

## Análisis ultraestructural de membranas de glóbulos grasos lácteos de calostro y leche humana

Francisco Hernández

Instituto de Investigaciones en Salud y Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

Hiroshi Akahori

Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica y Naka Works, Hitachi Ltd., Japón.

(Recibido para su publicación el 23 de marzo de 1983)

**Abstract:** Lacteous fat globules with their membranes from human milk and calostrum were studied by scanning and transmission electron microscopy. The first appear as spheroidal structures with some irregularities on the surface. Under the transmission electron microscope these irregularities are composed of islets from a material morphologically similar to cytoplasm, and with structures that resemble a fragment of rugose endoplasmic reticulum. The membranes in specimens fixed immediately after secretion are tri-layered, similar in appearance to those of a single membrane, but in samples fixed between two and four hours after secretion the details are unclear. Through freeze-etching, the laminar aspect of the fat globules is observed.

La grasa en la leche humana aparece en forma de corpúsculos de 3 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro, denominados glóbulos grasos lácteos (GGL; Bayer, 1972), recubiertos por una membrana (MGGL), que aparentemente es unitaria y que posiblemente proviene del aparato de Golgi, o de la membrana celular de las células glandulares mamararias. Esta última posibilidad se apoya en el hallazgo de que ambas membranas tienen una composición química similar (Wooding, 1971a; Keenan *et al.* 1971; Bayer, 1972), y que comparten antígenos (Mather *et al.*, 1980). Por otra parte, algunos glóbulos grasos lácteos muestran ensanchamientos constituidos por un material semejante a citoplasma, en el que pueden identificarse restos de retículo endoplasmático rugoso y fragmentos de mitocondrias (Wooding, 1971b; Keenan *et al.*, 1971).

En cuanto a la posición química de estas membranas lácteas, se ha descubierto que contienen el 65% de los fosfolípidos lácteos (Baumiucker y Keenan, 1973), entre los que se encuentran principalmente fosfatidilcolina y esfingomielina, además de pequeñas cantidades de ésteres de colesterol, monoglicéridos, triglicéridos, carotenoides, glicoproteínas y enzimas como xantina oxidasa, fosfatasa alcalina, nucleotidasa y ATPasas (Zittle *et al.*, 1956; Thompson *et al.*, 1961; Keenan *et al.*,

1970; Bracco *et al.*, 1972; Horisberger *et al.*, 1977; Eigel, 1980). No obstante que los componentes lípidos de la membrana son estables hasta por 96 horas, la composición química de los glóbulos grasos se altera durante el almacenamiento de la leche (Patton *et al.*, 1980). Posiblemente esta alteración se debe a la pérdida de fragmentos del glóbulo, que se desprenden como pequeñas vesículas que modifican el aspecto ultraestructural de su membrana (Wooding, 1971a; 1971b; Pillay *et al.*, 1980a; 1980b; Patton *et al.*, 1980). El desprendimiento de esas vesículas origina estructuras que semejan retrovirus tipo C; sin embargo, ultraestructuralmente esas vesículas conservan el aspecto de la membrana unitaria y han sido denominadas plasmalemasomas (Wooding, 1972).

Debido a las alteraciones que sufren las membranas de los glóbulos grasos lácteos durante el almacenamiento, se recomienda procesar las muestras de calostro y leche destinadas a estudios ultraestructurales o químicos inmediatamente después de recogidas. En este trabajo se evalúan morfológicamente los glóbulos lácteos y sus membranas en leche y calostro de origen humano y se correlaciona con el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su fijación.

## MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron doce muestras de calostro humano recogidas durante los primeros cinco días *post partum* y tres muestras de leche madura (8 meses *post partum*). El calostro se guardó a 4 C durante cuatro horas antes de procesarlo y las muestras de leche se fijaron inmediatamente después de recogidas.

**Microscopía electrónica de barrido:** Tres de las muestras de calostro y las tres muestras de leche se procesaron para microscopía electrónica de barrido. De cada espécimen se separó la fracción lipídica mediante centrifugación a 2000 XG durante 10 minutos. Se eliminó la fase acuosa y se fijó la nata sobrenadante (grasa) en una mezcla de aldehído glutárico y formalina, cada uno al 1% en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7. Luego la grasa láctea se deshidrató en una serie de alcohol etílico de 70 a 100%. Y después se resuspendió en benceno y se dejó sedimentar durante dos horas. De cada sedimento se tomaron alícuotas de 0,3 ml y se colocaron sobre bases de aluminio, se dejaron secar a temperatura ambiente y se recubrieron con oro en un evaporador de metales (EIKO 1B-3). Los especímenes se analizaron en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi HHS-2R), bajo un voltaje de aceleración de 10 KV.

**Microscopía electrónica de transmisión:** De cada muestra de leche y de seis de los calostros se tomaron alícuotas de 1 ml y se fijaron en aldehído glutárico al 1% durante dos horas y se deshidrataron en una serie de alcohol etílico de 30 a 100%. Luego se embebieron en resina (Epoxi) y se incubaron a 70 C durante 72 horas. Posteriormente se hicieron cortes ultrafinos y se tñieron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Los cortes fueron analizados en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi HU-12A).

Además, tres de las muestras de calostro se fijaron en aldehído glutárico al 1% y se resuspendieron en glicerol al 10% en el amortiguador de fosfatos. De cada muestra se tomó 0,1 ml y se colocó sobre una base de cobre para criofractura, que inmediatamente se congeló aproximadamente a -210 C sobre nitrógeno sólido. Luego se pasó a un dispositivo de criofractura (sumergido en nitrógeno líquido) y se colocó en un evaporador de metales (Hita-

chi HUS-5). Las muestras fueron fracturadas a un vacío de aproximadamente  $10^{-5}$  Torr e inmediatamente se elevó la temperatura hasta -100 C, para sublimar el hielo y erosionar la superficie fracturada, la que a su vez fue sombreada con platino en un ángulo de  $45^{\circ}$  y luego recubierta por carbón evaporado en un ángulo de  $90^{\circ}$ . Las réplicas de platino-carbón obtenidas de las superficies de fractura se hicieron flotar en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, para eliminar los restos de materia orgánica y se recogieron con rejillas de cobre de malla 400 para examinarlas.

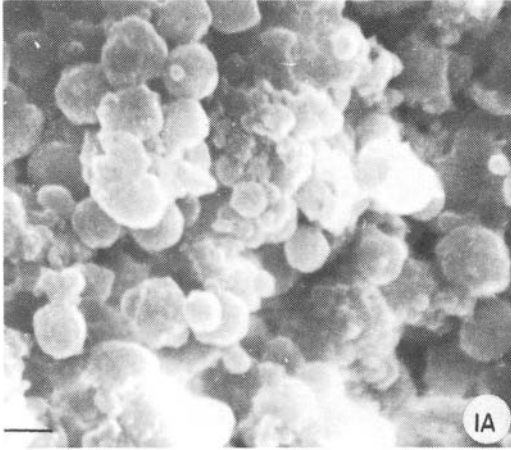
## RESULTADOS

La grasa láctea tanto de calostro como de leche madura, se observó al microscopio electrónico de barrido como conglomerados esferoides, cuyos diámetros oscilaron entre 2 y 8  $\mu\text{m}$ , predominando los glóbulos de menos de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 1a). Con aumentos mayores de 1000X se puede observar irregularidades en la superficie de estos glóbulos, a manera de abultamientos (Fig. 1b).

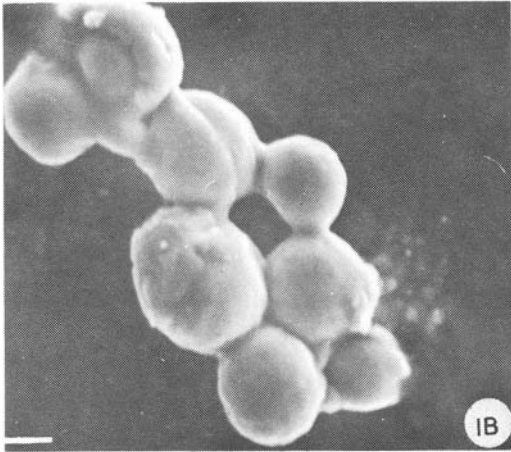
En los cortes ultrafinos los glóbulos aparecen cortados transversalmente, observándose como anillos formados por una membrana delgada, que a grandes aumentos (100.000X) muestra un aspecto trilaminar, similar al de una membrana unitaria, en la que se aprecian dos capas electrodensas y una central translúcida a los electrones (Fig. 2).

Algunos de los glóbulos grasos presentan ensanchamientos en su superficie, compuestos aparentemente por porciones de citoplasma, atrapados o adheridos a la membrana de los glóbulos. En esos ensanchamientos es posible reconocer fragmentos de retículo endoplasmático rugoso. En la figura 3a se observa una de esas porciones de citoplasma cortada transversalmente, como se señala en el esquema del recuadro de esa figura. La figura 3b corresponde a un detalle de una porción de citoplasma, en la que se observa un sistema de membranas cortadas transversalmente y que aparece adosada a una matriz citoplásmica.

En las muestras de calostro procesadas a las cuatro horas post recolección, no se aprecia claramente el aspecto trilaminar de la membrana. Además, en algunas secciones a gran aumento se observan irregularidades en las membranas, a manera de vacuolas o vesículas (Fig. 4c, d e).

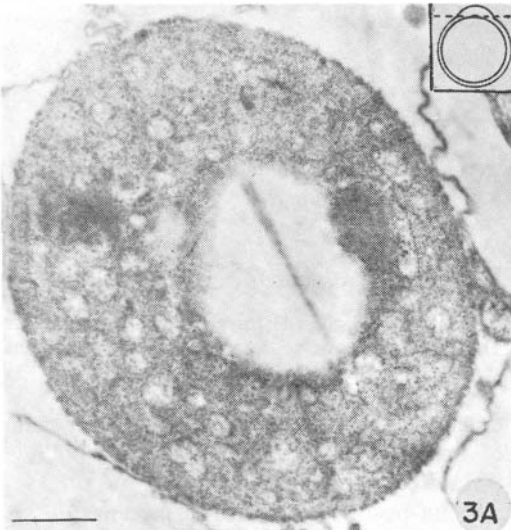


1A



1B

Fig. 1. Microfotografías electrónicas de barrido: A. grupo de glóbulos grasos lácteos (barra = 10  $\mu\text{m}$ ). B. a mayor aumento se observan irregularidades en la superficie de los glóbulos (barra = 1  $\mu\text{m}$ ).

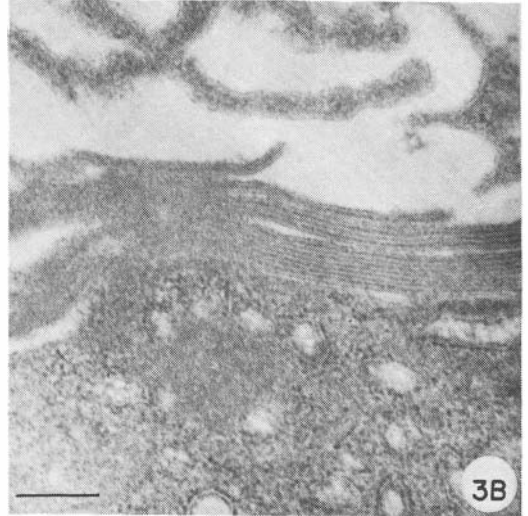


3A



2

Fig. 2. Microfotografía electrónica de transmisión: cortes ultrafinos de la membrana de glóbulos grasos lácteos de leche humana fijada inmediatamente post secreción. Se observa el aspecto trilaminar propio de una membrana unitaria (barra = 100 nm).



3B

Fig. 3. Microfotografía electrónica de transmisión: A. corte transversal de un ensanchamiento de material semejante a citoplasma; se observan estructuras similares a fragmentos de retículo endoplasmático rugoso. El recuadro superior indica la forma en que se cortó el glóbulo (barra = 500 nm). B. arreglo de membranas en un ensanchamiento de material similar a citoplasma de un GGL (barras = 250 nm).

En las réplicas de criofractura aparecen glóbulos cortados transversalmente en diferentes planos, exponiendo superficies de fractura con apariencia laminar al corte (Fig. 5a, b). Además, algunos glóbulos se fracturaron muy superficialmente y muestran un casquete esférico, en el que se aprecia la membrana externa (Fig. 5a, c).

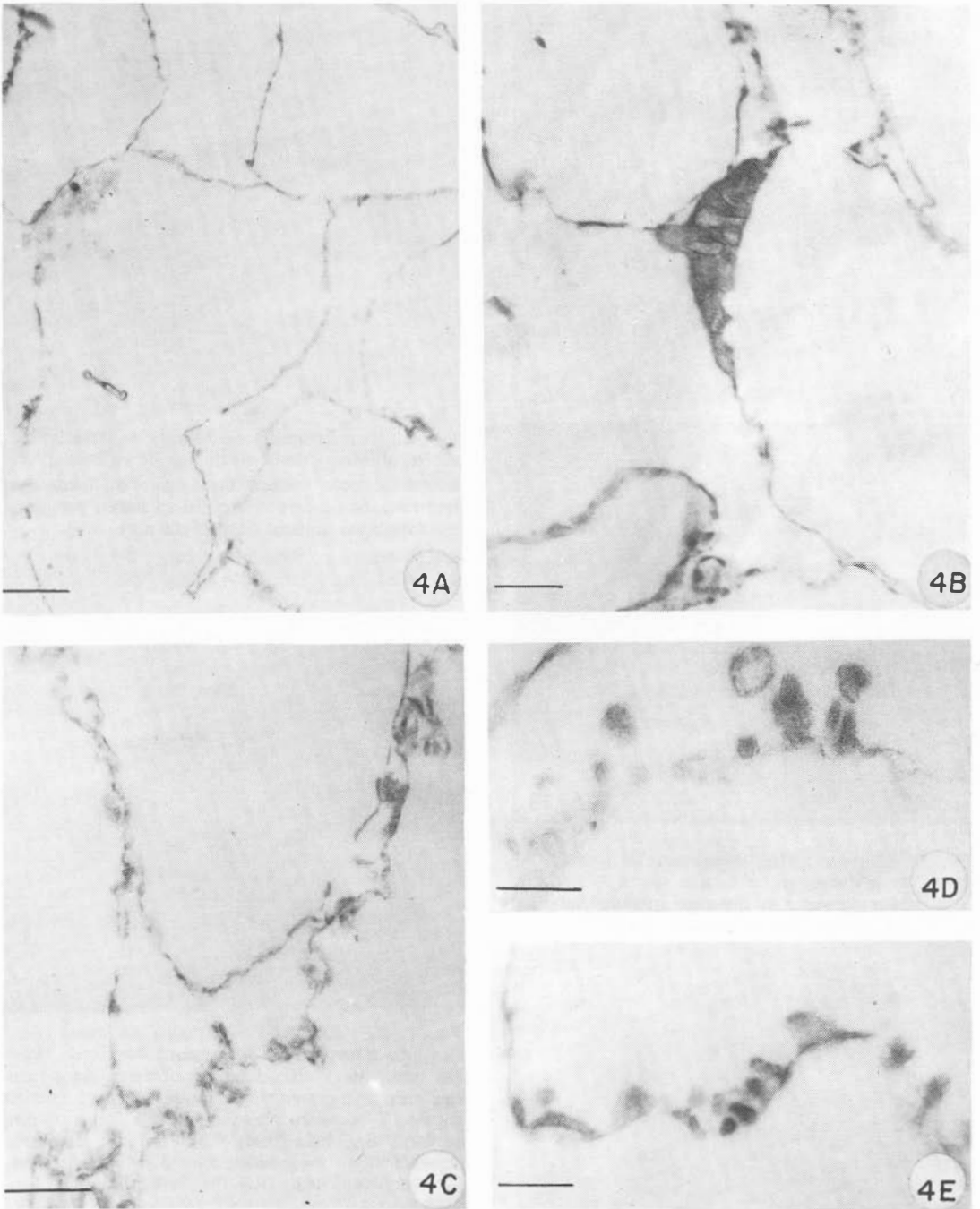


Fig. 4. Microfotografía electrónica de transmisión. A., B., C. cortes transversales de los glóbulos, en algunos se observan ensanchamientos de citoplasma (barra = 500 nm). D. E. vesículas que se desprenden de la membrana fijadas 4 horas post secreción (barras = 250 nm).

#### DISCUSION

Los glóbulos grasos lácteos y sus membranas observadas en el calostro y la leche de origen

humano, son similares a los descritos en leche de otros mamíferos (Baver, 1972; Wooding, 1971a; Keenan *et al.*, 1971).

Se ha postulado que las membranas de los

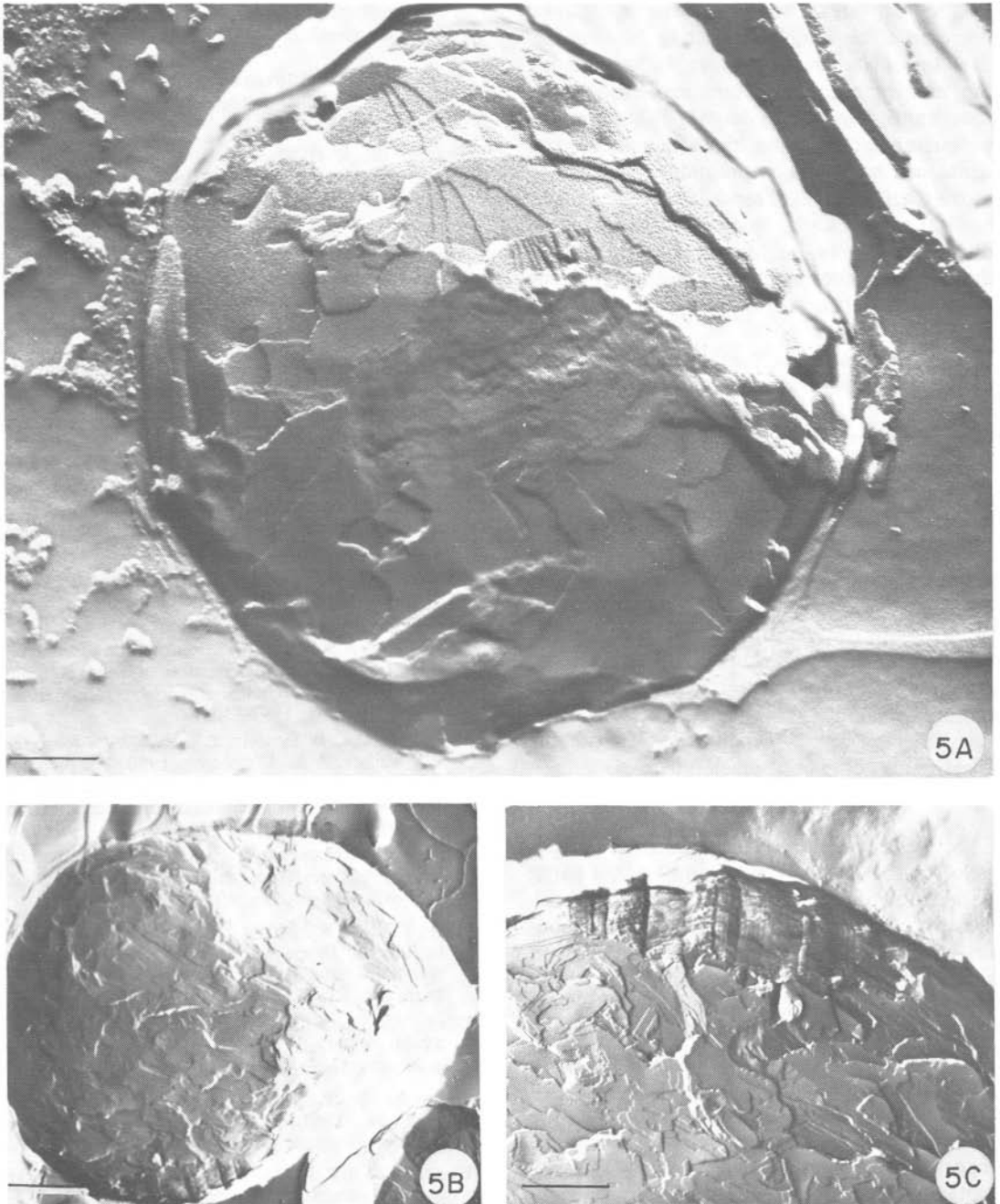


Fig. 5. Microfotografía electrónica de transmisión de glóbulos procesados mediante crio fractura. A. glóbulo cortado superficialmente; se observa la membrana (barra = 200 nm). B. glóbulo cortado más profundamente que el anterior; se observa el aspecto laminar cristalino de los lípidos congelados (barra = 250 nm). C. cristales de lípidos congelados y parte de la membrana fracturados transversalmente (barra = 500 nm).

glóbulos grasos lácteos son unitarias y que podrían originarse a partir de vacuolas del aparato de Golgi que rodearían las vacuolas grasas en el citoplasma de la célula mamaria (Wooding,

1971b), o que la membrana celular envolvería al glóbulo durante la secreción (Long y Patton, 1978).

Ultraestructuralmente estas membranas lác-

teas son similares a una membrana unitaria, tal como se observó en las muestras de leche fijadas inmediatamente después de secretadas. Sin embargo, esa estructura se perdió en las muestras fijadas 4 horas después de la secreción, ya que aparecían como una sola capa electrodensa con bordes poco definidos. Además, en esos especímenes se observó la presencia de vesículas, similares a las que había descrito Wooding en 1972, lo que confirma que para estudios ultraestructurales las muestras de leche o calostro deben fijarse inmediatamente después de secretadas.

Por otra parte, el posible valor biológico de estas membranas debe correlacionarse con el período de almacenamiento de la leche, ya que esas alteraciones en las membranas lácteas podrían reflejarse en su funcionalidad.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el aporte económico de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y del AID (préstamo 026); al Dr. Leonardo Mata, Director del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), por su apoyo a este proyecto; y a las señoras Iris Morera Alvarado y María del Carmen Obando Jiménez de la Unidad de Microscopía Electrónica por la colaboración técnica.

#### RESUMEN

Se describen ultraestructuralmente los glóbulos grasos lácteos y sus membranas, a partir de leche y calostro de origen humano. Al microscopio electrónico de barrido los glóbulos aparecen como estructuras esféricas con algunas irregularidades en su superficie. Al microscopio electrónico de transmisión se ve que esas irregularidades están compuestas por islotes de un material morfológicamente similar al citoplasma, en el que aparecen estructuras similares a fragmentos de retículo endoplasmático rugoso. Las membranas en los especímenes fijados inmediatamente después de secretados muestran un aspecto trilaminar similar al de una membrana unitaria, aspecto que no es claro en las muestras fijadas entre dos y cuatro horas post secreción. Mediante criofratura se observa el aspecto laminar del contenido de los glóbulos grasos.

#### REFERENCIAS

- Baumiucker, D. R., & T.W. Keenan. 1973. Membranes of mammary gland. VII. Stability of milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 56: 1092-1094.
- Baver, H. 1972. Ultrastructure observations on the milk fat globule envelope of cow's milk. *J. Dairy Sci.*, 55: 1375-1387.
- Bracco, U., J. Hidalgo, & H. Bohren. 1972. Lipid composition of the fat globule membrane of human and bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 55: 165-172.
- Eigel, W.N. 1980. Characterization of bovine milk fat globule membrane prepared in the presence of chloroquine and kallikrein inhibition. *J. Dairy Sci.*, 63: 158.
- Horisberger, M., J. Rosset, & M. Vonlanthen. 1977. Location of glycoproteins on milk fat globule membrane by scanning and transmission electron microscopy, using lectinlabelled gold granules. *Exp. Cell. Res.*, 109: 361-369.
- Keenan, T. W., D.J. Morré, D. E. Olson, W. N. Yung-hans, & S. Patton. 1970. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. *J. Cell. Biol.*, 44: 80-93.
- Keenan, T.W., D.E. Olson, & H. H. Mollenhaver. 1971. Origin of the milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 54: 295-299.
- Long, C. A., & S. Patton. 1978. Formation of intracellular fat droplets: interrelation of newly synthesized phosphatidylcholine and triglyceride in milk. *J. Dairy Sci.*, 61: 1392-1399.
- Mather, I. H., C. B. Tamplin, C.S. Nace, V.G. Johnson, P.J. Madara, & R. A. Goldsby. 1980. The preparation of polyclonal and monoclonal antibodies to the proteins of bovine milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 63 (Suppl.): 159-160.
- Patton, S., C. Long, & T. Sokka, 1980. Effect of storing milk on cholesterol and phospholipid of skim milk. *J. Dairy Sci.*, 63: 697-700.
- Pillay, V.T., A. N. Myhr, & J.I. Gray. 1980a. Lipolysis in milk. I. Determination of free fatty acid and threshold value for lipolized flavor detection. *J. Dairy Sci.*, 63: 1213-1218.
- Pillay, V.T., A. N. Myhr, J. I. Gray, & D. A. Biggs. 1980b. Lipolysis in milk. II. Effect to milking systems. *J. Dairy Sci.*, 63: 1219-1223.
- Thompson, M. P., J. R. Brunner, C.M. Stine, & K. Lindquist. 1961. Lipid components of the fat-globule membrane. *J. Dairy Sci.*, 44: 1589-1596.
- Wooding, F. B. P. 1971a. The structure of the milk fat globule membrane. *J. Ultrastruct. Res.*, 37: 388-400.
- Wooding, F. B. P. 1971b. The mechanism of secretion of milk fat globules. *J. Dairy Sci.*, 9: 805-821.
- Wooding, F. B. P. 1972. Milk microsomes, viruses, and the milk fat globule membrane. *Experientia*, 28: 1077-1079.
- Zittle, C.A., E. S. Dellamonica, J. H. Custer, & R. K. Rudd. 1956. The fat-globule membrane of milk: alkaline phosphatase and xanthine oxidase in skim milk and cream. *J. Dairy Sci.*, 39: 528-535.