



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**

**CARACTERIZACIÓN DE MICRODOMINIOS LIPÍDICOS  
EN MEMBRANAS APICALES DE  
SINCICIOTROFOBLASTO PLACENTARIO HUMANO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**VALERIA GODOY TORRES**

**PROFESOR GUÍA: GLORIA RIQUELME PINO**

**PROFESOR PATROCINANTE: MARÍA ANTONIETA VALENZUELA PEDEVILA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE FISIOLÓGÍA Y BIOFÍSICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Santiago, Chile**

**2006**

*A mi adorada familia, José, Ivonne y Nydia,  
por su incondicional fe en mi*

## AGRADECIMIENTOS

---

Quiero comenzar por expresar mi más sincera admiración y profundo agradecimiento a la Dra. Gloria Riquelme, por introducirme desinteresadamente en este camino, por su apoyo y respeto. Debo agradecerle el haberme permitido participar de todas las actividades en su laboratorio y por sobre todo, por el gran cariño y comprensión que me entregó.

Al Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina, por la beca de financiamiento que me sustentó durante el pasado año.

En forma particular quiero agradecer a Andrea, por entregarme las primeras herramientas para realizar el trabajo de esta memoria, por su apoyo y amistad. A Mauricio quien puso toda la paciencia, sapiencia y pasión para hacer de esta memoria un trabajo digno. Agradezco a toda las personas que de manera silenciosa y desapercibida, me ayudaron o aportaron a finalizar esta etapa.

Además me gustaría destacar a mis compañeros y amigos del día a día: Catalina, Carla, Loreta, Paula y Aldo, porque su apoyo, aporte y críticas constantes ayudaron a mejorar y alegrar cada momento en el LEM.

A Liz, Pia, Eduardo, Lautaro, Juan y a todos los amigos que me han acompañado en las buenas y las malas, que han hecho tan agradables los recuerdos del estudio de los últimos años, y que de una u otra manera alientan a continuar. Agradezco especialmente a Diego por su amor y apoyo incondicional, gracias por haber mantenido la fuerza, paciencia y predisposición durante todo este tiempo.

Finalmente agradezco a mis padres, a mi “hermanita” Nydia y a todos los tíos y primos, por el apoyo constante y la confianza ciega que siempre, siempre pusieron en mi. Muchas de las horas invertidas aquí se les robé a ellos, a pesar de que siempre me regalaron su amor.

## TABLA DE CONTENIDOS

---

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La membrana plasmática celular: .....</b>	<b>1</b>
1.1 Componentes lipídicos de la membrana plasmática: .....	1
1.2 Organización de la membrana, modelos artificiales: .....	4
1.3 “Lipid rafts” y la dinámica en la membrana plasmática: .....	6
<b>2. La placenta humana y su estructura de término:.....</b>	<b>9</b>
2.1 La barrera placentaria:.....	9
2.2 El sinciotrofoblasto placentario: .....	11
<b>3. Hipótesis:.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Objetivo general: .....</b>	<b>14</b>
<b>5. Objetivos específicos:.....</b>	<b>14</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Purificación de membranas placentarias. ....</b>	<b>15</b>
<b>2. Purificación de DRMs:.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Tratamiento con metil- <math>\beta</math>-Ciclodextrina (m<math>\beta</math>CD): .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Determinación de colesterol total: .....</b>	<b>17</b>
<b>5. Electroforesis SDS-PAGE y “Western Blot”:.....</b>	<b>17</b>
<b>6. “Dot Blot”:.....</b>	<b>18</b>
<b>7. Análisis estadístico: .....</b>	<b>18</b>

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Caracterización del contenido de colesterol total en L-MVM y MVM:.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Estandarización del protocolo para el aislamiento de DRMs desde L-MVM y MVM, membranas apicales de sincitiotrofoblasto placentario humano:.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Caracterización de los DRMs obtenidos desde L-MVM y MVM:.....</b>	<b>24</b>
3.1 Caracterización general de los complejos insolubles: .....	24
3.2 Los DRMs de la fracción apical liviana L-MVM son distintos a los de la fracción apical tradicional MVM: .....	28
3.3 Efecto de la depleción de colesterol en la distribución de los marcadores en los DRMs de L-MVM y MVM.....	33
<b>4. Discusión final:.....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>x</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1: Estructura molecular de los lípidos que componen la membrana plasmática.	2
Figura 2: Colesterol favorece la separación de fases en membranas lipídicas.	5
Figura 3: Modelo clásico de la organización de los “rafts” y la caveola en la membrana plasmática.	7
Figura 4: Esquema representativo de los componentes de una vellosidad placentaria.	10
Figura 5: Inmunohistoquímica de una vellosidad placentaria (5 µm).	11
Figura 6: Diagrama de los principales pasos incluidos en el protocolo implementado para la obtención de DRMs desde L-MVM y MVM.	16
Figura 7: Determinación del contenido de colesterol total de membrana.	21
Figura 8: Distribución de PLAP en las FsRG de L-MVM y MVM.	25
Figura 9: Distribución de hTf-R en las FsRG de ambas membranas apicales.	27
Figura 10: Caracterización de las FsRG de L-MVM.	30
Figura 11: Caracterización de las FsRG de MVM.	31
Figura 12: Presencia de Anx 2 en las membranas L-MVM y MVM.	32
Figura 13: Gráfico del efecto del tratamiento con mβCD 2%, en la razón colesterol/proteínas.	34
Figura 14: Efecto de la extracción de colesterol en los DRMs de L-MVM.	36
Figura 15: Resultado de la depleción del colesterol en la distribución de los marcadores de “rafts” de MVM.	38
Figura 16: Comparación de la sensibilidad de GM1, PLAP y Anx 2 a la extracción de colesterol desde las membranas L-MVM y MVM.	40

## ABREVIATURAS

---

<b>Anx 2:</b>	Anexina A2
<b>BM:</b>	Membrana basal
<b>BSA:</b>	Seroalbúmina de bovino
<b>CEMs:</b>	Membranas enriquecidas en colesterol
<b>DIGs:</b>	Membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos, detergente-insolubles
<b>DRMs:</b>	Membranas resistentes a detergente
<b>FRG:</b>	Fracción recolectada de la gradiente
<b>FsRG:</b>	Fracciones recolectadas de la gradiente
<b>GalCer:</b>	Galactoceramida
<b>GEMs:</b>	Membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos
<b>GLPs:</b>	Glicerofosfolípidos
<b>GM1:</b>	Gangliósido GM1
<b>GPI:</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>GSLs:</b>	Glicoesfingolípidos
<b>Hepes:</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etansulfónico
<b>HRP-CTX:</b>	Toxina colérica cojugada con peroxidasa
<b>hTf-R:</b>	Receptor humano de Transferrina
<b>La:</b>	Fase sol-gel
<b>Ld:</b>	Fase líquida-desordenada, líquida-cristalina
<b>L-MVM:</b>	Membrana liviana apical
<b>Lo:</b>	Fase líquida-ordenada
<b>m<math>\beta</math>CD:</b>	Metil- $\beta$ ciclodextrina
<b>Mes:</b>	Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico
<b>MVM:</b>	Membrana apical
<b>OH:</b>	Hidroxilo
<b>PBS:</b>	Solución amortiguador fosfato salino
<b>PLAP:</b>	Fosfatasa alcalina placentaria humana
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SEM:</b>	Error estandar de la media
<b>SMs:</b>	Esfingomielinas
<b>SPLs:</b>	Esfingolípidos
<b>STP:</b>	Sinciotrofoblasto placentario
<b>TA:</b>	Temperatura ambiente
<b>TCA:</b>	Ácido tricloroacético
<b>Tm:</b>	Temperatura de fusión
<b>Tris:</b>	Tris (hidroximetil)-aminometano
<b>Tx-100:</b>	Tritón X-100

## RESUMEN

---

Los “lipid rafts” son pequeños dominios de membrana, heterogéneos y dinámicos, constituidos por elevados niveles de colesterol y glicoesfingolípidos. Se encuentran directamente involucrados en la estructuración y organización celular. Son, por lo tanto importantes en la mantención de la funcionalidad de los diversos tejidos, los órganos y sistemas, a nivel macromolecular.

El sinciciotrofoblasto (STP) es el epitelio que constituye la principal barrera al transporte materno-fetal en la placenta de término. Con anterioridad, se ha descrito la presencia de dos fracciones dentro de la membrana apical del STP. Una fracción pesada (MVM) y otra más liviana (L-MVM), obtenidas mediante centrifugación diferencial y separación en gradiente de sacarosa. Sin embargo, a pesar de importantes evidencias, no se ha establecido formalmente la presencia de microdominios lipídicos en el dominio apical del STP.

El propósito de esta memoria fue obtener y caracterizar la presencia de rafts en ambas fracciones de membrana apical de STP. Para esto, se determinó el contenido de colesterol a L-MVM y MVM y luego se implementó una metodología de extracción de membranas resistentes a detergente (DRMs), utilizando 1% Tritón X-100, y gradiente de sacarosa. Luego de la centrifugación, se recolectaron las muestras y se analizaron por “immunoblotting” para marcadores específicos de rafts (Fosfatasa alcalina placentaria, Anexina A2 y Gangliósido GM1) y de no-raft (Receptor humano de Transferrina).

Los resultados obtenidos mostraron que L-MVM y MVM tienen diferencias significativas en la cantidad de colesterol. Además, desde ambas fracciones se obtuvieron DRMs, en los cuales los marcadores detectados, mostraron diferente intensidad de señal y distribución. En conclusión, cada fracción apical contiene “rafts”, pero de distinta composición. Este hallazgo podría ser el origen de la separación de las fracciones y en conjunto constituye la primera evidencia de la presencia de microdominios en el STP, siendo un aporte al entendimiento del modelo de transporte materno-fetal.



## SUMMARY

---

### **“Characterization of lipid microdomains in human apical syncytiotrophoblast membranes”**

Lipid rafts are small membrane domains, dynamics and heterogeneous, constituted by high cholesterol levels and glycosphingolipids. Rafts are directly involved in the structuring and cellular organization. Therefore, at a macromolecular level, they are important in the functionality of diverse tissues, organs, and systems.

Syncytiotrophoblast (STP) is an epithelium that constitutes the main barrier to maternal-fetal transport in the term placenta. Previously, it has been described the presence of two fractions within the apical membrane of STP. A heavy (MVM) and a light fraction (L-MVM), obtained by differential centrifugation and sucrose gradient separation. Nevertheless, in spite of important evidences, the presence of lipid microdomains in the apical domain of STP has not been verified formally.

The aim of this thesis was to obtain and characterize the presence of lipid rafts in both apical membranes fractions of STP. For this purpose, the cholesterol content was determined to L-MVM and MVM, and a methodology was implemented for the obtention of detergent resistant membranes (DRMs), using 1% Triton X-100, and sucrose gradient flotation. After ultracentrifugation, the samples were collected and analysed by immunoblotting for specific raft-markers (Placental alkaline phosphatase, Annexin A2 and Ganglioside GM1) and non raft marker (Human Transferrin receptor). The results obtained showed that L-MVM and MVM have significant differences in the amount of cholesterol. In addition, DRMs were obtained from both fractions, in which the detected markers showed different signal intensity and distribution. In conclusion, each apical fraction contains lipid rafts, but their composition is different. This finding could be the cause of the separation of the fractions together, it constitutes the first evidence for the presence of rafts in the STP, making a contribution to the understanding of the maternal-fetal transport model.

## REFERENCIAS

---

- ALMEIDA, P. F., W. L. VAZ, AND T. E. THOMPSON.** 1992. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. Biochemistry 31: 6739-6747.
- BABIYCHUK, E. B. AND A. DRAEGER.** 2006. Biochemical characterisation of detergent-resistant membranes: a systematic approach. Biochem.J.
- BABIYCHUK, E. B. AND A. DRAEGER.** 2000. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. J.Cell.Biol 150: 1113-1124.
- BODIN, S., C. SOULET, H. TRONCHERE, P. SIE, C. GACHET, M. PLANTAVID, AND B. PAYRASTRE.** 2005. Integrin-dependent interaction of lipid rafts with the actin cytoskeleton in activated human platelets. J Cell.Sci 118: 759-769.
- BRACCIA, A., M. VILLANI, L. IMMEDAL, L. L. NIELS-CHRISTIANSEN, B. T. NYSTROM, G. H. HANSEN, AND E. M. DANIELSEN.** 2003. Microvillar membrane microdomains exist at physiological temperature. Role of galectin-4 as lipid raft stabilizer revealed by "superrafts". J.Biol.Chem. 278: 15679-15684.
- BRETSCHER, M. S.** 1973. Membrane structure: some general principles. Science 181: 622-629.
- BROWN, D. A. AND E. LONDON.** 1998a. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. J.Membr.Biol. 164: 103-114.
- BROWN, D. A. AND E. LONDON.** 1998b. Functions of lipid rafts in biological membranes. Annu.Rev.Cell Dev.Biol 14: 111-136.
- BROWN, D. A. AND J. K. ROSE.** 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 68: 533-544.
- CERNEUS, D. P. AND E. A. VAN DER.** 1991. Apical and basolateral transferrin receptors in polarized BeWo cells recycle through separate endosomes. J.Cell.Biol. 114: 1149-1158.
- CHATTERJEE, S. AND S. MAYOR.** 2001. The GPI-anchor and protein sorting. Cell.Mol.Life Sci 58: 1969-1987.
- CHEN, T. Y., P. H. LIU, C. T. RUAN, L. CHIU, AND F. L. KUNG.** 2006. The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein. Biochem.Biophys.Res.Commun. 342: 266-272.
- DANIELSEN, E. M. AND G. H. HANSEN.** 2003. Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions. Biochim.Biophys.Acta 1617: 1-9.
- DANIELSEN, E. M. AND D. B. VAN.** 1995. A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. J.Cell.Biol. 131: 939-950.
- EATON, S. AND K. SIMONS.** 1995. Apical, basal, and lateral cues for epithelial polarization. Cell 82: 5-8.
- FANTINI, J., N. GARMY, R. MAHFOUD, AND N. YAHI.** 2002. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases. Expert.Rev.Mol.Med. 2002: 1-22.
- GALBIATI, F., B. RAZANI, AND M. P. LISANTI.** 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. Cell 106: 403-411.
- GAUS, K., M. RODRIGUEZ, K. R. RUBERU, I. GELISSEN, T. M. SLOANE, L. KRITHARIDES, AND W. JESSUP.** 2005. Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. J.Lipid.Res. 46: 1526-1538.

- GLAZIER, J. D., C. J. JONES, AND C. P. SIBLEY.** 1988. Purification and Na<sup>+</sup> uptake by human placental microvillus membrane vesicles prepared by three different methods. Biochim.Biophys.Acta 945: 127-134.
- GUDE, N. M., C. T. ROBERTS, B. KALIONIS, AND R. G. KING.** 2004. Growth and function of the normal human placenta. Thromb.Res. 114: 397-407.
- HANADA, K., M. NISHIJIMA, Y. AKAMATSU, AND R. E. PAGANO.** 1995. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. J.Biol.Chem. 270: 6254-6260.
- HANSEN, G. H., J. PEDERSEN, L. L. NIELS-CHRISTIANSEN, L. IMMERDAL, AND E. M. DANIELSEN.** 2003. Deep-apical tubules: dynamic lipid-raft microdomains in the brush-border region of enterocytes. Biochem.J 373: 125-132.
- HARDER, T., P. SCHEIFFELE, P. VERKADE, AND K. SIMONS.** 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. J.Cell.Biol. 141: 929-942.
- HAYES, M. J., U. RESCHER, V. GERKE, AND S. E. MOSS.** 2004. Annexin-actin interactions. Traffic. 5: 571-576.
- HOLTHUIS, J. C. AND T. P. LEVINE.** 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 6: 209-220.
- HUANG, Q., H. M. SHEN, G. SHUI, M. R. WENK, AND C. N. ONG.** 2006. Emodin inhibits tumor cell adhesion through disruption of the membrane lipid Raft-associated integrin signaling pathway. Cancer Res. 66: 5807-5815.
- ILLSLEY, N. P., Z. Q. WANG, A. GRAY, M. C. SELLERS, AND M. M. JACOBS.** 1990. Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. Biochim.Biophys.Acta 1029: 218-226.
- ISHITSUKA, R., S. B. SATO, AND T. KOBAYASHI.** 2005. Imaging lipid rafts. J.Biochem.(Tokyo) 137: 249-254.
- JACOB, R., M. HEINE, J. EIKEMEYER, N. FRERKER, K. P. ZIMMER, U. RESCHER, V. GERKE, AND H. Y. NAIM.** 2004. Annexin II is required for apical transport in polarized epithelial cells. J.Biol.Chem. 279: 3680-3684.
- JANSSON, T., T. L. POWELL, AND N. P. ILLSLEY.** 1993. Non-electrolyte solute permeabilities of human placental microvillous and basal membranes. J.Physiol 468: 261-274.
- JIMENEZ, V., M. HENRIQUEZ, P. LLANOS, AND G. RIQUELME.** 2004. Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. a comparative study. Placenta 25: 422-437.
- KURZCHALIA, T. V. AND R. G. PARTON.** 1999. Membrane microdomains and caveolae. Curr.Opin.Cell Biol 11: 424-431.
- LAGERHOLM, B. C., G. E. WEINREB, K. JACOBSON, AND N. L. THOMPSON.** 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. Annu.Rev.Phys.Chem. 56: 309-336.
- LANGE, Y., M. H. SWAISGOOD, B. V. RAMOS, AND T. L. STECK.** 1989. Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts. J.Biol. Chem. 264: 3786-3793.
- LICHTENBERG, D., F. M. GONI, AND H. HEERKLOTZ.** 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Trends Biochem.Sci 30: 430-436.
- LONDON, E.** 2005. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. Biochim.Biophys.Acta 1746: 203-220.
- LYDEN, T. W., C. L. ANDERSON, AND J. M. ROBINSON.** 2002. The endothelium but not the syncytiotrophoblast of human placenta expresses caveolae. Placenta 23: 640-652.
- MAYOR, S. AND M. RAO.** 2004. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. Traffic. 5: 231-240.

- MEDER, D., M. J. MORENO, P. VERKADE, W. L. VAZ, AND K. SIMONS.** 2006. Phase coexistence and connectivity in the apical membrane of polarized epithelial cells. Proc Natl.Acad.Sci U.S.A 103: 329-334.
- MULLER, P. AND A. HERRMANN.** 2002. Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes. Biophys.J 82: 1418-1428.
- MUNRO, S.** 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? Cell 115: 377-388.
- NAGY, P., G. VAMOSI, S. DAMJANOVICH, AND L. DAMJANOVICH.** 2006. ICAM-1 inhibits the homocluster formation of MHC-I in colon carcinoma cells. Biochem.Biophys.Res.Commun.
- NGUYEN, H. T., A. B. AMINE, D. LAFITTE, A. A. WAHEED, C. NICOLETTI, C. VILLARD, M. LETISSE, V. DEYRIS, M. ROZIERE, L. TCHIAKPE, C. D. DANIELLE, L. COMEAU, AND A. HIOL.** 2006. Proteomic characterization of lipid rafts markers from the rat intestinal brush border. Biochem.Biophys.Res.Commun. 342: 236-244.
- OHVO-REKILA, H., B. RAMSTEDT, P. LEPPIMAKI, AND J. P. SLOTTE.** 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Prog.Lipid Res. 41: 66-97.
- OSTERMEYER, A. G., B. T. BECKRICH, K. A. IVARSON, K. E. GROVE, AND D. A. BROWN.** 1999. Glycosphingolipids are not essential for formation of detergent-resistant membrane rafts in melanoma cells. methyl-beta-cyclodextrin does not affect cell surface transport of a GPI-anchored protein. J.Biol.Chem. 274: 34459-34466.
- PALADINO, S., D. SARNATARO, R. PILLICH, S. TIVODAR, L. NITSCH, AND C. ZURZOLO.** 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. J.Cell Biol. 167: 699-709.
- PARADELA, A., S. B. BRAVO, M. HENRIQUEZ, G. RIQUELME, F. GAVILANES, J. M. GONZALEZ-ROS, AND J. P. ALBAR.** 2005. Proteomic analysis of apical microvillous membranes of syncytiotrophoblast cells reveals a high degree of similarity with lipid rafts. J.Proteome.Res. 4: 2435-2441.
- PARTON, R. G.** 1994. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. J Histochem.Cytochem. 42: 155-166.
- PARTON, R. G. AND A. A. RICHARDS.** 2003. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. Traffic. 4: 724-738.
- PIKE, L. J.** 2006. Rafts Defined. J Lipid Res.
- PIKE, L. J.** 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. J Lipid Res. 44: 655-667.
- RAJENDRAN, L., M. MASILAMANI, S. SOLOMON, R. TIKKANEN, C. A. STUERMER, H. PLATTNER, AND H. ILLGES.** 2003. Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. Proc Natl.Acad.Sci U.S.A 100: 8241-8246.
- RAJENDRAN, L. AND K. SIMONS.** 2005. Lipid rafts and membrane dynamics. J.Cell Sci. 118: 1099-1102.
- RAMSTEDT, B. AND J. P. SLOTTE.** 2002. Membrane properties of sphingomyelins. FEBS Lett. 531: 33-37.
- RASHID-DOUBELL, F., D. TANNETTA, C. W. REDMAN, I. L. SARGENT, C. A. BOYD, AND E. A. LINTON.** 2006. Caveolin-1 and Lipid Rafts in Confluent BeWo Trophoblasts: Evidence for Rock-1 Association with Caveolin-1. Placenta.
- RESCHER, U. AND V. GERKE.** 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. J Cell Sci 117: 2631-2639.
- RIQUELME, G., P. LLANOS, E. TISCHNER, J. NEIL, AND B. CAMPOS.** 2004. Annexin 6 modulates the maxi-chloride channel of the apical membrane of syncytiotrophoblast isolated from human placenta. J.Biol.Chem. 279: 50601-50608.
- RIQUELME, G., A. STUTZIN, L. F. BARROS, AND J. L. LIBERONA.** 1995. A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. Am.J.Obstet.Gynecol. 173: 733-738.
- ROPER, K., D. CORBEIL, AND W. B. HUTTNER.** 2000. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. Nat.Cell Biol 2: 582-592.

- SCHEIFFELE, P., M. G. ROTH, AND K. SIMONS.** 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. EMBO J 16: 5501-5508.
- SCHROEDER, R. J., S. N. AHMED, Y. ZHU, E. LONDON, AND D. A. BROWN.** 1998. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. J.Biol.Chem. 273: 1150-1157.
- SCHUCK, S. AND K. SIMONS.** 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. J.Cell Sci. 117: 5955-5964.
- SIMONS, K. AND R. EHEHALT.** 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. J.Clin.Invest 110: 597-603.
- SIMONS, K. AND E. IKONEN.** 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature 387: 569-572.
- SIMONS, K. AND M. G. VAN.** 1988. Lipid sorting in epithelial cells. Biochemistry 27: 6197-6202.
- SIMONS, K. AND W. L. VAZ.** 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct. 33: 269-295.
- SINGER, S. J. AND G. L. NICOLSON.** 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731.
- SMART, E. J., G. A. GRAF, M. A. MCNIVEN, W. C. SESSA, J. A. ENGELMAN, P. E. SCHERER, T. OKAMOTO, AND M. P. LISANTI.** 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. Mol.Cell Biol. 19: 7289-7304.
- STULC, J.** 1997. Placental transfer of inorganic ions and water. Physiol Rev. 77: 805-836.
- TYSKA, M. J. AND M. S. MOOSEKER.** 2004. A role for myosin-1A in the localization of a brush border disaccharidase. J.Cell Biol. 165: 395-405.
- VAN DER GOOT, F. G. AND T. HARDER.** 2001. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. Semin.Immunol. 13: 89-97.
- VAN, M. G.** 1989. Lipid traffic in animal cells. Annu.Rev.Cell Biol 5: 247-275.
- ZHAO, H. AND R. W. HARDY.** 2004. Long-chain saturated fatty acids induce annexin II translocation to detergent-resistant membranes. Biochem.J. 381: 463-469.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. La membrana plasmática celular:

Por más de treinta años, el modelo del mosaico fluido descrito por Singer y Nicolson ha sustentado el conocimiento acerca de la estructura de las membranas celulares, el modelo establece que los componentes lipídicos conforman el medio fluido que permite el movimiento de las proteínas de membrana, y brindan a la membrana la funcionalidad necesaria para la viabilidad celular (Singer and Nicolson 1972).

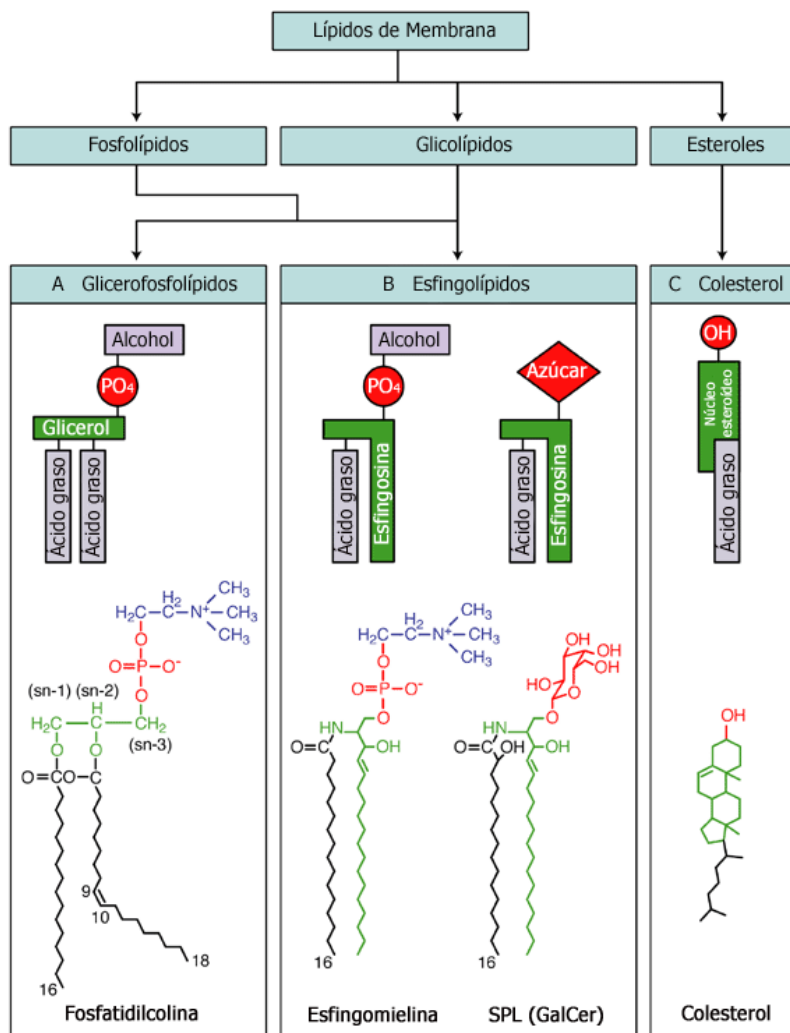
#### 1.1 Componentes lipídicos de la membrana plasmática:

El marco estructural básico de las membranas está conformado por lípidos, si bien se han descrito más especies moleculares de las involucradas en la formación de una simple bicapa lipídica (Bretscher 1973), los tres componentes lipídicos principales en las membranas eucariontes son fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol (Munro 2003).

Los glicerofosfolípidos (GPLs) son los principales componentes de las membranas, como muestra la Fig.1 están conformados en base a una molécula de glicerol sustituida por dos ácidos grasos de 12-26 átomos de carbono de largo, de los cuales uno es siempre mono o poliinsaturado en posición cis. La cabeza polar está compuesta por un grupo fosfato covalentemente unido a un alcohol de naturaleza neutra (serina o inositol) que le da carga final negativa al fosfolípido, o de naturaleza básica (etanolamina o colina) lo que le da una carga final neutra o zwitteriónica al lípido (Fantini et al. 2002; Simons and Vaz 2004).

Los esfingolípidos (SPLs), son lípidos derivados de la esfingosina, se dividen en tres grupos de acuerdo a los sustituyentes que conforman la cabeza polar de la molécula. En las esfingomielinas (SMs) la cabeza la conforman un grupo fosfato y un alcohol, al igual que los GPLs, los glicoesfingolípidos (GSLs) usualmente son denominados glicolípidos neutrales ya que no tienen carga. Tienen una cabeza polar

compuesta por uno o más azúcares que se unen directamente a través del primer -OH de la ceramida (esfingosina sustituida con una cadena de ácido graso), no contienen grupo fosfato y se subdividen en cerebrósidos y globósidos. En los primeros la ceramida está sustituida por una hexosa simple y neutra, mientras que en los segundos está sustituida por dos o más azúcares. El tercer subgrupo de SPLs corresponde a los gangliósidos, en los que la ceramida esta unida a un oligosacárido complejo que tiene una o más moléculas de ácido siálico, sustituyente que le proporciona carga neta negativa al gangliósido (Fantini et al. 2002; Pike 2003).



**Figura 1: Estructura molecular de los lípidos que componen la membrana plasmática.**

**A)** Los GPLs son los principales componentes de las membranas lipídicas, difieren entre ellos en la estructura del alcohol que compone la cabeza polar. **B)** La esfingomielina, que es también un fosfolípido, comparte el sustituyente de la cabeza polar con la fosfatidilcolina, pero difiere en la cadena acil, que comparte con los SPLs. Cuya base estructural es una unidad de esfingosina acilada (ceramida) **C)** El grupo OH le da la polaridad a la molécula de colesterol, mientras la cadena iso-octil constituye el polo hidrofóbico (Modificado de Fantini et al. 2002)

El colesterol es el tercer componente lipídico y único esteroide presente en las membranas celulares eucariotas, su estructura es a base de un núcleo esteroideo consistente en 4 anillos hidrocarbonados fusionados. Los que le confieren una estructura rígida, además se encuentra sustituido con un grupo hidroxilo en C-3, y con una cadena hidrocarbonada iso-octil en C-17, sustituyentes que le dan propiedades anfipáticas a la molécula final (Munro 2003).

De acuerdo al tipo celular, las concentraciones de cada compuesto lipídico en la membrana son variables. Sin embargo, en general del total de lípidos que constituyen la membrana plasmática, los fosfolípidos componen más del 50% mientras que el colesterol está presente en un 30-40% (Lange et al. 1989; Van 1989). La esfingomielina se encuentra en una 10-20%, y el resto de los esfingolípidos usualmente representa muy bajos porcentajes dentro del total. En membranas especializadas, en cambio, como en el caso de las barreras epiteliales, los esfingolípidos pueden alcanzar hasta el 30% o más del total de los lípidos de la membrana plasmática (Simons and van 1988; Ishitsuka et al. 2005).

Entre las dos caras de la membrana, la composición lipídica es asimétrica. Los esfingolípidos sólo están presentes en la cara externa, mientras que ciertos fosfolípidos están restringidos a la cara citoplasmática de la membrana. La asimetría es mantenida mediante un efectivo transporte activo, llevado a cabo a través de proteínas denominadas traslocasas (Munro 2003; Holthuis and Levine 2005). El colesterol, por otra parte, se mueve espontáneamente entre las dos caras de la membrana, aún cuando interactúa preferentemente (no exclusivamente) con los esfingolípidos, por lo que parece ser más abundante en el lado externo de la membrana que el interno (Muller and Herrmann 2002 ; Munro 2003).



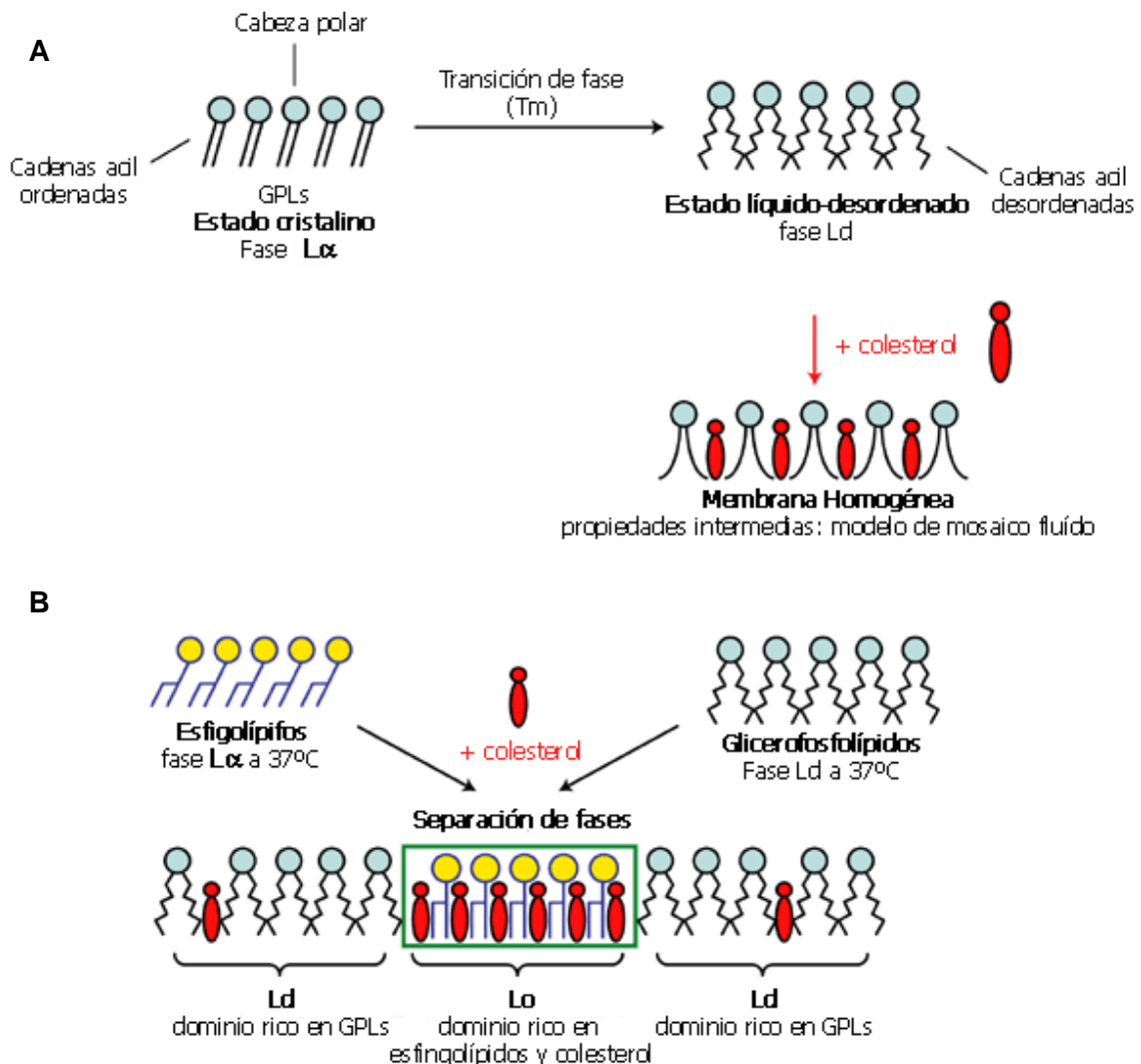
## 1.2 Organización de la membrana, modelos artificiales:

Los modelos de bicapas lipídicas son muy utilizados en el estudio de la organización de la membrana y sus componentes. Permiten manipular el contenido lipídico y observar los efectos inmediatos del cambio de condiciones tales como composición o temperatura, entre otras.

Las bicapas compuestas únicamente de fosfolípidos pueden existir en dos estados, dependiendo de la temperatura ambiente (TA) en la que el sistema se encuentre. Si la TA es inferior al punto de fusión ( $T_m$ ) de los fosfolípidos, la bicapa estará en estado sólido-gel ( $L_\alpha$ ). Si la TA es superior al  $T_m$  de los fosfolípidos que componen la bicapa, esta se encontrará en estado fluido-líquido o cristalino-desordenado ( $L_d$ ). Considerando la temperatura a la que fisiológicamente se encuentran las membranas celulares y el  $T_m$  promedio de los fosfolípidos, la fase  $L_\alpha$  no tiene relevancia, y la bicapa permanece en estado  $L_d$  (Brown and London 1998a).

Las bicapas lipídicas binarias, compuestas por esfingolípidos y fosfolípidos, a las que se les adiciona altos niveles de colesterol, forman una fase similar a  $L_\alpha$ , pero sus componentes mantienen la capacidad de difusión lateral a velocidad similar a la alcanzada por los componentes en fase  $L_d$  (Almeida et al. 1992). Este estado con propiedades intermedias se denominó Líquido-ordenado ( $L_o$ ) (London 2005).

La formación de la fase  $L_o$  luego de la adición de colesterol, podría originarse por una parte a que la estructura rígida del colesterol adopta disposición perpendicular, que afecta la organización y el orden de las cadenas de ácidos grasos, por lo que la bicapa se vuelve más gruesa (Ohvo-Rekila et al. 2002). Por otra parte, como muestra la Fig. 2, la presencia de esfingolípidos compuestos por ácidos grasos saturados con capacidad de formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, y el tamaño de las cabezas polares azucaradas que los constituyen, determina que al adicionar colesterol ambos compuestos adquieran una conformación ordenada y compacta de mayor estabilidad (Ramstedt and Slotte 2002; Fantini et al. 2002).



**Figura 2: Colesterol favorece la separación de fases en membranas lipídicas.**

**A)** En bicapas compuestas de únicamente de GPLs (fosfatidilcolina) y a TA inferior a la  $T_m$  de este compuesto, las moléculas pueden empaquetarse de modo que las cadenas acil se inclinan para formar fase  $L\alpha$ . A TA igual a  $37^\circ\text{C}$  (por sobre la  $T_m$ ) la bicapa se convierte a una fase fluida líquida-cristalina ( $L_d$ ). La adición de colesterol a estos dominios anula la transición térmica normal de  $L\alpha$  a  $L_d$ , dando a la membrana propiedades intermedias entre las dos fases. **B)** Un dominio de SPLs se forma en fase gel a  $37^\circ\text{C}$ , con un empaquetamiento estrecho de las cadenas acil saturadas. El colesterol interactúa preferentemente con los esfingolípidos y favorece la separación de las fases entre SPLs y GPLs. En la membrana plasmática, los GPLs se ordenan en un dominio en fase  $L_d$ , bajo en colesterol, mientras que los SPLs forman una fase líquida ordenada  $L_o$ , altamente enriquecida en colesterol (Modificado de Fantini et al. 2002)

### **1.3 “Lipid rafts” y la dinámica en la membrana plasmática:**

#### **1.3.1 Definición de “Rafts”:**

Los “lipid rafts” son pequeños dominios (10-200 nm) heterogéneos y dinámicos, constituidos por elevados niveles de colesterol y glicoesfingolípidos. Los “rafts” se encuentran en estado Lo en las membranas y son capaces de seleccionar e incluir proteínas específicas, funcionando como plataformas que agrupan y determinan funciones básicas de la célula (Brown and London 1998b; Simons and Vaz 2004; Pike 2006).

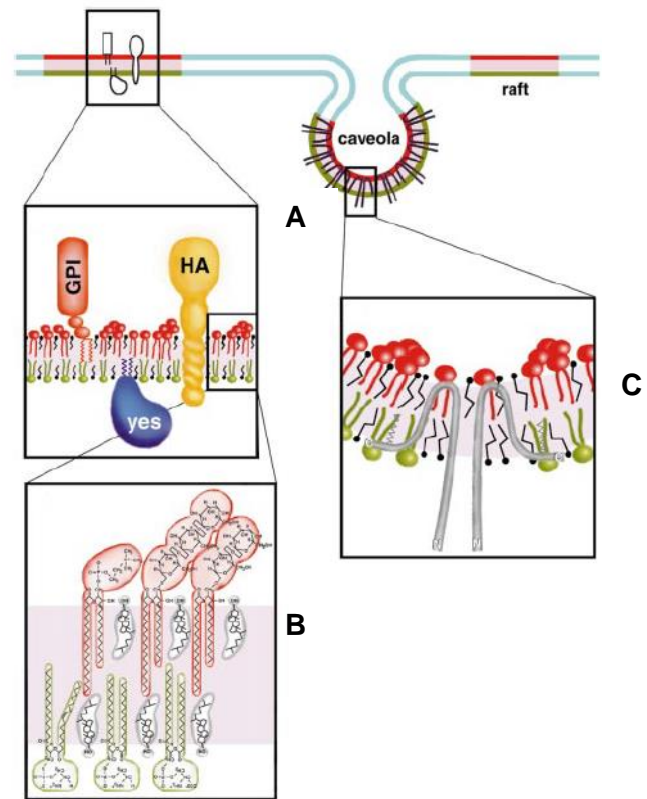
La única estructura de membrana que posee las características de dominio “raft” y que ha sido morfológicamente identificable corresponde a la caveola (Kurzchalia and Parton 1999). En este término se agrupan las invaginaciones de 50-100 nm de diámetro encontradas en la membrana plasmática de diversos tipos celulares, pero particularmente abundante en fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y musculares (Galbiati et al. 2001; Parton and Richards 2003). El primer componente estructural identificado en estos microdominios fue caveolina, proteína que se une directamente al colesterol de la membrana plasmática y representa un componente indispensable para la estabilización de la caveola (Smart et al. 1999; Pike 2003).

#### **1.3.2 Propiedades generales de los “lipid rafts”:**

La Fig. 3 esquematiza el modelo de la organización de los “rafts” en las membranas plasmáticas celulares. Los SPLs se encuentran asociados lateralmente entre ellos a través de débiles interacciones, las cabezas azucaradas ocupan mayores áreas que las colas aciladas, sin embargo, cualquier espacio es llenado por las moléculas de colesterol que funcionan como espaciadores (Fig 3B). Aunque los SPLs se encuentran sólo en el lado exoplasmático de la membrana, sus largas cadenas acil se interdigitan entre los lípidos de la cara citoplasmática, por lo que se espera que la organización presente en la cara externa de la membrana se refleje en la cara interna, para mantener una conexión activa entre los dos lados de la membrana (Simons and Ikonen 1997).

**Figura 3: Modelo clásico de la organización de los “rafts” y la caveola en la membrana plasmática.**

**A)** Los “rafts” (en rojo) se encuentran segregados de otras regiones de membrana (en azul). Contienen diversos tipos de proteínas unidas por el lado exoplásmico, citoplasmático o transmembrana a los microdominios. **B)** La bicapa lipídica que compone los “rafts” es asimétrica, compuesta por esfingomielina y glicosfingolípidos (en rojo) enriquecidos en la cara extracelular y glicerofosfolípidos en la cara interna (en verde). El colesterol (en gris) está presente en ambas caras y llena los espacios bajo las cabezas polares de los esfingolípidos o entre las cadenas acil. **C)** La caveola esta estabilizada por la presencia de moléculas de caveolina que le dan la forma a esta estructura de membrana (Figura modificada de Simons and Ikonen 1997)



Una variedad de métodos han sido utilizados para la investigación de los “rafts”, algunos de ellos requieren destrucción celular y otros se realizan en células vivas e intactas (Lagerholm et al. 2005). El primer método que permitió definir bioquímicamente los “rafts”, fue desarrollado basándose en la resistencia a la extracción con detergentes no iónicos de algunos componentes de los “rafts” (Brown and Rose 1992). Esta definición inicial dio origen a diferentes pseudónimos tales como, TIMs (membranas insolubles a TX-100), GEMs (membranas enriquecidas en glicosfingolípidos), CEMs (membranas enriquecidas en colesterol), DIGs (membranas enriquecidas en glicosfingolípidos, detergente-insolubles) y DRMs (membranas resistentes a detergente) (Pike 2003).

La insolubilidad a detergentes no-iónicos ha probado ser una herramienta útil como punto de partida en el análisis de los dominios de membrana correspondientes a “rafts”, ya que si bien esta técnica puede subestimar la asociación de proteínas y lípidos a los microdominios lipídicos, elimina la posibilidad de obtención de dominios artificiales creados por la técnica, o la asociación de proteínas ausentes de los “rafts” a los DRMs obtenidos (Hanada et al. 1995; Sheffele et al. 1997; Schroeder et al. 1998; Babychuk and Draeger 2006). Aún cuando, en la actualidad se acepta que las fracciones insolubles obtenidas producto de la técnica utilizada, no representan el estado nativo de los “lipid rafts” en la membrana celular (Munro 2003; Lichtenberg et al. 2005). Además de que se cuenta con técnicas de mayor complejidad y especificidad para la caracterización de “rafts” a diferentes escalas (Mayor and Rao 2004; Lagerholm et al. 2005).

Los componentes específicos de la membrana que son selectivamente asociados a los “rafts” (independientemente del tipo celular) han sido denominados marcadores de “rafts”, ejemplos clásicos los constituyen la familia de proteínas unidas mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) al lado extracelular de la membrana plasmática, (Brown and Rose 1992; Chatterjee and Mayor 2001); la familia Src-tirosina quinasa, unidas por acilación al lado intracelular de la membrana; proteínas palmitoiladas o miristoiladas como las flotilinas (Rajendran et al. 2003); proteínas unidas a colesterol de membrana como caveolina (Kurzchalia and Parton 1999); ciertas isoformas de proteína G; y proteínas unidas a fosfolípidos como las anexinas (Babychuk and Draeger 2000).

Entre las múltiples funciones establecidas para los “rafts” destacan: tráfico de proteínas y lípidos, mantención de la polaridad epitelial de lípidos y proteínas, mantención de la organización del citoesqueleto, transducción de señales intracelulares, regulación de las señales dependientes de ceramida/esfingomiolina, etc. (Schuck and Simons 2004). Adicionalmente, muchos agentes patógenos tales como bacterias, virus y priones interaccionan con elementos “rafts” en las primeras etapas de la infección celular, por lo que los “rafts” tienen un rol directo en la generación de diversas patologías (Simons and Ehehalt 2002).

Por otra parte, los “rafts” están directamente involucrados en la estructuración y organización celular, y son por lo tanto, importantes en la mantención de la funcionalidad de los diversos tejidos, de los órganos y sistemas (a nivel macromolecular), como en el caso particular de la placenta.

## **2. La placenta humana y su estructura de término:**

La placenta es un órgano fetal transitorio que junto a las membranas fetales y el fluido amniótico, constituye la base para el desarrollo y crecimiento normal del feto. Está compuesta tanto por tejido fetal derivado del saco coriónico, como de tejido materno derivado del endometrio. La región fetal, en la placenta de término, es denominada lámina coriónica, región que mantiene los vasos sanguíneos fetales, radiales al cordón umbilical. La región materna, por otro lado, es denominada lámina basal. Entre ambas láminas se encuentra el espacio intervelloso, el cual, en forma ramificada y altamente empaquetada, contiene las estructuras vellosas, principales unidades funcionales de la placenta, dentro de las cuales se encuentran los vasos fetales sanguíneos (Gude et al. 2004).

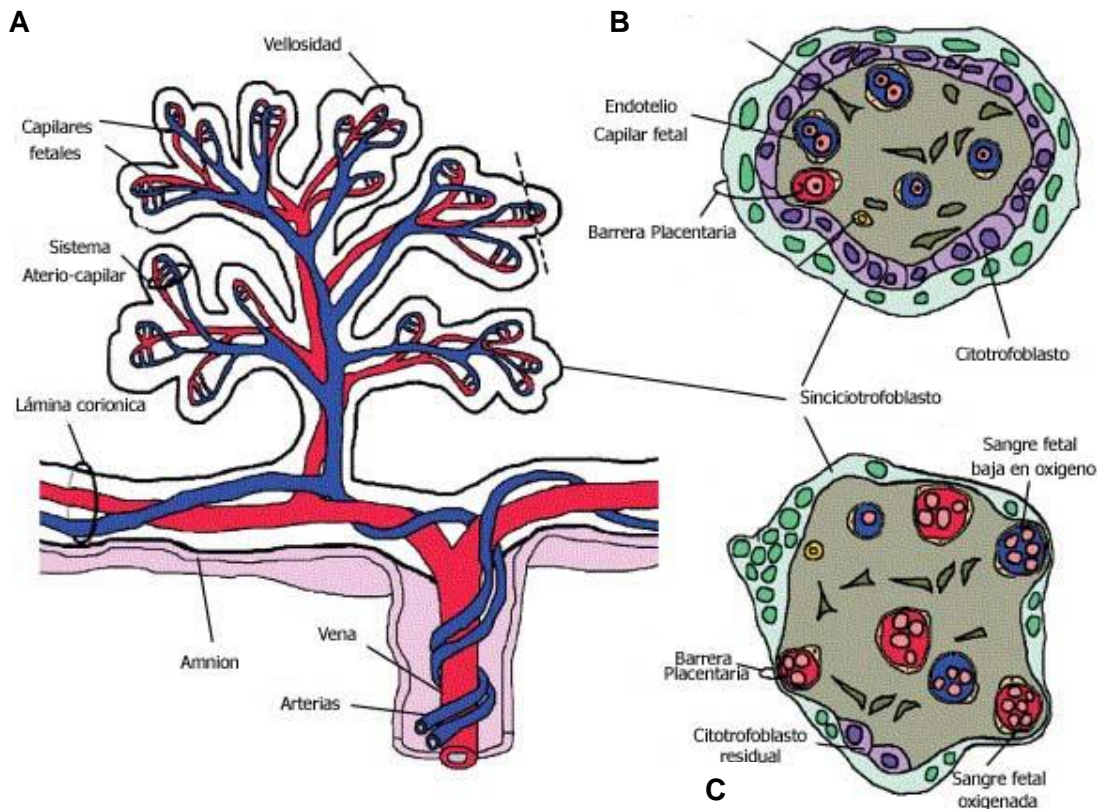
El espacio intervelloso está completamente rodeado de un tejido sincicial multinucleado, el sinciciotrofoblasto placentario (STP). Por una parte, la sangre materna entra al espacio a través de las arterias endometriales y baña las vellosidades drenándolas de vuelta por las venas endometriales. Mientras que, la sangre fetal (baja en oxígeno) pasa a través de las venas umbilicales y las arterias coriónicas, en el interior de las vellosidades coriónicas, donde es oxigenada en los capilares, para luego retornar al feto vía vena umbilical (Fig. 4A) (Gude et al. 2004 ).

### **2.1 La barrera placentaria:**

La barrera placentaria está compuesta de las capas celulares que separan la sangre materna del espacio intervelloso y la sangre fetal en los vasos de las vellosidades. Inicialmente la barrera está conformada por un conjunto de 4 capas celulares; el STP por la cara materna, una capa de células de citotrofoblasto, otra de tejido conectivo de las vellosidades y por último una capa de células endoteliales de

los capilares sanguíneos fetales (Fig.4B). Sin embargo, aproximadamente a las 20 semanas de gestación la capa de células citotrofoblásticas se atenúa y desaparece. Subsecuentemente, en gran parte de las vellosidades coriónicas la barrera queda constituida sólo por tres capas e incluso en algunas áreas, el STP se vuelve en contacto directo con el endotelio de los capilares fetales y por lo tanto la sangre materna y fetal se encuentran separadas por sólo el STP, que tiene un espesor de 2-4  $\mu\text{m}$  (Fig.4C) (Gude et al. 2004 ).

**Figura 4:**



**Figura 4: Esquema representativo de los componentes de una vellosidad placentaria.**

**A)** Vellosidad representativa en donde la línea punteada muestra la posición de un corte transversal. **B)** Vista en detalle del corte de una vellosidad coriónica de 10 semanas de gestación aproximadamente. **C)** Corte de la vellosidad coriónica de placenta de término (Modificado de Gude et al. 2004 ).

## 2.2 El sinciotrofoblasto placentario:

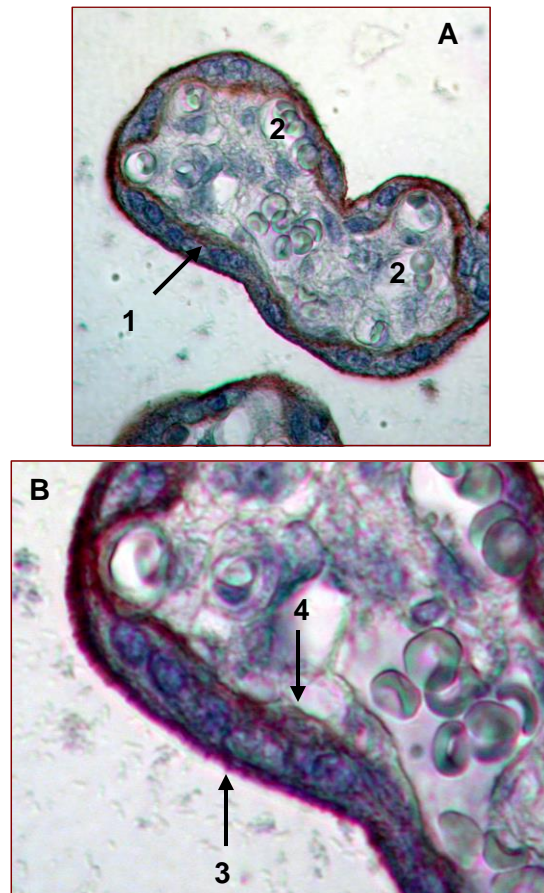
La organización del STP es consistente con una estructura involucrada activamente en el transporte específico de moléculas. El trofoblasto placentario posee una estructura epitelial; es decir la membrana plasmática se encuentra dividida en dos dominios los cuales separan dos compartimentos distintos. Por otro lado, es también un sincicio, ya que no tiene rutas paracelulares. Esto implica que todo intercambio de solutos se realiza sólo a través de las membranas del STP, entre la cara fetal o membrana basal (BM) y la cara materna o membrana apical (MVM). La MVM cubre una extensa superficie, ya que tiene forma de ribete de cepillo (brush border) (Fig.5). Por esto constituye la principal barrera al transporte materno-fetal (Stulc 1997; Lyden et al. 2002).

### Figura 5: Inmunohistoquímica de una vellosidad placentaria (5 $\mu\text{m}$ ).

**A)** Vista general de un corte transversal (utilizando anti-PLAP), que muestra la morfología de una vellosidad. El STP (1) separa el lado materno del fetal, en el cual se distinguen los capilares sanguíneos (2) con glóbulos rojos.

**B)** En el detalle del corte, es posible observar la estructura multinucleada del STP (núcleos en azul), la ubicación de la membrana apical (3) y la basal (4).

(Fotografía modificada de los registros del Laboratorio).





Se han tratado de establecer los mecanismos moleculares involucrados en la mantención del transporte materno-fetal que ocurre a través del STP. En esta búsqueda se han identificado diversos componentes (transportadores, bombas, canales iónicos, etc) así como también, los distintos mecanismos de regulación y modulación. Sin embargo, hasta la fecha el modelo de transporte no está completamente caracterizado.

Debido a la estructura sincicial del trofoblasto placentario, los estudios de transporte se han realizado fundamentalmente en membranas purificadas, tanto de la cara fetal, como de materna. Para esto se han desarrollado protocolos específicos que permiten la obtención de membranas purificadas BM y MVM (Glazier et al. 1988; Illsley et al. 1990; Riquelme et al. 1995; Jimenez et al. 2004). En particular, Jimenez et al. (2004), utilizando un protocolo de obtención simultánea de membranas apical y basal, describió la presencia de otra fracción apical, denominada L-MVM, adicional a la MVM obtenida mediante el uso del protocolo. Esta fracción tiene características similares a MVM, en cuanto a enriquecimiento de marcadores apicales y actividades enzimáticas, pero esta caracterizada por menor densidad y cantidad de proteínas totales (Jimenez et al. 2004). Es particularmente importante notar, que el STP constituye el único tejido en donde se ha descrito la presencia de dos fracciones apicales. Sin embargo, no se ha establecido aún el origen de su presencia.

En el dominio apical de diversos tejidos epiteliales, se ha estudiado y caracterizado la presencia de "rafts", y se han logrado identificar procesos claves en donde los componentes de estos microdominios participan activamente ya sea regulando la mantención de la polaridad del epitelio o indirectamente en forma regulatoria (Rajendran and Simons 2005). Además en este dominio se comprobó la co-existencia de las fase Ld y Lo, y se postula que debido a su particular composición lipídica, en la membrana apical de los epitelios polarizados, la fase predominante sería la Lo y no la Ld, como en el común de las membranas celulares (Meder et al. 2006 ). Sin embargo, a pesar de evidencias tales como el enriquecimiento de marcadores-rafts en MVM o de la similitud de la composición de esta fracción con la de los microdominios (Paradela et al. 2005), no se ha establecido formalmente la presencia de microdominios en las fracciones apicales del STP, los que podrían ser

fundamentales en la determinación de la causa de la presencia de L-MVM en este epitelio en particular, y más importante aún, los “rafts” podrían dar nuevas señales de la organización estructural del dominio apical del STP, que se relaciona directamente con la organización funcional de la barrera placentaria.

Los “rafts” constituyen herramientas versátiles para la compartimentación celular de procesos de membrana, y por lo tanto su caracterización representa la clave para el entendimiento de la fisiología de la placenta, más específicamente, del transporte materno-fetal, y constituye la base para entender como se generan las diversas patologías que afectan a la madre y el desarrollo del feto.

### **3. Hipótesis:**

La membrana apical (MVM) y la liviana apical (L-MVM) de sinciciotrofoblasto humano contienen "lipid rafts" con características propias.

### **4. Objetivo general:**

Obtener y caracterizar la presencia de microdominios lipídicos en MVM y L-MVM de sinciciotrofoblasto humano, de acuerdo a marcadores específicos de "rafts".

### **5. Objetivos específicos:**

1. Cuantificar y comparar la cantidad de colesterol en las fracciones de membranas aisladas MVM y L-MVM de sinciciotrofoblasto.
2. Obtener microdominios de membrana resistentes a solubilización con detergente (DRMs) a partir de membranas aisladas MVM y L-MVM .
3. Caracterizar los DRMs obtenidos a partir de fracciones apicales aisladas (MVM y L-MVM), de acuerdo al perfil de marcadores específicos de "rafts"
  - 3.1. Proteicos: Detectar la presencia de Fosfatasa Alcalina placentaria (PLAP) y Anexina A2 (Anx 2), en las fracciones de DRMs.
  - 3.2. Lipídicos: Cuantificar Colesterol total y detectar enriquecimiento de gangliósido GM1 en las fracciones de DRMs obtenidas a partir de MVM y L-MVM.

## METODOLOGÍA

---

### 1. Purificación de membranas placentarias.

Las fracciones purificadas se prepararon rutinariamente según lo reportado por (Jimenez et al. 2004). Placentas de término procedentes de pacientes con embarazos fisiológicamente normales, fueron obtenidas desde la Unidad de Maternidad del Hospital San José y transportadas inmediatamente al laboratorio en hielo.

Se cortaron 100 g de cotiledones, y se lavaron con NaCl 0.9%. El tejido fue resuspendido en Solución tampón A (250 mM sacarosa; 10 mM Tris-Hepes pH 7,4; 0,7  $\mu$ M Pepstatina A; 1,1  $\mu$ M Leupeptina; 80 mM Aprotinina) y homogeneizado. El tejido fue sometido luego a varias etapas de centrifugación diferencial, para eliminar los diversos organelos intracelulares, el citosol y particularmente las mitocondrias. Luego, la suspensión se agitó en presencia de 12 mM MgCl<sub>2</sub>, procedimiento que mediante centrifugación logró la separación de la fracción apical (sobrenadante) de la basal ("pellet") del STP. El sobrenadante obtenido, correspondiente a la fracción microsomal apical, se sometió a una purificación en gradiente de sacarosa para la obtención de las fracciones finales purificadas MVM y L-MVM.

La composición de las gradientes de sacarosa utilizadas en la purificación fue de 37% y 45% (p/v) en solución Tris-Maleato 20 mM pH 7,4, recuperando la banda correspondiente a la fracción L-MVM en la concentración 37% de sacarosa de la gradiente y la fracción MVM en la interfase 37/45% de sacarosa. Las fracciones obtenidas, se lavaron, centrifugaron y resuspendieron, almacenando las alícuotas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

La pureza y enriquecimiento de las fracciones fueron determinados rutinariamente utilizando ensayos de actividad enzimática, "Western Blot" y otros. En este caso, utilizando el marcador epitelial de membrana apical PLAP (Valtek Diagnostics, Santiago Chile). La concentración de proteínas fue determinada por el método del Ácido Bicinonínico (Pierce Biotechnology, Inc.).

## 2. Purificación de DRMs:

Se tomaron 0,6 mg de proteína total de L-MVM y MVM purificadas, y se llevaron a 1 ml final con solución de homogenización (TX-100 1,1 % v/v; MES 25 mM; NaCl 150 mM; pH 6,5) se homogenizaron 30 veces manualmente con homogenizador vidrio-vidrio, en hielo (ver Fig.6). El homogenizado fue incubado por 90 min en hielo y luego mezclado con 1 ml de solución de sacarosa 80%, usando una jeringa de tuberculina con aguja calibre 22. El lisado (2 ml al 40%) fue cargado en el fondo de un tubo de centrifuga (rotor Sorvall AH-650). Para la formación de la gradiente discontinua, sobre la solución 40%, se cargaron 2 ml de solución de sacarosa 35% y 1 ml de solución de sacarosa 5%. La gradiente fue ultracentrifugada a 40K (217000 x g) por 22h a 4°C. Se recolectaron arbitrariamente 10 fracciones de 0,5 mL, desde la parte superior de la gradiente, usando una bomba peristáltica. Estas fueron denominadas: Fracciones Recolectadas de la Gradiente final (FsRG), además el “pellet” fue resuspendido en 0,5 mL de buffer MBS (MES 25 mM; NaCl 150 mM; pH 6,5) y fue agregado como FRG nº 11 al estudio. Todas las fracciones fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

Figura 6:

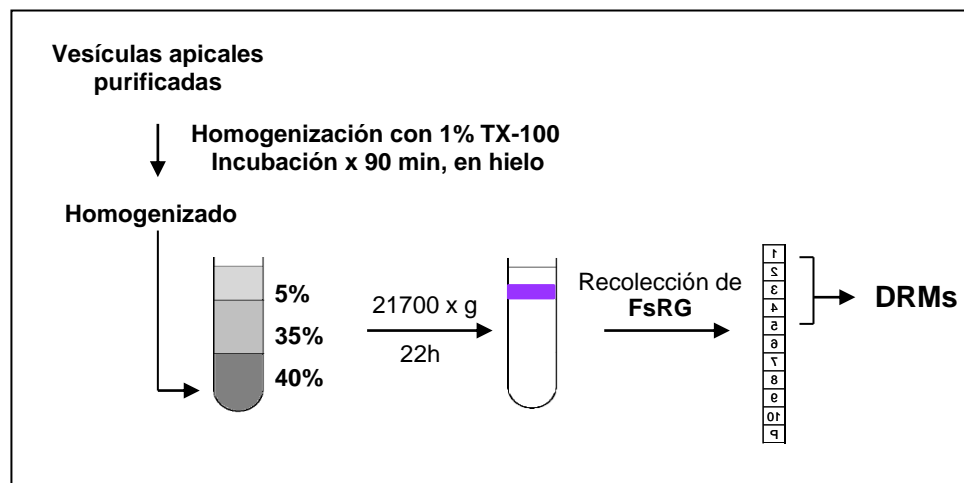


Figura 6: Diagrama de los principales pasos incluidos en el protocolo implementado para la obtención de DRMs desde L-MVM y MVM.

### **3. Tratamiento con metil- $\beta$ -Ciclodextrina (m $\beta$ CD):**

Previamente al procedimiento de extracción con detergente, el volumen de fracción apical correspondiente a 0,6 mg de proteína fue incubado a 37°C por 30 min, en 1 mL de solución de m $\beta$ CD al 2% p/v, luego se centrifugó a 40K (155000 x g) por 2 hrs a 4°C usando el rotor Sorvall T865.1. El “pellet” fue resuspendido en 1 ml de solución de homogenización, y se continuó con el protocolo de purificación de DRMs descrito anteriormente.

Para el análisis de la eficiencia de la extracción de colesterol, se tomaron 30  $\mu$ L de cada fracción apical y se llevaron a un volumen final igual a 1 mL con solución de m $\beta$ CD al 2% p/v, luego el homogenizado fue incubado a 37°C por 30 min y centrifugado a 21000 x g (Micromax RF). Se descartó el sobrenadante, y el “pellet” fue resuspendido en 30  $\mu$ L de solución Tris-Maleato 20 mM; pH 7,4 y utilizado inmediatamente para la determinación de colesterol total.

### **4. Determinación de colesterol total:**

En la medición de colesterol de L-MVM y MVM, se utilizó un kit de determinación enzimática de colesterol sérico (Roche Diagnostics GMBH, USA,) que contiene colesterol esterasa y oxidasa. El colesterol oxidado reacciona con 4-aminofenazona y fenol, producto de lo cual se libera 4-(p-benzoiquinona monoimino)-fenazona, la cual es determinada espectrofotométricamente a 505 nm.

### **5. Electroforesis SDS-PAGE y “Western Blot”:**

Volúmenes constantes (50  $\mu$ L) de cada FsRG fueron incubadas por 30 min en hielo con TCA al 10% v/v y luego precipitadas mediante centrifugación a 21000 x g por 45 min a 4°C. El “pellet” fue resuspendido en 20  $\mu$ L de Solución amortiguadora de muestra (Tris 25 mM; glicerol 50%; SDS 10%; ditiotretitol 50 mM y azul de bromofenol 0,5%; pH 6,8), hervido por 5 min, y sometido a sonicación dos veces por 15 min. Todas las muestras fueron cargadas y resueltas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, con SDS como agente denaturante (SDS/PAGE) a TA y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad Laboratories) a 30 Volts

durante toda la noche a 4°C. El bloqueo se realizó en solución de bloqueo al 3% (leche descremada 3% p/v, NaCl 138 mM; KCl 270 mM; Tween 0,05% p/v). Posteriormente, la membrana fue incubada por 1 hora a TA con: anticuerpo monoclonal anti-PLAP (1:5000) o anti- hTf-R (1: 500), y policlonal anti-Anx 2 (1:1000). Luego de lavar con solución de lavado (NaCl 138 mM, KCl 270 mM, Tween 0,05% p/v) las membranas fueron incubadas por 1 hora a TA con anti-rabbit (1:5000) o anti-mouse (1:10000) conjugado con peroxidasa, lavadas nuevamente y reveladas con el sistema de detección ECL Blotting Análisis System (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

## **6. “Dot Blot”:**

De cada FsRG se tomaron 3  $\mu$ L y se sembraron directamente en una membrana de nitrocelulosa (BioRad Laboratories), la que luego fue secada durante 1 hora y posteriormente bloqueada a TA por 2 horas con BSA 3% en PBS 1X (NaCl 128 mM, KCl 2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, pH 7,2). Posterior al lavado con PBS la membrana se incubó toda la noche a 4°C con la sub-unidad  $\beta$  de la toxina colérica (1:10000) conjugada con peroxidasa y finalmente fue revelada con el sistema de detección ECL Blotting Análisis System.

El análisis densitométrico de las bandas tanto de los “Western”, como de los “Dot Blots”, se realizó utilizando el programa UN-SCAN-IT gel versión 4.1 (Silk Scientific Corporation, Orem, UT, USA).

## **7. Análisis estadístico:**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  SEM (error estándar del promedio). Los datos fueron sometidos a un test de normalidad (Shapiro-Wilk) para evaluar la distribución. La significancia estadística fue probada usando el test de Student para datos no pareados, considerando significativos aquellos datos con un valor  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Las membranas apicales purificadas MVM y L-MVM, fueron obtenidas tal como se describe en Metodología, utilizando el protocolo descrito por Jiménez et al 2004, a partir de un total de nueve placentas independientes, de acuerdo a las especificaciones obtenidas desde la unidad de Pre-parto del servicio de maternidad del Hospital San José.

La cantidad promedio de proteínas encontradas en L-MVM y de MVM fue de 3,65 mg (7,3 mg/mL de concentración) y 8,1 mg (8,1 mg/mL de concentración) respectivamente. La actividad de PLAP en las fracciones purificadas estuvo enriquecida 24,3 en L-MVM y 17,3 veces en MVM. Resultados que se encuentran dentro de los rangos reportados para las respectivas fracciones apicales obtenidas según el protocolo (Jimenez et al. 2004).

### 1. **Caracterización del contenido de colesterol total en L-MVM y MVM:**

Tal como se ha dicho, el STP es, hasta el momento, el único epitelio en el cual se ha descrito y aislado dos fracciones de membranas apicales (Jimenez et al. 2004), sin embargo no se han encontrado diferencias significativas en su composición. Por lo tanto no ha sido posible determinar el origen de su diferente migración en la gradiente de sacarosa, utilizada para la purificación final (ver sección 1 de Metodología).

Con el fin de dilucidar si el contenido lipídico es una diferencia importante en la composición de ambas membranas apicales, y para establecer las primeras evidencias de la existencia de microdominios lipídicos en ellas, se determinó la cantidad de colesterol total de membrana en ambas fracciones apicales purificadas.

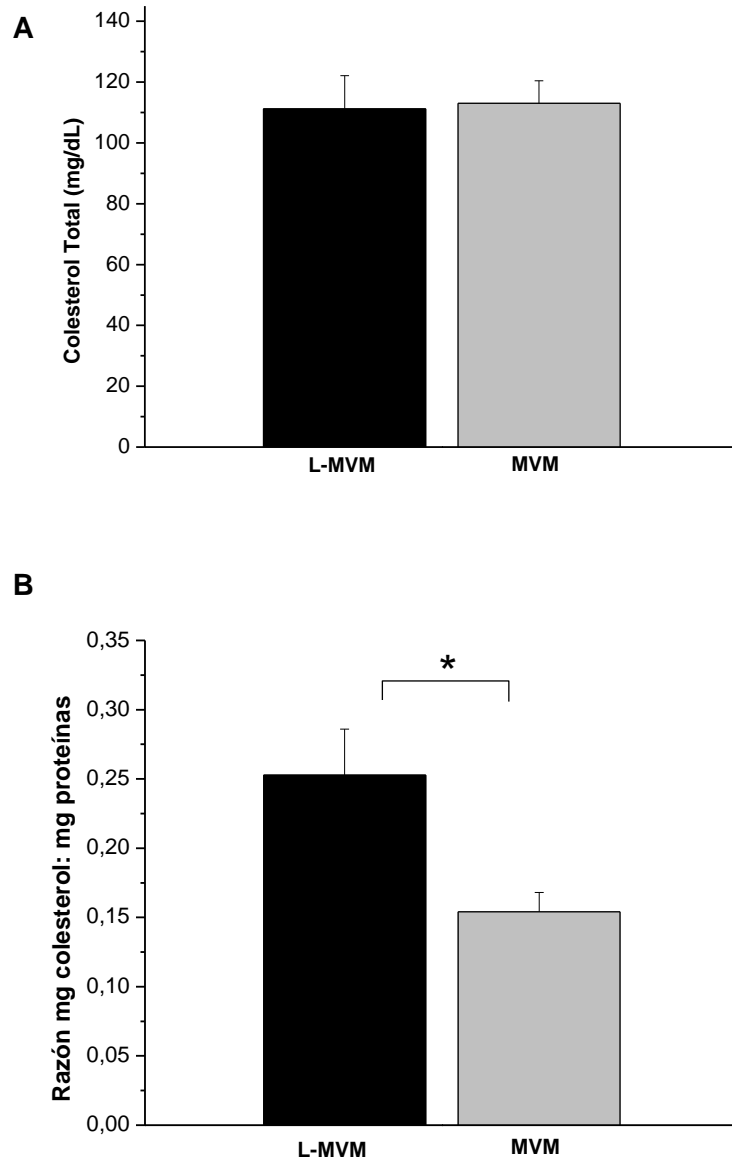
El resultado de la determinación se muestra en la Fig. 7A, según este gráfico no se encontró una diferencia significativa en el contenido de colesterol entre ambas membranas, sin embargo dadas las diferencias en la cantidad de proteínas totales de ambas membranas apicales, al normalizar este valor por la concentración de proteínas



de cada fracción, fue posible observar que la razón mg de colesterol / mg de proteínas totales, es significativamente mayor en L-MVM que en MVM (Fig. 7B).

Es importante notar que el contenido de colesterol de membrana en MVM, igual a  $0,15 \pm 0,01$  mg de colesterol /proteína total, concuerda con lo reportado previamente en la fracción apical MVM (Jansson et al. 1993). Por otro lado, el contenido de colesterol de membrana presente en L-MVM, igual a  $0,25 \pm 0,03$  mg de colesterol/ mg proteína, constituye la primera evidencia de la composición lipídica de esta fracción apical. Además, las diferencias en la composición de colesterol entre L-MVM y MVM, podrían ser una explicación a las distintas densidades que se observan entre ambas fracciones.

**Figura 7:**



**Figura 7: Determinación del contenido de colesterol total de membrana.**

**A)** Cantidad (mg/dL) de colesterol total encontrado en L-MVM y en MVM ( $n = 9$ , promedio  $\pm$  SEM, de 6 placentas independientes). **B)** Normalización de los valores mostrados en A por la concentración (mg/dL) de proteína total. Los datos corresponden al promedio de  $n = 6 \pm$  SEM para L-MVM y  $n = 5 \pm$  SEM para MVM de placentas independientes.  $*P < 0,05$ .

## **2. Estandarización del protocolo para el aislamiento de DRMs desde L-MVM y MVM, membranas apicales de sinciotrofoblasto placentario humano:**

Para la determinación de la presencia de “rafts” en ambas fracciones apicales, luego de la purificación simultánea de L-MVM y MVM desde la placenta, se implementó una metodología de extracción de microdominios lipídicos. La cual consiste básicamente en la separación de las proteínas y lípidos que constituyen los “rafts” en DRMs, ya que debido a sus propiedades biofísicas gran parte de los “rafts” no son solubilizados al tratarlos con detergente, y se pueden separar del resto de la membrana como DRMs.

El protocolo se implementó básicamente basándose en los métodos reportados por Brown and Rose (1992) y por Danielsen and Van (1995). El primero de estos autores obtuvo DRMs a partir de un lisado de células MDCK (Madin-Darby canine kidney), estableciendo el protocolo básico para la obtención de DRMs, usando Tritón X-100 (TX-100) como detergente. Por otro lado, la importancia del segundo reporte radica en la obtención de microdominios DRMs a partir de un purificado de membrana apical de intestino delgado de cerdo (no de células aisladas).

Para la definición de la cantidad de material inicial, tanto de detergente como de membrana purificada, se estableció una proporción TX-100/proteínas de membrana (p/p) cercana a 10, manteniendo constante tanto la concentración de TX-100, como la cantidad de proteínas. Tal como describió Ostermeyer et al. (1999), para descartar escasez de agente detergente en la preparación y normalizar los resultados obtenidos desde preparaciones de placentas independientes, lo cual fue posteriormente reafirmado por Babiychuk and Draeger (2006).

Las principales modificaciones de esta memoria a los reportes anteriores incluyeron:

- Utilización de material inicial puro, es decir, fracciones apicales libres de contaminación de membrana basal o de membranas de organelos intracelulares.
- Mantención de la cantidad inicial constante, 0,6 mg de proteínas, para la obtención de DRMs.

- Aumento del tiempo de incubación con el detergente, con el fin de asegurar la extracción total de los microdominios de membrana.
- Utilización de una gradiente discontinua de sacarosa, con el lisado al 40% y sobre este, sacarosa al 35% y al 5%.
- Automatización de la recolección final de las 10 fracciones, utilizando para esto una bomba con flujo peristáltico.
- Inclusión del “pellet” como FRG nº 11 en el estudio, tal como se describió anteriormente en métodos.

### **3. Caracterización de los DRMs obtenidos desde L-MVM y MVM:**

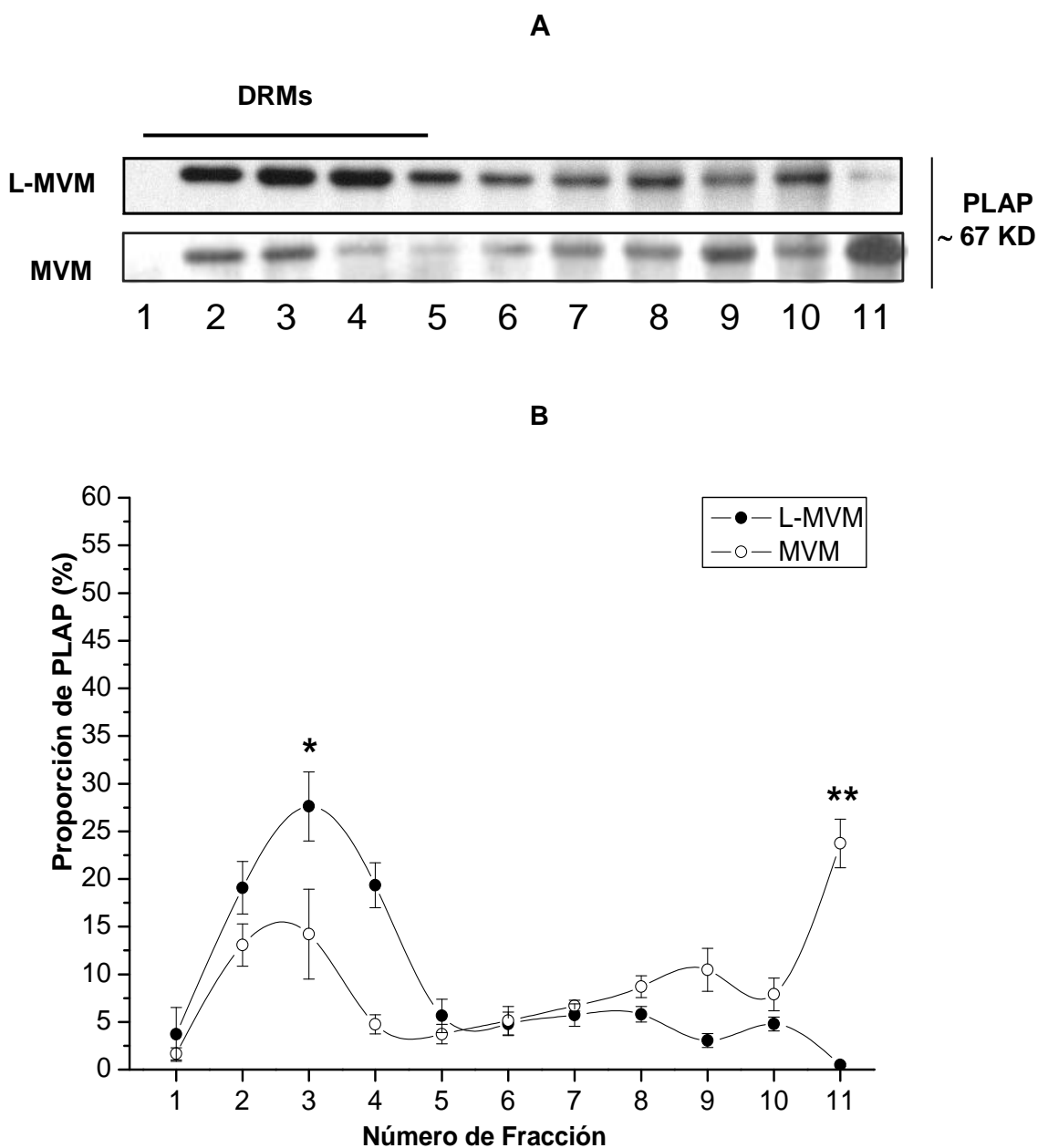
#### **3.1 Caracterización general de los complejos insolubles:**

Fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) es una proteína unida a través de GPI a la membrana, que se ubica exclusivamente en el lado exoplasmático. Aún cuando se desconoce su rol específico dentro de la membrana de las células epiteliales, ha sido ampliamente usada como marcador de membrana apical en epitelios, incluido el STP, donde es muy abundante (Illsley et al. 1990; Eaton and Simons 1995; Braccia et al. 2003).

Por largo tiempo se describió la escasa solubilización de esta proteína frente al tratamiento con detergentes no-iónicos. Sin embargo, no fue hasta 1992 cuando Brown y Rose relacionaron esta propiedad con su asociación a microdominios específicos de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol, responsables de su insolubilidad. Desde entonces es utilizada también como marcador de dominios “rafts”. (Brown and Rose 1992; Hanada et al. 1995).

Basándose en la abundancia de este marcador en ambas fracciones apicales de STP (Jimenez et al. 2004), se determinó el patrón de distribución entre las FsRG. La Fig. 8A muestra el resultado de la detección realizada por “Western Blot”, donde resulta evidente la presencia de PLAP en las fracciones de menor densidad (1-5), correspondientes a DRMs, tanto para L-MVM como para MVM. No obstante, tal como muestra la Fig. 8B, mientras en las FsRG de L-MVM la señal de PLAP se encontró enriquecida en un “peak” en la interfase 5-35%, en las FsRG de MVM, la señal de PLAP se encuentra distribuida en dos “peaks”, el 1º correspondiente a los DRMs y el 2º a la FRG nº 11. Ambos “peaks” corresponden a material insoluble, resistente a detergente, pero el “pellet” tiene una densidad intrínseca mayor. La marca de PLAP en el “pellet” de MVM es significativamente mayor a la encontrada en el “pellet” de L-MVM.

Figura 8:



**Figura 8: Distribución de PLAP en las FsRG de L-MVM y MVM.**

**A)** Imágenes representativas de los “Western Blot” contra PLAP en las FsRG de L-MVM y MVM. **B)** Curva del % de PLAP encontrado en cada fracción (con respecto a la suma de las 11 FsRG) luego del análisis densitométrico de los “immunobloting” (n = 6, promedio ± SEM, de placentas independientes. \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ ).

Para descartar deficiencias en la extracción de los DRMs en las FsRG recolectadas, se controló la presencia del Receptor de Transferrina (hTf-R), el cual ha sido ampliamente utilizado como marcador de dominios no-"rafts" (Harder et al. 1998; Gaus et al. 2005).

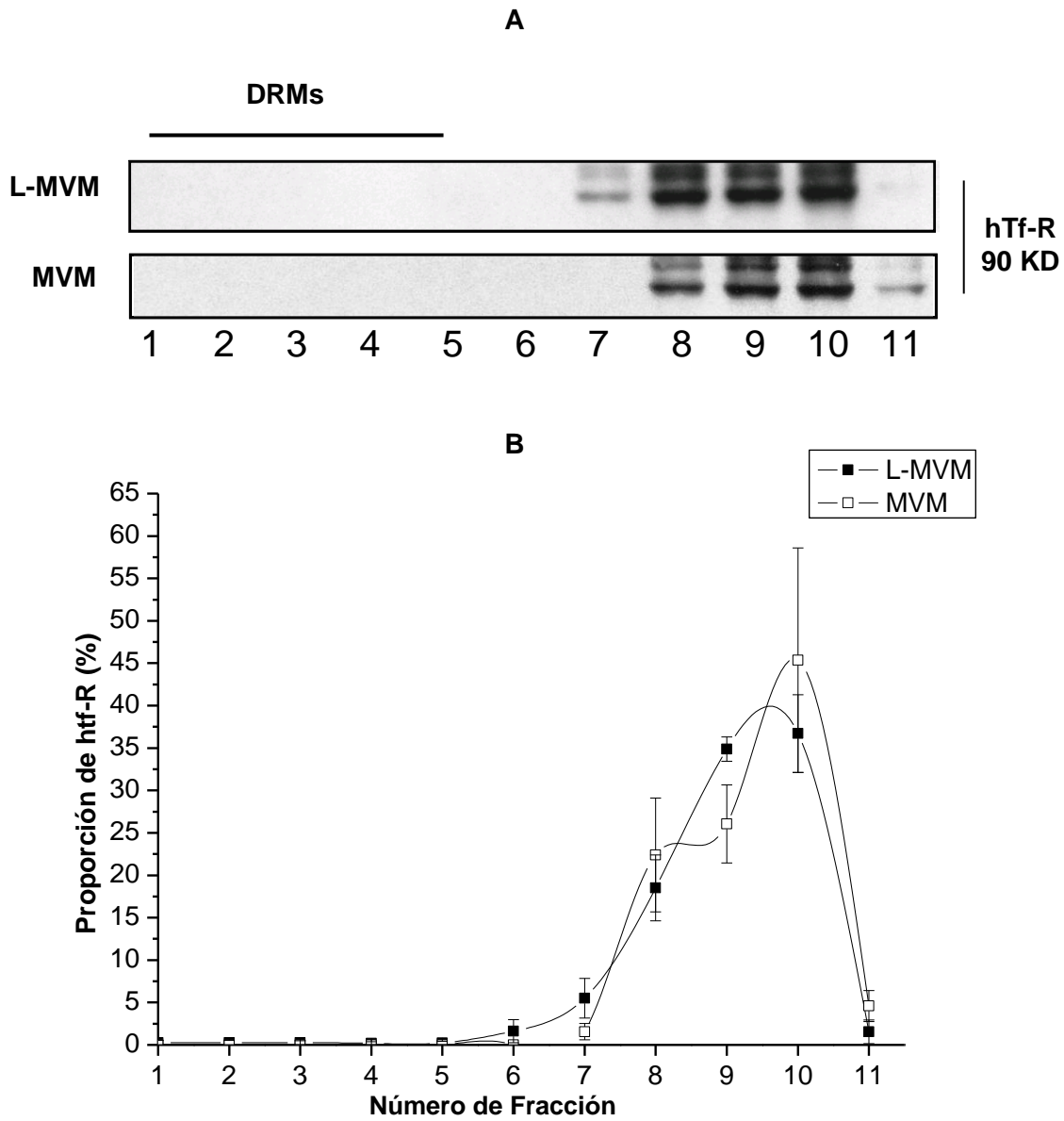
El hTf-R es una glicoproteína constitutiva de la membrana apical del STP, (Cerneus and Van der 1991; Paradela et al. 2005) que une el hierro asociado a Transferrina y lo internaliza por mecanismos de endocitosis, participando activamente del transporte de este elemento desde la sangre materna hacia la fetal.

Como muestra la Fig. 9, hTf-R estuvo totalmente ausente de los DRMs de ambas membranas apicales. Las cuales exhibieron un importante "peak" en las FsRG de alta densidad, no correspondientes a DRMs.

Estos primeros datos permitieron afirmar, primero que el protocolo puede ser empleado para la obtención de DRMs libres de contaminación y segundo, que la marca de PLAP encontrada en los DRMs es consecuente con la existencia de microdominios en ambas fracciones apicales.

Por otra parte, debido a las diferencias encontradas tanto en la proporción de colesterol /proteínas, como en la distribución de PLAP entre las FsRG apicales, resultó necesario controlar la presencia de nuevos marcadores de "rafts". Esto permitió lograr caracterizar de manera más particular cada membrana apical y establecer evidencias más concretas acerca del origen de la desigualdad de la composición entre los DRMs de L-MVM y MVM.

Figura 9:



**Figura 9: Distribución de hTf-R en las FsRG de ambas membranas apicales.**

**A)** Figuras representativas de los “immunobloting” realizados contra hTf-R en las 11 FsRG de L-MVM y MVM. **B)** Cuantificación de la presencia de hTf-R en las FsRG. Las cantidades indicadas para cada fracción corresponden al porcentaje con respecto a la suma de todas las fracciones ( $n = 4$ , promedio  $\pm$  SEM, de placentas independientes).



### **3.2 Los DRMs de la fracción apical liviana L-MVM son distintos a los de la fracción apical tradicional MVM:**

Cada FRG se analizó para la detección de dos marcadores de “lipid rafts”, adicionales. El primero de ellos, Anexina A2 (Anx 2) es una proteína abundante en el STP (Paradela et al. 2005). Anx 2 pertenece a una familia de proteínas cuya característica bioquímica central es la unión dependiente de  $Ca^{+2}$  a fosfolípidos de la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Rescher and Gerke 2004). En particular, Anx 2 se ha localizado en los “rafts” de diversos tipos celulares (Babiychuk and Draeger 2000; Danielsen and Hansen 2003; Zhao and Hardy 2004) y tiene un rol crucial en el tráfico de proteínas hacia la membrana apical en células epiteliales polarizadas (Jacob et al. 2004).

GM1, de naturaleza lipídica, corresponde al 2º marcador-rafts utilizado en la caracterización de los DRMs (Parton 1994). Los gangliósidos son compuestos que tienen un rol importante en el reconocimiento celular, en la transducción de señales y son esenciales para el desarrollo en mamíferos. En particular, este esfingolípido está involucrado en la entrada de diversos agentes patógenos, que lo utilizan como molécula de anclaje a los “rafts” para la posterior infección celular (Van der Goot and Harder 2001).

#### **3.2.1 Caracterización de los DRMs correspondientes a L-MVM:**

La Fig. 10 resume la distribución de Anx 2 y GM1, en las FsRG de L-MVM, ambos marcadores se encuentran en los DRMs de esta fracción apical. El gangliósido GM1 se visualizó por “Dot Blot” usando la sub-unidad  $\beta$  de la toxina colérica (HRP-CTX), la cual se une específicamente a GM1 de la membrana celular. Como muestra la Fig.10A, la distribución de GM1 en las FsRG es muy similar a la encontrada para PLAP, con la señal concentrada en un “peak” en los DRMs. La señal correspondiente a Anx 2 se distribuyó en dos “peaks”, siendo el área del 2º muy superior al correspondiente al primer “peak”, asociado a los DRMs, abarcando más del 90% de la señal total de Anx 2 entre todas las FsRG.

La prominente marca de Anx 2 en las FsRG no-"rafts" es un novedoso resultado, ya que si bien en otros reportes Anx 2 aparece en fracciones "rafts" y "no-rafts", dependiendo del tipo celular estudiado, generalmente lo detectado en las fracciones DRMs es muy superior a lo detectado en las fracciones solubles, por lo que la distribución encontrada las FsRG de L-MVM no parece tener una explicación evidente (Danielsen and Hansen 2003; Hansen et al. 2003; Nguyen et al. 2006).

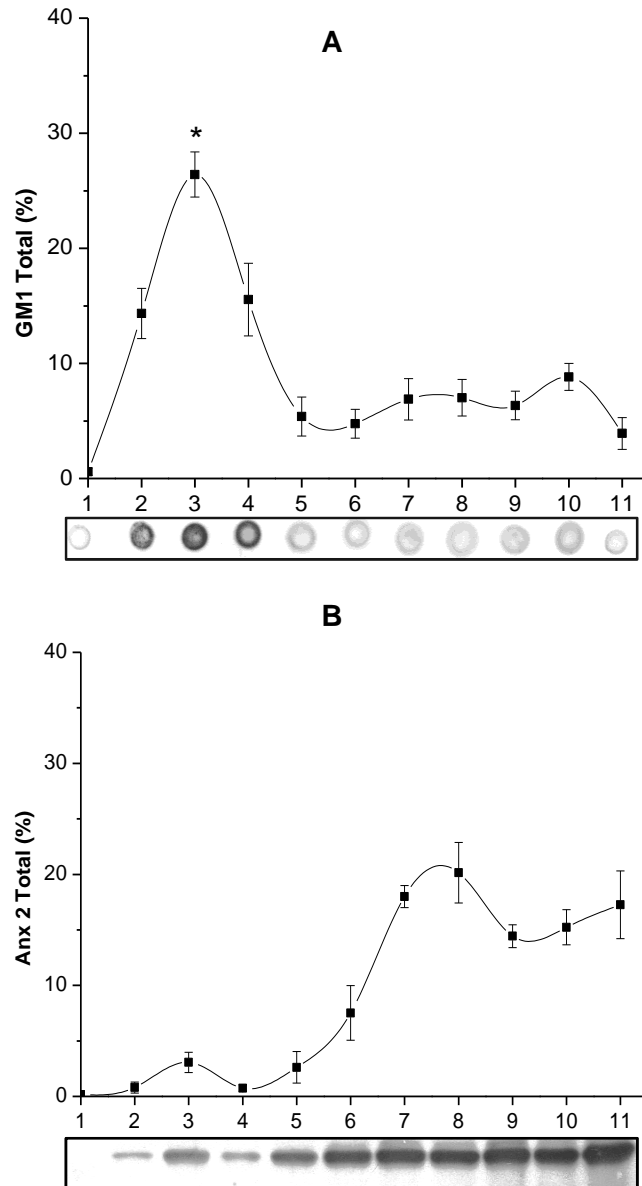
### **3.2.2 Caracterización de los DRMs correspondientes a MVM:**

La señal de GM1, se distribuyó en dos "peaks", el 1º en los DRMs y el 2º en el "pellet" (FRG nº 11), como muestra la Fig. 11A. Esta distribución es muy similar a la de PLAP y da cuenta de la presencia de marcadores-"rafts" en una FRG insoluble, de alta densidad y resistente a la extracción con detergente, debido a lo cual estos complejos no migran en la gradiente de sacarosa, a densidades en donde se recogen los DRMs.

Por otro lado, Anx 2 no se encontró asociada a los DRMs. Es decir, 100% de su señal se concentró en las fracciones de alta densidad, donde una alta proporción de su marca correspondió al "pellet" tal como muestra la Fig. 11B.

Como muestra la Fig. 12, las dos membranas purificadas apicales de STP contienen una alta cantidad de Anx 2. Lo anterior sugiere que la diferencia en el patrón de distribución de Anx 2 entre L-MVM y MVM, podría deberse exclusivamente a fenómenos de interacción molecular entre los distintos elementos que las componen. Por otras técnicas en MVM, se han encontrado una variedad de elementos del citoesqueleto (Paradela et al. 2005), estas asociaciones podrían explicar la tendencia en la distribución que han exhibido los marcadores detectados. Pudiera ser que el citoesqueleto sea una de las diferencias estructurales importantes entre las dos fracciones apicales.

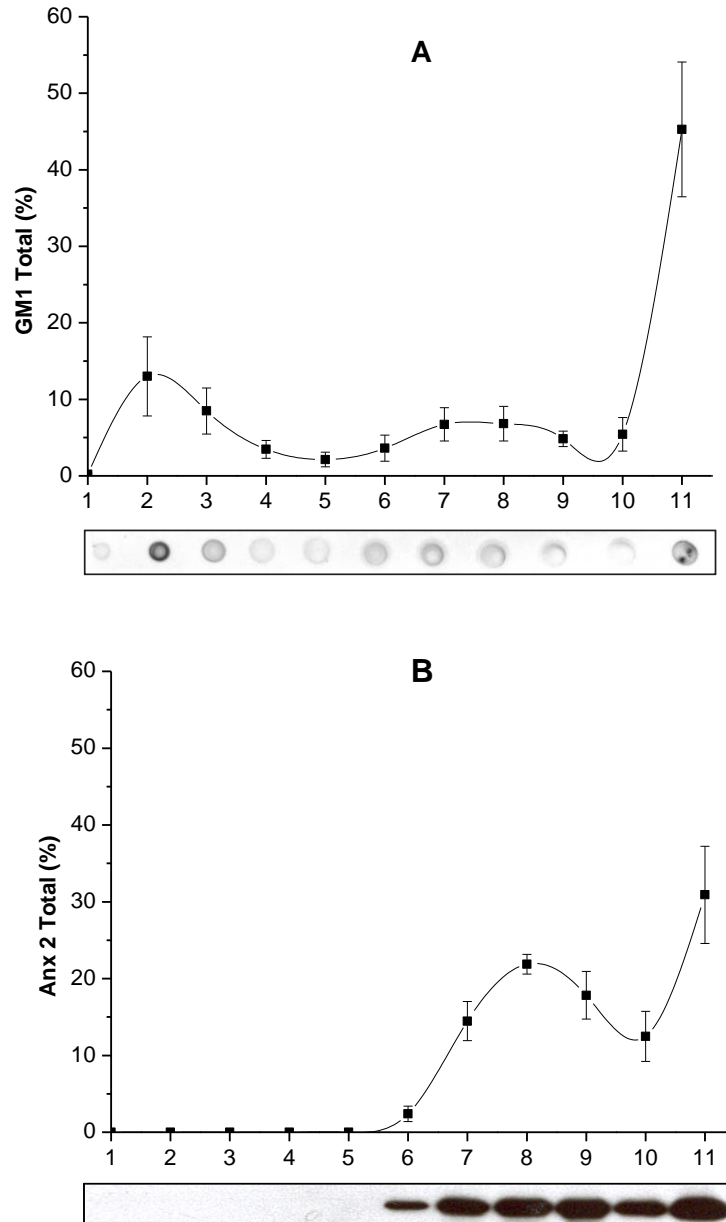
**Figura 10:**



**Figura 10: Caracterización de las FsRG de L-MVM.**

**A)** Análisis densitométrico e imagen representativa de la distribución de la señal de GM1 en las FsRG (n = 6, promedio  $\pm$  SEM \*  $P < 0,05$ ) **B)** Análisis densitométrico e imagen representativa de la distribución de la señal de Anx 2 en las FsRG (n = 6, promedio  $\pm$  SEM).

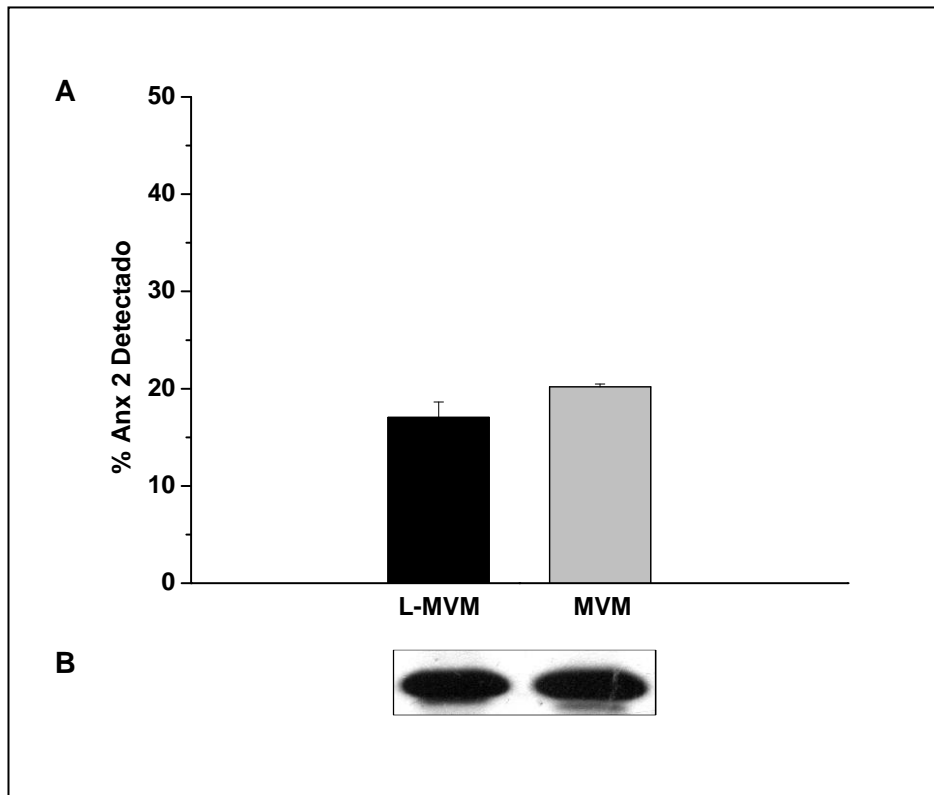
**Figura 11:**



**Figura 11: Caracterización de las FsRG de MVM.**

**A)** Análisis densitométrico e imagen representativa de la distribución de la señal de GM1 en las FsRG luego de su detección por “Dot Blot” usando HRP-CTX (n = 5, promedio  $\pm$  SEM) **B)** Análisis densitométrico e imagen representativa de la distribución de la señal de Anx 2 en las FsRG (n = 6, promedio  $\pm$  SEM).

**Figura 12:**



**Figura 12: Presencia de Anx 2 en las membranas L-MVM y MVM.**

**A)** Análisis densitométrico de la señal de Anx 2 en L-MVM y MVM detectada por "immunoblotting" (n = 6, promedio  $\pm$  SEM, de placentas independientes). **B)** Imagen representativa de la detección de Anx 2 por "Western Blot" en ambas fracciones de membrana apical.

### **3.3 Efecto de la depleción de colesterol en la distribución de los marcadores en los DRMs de L-MVM y MVM.**

Con el propósito de establecer una relación entre el contenido de colesterol en la membrana nativa y el patrón de distribución de los marcadores de “rafts” detectados, se implementó un paso previo a la extracción de los DRMs. El que consistió en la incubación a 37° C de las membranas apicales con m $\beta$ CD, para lograr mediante la formación del complejo colesterol-m $\beta$ CD, la extracción del colesterol presente en las membranas L-MVM y MVM (Ostermeyer et al. 1999 ).

En la Fig. 13 se muestran los resultados de la determinación de colesterol en membranas apicales tratadas con 0 y 2% m $\beta$ CD. Evaluación realizada para examinar el grado de extracción de colesterol alcanzado. Según el gráfico, el tratamiento efectivamente remueve el colesterol, ya que se encontraron diferencias significativas entre las razones de colesterol/proteínas entre los controles y los tratados en ambas membranas apicales.

Figura 13:

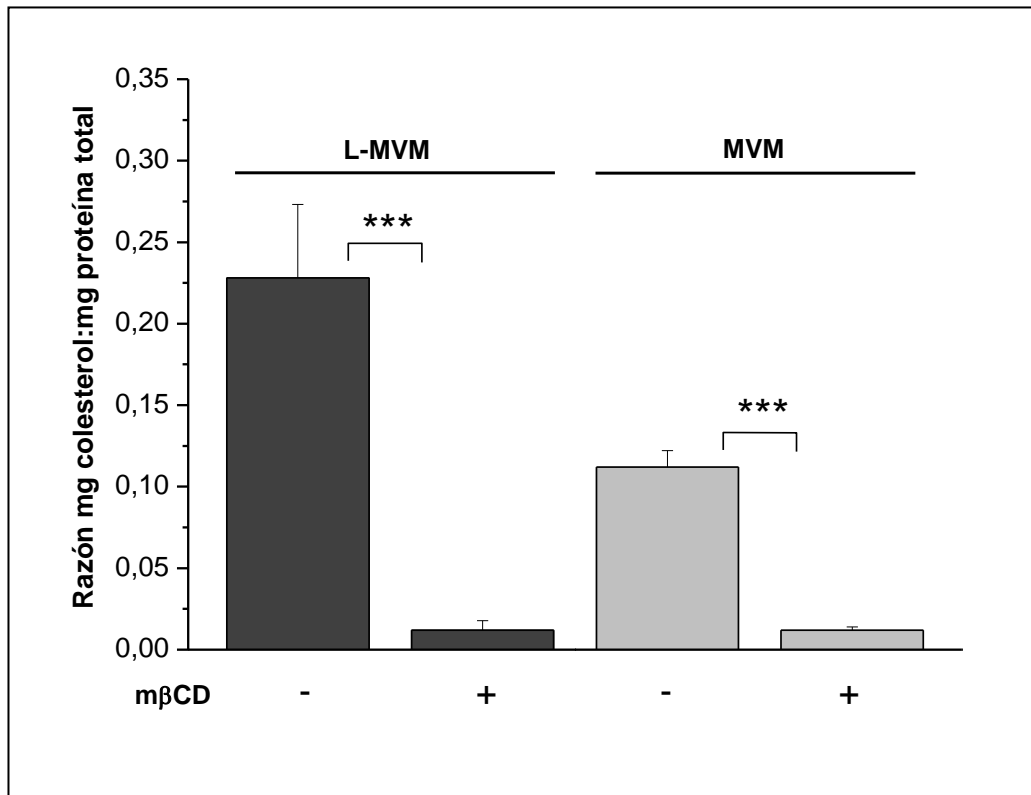


Figura 13: Gráfico del efecto del tratamiento con mβCD 2%, en la razón colesterol/proteínas.

Se comprobó que el tratamiento implementado es efectivo en extraer el colesterol de las membranas apicales (n = 5, promedio ± SEM de 5 placentas independientes.\*\*\*  $P < 0,005$ )

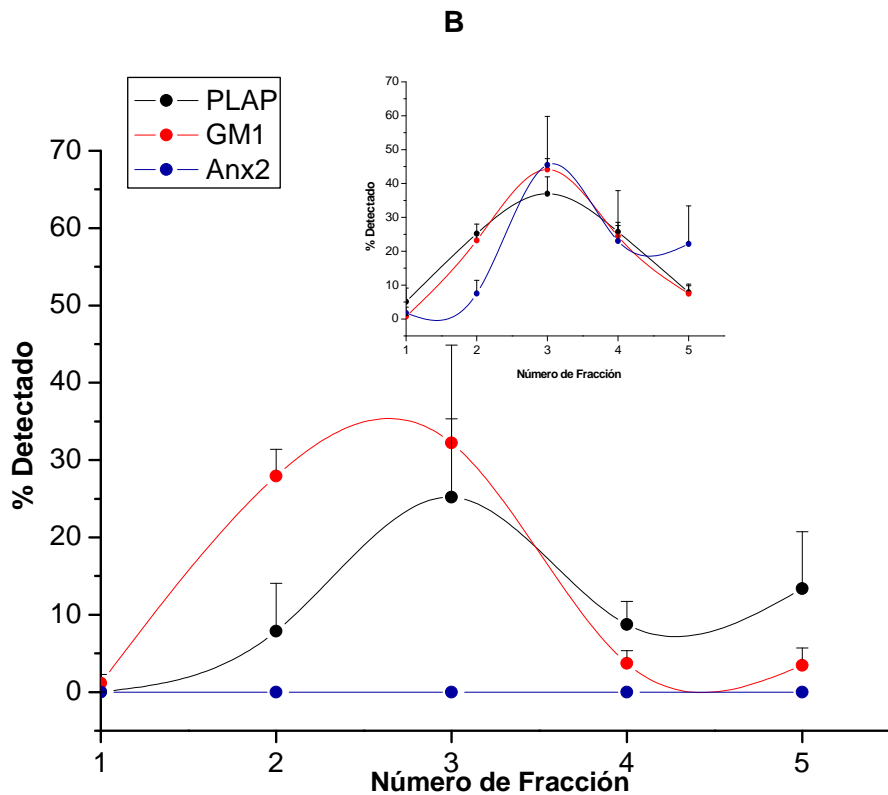
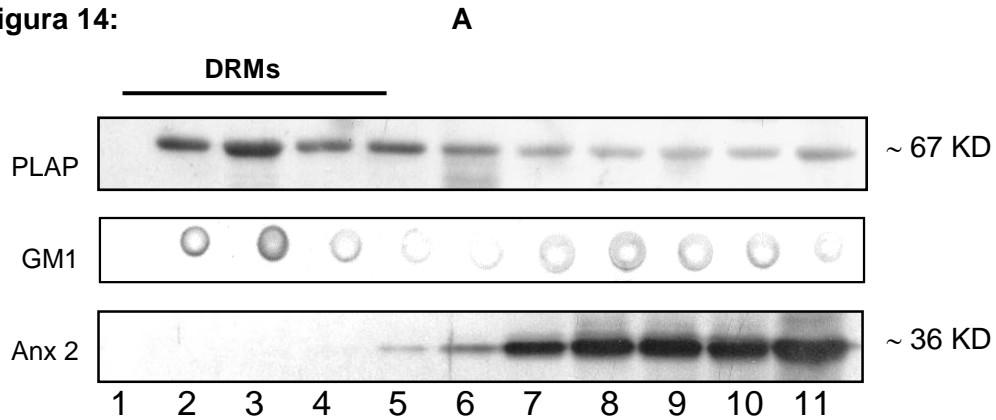
En el caso de L-MVM, la asociación de PLAP a los DRMs, no fue significativamente afectada por la eliminación del colesterol, la asociación de PLAP a los DRMs parece ser independiente de la presencia de colesterol en la membrana. Tal como se había reportado en otros tipos celulares (Roper et al. 2000; Paladino et al. 2004). Por otro lado, el tratamiento de depleción de colesterol perturbó considerablemente la asociación de GM1 con los DRMs de L-MVM, la señal fue removida significativamente, pero no en su totalidad. Al igual que lo sucedido con PLAP, esto ha sido demostrado con anterioridad, es decir, los glicosfingolípidos no son totalmente solubilizados al extraer el colesterol (Ostermeyer et al. 1999). Anx 2 al contrario de los otros dos marcadores utilizados, mostró una dependencia completa al colesterol para su asociación a los DRMs de L-MVM, ya que fue totalmente solubilizada por el tratamiento de extracción de colesterol, tal como muestra la Fig.14A. Este fenómeno podría tener su origen en la estrecha relación que mantiene esta proteína con los lípidos de la cara interna de la membrana plasmática.

El análisis detallado de la redistribución de los marcadores en las FsRG, correspondientes a DRMs, se muestra en la Fig. 14B. Para esto se consideró la suma de la señal de cada marcador presente en las fracciones desde 1 a la 5, como el total de marca en los DRMs, por lo tanto se normalizó la señal de cada marcador respecto al total de marca en los DRMs control (obtenidos desde L-MVM tratada con m $\beta$ CD 0%).

En el caso de PLAP, el principal cambio en la curva, que da cuenta del tratamiento con ciclodextrina, es la disminución no significativa de área de la curva y la agudización de la señal de los DRMs en la fracción n $^{\circ}$  3 (correspondiente a la interfase de la gradiente 5%/35%). El área de la curva de GM1 por otro lado, disminuyó levemente con respecto a la curva control, y además se desplazó hacia las fracciones 2 y 3. La señal de Anx 2, fue eliminada indiscutiblemente de los DRMs.



Figura 14:



**Figura 14: Efecto de la extracción de colesterol en los DRMs de L-MVM.**

**A)** “Immunoblotting” representativos de la distribución de los marcadores GM1, Anx 2 y PLAP, en las FsRG. **B)** Análisis densitométrico de la redistribución de los marcadores, en las FsRG correspondientes a DRMs luego del tratamiento con 2% m $\beta$ CD. Los valores corresponden al porcentaje promedio de cada fracción con respecto a la suma de las 5 fracciones (n=3, promedio  $\pm$  SEM). El gráfico inserto muestra la distribución original de los controles (n = 6, promedio  $\pm$  SEM).

En el caso de MVM, como muestra la Fig. 15A, la depleción selectiva de colesterol de membrana no afectó la magnitud de la marca de PLAP detectada en los DRMs, sin embargo disminuyó considerablemente la señal presente en las fracciones de mayor densidad (6-11), con respecto a lo ya observado en la Fig. 8A para MVM.

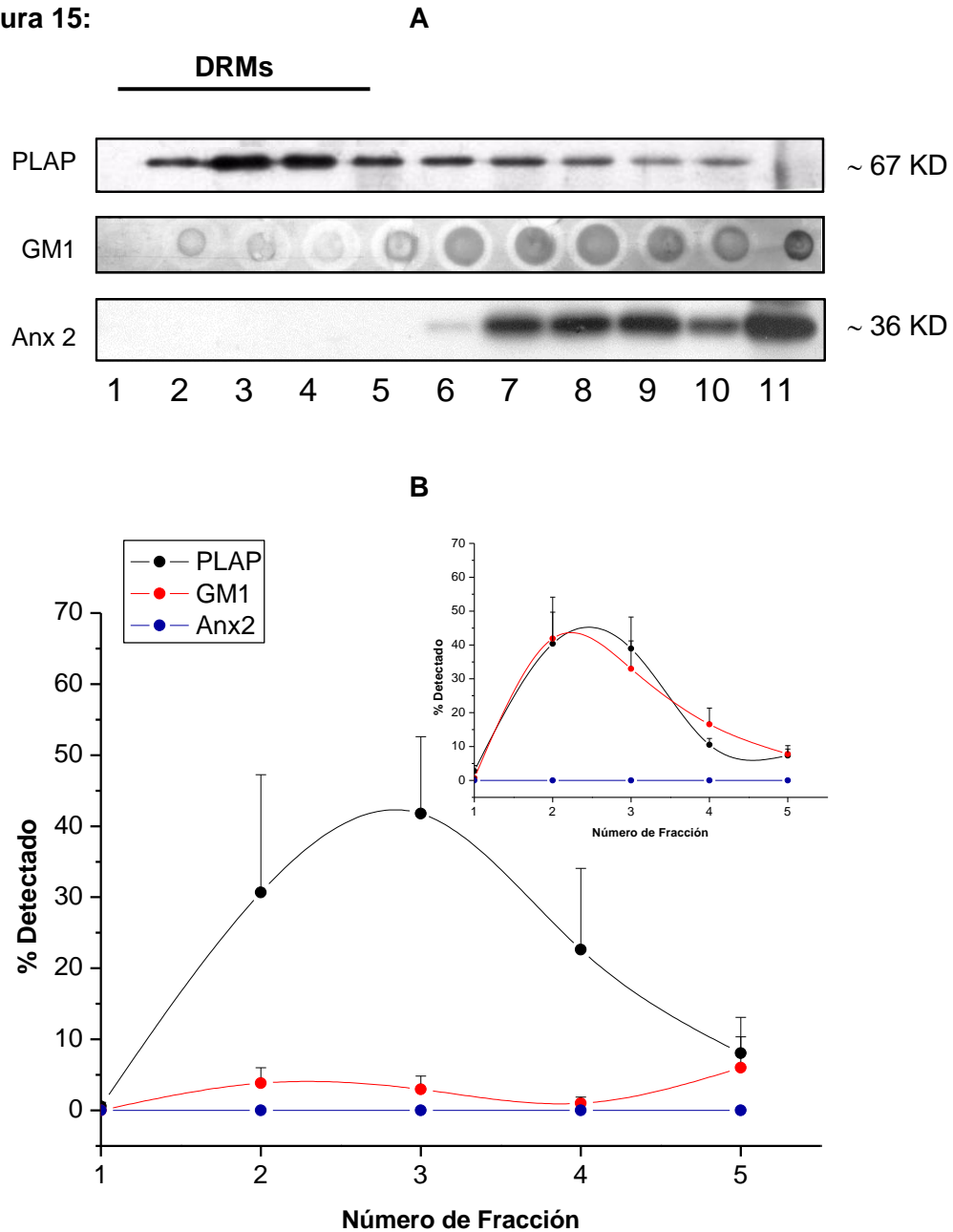
La magnitud de la señal de GM1 que normalmente se encuentra asociado a los DRMs de MVM, disminuyó a menos del 10 % con respecto a la suma de la señal detectada en las 11 fracciones.

Consecuentemente a lo encontrado para Anx 2, que no se detectó en los DRMs de MVM, luego del tratamiento de extracción de colesterol de membrana, este marcador no se encontró asociado a las fracciones DRMs.

La Fig. 15B muestra el análisis detallado de la distribución de los marcadores sólo para las fracciones correspondientes DRMs, es decir, cada valor corresponde al porcentaje respecto de la suma de las densidades relativas de las fracciones 1 a la 5 de la situación control.

La magnitud de la curva de la señal de PLAP presente en los DRMs de MVM, no se vio afectada por la depleción de colesterol. En contraste, la señal de GM1 en los DRMs, se vio significativamente afectada, la curva no se desplazó en el eje x, pero la señal del marcador experimentó una disminución evidente en todas las FsRG. Con respecto a Anx 2 el tratamiento de extracción del colesterol no tuvo efecto en la curva del marcador, manteniéndose totalmente ausente de las fracciones DRMs.

Figura 15:



**Figura 15: Resultado de la depleción del colesterol en la distribución de los marcadores de “rafts” de MVM.**

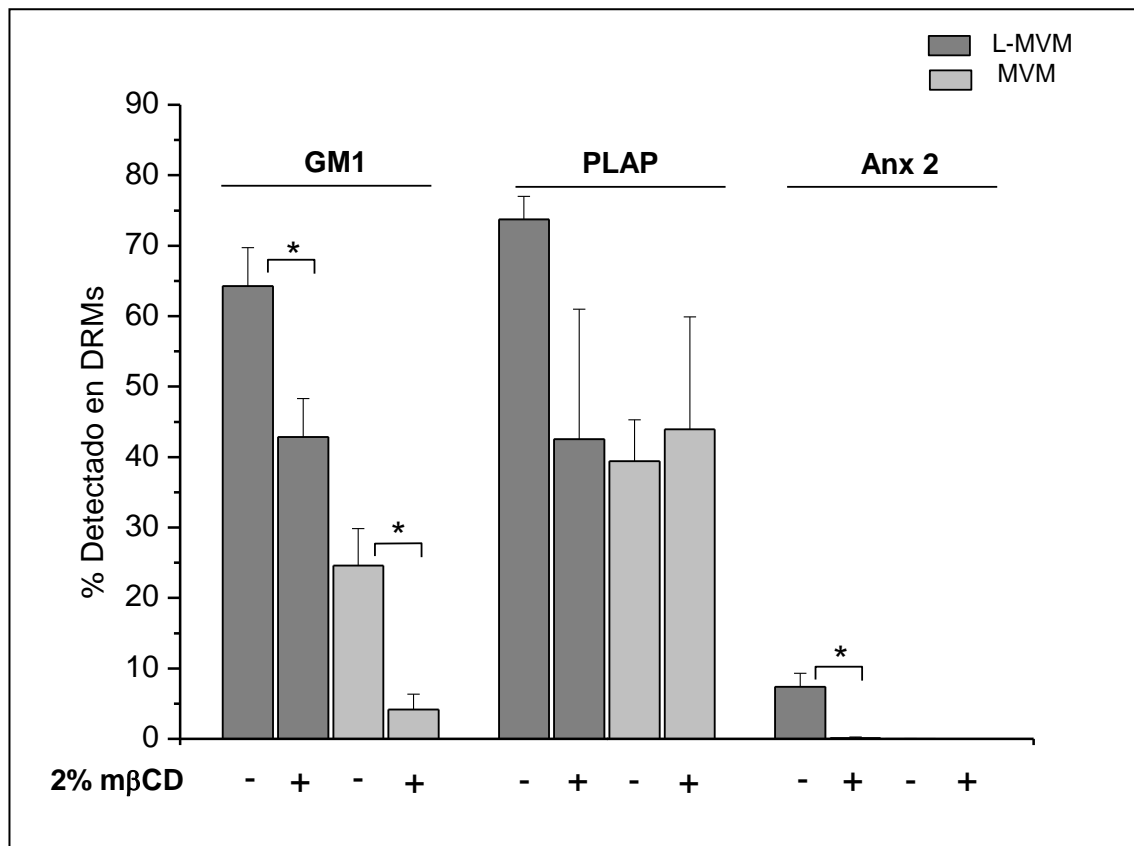
**A)** Imágenes de los “immunoblotting” característicos de la detección de GM1, Anx2 y PLAP en las FsRG de MVM previamente tratada con 2% m $\beta$ CD. **B)** Análisis densitométrico de la presencia de los tres marcadores en las FsRG correspondientes a DRMs. Cada valor corresponde al porcentaje promedio de cada fracción con respecto a la suma de las 5 fracciones (n = 3, promedio  $\pm$  SEM). El inserto muestra la distribución original de los marcadores (n = 6, promedio  $\pm$  SEM).

La Fig. 16 muestra el resumen del efecto de la depleción de colesterol desde las membranas nativas L-MVM y MVM. A diferencia de las curvas mostradas en las figuras 14 y 15, los valores graficados en esta figura corresponden sólo a la sumatoria de las densidades relativas de la fracción 1 a la 5, es decir la cantidad de marcador encontrado en las fracciones DRMs.

Es posible notar la sensibilidad de GM1 a la presencia de colesterol tanto en L-MVM como en MVM. Independiente de la razón colesterol/proteínas de cada fracción apical, el resultado luego de la extracción fue prácticamente el mismo, GM1 se solubilizó significativamente en ausencia del colesterol de membrana.

Por otra parte, indicando una baja sensibilidad a la ausencia de colesterol de membrana, la señal de PLAP, disminuyó levemente en las FsRG de L-MVM y se mantuvo igual que el control en el caso de las fracciones de MVM tal como se ha descrito. En el caso de Anx 2, fue posible advertir la completa dependencia a colesterol en L-MVM, además resultó clara la diferencia en el comportamiento de este marcador en los DRMs de L-MVM, con respecto a los DRMs de MVM.

Figura 16:



**Figura 16: Comparación de la sensibilidad de GM1, PLAP y Anx 2 a la extracción de colesterol desde las membranas L-MVM y MVM.**

El gráfico muestra que la asociación de GM1 con los DRMs de L-MVM y MVM es dependiente de colesterol. PLAP no mostró una sensibilidad significativa a la extracción del colesterol. Mientras que Anx2, presente sólo en los DRMs de L-MVM, es totalmente sensible al tratamiento con 2% mβCD. Los valores graficados corresponden a la sumatoria de las densidades relativas de las fracciones 1 a la 5 correspondientes a DRMs (n = 6, promedio ± SEM controles y n = 3, promedio ± SEM con 2% mβCD.\*  $P < 0,05$ . Placentas independientes ).

#### **4. Discusión final:**

Los resultados descritos en este trabajo confirman la hipótesis de la presencia de microdominios lipídicos en ambas fracciones apicales de STP. Sin embargo, la diferente distribución que adquirieron los marcadores-raft controlados, pone en evidencia que la composición particular de cada fracción de membrana apical es un factor importante en la caracterización de cada una de ellas.

Además, los resultados mostraron que la sensibilidad de los marcadores a la depleción del colesterol, es independiente de la cantidad colesterol/proteínas en las membranas nativas. Ya que el comportamiento de los marcadores presentes en los DRMs de ambas fracciones apicales fue muy similar, a pesar de que L-MVM tiene una razón significativamente mayor que MVM.

Otro punto importante, es la presencia exclusiva de Anx 2. en los DRMs de L-MVM. Lo que sugiere que la mayor cantidad de colesterol que tiene esta fracción apical, podría ser un factor importante en la determinación de la asociación de Anx 2 con los DRMs, ya que tanto L-MVM como MVM contienen cantidades semejantes de esta anexina. Además, esto se vio confirmado por la absoluta sensibilidad de Anx 2 a la depleción de colesterol de L-MVM. Adicionalmente, trabajos previos en STP documentaron que sólo removiendo el colesterol de membrana, es posible extraer eficazmente toda la Anx 6 desde la membrana apical. Por lo tanto, el comportamiento que mostró Anx 2 no constituye un hecho aislado y podría dar cuenta de la existencia de una fuerte interacción entre el colesterol y las anexinas presentes en los “rafts” del STP (Riquelme et al. 2004).

Tomando en consideración que Anx 2 interacciona directamente con elementos del citoesqueleto (Hayes et al. 2004), el significativo “peak” de su señal en el “pellet” de las FsRG de MVM, podría estar directamente relacionado con la asociación a los elementos del citoesqueleto presentes en MVM.

Los otros marcadores utilizados en la caracterización, PLAP y GM1, también se distribuyeron en forma diferente en las fracciones apicales, pero con perfiles de distribución característicos y reproducibles. En L-MVM, PLAP y GM1 se concentraron

en un “peak” definido en las fracciones correspondientes a DRMs. En cambio, en MVM, se distribuyeron en dos “peaks”, el 1º (de menor área) en las fracciones DRMs, y el 2º en el “pellet”. Aún cuando, por su ubicación en la membrana plasmática ninguno de estos dos marcadores interacciona directamente con el citoesqueleto, este último resultado, podría indicar que efectivamente el citoesqueleto es una diferencia significativa en la composición de L-MVM y MVM.

Por lo tanto, la distribución que mostraron los marcadores-“raft” entre L-MVM y MVM, podría ser causa de una distribución espacial diferencial entre dominios “raft” y “no-raft” *in vivo*, hecho que estaría determinado por las composiciones intrínsecas (colesterol y citoesqueleto) de cada fracción apical (Babiychuk and Draeger 2006).

Las interacciones entre “rafts” y los elementos que componen el citoesqueleto fueron propuestas en varios tipos celulares (Tyska and Mooseker 2004; Bodin et al. 2005), inclusive en la línea celular BeWo, la cual es empleada como modelo para el estudio de los procesos previos a la transformación del trofoblasto en sincicio. (Rashid-Doubell et al. 2006). Sin embargo, el mecanismo molecular que subyace a las interacciones raft-citoesqueleto ha sido escasamente documentado.

Basándose en los resultados obtenidos, es probable que MVM esté asociada a una fracción de citoesqueleto mayor que L-MVM, o que sus “rafts” estén fuertemente estabilizados por éste. Lo que llevaría primero a la separación de estas fracciones en L-MVM y MVM (en la gradiente de sacarosa final del protocolo de purificación de membrana apical), y segundo, a la segregación de marcadores-raft en el “pellet” de la gradiente de obtención de DRMs. Esto debido que la asociación con los elementos del citoesqueleto, aumentaría la densidad de los complejos

La hipótesis de participación del citoesqueleto en la organización de las fracciones apicales y de sus microdominios, adquiere mayor fuerza debido a la arquitectura del “brush border”, definida por un citoesqueleto longitudinal especializado, sustentado en el corazón de cada microvellosidad (Tyska and Mooseker 2004).

Por otra parte, los resultados aquí presentados, demuestran que la obtención de DRMs constituye una importante herramienta en la caracterización primaria de “rafts” en células. En forma particular, en el estudio de “rafts” en tejidos donde no es posible el estudio individual de células (como es el caso del STP). En consecuencia, este método representa una alternativa válida, a pesar de que en la actualidad hayan emergido técnicas con aplicaciones más limitadas, pero de mayor sensibilidad y con menor invasión a la integridad de la membrana, para el estudio celular *in vivo* (Lagerholm et al. 2005).

Estos resultados corresponden a la primera evidencia y caracterización de la presencia de “rafts” en las dos fracciones apicales del STP. Sin embargo, se hace necesario continuar con la caracterización de los microdominios en cada una de ellas. En consecuencia, nuevos experimentos revelarán el rol específico del citoesqueleto en la formación-mantenimiento de los microdominios, para finalmente involucrar tanto a los “rafts”, como al citoesqueleto, directamente en la modulación de la funcionalidad del transporte a través del dominio apical del STP.

La presencia de una proteína integral de la membrana plasmática, fuera o dentro de los microdominios, es clave en la funcionalidad de la célula y de la del tejido (Chen et al. 2006; Huang et al. 2006; Nagy et al. 2006). Por lo tanto caracterizar los elementos que componen los “rafts” y determinar las particularidades que subyacen a las interacciones presentes en los microdominios, representa un gran avance en la identificación de nuevos mecanismos involucrados en la fisiología y en las patologías que surgen durante el embarazo. Lo que en el futuro, hará posible la selección de nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento específico de cada patología.



## CONCLUSIONES

---

- Entre las membranas apicales de STP existen diferencias significativas en la de composición de colesterol total.
- La metodología implementada es efectiva para la obtención de DRMs, libres de contaminación de elementos asociados a zonas no-raft (hTf-R) y que dan cuenta de la presencia de microdominios en las membranas aisladas.
- Ambas fracciones apicales contienen microdominios lipídicos, que pueden ser aislados y estudiados en forma de DRMs, por la metodología implementada.
- Los marcadores-raft ensayados presentaron patrones característicos, tanto de distribución en las FRsG, como de sensibilidad a la extracción de colesterol. Fenómenos que dan cuenta de diferentes interacciones de las proteínas, tanto con los componentes lipídicos, como con los del citoesqueleto, que componen los “rafts”.
- Estos resultados corresponden al primer avance en la caracterización de la presencia de microdominios lipídicos en el dominio apical del STP, el que incluye tanto a MVM como a L-MVM.
- Finalmente, la hipótesis planteada, acerca de la existencia de “rafts” característicos en ambas fracciones apicales del STP, se confirma con los resultados obtenidos.

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1: Estructura molecular de los lípidos que componen la membrana plasmática.	2
Figura 2: Colesterol favorece la separación de fases en membranas lipídicas. ....	5
Figura 3: Modelo clásico de la organización de los “rafts” y la caveola en la membrana plasmática.....	7
Figura 4: Esquema representativo de los componentes de una vellosidad placentaria. ....	10
Figura 5: Inmunohistoquímica de una vellosidad placentaria (5 µm).....	11
Figura 6: Diagrama de los principales pasos incluidos en el protocolo implementado para la obtención de DRMs desde L-MVM y MVM. ....	16
Figura 7: Determinación del contenido de colesterol total de membrana. ....	21
Figura 8: Distribución de PLAP en las FsRG de L-MVM y MVM. ....	25
Figura 9: Distribución de hTf-R en las FsRG de ambas membranas apicales.....	27
Figura 10: Caracterización de las FsRG de L-MVM. ....	30
Figura 11: Caracterización de las FsRG de MVM. ....	31
Figura 12: Presencia de Anx 2 en las membranas L-MVM y MVM. ....	32
Figura 13: Gráfico del efecto del tratamiento con mβCD 2%, en la razón colesterol/proteínas. ....	34
Figura 14: Efecto de la extracción de colesterol en los DRMs de L-MVM. ....	36
Figura 15: Resultado de la depleción del colesterol en la distribución de los marcadores de “rafts” de MVM. ....	38
Figura 16: Comparación de la sensibilidad de GM1, PLAP y Anx 2 a la extracción de colesterol desde las membranas L-MVM y MVM.....	40

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. La membrana plasmática celular:.....</b>	<b>1</b>
1.1 Componentes lipídicos de la membrana plasmática: .....	1
1.2 Organización de la membrana, modelos artificiales:.....	4
1.3 “Lipid rafts” y la dinámica en la membrana plasmática: .....	6
<b>2. La placenta humana y su estructura de término: .....</b>	<b>9</b>
2.1 La barrera placentaria: .....	9
2.2 El sinciotrofoblasto placentario:.....	11
<b>3. Hipótesis:.....</b>	<b>14</b>
<b>4. Objetivo general:.....</b>	<b>14</b>
<b>5. Objetivos específicos: .....</b>	<b>14</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Purificación de membranas placentarias.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Purificación de DRMs: .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Tratamiento con metil- <math>\beta</math>-Ciclodextrina (<math>m\beta</math>CD):.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Determinación de colesterol total:.....</b>	<b>17</b>
<b>5. Electroforesis SDS-PAGE y “Western Blot”: .....</b>	<b>17</b>
<b>6. “Dot Blot”: .....</b>	<b>18</b>
<b>7. Análisis estadístico:.....</b>	<b>18</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Caracterización del contenido de colesterol total en L-MVM y MVM: .....</b>	<b>19</b>
<b>2. Estandarización del protocolo para el aislamiento de DRMs desde L-MVM y MVM, membranas apicales de sinciotrofoblasto placentario humano: .....</b>	<b>22</b>

<b>3. Caracterización de los DRMs obtenidos desde L-MVM y MVM:</b> .....	<b>24</b>
3.1 Caracterización general de los complejos insolubles:.....	24
3.2 Los DRMs de la fracción apical liviana L-MVM son distintos a los de la fracción apical tradicional MVM: .....	28
3.3 Efecto de la depleción de colesterol en la distribución de los marcadores en los DRMs de L-MVM y MVM. ....	33
<b>4. Discusión final:</b> .....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>45</b>