

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA Y ANIMAL
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LA PLACENTA DE LA ESPECIE OVINA (*Ovis Aries*) ASOCIADAS A LA GESTACIÓN

Presentador de Servicio Social:
Kevin Nava Salazar
Matricula 2132038176

Asesores:
Interno: Dr. José Ernesto Hernández Pichardo
Núm. Económico: 16587

Externo Dr. José Gerardo Perera Marín
Cédula: 04138124

Lugar de Realización:
Departamento de Reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Circuito Interior
S/N, c.p. 04510.

Fecha de inicio y Termino:
26 de junio al 27 de diciembre de 2019.

Índice	Páginas
Resumen. -----	3
Introducción. -----	4
Marco teórico. -----	4
Objetivo general y específicos. -----	7
Metodología utilizada. -----	7
Actividades realizadas. -----	11
Objetivos y metas alcanzadas. -----	11
Resultados, discusión y conclusión. -----	11
Recomendaciones. -----	23
Bibliografía. -----	24

Resumen

En rumiantes, las glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG) se han utilizado como herramientas para diagnóstico de preñez. El objetivo del presente estudio fue identificar y aislar formas de las PAG's de placenta ovina de 100 días de gestación. Las proteínas presentes en el extracto placentario se precipitaron con sulfato de amonio al 40% y 80% de saturación, fracciones llamadas PAG40 y PAG80, respectivamente. Cada fracción proteica se purificó en el intercambiador iónico DEAE-SEPHACEL (pH 7.6) con un gradiente de NaCl (0 a 1.0 M). La fracción de proteína proveniente de PAG40 y recuperada con 80 mM de NaCl (PAG 40-80 mM) se envió a secuenciación y se analizó por medio de la inmunotransferencia. La fracción PAG80 recuperada con 320 mM de NaCl (PAG80-320 mM) se repurificó en una cromatografía de CM-Sepharosa (pH 5.2) bajo un gradiente de NaCl (0 - 1.0 M); las fracciones recuperadas de esta cromatografía se analizaron por medio de la inmunotransferencia. El análisis de la secuenciación de la fracción PAG 40-80 mM confirmó la presencia de tres isoformas de PAG con un peso molecular teórico de 42.7, 42.5 y 43.5 Kilodaltones, respectivamente. El análisis inmunoelectroforético denoto bajo condiciones no reducidas la presencia de proteínas de alto peso molecular relativo (100 a 130 kDa), y bajo condiciones reducidas (en presencia β mercaptoetanol) estas glicoproteínas desaparecieron significativamente y se enriquecieron las proteínas con peso molecular de 54 y 28 kDa y bandas de proteínas menos visibles de 62, 60, 43 y 42 kDa. La fracción PAG 80-320 mM mostró un patrón de proteínas de 100 a 40 kDa con un predominio de la proteína de 42 kDa en la fracción de proteína no retenida y de la eluida a 160 y 320 mM de NaCl se observó el predominio de la forma de 55 kDa. Bajo las condiciones de extracción y purificación desarrollados en este estudio se logró identificar y aislar proteínas similares a PAG's.

Introducción

En la especie humana como en la equina existe una glicoproteína como marcador de gestación, nos referimos a la gonadotropina coriónica humana (hCG) y equina (eCG), respectivamente. En rumiantes, la presencia de un posible marcador de preñez se ha dirigido a una serie de glicoproteínas sintetizadas y secretadas en la placenta sinepiteliocorial (Amiri *et al.*, 2003). Esta serie de glicoproteínas se han denominado glicoproteínas asociadas a la gestación o PAG's, por sus siglas en inglés (pregnancy-associated glycoprotein). Este grupo de glicoproteínas pertenece a la familia de proteasas aspárticas (Touzard *et al.*, 2013), presentan un patrón estructural heterogéneo conformado por variantes de masa con isoformas de diferente punto isoeléctrico (Amiri *et al.*, 2003; 2004). Durante el periodo de gestación, esta serie de glicoproteínas se sintetizan y secretan de forma diferencial (Telugu *et al.*, 2009). Sin embargo, la presencia de un grupo específico de los miembros de esta proteína (boPAG-1 en bovinos y ovPAG-1 en ovinos) en suero como en leche, al inicio (desde el día 28 post-inseminación en bovinos y desde el día 18 al 25 post-monta en ovinos) y a lo largo de la gestación, hace a este grupo de glicoproteínas como indicadores de la gestación en rumiantes (Amiri *et al.*, 2015). Por lo tanto, el presente estudio se encaminó a aislar y purificar el grupo de ovPAG's1 como antígenos para el desarrollo de un sistema de inmunodetección que permita el diagnóstico de gestación temprana en esta especie.

Marco Teórico.

Las proteínas asociadas a la gestación o PAG's son una serie de glicoproteínas abundantemente expresadas en la placenta de los ungulados (Szafranska *et al.*, 1995). Desde el punto de vista químico, estas glicoproteínas presentan un alto grado de variabilidad a nivel de residuos de aminoácidos, que en conjunto con su contenido de carbohidratos y su grado de glicosilación dan pie a la integración de esta familia (Zoli *et al.*, 1991; Atkinson *et al.*, 1993; Klisch *et al.*, 2006).

Este grupo de glicoproteínas tienen un origen filogenético a partir de dos grupos de proteínas, uno ancestral que se refiere a las moléculas que aparecieron aproximadamente hace 87 millones de años y el grupo más reciente se refiere a proteínas que aparecieron hace 52 millones de años (Green *et al.*, 2000; Hughes *et al.*, 2000; Garbayo *et al.*, 2008). Estas últimas son sintetizadas en las células binucleadas del trofoectodermo y han sido extensivamente caracterizadas, tipificándolas como PAG's1 (Xie *et al.*, 1991; Zoli *et al.*, 1992; Green *et al.*, 1998; Wooding *et al.*, 2005). En contraste, el grupo ancestral (PAG's 2 al 13) son pobremente conocidas y se ha reportado que son sintetizadas en las células del trofoblasto o en la unión entre el trofoblasto cotiledonario y la carúncula endometrial (Wooding *et al.*, 2005).

Las PAG'1s de la placenta más estudiadas en la actualidad corresponden a la especie *Bos taurus*, cuenta con cerca de 18 genes transcritos y 14 pseudogenes similares a PAG siendo la boPAG2 la más abundante (Telugu *et al.*, 2009). En esta especie, las proteínas se distribuyen en un amplio rango de pesos moleculares que oscilan desde 37 a 90 kDa (Butler *et al.*, 1982, Xie *et al.*, 1991; 1994, Zoli *et al.*, 1991, Szafranska *et al.*, 2006). En contraste, las glicoproteínas de la placenta en la especie ovina cuentan con solo ocho genes identificados (Barbato *et al.*, 2013; Garbayo *et al.*, 2008) que se han estudiado y purificado de placentomas ovinos obtenidos en diferentes periodos de gestación mediante métodos convencionales de purificación de proteínas. Con respecto a esto, Atkinson *et al.*, en (1993) identificaron y aislaron de placentomas de 100 días de desarrollo al menos tres variantes de carga (57, 62 y 69 kDa) con una similitud del 61 y 78% en la región del amino terminal. Por su parte Xie *et al.*, en (1997), purifican cuatro PAG's con diferente masa molecular (55, 60, 61 y 65 kDa) del medio de cultivo obtenido después de la incubación de rebanadas de placenta de borrega de 100 días de gestación. Amiri *et al* en (2003) reportaron el aislamiento y la purificación de tres variantes de masa de 55, 57 y 59 kDa con diferente secuencia de aminoácidos, pero un patrón similar en la secuencia consenso de sitios de sulfatación y sitios de N-glicosilación entre otras PAG's. Para 2004, los mismos autores (Amiri *et al.*, 2004)

aislaron y caracterizaron ocho PAG's presentes en los placentomas de 60 y 100 días de gestación, los datos indicaron proteínas de 55 a 66 kDa, 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 identificado.

Aunado a este patrón de heterogeneidad molecular, las PAG's y sus variantes presentan un patrón de expresión y secreción espacio-temporal durante la etapa de desarrollo gestacional (Touzard *et al.*, 2013), por ejemplo, las variantes ancestrales o antiguas como grupo son usualmente detectable al inicio del desarrollo gestacional y son generalmente más abundantes en comparación con las PAG's modernas (Touzard *et al.*, 2013). El perfil de PAG's individuales pueden diferir una de otra, por ejemplo, algunas se elevan en etapas tempranas del desarrollo, mientras que otras se vuelven más abundantes en etapas más tardías (Patel *et al.*, 2004; Telugu *et al.*, 2009; Touzard *et al.*, 2013). El patrón se complica más si se considera el patrón de expresión en células específicas (mononucleadas vs. células trofoblásticas binucleadas) y en la ubicación de tipo de célula para su secreción. A la luz de esta compleja expresión de PAG's por la placenta, los posibles papeles funcionales que juegan estas glicoproteínas durante el desarrollo de la preñez son de suma importancia. A este respecto se ha propuesto que las PAG's pueden desempeñar diversos papeles como el ser Inmunomodadores, tener una función luteotrópica, también como sustancias de adhesión o estimuladoras de factores de crecimiento y finalmente como herramienta para el diagnóstico de gestación (Wallace *et al.*, 2015).

Objetivo General.

Extraer y purificar de la placenta ovina la glicoproteína ovPAG's1 y determinar su actividad inmunológica.

Objetivos específicos

Identificar la actividad inmunológica de las diferentes ovPAG,s

Caracterizar la secuenciación de aminoácidos de ovPAG's1

Materiales y métodos.

1.- Extracción de la proteína.

La extracción y purificación de la ovPAG's1 de la placenta ovina se realizó de acuerdo al método descrito por Amiri *et al.*, en (2003) con algunas modificaciones (ver esquema al final de la metodología). La placenta ovina se colectó del rastro local y la edad de gestación aproximada se estimó de acuerdo al método de Joubert (1956).

2.- Purificación por Cromatografía.

Los diferentes pasos de purificación de la PAG ovina se llevaron a cabo a 4 °C; previo al análisis cromatográfico, cada muestra se dializó (cut-off 12-14 kDa) por 48 horas con el amortiguador de equilibrio correspondiente.

2.1 Estudio de PAG40.

La fracción de proteína obtenida con el 40% de saturación de sulfato de amonio (PPO-II) se purificó en una columna (1.5 cm D.I. x 26 cm) que contenía al intercambiador iónico dietil-amino-etilsephacel (DEAE-Sephacel), pre-equilibrada con el amortiguador de elución (TRIS-HCl 10 mM, pH 7.6). En breve, el contenido de proteína se colocó en la columna y se inició su elución con TRIS-HCl, 10 mM, pH 7.6. La fracción de proteína eluida con este amortiguador (proteína no retenida)

se dializo por 48 horas a 4 °C con 5 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.0) y después se liofilizo. Por otro lado, las proteínas retenidas en la columna se eluyeron con un gradiente escalonado de NaCl (20, 40, 80, 160 y 1000 mM), respectivamente. Las fracciones de cada pico de proteína se dializaron (cut-off 12 a 14 kDa) contra 5 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.0) por 48 horas con cambios cada 8 horas y luego se liofilizaron. Durante la corrida cromatográfica se colectaron fracciones de 4 ml que se monitorearon por espectrofotometría a 280 nm.

2.2 Estudio de PAG80.

La fracción de proteína obtenida con el 80% de saturación de sulfato de amonio (PPO-II o PAG80) se purificó en una columna (1.5 cm D.I. x 26 cm) que contenía al intercambiador iónico dietil-amino-etilsephacel (DEAE-Sephacel), pre-equilibrada con el amortiguador de elución (TRIS-HCl 10 mM, pH 7.6) de forma similar a lo descrito para PAG40.

2.3 Purificación con CM-SEPHACEL.

La fracción de proteína obtenida de la columna DEAE-Celulosa con actividad inmunológica a PAG se fraccionó en una columna de CM-Sephacel previamente equilibrada con 10 mM de acetato de amonio (pH 5.2) la cual se eluyó con un gradiente de NaCl en un rango de 0.0 a 1.0 M. Se colectaron fracciones de 5 ml las que se monitorearon a 280 nm. Las fracciones de cada pico se dializó extensivamente con 5 mM de bicarbonato de amonio pH, 8.0 y se liofilizó.

3. Caracterización por gel electroforesis.

El patrón electroforético y el peso molecular para cada fracción obtenida durante la extracción y purificación de la PAG se determinó por electroforesis en placa con geles de poliacrilamida al 10%, pH 8.6 en presencia de SDS (Laemmli 1970). Cada muestra se analizó a una concentración de 10 µg de proteína en presencia de β-mercaptoetanol (condiciones reductoras) o en su ausencia (condiciones no reductoras). Al final de la corrida electroforética, los geles se tiñeron con azul brillante de Comassie. Se utilizaron como referencia estándares de bajo peso

molecular preteñidos (Thermo Scientific). La determinación del peso molecular aproximado de las proteínas se determinó comparando la movilidad electroforética relativa de cada proteína (R_f) de interés con la movilidad relativa generada de proteínas con peso molecular conocido. La movilidad relativa (R_f) se determinó 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 R_f de cada banda de proteína, se desarrolló una gráfica formada por el R_f de las proteínas de peso molecular conocido ($x=R_f$) y el logaritmo del peso molecular de cada proteína conocida ($y=\text{Log PM}$). Así, la línea de referencia servirá para extrapolar el R_f de las muestras desconocidas y obtener el peso molecular (Bollag y Edelstein, 1991).

4. Caracterización Inmunológica.

4.1 ELISA

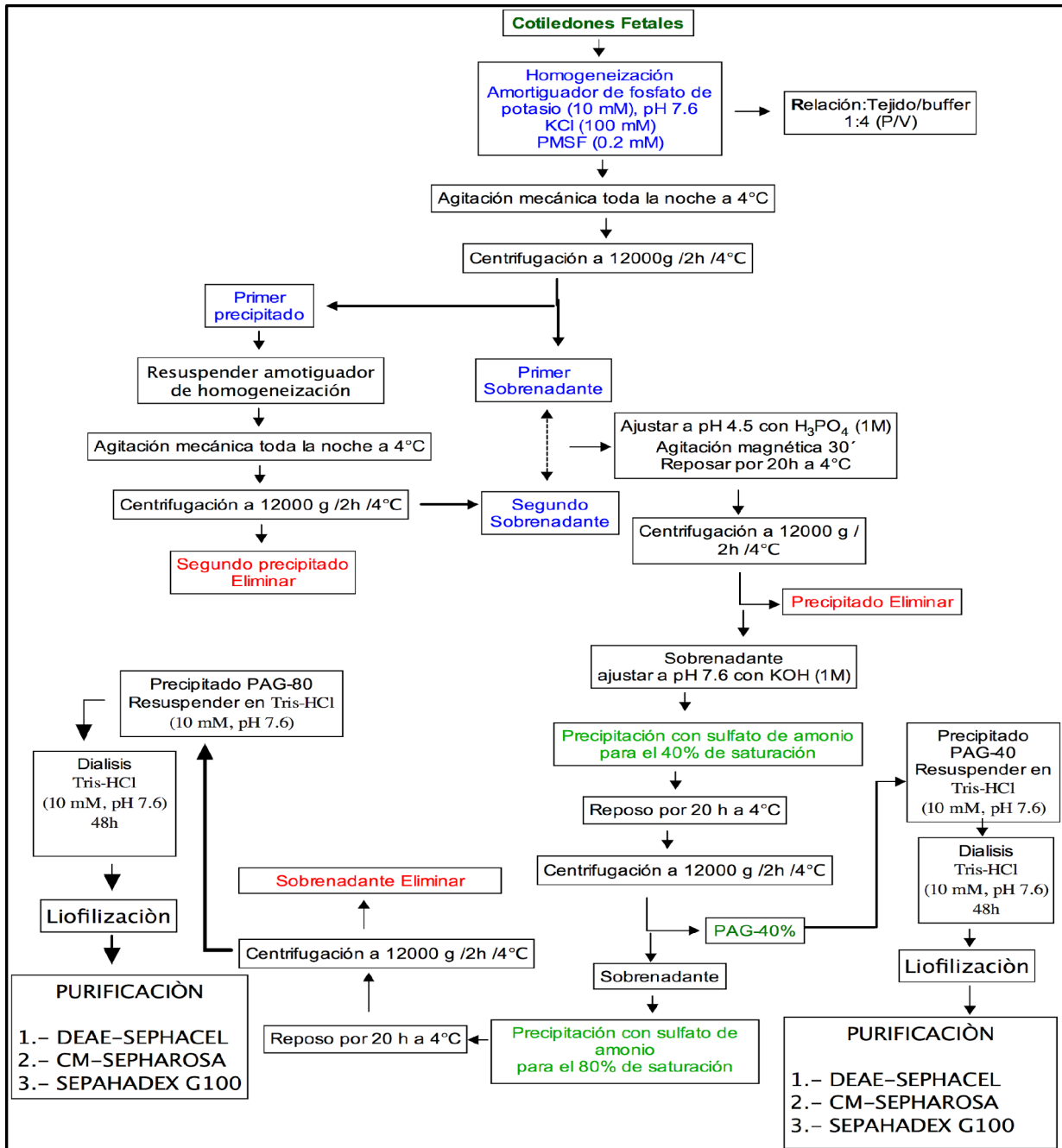
La determinación inmunológica para cada uno de los diferentes pasos de extracción y purificación de la PAG ovina se realizó siguiendo las especificaciones del estuche comercial de ELISA competitivo (Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins (PAPPA) Elisa kit, MBS750306).

4.2 Inmunotransferencia

Con el propósito de identificar las bandas de proteínas correspondientes a PAG en las fracciones obtenidas en el intercambiador aniónico (DEAE Sephacel) y Sephadex G-100 se desarrolló la electroforesis de SDS-PAGE al 10% aplicando una concentración de proteína de 20 y 40 μg por carril. Una vez realizada la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm trans, blot, Millipore) durante 60 minutos a 100 volts. Transferidas las proteínas al papel de nitrocelulosa, el papel se incubó con el primer anticuerpo (PAG1 Antibody, NBP2-56541, diluido 1:3000) durante 20 hora. Al término, la membrana se lavó y posteriormente se incubó durante dos horas con el segundo anticuerpo (1:5000) de cabra dirigida contra IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch) acoplado a fosfatasa alcalina. 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 ul de agente de color B (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en DMF), disueltos en 12.5 ml de amortiguador TRIS (0.1 M).

Esquema. Extracción y purificación de glicoproteínas (PAG) de la placenta ovina. Tomado de Amiri *et al.*, 2003. Molecular Reproduction and Development 64:199-206 (2003). Modificado



Actividades realizadas

Durante mi estancia, participe en los seminarios sobre “La relación estructura-función de la familia de glicoproteínas presentes en la placenta ovina durante el desarrollo gestacional”. Adicionalmente y como parte formativa se analizaron múltiples referencias sobre cómo escribir un artículo científico y la metodología a seguir.

Una actividad primordial fue el aprendizaje entorno a técnicas de purificación de proteínas. En este rubro, se comprendió el fundamento de cada técnica y su aplicación. De forma particular se trabajó con la cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico.

Continuando con mi formación, aprendí a identificar y determinar las concentraciones de proteínas en muestras biológicas de estudio, así mismo el desarrollo de la electroforesis en placa para el análisis del patrón y la determinación de pesos moleculares. Con este mismo procedimiento se desarrolló el análisis por inmunotransferencia o Western-Blot. Con 15 muestras por cada ensayo.

Finalmente se puede agregar el aprendizaje en el desarrollo de técnicas inmunológicas en particular el ELISA.

Objetivos y metas alcanzadas

El objetivo general y las metas propuestas de este estudio, se cumplieron satisfactoriamente en un 100%, al obtener e identificar inmunológicamente proteínas asociadas a la gestación de la placenta ovina.

Resultados

En la figura 1 se observa el patrón electroforético bajo condiciones no reducidas (I) y reducidas (II) de la fracción ácida y de los extractos proteicos PAG40 y PAG80.

Bajo condiciones no reducidas PAG40 mostró una proteína predominante de 138.0 kDa, mientras que PAG80 obtuvo 55 kDa para su proteína. Bajo condiciones reducidas, el patrón de PAG40 se distribuyó en dos proteínas una de 55 kDa y otra de 28 kDa, mientras que PAG80 presentó un patrón más heterogéneo con seis proteínas que oscilaron en su peso molecular desde 69 a 28 kDa con un predominio de una proteína de 69 kDa. La tabla 1 muestra el peso molecular de las bandas de proteínas presentes en cada fracción, marcando el peso molecular de la banda predominante en el gel.

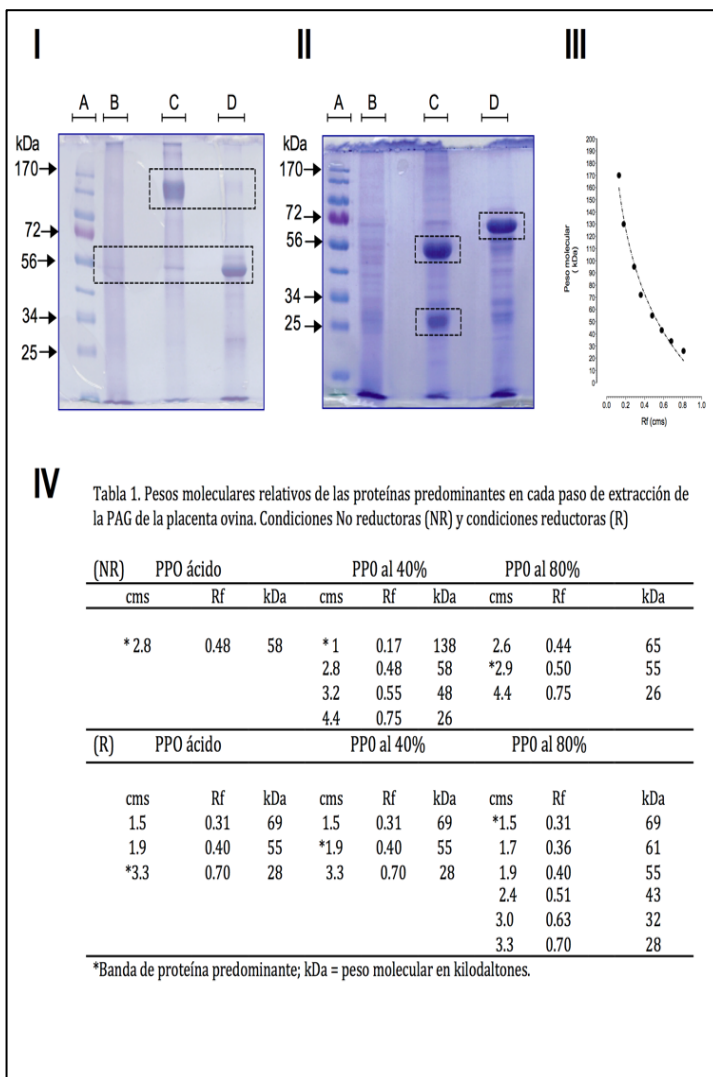


Figura 1. Patrón electroforético SDS-PAGE al 10%, pH 8.6 de las fracciones obtenidas durante la extracción de glicoproteínas de la placenta ovina. I) En condiciones no reductoras (II) Patrón en presencia de β -mercaptoetanol; III) Curva de referencia de los pesos moleculares. IV) Pesos moleculares de las fracciones en ambas condiciones de corrida electroforética. A) Las flechas indican el peso molecular (kDa) de las proteínas de referencia; B) Fracción ácida; C) Fracción recuperada con el 40% de saturación de sulfato de amonio; D) La fracción recuperada con 80% de sulfato de amonio. La tinción se realizó con azul brillante de Comassie. Los recuadros señalan las proteínas predominantes en cada fracción. Cada fracción se corrió en una concentración de 10 μ g de proteína.

Durante el proceso de purificación de PAG40 en DEAE-sephacel a través del gradiente de NaCl se identificaron seis picos de proteína (Fig.2) cuyo patrón electroforético bajo condiciones no reductoras denoto un patrón similar de PAG40 previo a su purificación con un predominio de la proteína de 138.0 kDa que bajo condiciones reducidas generó un patrón electroforético nuevamente de dos proteínas mas intensas de 55.0 kDa y 28.0 kDa (Fig. 3).

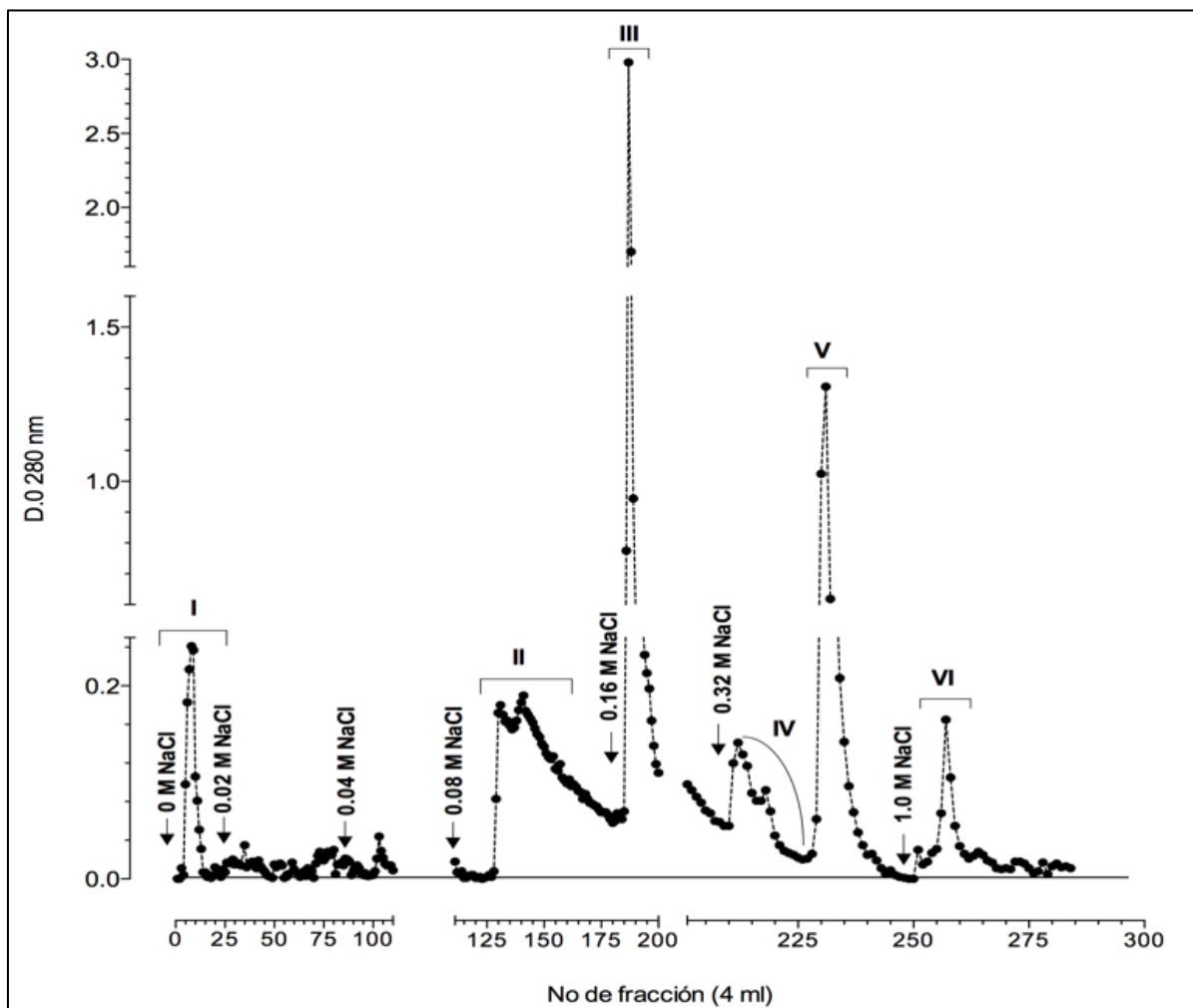


Fig. 2.- Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepahcel) de la fracción glicoproteínica PAG40. La columna (1.5 di x 27 cm) se equilibró con TRIS-HCL 0.010 M, pH 7.6 con un flujo de 60 ml/h y 39 mg de proteína se eluyeron con un gradiente de NaCl y se colectaron fracciones de 4 ml. Cada pico de proteína se monitoreó a 280 nm. Al término, los picos se dializaron contra bicarbonato de amonio 5mM, pH 8.0 por 48 horas y después se liofilizaron.

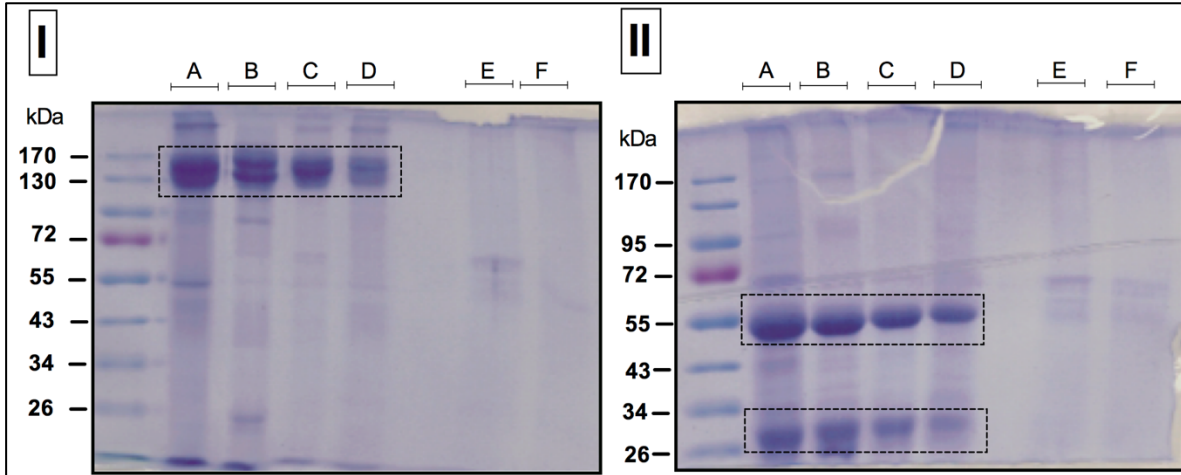


Fig. 3. Patrón electroforético en SDS-PAGE al 10%, pH 8.6 de las fracciones obtenidas durante la purificación de PAG40 en DEAE-Sephacel. I) Patrón bajo condiciones no reductoras (ausencia de β -mercaptoetanol); II) Patrón en condiciones reducidas (β -mercaptoetanol). La tinción se realizó con azul brillante de Comassie. Las barras a la izquierda indican el peso molecular de las proteínas de referencia. Los recuadros señalan las proteínas predominantes de cada fracción. 10 μ g de proteína por muestra. A) PAG40; B) Proteína no retenida en la columna; C) 80 mM de NaCl; D) 160 mM de NaCl; E) 320 mM; F) 1M de NaCl.

El análisis de secuenciación de la fracción PAG40 eluida con 80 mM de NaCl se presenta en la tabla 2. El análisis demostró tres proteínas (42.481, 42.763 y 43.524 kDa) que presentaron regiones con una probabilidad de 100% para PAG4, PAG3 y W5PC46, respectivamente.

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de la fracción PAG 40 eluida con 80 mM de NaCl en la cromatografía der DEAE-Sephacel

Proteína asociada	Secuencia	Probabilidad (%)	Peso molecular (kDa)
PAG*4	IGDLVSIQPFGLSMAEYGFHGR	100	42.481
	LKNQGAISEPVFAFYLSK	100	
	TSTESWVLGDVFLRLYFSVFDR	100	
PAG* 3	IGDLVSTDQPFGLSVVESGFEHR	100	42.763
	LKNEGAISEPVFAFYLSK	100	
	TSTESWVLGDVFLRLYFSVFDR	100	
Uncharacterized protein	ISFSGAIPFDKI	100	43.524
	ETWILGDVFLRLYFSVFDR	100	

*Pregnancy-associated glycoprotein

La actividad inmunológica denoto un incremento entre cada paso de purificación.

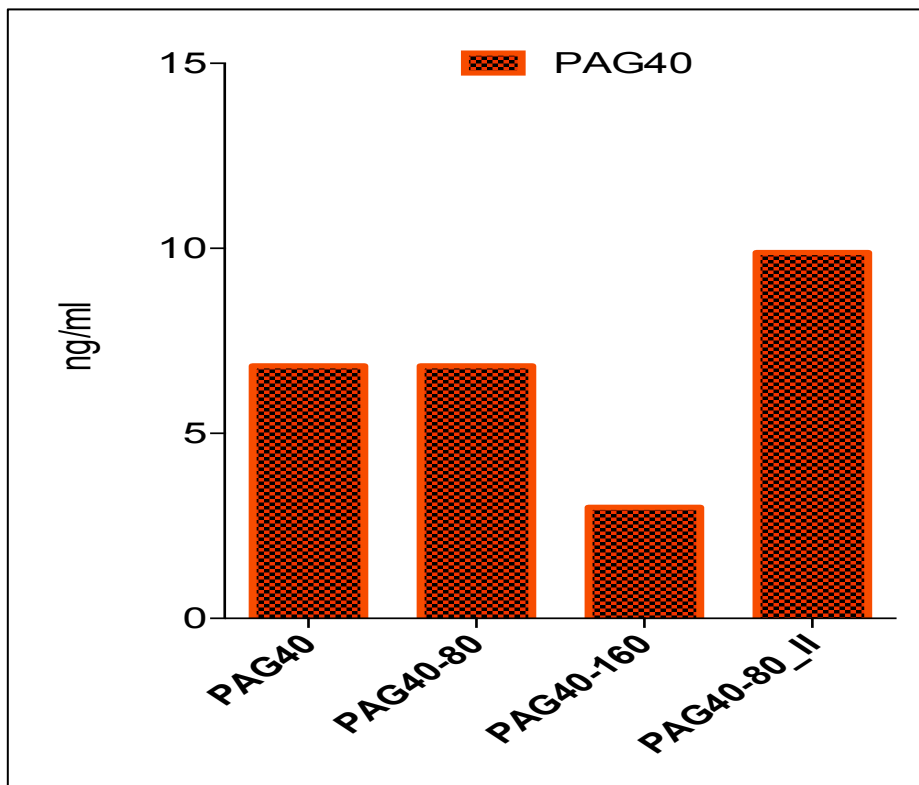


Fig.4 La determinación inmunológica. En cada pasos de purificación de la PAG ovina se realizó siguiendo las especificaciones del estuche comercial de ELISA competitivo (My BIO Source. Inc, Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins (PAPPA) Elisa kit, MBS750306).

El patrón de elución de la fracción PAG 40-80 mM de NaCl en la columna de Sephadex G-100 presentó un pico de proteína homogéneo (Fig. 5) cuyo patrón electroforético bajo condiciones no reductoras (NR) mostró una proteína abundante de 138 kDa inmunoreactiva a PAG, que se distribuyó en condiciones reducidas (R) en seis proteínas inmunoreactivas dos de alto peso molecular (130 y 100 kDa), dos entre 60 y 62 kDa, una abundante de 54 kDa, dos de 43.0 y 42.0 kDa, y muy abundante de 28 KDa respectivamente (Fig.5-II).

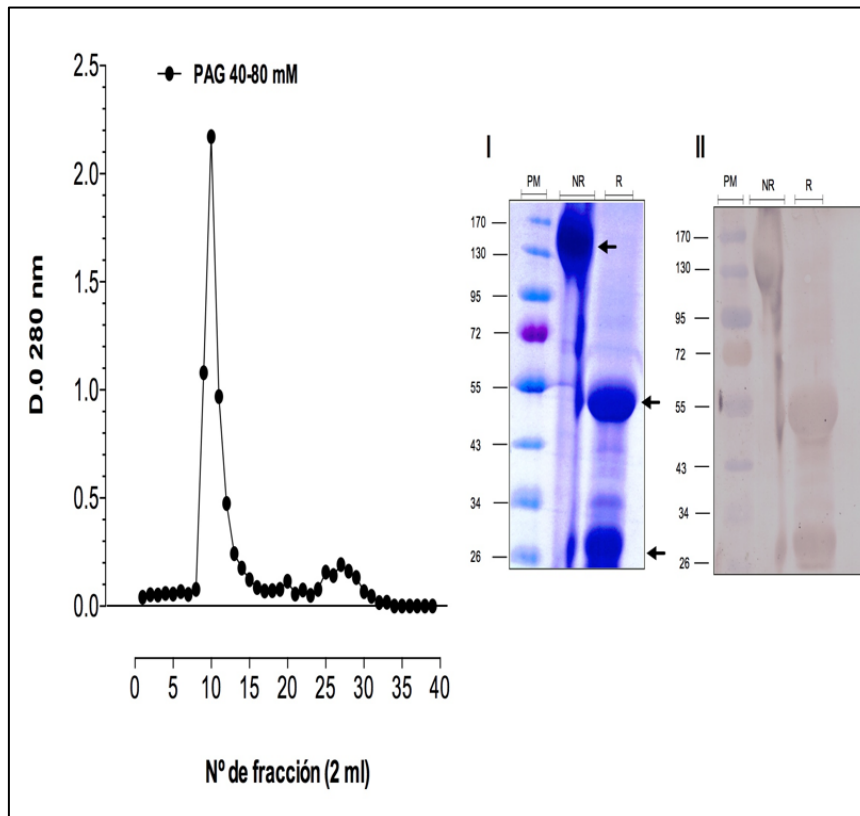


Fig. 5. Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-100) de la fracción PAG40-80 mM de NaCl. La columna (1x 65 cm) se equilibro previamente con bicarbonato de amonio 5 mM, pH 7.5 y se aplico un flujo de 0.5 ml/min. La elución de la proteína se monitoreo con una longitud de onda de 280 nm y se colectaron fracciones de 2 ml cada una. I) Patrón electroforético (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R) del pico de proteína; II) Patrón por inmunotransferencia del pico de proteína. En ambos casos se aplicó una concentración de proteína de 40µg por carril.

La fracción obtenida con el 80% de sulfato de amonio y purificada en DEAE-Sephacel se presenta en la figura 6. El patrón de elución se distribuyó en nueve picos de proteína con un predominio de las fracciones eluidas a 80, 160 y 320 mM de NaCl, respectivamente.

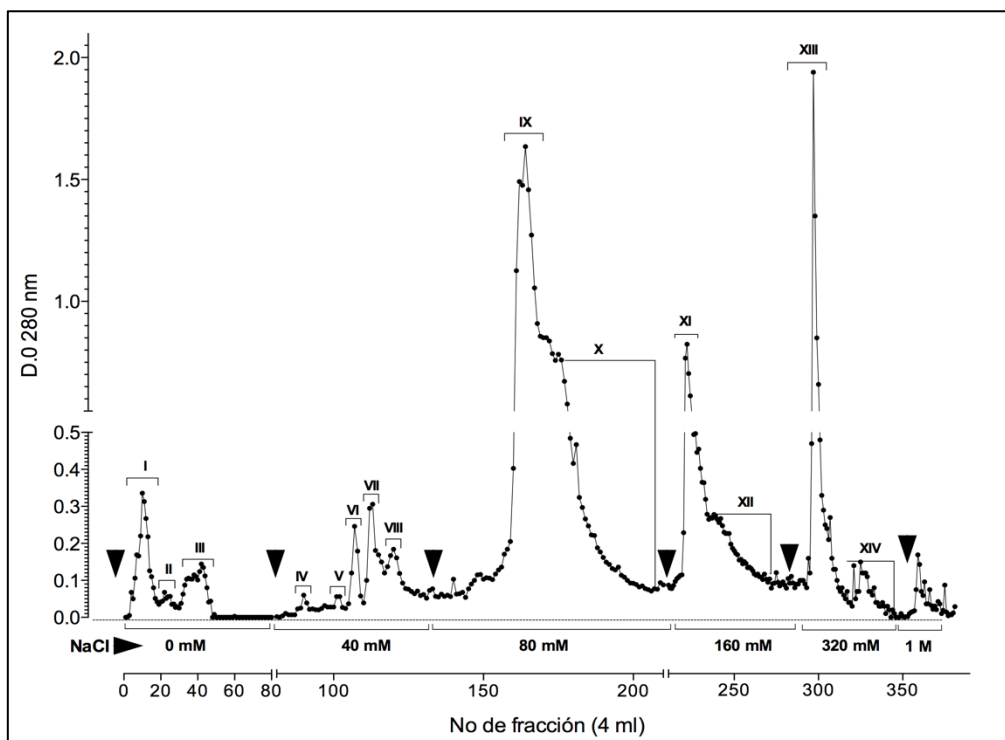


Fig. 6. Patrón cromatográfico de la fracción PAG 80 (140.6 mg de proteína). La columna (1.5 di x 27 cm) se equilibró con TRIS-HCl 0.010 M, pH 7.7 y un flujo de 60 ml/h, se colectaron fracciones de 4 ml. Cada pico de proteína se monitoreo a 280 nm. Al término, los picos de proteína se dializaron contra bicarbonato de amonio 5.0 mM, pH 8.0 por 48 horas y después se liofilizaron.

El patrón electroforético de las distintas fracciones de PAG80 recuperadas durante la separación en DEAE-Sephacel se presentan en la figura 7. Bajo condiciones no reductoras (NR) las fracciones de la I a la III presentaron un patrón heterogéneo con el predominio de tres proteínas de 40, 27, 24 kDa, mientras que la fracción IV mostro dos proteínas de 64 y 55 kDa, respectivamente. Las fracciones V y VI no mostraron un patrón definido de proteínas, mientras que en la fracción VII predominaron las proteínas de 55, 24, 19 y 15 kDa, en contraste a la fracción VIII, donde predominó la banda de 54 kDa. Bajo condiciones reducidas (R) en el patrón de la fracción I predominaron las proteínas de 55 y 24 kDa, los picos II y III se conservaron. En el pico IV predomino la banda de 64 y 59 kDa. El pico V y VI resultaron muy heterogéneos, en tanto que el pico VII y VIII, la banda de 66 kDa fue la predominante.

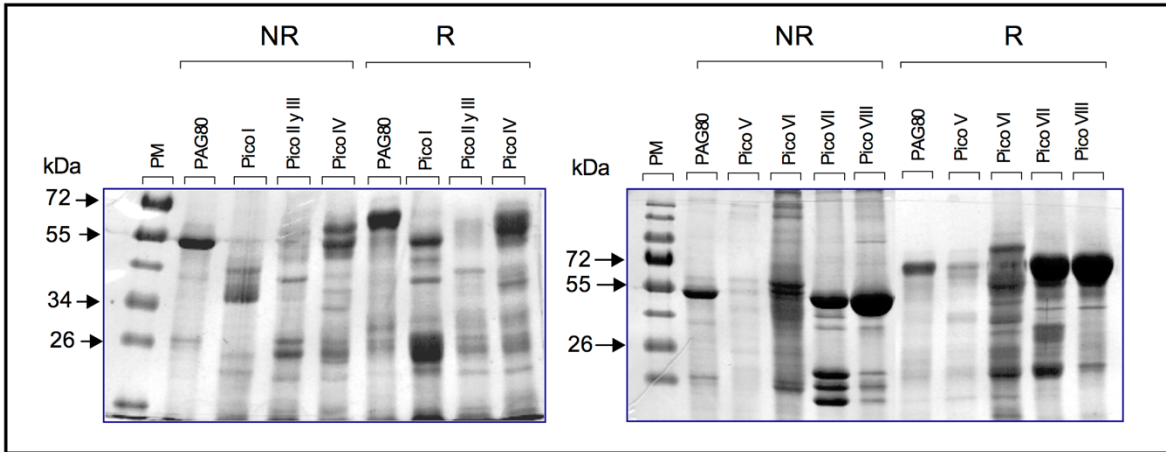


Figura 7. Patrón electroforesis en SDS-PAGE (10%, pH 8.6) de las fracciones obtenidas durante la purificación de PAG80 en DEAE-Sephacel. Cada fracción correspondió a 10 µg de proteína. La tinción se realizó con azul brillante de Comassie. Los números señalan los pesos moleculares de referencia.

La actividad inmunológica denoto un incremento entre cada paso de purificación,

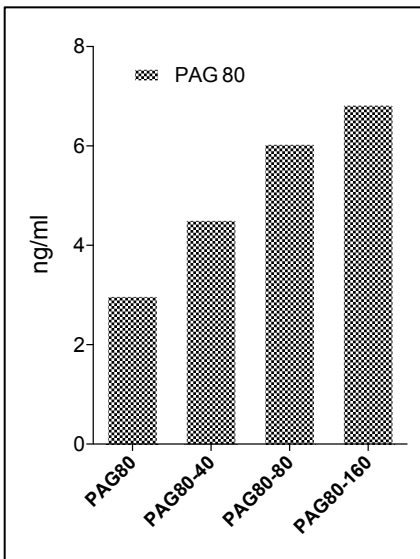


Fig. 8. Determinación inmunológica. En cada pasos de purificación de la PAG ovina se realizó siguiendo las especificaciones del estuche comercial de ELISA competitivo (My BIO Source, Inc, Sheep Pregnancy Associated Glycoproteins (PAPPA) Elisa kit, MBS750306).

El análisis por inmunotransferencia de las fracciones eluidas durante la purificación de PAG80 en DEAE-Sephacel se presenta en a figura 9. La fracción de 80 y 320 mM denotado la presencia de proteínas inmunoreactivas con un peso molecular de 170, 130, 90 y 43 kDa respectivamente, cuyo peso molecular se conservo bajo condiciones reducidas. La fracción de 160 mM no presentó bandas inmunoreactivas contra el anticuerpo de referencia.

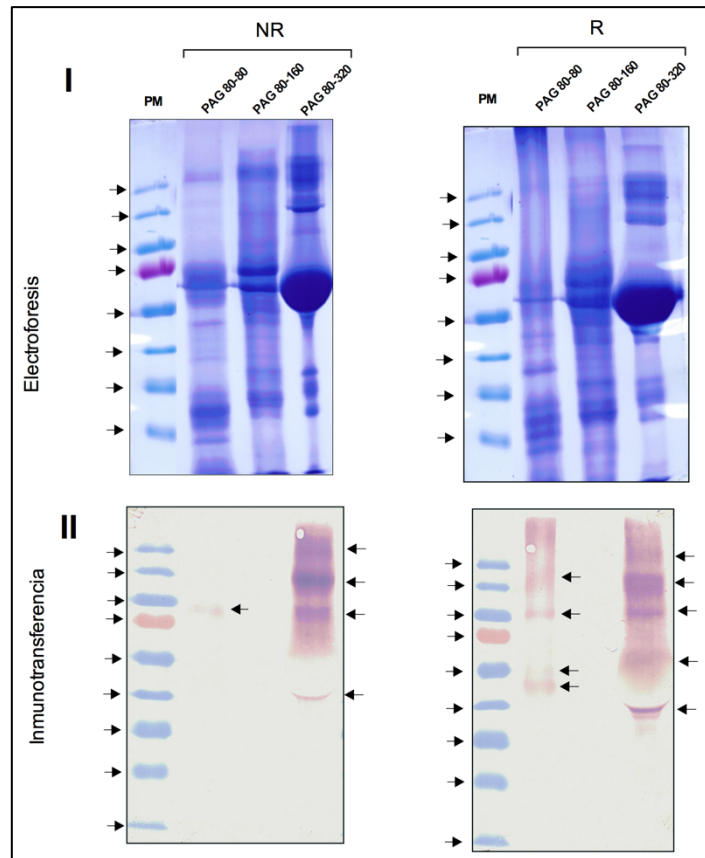


Fig.9. Análisis electroforético e inmunotransferencia de las fracciones de proteína recuperadas durante la purificación de la PAG 80 en DEAE-Sephacel. I) Patrón electroforético en SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R), teñido con azul brillante de Comassie. **II)** Patrón de las proteínas después de la inmunotransferencia. PM) Patrón de peso molecular. Cada carril corresponde a una concentración de 40 μ g de proteína. Para la inmunotransferencia, el primer anticuerpo (PAG1 Antibody, NBP2-56541) se utilizó 1:3000 con un tiempo de incubación de 16 horas a 4 °C, mientras que el anticuerpo secundario (Rabbit anti-IgG, Jakson Inmunoresearch) se analizó a una dilución 1:5000 incubado por dos horas a temperatura ambiente. Las flechas del panel inferior indican proteínas identificadas por el primer anticuerpo para las distintas fracciones de proteína analizadas.

La figura 10 muestra el patrón de elución de la fracción PAG80 eluida a 320 mM de NaCl en la cromatografía de DEAE-Sephacel. El patrón se distribuyó a lo largo de gradiente de concentración de NaCl en 6 fracciones, con una fracción predominante de proteína no retenida en la columna y dos fracciones que se distribuyeron con 160 y 320 mM, respectivamente. La figura 10 (II y III) muestra el patrón electroforético y de inmunotransferencia de las fracciones obtenidas de la CM-sepharosa.

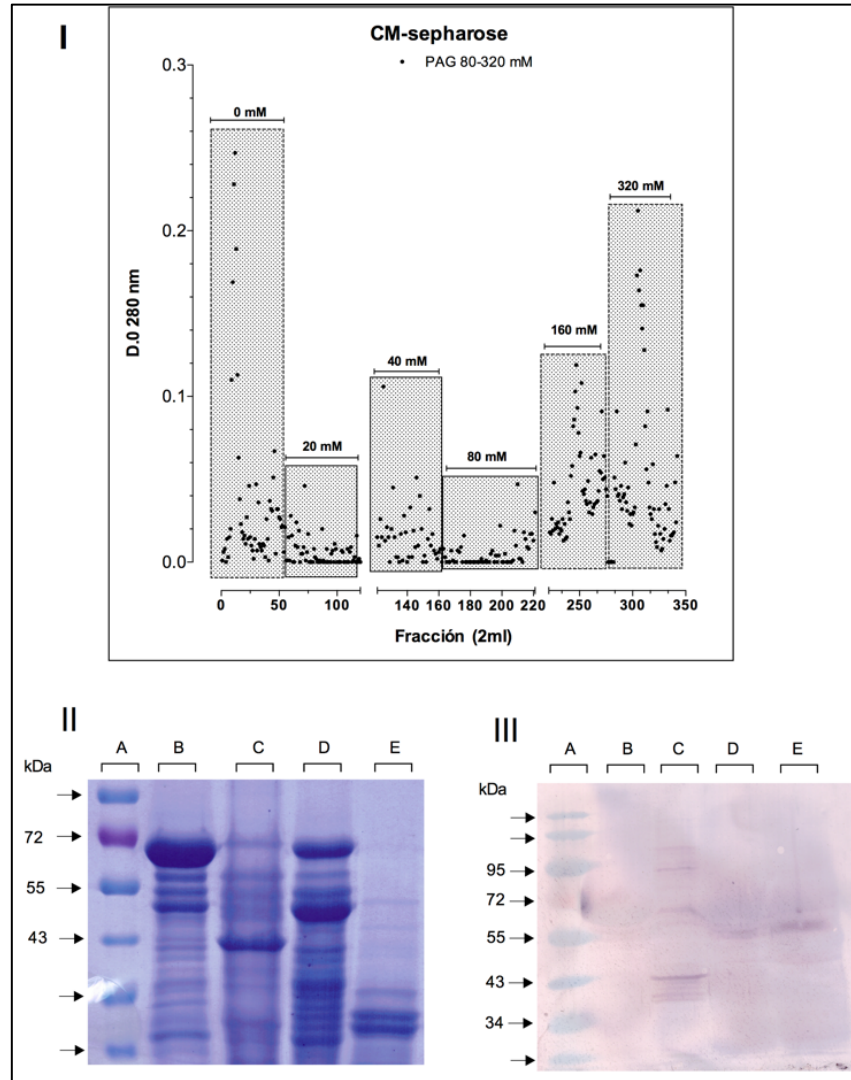


Fig. 10.- Patrón de elución de la fracción PAG80 obtenida con 320 mM de NaCl en una cromatografía de DEAE-Sephacel y repurificada en una cromatografía de intercambio catiónico (CM-Sephrose). I) La columna (1.5 di x 27 cm) se equilibró con acetato de amonio 10 M pH 5.2 y un flujo de 60 ml/h, se colectaron fracciones de 2 ml. Cada pico se monitoreo a 280 nm. Al termino los picos se dializaron (cut-off 12-14kDa) contra bicarbonato de amonio 5 mM, pH 8.0 por 48 horas y después se liofilizaron. II) Patrón electroforético en SDS-PAGE al 10%, tinción con azul brillante de Comassie. III) Inmunotransferencia. A) Marcadores de peso molecular; b) PAG 80-320 mM; C) Fracción no retenida en CM-Sephrosa; D) Fracción eluida a 160 mM de NaCl; E) Fracción eluida con 320 mM de NaCl

Discusión

La existencia de posibles formas hiperglicosiladas (Szafranska *et al.*, 2006) como las observadas de 90, 100 a 138 kDa (Fig. 5 y 9) bajo condiciones no reducidas y que reaccionaron positivamente al anti- hPAG1 no se descarta, ya que se ha descrito que esta familia de proteínas en la especie ovina y otras especies presentan varios sitios potenciales de glicosilación (Asp-X- S/T), por ejemplo, en la especie porcina se han descrito la presencia de al menos tres sitios en precursores de PAG (Szafranska *et al.*, 1995; Panasiewicz *et al.*, 2004; Szafranska *et al.*, 2004); en rumiantes este número de sitios posible de glicosilación se incrementa a siete (Xie *et al.*, 1997; Garbayo *et al.*, 2000); oligosacáridos que incrementan significativamente el peso molecular de la proteína nativa como se ha descrito en bisonte americano 72-76 kDa (Kiewisz *et al.*, 2008) y europeo 70-90 kDa, (Szafranska *et al.*, 2005; Kiewisz *et al.*, 2009).

Las proteínas observadas entre el rango de 62 a 42 kDa coinciden con el rango de pesos moleculares reportados para esta familia de PAG's en ovinos (Amiri *et al.*, 2003; 2004) y otras especies (Zoli *et al.*, 1991; Xi *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2002; Barbato *et al.*, 2008; Panasiewicz *et al.*, 2019). Por lo tanto, es posible que la presencia de esta familia de proteínas inmunoreactivas a PAG e identificadas en este estudio se encuentren formando parte de la placenta con 100 días de gestación.

Un hallazgo interesante fue la presencia de una proteína inmunoreactiva a PAG con un peso molecular de 28 kDa que podría tratarse de formas inmaduras en diferentes estadios de glicosilación. Se ha informado en ovinos que el peso molecular de PAG's maduras se incrementa en un 18% debido al contenido de 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 *et al.*, 2013) han descrito que la eliminación del grupo de oligosacáridos presentes en estas moléculas PAG1, PAG 2 y PAG11 mediante la aplicación de glicopeptidasa F, el peso molecular de las formas maduras (63, 57 y 44 kDa) disminuyen a razón de 37 kDa y en algunos casos de 21 kDa, lo que es un indicativo que la incorporación de oligosacáridos forma parte de la proteína madura. Xie *et al.*, en 1997 aplicando

tunicamisina como un inhibidor de la glicosilación observó la presencia de 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 kDa durante la purificación de PAG40 puede ser proteínas en diferentes estadios de desarrollo de las proteínas PAG's en la placenta ovina; Sin embargo, no se descarta que se trate de una proteína madura que es sintetizada en este periodo de la gestación en ovinos, se ha informado de proteínas cercanas a este peso molecular en la placenta ovina de 60 días de preñez (Amirí *et al.*, 2004) y recientemente se han observado proteínas PAG de 19 a 26 kDa en el oso pardo (Panasiewicz *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, no se descarta la posibilidad de un grupo de formas de estas proteínas que se trate de péptidos generados durante el proceso de reducción de la muestra original, es por ello que es conveniente un estudio mas profundo de esta proteína.

El análisis de secuenciación de PAG 40 eluida con 80 mM de NaCl confirmó la presencia de tres formas de PAG con un peso molecular teórico de 42.5, 42.7 y 43 kDa similar a lo informado para esta especie y coincide con el patrón de secuenciación descrito para PAG 3, 4 y una desconocida, respectivamente.

Aunque es claro que ocurre modificación postraducción (glicosilación) de forma específica en células de la placenta durante el desarrollo gestacional (Amiri *et al* 2003; 2004), y que a través de ensayos de protección de ribonucleasa (Green *et al.*, 2005; Garbayo *et al.*, 2000) se ha demostrado un patrón diferencial de expresión de PAG's a lo largo de la gestación, por lo tanto, la gran variabilidad de estas glicoproteínas presentes en el tejido placentario son producto de esta modificación postraducción (Szafranska *et al.*, 2007). En este estudio se confirmó lo descrito por Amirí *et al.* (2003), el cual menciona que las proteínas identificadas provienen de tejido placentario de 100 días de gestación en donde se expresan la gran variedad de las mismas.

Por lo tanto, las presencia de diferentes formas de PAG's con masa molecular distinta como se identificaron en este estudio no solo provienen del sistema de

inmuno-detección heteróloga, en las cuales varios epítomos de la molécula en cuestión fueron reconocidos por el anticuerpo anti-hPAG1, sino también hay que considerar las múltiples glicosilación, modificaciones postraduccionales específicas de cada especie y de eventos de corte y empalme del RNA durante el desarrollo del embarazo (Szafranska *et al.*, 2004; 2005; 2006). 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 *et al.*, 2007).

Conclusión

Bajo las condiciones de extracción y purificación desarrollados en este estudio es evidente que se logró identificar y aislar proteínas similares a PAG's, monitoreadas por inmunotransferencia y métodos inmunológicos como el ELISA. Es necesario un método de identificación homólogo (inmunotransferencia) para confirmar nuestros hallazgos. Se cuenta con material biológico suficiente para la purificación final y tratar de identificar posibles isoformas de las formas mayoritarias (52 y 28 kDa) bajo un sistema estandarizado de inmunodetección para este propósito. Con la obtención de la fracción mayoritaria de PAG se procederá a la inducción de sus correspondientes anticuerpos.

Recomendaciones

Llevar un adecuado control de los instrumentos del laboratorio, así como de los reactivos en el laboratorio de endocrinología. Que se lleve un control de entrada y de salida de reactivos, y la implementación de un inventario con las anotaciones pertinentes (material roto, o dañando, desaparecido, reactivos próximos a caducar o inexistentes). Esto ayudara a facilitar la información de reactivos y material de laboratorio que realmente sean necesarios para su posterior compra.

Bibliografia

Amiri, B., Remy, B., Sousa, N., Joris, B., Gerardin-Ottiers, N., BangaMboko, H., Beckers, J. (2003). Isolation and partial characterization of three pregnancy-associated glycoproteins from theewe placenta. *Molecular Reproduction and Development*, 64, 199–206.

Amiri, B., Remy, B., Sousa, N. (2004). Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high levels in the ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reproduction Nutrition Development*, 44, 169-181.

Amiri, B., Sousa, N., Alvarez, A., Hadarbach, D., Beckers, J. (2015). Pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration in plasma and milk samples for early pregnancy diagnosis in Lacaune dairy sheep. *Research in Veterinary Science*, 99,30-36.

Atkinson, Y., Gogolin, K., Hounsell, E., Davies, M., Brandon, M., Seamark, R. (1993). Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. Evidence for a new family of pregnancy-associated molecules. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 26679–26685.

Barbato, O., Majewska, M., Romanowska, A., Dajnowiec, J., Szafranska, B. (2008). Radiocompetition of secretory pregnancy-associated glycoproteins as chorionic ligands with luteal and uterine gonadotrophin receptors of pregnant pigs. *Animal Reproduction Science*, 99, 285–298.

Barbato, O., Sousa, N., Barile, V., Canali, C. (2013). Purification of pregnancy-associated glycoproteins from late-pregnancy Bubalus bubalis placentas and development of a radioimmunoassay for pregnancy diagnosis in water buffalo females. *BioMed Central Veterinary Research*, 9, 89-100.

Bollag, M., Edelman, J., (1991). Protein Methods. Wiley-Liss, Inc., NewYork, USA.

Butler, J., Hamilton, W., Sasser, R., Ruder, C., Hass, G., Williams, R. (1982). Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biology of Reproduction*, 26, 925–933.

Garbayo, J., Green, J., Manikkam, M., Beckers, J., Kiesling, D., Ealy, A., Roberts, R. (2000). Caprine Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAGs): their cloning, expression and evolutionary relationship to other PAG. *Reproduction*, 57, 311- 322.

Garbayo, M., Serrano, B., Lopez, F. (2008). Identification of novel pregnancy associated glycoproteins (PAG) expressed by the perimplantation conceptus of domestic ruminants. *Animal Reproduction Science*, 103, 120-134.

Green, J., Xie, S., Roberts, R. (1998). Pepsin-related molecules secreted by trophoblast. *Reviews of Reproduction*, 3, 62-91.

Green, J., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J., Roberts, R. (2000). Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biology of Reproduction*, 62, 1624–1631.

Green, J., Tina, E., Avalle, M., Telugu, B., McLain, A., Peterson, A., McMillan W., Marthialagan, N., Hook, R., Xie, S., Roberts, R. (2005). The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, 63, 1481–1503.

Hughes, A., Green, J., Garbayo, J., Roberts, R. (2000). Adaptive diversification within a large family of recently duplicated, placentally-expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 3319–3323.

Joubert, D. (1956). A study of pre-natal growth and development in sheep. *Journal of Agricultural Science*, 47, 382–428.

Kiewisz, J., Sousa, N., Beckers, J., Vervaecke, H., Panasiewicz, G., Szafranska, B. (2008). Isolation of pregnancy-associated glycoproteins from placenta of the American bison (*Bison bison*) at first half of pregnancy. *Genetics Compared Endocrinology*, 155, 164–175.

Kiewisz, J., Sousa, N., Beckers, J., Panasiewicz, G., Gizejewski, Z., Szafranska, B. (2009). Identification of multiple pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) purified from the European bison (*Bison bonasus* L.) placentas. *Animal Reproduction Sciences*, 112, 229–250.

Klisch, K., Boos, A., Friedrich, M., Herzog, K., Feldmann, M., Sousa, M., Beckers, J., Leiser, R., Schuler, R. (2006). The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition. *Reproduction*, 132, 791–798.

Laemmli, K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

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. *Reproduction Biology*, 4, 131–141.

Panasiewicz, G., Lipka, A., Majewska, M., Saveljev, A., Bozena, S. (2019). Identification of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) in the brown bear (*Ursus arctos* L.). *Acta Histochemica*, 121, 240–247.

Patel, O., Yamada, O., Kizaki, K., Takahashi, T., Imai, K., Hashizume, K. (2004). Quantitative analysis throughout pregnancy of placentomal and interplacentomal expression of pregnancy-associated glycoproteins-1 and -9 in the cow. *Molecular Reproduction and Development*, 67, 257–263.

- Perera, G., Murcia, C., González, E. (2007). Luteinizing hormone (LH) isoforms in ruminants: Characterization and physiological relevance. *Animal Reproduction Science*, 101, 187–207.
- Souza, N., Remy, B., Amiri, B., Figueiredo, J., Banga-Mboko, H., Dias, P., Beckers, J. (2002). Characterization of pregnancy-associated glycoproteins extracted from zebu (*Bos indicus*) placentas removed at different gestational periods. *Reproduction Nutrition*, 42, 227–241.
- Szafranska, B., Xie, S., Green, J., Roberts, R. (1995). Porcine pregnancy-associated glycoproteins: new members of the aspartic proteinase gene family expressed in trophoblast. *Biology of Reproduction*, 53, 21–28.
- Szafranska, B., Majewska, M., Panasiewicz, G., (2004). N-glycodiversity of the Pregnancy-Associated Glycoprotein family (PAG) produced in vitro by trophoblast and trophoblast explants during implantation, placentation and advanced pregnancy in the pig. *Biology of Reproduction*, 4, 67–89.
- Szafranska, B., Panasiewicz, G., Dabrowski, M., Majewska, M., Gizejewski, Z., Beckers, J., (2005). Chorionic mRNA expression and N-glycodiversity of pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) of the European bison (*Bison bonasus*). *Animal Reproduction*, 88, 225–243.
- 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. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 481–502.
- Szafranska, B., Panasiewicz, G., Majewska, M., Romanowska, A., Dajnowiec, J., (2007). Pregnancy-associated glycoprotein family (PAG) chorionic signaling ligands for gonadotropin receptors of cyclic animals. *Animal Reproduction*, 99, 269–284.
- Telugu, B., Walker, A., Green, J. (2009). Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family – analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. *BioMed Central Genomics*, 10, 185.
- Touzard, E., Reinaud, P., Dubois, O., Guyader-Joly, C., Humblot, P., Ponsart, C., Charpigny, G. (2013). Specific expression patterns and cell distribution of ancient and modern PAG in bovine placenta during pregnancy. *Reproduction*, 146, 347–362.
- Wallace, R., Pohler, K., Smith, M., Green, A. (2015). Placental PAGs: gene origins, expression patterns, and use as markers of pregnancy. *Society for Reproduction and Fertility*, 1470-1483.

Wooding, F., Roberts, R., Green, J. (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.

Xie, S., Low, B., Nagel, R., Kramer, K., Anthony, R., Zoli, A., Beckers, J., Roberts, R. (1991). Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *PNAS*, 88, 10247–10251.

Xie, S., Low, B., Nagel, R., Beckers, J. (1994). A Novel Glycoprotein of the Aspartic Proteinase Gene Family Expressed in Bovine Placental Trophectoderm. *Biology of Reproduction*, 51, 1145-1153.

Xie, S., Green, J., Bixby, J., Szafranska, B., DeMartini, J., Hecht, S., Roberts, R. (1997). The diversity and evolutionary relationships of the pregnancy-associated glycoproteins, an aspartic proteinase subfamily consisting of many trophoblast-expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 12809–12816.

Zoli, A., Beckers, J., Wouters-Ballman, P., Closset, J., Falmagne, P., Ectors, F. (1991). Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biology of Reproduction*, 45: 1–10.

Zoli, A., Guilbault, L., Delahaut, P., Ortiz, W., Beckers, J. (1992) Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction*, 46, 83–92.