructivo del anticuerpo. Esta banda de proteína es identificada exclusivamente por la secuencia polipeptídica de PAG 1 de origen humano y con la cual se generó el anticuerpo, este resultado por lo tanto, confirma la existencia de PAG en extractos de placenta ovina de 100 días de gestación, que es reconocida de manera específica por epítomos del anticuerpo que reconocen a PAG 1 humana y se amplía a la especie ovina. A este respecto, el desarrollo de sistemas inmunológicos heterólogos como el ELISA (Friedrich et. al 2010) el RIA (Barbatos et, al. 2009) e inmunodifusión radial (El Amir 2003 B) han permitido identificar y cuantificar a diferentes variantes de esta familia de proteínas de distintas especies, por lo tanto, se puede inferir que entre variantes de esta proteína entre especies comparten secuencias de aminoácidos que pueden ser reconocidas de manera indistinta por epítomos de anticuerpos policlonales de ensayos heterólogos.

Finalmente, el estudio previo de nuestro laboratorio encaminado a identificar la secuenciación de aminoácidos de la fracción de proteína PAG40 eluida con 80 mM de NaCl (estudiada aquí) demostró que la banda de esta proteína de 53.0 kDa y que se analizó a través de la secuenciación de aminoácidos, cuenta con una homología del 100% en su secuenciación de aminoácidos para PAG 3, PAG 4 y una proteína similar a PAG de origen ovino, lo que confirma categóricamente que nuestra proteína mayoritaria identificada en este estudio se trata de una variante de masa de 53 kDa presente en placentomas de la especie ovina de 100 días de gestación.

Un hallazgo interesante fue la presencia de una proteína inmunoreactiva a PAG con un peso molecular de 28.0 kDa que podría tratarse de formas inmaduras de la proteína en diferentes estadios de glicosilación. A este respecto se ha informado en ovinos que el peso molecular de PAGs maduras se incrementa en un 18% debido al contenido de los oligosacáridos en la molécula (Atkinson *et al.* 1993). Por otra parte, estudios en la especie bovina (Zoli *et al.* 1991; Xie *et al.* 1994; Patel *et al.* 2004; Touzard, 2013) han descrito que la eliminación del grupo de oligosacáridos con la aplicación de glicopeptidasa F en PAG1, PAG 2 y PAG 11, con un peso molecular previo de 63.0, 57.0 y 44.0 kDa, respectivamente,

disminuyen drásticamente a un valor cercano 37.0 kDa y en algunos casos hasta de 21.0 kDa, estas evidencias pueden sugerir que la incorporación de oligosacáridos durante la síntesis de la proteína da origen a la proteína madura.

Por otro lado, Xie en 1997 aplicando tunicamisina como un inhibidor de la glicosilación demostró un patrón electroforético de las proteínas PAG's de bajo peso molecular (8 y 10 kDa), adicionado a lo anterior se sabe que el patrón de glicosilación puede ser bi, tri, y tetra-antenario de oligosacáridos (Atkinson *et al.* 1993). Por lo tanto, podemos señalar que la proteína observada de 28.0 kDa durante la purificación de PAG40 puede ser una proteína que puede estar en un diferente estadio de desarrollo y que fue obtenida durante la purificación de la proteína. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se trate de una proteína madura que es sintetizada en este periodo de gestación en ovinos, ya que se ha informado de proteínas cercana a este peso molecular en la placenta ovina de 60 días de preñez (El Amirí *et al.* 2004) y recientemente se han observado proteínas PAG de 19.0 a 26.0 kDa en el oso pardo (Panasrewicz *et al.* 2019), a pesar de ello se desconoce la función de esta proteína, así como su estudio de secuenciación y patrón de aminoácidos. Finalmente, existe la posibilidad de un grupo de formas de estas proteínas se trate de péptidos generados durante el proceso de extracción de la muestra original y que son arrastrada durante la purificación final y que es reconocido de forma inespecífica por el anticuerpo al contener sitios de reconocimiento específicos luego entonces para verificar que se trata de una posible isoforma de PAG es necesario realizar un estudio de secuenciación de la proteína como se realizó en este estudio para PAG40-80 mM.

La isoforma aislada a partir de la fracción PAG40-80 y de la fracción PAG40-160 mM mediante el análisis por cromatoenfoque (**Figura 6 y 8**) permitió confirmar mediante el western blot (**Figura 7 y 9**) que la proteína de 53.0 kDa y que represento la mayor proporción de la proteína que eluyó en el rango de pH ácido y que correspondió al pico de proteína identificada a pH 4.96 se trata de PAG. Este patrón de distribución de la proteína en el cromatoenfoque es el primero en ser informado para esta proteína. El punto isoelectrico identificado resultó similar, aunque no idéntico al observado en otras isoformas para la especie ovina (El Amiri *et al.* 2003, Bella A *et al.* 2007), y bovinos (Klisch K 2003), en donde las isoformas aisladas de tipo ácido predominaron. Por lo tanto, podemos asumir que el

procedimiento desarrollado para la obtención del grupo de isoforma de la PAG ovina no interfiere en el patrón particular de isoformas que muestra la PAG en esta especie y otras especies. En apoyo a este resultado, un estudio preliminar de nuestro grupo utilizando la electroforesis en dos dimensiones para el análisis de la misma fracción se identificó un patrón de tres proteínas en el rango de 4.0 a 6.0 de pH. Siendo la proteína cercana pH 5.0 la mayoritaria. La presencia de otras proteínas con pH diferentes es debido posiblemente a que el cromatoenfoco bajo nuestras condiciones es poco resolutivo. Mientras que la electroforesis en 2D se ha demostrado su alta sensibilidad

Aunque es claro que ocurren modificación postraducción como el proceso de glicosilación dentro de las proteínas (Perera *et al.* 2007) y este evento se lleva a cabo de forma específica en células de la placenta durante el desarrollo gestacional (El Amiri *et al.* 2003 A; 2003 B y 2004), y mediante ensayos de protección de ribonucleasa (Green *et al.* 2000; Garbayo *et al.* 2000) se ha demostrado que este patrón diferencial de expresión de PAG's ocurre a lo largo de la gestación, hace pensar, por lo tanto, que la presencia de proteínas de peso molecular de 100-130 kDa, 53.0 kDa y 28.0 kDa son proteínas de PAG presentes en el tejido placentario como productos de modificación postraducción y que pueden estar presentes durante el proceso de purificación y que se recuperaron durante la extracción del extracto placentario ovino (Szafranska *et al.* 2006) y que no se trata de artefactos del proceso de extracción y purificación desarrollado en nuestro estudio inicial.

En este estudio se confirmó la presencia de tres proteínas inmunoreactivas a PAG en tejido placentario de 100 días de gestación con un anticuerpo policlonal heterólogo a la especie en estudio. La proteína de 53kDa resulto ser la predominante con un pI de 4.96. Es de destacar que durante en la revisión de la literatura se presentó que la variante de 55 a 57 kDa corresponde a la PAG predominante durante su purificación.

Aunque se cuenta con esta información es necesario la realización de estudios biológicos *in vivo e in vitro* con el fin de conocer la relación estructura-función de esta familia de proteínas como se ha descrito para otras glicoproteínas involucradas en el proceso reproductivo (Perera-Marín *et al.* 2007).

Finalmente, bajo las condiciones de la inmunotransferencia desarrollada y el estudio con el cromatoenfoco se logró identificar una proteína predominante inmunoreactiva a PAG con un peso molecular de 53.0 kDa y un pI de 4.96. Es necesario un método de inmunodetección homólogo (inmunotransferencia) para confirmar nuestros hallazgos.

8 CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones de la inmunotransferencia desarrollada y el estudio con el cromatoenfoco se logró identificar y aislar proteínas inmunoreactivas PAG`s, partir de placentomas en el día 100 de gestación ovina), con diferente peso molecular y con un punto isoeléctrico de 4.96. Es necesario un método de identificación homólogo (inmunotransferencia) para confirmar nuestros hallazgos. Se cuenta con material biológico suficiente para la inducción de sus correspondientes anticuerpos.

9 REFERENCIAS

1. Alvarex-Oxiley A, Señales embrionarias y hormonas placentarias: bases moleculares y potencial uso para el diagnóstico y el seguimiento de la gestación en animales de interés productivo. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 2022. 30 (3)
2. Atkinson YH, Gogolin-Ewens KJ, Hounsell EF, Davies MJ, Brandon MR, Seamark RF: Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. Evidence for a new family of pregnancy-associated molecules. J Biol Chem 1993,268:26679–26685.
3. Austin, K.J.; King, C.P.; Vierk, J.E.; Sasser, R.G.; Hansen, T.R. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. Endocrinology 1999, 140, 542–545.
4. Barbato O. Menchetti L. *et al.* Using Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAGs) to Improve Reproductive Management: From Dairy Cows to Other Dairy Livestock. Animals 2022, 12, 2033. <https://doi.org/10.3390/ani12162033>
5. Barbato, O., Sousa, N.M., Klisch, K., Clerget, E., Debenedetti, A., Barile, V.L., Malfatti, A., Beckers, J.F., 2008. Isolation of new pregnancy-associated glycoproteins from water buffalo (*Bubalus bubalis*) placenta by Vicia villosa affinity chromatography. Res. Vet. Sci. 85, 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.01.004>.
6. Barbato, O.; Guelfi, G.; Barile, V.L.; Menchetti, L.; Tortiello, C.; Canali, C.; Brecchia, G.; Traina, G.; Beckers, J.F.; Sousa, M.N. Using real-time PCR to identify pregnancy-associated glycoprotein 2 (PAG-2) in water buffalo (*Bubalus bubalis*) blood in early pregnancy. Theriogenology 2017, 89, 106–113.
7. Barbato, O.; Melo de Sousa, N.; Barile, V.L.; Canali, C.; Beckers, J.-F. Purification of pregnancy-associated glycoproteins from late-pregnancy *Bubalus bubalis* placentas and development of a radioimmunoassay for pregnancy diagnosis in water buffalo females. BMC Vet. Res. 2013, 9, 89.
8. Barbato, O.; Sousa, N.M.; Debenedetti, A.; Canali, C.; Todini, L.; Beckers, J.F. Validation of a new pregnancy-associated glycoprotein radioimmunoassay method for the detection of early pregnancy in ewes. Theriogenology 2009, 72, 993–1000.
9. Bella A. Sousa N. Dehimi M. *et al.* Western analyses of pregnancy associated glycoprotein family (PAG) in placental extracts of various mammals. Theriogenology 68; 2007: 1055-1066.

10. Bollag DM, Edelstein SJ. Protein Methods. 2a ed. Nashville, TN, Estados Unidos de América: John Wiley & Sons; 1996.
11. Brandt, G.A., Parks, T.E., Killian, G., Ealy, A.D., Green, J.A., 2007. A cloning and expression analysis of pregnancy-associated glycoproteins expressed in trophoblasts of the white-tail deer placenta. *Mol. Reprod. Dev.* 47, 1355–1362. <https://doi.org/10.1002/mrd.20669>
12. Butler, J.E.; Hamilton, W.C.; Sasser, R.G.; Ruder, C.A.; Hass, G.M.; Williams, R.J. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol. Reprod.* 1982, 26, 925–933.
13. Chan JSD, Robertson HA, Friesen HG. 1976. The purification and characterization of ovine placental lactogen. *Endocrinol* 98:65–76.
14. Chen, X., Rosenfeld, C.S., Roberts, R.M., Green, J.A., 2001. An aspartic proteinase expressed in the yolk sac and neonatal stomach of the mouse. *Biol. Reprod.* 65, 1092–1101. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.4.1092>
15. Davies, D.R., 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 19, 189–215.
16. Del Vecchio, R.P.; Sutherland, W.D.; Sasser, R.G. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2a. *J. Reprod. Fertil.* **1996**, 107, 131–136.
17. Dosogne, H., A. Massart-Leen, and C. Burvenich. 2002. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. Pages 295–305 in *Biology of the Mammary Gland*. Springer, Berlin, Germany.
18. Duello TM, Byatt JC, Bremel RD. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology* 1986;119:1351–5.
19. El Amiri B, Remy B, De Sousa NM, Beckers JF. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod Nutr Dev.* 2004 May-Jun;44(3):169-81.
20. El Amiri, B.; Sousa, N.M.; Alvarez Oxiley, A.; Hadarbach, D.; Beckers, J.F. Pregnancy-Associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep. *Res. Vet. Sci.* 2015, 99, 30–36.

21. El Amiri, Remy B, Sousa N, Jordis B, *et al.* Isolation and Partial Characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from the ewe placenta. *Molecular reproduction and development* 2003; 64: 199-206
22. Friedrich, M.; Holtz,W. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 142–146.
23. Gajewski, Z.; Beckers, J.F.; Sousa, N.M.; Thun, R.; Sulon, J.; Foundez, R. Determination of pregnancy associated glycoprotein concentration in sheep. A retrospective study. *Adv. Cell Biol.* 1999, 2, 89–96.
24. Galina C. Reproduccion de los animals domésticos. UNAM 2021. E-book <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/index.html>
25. Garbayo JM, Remy B, Alabart JL, Folch J, Wattiez R, Falmegne P *et al.* Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biol Reprod* 1998; 58:109-15.
26. Garbayo JM, Serrano B, Lopez-Gatius F: Identification of novel pregnancyassociated glycoproteins (PAG) expressed by the perimplantion conceptus of domestic ruminants. *Anim Reprod Sci* 2008, 103:120–134.
27. Garbayo, J.M.; Green, J.A.; Manikkam, M.; Beckers, J.F.; Kiesling, D.O.; Ealy, A.D.; Roberts, R.M. Caprine pregnancy-associated glycoprotein (PAG): Their cloning, expression and evolutionar relationship to other PAG. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 57, 311–322.
28. Geisert RD, Bazer FW, editors. Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals: Tribute to 45 Year Anniversary of Roger V. Short's "Maternal Recognition of ... in Anatomy, Embryology and Cell Biology). 1st ed. 20. New York, NY: Springer; 2015. 270 p.
29. Gogolin-Ewens KJ, Lee CS, Mercer WR, Moseby AM, Brandon MR. 1986. Characterization of a sheep trophoblast-derived antigen first appearing at implantation. *Placenta* 7:243–255.
30. Green JA, Xie S, Quan X, Bao B, Gan X, Mathialagan N, Beckers JF, Roberts RM. Pregnancy-associated glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod* 2000, 62: 1624–1631.
31. Green, J., Xie, S., Szafranska, B., Gan, X., Newman, A.G., McDowell, K., Roberts, R.M., 1999. Identification of a new aspartic proteinase expressed by the outer chorionic cell layer of the equine placenta. *Biol. Reprod.* 60, 1069–1077. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.5.1069>.

32. Green, J.A.; Xie, S.; Roberts, R.M. Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Rev. Reprod.* 1998, 3, 62–69.
33. Green J. Parks T. Avalle M.P. Telugu B.P et. al. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAG's) in the serum of pregnant cow and heifers
34. Guruprasad K, Blundell TL, Xie S, Green J, Szafranska B, Nagel RJ, *et al.* Comparative modeling and analysis of amino acid substitutions suggests that the family of pregnancy-associated glycoproteins includes both active and inactive aspartic proteinases. *Protein Engineer.* 1996; 9: 849–856.
35. Hughes AL, Green JA, Garbayo JM, Roberts MR. Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3319–23.
36. Hughes, A.L., Green, J.A., Piontkivska, H., Roberts, R.M., 2003. Aspartic proteinase phylogeny and the origin of pregnancy-associated glycoproteins. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1940–1945.
37. Jerome, A.; Singh, S.K.; Agarwal, S.K.; Mohini, S.; Raut, A. Characterization and In Silico analysis of pregnancy-associated glycoprotein-1 gene of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genet. Res. Int.* 2011, 2011, 436138.
38. Karen, A.; El Amiri, B.; Beckers, J.F.; Sulon, J.; Taverne, M.A.M.; Szenzi, O. Comparison of accuracy of transabdominal ultrasonography, progesterone and pregnancy-associated glycoproteins tests for discrimination between single or multiple pregnancy in sheep. *Theriogenology* 2006, 66, 314–322.
39. Kiewisz J, Sousa M, Beckers J.K, Panasiewicz G, *et al.* Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (*B. bonasus* L) placentas. *Animal Reproduction Science* 112 (2009) 229-250 doi:10.1016/j.anireprosci.2008.04.021
40. Klisch K, Leiser R. In bovine binucleate trophoblast giant cells, pregnancy-associated glycoproteins and placental prolactin-related protein-I are conjugated to asparagine-linked N-acetylgalactosaminyl glycans. *Histochem Cell Biol* 2003;119:211e7.
41. Laemmli, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 1970;227: 680–685.

42. Ledezma-Torres, R.A.; Beckers, J.F.; Holtz, W. Assessment of plasma profile of pregnancy-associated glycoprotein (PAG) in sheep with a heterologous (anti-caPAG22 + 59) RIA and its potential for diagnosing pregnancy. *Theriogenology* 2006, 66, 906–912.
43. Lipka, A., Panasiewicz, G., Majewska, M., Bieniek-Kobuszezowska, M., Saveljev, A.P., Pankratov, A.P., Szafranska, B., 2016. Identification of the pregnancy-associated glycoprotein family (PAGs) and some aspects of placenta development in the European moose (*Alces alces* L.). *Theriogenology* 86, 2119–2135. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.006>.
44. Lobago, F.; Bekana, M.; Gustafsson, H.; Beckers, J.F.; Yohannes, G.; Aster, Y.; Kindahl, H. Serum Profiles of Pregnancy-Associated Glycoprotein, Oestrone Sulphate and Progesterone During Gestation and Some, Factors Influencing the Profiles in Ethiopian Borana and Crossbred Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 2009, 44, 685–692.
45. M. Galosi. *PAatología placentaria: Conocimientos generados por estudios experimentales.* ResearchGate 2010, disponible en <https://www.researchgate.net/publication/274388474>
46. Majewska, M., Lipka, A., Panasiewicz, G., Gowkielewicz, M., Jozwik, M., Majewski, M.K., Szafranska, B., 2017. Identification of novel placentally expressed aspartic proteinase in humans. *Int. J. Mol. Sci.* 8 (6), E1227. <https://doi.org/10.3390/ijms18061227>
47. Majewska, M., Panasiewicz, G., Klisch, K., Olivera, L.V., Mamani, J.M., Abd-Elnaeim, M.M., Szafranska, B., 2009. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family: transcripts and gene amplicons in camelids. *Reprod. Biol.* 9, 127–150. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60022-9](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60022-9).
48. Metelo, R.; Sulon, J.; da Silva, F.; Beckers, J.F. Preliminary results for measuring bovine PAG in milk samples. In *7ième Journée de Rencontre Bioforum; Association des Biotechnologistes Liégeois: Liege, Belgium, 2002; p. 32.*
49. Mialon, M.M.; Camous, S.; Renand, G.; Martal, J.; Menissier, F. Peripheral concentrations of a 60-kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 1993, 33, 269–282.
50. Mialon, M.M.; Renand, G.; Camous, S.; Martal, J.; Menissier, F. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 1994, 34, 65–72.

51. Moussad EE, Rageh MA, Wilson AK, Geisert RD & Brigstock DR Temporal and spatial expression of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) and transforming growth factor beta type 1 (TGF- β 1) at the utero-placental interface during early pregnancy in the pig. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 55 2002 186–192. (doi:10.1136/mp.55.3.186)
52. Munger JS, Harpel JG, Giancotti FG & Rifkin DB Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin α v β 1. *Molecular Biology of the Cell* 9 1998. 2627–2638. (doi:10.1091/mbc.9.9.2627)
53. Nava SK, Valdez MG, León LG, González PE, Murcia MC y Perera MG. Partial purification of glycoproteins from the ewe placenta pregnancy associated. *Reuniones Nacionales de Investigación e Innovación Pecuaria, Agrícola, Forestal y Pesquera. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. 2019: 128-130.*
54. Panasiewicz G. Lipka A, Majewska M, Bieniek-Kobuszewska M, *et al.* Identification of pregnancy associated glycoprotein family (PAG) in the brown bear (*Ursus arctos* L) *Acta Histochemica* 121 (2019) 240–247
55. Panasiewicz, G., Majewska, M., Szafranska, B., 2004. Trophoblastic cDNA cloning of porcine pregnancy-associated glycoprotein genes (pPAG) and in silico analysis of coded polypeptide precursors. *Reprod. Biol.* 4, 131–141.
56. Patel T, Takahashi K. Imai K. Hashizume. Characterization of native and recombinant bovine pregnancy-associated glycoproteins. *Veterinary Science* 77 (2004) 203–210 doi:10.1016/j.rvsc.2004.05.003
57. Perera-Marin, G., Murcia, C., Rojas, S., Hernandez-Ceron & González-Padilla E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. *Anim Reprod Sci*, 86, 2005: 53-69.
58. Pohler, K.G., Geary, T.W., Johnson, C.L., Atkins, J.A., Jinks, E.M., Busch, D.C., Green, J.A., MacNeil, M.D., Smith, M.F., 2013. Circulating bovine pregnancy associated glycoproteins are associated with late embryonic/fetal survival but not ovulatory follicle size in suckled beef cows. *J. Anim. Sci.*, 91, 4158–4167.

59. Ranilla, M.J.; Sulon, J.; Carro, M.D.; Mantecon, A.R.; Beckers, J.F. Plasmatic profiles of pregnancy-associated glycoprotein and progesterone levels during gestation in Churra and Merino sheep. *Theriogenology* 1994, 42, 537–545.
60. Ranilla, M.J.; Sulon, J.; Mantecon, A.R.; Beckers, J.F.; Carro, M.F. Plasma pregnancy-associated glycoprotein and progesterone concentrations in pregnant Assaf ewes carrying single and twin lambs. *Small Rumin. Res.* 1997, 24, 125–131.
61. Rifkin, D.B.; Mazzieri, R.; Munger, J.S.; Noguera, I.; Sung, J. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **1999**, 107, 80–85.
62. Roberts, R.M.; Xie, S.; Mathialagan, N. Maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 1996, 54, 294–302.
63. Sasser, R.G.; Ruder, C.A.; Ivani, K.A.; Butler, J.E.; Hamilton, W.C. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol. Reprod.* 1986, 35, 936–942.
64. Scully S, Butler ST, Kelly AK, Evans AC, Lonergan P, Crowe MA. Early pregnancy diagnosis on days 18 to 21 postinsemination using high-resolution imaging in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 2014;97(6):3542-57. doi: 10.3168/jds.2013-7518. Epub 2014 Mar 20.
65. Semambo, D.K.N.; Eckersall, P.D.; Sasser, R.G.; Ayliffe, T.R. Pregnancy-specific protein B and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with *Actinomyces pyogenes*. *Theriogenology* **1992**, 37, 741–748.
66. Shahin, M.; Friedrich, M.; Gaulty, M.; Beckers, J.F.; Holtz, W. Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) pattern and pregnancy detection in Boer goats using an ELISA with different antisera. *Small Rumin. Res.* 2013, 113, 141–144.
67. Sousa, N.M., Remy, B., El Amiri, B., De Figueiredo, J.R., Banga-Mboko, H., Dias Goncalves, P.B., Beckers, J.F., 2002. Characterization of pregnancy-associated glycoprotein sextracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational periods. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 227–241. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002021>.
68. Staples LD, Lawson RAS, Findlay JK. 1978. The occurrence of an antigen associated with pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* 19:1076–1082.

69. Steckeler, P.; Weber, F.; Zerbe, H.; Rieger, A.; Voigt, K. Evaluation of a bovine visual pregnancy test for the detection of pregnancy-associated glycoproteins in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 2019, 54, 280–288.
70. Szafranska, B., Majewska, M., Panasiewicz, G., 2004. N-glycodiversity of the Pregnancy-Associated Glycoprotein family (PAG) produced in vitro by trophoblast and trophoctoderm explants during implantation, placentation and advanced pregnancy in the pig. *Reprod. Biol.* 4, 67–89.
71. Szafranska, B., Panasiewicz, G., Dabrowski, M., Majewska, M., Gizejewski, Z., Beckers, J.F., 2005. Chorionic mRNA expression and N-glycodiversity of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) of the European bison (*Bison bonasus*). *Anim. Reprod. Sci.* 88, 225–243. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.12.013>.
72. Szafranska, B., Panasiewicz, G., Majewska, M., 2006. Biodiversity of multiple pregnancy-associated glycoprotein (PAG) family: gene cloning and chorionic protein purification in domestic and wild eutherians (Placentalia) – a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 5, 481–502. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006034>
73. Szafranska, B., Xie, S., Green, J., Roberts, R.M., 1995. Porcine pregnancy associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in the trophoctoderm. *Biol. Reprod.* 53, 21–28. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.1.21>.
74. Szenci, O.; Taverne, M.A.; Beckers, J.F.; Sulon, J.; Varga, L.; Borzosoni, C.; Hanzen, K.; Schrek, K. Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy-associated glycoprotein 1. *Vet. Rec.* 1998, 142, 304–306.
75. Tandiya U. Nagar V. Yadav V. AliI. *et al.* Temporal changes in pregnancy-associated glycoproteins across different stages of gestation in the Barbari goat.
76. Telugu BP, Palmier MO, Doren SRV, Green JA. An Examination of the Proteolytic Activity for Bovine Pregnancy- Associated Glycoprotein 2 and 12. *Biol Chem.* 2010; 391(2–3): 259–270. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.016> PMID: 20030586
77. Telugu VLBP Walker AM, Green JA. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family—analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *BMC Genomics.* 2009; 10: 185. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-185> PMID: 19393060

78. Tombin., Staehlin, T. & Gordon, J.. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979;76: 4350-4.
79. Touzard, E.; Reinaud, P.; Dubois, O.; Guyader-Joly, C.; Humblot, P.; Ponsart, C.; Charpigny, G. Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction* 2013, 146, 347–362.
80. Wallace, R.M.; Pohler, K.G.; Smith, M.F.; Green, J.A. Placental PAGs: Gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Reproduction* 2015, 149, R115–R126.
81. Weems, Y.S.; Lammoglia, M.A.; Vera-Avila, H.R.; Randel, R.D.; King, C.; Sasser, R.G.; Weems, C.W. Effect of luteinizing hormone (LH), PGE2, 8-Epi-PGE1, 8-EPI-PGE2, trichosanthin, and pregnancy specific protein B on secretion of progesterone in vitro by corpora lutea (CL) from nonpregnant and pregnant cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **1998**, 55, 27–42.
82. Willard, J.M.; White, D.R.; Wesson, C.A.R.; Stellflug, J.; Sasser, R.G. Detection of fetal twins in sheep using a radioimmunoassay for pregnancy-specific protein B. *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 960–966.
83. Wooding FB, Roberts RM & Green JA 2005 Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta* 26 807–827. (doi:10.1016/j.placenta.2004.10.014)
84. Xie S, Green JA, Bixby JB, Szafranska B, DeMartini JC, Hecht S, Roberts RM.. 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*, 1997a
85. Xie, S., Low, B.G., Nagel, R.J., Beckers, J.F., Roberts, R.M., 1994. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoctoderm. *Biol. Reprod.* 51, 1145–1153.

86. Xie, S.; Green, J.; Beckers, J.F.; Roberts, R.M. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. *Gene* 1995, 159, 193–197.
87. Xie, S.; Green, J.A.; Bao, B.; Beckers, J.F.; Valdez, K.E.; Hakami, L.; Roberts, R.M. Multiple pregnancy-associated glycoproteins are secreted by day 100 ovine placental tissue. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1384–1393.
88. Xie, S.C.; Low, B.G.; Nagel, R.J.; Kramer, K.K.; Anthony, R.V.; Zoli, A.P.; Beckers, J.F.; Roberts, R.M. Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 10247–10251
89. Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F. Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod* 1991, 45: 1–10.
90. Zoli, A.P., Guilbault, L.A., Delabaut, P., Ortiz, W.B., Beckers, J.F., 1992. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biol. Reprod.* 46 (1),83–92.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA GESTACIÓN EN LA BORREGA

El periodo de gestación transcurre entre la concepción (fertilización de un óvulo con el espermatozoide) y el momento del parto. Después de la fertilización, el cigoto o huevo comienza a dividirse y pasa de una unidad unicelular a una multicelular. La primera división mitótica o segmentación del huevo o cigoto da origen a dos nuevas células idénticas y sus subsecuentes divisiones se conocen como blastómeros que continúan su división para formar la mórula, en donde las células de la periferia comienzan a liberar sodio hacia los espacios intercelulares con ello se logra un incremento de líquido lo que permite la formación del blastocele, en este momento la mórula se convierte en el blastocisto. (Galina *et al.* 2021)

La primera segregación celular en el blastocisto da origen a dos subpoblaciones, las periféricas y las centrales. De las células periféricas de este blastocisto se forma el trofoblasto, que da origen a la mayoría de las membranas extraembrionarias; de la subpoblación de células centrales se forma el embrioblasto, que da origen al embrión. La segunda segregación de células a partir de las células de la masa celular interna da origen a la formación del hipoblasto y epiblasto; el epiblasto dará origen a las capas germinales, endodermo, mesodermo y ectodermo, proceso conocido como gastrulación (Galina *et al.* 2021). El desarrollo del blastocisto con el aumento del líquido en el blastocele termina por romper la zona pelúcida, liberando al blastocisto que entra en contacto con el endometrio y comienza la etapa de implantación.

La implantación para su estudio se divide en 5 fases: 1) Toma como referencia la inclusión de la eclosión del embrión de la zona pelúcida; 2) Fase que se conoce como pre-contacto y orientación del blastocisto donde el trofoblasto embrionario entra en contacto con el endometrio. Durante este proceso y por un tiempo limitado es conocido como “ventana de receptividad” en esta etapa está existiendo un intercambio de secreciones entre la madre y el embrión; 3) La tercera fase conocida como aposición, hace alusión al posicionamiento del blastocisto en una de las tres zonas del útero, denominadas céntrica, excéntrica e intersticial,

en las borregas es céntrica, posteriormente la inter digitalización de las vellosidades coriónicas determina el tipo de placentación según la especie; 4) Esta fase comprende a la adhesión donde se involucran glicoproteínas, integrinas, selectinas y galactinas que son señalizadores de comunicación celular; 5) La última fase corresponde a la invasión endometrial, que consiste en la invasión de las células de trofoblasto al epitelio del endometrio durante la formación de la placenta, esta fase depende de la especie. (Geisert 2015).

Para la especie ovina, el trofoblasto invade parcialmente al epitelio del útero, dando como resultado una placentación de tipo sindesmocorial. Existe la formación de vellosidades agrupadas en pequeñas zonas del corion, constituyendo cotiledones, información que se describe más detalladamente en la sección de placentación.

En los ovinos, la implantación inicia entre el día 15 y 16 posterior a la concepción y el proceso culmina entre la cuarta y quinta semana de gestación. El reconocimiento de la gestación debe efectuarse simultáneamente. Este reconocimiento materno consiste en evitar la luteólisis a través de señales emitidas por el cigoto como hormonas y /o proteínas, de tal manera que el ciclo estral se interrumpe, por otro lado, la producción y secreción de progesterona por el cuerpo lúteo se mantiene. En esta especie, el señalizador es el interferón tau (IFN- τ), el cual interfiere con la secreción de prostaglandina F 2α , así evita la luteólisis y bajo estas condiciones el ambiente uterino se ve favorecido para la implantación y desarrollo del embrión.

Una vez que se efectúa el reconocimiento, la placenta paulatinamente comienza a secretar hormonas como el lactógeno placentario, progesterona entre otras que le permiten a la madre adaptarse fisiológica y conductualmente a la gestación. Un ejemplo de esto es la producción y secreción de lactógeno placentario que en ovinos estimula la hiperplasia de las glándulas uterinas y secreción del histotrofo, así como el crecimiento de la glándula mamaria y el crecimiento fetal.

10.2 DESARROLLO DE LA PLACENTA

La placenta es un órgano endocrino transitorio que se desarrolla durante la gestación; la placenta evoluciona de forma paralela al proceso de gastrulación. Este órgano tiene la principal, pero no única función de intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto. La placenta, está constituida por tres membranas: amnios, alantoides y corion y el saco vitelino que resultan de la unión del tejido de la madre y el feto.

El origen de estos cuatro tejidos es a partir del trofoblasto, el mesodermo y endodermo embrionario (Galina *et al.* 2021). Por ejemplo, el saco vitelino tiene su origen a partir del endodermo primitivo y junto con el trofoblasto y el mesodermo del embrión forma el corion; en contraste, el amnios y el alantoides son una evaginación del intestino primitivo, que da origen al sistema vascular de la placenta fetal.

El amnios por su parte contiene líquido amniótico, se mantiene en contacto directo con el embrión protegiéndolo y brindando flotabilidad, mientras que el corion es la membrana más externa, está en contacto con el endometrio uterino de la madre por medio de un tejido denominado trofoblasto o trofoectodermo, este tejido forma pliegues llamados vellosidades coriónicas, la distribución en borregas es de tipo cotiledonaria (M Galosi. 2010). Las vellosidades se unen al tejido conectivo en las zonas avasculares del endometrios, estas uniones se denominadas carúnculas y en conjunto forman el placentoma. El saco vitelino y alantoides: se llenan de líquido conforme el embrión crece y se desarrolla, la fusión de estas dos membranas forma el corioalantoides y es la porción fetal de la placenta.

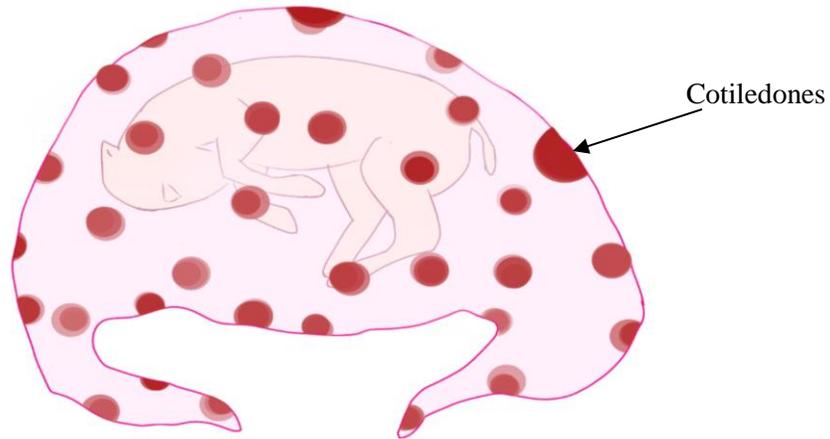


Imagen 1. Placenta sinepiteliocorial de rumiante con cotiledone. Tomada por Giovanna León Legaspi.

10.3 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PLACENTA.

La fusión del epitelio uterino con las células trofoblásticas, da origen a la placenta denominada sinepiteliocorial o sindesmocorial, constituida entre la madre y el embrión con seis capas: corion, tejido intersticial, endotelio (de origen embrionario), epitelio endometrial, tejido intersticial y endotelio vascular que provienen de la madre. (M. Galosi 2010). La figura siguiente enfatiza la distribución de las capas entre el feto y la madre.

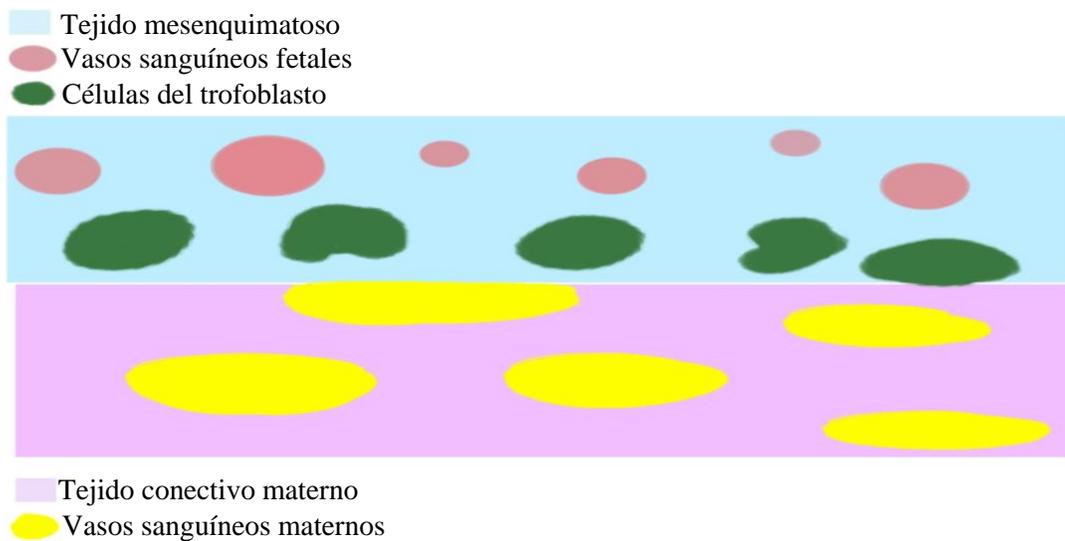


Imagen 2. Capas histológicas entre la madre y el feto presentes durante la gestación de rumiantes. Tomada por Giovanna León Legaspi

Como ya se mencionó en las funciones de la placenta, esta no se limita al intercambio gaseoso y nutrientes, adicionalmente, desempeña la función de síntesis y secreción de una gran y variada cantidad de hormonas tales como las gonadotropinas, estrógenos, progesterona, lactógenos, leptinas, factores de crecimiento y relaxinas (Blanco *et al.* 2009).

Características de la placenta ovina	
Distribución de las vellocidades	Cotiledonaria
Posicionamiento placentario	Central
Histología	Sinepiteliocorial

Tabla 1. Características de la placenta ovina.

10.4 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN OVINOS

El diagnóstico de gestación en la especie ovina se determina a través de múltiples métodos dependiendo de la etapa de gestación. Para ello, existen tres tipos de diagnósticos: conductual, clínico y de laboratorio.

El diagnóstico conductual se refiere a la observación de la conducta que presenta la borrega y con ello identificar su regreso o no al estro, así, en caso de un diagnóstico negativo, la borrega presenta conducta de celo aproximadamente 17 días después de la monta o la inseminación artificial, sin embargo, el no retorno al estro puede deberse a un cuerpo lúteo.

El diagnóstico clínico implica la intervención del MVZ por lo que este diagnóstico es dependiente de la habilidad y experiencia de este. El diagnóstico por ultrasonido se hace de manera transabdominal entre los días 40 y 50, se busca localizar los cotiledones, que se observan como estructuras redondas similares a pequeñas donas, que mediante el efecto Doppler se busca detectar el movimiento y latido cardiaco fetal. También se puede hacer ultrasonido vía rectal posterior al día 35, esta opción tiene un mayor grado de invasión. Otro método se realiza aproximadamente a los 100 días de gestación y se puede hacer la palpación

externa del abdomen (prueba del peloteo), que consiste en retraer suavemente el vientre de la borrega y soltarlo para sentir el movimiento del producto.

El diagnóstico por pruebas de laboratorio es de los métodos más confiables ya que miden en suero, leche u orina la concentración de hormonas propias de la gestación como, lactógeno placentario, factores de crecimiento, glicoproteínas asociadas a la gestación (Alvarez Oxiley. 2022) estas pruebas además de ser confiables se pueden realizar en las primeras semanas de la gestación, el costo de estas pruebas puede variar. Cabe mencionar que PAG no es el único marcador que permitiría realizar un diagnóstico temprano, los leucocitos tienen un aumento entre los días 16 y 20 post inseminación, la progesterona aumenta en leche entre los días 20 y 24 post inseminación (Scully S *et al.* 2014), solo por poner unos ejemplos.



Imagen 3. Diagnóstico de gestación en ovino. Sugerencias de técnicas para diagnóstico de gestación en ovinos dependiendo de tiempo de preñez. Tomada por Giovanna León Legaspi.

10.5 ANEXO 2: TABLA DE HISTORIA SOBRE PAG

Año	Investigador	Hallazgo
1978	Staples.	Detección del antígeno asociado a la gestación.
1982	Butler.	Reconocen dos antígenos: Proteína específica de la preñez PSP's A y B 47 – 53 kDa.
1986	Sasser.	Primero en medir por radioinmunoensayo PSPB en suero para hacer diagnóstico de gestación temprano.
1986	Gogolin.	Identificación de PAG en ovinos (SBU-3)
1991	Zoil.	Aisló y purificó PAG bovino de tejido cotiledonario. encuentra 4 puntos isoeléctricos:4.4, 46, 5.2 y 5.4.
1991	Xie.	Integración de PAG a la familia de glicoproteínas aspárticas
1991	Xie. Green.	PAG no presenta actividad enzimática
1993	Mialon.	Describe una PAG de 60 kDa distinta a PSPB
1994	Ranilla.	ovPAG cambia su concentración a lo largo de la gestación, siendo detectable en suero.
1995	Xie.	Identificación de bPAG 1.
1995	Szafranska	Pag en cerdos
1996	Roberts	Sugiere que PAG es un inmunomodulador entre la madre y el producto.
1997	Xie.	Aislamiento de 4 PAG ovinas ovPAG55, ovPAG60, ovPAG61 y ovPAG65.
1998	Garbayo.	Aislamiento y caracterización parcial de PAG caprina caPAG 55, caPAG 59 y caPAG 62.
1998	Szenci	Uso de PAG como indicador de viabilidad fetal.
1999	Rifkin.	Sugiere que las PAG tiene funciones proteolíticas.
1999	Green	PAG en gatos.
1999	Green	PAG en caballos
1999	Austin	Sugiere que PAG tienen un rol hormonal
2000	Hughes.	Clasificación de las PAG en antiguas y modernas.

Año	Investigador	Hallazgo
1978	Staples.	Detección del antígeno asociado a la gestación.
2000	Garbayo.	PAG caprina
2001	Chen	PAG en roedores
2002	Sousa	PAG en zebu
2002	Metelo	Detección de PAG en leche de bovino
2003	El Amiri.	Aislamiento y purificación de 3 PAG's ovinas: ovPAG55, ovPAG57 y ovPAG59.
2005	Szafranska	PAG en bisonte europeo
2005	Wooding	sugiere que PAG actúa como un puente molecular entre la placenta y el útero
2007	Brandt	PAG en ciervo de cola blanca.
2008	Barbato	PAG en búfalo de agua
2009	Majewska	PAG en camélidos
2009	Barbato	Diagnóstico de gestación temprano en borregas por radioinmunoensayo
2010	Friedrich	Medición de PAG por ELISA en muestras de leche de bovino
2013	Shahin	Monitoreo de PAG caprina usando ELISA
2013	Barbato	Purificación y RIA en PAG de búfalos.
2016	Lipka	PAG en Alce europeo
2017	Majewska.	PAG en primates
2017	Barbato	Uso de PCR para identificación de PAG 2 en búfalo
2019	Panasiewicz	PAG en osos pardos
2020	Silva-Chavez	Uso del test de diagnóstico rápido de bovino empleado en otros rumiantes
2020	Oliveira Filho	La concentración de PAG en bovinos al día 24 puede ser empleada para detectar de forma temprana la gestación.
2021	Singh	La concentración de PAG en leche de cabra entre el día 26 a 51 puede ser empleada para hacer diagnóstico temprano de gestación, siendo un método menos invasivo
2022	Barbato	Revisión de PAG

Tabla 2. Historia de PAG.

10.6 ANEXO 3: TABLA DE PESO MOLECULAR Y PUNTO ISOELÉCTRICO DE PAG EN DISTINTAS ESPECIES.

Autor	año	Especie	dato	Observación	P.I
Xie <i>et al.</i>	1991	Rumiantes	47, 67 kDa	47 kDa*	
Xie <i>et al.</i>	1997	ovinos	45, 70 kDa		
Garbayo <i>et al.</i>	1998	Caprinos	55, 59, 62 kDa		4.9,5.1, 5.3 5.5,
El Amiri <i>et al.</i>	2003 (a)	Ovino	55, 57 y 59 kDa.	ovPAG-55*	4.1, 4.3, 4.7, 5.0 y 5.9
El Amiri <i>et al.</i>	2004	Ovino	58, 61, 58, 66, 66, 60,59, 55		4.0 - 8.5
Green <i>et al.</i>	2005	bovinos	55, 65, 75 kDa	75 kDa*	
Bella A. <i>et al.</i>	2007	Mamíferos	39.7 - 66.2(alpaca) 33.9 - 52.2 (perros y gatos) 58.9 - 65.3 (humano)	76.4, 69.9*	
Kiewisz	2009	Bisonte	50, 55, 67, 71		3.7 - 7.4
Barbato	2013	Búfalo de agua	55 to 78 kDa	55 kDa*	
Beriot <i>et al.</i> ,	2014	Cérvidos	31 a 58 kDa		
Lotfan <i>et al.</i>	2018	Búfalo	41.2 kDa		9.64
Panasiewicz <i>et al.</i>	2019	Oso pardo	55,66, 72, 26, 36, 45 kDa	55kDa*	

Tabla 3. Peso molecular y punto isoeléctrico de PAG. *Molécula predominante

10.7 ANEXO 4: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (MÉTODO DE BRADFORD)

10.7.1 Curva Estandar

Preparar concentraciones de Albumina Sérica Bovina (1, 2, 4, 8, 10, 20 μg)

Llevar a cada solución a un volumen final de 800 μl con agua desionizada.

Agregar 200 μl de reactivo de Bradford (concentrado)

Dejar que reaccione durante 5 min.

Leer a 590 nm (Perkin Elmer Lambda-Bio 23)

10.7.2 PREPARACIÓN DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA

Se tomó de la solución estándar (BSA al 20%), se tomaron 10 μl que contienen 2 mg de proteína. Esta concentración de proteína se ajustó a un volumen de 2 ml con agua desionizada, generando una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solución.

10.7.3 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

a) Solución A: Acrilamida al 30%, Bisacrilamida 0.8%

Acrilamida 30.0 g

Bisacrilamida 0.8 g

Agua 100.0 ml

b) Solución B: (Amortiguador para gel resolvedor)

TRIS 18.17 g

SDS 0.40 g

Agua 100.0 ml

Ajustar a pH 8.8 con HCl concentrado

c) Solución C (amortiguador del gel concentrador)

TRIS 6.06 g

SDS 0.40 g

Agua 100.0 ml

Ajustar a pH 6.8 con HCl concentrado

d) Solución D (amortiguador de corrida)

	1X	2x
TRIS	1.52 g	2.28 g
Glicina	7.21 g	10.81 g
SDS	0.50 g	0.75 g
Agua	500 ml	750 ml

Ajustar a pH 8.3 con NaOH 10 N

e) Solución E (amortiguador de muestras no reductoras)

Solución C	125 ml
SDS al 19%	0.10 ml
Glicerol (0.05%)	1.0 ml
Azul de Bromoferol (0.05%)	0.4 ml

f) Solución F (Persulfato de amonio al 10%)

Persulfato de amonio 100 mg

Agua 1.0 ml

g) Solución G (amortiguador de muestras reductoras)

B-mercaptoetanol 10 μ l

Solución E 990 μ l

Marcadores de Peso Molecular

Marcadores de BIO-RAD (Bajo peso molecular)

10.7.4 PROCEDIMIENTO

GEL	7.5%	10%	12.5%
RESOLVEDOR			
Solución B	2.5 ml	2.5 ml	2.25 ml
Solución A	2.5 ml	3.33 ml	3.75 ml
Agua	5 ml	5 ml	3 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l	7.5 μ l
Solución F	50 μ l	50 μ l	30 μ l

Gel Concentrador	(4%)
Solución C	1.26 ml
Solución A	0.66 ml
Agua	3 ml
TEMED	5 μ l
Solución F	25 μ l

La corrida electroforética del gel se realiza a 70 volts en el gel concentrador y a 140 volts en el gel resolvedor.