



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS APICALES  
Y BASALES DE TROFOBlasto EQUINO (*Equus caballus*)**

**EDUARDO HIDALGO MORENO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias Biológicas.

**PROFESOR GUÍA : GLORIA RIQUELME PINO.**

**SANTIAGO, CHILE  
2004**

Dedico este trabajo a mis padres por el incondicional apoyo y ayuda a lo largo de estos años de estudio, y en especial a Karen quien se ha transformado en un apoyo constante en los momentos difíciles y que ha representado el empuje que todo ser humano necesita.

## **AGRADECIMIENTOS**

Por su constante preocupación a lo largo de este proceso, y por toda la ayuda otorgada en aquellos momentos difíciles, agradezco especialmente a la Doctora Gloria Riquelme y a Verónica Jiménez.

Por hacer de mi trabajo un constante aprendizaje y por contribuir a una grata convivencia, a todos los miembros del Laboratorio de Electrofisiología de Membranas del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

## Resumen

La placenta es el principal órgano de intercambio de nutrientes y productos de desecho entre la madre y el feto. De su normal desarrollo y funcionamiento depende el éxito de la gestación.

Si bien la placenta puede considerarse fundamentalmente similar a otros epitelios como el intestinal y renal, ésta presenta algunas características anatómicas e histológicas sinciales que la diferencian de otros epitelios.

Se estandarizó un protocolo de aislamiento de membranas apicales y basales de trofoblasto equino, a partir de una misma placenta en forma simultánea. Esto minimiza las variaciones intrínsecas debido al origen diverso de las membranas analizadas.

Las placentas se obtuvieron del Haras Fina Sangre de Carrera (“El Sheik” y “Santa Eladia”, ambos ubicados en la Región Metropolitana). Inmediatamente después, se realizó la purificación de la membrana apical y basal de trofoblasto equino, mediante un método que incluyó centrifugaciones diferenciales, precipitación de membranas con cloruro de magnesio y purificación de membranas utilizando gradiente de sacarosa. La calidad, en cuanto a pureza, se determinó con marcadores bioquímicos específicos tanto de membrana apical y basal

Se trabajó con un total de ocho placentas. El tejido fue sometido a dos procedimientos alternativos procesando la membrana corioalantoidea por corte (I) (n=5) o raspado (II) (n=3). En ambos casos las muestras fueron tomadas de las zonas cercanas al cordón umbilical, las que presentaron mayor desarrollo microcotiledonario.

El rendimiento de la preparación en términos de recuperación de proteínas obtenidas por (I) y (II), fue para la fracción microsomal apical (fma) de  $1,22\% \pm 0,10$  y de  $4,34\% \pm 0,73$ , respectivamente; en tanto que para la fracción microsomal basal (fmb) fue de  $0,47\% \pm 0,13$  y  $1,65\% \pm 0,29$ . El rendimiento de las fracciones puras apicales (PA) fue de  $0,046\% \pm 0,04$  y de  $0,18\% \pm 0,01$ , en tanto el rendimiento de la fracción basal pura (PB) fue de  $0,081\% \pm 0,01$  y  $0,073\% \pm 0,01$ , respectivamente.

A fin de asegurar la pureza de las vesículas obtenidas, se midió la actividad enzimática de marcadores específicos para la membrana apical y basal del trofoblasto equino (fosfatasa alcalina y unión de ligandos específicos a receptores  $\beta$ -adrenérgicos), respectivamente. La actividad específica de fosfatasa alcalina (UI/ mg prot) se midió por un método comercial, con valores para la fracción microsomal apical (fma) obtenida por (I) y (II), de  $80,8 \pm 18,05$  (I) y de  $159,04 \pm 15,5$  (II). En tanto, para la

fracción microsomal basal (fmb) los valores obtenidos fueron  $19,7 \pm 5,0$  (I) y  $30,7 \pm 3,1$  (II), respectivamente.

La actividad de fosfatasa alcalina de las fracciones pura apical (PA) que se obtuvo por cortado y raspado fue de  $91 \pm 6$ , (I) y  $174 \pm 8,2$  (II), en tanto que la fracción pura basal (PB) arrojó los valores de  $15 \pm 1,5$  y  $12 \pm 0,1$  respectivamente. En tanto el enriquecimiento de la fracción pura apical (PA) que se obtuvo fue de  $4,6 \pm 0,1$  y  $5,0 \pm 0,1$  veces, y para la fracción pura basal (PB) los valores de enriquecimiento fueron de  $0,8 \pm 0,01$  y  $0,3 \pm 0,05$  veces respectivamente.

La unión de dihidroalprenolol tritiado a receptores  $\beta$ -adrenérgicos no arrojó un resultado concluyente respecto a la distribución diferencial de dicho marcador en las membranas apical y basal purificadas. Sin embargo, la escasa contaminación de la membrana basal con fosfatasa alcalina es un buen indicador de la calidad de dichas membranas y de la eficiencia del gradiente de sacarosa utilizado para purificar la fracción microsomal basal.

Estos datos indican que el rendimiento del método de purificación por raspado es mayor que cuando el procesamiento del tejido se realiza inicialmente por cortado. La actividad y el enriquecimiento de fosfatasa alcalina también respaldan esta conclusión.

Con el desarrollo de este método de purificación se ha dado un primer paso para la obtención de membranas apicales y basales de placentas de tipo epiteliocorial, lo que permitirá, posteriormente, aplicar el protocolo de aislamiento en placentas de camélidos sudamericanos, cuyas características fisiológicas son relevantes para el estudio de gestaciones bajo condiciones de hipoxia.

## Summary

The placenta is the main organ of exchange of nutrients and waste products between the mother and the fetus in mammalian species. Although the placental epithelium can be considered fundamentally similar to other epithelia, it displays particular anatomical and histological characteristics in both the human and equine placenta, such as its syncytial nature. The study of transport functions between mother and fetus in these cases necessarily involves the study of such functions in the polarized apical (mother-facing) and basal (fetal-facing) plasma membranes.

In this study, a protocol for simultaneous apical and basal membrane isolation in equine trophoblast was standardized. A total of  $n=8$  placentas were obtained from two Thoroughbred Race Horse Haras (El Sheik and Santa Eladia, both located in the Metropolitan Region of Chile). Immediately after birth, the equine placenta was transported to the laboratory on ice to begin the purification protocol, which included two alternative methods for tissue collection followed by differential centrifugations, precipitation of basal membranes with magnesium chloride, and membrane purification using sucrose gradients. Initial tissue collection was done either by chopping the placental tissue (villous tissue adhered to chorioallanthoid membrane) in small pieces (method I;  $n=5$ ) or by scraping the villous tissue from the chorioallanthoid membrane (method II;  $n=3$ ). Specific biochemical markers for apical and basal membranes were used to determine purified fraction purity and contamination. The yield of the preparation in terms of protein recovery obtained by method I and method II for the apical microsomal fraction (fma) was of  $1.22\% \pm 0.10$  and  $4.34\% \pm 0.73$ , respectively, whereas for the basal microsomal fraction (fmb) the yield was of  $0.47\% \pm 0.13$  and  $1.65\% \pm 0.29$ , respectively. The protein recovery for the purified apical fraction (PA) for method I and method II was of  $0.046\% \pm 0.04$  and  $0.18\% \pm 0.01$ , respectively, whereas the protein recovery for the purified basal fraction (PB) was of  $0.081\% \pm 0.01$  and  $0.073\% \pm 0.01$ , respectively. Specific markers for apical membrane (enzymatic activity of alkaline phosphatase) and basal membrane (substrate binding to  $\beta$ -adrenergic receptors) of trophoblast were measured in both the apical and basal fractions to determine their degree of purity and cross-contamination. Measurements of specific activity for alkaline phosphatase (UI/mg prot) were of  $80.8 \pm 18.05$  for method I and  $159.04 \pm 15.5$

for method II in the apical microsomal fraction (fma), and of  $19.7 \pm 5.0$  for method I and  $30.7 \pm 3.1$  for method II in the basal microsomal fraction (fmb). Alkaline phosphatase activity in the purified apical fraction (PA) was of  $91 \pm 6.3$  for method I and  $174 \pm 8.2$  for method II, whereas in the purified basal fraction (PB) values were of  $15 \pm 1.5$  for method I and  $12 \pm 0.1$  for method II. Enrichment of alkaline phosphatase activity in the PA fraction was of  $4.6 \pm 0.1$  fold for method I and  $5.0 \pm 0.1$  fold for method II, and of  $0.8 \pm 0.01$  fold for method I and  $0.3 \pm 0.05$  fold for method II in the PB fraction. Substrate binding to  $\beta$ -adrenergic receptors did not show conclusive results with respect to the differential distribution of this marker in purified apical and basal membranes. Nevertheless, the little contamination of the basal membrane with alkaline phosphatase is a good indicator of the quality of these purified membranes. The exposed data indicate more efficient membrane purification when using method II than when using method I. The activity and the enrichment of alkaline phosphatase also endorse this conclusion.

The development of this method of simultaneous isolation of apical and basal trophoblast plasma membranes is a first approximation for the study of transport functions in placentas of the epitheliocorial type. This may allow, in the future, the use of such protocol in placentas of South American camelids, whose physiological characteristics are excellent for the study of gestations under conditions of hypoxia.

## INDICE

|  | Página |
|--|--------|
| I.- Introducción.....  | 1      |
| II.- Revisión Bibliográfica  |        |
| a) Clasificación Morfológica.....  | 3      |
| b) Origen Vascular.....  | 5      |
| c) Relación Feto-Materna.....  | 5      |
| d) Histología.....   | 5      |
| III.- Objetivos  |        |
| Objetivo General.....  | 12     |
| Objetivos Específicos.....   | 12     |
| IV.- Materiales y Métodos  |        |
| a) Obtención de la Muestra.....  | 13     |
| b) Procesamiento de la Muestra.....  | 13     |
| c) Protocolo de Purificación Simultanea de las Membranas Apicales y Basales de Trofoblasto Equino..... | 13     |
| - Protocolo doble de obtención de membranas por Cortado (I) y Protocolo por Raspado (II) .....         | 16     |
| d) Determinación de Proteína y Marcadores específicos.....   | 17     |
| - Determinación de Proteína.....   | 17     |
| - Fosfatasa Alcalina.....  | 17     |
| - Receptores $\beta$ -Adrenérgicos.....  | 17     |
| V.Resultados.....  | 18     |
| VI. Discusión .....  | 31     |
| Conclusiones.....  | 33     |
| Bibliografía   |        |

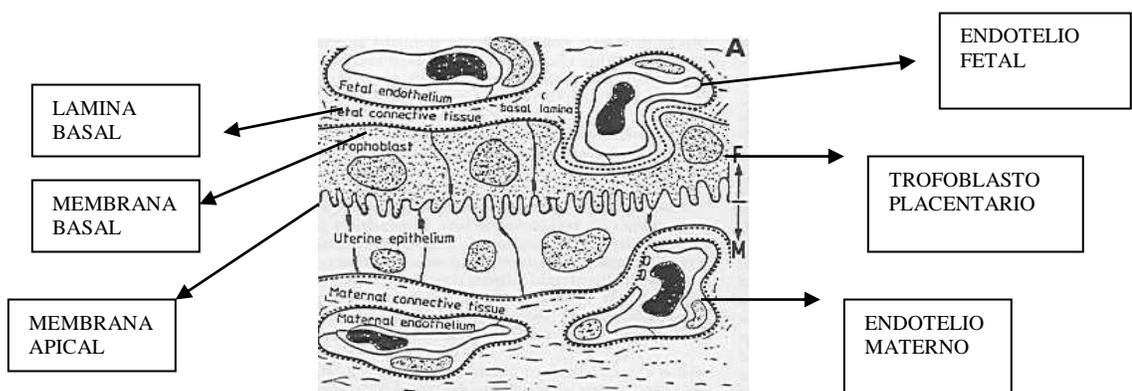
## INTRODUCCION.

La placenta corioalantoidea cumple una función fisiológica básica que es el intercambio entre la sangre materna y fetal. La placenta contiene diversos elementos tisulares, pero la sangre circulante y el trofoblasto son funcionalmente los más importantes desde el punto de vista del intercambio.

El transporte a través de la placenta es de vital importancia en el desarrollo y crecimiento del feto. El trofoblasto, que separa la sangre materna y fetal, se constituye en la principal barrera al transporte, ya que todos los solutos deben pasar a través de las membranas que lo delimitan.

El transporte a través de membranas se realiza por diferentes mecanismos, que incluyen la difusión simple de moléculas a través de la bicapa lipídica y el transporte de solutos polares por medio de proteínas de membrana. Transportadores y canales iónicos son los responsables de este último mecanismo de transporte. Los canales iónicos, en los epitelios en general y en la placenta en particular, participan en la regulación del volumen celular, en la generación del potencial de membrana y en el transporte de nutrientes, entre otras funciones.

El trofoblasto placentario constituye, desde el punto de vista morfológico y funcional, un epitelio polarizado, por lo cual la distribución de las proteínas de superficie es asimétrica, estableciendo dominios característicos como son la membrana apical (cara materna) y la membrana basal (cara fetal).



**Fig. 1 Barrera placentaria en el trofoblasto equino.**

En la placenta humana el trofoblasto es un sincicio, esto último implica que, al no haber rutas paracelulares, todos los solutos (agua, nutrientes tales como los aminoácidos,

electrolitos, etc.) deben pasar directamente a través de las membranas del trofoblasto, el cual constituye la principal barrera al transporte materno-fetal.

Los mecanismos generales de transporte han sido extensamente estudiados en membranas aisladas de placenta, ya sea tanto del lado materno (membranas apicales), como de la cara fetal (membranas basales). Además, existen numerosos estudios de flujo acerca de los mecanismos de transporte de metabolitos, tales como aminoácidos y azúcares, que han sido ampliamente caracterizados en el tejido trofoblástico.

La característica sincicial, descrita anteriormente, dificulta los estudios directos de canales iónicos por técnicas electrofisiológicas como el “patch clamp”. Por esto ha sido necesario implementar la reconstitución de los canales iónicos en una matriz lipídica artificial, para lo cual se deben obtener membranas apicales y basales de trofoblasto, altamente enriquecidas y purificadas.

La importancia de obtener información sobre los mecanismos de transporte transplacentario en embarazos humanos, desarrollados bajo condiciones fisiológicas extremas, así como en patologías del tipo de la preeclampsia, que suponen condiciones de hipoxia fetal, ha llevado a la búsqueda de un modelo animal a partir del cual realizar un estudio del transporte transplacentario en gestaciones bajo tales condiciones. Al respecto, la llama y otros camélidos constituyen un importante modelo de estudio ya que su hábitat natural los expone a bajas tensiones de oxígeno, pese a lo cual desarrollan gestaciones normales.

Dada la escasa accesibilidad de placentas de estos animales, una etapa intermedia consiste en el aislamiento y purificación de membranas trofoblásticas de equinos, los cuales poseen un tipo de placentación similar a la placenta de llama.

En la presente Memoria de Título se desarrolló un protocolo de purificación de membranas placentarias de tipo epiteliochorial, en una especie que, por sus características morfológicas e histológicas, representa un antecedente importante para la posterior aplicación de este método en la obtención de membranas placentarias de otras especies animales de interés.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

La placenta, junto con la sangre, es el único tejido animal de fácil acceso. Además de transportar nutrientes, gases y productos metabólicos hacia y desde el feto, sintetiza y libera proteínas, péptidos y esteroides. Posee también receptores opiáceos, adrenérgicos y componentes del sistema colinérgico.

Los mamíferos presentan tipos estructuralmente diferentes de placentas, las que varían de acuerdo a su morfología (según la distribución de las vellosidades coriales); origen vascular; relación feto maternal y en su histología, en función del grado de unión que se establece entre las vellosidades coriales y la mucosa uterina.

### **A) Clasificación Morfológica**

Las variaciones estructurales de la placenta son diversas. Aunque no siempre resulta exacta una clasificación morfológica, se describen a continuación algunos criterios en los que se basa tal clasificación.

La necesidad de proporcionar una amplia área feto-materna de intercambio determina la estructura a nivel macro y microscópico. La parte del corion, con el correspondiente aumento del área, se denomina corion frondoso y la parte lisa, cuando existe, corion liso.

a) Forma: En los animales domésticos se reconocen microscópicamente tres tipos de corion frondoso y su equivalente uterino: placenta difusa, placenta cotiledonaria, placenta zonal, y una cuarta no presente en animales domésticos que es la discoidal (Dieter, 1993).

La placenta de los equinos y camélidos sudamericanos es morfológicamente difusa, donde la mayor parte del saco coriónico forma el corion frondoso unido al epitelio endometrial.

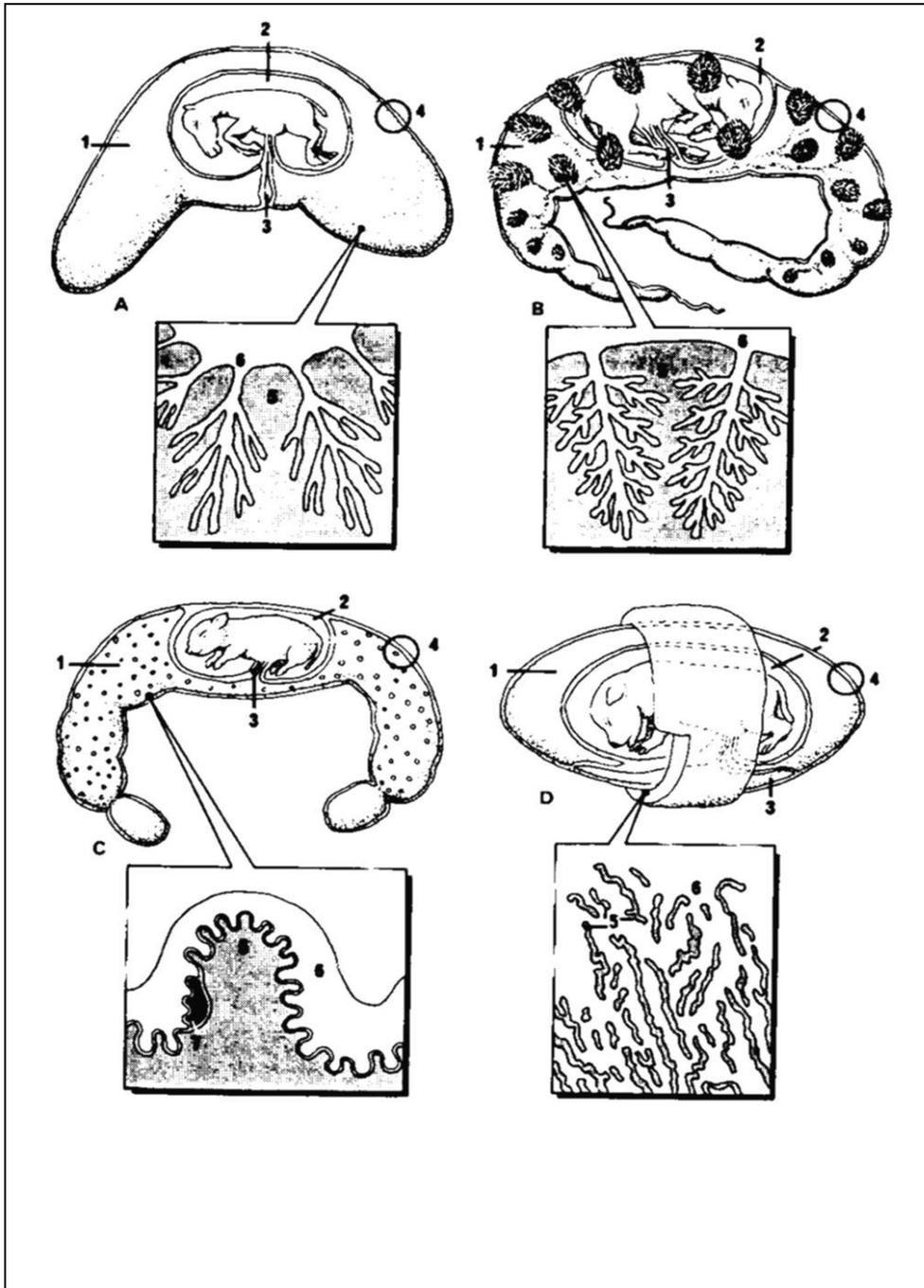


Fig.2: Diagramas esquemáticos del feto con las membranas fetales que muestra las diferencias de la forma placentaria entre las especies. También se indican detalles de la estructura interna. Yegua con placenta vellosa difusa (A); rumiantes, vaca con placenta vellosa cotelidonaria (B); cerda con placenta plegada difusa provista de areola visible macroscópicamente (C); carnívoros, perra con placenta laberíntica zonaria (D); Cavidad alantoica (1); cavidad amniótica (2); vesícula vitelina (3); alantocorion (4); en los detalles, el lado materno es gris (5); el lado fetal es blanco (6).

b) Estructura interna: El aumento de la capacidad para el intercambio feto-materno mediante una mayor área superficial, se efectúa por tres vías, dando lugar a tipos de

placentación como son la plegada, vellosa y laberíntica. La placenta de los equinos y camélidos sudamericanos es vellosa, provista de vellosidades que participan en la unión entre el corion fetal y la pared uterina, donde el componente fetal forma arborizaciones corion vellosa con núcleos vasculares mesenquimales que se encajan en las correspondientes criptas (Dieter, 1993)

### **B) Origen Vascular**

En los animales domésticos existen dos tipos fundamentales de placentación, la de tipo vitelina y el tipo alantoideo. Esta última, es la que se estudiará en la presente investigación.

Cuando el alantoides se fusiona con el corion se forma el alantocorion, resultando la placenta corioalantoidea que se observa en la yegua. Este órgano es más eficaz para gobernar los intercambios fisiológicos entre la madre y el feto (Dieter, 1993).

### **C) Relación Feto-Maternal**

El grado en que las membranas fetales se unen al endometrio determina la cantidad de tejido uterino que se pierde durante el parto. De acuerdo a esto se reconocen dos tipos diferentes de placentación alantoidea, la no decidual y la decidual (Dieter et al., 1993). En el equino y camélidos sudamericanos, los componentes fetales se entrelazan con el tejido uterino relativamente intacto, del cual se pueden separar sin mucha dificultad constituyendo una placenta de contacto (no decidual), sin invasión de la mucosa uterina (Allen y Stewart 2001).

### **D) Histología**

Cualquiera que sea el tipo de placentación, el trofoblasto está siempre presente en la barrera placentaria. El componente fetal de la placenta corioalantoidea está formado por tejido coriónico vascularizado por vasos alantoideos, que consiste en tres capas de tejido: endotelio, mesénquima y trofoblasto. El equivalente materno está formado básicamente por tres capas correspondientes en orden inverso: epitelio superficial uterino, tejido conjuntivo y endotelio. Cuando se interponen entre la corriente sanguínea fetal y materna, estas capas forman la barrera placentaria que es la asociación de una barrera altamente selectiva y una vía de transporte del intercambio feto-materno.

Se puede señalar que en la membrana placentaria del feto, el número de capas de tejido del componente materno varía con la especie. Por tanto, la placenta se clasifica según el número de capas del tejido uterino en: **epiteliocorial** (placenta *epitheliochorialis*) donde persisten las tres capas, la **endoteliocorial** y la **hemocorial**. (Dieter, 1993)

Microscópicamente la yegua se ajusta a la placenta epiteliocorial.

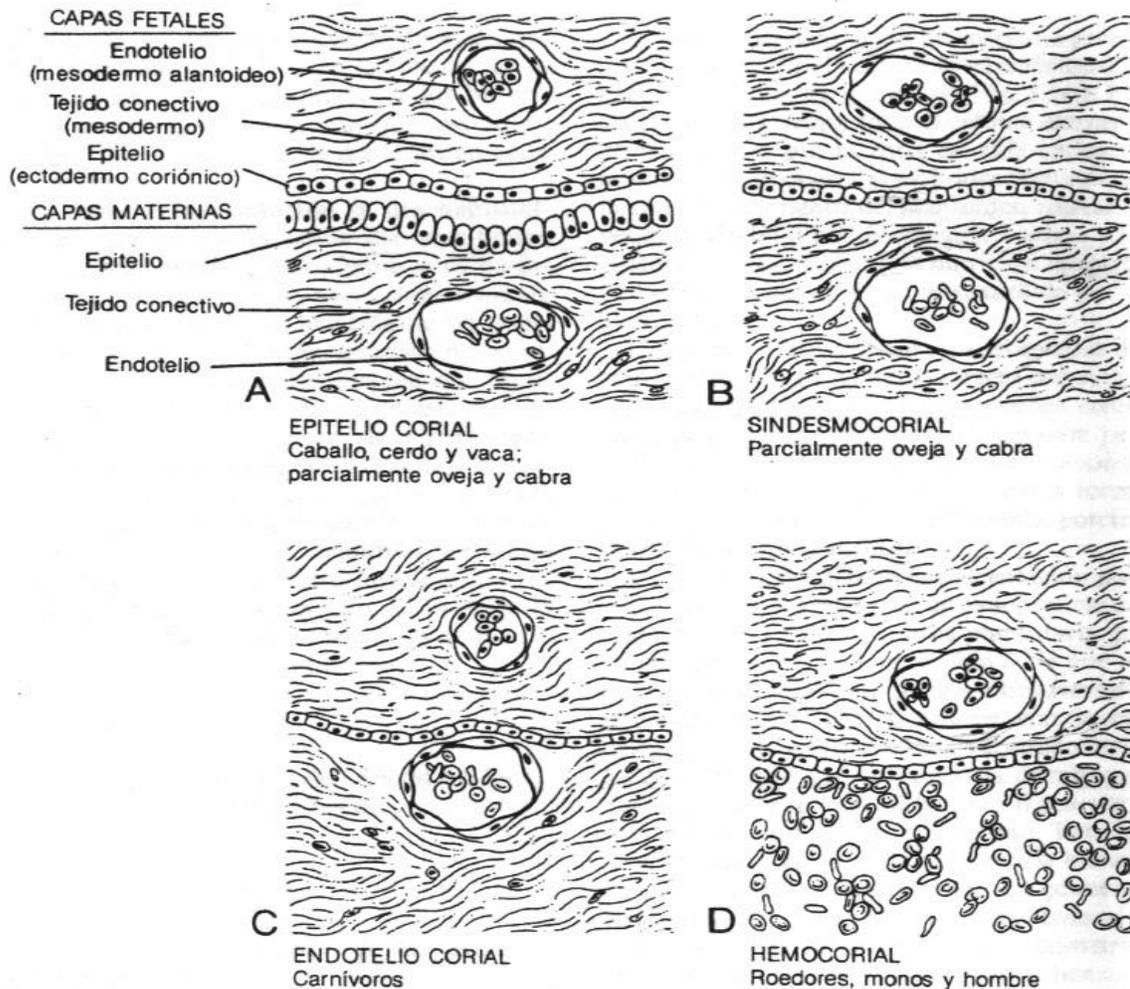


Fig. 3: Clasificación de las placentas corioalantoideas según el número de capas celulares maternas que posean (Drew y Alexander de Lahunta 1990).

En resumen, la placenta corioalantoidea de la yegua es difusa, adecidua o no decidua, vellosa y epiteliocorial.

En relación al tiempo de gestación de la yegua (*Equus caballus*), se puede señalar que es de aproximadamente 335 a 345 días. Además, es monoteca, lo que quiere decir, que tiene una sola cría por gestación; la gemelaridad ocurre en menos del uno por ciento de las gestaciones. En caso de gestación gemelar, la placenta de cada gemelo es limitada por el crecimiento de la del otro y la muerte en útero de uno o de ambos es habitual (Drew y Alexander de Lahunta, 1990).

Una característica particular de los equinos es que carecen de una estructura caruncular/ cotiledonaria como la que se encuentra en rumiantes. En su lugar, poseen un sistema de papilaciones plegadas y densas que forman grupos o acúmulos sobre la superficie del corion, denominados microcotiledones. La distribución de estos microcotiledones es asimétrica, encontrándose más desarrollados en las zonas cercanas al cordón umbilical (Drew y Alexander de Lahunta, 1990).

La estructura microscópica de la placenta coriolantoidea revela la superficie coriónica que se compone de millares de estructuras poligonales de 1-2 milímetros de diámetro. Estos microcotiledones son la unidad fundamental de la interfaz materno-fetal en la placenta equina. Los microcotiledones consisten en un racimo altamente vascularizado de vellosidades coriónicas, que se extienden en invaginaciones del endometrio.

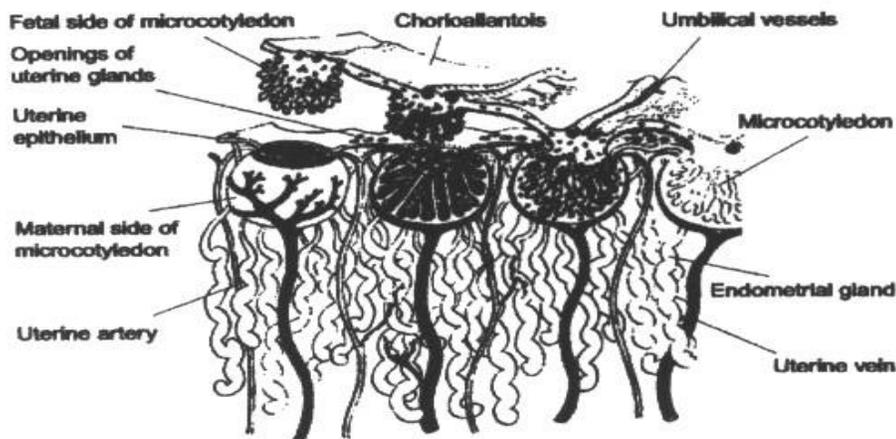


Fig. 4: Representación esquemática de tres microcotiledones; el extremo izquierdo muestra una vellosidad coriónica sacada del endometrio, mientras que en el extremo derecho está intacta. Las áreas microcotiledonarias de la placenta permiten la transferencia eficiente de moléculas entre la sangre fetal y materna.

La aposición del corion al epitelio endometrial es un proceso lento; comienza sobre la 7ª a 10ª semana y no se completa hasta la 14ª semana. El área de contacto placentario se ve aumentada por la existencia de penachos de vellosidades ramificadas que forman grupos o acúmulos sobre la superficie del corion y se alojan en pequeñas depresiones del endometrio llamadas “criptas” (ocultos). Las microvellosidades se desarrollan tanto en las células epiteliales coriónicas como en las endometriales y se intercalan entre sí en íntimo contacto en la unión epiteliocorial.

Los antecedentes bibliográficos encontrados en equinos no son concluyentes respecto del tipo de epitelio que constituye el trofoblasto placentario. Algunos autores, tales como Samuel et al., (1975) y Enders y Liu (1991) señalan que este epitelio está formado por una única capa de células cuboidales. En tanto, otros autores (Bosco et al., 1995) sostienen que se trata de sinciotrofoblasto, observándose como una característica particular de este tipo de placenta que los capilares fetales se encuentran a escasa distancia de la capa epitelial sincicial.

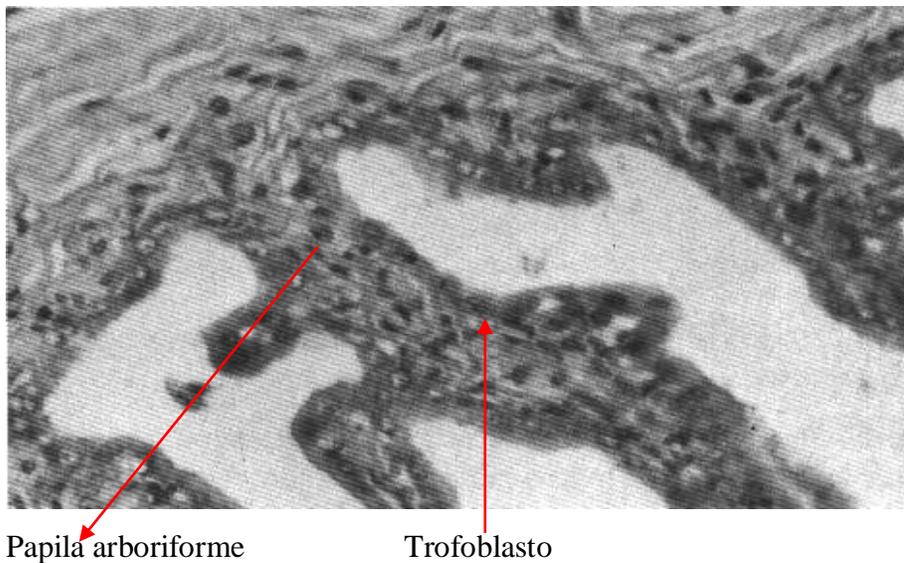
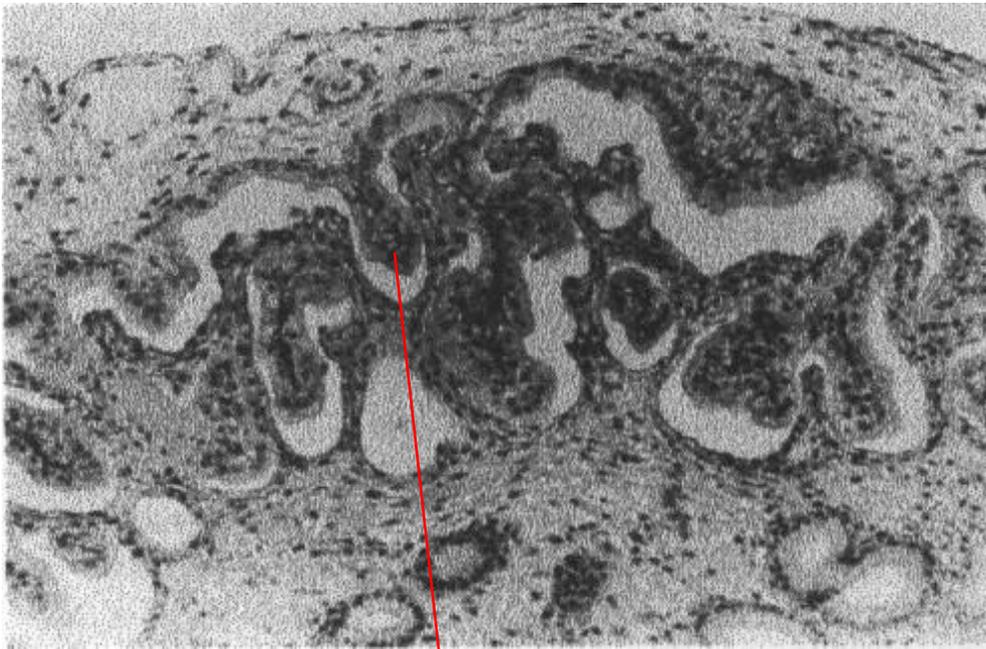


Fig. 5. En la placenta de yegua, el corion se dispone formando papilas arboriformes cubiertas por sinciotrofoblasto. X 400 (Bosco et al., 1995).

La interfase materno-fetal en la placenta de los equinos es una intrincada interdigitación de papilas, cubiertas por un epitelio, las que se sumergen en foveolas endometriales. Estas papilas son arboriformes, es decir que grandes papilas secundarias emergen de las primarias y se asocian o superponen a ondulaciones del epitelio uterino (Bosco et al., 1995).



Interfase Materno-Fetal

Fig. 6. Sección de la interfase alantocorion-endometrio en una yegua preñada de 60 días de gestación. La fijación reducida muestra las vellosidades ramificadas del alantocorion con la presencia de una superficie endometrial más desarrollada. Además se observa un área de trofoblasto pseudoestratificado. X 100 (Allen y Stewart, 2001).

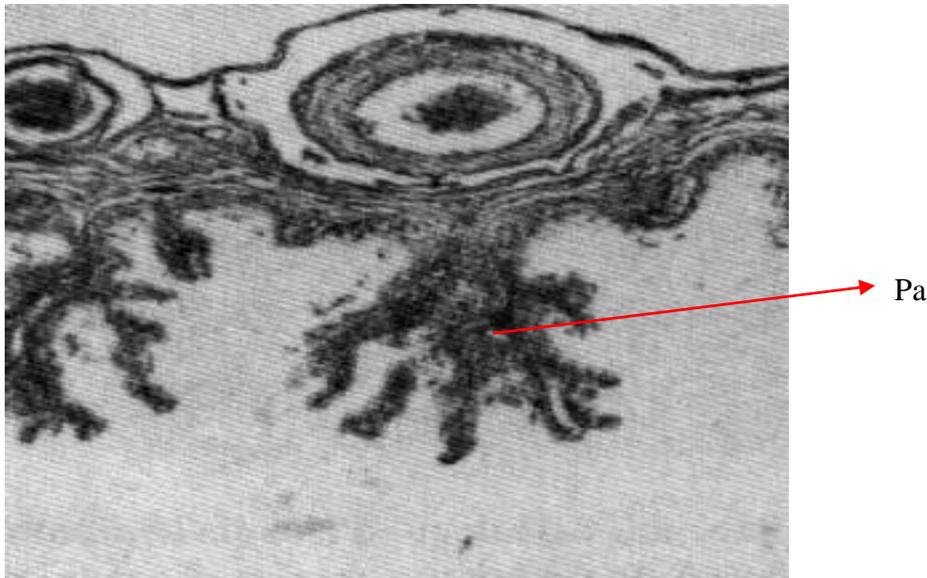


Fig. 7. Placenta epiteliorial de yegua. Papilas arboriformes (Pa) del corion (Papila Arboriforme: Grandes papilas secundarias emergiendo de las primarias, con tejido conectivo, vasos sanguíneos y trofoblasto que las cubre. X 100 (Bosco et al., 1995).

Aunque la barrera placentaria mantiene una estructura epiteliorial a lo largo de la preñez, un adelgazamiento del epitelio uterino y una progresiva indentación del trofoblasto por los capilares fetales, acorta la longitud (ancho) de la vía de difusión y reduce la cantidad de tejido placentario entre los torrentes sanguíneos fetales y maternos (Samuel et al., 1976).

Estas características morfológicas determinan una distancia intercapilar o distancia de barrera muy reducida en placentas epitelioriales tanto de equinos como de camélidos. Esto podría contribuir a la optimización de los mecanismos de transporte transplacentario entre la madre y el feto en estas especies.

En placentas humanas se han realizado extensos estudios sobre los mecanismos de transporte transplacentario a través de transportadores y canales iónicos. Entre estos últimos, se puede mencionar el Maxi canal de cloruro de membrana apical (Riquelme et al., 1995) regulado por ácido araquidónico y otros ácidos grasos insaturados y modulado por hormonas esteroidales como el estradiol (Henríquez y Riquelme, 2002). Esta vía conductiva se ha relacionado con los mecanismos de transporte de aminoácidos a través de la placenta, lo cual representa un antecedente que vincula la función de los canales iónicos con el transporte de nutrientes.

En base a los antecedentes expuestos previamente, hemos desarrollado un protocolo de purificación de membranas apicales y basales de trofoblasto equino, a partir del método de purificación de placentas humanas implementado por Riquelme y Jiménez (Jiménez et al., 2004). Éste se basa en la centrifugación diferencial para separar componentes intracelulares, seguido de un tratamiento con  $Mg^{+2}$  para precipitar las membranas ricas en ácido siálico o con carga negativa y separar membrana basal de la apical, realizando posteriormente una purificación de las fracciones de membrana por gradientes de sacarosa.

La obtención de vesículas de membrana plasmática, tanto de la cara apical como basal de la placenta, ha probado ser un modelo de gran utilidad para el estudio de los mecanismos de transporte de aminoácidos, de sitios de receptores a hormonas y de los mecanismos de transporte en epitelios en general.

La determinación de la concentración de proteínas de las fracciones obtenidas y el seguimiento a través de marcadores enzimáticos específicos, tanto de membrana apical como basal, permite una caracterización amplia del rendimiento y pureza del método de aislamiento.

La fosfatasa alcalina, al igual que en otros epitelios, se localiza selectivamente en la membrana apical del trofoblasto humano, utilizándose como indicador de la pureza de ésta (Jones y Fox, 1975). A este respecto, estudios de inmunohistoquímica de trofoblasto equino evidencian una isoforma placentaria de fosfatasa alcalina ubicada en la membrana apical (Oriol et al., 1991).

En cuanto a la membrana basal, la presencia de proteína G asociada a receptores  $\beta$ -adrenérgicos supone la existencia de enzimas efectoras del tipo de la adenilatoclasa, cuya actividad ha sido utilizada como marcador de membrana basal de epitelios polarizados (Matsubara et al, 1987). Antecedentes de placenta de oveja y de otros mamíferos demuestran la unión de ligandos específicos a receptores  $\beta$ -adrenérgicos, por lo que se utilizó este marcador para evaluar la pureza de las membranas basales (Padbury et al., 1981).

## **OBJETIVO GENERAL:**

Desarrollar e implementar un protocolo de aislamiento de membranas apicales y basales de trofoblasto equino altamente purificadas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar un protocolo de purificación de fracciones microsomales de membranas apicales (fma) y basales (fmb) de trofoblasto equino.
2. Implementar gradientes de sacarosa, que aumenten la pureza de las membranas placentarias apicales (PA) y basales (PB) de trofoblasto equino.
3. Evaluar la calidad de las membranas obtenidas a través de marcadores específicos de membrana apical (fosfatasa alcalina) y basal (receptores  $\beta$ -adrenérgicos).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Inicialmente se utilizó el protocolo de purificación de membranas de sinciciotrofoblasto humano ya existente, para implementar el protocolo de placenta de equino, con las modificaciones pertinentes para este tipo de tejido.

### **A. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.**

Las muestras se obtuvieron de los Haras Fina Sangre de Carrera “El Sheik” y “Santa Eladia”, ambos de la Región Metropolitana. Se trabajó con placentas normales de término, de aproximadamente de 340 días de gestación, procedentes de partos vaginales. En todos los casos, el tejido presentaba características macroscópicas normales, con microcotiledones bien desarrollados. Las placentas fueron transportadas al laboratorio refrigeradas y procesadas dentro de los 90 minutos siguientes al parto, realizando todo el procedimiento posterior a 4°C.

### **B. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.**

Se utilizó tanto muestras de tejido frescas, como congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El tejido se obtuvo de las zonas de mayor desarrollo de vellosidades y microcotiledones que se encuentran cercanas al cordón umbilical.

### **C. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE MEMBRANAS APICALES Y BASALES DE TROFOBLASTO EQUINO.**

El protocolo que se describe a continuación es el mismo para el tejido placentario, tanto cortado (I) como raspado (II). Se utilizaron 100 y 25grs de tejido placentario respectivamente. En el caso del segundo tipo (raspado II), éste se lavó y molió con solución de NaCl al 0,9 % para eliminar restos de sangre. A continuación se resuspendió el tejido (caso I, 100grs muestra inicial de tejido) en 200 ml de solución tampón de trabajo 10 mM Tris Hepes pH 7.4, que contiene 250 mM de sacarosa y una mezcla de inhibidores de proteasas (Pepstatina 0,7  $\mu\text{M}$ , Leupeptina 1,1  $\mu\text{M}$ , Antipaina 0,8  $\mu\text{M}$ , Aprotinina 80 nM), y se homogenizó en juguera 3 veces por 30 segundos (Homogeneizado **H**). A continuación se centrifugó a 5860 x gr por 15 min. para eliminar restos de sangre y tejido conectivo y se

guardó el sobrenadante (S1). El sedimento se resuspendió en 100 ml de tampón de trabajo, repitiendo la centrifugación anterior guardando el sobrenadante (S2). Cuando se empezó con los 25 g del tejido placentario raspado (II) se realizaron algunas modificaciones en los volúmenes de las soluciones, proporcional al peso de la muestra. En este caso, para el protocolo realizado por raspado (II) se utilizaron 25 g de tejido placentario, que se lavó con solución de NaCl al 0,9 % para eliminar restos de sangre. A continuación se resuspendió el tejido en 60 ml de solución tampón de trabajo 10 mM Tris Hepes pH 7,4 que contiene 250 mM de sacarosa y una mezcla de inhibidores de proteasas (Pepstatina 0,7  $\mu$ M, Leupeptina 1,1  $\mu$ M, Antipaina 0,8  $\mu$ M, Aprotinina 80 nM), y se homogeneizó en juguera 3 veces por 30 segundos (H). Luego se centrifugó en rotor SS-34 a 6830 x g por 15 min para eliminar restos de sangre y tejido conectivo y se guardó el sobrenadante (S1). El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón de trabajo y se centrifugó en rotor SS-34 a 8300 x g por 15 min, guardando el sobrenadante (S2).

Ambos sobrenadantes (S1 y S2) se juntaron y centrifugaron a 124000 x g por 30 min, para eliminar citosol y organelas intracelulares. El sedimento obtenido, rico en membranas celulares, se resuspendió en solución de trabajo y se homogeneizó en vidrio teflón. El homogeneizado obtenido se sometió a un tratamiento con 10 mM de  $MgCl_2$ , lo que precipita en forma selectiva las membranas ricas en ácido siálico o con carga negativa, centrifugando luego a 4500 x g por 10 min para separar membranas basales de apicales.

El sobrenadante, rico en membrana apical, se centrifugó a 12100 x g por 70 min. El precipitado de esta centrifugación, que corresponde a la fracción microsomal apical (fma), se resuspendió en solución tampón de trabajo 10 mM Tris Hepes pH 7,4 homogeneizando en vidrio teflón.

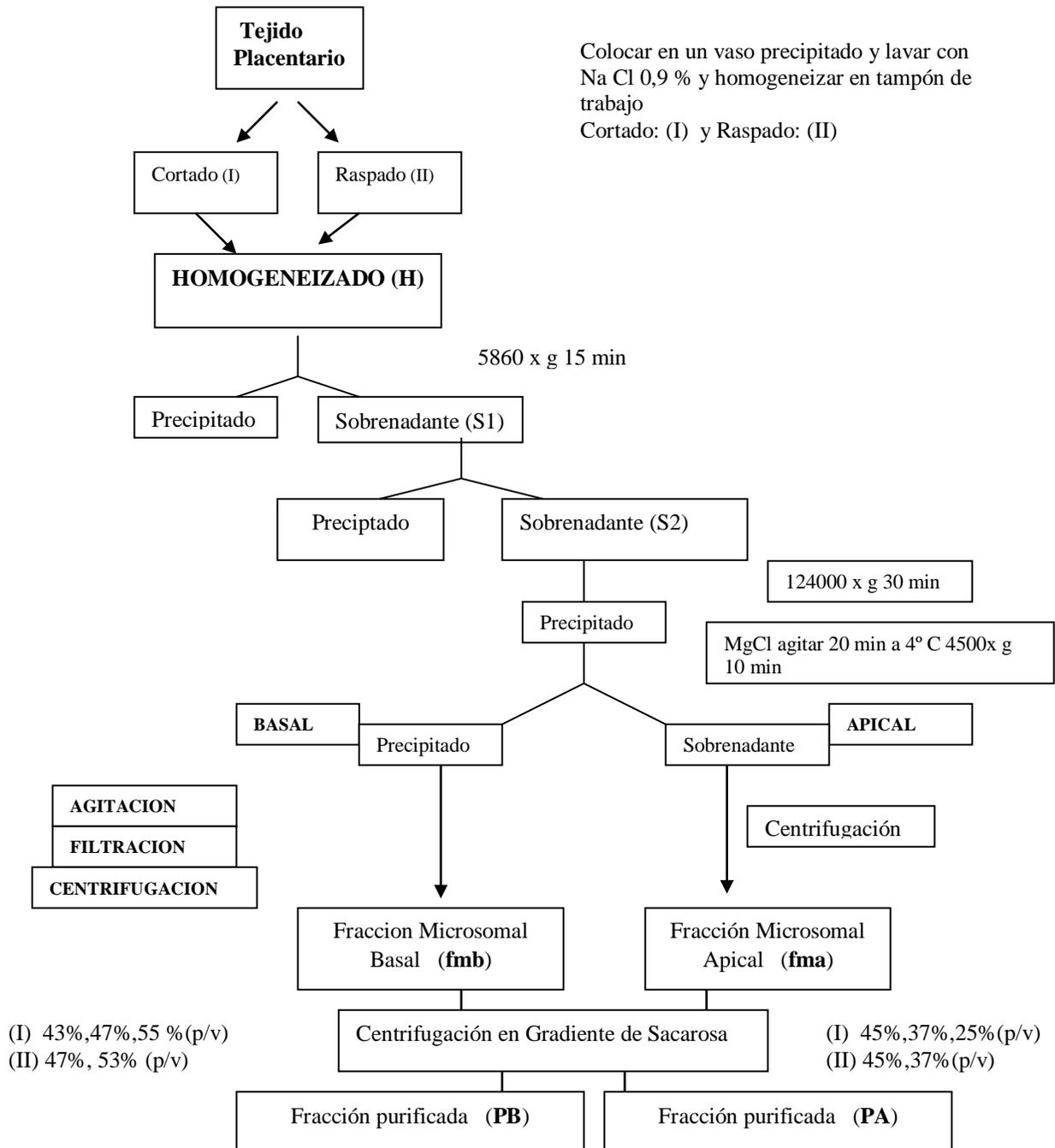
La fracción microsomal apical (fma) se purificó en gradiente discontinuo de sacarosa al 45, 37 y 25 % (p/v) en tampón Tris-maleato 20 mM, pH 7,4 y se centrifugó a 60000 x g. Las bandas obtenidas se recuperaron, diluyéndolas en cinco a diez volúmenes de solución tampón de lavado (Tris-Maleato 20 mM, pH 7.4) y se centrifugaron nuevamente a 110000 x g por 30 minutos. Este precipitado se homogeneizó en vidrio-teflón con solución tampón de almacenamiento (sacarosa 300 mM, 20 mM Tris Maleato pH 7,4) manteniendo las vesículas en  $N_2$  líquido hasta su utilización.

El precipitado resultante del tratamiento con  $Mg^{+2}$ , que contiene la fracción de membranas basales crudas, se resuspendió en solución tampón de trabajo y se agitó

enérgicamente durante 1 hora a fin de separar mecánicamente la membrana basal de la lámina basal subyacente, filtrándose a continuación por una malla de 100  $\mu\text{m}$ . El filtrado se centrifugó a 4350 x g por 10 min y este sobrenadante se centrifugó a 98500 x g por 45 min, resuspendiendo el precipitado en solución tampón de trabajo y homogeneizando en vidrio teflón, siendo esta última, la fracción microsomal basal (fmb). Dicha fracción (fmb) se purificó en gradientes de sacarosa al 43; 47 y 55 % (p/v) en tampón Tris Hepes 10 mM pH 7,4, centrifugando a 60000 x g. Las bandas obtenidas se recuperaron y se lavaron en volumen suficiente de solución tampón de lavado (Tris-Hepes 10 mM pH 7,4) en forma semejante a lo aplicado para membranas apicales, manteniendo las vesículas resultantes en  $\text{N}_2$  líquido hasta su utilización.

A fin de optimizar y estandarizar el protocolo de purificación de membranas de placenta de equino, se tomaron alícuotas de cada uno de los pasos del procedimiento y para establecer un seguimiento de marcadores específicos de membrana apical (fosfatasa alcalina) y basal (receptores  $\beta$ -adrenérgicos), que brindan información sobre la eficiencia del método de purificación.

**ESQUEMA 1**  
**PROTOCOLO DE OBTENCIÓN SIMULTÁNEA DE MEMBRANAS APICALES Y**  
**BASALES.**



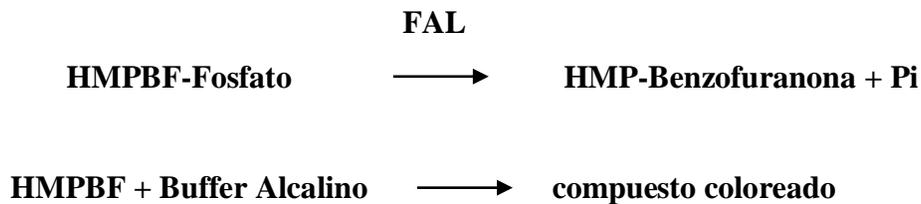
ESQUEMA 1. Protocolo realizado para la obtención de las distintas fracciones microsomales y purificadas de trofoblasto equino, la diferencia entre I y II es solamente el tratamiento inicial del tejido (I: cortado; II raspado).

## **D. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS Y MARCADORES ESPECÍFICOS**

1. **Determinación de proteínas:** La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico (SIGMA), el cual se basa en la reacción del cobre (II) con los enlaces peptídicos de las proteínas en medio ácido, para dar un compuesto coloreado que se mide a 560 nm (Spectronic Educator).

Se utilizó como patrón una solución de BSA (Albúmina Sérica Bovina) de concentración 2 mg/ml (Smith et al., 1985).

2. **Fosfatasa Alcalina (FAL):** Utilizada como marcador de membrana apical de diversos epitelios, su actividad se determinó por un método comercial (VALTEK), en el que la fosfatasa alcalina de la muestra actúa sobre un sustrato sintético, hidrometilbenzofurano-fosfato (HMBPF) hidrolizando el grupo fosfato y dando una benzofuranona, que en medio alcalino, forma un cromógeno azul, cuya absorbancia a 590 nm es proporcional a la actividad enzimática de la muestra (Tietz, 1976).



3. **Receptores  $\beta$ -Adrenérgicos:** Para esta determinación se utilizó dihidroalprenolol tritiado, un agonista de receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  con una actividad específica de 40 Ci/mmol y propanolol como desplazante no marcado, ligando específico de los mismos receptores.

El ensayo consistió en ofrecer a las muestras cantidad suficiente de estos ligandos en solución tampón de 50 mM de Tris-Hepes pH 7,4, incubando 30 min a 25°C con agitación. Al término de este período, las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio, lavando dos veces con buffer Tris-Hepes 50 Mm pH 7,4. Los filtros se colocaron en 5 ml de líquido de centelleo y se leyeron en contador de centelleo (TRICARB). En todos los casos las muestras se procesaron por triplicado. Estas se dejaron en oscuridad toda la noche y se leyeron en un contador de centelleo líquido Packard 1600 TR (Kelley et al, 1983). Esta fue la metodología para cumplir el objetivo 3.

## **PRESENTACIÓN DE LOS DATOS**

Se calculó el promedio de los datos con su correspondiente desviación estándar, para un total de ocho placentas.

## **RESULTADOS**

### **Protocolo de purificación simultáneo de Membranas Apicales y Basales**

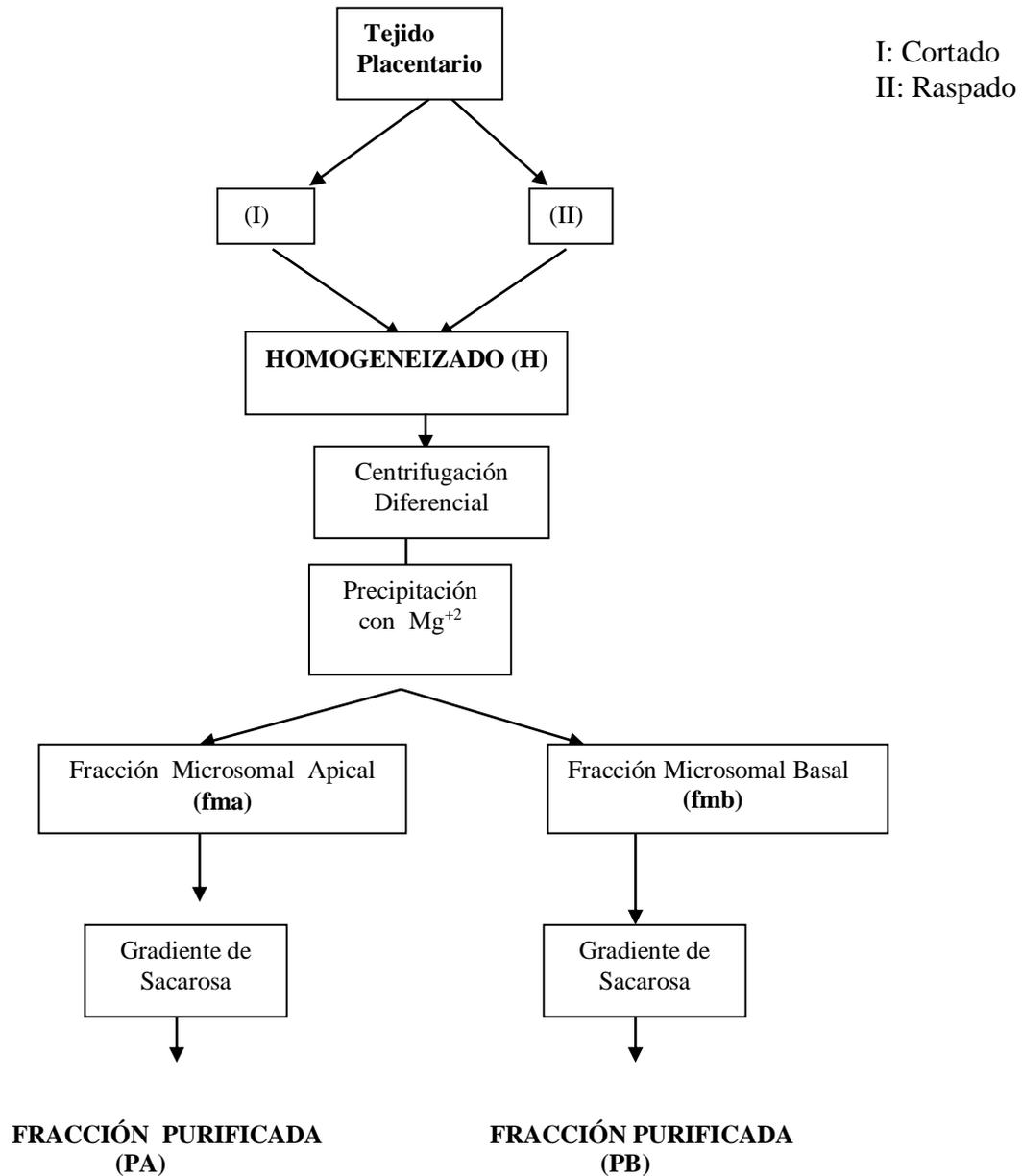
El trofoblasto placentario constituye, desde el punto de vista morfológico y funcional, un epitelio polarizado, por lo que la distribución de las proteínas de superficie es asimétrica, estableciendo dominios característicos como son la membrana apical (cara materna) y la membrana basal (cara fetal).

En base a lo anterior se desarrolló un protocolo de purificación de membranas apicales y basales de trofoblasto equino.

Para determinar las condiciones más adecuadas de purificación, se planteó la utilización de un protocolo que inicialmente fue aplicado en el aislamiento de sinciotrofoblasto placentario humano. Éste se basa en la centrifugación diferencial para separar componentes intracelulares, seguido de un tratamiento con  $Mg^{2+}$  para precipitar las membranas ricas en ácido siálico o con carga negativa y separar membrana basal de la apical (Kelley et al, 1983) realizando posteriormente una purificación de las fracciones de membrana por gradientes de sacarosa.

Se aplicaron dos procedimientos en el procesamiento inicial del tejido placentario: (I) cortado y (II) raspado de la membrana corioalantoidea realizándose modificaciones en la obtención de la muestra, centrifugaciones y gradientes de sacarosa. Todas las muestras fueron tomadas de las zonas de mayor desarrollo microcotiledonario, que son las cercanas al cordón umbilical.

## ESQUEMA 2



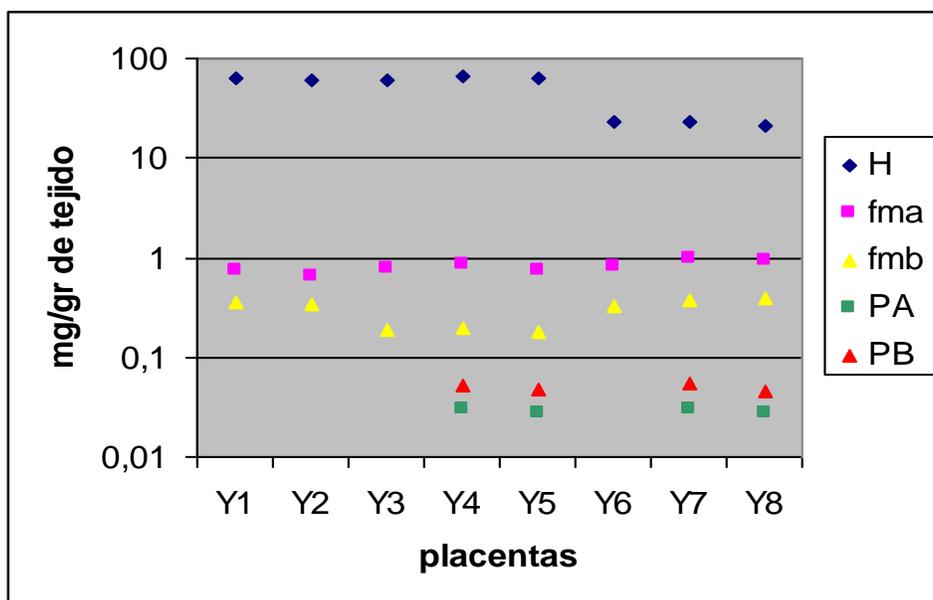
ESQUEMA 2. Protocolo realizado para la obtención de las distintas fracciones microsomales y purificadas de trofoblasto equino, la diferencia entre I y II es solamente el tratamiento inicial del tejido (I: cortado; II raspado).

### Rendimiento de las Preparaciones.

Para evaluar el rendimiento de los protocolos se midió la concentración de proteínas. Los respectivos resultados se expresaron en mg/g de tejido de muestras obtenidas por corte (I) (n=5) y muestras obtenidas por raspado del mismo (II) (n=3). (Figura 8).

Estos datos corresponden a las proteínas totales (mg/g de tejido) calculados a través de  $(\text{mg/ml} \times \text{volumen de cada fracción}) / \text{g de tejido inicial}$ , para cada una de las ocho placentas procesadas, lo que representa a las proteínas totales en la muestra, las que al dividir las por la cantidad de tejido inicial con el que se realizó el protocolo se obtuvieron los mg/gr de tejido, y que este cálculo permitió estandarizar los valores para las diferentes muestras procesadas.

El rendimiento de proteínas en mg / gr de tejido (n=8) para ambos tipos de obtención de membranas (I y II) mostró diferencias en cada una de las fracciones analizadas. En relación a PA mostró un mayor rendimiento aparente para el procedimiento con el tipo de tejido raspado (II), pero PB evidenció un mayor rendimiento a través del procedimiento en el tipo cortado (I). Las fracciones microsomales mostraron mayores rendimientos en el tipo de tejido raspado II (Fig. 8).



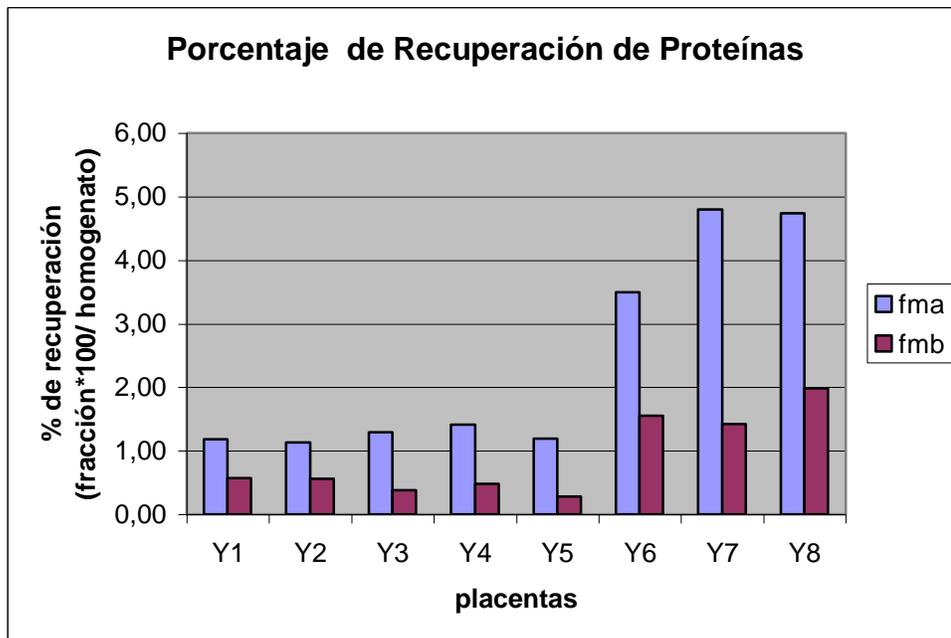
**Fig. 8.** Rendimiento de proteínas en mg/g de tejido (n=8) placentas. El protocolo de purificación fue obtenida por corte (I) de la placenta coriolantoidea yegua 1 (Y1) a la yegua 5 (Y5) y el II a través de raspado de la placenta corioalantoidea (Y6 a la Y8).

**H:**homogeneizado; **fma:** fracción microsomal apical; **fmb:** fracción microsomal basal; **PA:** membrana apical purificada.**PB:** membrana basal purificada.

Estos datos demuestran que tanto el corte de la muestra como el raspado (I y II) permiten la realización del protocolo con rendimientos en porcentaje de recuperación adecuados (Tabla 2).

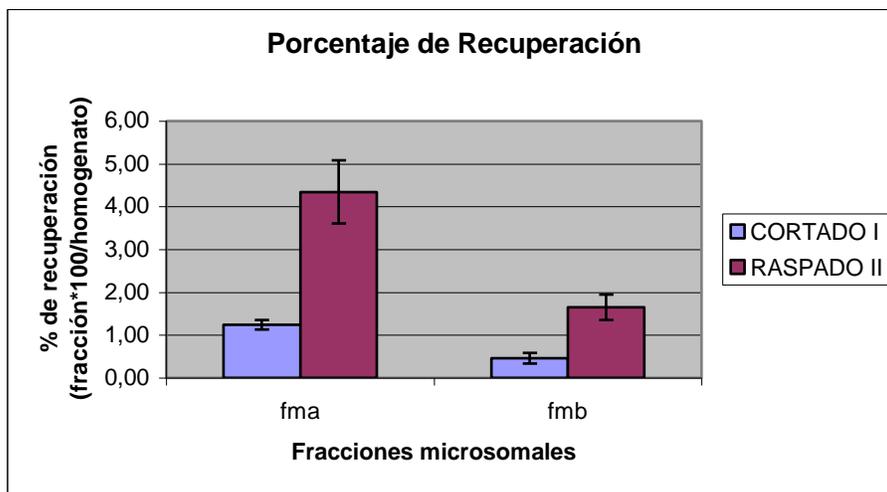
La realización del protocolo a partir de una muestra raspada, representa un mayor logro en términos de las fracciones microsomales apicales (fma) y basales (fmb), no siendo de igual forma en las fracciones puras (PA y PB) obtenidas posteriormente (tabla 3).

En lo que respecta a los porcentajes de recuperación de proteínas de las fracciones principales (fracciones microsomales apicales y basales), el protocolo aplicado en muestras cortadas (I) mostró en promedio un valor de  $1,22 \pm 0,10$  (n=5). En tanto el protocolo que se aplicó con la obtención de la muestra de la placenta corioalantoidea obtenida por raspado (II) mostró un mayor porcentaje de recuperación con un valor de  $4,34 \pm 0,73$  (n=3) para la fracción microsomal apical (fma) en promedio. En lo referente a las fracciones microsomales basales (fmb) los porcentajes de recuperación mostraron la misma tendencia que los de la fracción microsomal apical (Figura 9).



**Fig. 9:** Porcentaje de recuperación de proteínas de las fracciones microsomales (fma y fmb) del protocolo de purificación de membranas de trofoblasto equino. (I: cortado Y1 a Y5; II raspado Y6 a Y8).

En la figura anterior se observa el comportamiento de la totalidad de las ocho placentas con respecto al porcentaje de recuperación de proteínas de las diferentes fracciones microsomales tanto en protocolo aplicado en muestras cortadas (I) como raspadas (II) Éstas son la fracción microsomal apical (fma) y la fracción microsomal basal (fmb). Con respecto a las fracciones microsomales tanto apicales como basales, es claro el mayor porcentaje de recuperación promedio obtenido para las muestras procesadas a través del protocolo (II) en relación al (I) (Fig. 10).



**Fig. 10:** Gráfico resumen del porcentaje de recuperación de proteínas promedio de las diferentes fracciones mediante el protocolo de purificación de membranas de trofoblasto equino (I: cortado y II: raspado).

### **PURIFICACIÓN DE LAS FRACCIONES MICROSOMALES.**

A partir de la precipitación con  $Mg^{2+}$  los protocolos (I) y (II) involucraron el procesamiento en paralelo de ambas membranas.

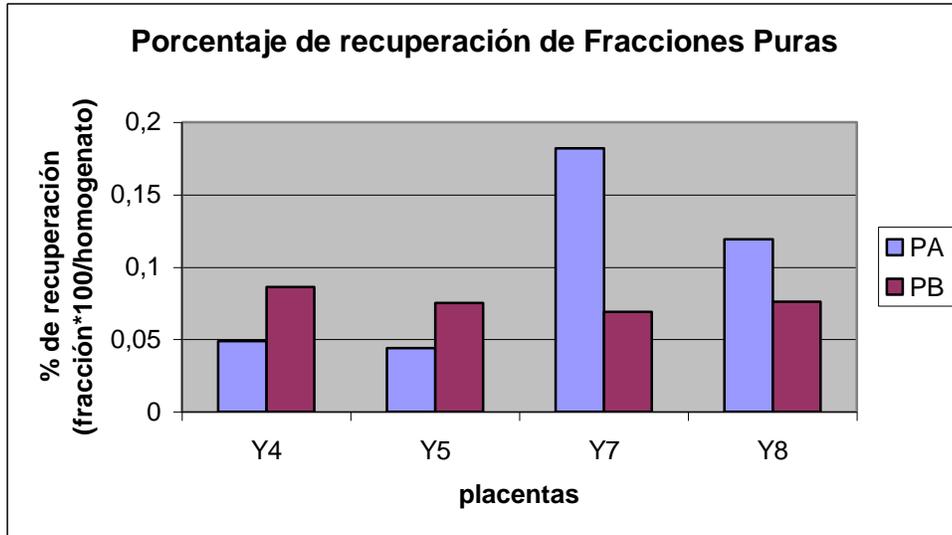
La fracción enriquecida en membranas apicales se purificó mediante un gradiente discontinuo de sacarosa, con soluciones al 45%, 37% y 25% (p/v) (n=2) en Tris Maleato 20 mM, centrifugando a 60000 x g por 4 horas, (Jiménez et al, 2004) al que se introdujo una modificación que consistió en eliminar uno de los gradientes discontinuos (25%) para optimizar la obtención de membranas apicales (n=2). Para estas muestras cortadas del gradiente se obtuvieron dos bandas: una entre 37% y 45% (PA) y otra entre 37% y 25%

(Po). Ambas bandas fueron recolectadas y alicuotadas para medir posteriormente su actividad enzimática. Con respecto a las muestras obtenidas por el protocolo (II) se obtuvieron dos bandas en el gradiente: una sobre los 37% (Po) y otra sobre los 45%, en la interfase (PA), ambas igualmente fueron recolectadas y alicuotadas para medir actividad enzimática.

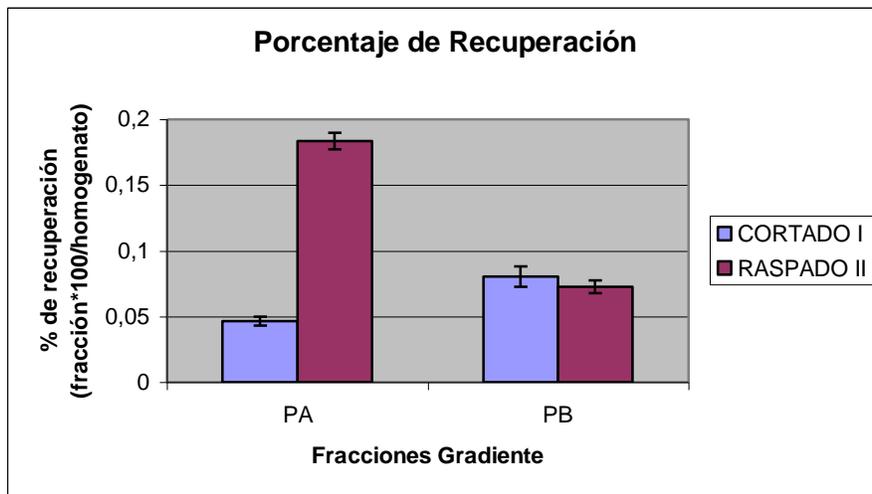
Con respecto a la fracción enriquecida en membranas basales, se purificó mediante un gradiente discontinuo de sacarosa, con soluciones al 43%, 47% y 55% p/v en Tris Hepes 10 mM, centrifugando a 60000 x g por 12 horas (n=2). Con las placentas ya mencionadas se obtuvieron 3 bandas en las correspondientes interfases, las que fueron recolectadas y alicuotadas para medir su actividad de marcadores enzimáticos. Con respecto a la muestra obtenida por raspado a partir del gradiente se obtuvieron dos bandas: una en los 47% (Bo) y otra en 53% (PB), realizando el mismo procedimiento señalado anteriormente (Tabla 1).

**TABLA 1.** Porcentaje de recuperación de proteínas en fracciones puras apicales (PA) y basales (PB) obtenidas por cortado (I) y raspado (II) del trofoblasto equino Y4 y Y5 (I); Y7 y Y8 (II).

|                             |      | <b>Porcentaje de recuperación de proteínas</b> |                      |
|-----------------------------|------|--|----------------------|
|                             |      | Cortado (I)                                    | Raspado(II)          |
| <b>Fracción Pura Apical</b> | (PA) | 0,046 ± 0,04<br>(n=2)                          | 0,184 ±0,01<br>(n=2) |
| <b>Fracción Pura Basal</b>  | (PB) | 0,080 ± 0,01<br>(n=2)                          | 0,072 ±0,01<br>(n=2) |



**Fig. 11.** Porcentaje de recuperación de proteínas de las fracciones puras del protocolo de purificación de membranas de trofoblasto equino.



**Fig. 12:** Porcentaje de recuperación de las fracciones puras del protocolo de purificación de membranas de trofoblasto equino.

En relación a los porcentajes de recuperación de las fracciones puras apicales (PA), los resultados obtenidos sugieren una diferencia aparente siendo mayor en el caso en que el tejido inicial fue obtenido por raspado (II) la que no se evidenció en las fracciones puras basales (PB).

Para establecer si existían diferencias en el procesamiento entre placentas frescas y congeladas, una muestra de placenta se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  y luego se procesó mediante el protocolo en muestras cortadas (I). Los datos obtenidos se observan en la (Tabla 2), de la

que se puede concluir que no existe una diferencia apreciable entre muestras frescas y congeladas en lo que respecta a recuperación de proteínas y actividad de fosfatasa alcalina.

**TABLA 2.** Cuadro comparativo de rendimiento de proteínas y actividad específica de fosfatasa alcalina de las diferentes fracciones del protocolo de purificación realizado con muestras frescas y congeladas de trofoblasto equino.(DEM:desviación estándar de la media)

|                                 | <b>Proteínas(mg/g tej)</b><br><b>Promedio±DEM</b> | <b>Fosfatasa Alcalina</b><br><b>(UI / mg prot)</b> |
|---------------------------------|---|--|
| <b>Placenta Fresca (n=4)</b>    |   |  |
| Homogeneizado (H)               | 62,3±1,8  | 20,1±1,6   |
| F microsomal A(fma)             | 0,7±0,06  | 80,1±14,9  |
| F microsomal B(fmb)             | 0,3±0,05  | 20,1±3,1   |
| Mb Apical pura(PA)              | 0,03  | 86,5   |
| Mb Basal pura(PB)               | 0,05  | 13,8   |
| <b>Placenta congelada (n=1)</b> |   |  |
| Homogeneizado (H)               | 62,8  | 20,7   |
| F microsomal A (fma)            | 0,7   | 64,5   |
| F microsomal B (fmb)            | 0,1   | 19,7   |
| Mb Apical pura (PA)             | 0,02  | 95,3   |
| Mb Basal pura (PB)              | 0,04  | 16,0   |

Con la aplicación de este procedimiento se demostró la posibilidad de realizar el protocolo de purificación con rendimientos y actividades satisfactorias, no sólo de muestras en fresco, sino que también a partir de muestras congeladas, dentro de un periodo que no exceda las 8 horas desde el alumbramiento del animal, mostrando valores comparativos entre las placentas frescas y congeladas.

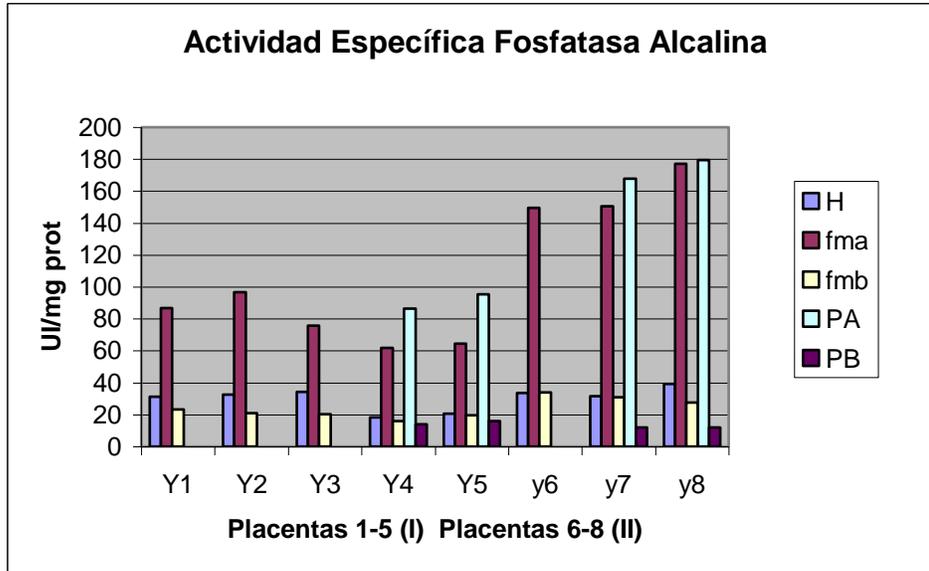
### **Marcadores Enzimáticos Membrana Apical**

Dentro de los ensayos realizados la determinación del marcador apical fosfatasa alcalina, y su actividad en las diferentes fracciones de las muestras obtenidas mediante cortado o raspado I y II, nos permite una visión de las membranas obtenidas y su grado de pureza.

**TABLA 3.** Actividad específica de fosfatasa alcalina de las diferentes fracciones del protocolo de purificación en muestras (I) y (II) de trofoblasto equino.

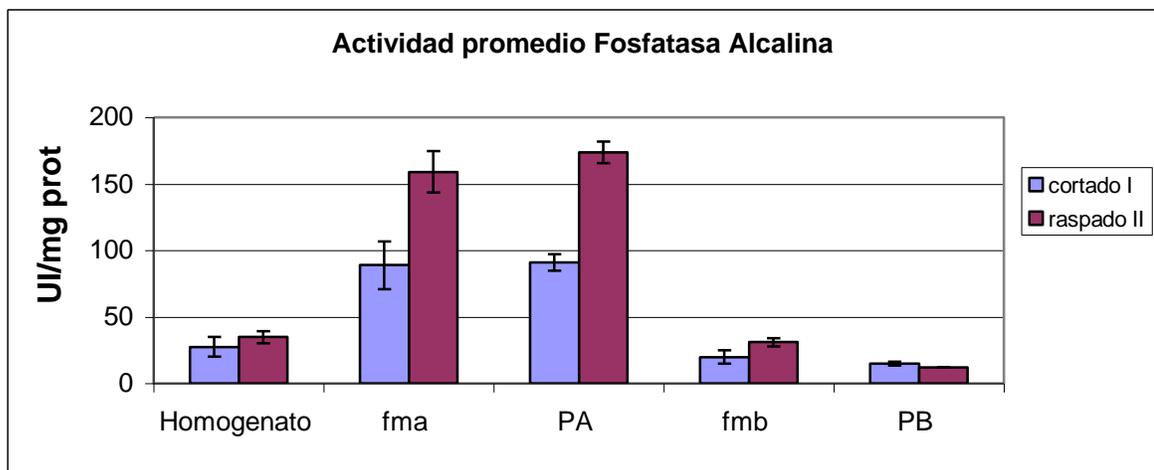
| <b>Fracción</b>               | <b>Protocolo</b>                      |                        |
|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
|                               | (I)                                   | (II)                   |
|                               | Fosfatasa Alcalina ( UI/ mg proteína) |                        |
| Homogeneizado<br>(H)          | 27,4 ± 7,4<br>( n=5)                  | 34,7 ± 4,0<br>(n=3)    |
| F Microsomal Apical<br>( fma) | 80,8 ± 18,0<br>(n=5)                  | 159,1 ± 15,5<br>( n=3) |
| Mb Apical Pura<br>(PA)        | 90,1 ± 6,2<br>( n=2)                  | 173,6 ± 8,2<br>(n=2)   |
| F microsomal Basal<br>(fmb)   | 19,7 ± 5,0<br>(n=5)                   | 30,7 ± 3,1<br>(n=3)    |
| Mb Basal Pura<br>(PB)         | 14,9 ± 1,5<br>(n=2)                   | 12,0 ± 0,1<br>(n=2)    |

La actividad específica de fosfatasa alcalina (UI/ mg prot), utilizado como marcador de membrana apical fue de 80,8 ±18, 0 y 159,1±15,5 en las fma, para membranas obtenidas a través del protocolo cuya muestra fue obtenida o procesada por corte de la placenta corioalantoidea (I) y raspado (II), respectivamente (Fig. 13 y 14).



**Fig. 13.** Actividad Específica de las diferentes fracciones del protocolo de purificación de membranas de trofoblasto equino (n=8).

Esto indica que la actividad de fosfatasa alcalina en el protocolo simultáneo realizado en muestras de tejido raspado, muestra una mayor actividad de fosfatasa alcalina en las fracciones microsomales (fma) y las purificadas (PA) a través de gradiente. Para la fracción purificada basal (PB), la realización de un gradiente aumentó la pureza de estas membranas (PB, en cuanto se reduce la presencia de un marcador de membrana apical como es fosfatasa alcalina), pero no se puede señalar que es significativo debido al tamaño reducido de la muestra. A partir de los datos que se obtuvieron, se puede señalar que el procesamiento inicial de la muestra influiría en el rendimiento y la pureza de las muestras obtenidas y sería fundamental para la aplicación del protocolo de purificación, esto se reflejaría en la representación gráfica del promedio comparativo de las distintas fracciones (Fig. 14).



**Fig. 14.** Actividad específica de fosfatasa alcalina (UI/mg prot) obtenidas en las distintas etapas de purificación de membranas de placenta equina a través del protocolo realizado en muestras de tejido obtenidas por corte (I) y raspado (II).

### **ENRIQUECIMIENTO**

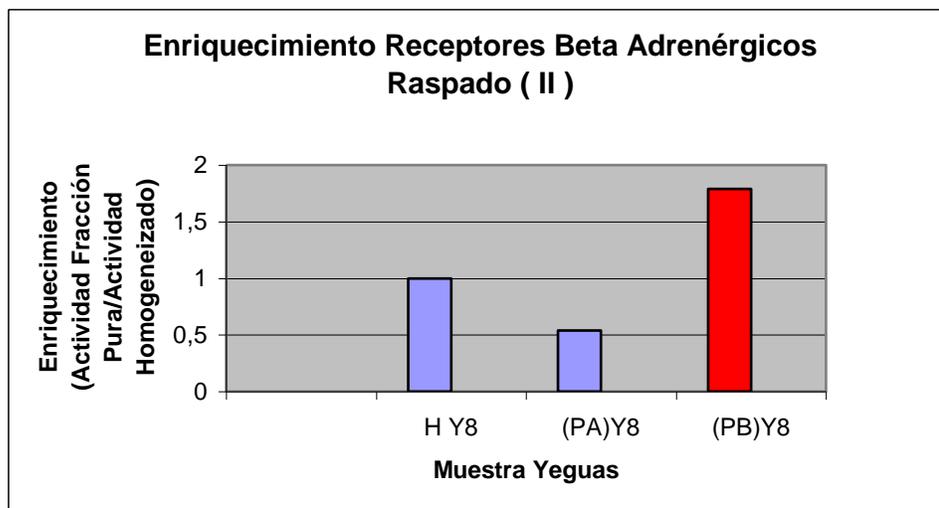
A continuación se presentan las muestras obtenidas por cortado (I) y raspado (II), luego de la aplicación del protocolo y de la realización de una comparación entre los enriquecimientos promedios (Tabla 4).

**Tabla 4.** Enriquecimiento de fosfatasa alcalina en muestras obtenidas por cortado (I) y raspado (II), luego de la aplicación del protocolo.

| ENRIQUECIMIENTO<br>Actividad Especifica<br>Fracción/ Actividad<br>Especificas<br>Homogeneizado | fma (Fracción<br>Microsomal<br>Apical) | fmb (Fracción<br>Microsomal<br>Basal) | PA(Fracción<br>Purificada<br>apical) | PB(Fracción<br>Purificada<br>basal) |
|--|--|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Cortado (I)</b>   | 2,94±0.33                              | 0,74±0.19                             | 4,67±0,09                            | 0,76±0,01                           |
| <b>Raspado (II)</b>  | 4,58±0.18                              | 0,72±0.04                             | 4,94±0,06                            | 0,34±0,05                           |

Estos datos muestran que el rendimiento del método de purificación (II) es mayor que cuando el procesamiento del tejido se realizó con el protocolo en muestras cortadas (I), siendo las diferencias en las fracciones microsomales y no en las fracciones puras. La actividad y enriquecimiento de fosfatasa alcalina respaldan esta conclusión.

En relación al enriquecimiento de las fracciones microsomales y fracciones puras, el protocolo realizado con muestras raspadas (II) mostró una tendencia a ser mayor que con las muestras cortadas (I), lo que puede verse, en la fracción microsomal apical (fma) y en la fracción pura apical (PA).



**Fig. 16.** Enriquecimiento Receptores  $\beta$ -Adrenérgicos, marcador de membrana basal de fracciones puras (PA) y (PB) obtenidas con la muestra por raspado (II) (n=1).

A través de los experimentos realizados, no se obtuvo un resultado concluyente en relación a la utilización de receptores  $\beta$ -adrenérgicos como marcador de membrana basal. Se aplicó el marcador a las muestras siete y ocho, obteniéndose en la primera de ellas un resultado no concordante con lo esperado para el receptor de membrana basal. En la muestra ocho se observa un comportamiento esperado para el marcador basal, siendo el enriquecimiento mayor en la fracción PB en relación a la PA (Fig. 16).

## **Discusión**

El protocolo de aislamiento de membranas basales y apicales de trofoblasto equino tiene como objetivo obtener vesículas puras que representen la composición de las membranas nativas in vivo, y cuyo rendimiento sea lo suficientemente adecuado y reproducible para permitir estudios de transporte transplacentario en especies de interés como el equino. Se estableció para esto un protocolo de purificación de membranas placentarias equinas, a partir de un protocolo humano, donde la anatomía de la barrera placentaria hace más expedita la toma de las muestras a partir del corte de cotiledones.

Dado la micro anatomía de la barrera placentaria en estos mamíferos se tuvo que sondear dos formas de obtención de la muestra. Es por esto que se aplicaron dos procedimientos alternativos en lo referido al procesamiento inicial del tejido: Cortado (I) y Raspado (II), observándose posibles diferencias entre ellas. Estas diferencias se reflejaron en el porcentaje de recuperación de proteínas, observándose mayor rendimiento en membranas obtenidas por raspado.

El tejido a procesar, ya sea cortado (I) o raspado (II), se obtuvo de zonas cercanas al cordón umbilical dado el desarrollo asimétrico de los microcotiledones placentarios de la placenta difusa epiteliocorial de la yegua, este aspecto es relevante para la obtención de la muestra y posteriores experimentos.

Como resultado de este trabajo se optimizó un protocolo de aislamiento y purificación de membranas apicales y basales de trofoblasto equino. Para ello se evaluaron las condiciones iniciales del tejido [cortado (I) y raspado (II)] en términos de concentración de proteínas por gramo y actividad específica de fosfatasa alcalina en las diferentes muestras. Los resultados demostraron que en términos de porcentaje de recuperación fueron mayores los obtenidos con la muestra raspada (II) que con aquella cortada (I). Por otra parte, se utilizó el marcador fosfatasa alcalina, para membrana apical, fundamental para realizar el seguimiento de la pureza de estas membranas.

En cuanto a la actividad específica de fosfatasa alcalina, los resultados demostraron una mayor actividad en aquellas placentas raspadas (II), en comparación con las cortadas (I). Las primeras con valores de  $159,0 \pm 15,5$  (UI/ mg prot) y  $80,8 \pm 18,0$  (UI/ mg prot) para la fracción microsomal apical (fma) y de  $173,6 \pm 8,2$  (UI/ mg prot) y  $90,9 \pm 6,2$  (UI/ mg prot) para la fracción pura (PA) obtenida a través de gradiente. Es importante señalar además que

los gradientes realizados son fundamentales para aumentar la pureza, sobre todo en las fracciones o membranas purificadas basales (PB).

La aplicación del protocolo de purificación demostró la posibilidad de realizarlo con rendimientos y actividades satisfactorias no sólo con muestras en fresco, sino que también a partir de muestras congeladas a partir de un período que no exceda las 8 horas desde el alumbramiento del animal, mostrando valores comparativos entre las placentas cortadas y cortada congelada de la fracción microsomal apical (fma) por ejemplo de  $20,1 \pm 1,6$  (UI/ mg prot) y  $20,7$  (UI/ mg prot), respectivamente.

En lo referente al enriquecimiento de las fracciones microsomales y fracciones puras, el protocolo realizado con muestras raspadas mostró una tendencia a ser mayor, a diferencia de las muestras cortadas, esto se puede ver por ejemplo en la fracción microsomal apical (fma) que presenta  $2,9 \pm 0,3$  veces con respecto a la fracción homogeneizada (actividad específica fracción / Actividad específica Homogeneizado) realizado para las muestras cortadas (I) y de  $4,6 \pm 0,2$  para la muestra raspada (II). Esto indica que la actividad de fosfatasa alcalina en el protocolo simultáneo realizado a través de raspado es mayor en la fracción microsomal (fma) y la purificada (PA) a través del gradiente apical.

En contraste para la fracción purificada basal (PB), la realización de un gradiente aumentó significativamente la pureza de ésta (PB), en cuanto a la disminución de la presencia de un marcador apical como es fosfatasa alcalina.

En cuanto a los resultados obtenidos al evaluar un marcador basal como son los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, éstos no fueron concluyentes, probablemente por una distribución diferente de este receptor en una placentación epiteliocorial como la de la yegua o por el bajo número de placentas evaluadas. Este punto merece un posterior análisis para llegar a una conclusión al respecto.

Debido a los escasos o nulos antecedentes científicos descritos con respecto a la realización de protocolos de obtención de membranas apicales y basales en animales mayores, la ejecución de este estudio permitirá tener la materia prima para realizar posteriormente estudios de transporte placentario.

Con el desarrollo de este método de purificación se ha dado el primer paso para la obtención de membranas apicales y basales de placentas de tipo epiteliocorial, lo que permitiría en estudios posteriores, aplicar el protocolo de aislamiento en placentas de otros

mamíferos de interés como son los camélidos sudamericanos, que presentan características fisiológicas relevantes para el estudio de gestaciones bajo condiciones de hipoxia.

## **Conclusiones**

Durante el desarrollo del presente trabajo se demostró la posibilidad de obtener membranas purificadas apicales y basales provenientes de placentas de equino a partir de muestras frescas y congeladas dentro de un período acotado. Estas membranas purificadas tuvieron el comportamiento esperado con respecto a los marcadores específicos, tanto en las muestras cortadas (I) como en aquellas raspadas (II).

El estudio se realizó partiendo del tejido inicial en dos condiciones [cortado (I) o raspado (II)], estableciéndose diferencias en los resultados de las membranas obtenidas provenientes de uno y otro caso.

a) en cuanto a la recuperación de proteínas de las fracciones purificadas los resultados sugieren mayor recuperación en la muestra raspada (II).

b) respecto a la actividad de fosfatasa alcalina como marcador de membrana apical, se puede señalar que la mayor actividad fue detectada en las fracciones microsomales purificadas provenientes del tejido raspado (II). En el caso de las fracciones basales, la fosfatasa alcalina fue baja, como era de esperar.

c) en relación al enriquecimiento de las fracciones microsomales y fracciones puras, el protocolo realizado con muestras raspadas (II) mostró una tendencia a ser mayor en comparación con las muestras cortadas (I), no obstante los resultados no son concluyentes.

Surge como un resultado aparente, que aplicar el protocolo en muestras de tejido placentario raspado (II), proporciona fracciones de membranas purificadas de mayor calidad, sin embargo, dado el tamaño reducido de la muestra utilizada no se pueden establecer diferencias significativas.

El protocolo de aislamiento y purificación de membranas apicales y basales de trofoblasto humano es factible de utilizar en otras especies de interés.