

# Extracción y cuantificación de la fracción granulo secretoria de placentomas bovinos y su relación con el crecimiento fetal<sup>a</sup>

Francisco Alfredo Nuñez González<sup>b</sup>, José Arturo García Macías<sup>b</sup>,  
Christian Peña Barrios<sup>c</sup>, Francisco Gerardo Ríos Rincón<sup>d</sup>, Ricardo  
Barajas<sup>d</sup>

---

## RESUMEN

Núñez GFA, García MJA, Peña BC, Ríos RFG, Barajas R. *Téc Pecu Méx* 2001;39(3):255-262. La placenta es un órgano esencial para el desarrollo del feto, y el crecimiento del mismo depende en gran medida de la transferencia materna de proteínas para su diferenciación y morfogénesis. En los tejidos placentarios se encuentran presentes una gran variedad de hormonas y factores de crecimiento similares a la insulina. Es posible que la concentración de estas proteínas sea variable y dependa de la propia etapa de gestación y desarrollo fetal. Por lo que el objetivo de este trabajo fue extraer y cuantificar la fracción granulo secretoria (FGS) a partir de cotiledones de placenta bovina y establecer su relación con el crecimiento y la longitud fetal. Se utilizaron datos de 21 placentas y fetos en diferentes etapas de gestación. La extracción de las proteínas de los cotiledones fue llevada a cabo por centrifugación diferencial de gradientes de densidad, y su cuantificación por colorimetría. Los resultados mostraron que existe una mayor concentración de proteínas de la FGS durante la primera etapa de gestación con relación a la cantidad y número de cotiledones presentes en esta etapa. La conclusión, sobre la significancia biológica de los resultados en el feto, es que la rapidez del crecimiento por aumento de peso o crecimiento relativo es mayor en la gestación temprana, y que la longitud fetal depende de la concentración de proteínas en la fracción granulo secretoria.

**PALABRAS CLAVE:** Bovinos, Fracción granulo secretoria, Crecimiento fetal, Etapas de gestación.

---

El crecimiento fetal depende en gran medida de la transferencia materna de proteínas para su diferenciación y morfogénesis, procesos que están estrechamente

relacionados con los factores de crecimiento y con sus receptores<sup>(1)</sup>. En estas condiciones, la placenta constituye un órgano esencial para el desarrollo del feto durante la etapa de gestación, ya que lo une a la madre, además de intervenir en la respiración, nutrición, excreción, y participar en el intercambio metabólico entre los componentes fetales y maternos<sup>(2)</sup>.

En años recientes, se han acumulado evidencias sobre la secreción de péptidos

---

<sup>a</sup> Recibido el 3 de abril de 2001 y aceptado para su publicación el 16 de octubre de 2001.

<sup>b</sup> Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua, Perif. Fco. R. Almada Km 1, Admón. Correos 4-28, 31031, Chihuahua, Chih., México, Tel.- (14) 34 03 03 Fax.- (14) 34 03 45, [jgarcia@uach.mx](mailto:jgarcia@uach.mx) Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

<sup>c</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit, (IV Verano de la Investigación del Pacífico).

<sup>d</sup> Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.

de origen placentario a partir de la fusión de la estructura coriónica con las células epiteliales uterinas, este proceso ocurre en las células binucleadas (BNC) maduras que sintetizan y almacenan proteínas específicas en los gránulos encargados de la secreción de hormonas placentarias<sup>(3)</sup>. En este contexto, diversos autores señalan que las células trofoblásticas tanto del tipo mononucleado como binucleado, producen estradiol y estrona<sup>(4)</sup>, así como las proteínas específicas de la preñez bovina<sup>(5)</sup>, que son producidas por las células trofoblásticas binucleadas<sup>(6)</sup>. Estas proteínas también se han aislado con el propósito de diagnosticar la preñez en estado temprano<sup>(7)</sup>.

Además de producir una gran variedad de hormonas, también se encuentran presentes los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF)<sup>(8)</sup> en los tejidos fetales y placentarios. Los IGF no sólo participan en el crecimiento fetal según la disponibilidad de glucosa, sino que también actúan de manera concertada con hormonas placentarias, regulando las actividades metabólicas maternas, de modo que se dispone de un suministro continuo de sustratos para el desarrollo fetal<sup>(9)</sup>.

Es posible que la concentración de estas proteínas sea variable y dependa de condiciones extrínsecas, como el estrés que experimentan los animales gestantes, o bien intrínsecas como la propia etapa de gestación y el desarrollo fetal.

Con base en los anteriores planteamientos, el objetivo del estudio fue el de extraer la Fracción gránulo secretoria (FGS) de los placentomas de bovinos, en diferentes etapas de la gestación, para cuantificar la

concentración de proteínas y establecer su relación con el peso y la longitud fetal.

El trabajo se realizó en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Zootecnia, de la Universidad Autónoma de Chihuahua. La recolección de placentomas se realizó en el rastro municipal de la ciudad de Chihuahua. Aproximadamente veinte minutos después del sacrificio de los animales, se obtuvieron úteros en diferentes meses de gestación. La edad del feto fue estimada al medir la longitud cráneo-caudal, de acuerdo a la fórmula de Keller citado por Vatti<sup>(10)</sup>.

Para evaluar la concentración de la FGS por edad fetal, se utilizaron un total de 21 fetos bovinos en tres etapas de gestación: el primer tercio comprendió de 0 a 90 días de gestación, utilizándose siete fetos de diferente longitud y peso corporal, pero todos dentro del mismo tercio; el segundo tercio comprendió de los 91 a los 180 días y se utilizaron siete fetos; y el tercer tercio comprendió de 181 a 270 días, con otros siete fetos.

Al momento de abrir los úteros, los placentomas fueron recolectados, contados y pesados, mientras que los datos obtenidos de los fetos fueron longitud, peso y determinación de la edad. Después de obtener los placentomas, estos fueron almacenados a una temperatura de 4 °C y trasladados al laboratorio, donde la porción fetal (cotiledones) fue separada de la porción materna (carúncula) mediante tracción manual suave; luego se retiró todo tejido adherido hasta quedar completamente limpios; posteriormente el cotiledón fue cortado en trozos pequeños, de acuerdo con el

PLACENTOMAS BOVINOS Y SU RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO FETAL

procedimiento propuesto por Byatt<sup>(11)</sup>. Este material se incubó en Medio 199 (Sigma) a un pH de 7.2 (50 g de tejido/50 ml del Medio) y fue homogenizado vigorosamente por 2 h a 22 °C. El material fue filtrado a través de un cedazo, recuperándose el tejido; se pesó y se tomó una muestra del filtrado, el cual se colocó en tubos de ensayo y se centrifugó a 350 xg durante 5 min a una temperatura de 4 °C.

El concentrado resultante fue medido y se recolectó la segunda muestra (S1). Nuevamente se centrifugó la suspensión a 4,800 xg durante 15 min, el sobrenadante se desechó y el precipitado se recolectó, al tiempo que se obtuvo la tercera muestra (S2). El material obtenido se lavó con agua desionizada y se aplicó a un gradiente discontinuo de Percoll (Pharmacia, Inc.) con capas de densidad de 1.03, 1.04, 1.06, 1.08 g/ml de acuerdo a la metodología recomendada<sup>(12)</sup>. Después de centrifugarse a la misma velocidad, temperatura y tiempo anterior, el material sedimentado en la capa de densidad 1.04, se recuperó y se tomó la cuarta muestra(S3). La fracción restante fue almacenada a -20 °C para su posterior

utilización. En todos los casos las muestras obtenidas fueron almacenadas en refrigeración para posteriormente cuantificar la concentración de proteína.

El contenido proteico de la FGS fue estimado mediante la técnica de Bradford<sup>(13)</sup>. Las lecturas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro Bio-Rad (Mod. 3550 Micoplate Reader), a una longitud de onda de 595 nm. Una vez obtenidas las lecturas, la concentración de proteína fue estimada mediante una curva de calibración previamente preparada con albúmina sérica bovina.

Los análisis estadísticos de la información se dividieron en descriptivos para las mediciones de recuperación de proteína en cada una de las fases del proceso de extracción, por cada etapa de gestación para las características de F, S1, S2 y S3; además se realizó una comparación de medias por medio de la prueba de rango múltiple de Duncan<sup>(14)</sup>, para lo cual se utilizó un modelo lineal general<sup>(15)</sup>, en el que se consideró el efecto de la concentración de proteínas y el efecto

**Cuadro 1. Promedio de longitud y peso fetal, número y peso total de los cotiledones y peso de la porción fetal por etapa de gestación de bovinos (Media ± EE)**

	Etapa de Gestación		
	Primer tercio (n = 7)	Segundo tercio (n = 7)	Tercer tercio (n = 7)
Longitud, cm	16.3±0.98	33.2±2.20	68.8±2.06
Peso, kg	0.32±0.05	6.20±5.50	21.00±7.90
Número de cotiledones	70±2.40	106±2.31	114±2.80
Peso de cotiledones, g	65±2.1	2600±315	5640±368
Peso de la porción fetal, g	50±4.8	992±99.6	1284±187

clasificadorio de etapa de la gestación. Finalmente la relación entre la concentración de proteína de la FGS y la longitud y peso fetal se realizó mediante el procedimiento de regresión<sup>(15)</sup>.

En el Cuadro 1 se muestran los valores obtenidos para la longitud y peso fetal por etapa de gestación, donde se observa que a medida que transcurre la gestación, se incrementa el peso y la longitud del feto. También se observa que en el primer tercio de la gestación, el número y peso de los cotiledones fetales tienen el valor más bajo en comparación con el segundo y tercer tercio, donde se mostraron los valores más altos para esta característica.

En el Cuadro 2, se muestran los valores de recuperación de FGS por etapa de

gestación y por fase de extracción, y se observa que la concentración de proteína en el material filtrado fue de 78.5 89.9 y 97.4 mg para la primera segunda y tercera etapa de gestación respectivamente, con respecto a la centrifugación a 350 xg; el porcentaje de proteína recuperada en el líquido sobrenadante fue del rango del 73.1 al 86.4. En el caso de la centrifugación a 4,800 xg los porcentajes de recuperación tuvieron un rango del 27.0 al 27.5. Finalmente el gradiente de densidad varió del 11.6 al 13.8.

Las medias de la concentración de proteína por etapa de gestación y fase del proceso de extracción se muestran en el Cuadro 3, pudiéndose observar que la mayor concentración de proteína ( $97.4 \pm 4.9$  mg) obtenida en la fase del filtrado corresponde

**Cuadro 2. Recuperación de proteína de la FGS de la placenta bovina por etapa de gestación y fase de extracción**

Fase de extracción	Porción	CPT (mg/ml)	CPR (mg)	PRP (%)
Primer tercio de gestación				
Homogenizado	Filtrado	2434.0	78.5	100.0
Centrifugación 350 xg	Sobrenadante	2367.3	61.5	78.3
Centrifugación 4,800 xg	Suspensión	2265.9	21.3	27.1
Gradiente de densidad, 1.04 g/ml	FGS	1602.8	10.8	13.8
Segundo tercio de gestación				
Homogenizado	Filtrado	2762.9	89.9	100.0
Centrifugación 350 xg	Sobrenadante	2761.0	77.6	86.4
Centrifugación 4,800 xg	Suspensión	2590.1	24.7	27.5
Gradiente de densidad, 1.04 g/ml	FGS	1942.2	12.2	13.6
Tercer tercio de gestación				
Homogenizado	Filtrado	3203.5	97.4	100.0
Centrifugación 350 xg	Sobrenadante	3061.1	71.2	73.1
Centrifugación 4,800 xg	Suspensión	3047.3	26.3	27.0
Gradiente de densidad, 1.04 g/ml	FGS	1542.0	11.3	11.6

FGS= fracción gránulo secretoria; CPT= concentración de proteína; CPR= concentración de proteína recuperada; PRP= porcentaje de recuperación de proteína.

PLACENTOMAS BOVINOS Y SU RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO FETAL

a los cotiledones fetales del último tercio de la gestación, este valor ( $P < 0.05$ ) fue superior al obtenido en esta fase por los cotiledones fetales de la placenta del primer tercio de la gestación. La concentración de proteína en el sobrenadante, después de la centrifugación a 350 xg fue de 77.6 mg en los cotiledones fetales de la placenta del segundo tercio de la gestación. Los valores fueron diferentes de los que se obtuvieron en esta fase de los cotiledones.

En el Cuadro 4 se muestran los valores de la concentración de proteína total por fase del proceso de extracción y por etapa de gestación, encontrándose que en cada

proceso de extracción, la concentración de proteína total disminuye con relación a la cantidad de material fetal utilizado.

Las ecuaciones de regresión lineal estimadas para peso ( $Y = 1.379 + 0.006(x)$ ;  $R^2 = 0.22$ ;  $P < 0.05$ ) y longitud fetal ( $Y = 23.77 + 1.99(x)$ ;  $R^2 = 0.75$ ;  $P < 0.01$ ), indican que el peso y la longitud del feto dependen de la concentración de proteínas.

De acuerdo con los resultados, el comportamiento de los valores de crecimiento de peso fetal por etapa de gestación se explica en razón de que la rapidez del crecimiento relativo dado por el aumento

**Cuadro 3. Medias de los cuadrados mínimos de la concentración de proteínas (mg) por etapa de gestación y fase del proceso de extracción (Media  $\pm$  EE)**

	Fase del proceso			
	Filtrado	Sobrenadante	Suspensión	Sedimento (FGS)
Etapa de gestación:				
Primer tercio	78.5 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	63.1 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>	24.0 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
Segundo tercio	89.9 $\pm$ 4.5 <sup>ab</sup>	77.6 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	12.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>
Tercer tercio	97.4 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	71.2 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>	26.3 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	11.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Literales diferentes dentro de las columnas indican diferencias ( $P < 0.05$ ) entre medias. FGS= fracción granulo secretoria

**Cuadro 4. Concentración de proteína total (g) por fase del proceso de extracción y etapa de gestación (Media  $\pm$  EE)**

	Etapa de gestación		
	Primer tercio	Segundo tercio	Tercer tercio
Fase del proceso:			
Filtrado	0.08 $\pm$ 0.01	1.78 $\pm$ 0.12	2.50 $\pm$ 0.18
Sobrenadante	1.60 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.06	1.41 $\pm$ 0.05
Suspensión	0.02 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02
Sedimento (FGS)	0.01 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.02

FGS= fracción granulo secretoria

de peso, es mayor en las fases tempranas de la gestación, pero posteriormente declina a medida que ésta avanza<sup>(16)</sup>.

Los datos obtenidos indican que es posible obtener una mayor concentración de proteína (FGS), durante la segunda etapa de la gestación con relación a la cantidad y número de cotiledones fetales presentes en esta etapa (120 a 130 días de gestación), donde alcanzan un gran tamaño<sup>(17)</sup>. Sin embargo, conforme los cotiledones fetales aumentan en número y tamaño, así como la cantidad de células binucleadas, la concentración de proteína aumenta. Se ha observado<sup>(3)</sup>, que las BNC se caracterizan por ser una estructura que integra el componente invasivo de la placenta de los rumiantes y liberan su contenido, generalmente hormonas de los gránulos secretorios, directamente en el tejido materno, favoreciendo el suministro de sustratos para el feto.

La rapidez del crecimiento por aumento de peso o crecimiento relativo es mayor en las fases tempranas de la gestación y declina a medida que esta avanza, mientras que el incremento absoluto por unidad de tiempo es de tipo lineal, hasta alcanzar la máxima expresión a finales de la preñez.

En bovinos, más de la mitad del aumento de peso fetal ocurre durante los dos últimos meses de la gestación. Al término, el peso del feto representa alrededor del 60 % del peso total de los productos de la gestación. Esto se explica a partir del papel fisiológico que poseen las BNC, que participan en la producción y participación de proteínas, así como la producción de hormonas esteroides<sup>(18)</sup>.

Al migrar las BNC por medio de la monocapa del trofoblasto y fusionarse con las células uterinas<sup>(19)</sup> y las proteínas séricas relacionadas con la preñez, son transportadas al tejido endometrial y a la circulación sanguínea materna<sup>(20)</sup>. Por otra parte la producción secuencial de diferentes proteínas de origen placentario, es un indicativo de que las BNC, conforme transcurre la preñez, tienen diferentes funciones en la implantación de la placenta y en el desarrollo subsecuente de las vellosidades cotiledonarias<sup>(21)</sup>.

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que la mayor concentración de la fracción gránulo secretoria se obtuvo durante la primera etapa de gestación en relación a la cantidad y número de cotiledones fetales. La significancia biológica de estos resultados están en relación a la velocidad del crecimiento, ya que el aumento de peso o crecimiento relativo es mayor al inicio de la gestación, además de que la longitud del feto depende de la concentración de proteínas.

#### **EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF BOVINE PLACENTAL SECRETORY GRANULES FRACTION (PGSF) AT DIFFERENT PREGNANCY STAGES AND ITS RELATIONSHIP TO FETAL GROWTH AND LENGTH**

#### **ABSTRACT**

Núñez GFA, García MJA, Peña BC, Ríos RFG, Barajas R. *Téc Pecu Méx* 2001;39(3)255-262. The placenta is an essential organ for fetal development; fetus morphogenic and differentiation growth depend principally on maternal protein transfer.

## PLACENTOMAS BOVINOS Y SU RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO FETAL

**A great variety of hormones and insulin like growth factors exist in placental tissues. Thus the aim of this work was to extract and quantify the placental secretory granules fraction (PSGF) from placental cotyledons and to establish its relationship with the fetus growth and length. Twenty one different pregnancy stage placentas and their fetuses were used. Protein extraction from cotyledons was done by differential gradient density centrifugation and quantified by a colorimetric method. Results showed that, in the first third of pregnancy exists more PSGF protein concentration related to quantity and number of cotyledons present in placentas at this stage compared to other stages. From the fetus data it can be concluded that a faster weight or relative growth occur early in pregnancy and that fetal length depends on (PSGF) protein concentration.**

**KEY WORDS: Bovine, Secretory granules fraction, Fetal growth, Stages of pregnancy.**

### LITERATURA CITADA

1. Liu HK, Gao K, Boumbach GA, Godkin JC. Purification and immunolocalization of ovine placental retinol-binding protein. *Biol Reprod* 1992;46:23-29.
2. Lawrence TL, Fowler VR. Growth of farm animals. CAB International. Cambridge. UK: University Press; 1997;172-176.
3. Wooding FBP. Current Topic: The synepithelio-chorial placenta of ruminants: Binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 1992;13:101-113.
4. Matamoros RA, Camaño L, Lamb SV, Reimers TJ. Estrogen production by binucleate and mononucleate trophoblastic cell in vitro. *Biol Reprod* 1994;51:486-456.
5. Buttler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Rudder RA, Hass GM, Williams RJ. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod* 1982;26:925-933.
6. Eackbland WP, Sasser RG, Rudder CD, Panlasigui P, Kucznski T. Localization of pregnancy-specific B (PSPB) in bovine placental cell using a glucose oxidase antiglucose immunohistochemical stain. *J Anim Sci* 1985;61:149-150.
7. Beckers JF, Wonters-Ballman P, Ectors F. Isolation and radiomunoassay of a bovine pregnancy specific protein. *Theriogenology* 1988;29:219-219.
8. Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD. Placental fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. *J Anim Sci* 1995;73:1861-1871.
9. Owen JA. Endocrine and substrate control of fetal growth placental and maternal influences and insulin-like growth factors. *J Reprod Fertil* 1991;3:501-517.
10. Vatti G. Ginecología y obstetricia veterinaria. México. Uteha. 1985.
11. Byatt JC, Shimomura K, Duello TM, Bremel RD. Isolation and characterization of multiple forms of bovine placental lactogen from secretory granules of the fetal cotyledon. *Endocrinology* 1986;119:1343-1350.
12. Hinton R, Dobrota M. Density gradient centrifugation. New York;. USA: North-Holland Publishing Company; 1980.
13. Ausubel FN, Brent R, Moore D, Smith JA. Analysis of protein. In; Jaansen K editor. Current protocols in molecular biology. Publishing Associates, Inc. 1993;1-3.
14. Steel RG, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Mc. Graw-Hill Book Co.; 1980.
15. SAS, User's Guide. Procedures statistics. Cary, N.C. USA. SAS Institute Inc. 1992.
16. Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6<sup>a</sup> ed. México: Interamericana McGraw-Hill; 1991.
- 17 Kappes SM, Warren WC, Pratt SL, Liang R, Anthony RV. Quantification and cellular localization of ovine placental lactogen messenger ribonucleic expresion mid-and embryonic trophoctoderm. *Endocrinology* 1992;131:2829-2838.
- 18 Wooding FBP, Hobbs T, Morgan G, Heap RB, Flint APF. Cellular dynamics of growth in sheep and goats synepitheliochorial placentomes: an autoradiographic study. *J Reprod Fertil* 1993;98:275-283.
- 19 Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. *J Reprod Fertil (Suppl)* 1995;49:39-51.
- 20 Wango EO, Wooding FBP, Heap RB. The role of trophoblastic binucleate cell in implantation in the goat: a morphological study. *J Anat* 1990;171:241-257.
- 21 Morgan G, Whyte A, Wooding FBP. Characterization of a synthetic capacities of isolated placental binucleated cell from sheep and goat. *Anatomical Record* 1990;226:27-36.

Francisco Alfredo Núñez González, *et al.*