



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“SEGREGACIÓN DE DISTINTOS TIPOS DE CANALES DE
POTASIO EN MICRODOMINIOS LIPIDICOS DE MEMBRANA
APICAL DE SINCICIOTROFOBLASTO PLACENTARIO
HUMANO”

MARÍA MACARENA BERRÍOS DÍAZ

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

PROFESOR GUÍA: GLORIA HENA RIQUELME PINO

**SANTIAGO, CHILE
2010**

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. Membranas Biológicas.....	3
1.1 Composición.....	3
1.2 Estructura.....	5
2. Microdominios Lipídicos o <i>Lipid Rafts</i>	6
3. Placenta.....	9
3.1 Estructura de la Placenta Madura.....	9
3.2 La Barrera Placentaria.....	10
3.3 Canales Iónicos y Placenta.....	12
3.3. a. Canales de Potasio en Placenta.....	13
3.4 Placenta y <i>Lipid Rafts</i>	15
4. <i>Lipid Rafts</i> y Canales Iónicos.....	16
4.1 <i>Lipid Rafts</i> y Canales de Potasio.....	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Preparación de membranas Apicales.....	20
1.1 Obtención de placentas.....	20
1.2 Procedimiento de preparación de membranas apicales.....	21
1.3 Determinación de proteínas y actividad de Fosfatasa Alcalina en las membranas purificadas.....	23
2. Preparación de Microdominios Lipídicos a partir de Membranas Apicales.....	23
3. 3. Técnica de Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot	24
3.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	24
3.1a Preparación de muestras.....	24
3.1b Procedimiento de electroforesis.....	25
3.2 <i>Western Blot</i>	26
4. <i>Dot Blot</i>	27
5. Análisis Densitométrico y Estadístico.....	27
5.1 Cálculo de los datos graficados.....	27
6. Extracción de Colesterol de membrana con Metil β Ciclodextrina.....	28
RESULTADOS	30
1. Obtención y caracterización de subdominios de membrana apical (MVM y LMVM) purificados a partir de una placenta de término.....	30

2. Obtención y caracterización con marcadores específicos de las fracciones <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i> obtenidas a partir de MVM y LMVM.....	31
2.1 Marcadores <i>Rafts</i>	32
2.1.a Presencia de Fosfatasa Alcalina.....	32
2.1.b Presencia de Gangliósido GM1.....	33
2.1 c Presencia de Flotillina-1.....	33
2.2 Marcador no- <i>Rafts</i>	34
2.2.a Expresión del receptor de Transferrina humano (hTrf).....	34
3. Identificación de la expresión de los Canales de Potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TASK-1 y TREK-1) en Membranas Enteras de hSTB y su distribución en dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i> de LMVM y MVM.....	35
3.1 Presencia de los Cuatro canales de Potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1) en membranas enteras.....	36
3.1.a Presencia de K_V 2.1 en Membranas Enteras.....	36
3.1.b Presencia de K_{IR} 2.1 en Membranas Enteras.....	37
3.1.c Presencia de TREK-1 en Membranas Enteras.....	38
3.1d Presencia de TASK-1 en Membranas Enteras.....	39
3.1e Resumen comparativo de la distribución de los 4 tipos de Canales de Potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1) en Membranas Enteras.....	40
3.2 Distribución de los Canales de Potasio (K_{IR} 2.1, K_V 2.1, TREK-1 y TASK-1) en dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i>	41
3.2.a Presencia de K_V 2.1 en dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i>	41
3.2b Presencia de K_{IR} 2.1 en dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i>	42
3.2c Presencia. de TREK-1 entre dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i>	43
3.2d Presencia de TASK-1 entre dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i>	44
3.2.e Porcentaje de Segregación en dominios <i>Rafts</i> para el Canal de Potasio K_{IR} 2.1.....	45
4. Confirmación de la presencia de los Canales de Potasio que se ubican en dominios <i>Rafts</i> , mediante la extracción de colesterol de membrana con Metil β Ciclodextrina previo a la solubilización con Tritón X-100, e identificación con experimentos de <i>Western Blot</i>	45
4.1 Comparación de presencia de K_{IR} 2.1 en dominios <i>Rafts</i> y no- <i>Rafts</i> en fracciones de membranas (LMVM y MVM) control y tratadas con metil β -Ciclodextrina.....	46
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIÓN	54
BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

Durante décadas, la estructura de las membranas biológicas fue caracterizada como un *Mosaico Fluido*, pero posteriormente surgió evidencia de la presencia de *Lipid Rafts* o Microdominios Lipídicos, que son estructuras de membrana enriquecidas en esfingolípidos y colesterol que contienen diversas proteínas y cumplen roles específicos dentro de la membrana. Recientemente, se ha reportado la presencia de estas estructuras, además de una serie de canales iónicos, en las membranas del *Sinciciotrofoblasto placentario humano* (hSTB), epitelio sincicial responsable del intercambio materno-fetal en la gestación. Este tejido posee membrana basal y membrana apical, la cual se subdivide en dos subdominios; uno pesado o MVM y uno liviano o LMVM.

Por otra parte, existen antecedentes de que la asociación de un canal de potasio a microdominios de membrana tiene implicancias en el funcionamiento del canal, por lo que, el objetivo del presente estudio es describir la segregación de los canales de potasio previamente identificado en placenta K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1 en dominios *Rafts* de MVM y LMVM del hSTB.

A partir de placentas de término, se obtuvieron la membrana basal y los dos sub-dominios de membrana apical del hSTB. Luego, MVM y LMVM se solubilizaron con detergente Tritón-X-100 y se centrifugaron en una gradiente discontinua de sacarosa, la cual se alicuotó en once fracciones, donde las fracciones insolubles en detergente (1-5) fueron *Rafts* y el resto no-*Rafts*. Mediante *Western Blot* y *Dot Blot*, se probaron marcadores *Rafts* (Fosfatasa Alcalina Placentaria o PLAP y gangliósido GM1) y no-*Rafts* (Receptor de Transferrina Humano o hTf-R), como también los canales de potasio K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1 en las once fracciones.

Los resultados indicaron que las fracciones *Rafts* son ricas en PLAP y GM1, mientras que las no-*Rafts* ricas en hTf-R, lo cual permite inferir que se lograron aislar los *Lipid Rafts*. En el caso de los canales de potasio, K_V 2.1 se ubicó en fracciones no-*Rafts* y K_{IR} 2.1 en fracciones *Rafts*. La presencia de K_{IR} 2.1 en *Rafts* además se confirma mediante un experimento con extracción de colesterol.

Este es la primera evidencia de segregación de canales de potasio en dominios *Rafts* y no-*Rafts* realizado en el hSTB. Sabiendo que K_V 2.1 se ubica en sitios no-*Rafts* y K_{IR} 2.1 en sitios *Rafts*, resta investigar la implicancia funcional de dicha asociación en la membrana apical, ya sea en condiciones normales como en patologías de la gestación.

SUMMARY

For decades, the structure of biological membranes was characterized as *fluid mosaic*, but later came evidence of the existence of *Lipid Rafts* or Lipid Microdomains, which are membrane structures enriched in sphingolipids and cholesterol containing different proteins and fulfill specific roles within the membrane. Recently, we have reported the presence of these structures, plus a number of ion channels in the membranes of human syncytiotrophoblast (hSTB), syncytial epithelium responsible for maternal-fetal exchange in pregnancy. This tissue has basal membrane and apical membrane, which is subdivided into two subdomains; high subdomains or MVM and light subdomains or LMVM. Moreover, there is a background that the association of a potassium channel to membrane Microdomains has implications for the channel functioning, so that the objective of this study is to describe the segregation of potassium channels previously identified in placenta; K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 and TASK-1 in *Rafts* domains of LMVM and MVM. From term placentas, were obtained basal membrane and the two sub-domains of hSTB apical membrane. Then, MVM and LMVM were solubilized with detergent Triton-X-100 and were centrifuged in a discontinuous sucrose gradient, which aliquot in eleven fractions, where the detergent-insoluble fractions (1-5) were *Rafts* and the rest were non-*Rafts*. By Western Blot and Dot Blot, *Rafts* were tested markers (placental alkaline phosphatase or PLAP and GM1 ganglioside) and non-*Rafts* (Human Transferrin Receptor or hTf-R) and then potassium channel K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 and TASK-1 in the eleven fractions.

The results indicated that fractions *Rafts* are rich in PLAP and GM1, while the non-*Rafts* rich in hTf-R, which indicates that it is able to isolate the *Lipid Rafts*. In the case of potassium channels, K_V 2.1 is located in fractions non-*Rafts* and K_{IR} 2.1 in fractions *Rafts*. The presence of K_{IR} 2.1 in *Rafts* also is confirmed by an experiment with cholesterol extraction.

This is the first report of potassium channels segregation in domains *Rafts* and non-*Rafts* made in the hSTB. Knowing that 2.1 K_V located in *Rafts* sites and K_{IR} 2.1 non-*Rafts* sites, it remains to investigate the functional implication of this association in the apical membrane, either under normal conditions and in pathologies of pregnancy.

INTRODUCCIÓN

La opinión actual acerca de las membranas biológicas, ha evolucionado gradualmente desde el influyente modelo de mosaico fluido de los años setenta, a un distintivo panorama más complejo. El modelo clásico, plantea que las membranas corresponden a bicapas lipídicas que otorgan un medio fluido homogéneo en el cual se encuentran proteínas dispuestas al azar. Sin embargo, este modelo se actualizó hace más de una década cuando investigadores independientes dieron evidencias que existen sectores de la bicapa que presentan otro estado enriquecido en esfingolípidos y colesterol, más ordenado y menos fluido que el resto de la membrana. Estas zonas se han denominado Microdominios Lipídicos o Balsas Lipídicas (del inglés *Lipid Rafts*), los cuales se encuentran implicados en diversas funciones de la membrana celular. Hoy en día, ya se han identificado estas estructuras en tejidos tales como músculo esquelético de conejo, células MDCK (del inglés Madin-Darby canine Kidney), cerebro de rata (Martens y cols., 2004) etc. y recientemente, en la membrana apical del Sinciciotrofoblasto Placentario Humano (hSTB) (Godoy y Riquelme, 2008).

El hSTB es un tejido epitelial multinucleado que, junto con el endotelio de los capilares fetales, conforman una barrera entre la circulación materna y fetal en una placenta de término. Como es un sincicio, constituye el principal sitio de intercambio materno-fetal, por lo tanto, todos los solutos deben atravesar necesariamente su membrana basal (BM de *basal membrane*) y apical (MVM de *microvillius membrane*). Este tejido, al igual que todos los tejidos epiteliales, es polarizado, lo que se traduce en una fuerte diferencia en composición lipídica y proteica entre sus dos dominios de membrana. El 2004 Jiménez y cols. aislaron la membrana basal y la membrana apical del hSTB. Esta última presenta dos Subdominios; uno pesado (o clásica MVM) y uno liviano (L-MVM del inglés *Light-microvillius membrane*).

El hSTB, posee mecanismos de transporte de membrana común para todas las células, los cuales consisten en dos grupos fundamentales; difusión simple y mediado por proteínas integrales, las cuales a su vez, se dividen en transportadores y canales iónicos. Estos últimos, son proteínas complejas que se encuentran en todas las células y se

comportan como verdaderos conductores biológicos que permite el paso de carga eléctrica (iones) en forma pasiva a través de la membrana.

Particularmente, en placenta se han identificado distintos tipos de canales de potasio que son responsables del transporte de potasio a través de la membrana con el fin de mantener el potencial de membrana y el transporte de solutos electrogénicos. Sin embargo, el estudio de su caracterización funcional y estructural en el hSTB aún no se ha completado.

Por otra parte, en diversos tejidos se ha descrito la presencia de canales de potasio que se segregan en *Lipid Rafts* de membrana. Se ha comprobado que esta asociación canal-microdominio tiene implicancias en el funcionamiento del canal y se cree que el hSTB no está exento de esto. Es por eso que, el objetivo de éste estudio es identificar la relación existente entre los canales de potasio previamente identificados en tejido placentario y los microdominios lipídicos aislados de la membrana apical del hSTB.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS

La célula requiere de una barrera física que la separe y en determinadas situaciones, la aisle del medio externo. A su vez, necesita mantener el contacto con el medio, ya que de él obtiene los nutrientes esenciales para la vida. La separación física entre el medio interno y externo es realizada por la membrana celular, la cual tiene proteínas tanto integrales como periféricas que juegan roles fundamentales en el transporte, señalización, actividad enzimática etc. Siendo además un elemento de protección, mantención de la presión osmótica, intercambio de moléculas, transducción de señales, reconocimiento celular y motilidad celular o de organelos. Las características de la membrana dependen del tipo de célula, aunque presentan componentes comunes como son la presencia de una bicapa o matriz lipídica y proteínas.

1.1 Composición

Si bien se han descrito múltiples especies moleculares de origen proteico, lipídico y glucídico involucradas en la formación de la bicapa lipídica, el marco estructural básico de la membrana está conformado por lípidos, los cuales se comportan como moléculas anfipáticas, es decir, con una zona polar o hidrofílica hacia el exterior y una apolar o hidrofóbica hacia el interior.

Los lípidos de mayor importancia en las membranas de células eucariontes y clasificados según estructura química (Figura 1) son; los Glicerofosfolípidos, los Esfingolípidos y el Colesterol.

Los **Glicerofosfolípidos (GPLs)** son los principales componentes de la membrana, 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.

Los **Esfingolípidos (SPLs)** son lípidos que presentan una molécula de esfingosina en vez de glicerol como en el caso de los GPLs, se dividen en tres grupos de acuerdo a los

sustituyentes que conforman la cabeza polar de la molécula. Tienen una cabeza polar compuesta por uno o mas azucares que se unen directamente a través del primer –OH de la ceramida (esfingosina sustituida con una cadena de acido graso), no contienen grupo fosfato y se subdividen en cerebrósidos y globósidos. En los primeros la ceramida esta sustituida por una hexosa simple y neutra, mientras que en los segundos esta sustituida por dos o más azucares. El tercer subgrupo de SPLs corresponde a los gangliósidos, en los que la ceramida esta unida a un oligosacáridos complejo que tiene una o mas moléculas de acido siálico, sustituyente que le proporciona carga neta negativa al gangliósido (Bonales 2004).

El **Colesterol**, es el tercer componente lipídico y único esteroide presente en las membranas celulares eucariontes. Su estructura, tiene como base un núcleo esteroideo consistente en 4 anillos hidrocarbonados fusionados 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 (Bonales 2004).

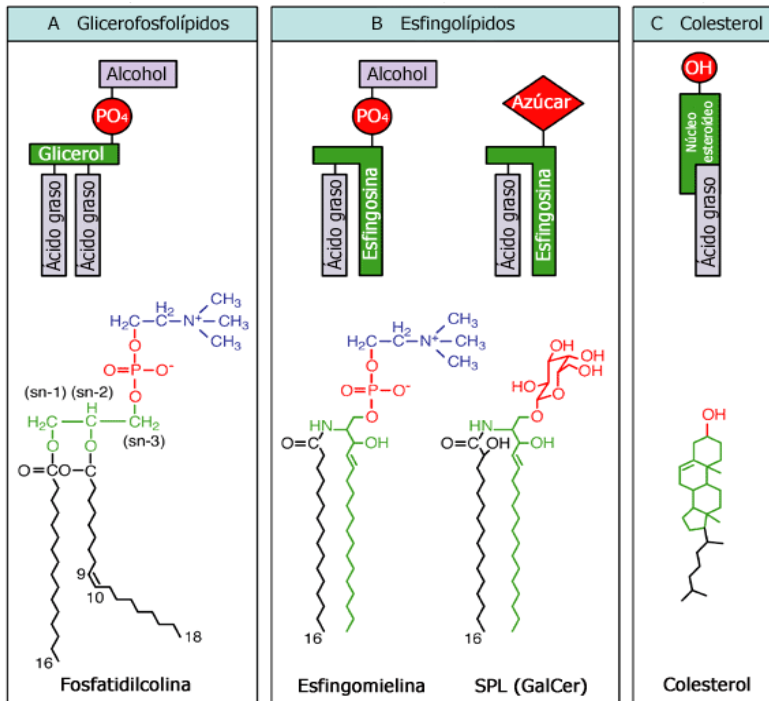


Figura 1. Clasificación de los lípidos de membrana basada en su estructura. A) Los GPLs son los principales componentes de las membranas lipídicas, difieren entre ellos en la estructura del alcohol que compone la cabeza polar. B) La esfingomielina, que es también un fosfolípidos, comparte el sustituyente 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 y cols. 2002).

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 esta presente en un 30-40%. La esfingomiolina se encuentra en un 10-20%, y el resto de los esfingolipidos usualmente representa muy bajos porcentajes dentro del total. En membranas especializadas, en cambio, como en el caso de las barreras epiteliales, los esfingolipidos pueden alcanzar hasta el 30% o más del total de los lípidos de la membrana plasmática.

Entre las dos caras de la membrana, la composición lipídica es asimétrica. Los esfingolipidos solo están presentes en la cara externa, mientras que ciertos fosfolípidos están restringidos a la cara citoplasmática de la membrana. El colesterol, por otra parte, se mueve espontáneamente entre las dos caras de la membrana, aun cuando interactúa preferentemente (no exclusivamente) con los esfingolipidos, por lo que parece ser más abundante en el lado externo de la membrana que el interno (Godoy 2006).

1.2. Estructura

En 1972, Singer y Nicholson plantearon el modelo de Mosaico Fluido que ha sustentado el conocimiento de la estructura de las membranas biológicas. Establece que los fosfolípidos de las membranas se encuentran ordenados en forma de bicapa lipídica, la cual es considerada como una matriz donde se incorporan diversas proteínas. Esta bicapa se encuentra formada por el acoplamiento de distintos lípidos anfipáticos, principalmente fosfolípidos, que cuando se encuentran en un medio acuoso se orientan espacialmente con las cabezas hidrofílicas hacia el exterior y las colas hidrófobas hacia el interior (Figura 2).

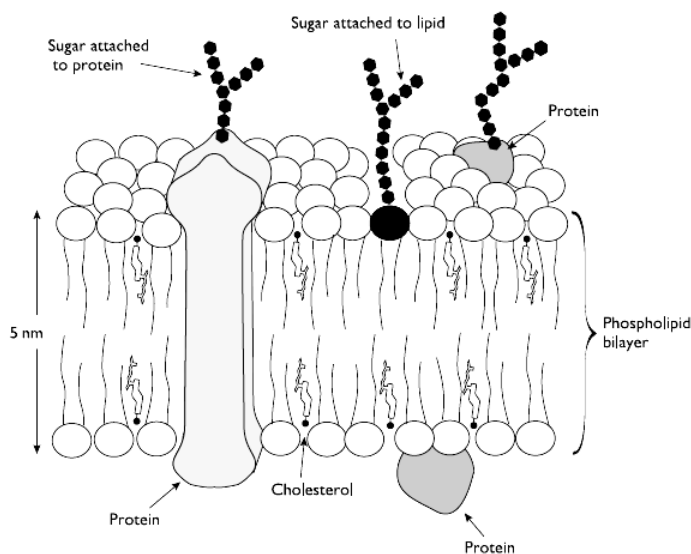


Figura 2. Estructura básica de la Membrana Plasmática. Se observa la bicapa lipídica compuesta principalmente por lípidos anfipáticos, en donde se encuentran insertas diversas proteínas, tanto integrales como periféricas.

La estructura de la bicapa lipídica se caracteriza por ser fluida, permitiendo el movimiento de los elementos que la componen. Esta propiedad se debe fundamentalmente a los componentes lipídicos de la membrana. Dependiendo específicamente, del largo y del grado de insaturaciones ácidos grasos y de la cantidad de colesterol presente. Este último, actúa como regulador de fluidez aumentándola o disminuyéndola acorde a los requerimientos de la célula.

La fluidez, permite que existan interacciones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína dentro del plano de la membrana y entre los componentes de membrana y el medio intracelular.

2. MICRODOMINIOS LIPÍDICOS O *LIPID RAFTS*

El modelo de Mosaico Fluido sugiere que la bicapa lipídica funciona como un solvente neutro bidimensional y que posee poca influencia sobre las funciones de membrana (Simons y Toomre, 2000). Además, enfatiza en la libre movilidad y autonomía de los lípidos y proteínas de la membrana. Este modelo carece de una organización lateral, lo que hace pensar que las moléculas en difusión pueden colisionar e interactuar en el plano de la membrana (Tang y Edidin, 2001).

Múltiple evidencia experimental sugirió que la distribución uniformemente al azar de proteínas y lípidos prevista por Singer y Nicholson era probablemente inexistente. En 1974, estudios sobre el efecto de la temperatura sobre las características de membrana habrían llevado a investigadores a proponer la presencia de agrupaciones de lípidos en la membrana, y el siguiente año se planteó que estos podrían ser regiones cuasi-cristalinas rodeadas por moléculas lipídicas más libremente dispersas de líquido cristalino. En 1978, esta idea fue refinada desde agrupaciones de “líquido cristalino rígido” a “lípidos en un estado más ordenado” (Pike 2008).

El concepto de dominio lipídico en las membranas fue formalizado en 1982 por Karnovsky y cols., quienes observaron múltiples fases en el ambiente lipídico de la membrana. Ellos, además investigaron el efecto funcional de alterar la estructura de

membrana por la adición de ácidos grasos específicos y, proféticamente, por la extracción de colesterol (Pike 2008).

Tempranas descripciones de *Lipid Rafts* o balsas lipídicas (nombre actual que reciben estas agrupaciones de lípidos) señalan que se encuentran enriquecidas en colesterol y glicosfingolípidos y se centran en su habilidad para resistir la extracción por detergentes no-iónicos. La visión inicial de un *Lipid Rafts* fue de una estructura de tamaño entre 100-500 nm de diámetro, que es relativamente estable y permanece unida por interacciones lípido-lípido. Algunas proteínas podrían participar dentro de estos dominios si tienen la afinidad apropiada para la inusual composición lipídica. Experimentos efectuados han dejado claro que los *Lipid Rafts* no son una sola estructura monolítica. Estos son una colección heterogénea de dominios que difieren en composición lipídica y proteica así como en estabilidad temporal (Pike, 2008).

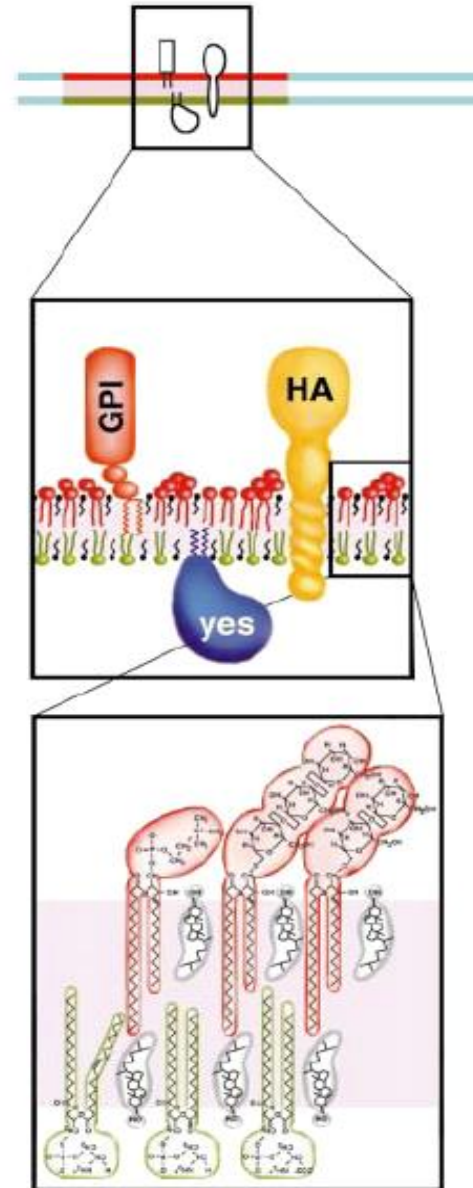
Un rol en su organización para los componentes proteicos de los *Rafts*, también se ha puesto de manifiesto. Este nuevo concepto es conseguido en la definición consensuada de un *Lipid Rafts* desarrollada el 2006 en el simposio de Keystone sobre *Lipid Rafts* y Función Celular: *“Los Lipid Raft son pequeños y altamente dinámicos microdominios de membrana (10-200nm) que son enriquecidos en colesterol y esfingolípidos y que compartimentalizan procesos celulares. Estos pequeños Rafts pueden a veces ser estabilizados para formar grandes plataformas a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípido.”* (Pike, 2008).

Hoy en día, se sabe que los microdominios están implicados en diversos procesos celulares tales como transducción de señales, tráfico de proteínas (incluyendo toxinas bacterianas) y lípidos intracelulares, además de ser sitios preferenciales para interacciones huésped-patógeno/toxina, entre otros. También están involucrados en la generación de formas patológicas de proteínas en enfermedades tales como el Alzheimer y aquellas producidas por priones (Fantini y cols., 2002). Se sugiere que esta variedad de funciones es acompañada por una diversidad en la composición de los microdominios. Actualmente, existe una visión emergente acerca de los *Lipid Rafts*, los cuales se observan como estructuras pluripotenciales que pueden adaptarse en forma, tamaño y contenido a determinadas funciones celulares.

Los microdominios se caracterizan por su riqueza en esfingolípidos y colesterol, pero también por poseer proteínas asociadas a ellos tales como: proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) como por ejemplo la fosfatasa alcalina, tirosinas quinasas de la familia Src, proteínas palmitoiladas y miristoiladas como la Flotilina, proteínas unidas a colesterol de membrana como Caveolina, ciertas isoformas de la proteína G y proteínas unidas a fosfolípidos como las Anexinas.

Figura 3. Estructura básica de un Microdominio Lipídico. Los *Lipid Rafts* (en rojo) se encuentran segregados de otras regiones de membrana (en azul). Contienen diversos tipos de proteínas unidas por el lado exoplasmico, citoplasmático o transmembrana a los microdominios. Se encuentran enriquecidos en moléculas de colesterol y fosfolípidos de ácidos grasos saturados, específicamente Esfingolípidos y pueden presentar proteínas palmitoiladas, miristoiladas o unidas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), entre otras, insertas en su estructura (Modificada de Godoy 2006).

Diversos métodos se han utilizado para aislar y caracterizar los *Lipid Rafts*. Los más comunes son aquellos que requieren destrucción celular y los menos frecuentes son los realizados en la célula intacta. El primer método se basó en la resistencia a la solubilización con detergentes no iónicos tal como Tritón X-100 (Brown y Rose 1992) motivo por el cual a los *Lipid Raft* también se les ha denominado DRMs, del inglés *Detergent-Resistant Membranes*. Las fracciones de membranas resistentes a detergentes que resultan de esta técnica son agregados de dominios *Raft* (Waugh y Hsuan 2009) que han probado ser útiles para el análisis y caracterización de los microdominios (Babiychuk y Draeger, 2006).



Adicionalmente, como se considera el colesterol un importante componente de la estructura de los *Lipid Rafts*, se puede realizar una extracción selectiva de esta molécula con ciclodextrina, importante oligosacárido altamente afín a esteroides (Christian y cols.

1997), en combinación con la extracción con Tritón X-100. Este método es utilizado para validar la asociación putativa de varios componentes con sus sitios *Rafts* (Babiychuk y Draeger, 2006).

Además, distintas proteínas pueden selectivamente ser incluidas o excluidas dentro de estos microdominios como elementos más bien dinámicos que estables, con el fin desarrollar distintos roles en estados inactivos o activos, lo cual tiene importantes implicancias para la célula ya sea en situaciones normales como patológicas (Martens y cols., 2004).

3. PLACENTA

La placenta es un órgano altamente especializado de la gestación que, junto con las membranas fetales y el fluido amniótico, da soporte al crecimiento y desarrollo normal del feto. Actúa proporcionando oxígeno y nutrientes al feto, mientras que remueve el dióxido de carbono y otros productos de desecho. Metaboliza un sin número de sustancias y ayuda a proteger al feto contra moléculas xenobióticas, infecciones y enfermedades maternas. Adicionalmente, libera hormonas dentro de la circulaciones materna y fetal que afectan la gestación, el metabolismo, el crecimiento fetal, el parto y otras demandas metabólicas para el desarrollo del feto a través de la gestación (Gude y cols., 2004).

Diferentes tipos de placentación se han categorizado acorde al número y tipos de capas entre la circulación materna y fetal. La placenta humana es un órgano vellosa hemocorial, por el cual, la sangre materna toma contacto directo con células trofoblásticas placentales y permite una relación íntima entre el desarrollo embrionario y el aporte de nutrientes (Gude y cols., 2004).

3.1. Estructura de la placenta madura.

La placenta se encuentra constituida tanto por tejido materno, derivado del endometrio, como fetal, derivado del saco coriónico. En la placenta madura, existe una región fetal, que lleva los vasos sanguíneos coriónicos fetales, y una región materna. Entre estas dos regiones, se encuentra el espacio intervilloso, el cual contiene la principal unidad

funcional de la placenta, las vellosidades coriónicas, que están extensamente bifurcadas y estrechamente cerradas y contienen los vasos sanguíneos fetales. En la región terminal de estas vellosidades coriónicas ocurre el mayor intercambio materno-fetal. El espacio intervelloso se encuentra totalmente delineado por un sincicio llamado Sinciciotrofoblasto placentario humano (hSTB). La sangre de la circulación materna entra a este espacio vía arterias endometriales espirales, baña la vellosidad y desemboca por venas endometriales. La sangre fetal deficiente en oxígeno pasa vía dos arterias umbilicales y bifurca en arterias coriónicas al sistema extenso arterio-capilar-venoso dentro de la vellosidad. La sangre oxigenada fetal retorna desde los capilares al feto vía varias venas coriónicas y una sola vena umbilical (Gude y cols., 2004).

3.2. La Barrera Placentaria

La barrera placentaria se refiere a las capas de células que separan la sangre materna en el espacio intervelloso y la sangre fetal en la vasculatura del corazón de la vellosidad. Como se observa en la figura 4, al inicio la barrera se compone de cuatro capas celulares; Sinciciotrofoblasto, Citotrofoblasto, tejido conectivo y endotelio de los capilares fetales. A partir de las 20 semanas de gestación la barrera placentaria se compone solo de tres capas, debido a que el citotrofoblasto se convierte en sincicio, se atenúa o desaparece, incluso en algunas zonas el Sinciciotrofoblasto se encuentra en estrecho contacto con el endotelio de los capilares fetales (Sadler, 2001).

El hSTB es una gran célula epitelial multinucleada y altamente especializada que funciona como barrera física, inmunológica y endocrina entre la circulación materna y fetal. Este epitelio, junto con el endotelio de los capilares fetales, conforman la barrera placentaria, que evita la mezcla entre la sangre materna y fetal, siendo además, el sitio de intercambio de diversas sustancias (Gude y cols., 2004).

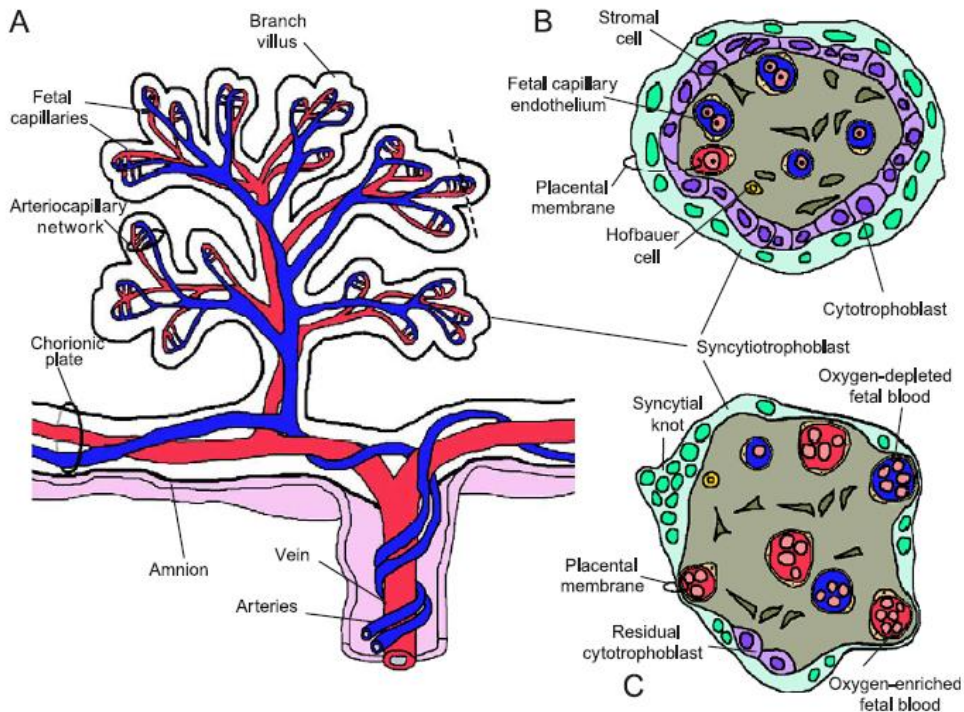


Figura 4. Esquema de la circulación feto-placentar. A), en el cual la línea punteada muestra una sección de la vellosidad coriónica aproximadamente a las B) 10 semanas de gestación. También se muestra una sección de C) la vellosidad coriónica a término. (Extraído de Gude 2004).

Como es un sincicio, el hSTB constituye la principal barrera para el transporte materno-fetal y, por lo tanto, todos los solutos deben atravesar necesariamente la membrana apical que va hacia la cara materna (o MVM; del inglés *microvillius membrane*) y la membrana basal que va hacia la cara fetal (BM; del inglés *basal membrane*). Además, es un epitelio altamente polarizado, lo que se traduce en una fuerte diferencia en composición lipídica y proteica entre sus dos membranas.

Se ha descrito la presencia de dos subdominios de membrana apical del hSTB; uno pesado (MVM) y uno liviano (LMVM del inglés *light microvillius membrane*) que difieren entre sí en composición relativa de proteínas de citoesqueleto y en sus microdominios (Jiménez y cols., 2004; Godoy y Riquelme, 2008).

El intercambio entre la madre y el feto constituye una de las funciones más importantes de la placenta, por lo tanto, se ha tratado de dilucidar los distintos mecanismos de transporte que existen en el hSTB, así como también su regulación y modulación. Sin embargo, aún resta trabajo para caracterizar totalmente el modelo de transporte transplacentar.

El transporte de solutos a través del hSTB es común para todas las membranas celulares. Existen dos sistemas de transporte de solutos en las membranas; la difusión simple a través de la bicapa lipídica, y el mediado por dos familias de proteínas integrales de membrana, los llamados transportadores y los canales iónicos. En particular, en los últimos años ha surgido un especial interés en el estudio de los canales iónicos presentes en las membranas del hSTB.

3.3. Canales Iónicos y Placenta

Los canales iónicos son considerados verdaderos conductores eléctricos biológicos que subyacen corrientes iónicas. Generalmente se supone que el mayor rol fisiológico de los canales de membrana se encuentra en el transporte de iones inorgánicos para procesos tales como absorción y secreción transepitelial, regulación de volumen celular, señales de transducción y control de las propiedades eléctricas de membrana. La creciente evidencia indica, sin embargo, que los canales juegan un importante rol en el transporte de solutos orgánicos en una amplia variedad de tipos celulares y organismos. Algunos de los mayores roles fisiológicos de los canales de solutos orgánicos incluye en consumo de nutrientes, excreción de productos metabólicos de desecho, control de metabolismo mitocondrial y regulación de volumen en el transporte de osmolitos orgánicos (Vallejos y Riquelme 2007).

El transporte que median es de carácter pasivo, es decir, a favor de una gradiente electroquímica. Entre las características biofísicas de los canales se encuentran su elevada velocidad de conducción en comparación con los transportadores, su alta selectividad para iones específicos y su apertura o cierre en respuesta a estímulos variados, ya sean de tipo mecánico, químico o eléctrico, tal es el caso de los canales dependientes de potencial. Sin excepción, en el sinciotrofoblasto placentario humano, tal como en otras células epiteliales, los canales proveen rutas para el movimiento rápido y pasivo de solutos a través de la membrana plasmática.

Se sabe que los canales iónicos en placenta son de gran relevancia para el desarrollo fetal. Al igual que en otros epitelios, en el hSTB se han descrito varios tipos de canales iónicos, los cuales cumplen diversas funciones, tales como la mantención del potencial de

membrana, regulación del volumen celular, transporte de nutrientes, etc. Debido a que los iones Na^+ , K^+ , Cl^- y Ca^{+2} son imprescindibles para la vida del feto, es muy importante conocer sus mecanismos de transporte (Stulc, 1997; Riquelme, 2009).

3.3.a Canales de Potasio en Placenta

Una de las familias de canales iónicos involucrados en las funciones señaladas anteriormente, es la de los canales de potasio. Siendo éste ión, el principal catión intracelular cuya concentración en el interior de la célula es controlada tanto por mecanismos de transporte activo como pasivo.

Los canales de potasio son proteínas integrales que forman poros acuosos de transmembrana que median el transporte pasivo específicamente del ión potasio (K^+).

Los canales de potasio conducen iones de potasio a través de la membrana celular, a favor de su gradiente electroquímica. La conducción de potasio comprende diferentes procesos celulares incluyendo el potencial de membrana, regulación de membrana celular, regulación de volumen celular y secreción de hormonas, entre muchas otras funciones en células epiteliales y no epiteliales (Díaz y cols. 2008).

Se han descrito múltiples familias de canales de K^+ conforme a sus características funcionales y estructurales en distintos tejidos. Ejemplo de ellas son la familia de canales de potasio dependiente de potencial (Kv), de doble-poro, los canales activados por calcio (BKca) y los canales rectificadores de entrada por mencionar algunos.

En placenta se han identificado distintas familias de canales de K^+ . Desde el punto de vista estructural, se ha descrito la presencia de canales de doble-poro como es el caso de TASK-1 (TWIK-related acid-sensitive K^+ channel), el cual se reportó utilizando flujos de rubidio 86Rb^+ en células de citotrofoblasto (precursoras del hSTB) en cultivo y adicionalmente por técnicas de biología molecular junto con TREK-1 (TWIK-related K^+ channels) (Bai y cols., 2005). Además, se ha demostrado la presencia de Canales de K^+ voltaje dependientes (Kv) y Canales de K^+ activados por calcio (BKCa) en vasculatura placentaria por medio de RT-PCR y *Western Blot* (Wareing y cols., 2006). En el aspecto funcional en cambio, se realizaron experimentos en explantes de vellosidades coriónicas de término, donde

describen la presencia de conductancias de K^+ sensibles a $BaCl_2$ (bloqueador típico de algunos Canales de K^+) las que contribuirían al potencial de reposo en la membrana apical (Birdsey y cols., 1999). En experimentos de *Patch-Clamp*, se describió funcionalmente la presencia de una corriente de K^+ rectificadora de entrada en células de citotrofoblasto, y se postuló que esta corriente es consistente con el canal de K^+ rectificador de entrada $K_{IR} 2.1$, el cual sería responsable en parte, del flujo neto de K^+ a través del sinciciotrofoblasto (Clarson y cols., 2001).

Recientemente, se ha publicado la caracterización de canales K^+ mediante métodos electrofisiológicos en membrana apical purificada de hSTB reconstituida en liposomas gigantes o trasplantada en ovocitos de *Xenopus laévis*, detectándose la presencia de corrientes de K^+ sensibles a Ba^{+2} /TEA y moduladas por Na^+ (Díaz y cols., 2008).

Tal como sucede en otros epitelios, la actividad de los canales de K^+ en el hSTB tiene una influencia mayoritaria en el potencial de membrana y en el transporte electrogénico de solutos. Sin embargo, su identificación, expresión, función e interacción lípido-proteína en la placenta no ha sido totalmente descrita hasta la fecha, aún cuando fisiológicamente, su presencia es fundamental en el sinciciotrofoblasto.

3.4 Placenta y *Lipid Rafts*

La membrana apical de las células epiteliales, es una estructura particularmente rica en lípidos característicos de los *lipid rafts*, los cuales parecen ser esenciales para la mantención y estabilidad de la microvellosidad.

En el 2008, Godoy y Riquelme caracterizaron microdominios lipídicos en membrana apical del hSTB. Los hallazgos más importantes fueron, la presencia de estas estructuras en ambas fracciones apicales y la existencia de dos tipos distintos de microdominios tanto en MVM como en LMVM (Godoy y Riquelme, 2008).

En éste caso, los autores realizaron una caracterización mediante *Western Blot* y *Dot Blot* con marcadores específicos *rafts* como PLAP, Anexina 2 (Anx-2) y el Glicosfingolípido llamado gangliósido GM1 y con marcador de dominios no-*rafts* como el receptor de Transferrina humano (hTf-R). La Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP) ha sido probada como un eficiente marcador *Rafts* (Saslowsky y cols., 2002), siendo además

importante su presencia en membranas Apicales. Por otra parte, el gangliósido GM1 es un esfingolípido constitutivo de *Rafts* y se ha demostrado mediante inmunofluorescencia que se encuentra en diferentes subdominios apicales de tejido epitelial, como células MDCK o *Madin-Darby Canine Kidney* (Janich y Corbell, 2007).

Los resultados indicaron que las fracciones *rafts*, desde MVM y LMVM, mostraron un *Peak* consistente para los marcadores PLAP y GM1, en donde se expresaron más abundantemente en sitios *rafts* de LMVM que en los de MVM. Anexina 2 se presenta en sitios *Rafts* sólo de LMVM y la hTf-R se ubicó en sitios no-*Rafts*. Por ende, los resultados muestran dos distintos *lipid rafts* desde MVM y LMVM respectivamente. Por otra parte, la depleción de colesterol modificó la segregación en ambos grupos de *Lipid Rafts*.

Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas entre MVM y LMVM en contenido de colesterol y en expresión de proteínas de citoesqueleto. MVM es enriquecida en ezrina y β actina, en contraste, el colesterol y la citoqueratina 7 son más abundantes en LMVM. Estas diferencias podrían explicar las distintas propiedades de los subtipos de *lipid rafts* (Figura 5).

En síntesis, los autores de éste trabajo, demostraron que LMVM y MVM contienen *Lipid Rafts* y que ambos subdominios apicales son diferentes entre sí en cantidad de colesterol, proteínas de citoesqueleto y características de los Microdominios aislados.

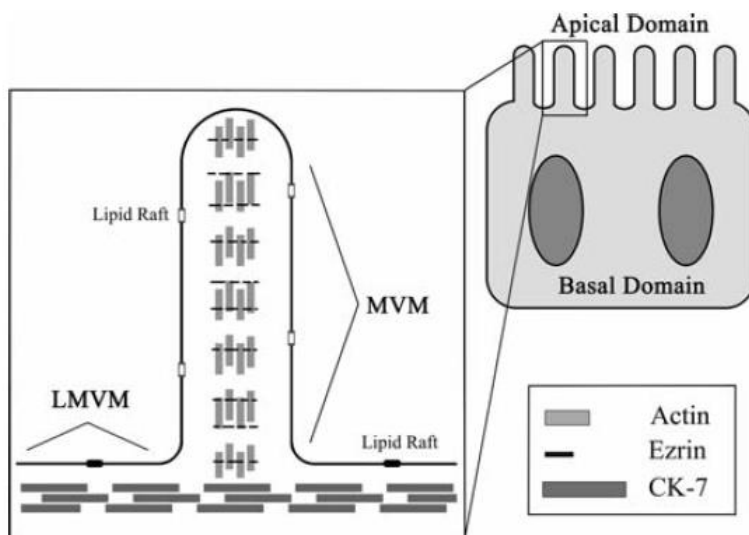


Figura 5. Modelo de localización de Lipid Rafts en la microvellosidad del hSTB. El modelo propone dos distintos subdominios que podrían corresponder a la fracción de membrana apical purificada. En el rectángulo blanco los *lipid rafts* de MVM podrían corresponder a la proyección de la microvellosidad, la cual es estabilizada por su citoesqueleto específico. En el rectángulo negro, los *rafts* presentes en LMVM corresponden a la base de la microvellosidad. (Extraído de Godoy y Riquelme 2008).

Este trabajo concluyó que la metodología implementada fue efectiva para la obtención de microdominios resistentes a detergentes o *lipid rafts*, libres de contaminación de elementos asociados a zonas no-*rafts* (Godoy y Riquelme, 2008). Además, corresponde al primer avance en la caracterización de la presencia de microdominios lipídicos en el dominio apical del hSTB, incluyendo tanto a MVM como a LMVM y será utilizada como una base metodológica para nuestros experimentos.

4. Lipid Rafts y Canales Iónicos

Los canales iónicos juegan un importante rol en la fisiología celular y aunque no todos se asocien con *lipid rafts*, se ha propuesto, debido al dinamismo de las balsas lipídicas, que la asociación de los canales con microdominios pueden estar involucrados en la regulación de la barrera funcional endotelial, debido a que los canales iónicos están involucrados en la regulación de la permeabilidad celular, transición, angiogénesis, respuesta al estrés y apoptosis (Szabo y cols. 2004).

Trabajos de colocalización con inmunofluorescencia y aislamiento de *Rafts*, combinado con herramientas de análisis de biología molecular (*Western Blot*), han podido demostrar que hay canales iónicos asociados a *lipid rafts* en formas tan diversas y en diferentes tejidos que resulta interesante la dinámica con la que interactúa el canal y el microdominio.

4.1 Lipid Rafts y Canales de Potasio.

Como se mencionó anteriormente, existen varios tipos de canales de potasio descritos en placenta, sin embargo, aún no existen estudios acerca de su interacción con microdominios de membrana en dicho tejido. En contraste, se ha desarrollado interesante evidencia al respecto en otras células.

Se sabe que los miembros de casi todas las familias de canales de potasio rectificadores de entrada K_{IR} se ubican en *lipid rafts*. Entre ellos, los $K_{IR} 2$ son suprimidos en actividad si se les aumenta el colesterol de membrana, en cambio, los $K_{IR} 4$ son

activados. Si existe supresión en hipercolesterolemia, tiene efectos en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Levitan y cols. 2010).

Un ejemplo es el trabajo hecho por Romanenko y otros el 2004, donde señalan que K_{IR} 2.1 se particiona en *lipid rafts* en células de ovario de Hamster Chino y al aumentar los niveles de colesterol el canal se inhibe.

También se ha observado, que al enriquecer las células aórticas endoteliales de bovino con colesterol provoca que la densidad de corriente del K_{IR} disminuya, mientras que la depleción de colesterol causa un aumento (Romanenko y cols., 2002).

Martens y cols. (2000), descubrieron la presencia del canal dependiente de voltaje K_V en *Lipid Raft*. Aislaron microdominios en células de cerebro de rata mediante el uso de Tritón-X-100 seguido de una flotación en gradiente de sacarosa. Mediante la técnica de *Western Blot* y la colocalización con inmunofluorescencia identificaron la inserción del canal dependiente de voltaje K_V 2.1 en microdominios no caveolares. Luego trataron éstas células con 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (un tipo de ciclodextrina que se utiliza para extraer colesterol de las células directamente) y las sometieron a caracterización funcional mediante *Patch Clamp*. La conclusión fue que el tratamiento no modificó ni la apertura, ni la expresión del canal en la superficie de membrana, si no que alteró su inactivación. Un año después, Martens y cols. (2001), demostraron que los canales K_V se insertan en distintas poblaciones de *lipid rafts* de membrana. Estos investigadores proponen que la asociación de canales K_V con *rafts* sirve principalmente para agruparlos a moléculas de señalización aumentando la eficiencia de funcionamiento del canal. Esto, dado que los canales K_V son modulados por la activación de varias vías de señalización y comúnmente contienen múltiples sitios de fosforilación.

En suma, la segregación de una proteína, ya sea en dominios *rafts* o *no-rafts*, tiene implicancias en la fisiología celular y se ha observado que si se altera la interacción normal entre una proteína específica y los lípidos pertenecientes a sitios *Rafts* se generan condiciones distintas, e incluso patológicas. Acorde a esto y a los ejemplos mencionados anteriormente, diversas evidencias indican la participación de distintos tipos de canales de potasio en microdominios lipídicos de tejidos no placentarios y su implicancia en la función celular ya sea en condiciones normales como patológicas (Martens y cols. 2004).

En resumen, en el caso del hSTB, se ha descrito la presencia de canales de potasio y también de microdominios Lipídicos en su membrana apical. En otros tejidos, se ha demostrado que la distribución de canales de potasio en microdominios lipídicos tiene cierta implicancia en las funciones celulares, por lo tanto, es esperable que también suceda en este particular epitelio que es el hSTB. La hipótesis del presente trabajo es que los canales de potasio, previamente descritos en placenta, se segregan entre dominios *Rafts* y *no-Rafts* en ambos subdominios de la membrana apical; MVM y LMVM. Los resultados podrían significar un importante punto de partida para comprender el rol fisiológico de la asociación lípido-proteína, y en éste caso la de un canal de potasio y su microdominio lipídico dentro en la función de transporte en la membrana apical en nuestro tejido de interés. En éste contexto, a continuación se plantean la hipótesis y los objetivos del presente estudio.

HIPÓTESIS

Los canales de potasio K_{IR} 2.1, K_V 2.1, TASK-1 y TREK-1 se encuentran en dominios rafts y/o no-rafts de membrana apical liviana (LMVM) y pesada (MVM) del Sinciciotrofoblasto Placentario Humano.

OBJETIVO GENERAL

Describir la distribución de los canales de potasio, previamente identificado en placenta, K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1 en dominios *rafts* y/o *no-rafts* en ambos subdominios de membrana apical (MVM y LMVM) del sinciciotrofoblasto placentario humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Obtener los dos subdominios de membranas apicales (MVM y LMVM) purificadas a partir de una placenta de término.

- 2) Obtener fracciones *Raft* y *no-Raft* mediante el protocolo de solubilización con detergente no iónico Tritón X-100 de ambas MVM y LMVM purificadas y caracterizar estas fracciones de acuerdo a la utilización de marcadores específicos tales como:
 - a) Fosfatasa Alcalina (PLAP), Flotillita-1 (Flot-1) y Gangliósido GM1: Marcadores *raft*.
 - b) Receptor de Transferrina (hTf -R): Marcadores *no-raft*.

- 3) Identificar la expresión de los distintos tipos de canales de potasio en las membranas del hSTB (BM, MVM y LMVM) y caracterizar su distribución entre fracciones *rafts* y *no-rafts* de MVM y LMVM mediante experimentos de *Western Blot* con anticuerpos específicos para K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1.

- 4) Confirmar la presencia de los canales de potasio que se ubican en dominios *rafts*, mediante la disrupción de su estructura extrayendo el colesterol de membrana con metil- β -Ciclodextrina, previo a la solubilización con detergente Tritón X-100, y estudiar su efecto mediante experimentos de *Western Blot*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de Membranas Apicales

El método aplicado para la obtención de membranas purificadas a partir de una placenta de término de embarazos fisiológicos, fue reproducido en base al protocolo de *Aislamiento y Purificación de Membranas Plasmáticas* descrito por Jiménez y cols.,(2004).

1.1 Obtención de Placentas.

Las once placentas de término provenientes de embarazos fisiológicos, fueron obtenidas desde Unidad de Pre-parto del Hospital San José previo consentimiento de la paciente. Dentro de los criterios de selección de las pacientes donantes, se descartaron placentas de mujeres con obesidad, patologías asociadas, medicamentos prescritos y nacionalidad extranjera, entre otros. La placenta, por su parte, no debía tener meconio y ni peso inferior a 550 grs. Las placentas fueron trasladadas inmediatamente después del alumbramiento a 4° C, hacia el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

1.2 Procedimiento de preparación de Membranas Apicales.

En la cara materna, los cotiledones fueron cortados en trocitos pequeños hasta alcanzar 100 grs., y fueron lavados con NaCl 0.9% 4 veces para retirar residuos de sangre. El tejido se resuspendió en tampón A (250nM sacarosa; 10mM Tris-Hepes pH 7,4; 0,7µM Pepstatina A; 1,1 µM Leupeptina; 80 mM Aprotinina) y homogeneizado a baja velocidad 3 veces por 30 segundos cada vez, en 3 volúmenes de tampón A frío.

El homogeneizado fue centrifugado a 5860 x g durante 15 minutos y el sobrenadante fue removido y retenido. El sedimento fue resuspendido en tampón A y re-homogeneizado por 30 segundos, 3 veces. Este segundo homogeneizado fue centrifugado nuevamente a 5860 x g durante 15 minutos y éste sobrenadante, junto con el anterior, fueron combinados y centrifugados a 10000 x g durante 15 minutos. El sedimento, que se encuentra enriquecido

en membranas mitocondriales fue descartado. El sobrenadante fue centrifugado a 124000 x g durante 30 minutos; el sedimento resultante fue resuspendido en 250ml de tampón A y homogeneizado en vidrio-teflón.

El homogeneizado fue agitado a 4°C con MgCl₂ 12 mM por 20 minutos y luego centrifugado a 2500 x g durante 10 minutos. En esta etapa, el Mg⁺² se une a la membrana basal permitiendo que se separe de la membrana apical en la centrifugación por precipitación.

El sobrenadante con la membrana microvellosa o apical, fue centrifugado a 12100 x g por 70 minutos y el sedimento fue resuspendido en tampón B (300 mM sacarosa, 20 mM Tris-Maleato, pH 7,4). El sobrenadante corresponde a la fracción microsomal apical (mMVM).

El *pellet* con membrana basal fue resuspendido en 250ml de Tampón A, agitado en hielo por 60 minutos, y centrifugado a 4340 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 98500 x g durante 45 minutos y el sedimento resultante fue resuspendido en tampón A. Esto corresponde a la fracción microsomal basal (mBM).

La mMVM se sometió a una purificación en gradiente discontinua de sacarosa al 37/45% tamponadas en 20 mM de Tris Maleato, pH 7,4, y la mBM se sometió a una gradiente de sacarosa al 45/52% tamponada en 10 mM de Tris Hepes para la obtención de las fracciones finales purificadas. Una porción de mMVM y de mBM fueron cargadas en sus respectivas gradientes y centrifugadas a 90000 x g por mínimo 6 horas a 4°C. Para el caso de mMVM, La banda en la interfase 10/37% de sacarosa corresponde a la fracción de membrana apical liviana (LMVM) y la banda de la interfase 37/45% de sacarosa corresponden a la fracción de membrana apical pesada (MVM) y en el caso de mBM la banda en la interfase 10/45% corresponde a contaminación apical que es desechada y la interfase 45/52% corresponde a la membrana basal (BM). LMVM y MVM fueron recolectadas y diluidas 10 veces en 20mM Tris-Maleato y la BM en 10mM Tris-Hepes para luego ser sometidas a una centrifugación a 110000 x g durante 30 minutos. Los sedimentos finales fueron resuspendidos en Tampón B, alicuotados y guardados en nitrógeno líquido. (Figura 6)

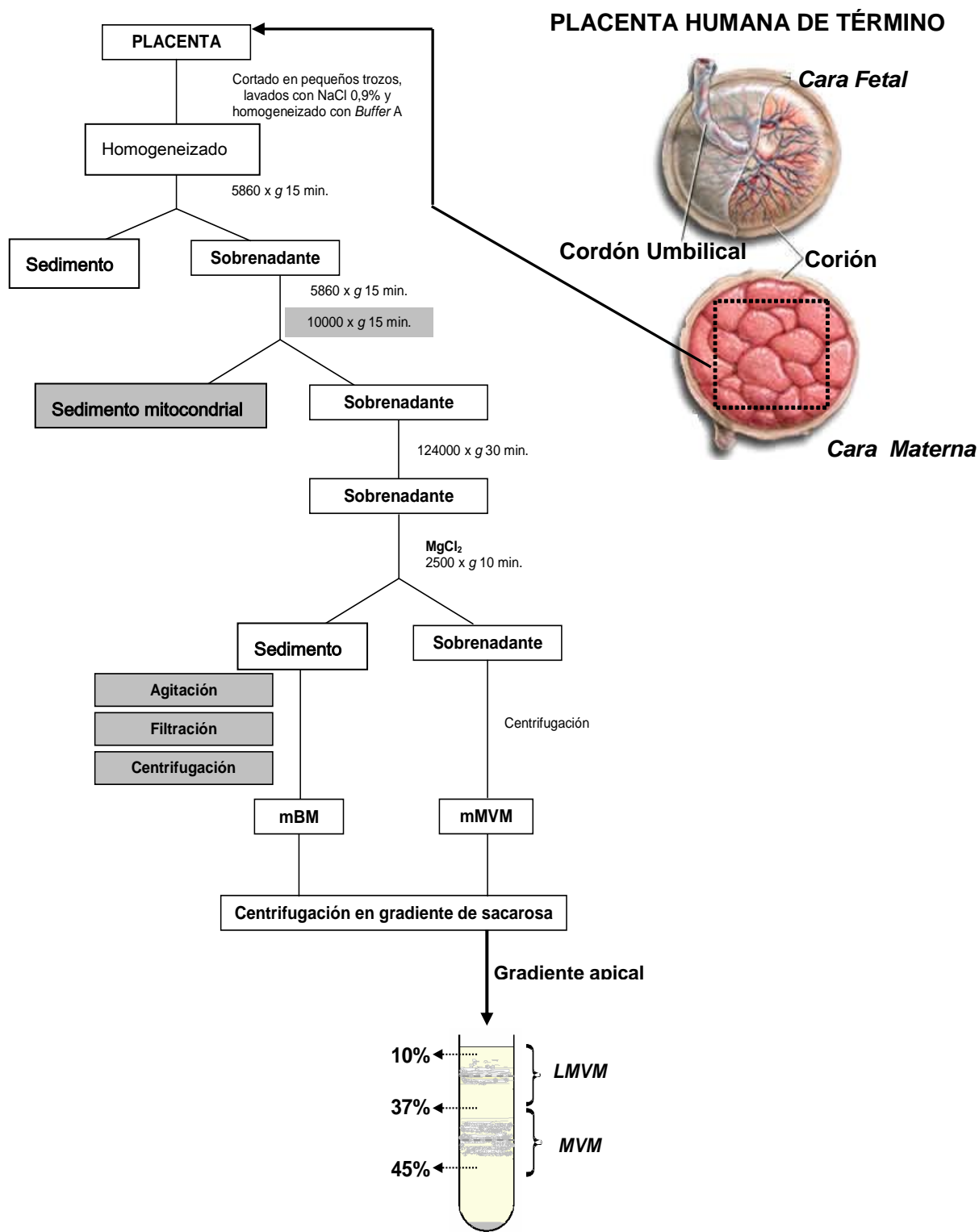


Figura 6. Esquema resumen del protocolo de preparación de ambos subdominios de membrana apical (MVM y LMVM)(Modificado de Jiménez 2004).

1.3 Determinación de proteínas y actividad de Fosfatasa Alcalina en las membranas purificadas.

La concentración de proteína se cuantificó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) Protein Assay Kit (Sigma, Pierce Biotechnology, Inc.) donde se realiza una detección colorimétrica, la cual indica la cantidad de proteína total para MVM, LMVM y BM. La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino (BSA) y luego se interpolaron los valores obtenidos para las fracciones de membrana (Jiménez y cols., 2004). La cantidad total de proteína obtenida se calculó multiplicando la concentración de proteína obtenida en cada fracción (mg/ml) por el volumen total de resuspensión de la muestra.

La pureza y enriquecimiento de MVM y LMVM fue determinada midiendo la actividad enzimática de Fosfatasa Alcalina, un marcador de membrana apical epitelial, que cataliza la hidrólisis del p-Nitrofenilfosfato a p-Nitrofenol y fosfato, produciéndose un aumento de absorbancia a 405nm mediante espectrofotometría, proporcional a la concentración de enzima en la muestra.



El valor obtenido se expresa como unidad enzimática, la cual corresponde a la cantidad de Fosfatasa Alcalina que cataliza la conversión de 1 μmol de p-Nitrofenilfosfato por minuto con respecto de la concentración de proteínas (UI/mg). Para determinar el enriquecimiento, los valores calculados para cada fracción se dividieron por el del homogeneizado.

2. Preparación de Microdominios Lipídicos a partir de Membranas Apicales.

La obtención de microdominios lipídicos a partir de LMVM y MVM del hSTB, fue realizada mediante la solubilización con detergente no iónico Tritón X-100, según lo descrito por Godoy y Riquelme (2008), con un total de 9 placentas normales. Se calculó un total de 0,6 mg de proteína total de LMVM y MVM y se resuspendió en 1 ml final con solución de homogenización de Tritón X-100 al 1,1 % en solución tampón MBS (MES 25

mM; NaCl 150 mM; pH 6,5). Esta solución fue homogenizada en homogenizador Dounce 30 veces y luego se incubó por 90 min. en hielo y mezclada con 1 ml de solución de sacarosa 80% para obtener una concentración final al 40%. Para la formación de un gradiente discontinuo de sacarosa, el lisado (2 ml al 40%) se cargó en el fondo de un tubo de centrifuga de rotor Sorvall AH-650, sobre éste se cargaron 2 ml de solución de sacarosa 35% y luego 1 ml de solución de sacarosa 5%. La gradiente fue ultracentrifugada a 40 K (217000 x g) por 22 hrs a 4°C. Se recolectaron 10 fracciones de 0,5 mL c/u desde la parte superior de la gradiente, usando una bomba peristáltica. Además el sedimento fue resuspendido en 0,5 ml de tampón MBS y agregado como fracción 11 al estudio. Las 5 primeras fracciones corresponden a los dominios *Rafts* y el resto corresponde a dominios no-*Rafts*. Todas las fracciones fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

La figura 7 muestra un resumen del protocolo detallado anteriormente, indicando los pasos claves para la obtención de microdominios.

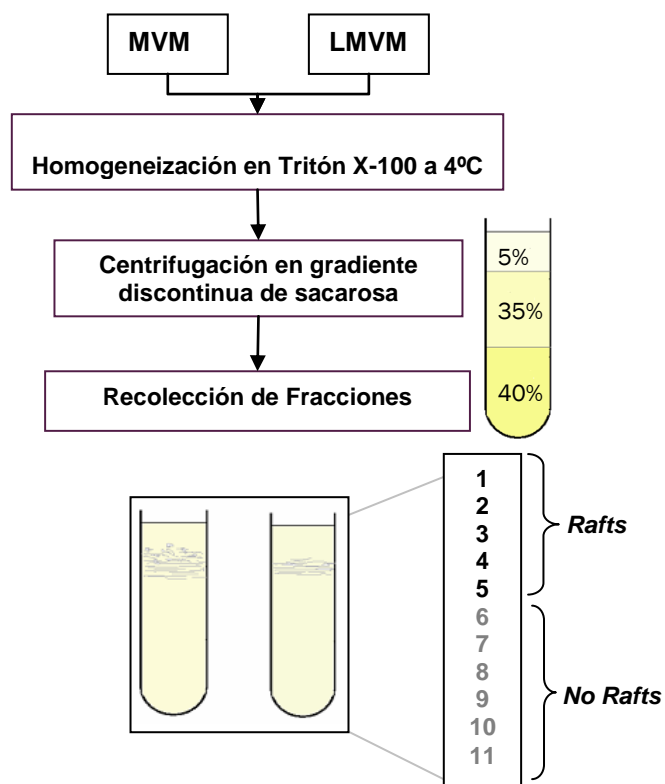


Figura 7. Resumen del protocolo de preparación de microdominios Lipídicos a partir de membranas apicales.

3. Técnica de Electroforesis SDS-PAGE y *Western Blot*

3.1 Electroforesis

3.1a Preparación de muestras

Este procedimiento se realizó en las tres fracciones de membrana purificadas de cada placenta (MVM, LMV y BM), una vez hecha su determinación de proteínas. Se tomó un volumen de muestra con una cantidad de 120 ug totales, luego se completa con agua bidestilada más tampón de muestra (Tris 25mM; Glicerol 50%; SDS 10%; ditiotreitól 50 mM y azul de bromofenol 0,5%; pH 6,8) hasta obtener un volumen final de 60 µl (a una concentración de 2µg/µl). Estas muestras son hervidas por 5 minutos, se enfrían y se almacenan a -20°C listas para ser cargadas en geles de electroforesis. El volumen de carga de muestra por pocillo fue de 10 µl, es decir, 20 µg totales.

En el caso de las 11 fracciones *Rafts* y *no-Rafts*, para ser cargadas en geles de Electroforesis, se incubó por 30 minutos en hielo un volumen de 50 µl, más 50 µl de agua bidestilada y 13 µl de ácido tricloroacético (TCA). Luego, la muestra fue precipitada en una centrifugación de 21000 x g por 30 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió con 500 µl de solución Tris HCl pH 6.8 y se centrifugó nuevamente a 21000 x g por 30 minutos a 4°C. El sedimento es resuspendido en 10 µl de agua bidestilada más 10 µl de tampón de muestra (20 µl totales). Finalmente, se hirvieron las muestras por 5 minutos y fueron almacenadas a -20°C.

3.1b Procedimiento de Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras anteriormente mencionadas, ya sea la membranas enteras como las 11 fracciones del aislamiento de microdominios lipídicos, fueron cargadas en geles de poliacrilamida con SDS (electroforesis SDS-PAGE) a un porcentaje de concentración variable según el peso molecular (PM) de la proteína en estudio. Para el caso de los marcadores como PLAP, hTf-R y Flotillina-1 se prepararon geles al 10%, mientras que para el estudio de los canales de potasio se usaron geles al 8%. Una vez cargadas las

muestras, junto con el marcador de PM (Fermentas), los geles fueron sometidos a una electroforesis por 2 horas a 100 volts a temperatura ambiente (TA). El resultado de la migración de proteínas en el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) por toda la noche a 4°C a 30 volts.

3.2 *Western Blot*

El *Immunoblotting* o *Western Blot* es un protocolo de inmuno-detección donde una reacción antígeno anticuerpo permite detectar una proteína en cuestión. Sus principales etapas son; bloqueo de sitios inespecíficos, incubación con anticuerpo primario contra la proteína testada, incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidada que se une al primario y un reactivo de detección basado en peróxido de hidrógeno, que al ser catalizado por la peroxidasa del anticuerpo secundario genera una reacción quimioluminiscente que se expone en películas de revelado. Todo se realiza bajo constante agitación y entre cada incubación se realizan lavados con tampón de lavado (TL) (138 mM NaCl, 270 mM KCl, 0,05% Tween-20).

Luego de realizada la transferencia del gel a la membrana, ésta fue teñida con rojo de Ponceau al 0,1% (Sigma) para verificar si hubo transferencia desde el gel a la membrana de proteína. Luego se lavó 3 veces la membrana, se bloqueó con blotto al 5% (leche descremada) en tampón de lavado por 1 hora a temperatura ambiente. Se repitieron los 3 lavados y se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios por 2 horas a TA. Los anticuerpos primarios utilizados para los marcadores con sus respectivas diluciones fueron: Anti-PLAP (Clon 836 Sigma) 1:500, Anti-hTf-R (Clon H68, 4 Zymed) 1:500, Anti-Flotillina-1 (Clon 18, BD Transduction) 1:250, todos diluidos en agua bidestilada. Para los canales de potasio, se utilizan los siguientes anticuerpos con sus respectivas diluciones; Anti-K_{IR} 2.1 (Alomone Labs, APC-026) 1:1000, Anti-K_V 2.1 (Alomone Labs, APC-012) 1:250, Anti-TASK-1 (Alomone Labs, APC-024) 1:500 y Anti-TREK-1 (Alomone Labs, APC-047) 1: 1000, todos diluidos en BSA (albúmina de suero bovino) al 1% en PBS (tampón fosfato salino pH 7,4).

Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces y se incubó con anticuerpo secundario HRP-conjugado (conjugado con peroxidasa de rábano); *goat anti-mouse* (Amersham) en una

dilución de 1:10000 en BL para los marcadores y *rabbit* (Santa Cruz) en una dilución de 1:5000 en BL para los canales de potasio. Se hicieron los últimos 3 lavados de la membrana, se deposita una pequeña porción (1,5 ml) de reactivo ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, UK) dando lugar a la reacción de quimioluminiscencia, la cual se reflejó en films de revelado (Thermo Scientific).

4. Dot Blot

Esta técnica es una variante del *Western Blot*, se utiliza para pruebas de alta sensibilidad, como la identificación de moléculas de baja concentración en una muestra. Fue implementada para identificar el marcador *Rafts* Gangliósido GM1, el cual se une a la sub-unidad β de la toxina colérica intestinal.

De cada una de las 11 fracciones *Rafts* y *no-Rafts* se tomaron 3 μ l y se sembraron directamente en una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific), la que luego fue secada durante 1 hora y posteriormente bloqueada a temperatura ambiente por 2 horas con BSA al 3% en PBS (Buffer Fosfato Salino pH 7,4). Posteriormente la membrana se incubó toda la noche a 4°C con la sub-unidad β de la toxina colérica que viene conjugada con peroxidasa (Sigma) y se depositó el ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, UK), dando lugar a la reacción de Quimioluminiscencia plasmada en Films de Revelado (Thermo Scientific).

5. Análisis Densitométrico y Estadístico

Las bandas del *Immunoblotting* y los Círculos del *Dot Blot* fueron cuantificados con el programa Image J Version 1.44b (Imagen Processing and Analysis in Java). Los resultados finales fueron expresados en promedios \pm error Standard del promedio. El nivel de significancia estadística fue probado usando ANOVA (Análisis de Varianza), considerando significativos los datos con un valor $P < 0,05$.

Los valores obtenidos en *Western Blot* realizados en membranas enteras (MVM, LMVM y BM), ya sea para el caso de PLAP como de los canales de potasio, fueron normalizados mediante respectivos valores de actina como control de carga.

5.1 Cálculo de los datos graficados.

Se realizaron las densitometrías de las bandas obtenidas en *Western Blot* en MVM, LMVM y BM para la proteína probada. La sumatoria de los valores de cada membrana se consideró como el 100% y se asignó a cada membrana un porcentaje con respecto del total. Los datos se expresaron como Promedios \pm Error Standard del Promedio (SEM) de los n experimentos realizados. Para el caso de las densitometrías de las 11 fracciones, se sumaron los 11 valores y se consideró esto como un 100%. Se calculó el porcentaje de cada banda dentro de un total, tal como se realizó para las membranas enteras.

6. Extracción de Colesterol de membrana con Metil- β -Ciclodextrina

Para extraer el colesterol de membrana de LMVM y MVM, se incuban estas fracciones apicales con metil- β -Ciclodextrina (m β CD). Este oligosacárido se utiliza de rutina para extraer el colesterol de las membranas.

Previo al tratamiento con Tritón X-100 para la obtención de microdominios lipídicos, MVM y LMVM fueron incubadas con 2% de Metil- β -Ciclodextrina (m β CD) diluida en tampón MBS (MES 25 mM; NaCl 150 mM; pH 6,5) a 37° C por 30 min. Luego, se centrifugaron por 90 minutos a 4° C. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 ml de solución de homogenización de Tritón X-100 al 1,1 % en tampón MBS, continuando con el protocolo de purificación de microdominios lipídicos anteriormente descrito. Las 11 fracciones finales fueron sometidas a *Western Blot* para aquellos canales de potasio que se ubican en sitios *rafts*.

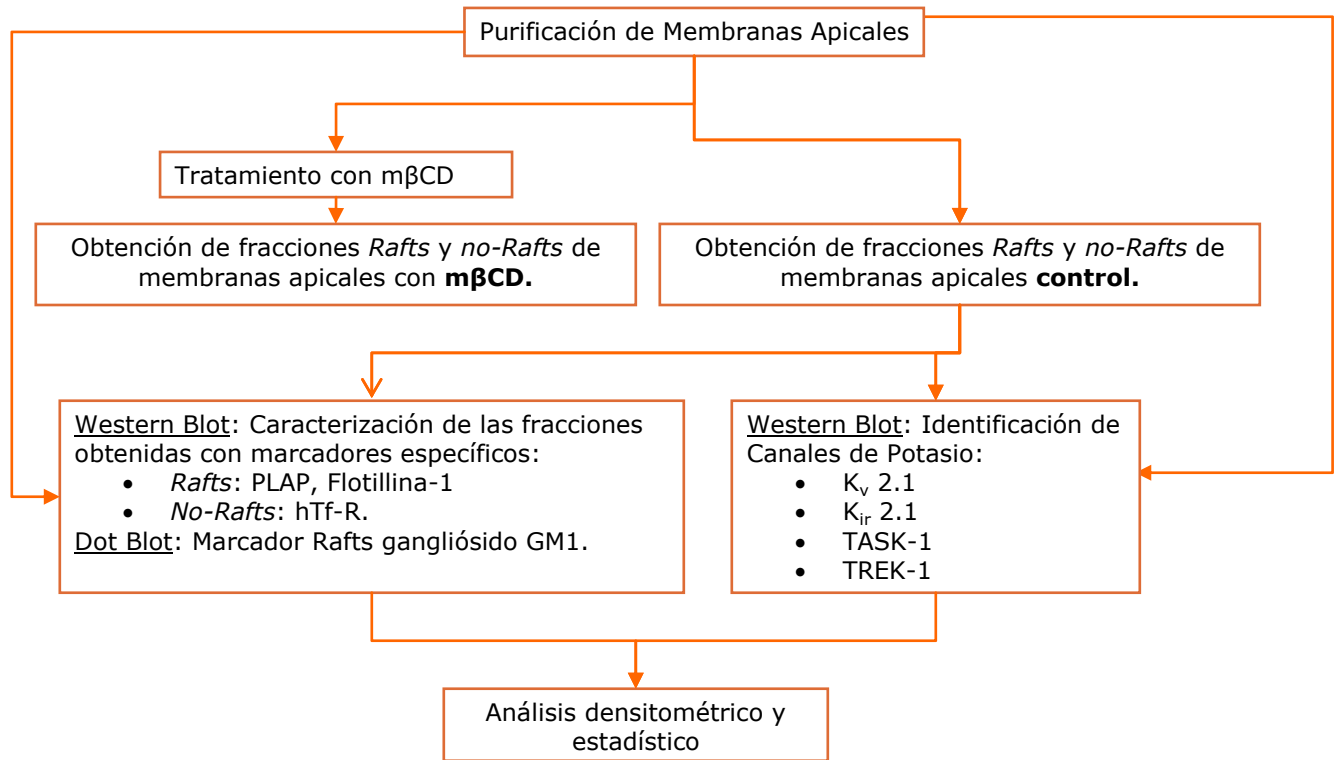


Figura 8. Resumen de la Metodología aplicada. El esquema indica un orden de los pasos que se llevaron a cabo para llegar a nuestro objetivo primordial, que es la caracterización de la segregación de los distintos tipos de canales de potasio entre dominios *Rafts* y *no-Rafts* de MVM y LMVM inicialmente purificadas.

RESULTADOS

1. Obtención y caracterización de ambos subdominios de membrana apical (MVM y LMVM) purificados a partir de una placenta de término.

Tal como se detalló en materiales y métodos, las placentas fueron sometidas al protocolo de aislamiento y purificación de membranas para obtener las fracciones de membrana del *Sinciciotrofoblasto*; MVM, LMVM y BM. En cada una de estas, se determinó la concentración de proteínas y se cuantificó la actividad de Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP), una proteína utilizada como marcador de membrana apical epitelial.

La siguiente tabla, muestra el promedio y su error standard de la concentración de proteína (expresada en mg/ml) y del enriquecimiento de Fosfatasa Alcalina con respecto del homogeneizado, obtenido a partir de 11 placentas.

	Conc. Proteínas (mg/ml)	Enriquecimiento de PLAP
Homogeneizado	12,2 ± 2,1	1
MVM	6,4 ± 0,7	14,3 ± 1,6
LMVM	5,4 ± 0,5	19,4 ± 2,1
BM	5,3 ± 0,6	3,7 ± 0,6

Tabla 1. Concentración de proteínas y enriquecimiento de Fosfatasa Alcalina de las fracciones de membrana del hSTB (n=11). Este último fue calculado dividiendo la actividad enzimática de las fracciones por la actividad del homogeneizado.

Los valores mostrados en la Tabla 1 son comparables a los que rutinariamente se han obtenido en el laboratorio.

Dado que la fracción MVM se resuspendió en 1 ml, la proteína total obtenida fue de 6,4 mg. Las fracciones LMVM y BM se resuspendieron en 500 µl, por lo tanto, el total de proteína fue de 2,7 y 2,6 mg respectivamente.

Tal como era esperable, el enriquecimiento de Fosfatasa Alcalina fue mucho mayor en las fracciones apicales que en la basal, lo que da cuenta que estas fracciones están enriquecidas en membrana apical.

La segunda técnica aplicada para determinar la presencia de PLAP en las membranas purificadas, fue el *Western Blot*. Tal como se describe en materiales y métodos, se cargaron en los geles 20 µg totales de proteína de MVM, LMVM y BM en un total de 9 experimentos (de 7 placentas independientes). Se cuantificaron las bandas obtenidas y los valores obtenidos en orden decreciente fueron los siguientes; MVM 45,9% ± 2,6, LMVM 36,6% ± 2,1 y BM 17,4% ± 2,1 (Figura 9). Nuevamente estos resultados dan mayor presencia de PLAP en las fracciones que identificamos como fracciones apicales.

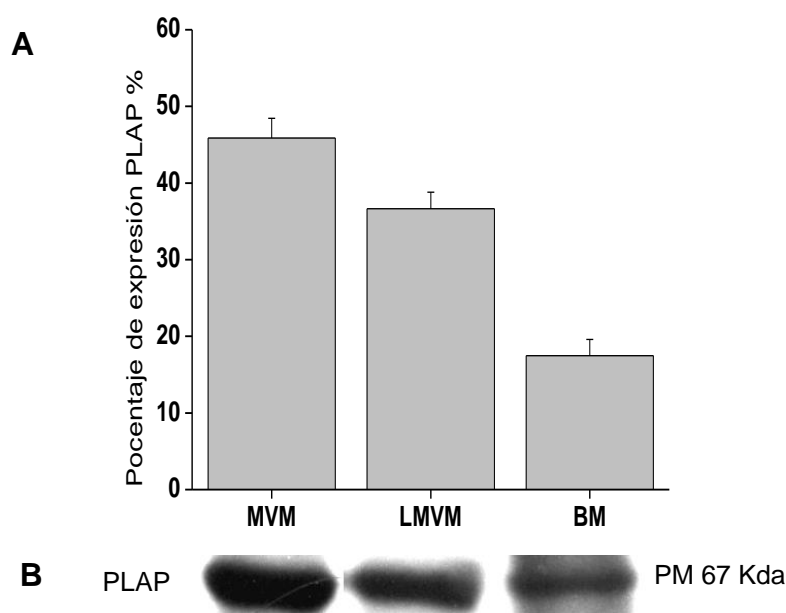


Figura 9. Presencia de PLAP, mediante *Western Blot*, en membranas enteras de placentas normales. A) Gráfico que representa la densidad relativa expresada en porcentaje de PLAP en las tres membranas aisladas (n=9). **B)** *Western Blot* representativos para cada membrana proveniente de la misma placenta, indicando el peso molecular de PLAP que corresponde a 67Kda.

Los dos métodos empleados, para la expresión y actividad enzimática, corroboran que LMVM y MVM son fracciones apicales.

2. Obtención y caracterización con marcadores específicos de las fracciones *Rafts* y no-*Rafts* obtenidas a partir de MVM y LMVM.

Mediante la técnica de solubilización de las membranas apicales con detergente Tritón X-100 se obtuvo un total de 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* a partir de MVM y LMVM para cada placenta normal (n=9). Se determinó que las fracciones 1-5 son *Rafts* y las fracciones 6-11 son no-*Rafts*, tal como se estableció en el protocolo de Godoy y Riquelme (2008). Para cualificar las fracciones obtenidas con los estándares descrito, se realizaron experimentos controles con el fin de determinar que existió aislamiento de microdominios lipídicos. Para ello, se caracterizaron las 11 fracciones utilizando marcadores de tipo *rafts* como la PLAP (el marcador de membrana apical), Flotillina-1 y Gangliósido GM1 y no-*Rafts* como el Receptor de Transferrina Humano (hTf-R). A continuación, se mostrarán los experimentos controles de dicha caracterización.

2.1 Marcadores *Rafts*

2.1 a Presencia de Fosfatasa Alcalina

Del mismo modo como se realizaron los experimentos de *Western Blot* de PLAP en las fracciones de membrana del hSTB, se analizaron las 11 fracciones provenientes del aislamiento de microdominios (n = 12 experimentos de n = 9 placentas).

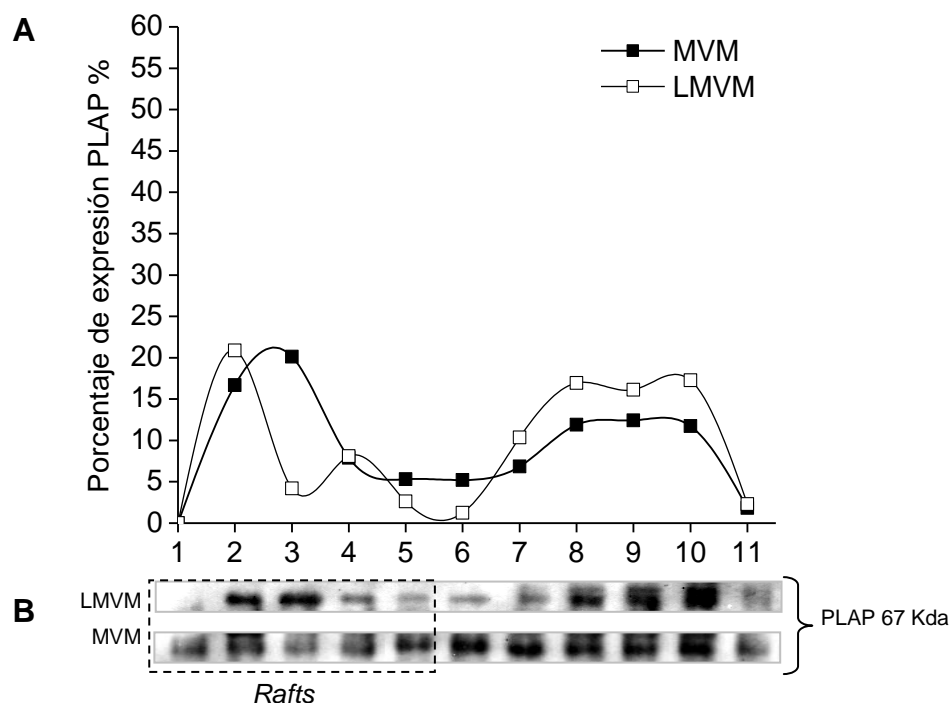


Figura 10 Presencia de PLAP entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* de LMVM y MVM en placentas normales. A) El gráfico indica la densidad relativa expresada como porcentaje de PLAP en las 11 fracciones de MVM y LMVM. B) *Western Blot* representativos de PLAP en las 11 fracciones, en donde la PLAP indica un peso molecular de 67 Kda.

Como se observa en la Fig. 10, la PLAP está presente en las fracciones de menor densidad (*Rafts*) en MVM y LMVM (fracciones 1-5).

2.1.b Presencia de Gangliósido GM1.

El esfingolípidos gangliósido GM1 es un marcador de *Rafts* y para su medición se utiliza la toxina colérica, que al unirse éste gangliósido puede ser detectado mediante la técnica de Dot Blot descrita en la metodología. En la figura 11 se expone un resultado representativo de la presencia de GM1 en las 11 fracciones de MVM y LMVM.

Nótese que su presencia es más marcada en las fracciones *Rafts*, lo cual concuerda con el patrón descrito anteriormente por Godoy y Riquelme (2008).

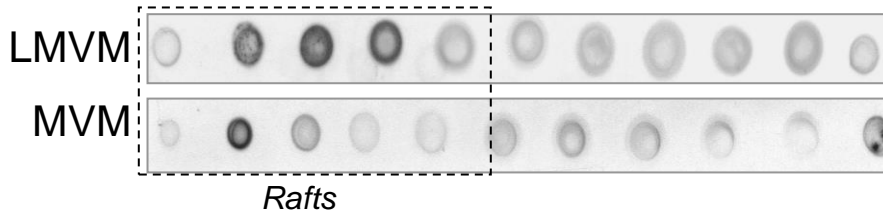


Figura 11. Presencia de GM1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM. La figura muestra una imagen representativa de la técnica de *Dot Blot* para identificar la presencia del lípido GM1 en las 11 fracciones de MVM y LMVM.

2.1 c Presencia de Flotillina-1

La Flotillina-1 es un marcador de sitios *Rafts* en células epiteliales, sin embargo, es una proteína nueva que no se había utilizado anteriormente en la cualificación de los *Rafts* provenientes de placenta. Por tal motivo, fue probada inicialmente en las membranas enteras (BM, MVM y LMVM) mediante experimentos de *Western Blot*.

En la Fig. 12, se muestran los resultados de la expresión de Flotillina-1 en las tres fracciones del hSTB (n = 4 experimentos) Como se observa en el gráfico, ésta proteína se encuentra más expresada en membranas apicales. El comportamiento decreciente de Flotillina-1 para cada membrana es el siguiente; MVM 46,7% ± 3,8, LMVM 30,4% ± 3,4 y BM 23,3% ± 1,4.

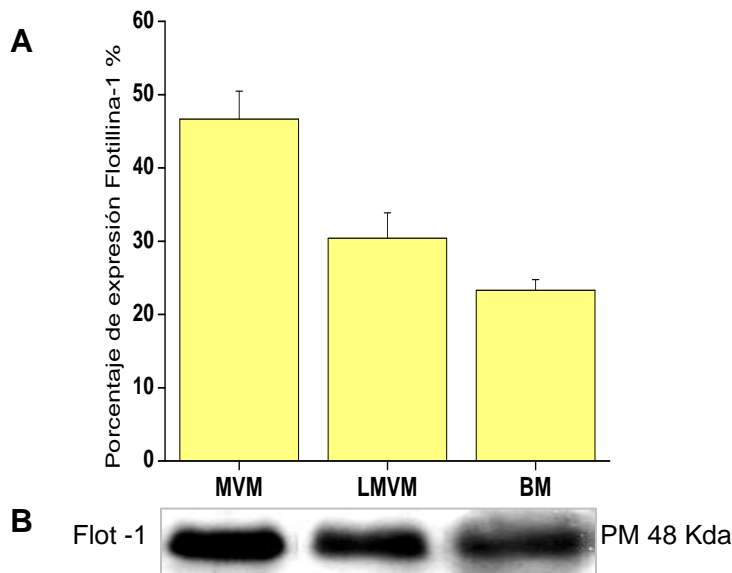


Figura 12 Presencia de Flotillina-1 en membranas enteras mediante Western Blot a partir de placentas normales. A) Gráfico de densidad relativa expresada en porcentajes para Flotillina-1 en MVM, LMVM y BM. B) *Western Blot* representativos para cada membrana, indicando el peso molecular de 48 Kda que marca la Flotillina-1 en el Western Blot y que coincide con el PM según datos del fabricante.

Luego de haber identificado la presencia de Flotillina-1 en las membranas enteras, el paso siguiente fue identificar su segregación entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM.

Ha sido muy dificultosa la implementación de la técnica de *Western Blot* para la detección de Flotillina-1 en las 11 fracciones aisladas. Los resultados obtenidos no permiten apreciar una expresión definida de éste marcador.

2.2 Marcador no-*Rafts*

2.2. a Presencia del receptor de Transferrina humano (hTf-R)

Se sabe que el Receptor de Transferrina Humano (hTf-R) se ubica en sitios no-*rafts* de la membrana apical, motivo por el cual se usó como marcador de éstas zonas en el hSTB. Como se observa en la Fig. 13, la hTf-R probada en las 11 fracciones *rafts* y no-*rafts* (n=4) se ubica solamente en las fracciones de mayor densidad (no-*rafts*) para el caso de LMVM y MVM.

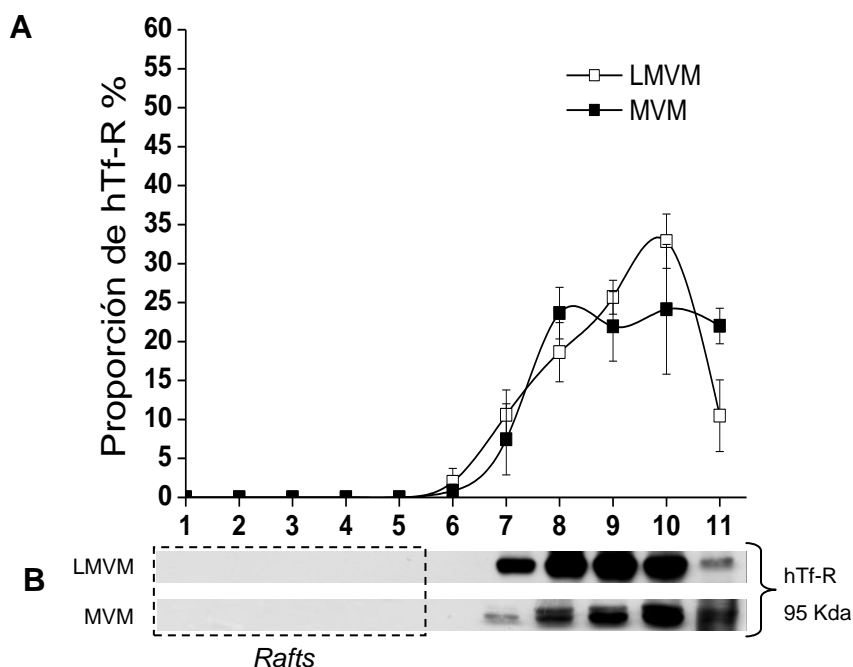


Figura 13 Presencia de hTf-R entre dominios *rafts* y no-*rafts*, mediante Western Blot, de MVM y LMVM proveniente de placentas normales. **A)** Gráfico de densidades relativas expresadas en porcentajes para hTf-R en las 11 fracciones de MVM y LMVM. **B)** Western Blot representativos para hTf-R en las 11 fracciones, indicando el peso molecular de hTf-R que es de 95 Kda.

3. Identificación de la presencia de los canales de potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TASK-1 y TREK-1) en membranas enteras de hSTB y su distribución en dominios *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM.

Luego de aprobar la caracterización de las 11 fracciones *rafts* y no-*rafts* con marcadores específicos, tales fracciones fueron sometidas a un estudio particular de expresión para los cuatro canales de potasio reportados con anterioridad en tejido placentario; K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1. Previo a ello, se analizó la distribución de cada uno de estos canales en las membranas enteras purificadas.

Se realizaron *Western Blot* en MVM, LMVM y BM probando cada uno de los cuatro canales de potasio con un $n > 3$. Los gráficos de las figuras 7, 8, 9 y 10 exponen los resultados obtenidos, finalizando con un gráfico resumen en la Fig. 11.

3.1 Presencia de los cuatro canales de potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1) en membranas enteras.

3.1a Presencia de K_V 2.1

La Fig. 14 muestra los resultados de expresión del canal de potasio K_V 2.1 en fracciones de membranas del hSTB. Nótese una mayor expresión de éste canal en MVM con respecto de las otras membranas. Los valores con sus respectivos errores estándar para cada membrana en orden decreciente, fueron los siguientes; MVM $60,2\% \pm 2$, LMVM $28,4\% \pm 1,4$ y BM $12,2\% \pm 1,5$.

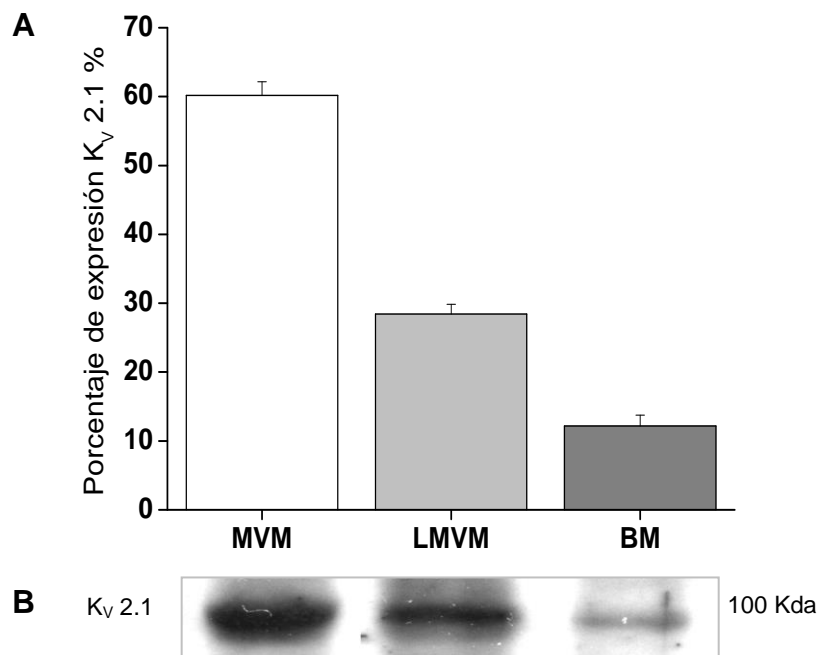


Figura 14. Presencia de Kv 2.1 en membranas enteras provenientes de placentas normales. A) Gráfico de barras con densidades relativas expresadas en porcentajes para el Canal de Potasio dependiente de Voltaje Kv 2.1 en MVM, LMVM y BM. B) *Western Blot* representativos para cada membrana, indicando un peso molecular de 100 Kda para Kv

2.1. Los valores están expresados como $X \pm SEM$ (n = 7).

3.1.b Presencia de K_{IR} 2.1

En la Fig. 15 se exponen los resultados de *Western Blot* realizado en membranas enteras para el canal de potasio K_{IR} 2.1, donde se aprecia una expresión mayor en ambas membranas apicales. Los valores promedios con sus respectivos errores estándar decrecientes para cada membranas fueron los siguientes; MVM 42 % \pm 1,9, LMVM 39,9% \pm 1,8 y BM 18,4% \pm 0,9.

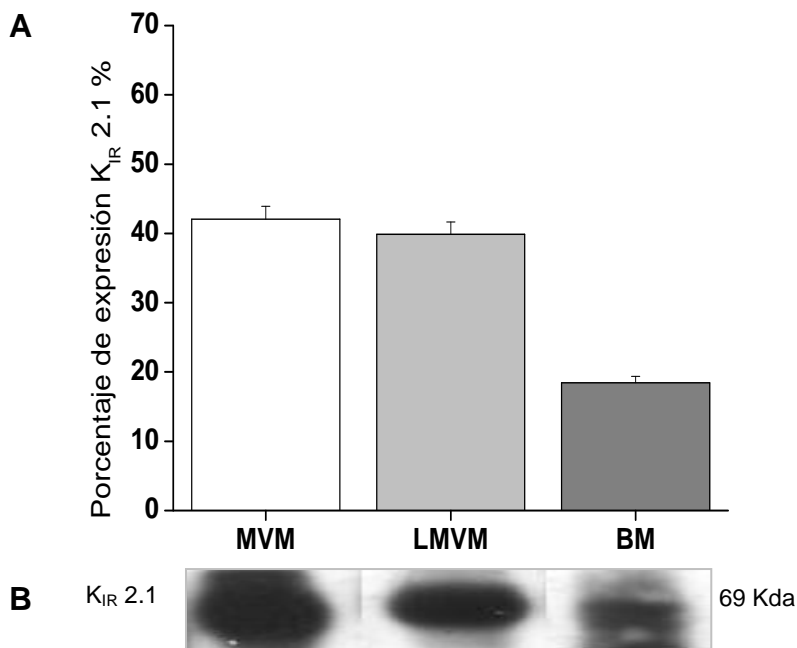
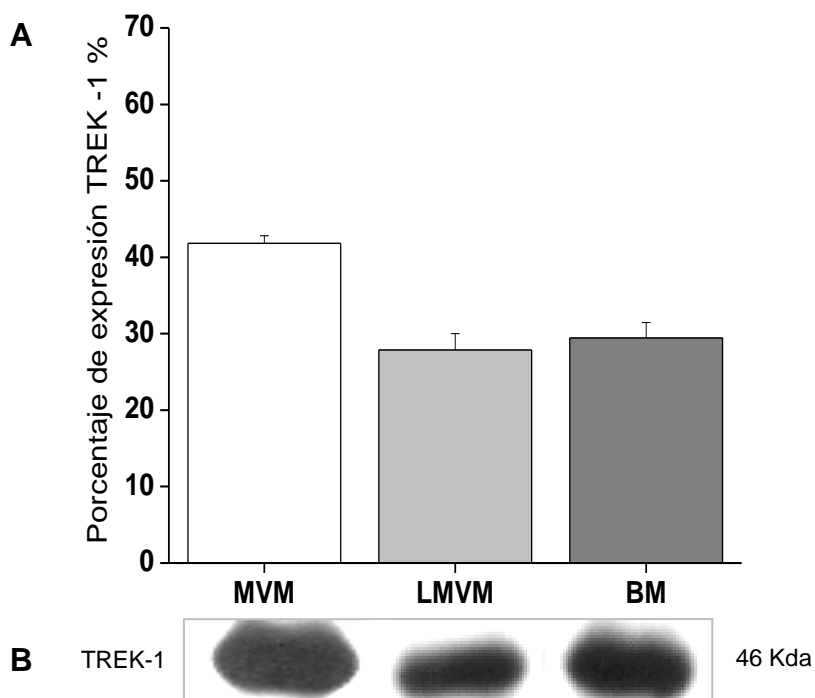


Figura 15. Presencia de K_{IR} 2.1 en membranas enteras provenientes de placentas normales. A) Gráfico de barra con densidades relativas expresadas en porcentajes para el canal de potasio rectificador de entrada K_{IR} 2.1 en MVM, LMVM y BM. B) *Western Blot* representativos para cada membrana, indicando un peso molecular de 69 Kda para el canal de potasio K_{IR} 2.1. Los valores están expresados como $X \pm SEM$ (n = 11).

3.1.c Presencia de TREK-1

En la Fig. 16 se indican los resultados de *Western Blot* para el canal de potasio de Doble Poro TREK-1 en membranas enteras purificadas. Los valores para cada membrana en orden decreciente son los siguientes; MVM $41,8\% \pm 1$, BM $29,5\% \pm 2$ y LMVM $27,9\% \pm 2,1$, donde nuevamente se observa una mayor expresión en MVM.



3.1d Presencia de TASK-1

En la Fig. 17 se exponen los resultados en *Western Blot* para el canal de potasio de Doble Poro TASK-1 en membranas enteras purificadas. Se observa que la expresión del Canal es más abundante en MVM y los valores promedios con sus respectivos errores Standard en orden decreciente para cada membrana son los siguientes; MVM $43,7\% \pm 4,3$, LMVM $31,2\% \pm 3,2$ y BM $25,1\% \pm 2,7$.

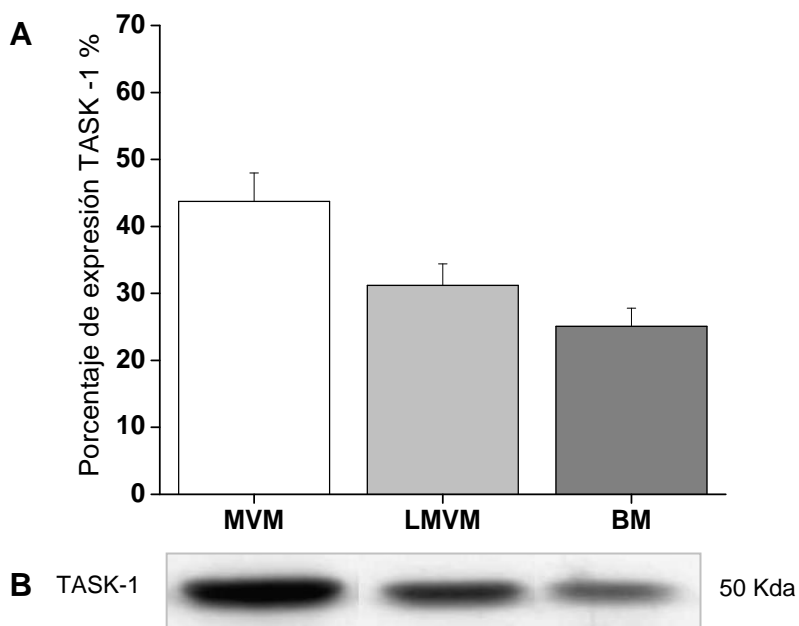


Figura 17. Presencia de TASK-1 en membranas enteras proveniente de placentas normales. **A)** Gráfico de barras con densidades relativas expresadas en porcentajes del canal de potasio de Doble Poro TASK-1 para MVM, LMVM y BM. **B)** *Western Blot* representativos para cada membrana, indicando el peso molecular de 50 Kda para el canal de potasio TASK-1. Los valores están expresados como $X \pm SEM$ (n=11).

3.1e Resumen comparativo de la distribución de los 4 tipos de Canales de Potasio (K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1) en Membranas Enteras.

La Fig. 18 expone un resumen de los gráficos detallados anteriormente. Tal como se observa, los cuatro canales de potasio (K_{IR} 2.1, K_V 2.1, TASK-1 y TREK-1) se expresan más en membrana apical (MVM y LMVM) que en membrana Basal con los siguientes porcentajes; K_V 2.1 88% en apical y 12% en basal, K_{IR} 2.1 82% en apical y 18% en basal, TASK-1 75% en apical y 25% en basal y TREK-1 70% en apical y 30% en basal.

En particular, el canal que se expresa más en MVM es el K_V 2.1 (60%), mientras que K_{IR} 2.1 se expresa en MVM y LMVM en porcentajes cercanos (42% y 40% respectivamente), TREK-1 en porcentajes similares entre LMVM y BM y TASK-1 (28% y 29% resp.) presenta diferencias de expresión muy bajas entre las tres fracciones de membrana.

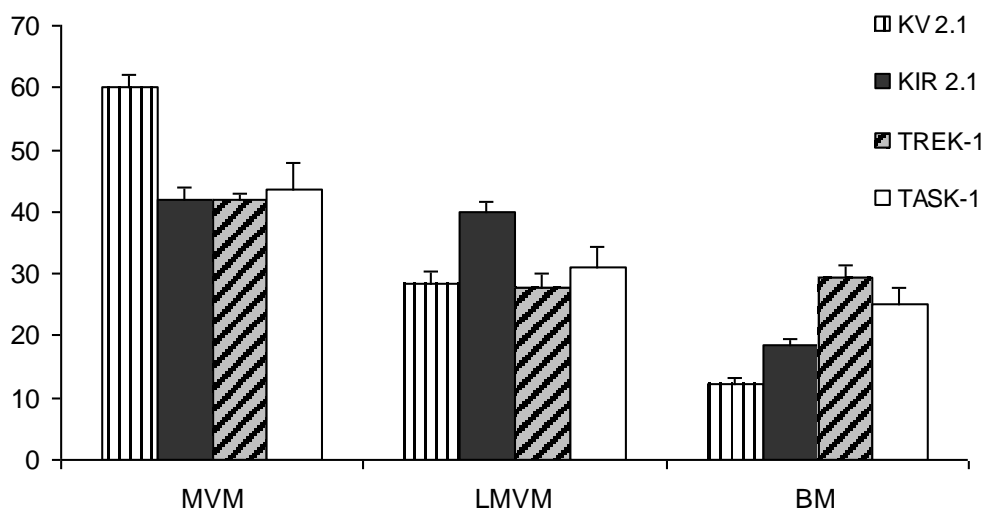


Figura 18. Gráficos resúmenes de presencia de los canales de potasio para cada una de las membranas purificadas. Patrón de distribución relativa, según los datos detallados en los gráficos anteriores, de los canales de potasio K_{IR} 2.1, K_V 2.1, TREK-1 y TASK-1 en cada una de las membranas purificadas del hSTB.

Una vez identificada la expresión de éstos cuatro canales de potasio en las membranas apicales, se probaron los mismos anticuerpos mediante *Western Blot* en las 11 fracciones *rafts* y *no-rafts* aisladas a partir de MVM y LMVM.

3.2 Distribución de los Canales de Potasio (K_{IR} 2.1, K_V 2.1, TREK-1 y TASK-1) en dominios *Rafts* y *no-Rafts*.

En las figuras 19, 20, 21 y 22 se muestran los gráficos correspondientes a las densitometrías de las 11 fracciones de MVM y LMVM obtenidas de los *Western Blot* de cada uno de los Canales de Potasio, y debajo de cada gráfico aparecen sus *Western Blot* representativos. Finalmente, en la figura 23 se indica el porcentaje de ubicación en *Rafts* de los Canales que sí se segregaron en éstos dominios.

3.2.a Presencia de $K_V 2.1$ en dominios *Rafts* y no-*Rafts*

A continuación, se indican los resultados de los *Western Blot* para las 11 fracciones ya sea para MVM como para LMVM (n =9). En la Fig. 19 podemos observar que el $K_V 2.1$ se segrega únicamente en dominios no-*Rafts* (7-11) tanto en MVM y LMVM. En cuanto a la distribución, es diferente en ambas membranas. En MVM hay un *Peak* (fracción 9) y el LMVM son dos *Peak* (f 8 y pellet f 11).

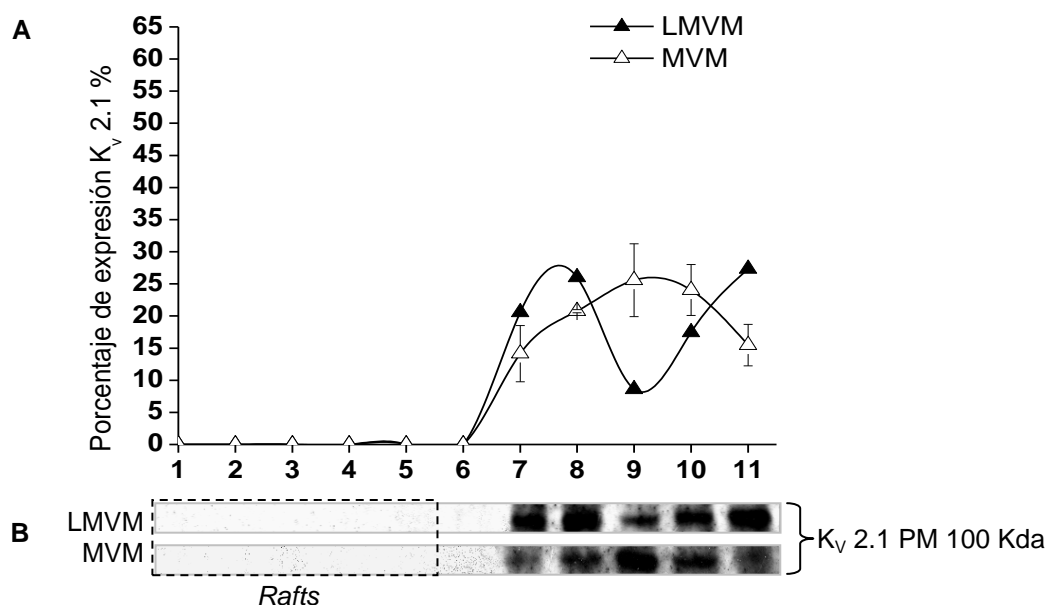


Figura 19. Presencia de $K_V 2.1$ entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* en LMVM y MVM del hSTB obtenidas a partir de placentas normales. A) Gráfico de densidades relativas expresadas en porcentajes que indica la segregación del Canal de Potasio $K_V 2.1$ en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* de MVM (n= experimentos de n= placentas) y LMVM (n= experimentos de n= placentas). **B)** *Western Blot* representativos de $K_V 2.1$ en las 11 fracciones a partir de MVM y LMVM, indicando el mismo peso molecular que marca en las membranas enteras (100 Kda). Los valores están expresados como $X \pm SEM$, excepto para el caso de LMVM que presenta sólo un *n*.

3.2b Presencia de K_{IR} 2.1 en dominios *Rafts* y no-*Rafts*

La Fig. 20 muestra los resultados de los experimentos de *Western Blot* realizados en fracciones *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM (n=6). Como se puede apreciar, éste canal se segrega entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* para ambos subdominios de membrana apical.

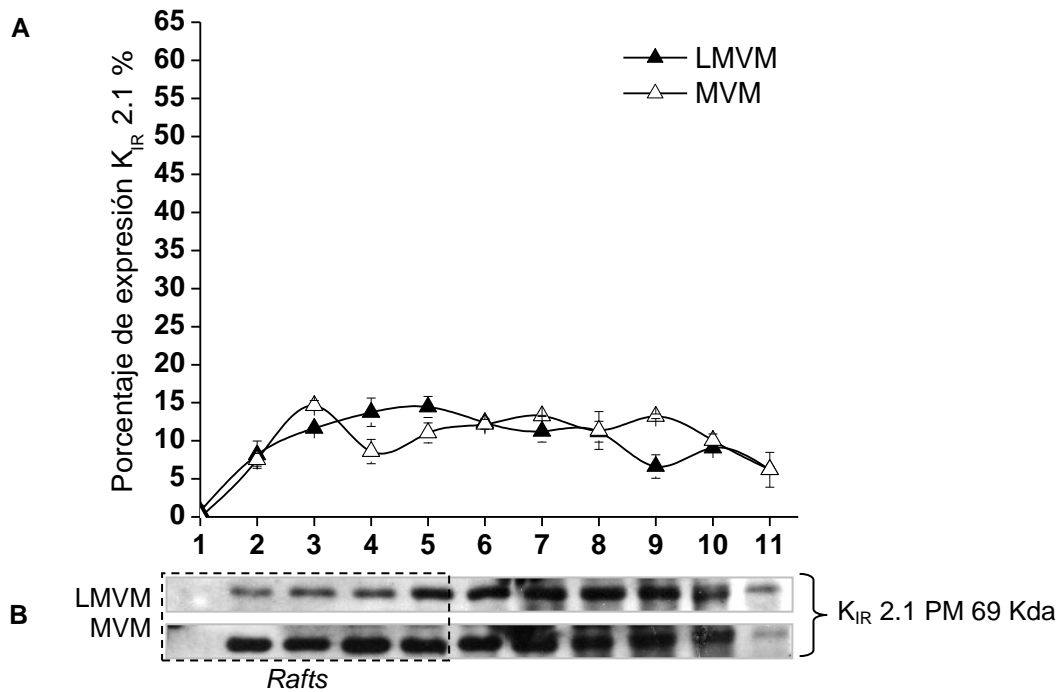


Figura 20. Presencia de K_{IR} 2.1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* en fracciones LMVM y MVM del hSTB de placentas normales. A) Gráfico de densidades relativas expresadas en porcentajes para en Canal de Potasio K_{IR} 2.1 en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM de placentas normales. B) Western Blot representativos para K_{IR} 2.1 en las 11 fracciones desde LMVM y MVM, indicando el mismo peso molecular que marca en las membranas enteras (69 Kda). Los valores están expresados como $X \pm SEM$.

3.2c Presencia de TREK-1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts*

En la Fig. 21 se muestran los *Western Blot* realizados en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* a partir de MVM y LMVM (n=7) de placentas normales. Se observa que existe una marcada segregación de TREK-1 entre dominios no-*Rafts*. Sin embargo, para el caso de LMVM existe una tendencia del canal hacia la expresión en fracciones *Rafts* (fracción 4 y 5).

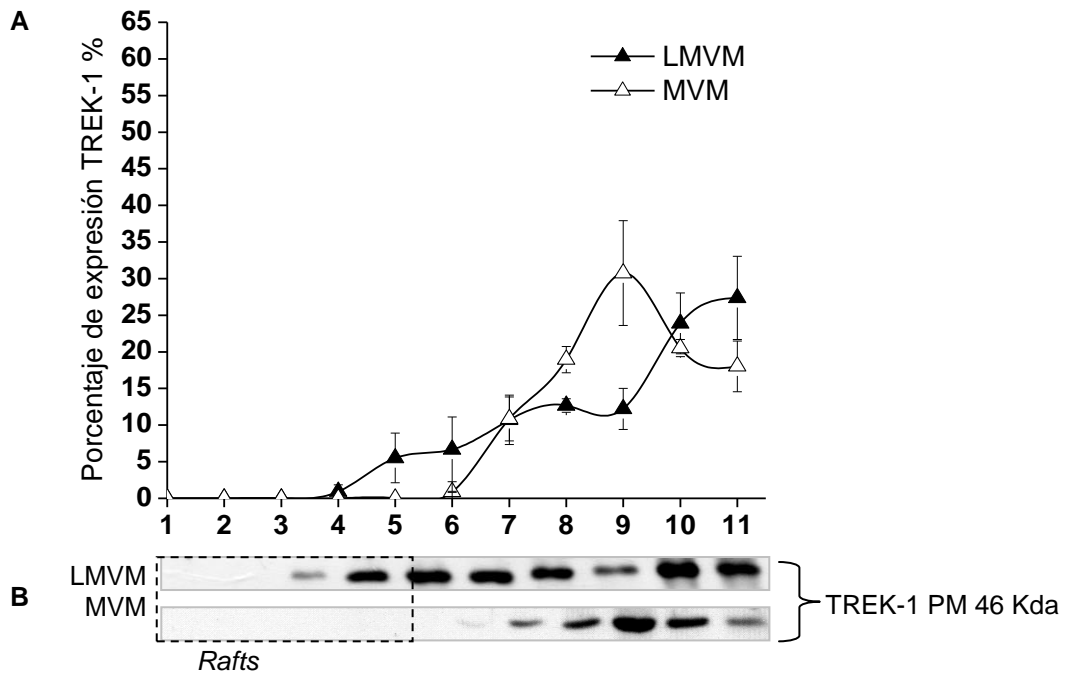


Figura 21. Presencia de TREK-1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* en fracciones LMVM y MVM de placentas normales. A) Gráfico de densidades relativas expresadas en porcentajes para el Canal de Potasio TREK-1 en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* en MVM y LMVM de placentas normales. B) *Western Blot* representativos para TREK-1 en las 11 fracciones de LMVM y MVM, indicando un el mismo peso molecular que marcó en membranas enteras (46 Kda). Los valores están expresados como $X \pm SEM$.

3.2d Presencia de TASK-1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts*

En la Fig. 22 se realizan experimentos de *Western Blot* en fracciones *Rafts* y no-*Rafts* a partir de MVM y LMVM (n= 6) de placentas normales. Se puede observar que el Canal se distribuye principalmente en dominios no-*Rafts*, sin embargo, se manifiesta una expresión poco definida en sitios *Rafts*.

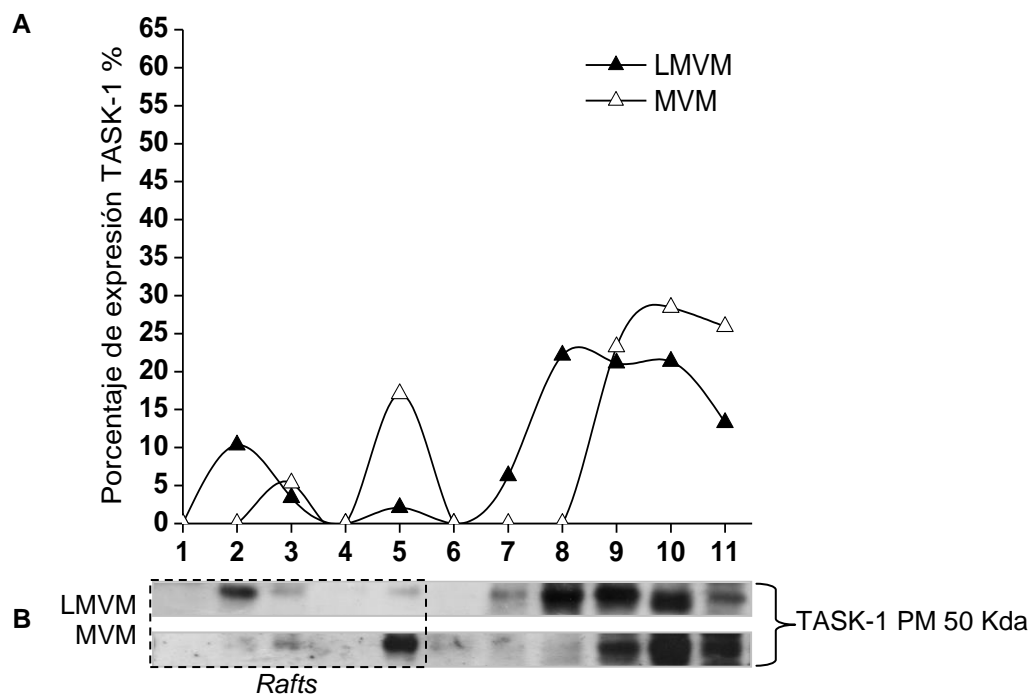


Figura 22. Presencia de TASK-1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* en fracciones LMVM y MVM de placentas normales. **A)** Gráfico de densidades relativas expresadas en porcentajes de TASK-1 en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* de MVM y LMVM de placentas normales. **B)** *Western Blot* representativos para TASK-1 en las 11 fracciones de LMVM y MVM, que marca el mismo peso molecular de las membranas enteras (50 Kda). Los valores están expresados como $X \pm SEM$.

3.2.e Porcentaje de segregación en dominios *Rafts* para el Canal de Potasio K_{IR} 2.1.

Tal como indican los resultados anteriores, dentro de los cuatro canales de potasio estudiados, aquel que se distribuyen claramente dentro de sitios *Rafts* es el K_{IR} 2.1.

A continuación, se grafica el porcentaje de presencia en sitios *Rafts* en LMVM y MVM, para ello, se suma la expresión en las primeras cinco fracciones (*Rafts*) y se calcula a cuanto corresponde del total de las 11 fracciones. LMVM representa un porcentaje de $48,8\% \pm 5,3$ y MVM es $41,8\% \pm 4$.

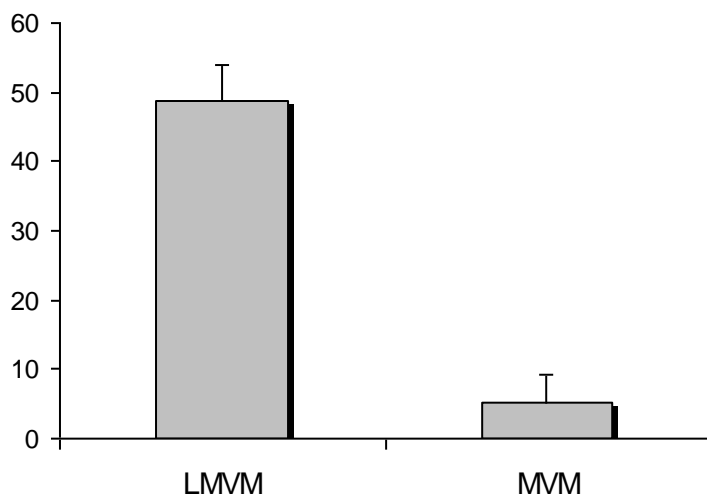


Figura 23. Porcentajes de expresión en *Rafts* de K_{IR} 2.1 de MVM y LMVM en placentas normales. Gráfico que compara la expresión de K_{IR} 2.1 en *Rafts* (n=3) entre MVM y LMVM. Los datos fueron expresados como $X \pm SEM$.

4. Confirmación de la presencia de los Canales de Potasio que se ubican en dominios *Rafts*, mediante la extracción de colesterol de membrana con Metil β Ciclodextrina previo a la solubilización con Tritón X-100, e identificación con experimentos de Western Blot.

Como se observó en los resultados anteriores, el único Canal de Potasio presentes en *Rafts* es el K_{IR} 2.1. Se probó la expresión de éste canal en las 11 fracciones, ya sea con tratamiento de depleción de colesterol con metil- β -ciclodextrina como sin él.

4.1 Comparación de presencia de K_{IR} 2.1 en dominios *Rafts* y no-*Rafts* en fracciones de membranas (LMVM y MVM) control y tratadas con metil β -Ciclodextrina

En la Fig. 24 se compara la distribución de K_{IR} 2.1 en fracciones *Rafts* y no-*Rafts* obtenidas de MVM y LMVM, ya sea con tratamiento previo de metil β -Ciclodextrina, como sin él. Los resultados (n=3) indican la ubicación de K_{IR} 2.1 en *Rafts* en situación control y la ausencia de esa expresión luego de tratamiento con metil- β -ciclodextrina, en ambas fracciones apicales.

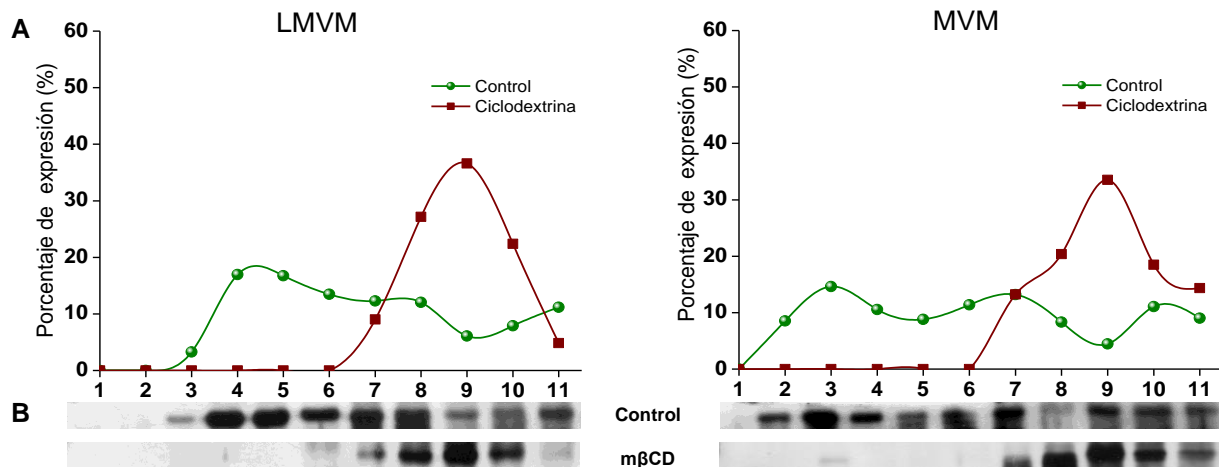


Figura 24. Presencia de K_{IR} 2.1 entre dominios *Rafts* y no-*Rafts* control y tratamiento previo con metil β ciclodextrina de MVM y LMVM. A) Se aprecia en ambos gráficos las densidades relativas expresadas en porcentajes de K_{IR} 2.1 para ambos subdominios de membrana apical en las 11 fracciones *Rafts* y no-*Rafts* obtenidas, según el protocolo de solubilización con detergente Tritón X-100 (control) y las fracciones obtenidas según el mismo protocolo pero sometiendo a MVM y LMVM a un tratamiento previo con metil- β -ciclodextrina. **B)** *Western Blot* graficados arriba, que indican la distribución del Canal de Potasio K_{IR} 2.1 para MVM y LMVM en situación control y con tratamiento previo con metil β ciclodextrina.

DISCUSIÓN

El objetivo primordial de éste trabajo fue describir la segregación de los Canales de Potasio previamente identificado en placenta; $K_V 2.1$, $K_{IR} 2.1$, TREK-1 y TASK-1 entre dominios *rafts* y *no-rafts* en ambos subdominios de membrana apical (MVM y LMVM) del Sinciciotrofoblasto Placentario Humano (hSTB).

En primer lugar, se obtuvieron las membranas del Sinciciotrofoblasto altamente purificadas mediante el protocolo de aislamiento simultáneo descrito por Jiménez y cols. 2004. Las membranas obtenidas fueron; la membrana basal (BM) y la membrana apical, quien se encuentra distribuída entre sus dos subdominios según lo reportado por el mismo autor: la membrana microvellosa propiamente tal (MVM) y la membrana microvellosa liviana (LMVM).

De un total de 11 placentas, las tres fracciones BM, MVM y LMVM fueron sometidas al estudio de Actividad de Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP), un marcador de membrana apical epitelial. Se detectó una mayor presencia de ésta enzima en las fracciones apicales (MVM y LMVM) en comparación con la Membrana Basal. Una segunda metodología, que permitió reafirmar el mayor enriquecimiento de PLAP en ambos subdominios apicales, fue la técnica de *Western Blot*. Ambas técnicas, aportaron evidencia fundamental para confirmar que el protocolo fue implementado de manera eficiente, considerando además que la concentración de proteína para cada membrana fue la esperada, según lo reportado en el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas en el estudio de placentas trabajadas con anterioridad.

Como se ha mencionado anteriormente, los *lipid rafts* son estructuras de las membranas biológicas descritas como Balsas o plataformas que poseen una composición y organización que difiere con el resto de la membrana, generando así un micro-ambiente con estado físico propio y con funciones específicas dependiendo de las proteínas que posee. Su estudio ha generado creciente interés y permanente cuestionamiento para muchos investigadores que se han encontrado con el obstáculo de la carencia de metodologías de identificación in-vivo para el estudio del funcionamiento dinámico de los microdominios. Sin embargo, dada su capacidad de resistencia a extracción con detergentes no-iónicos y a su habilidad de flotación en una centrifugación de gradiente de densidad se han considerado

éstas cualidades para el aislamiento de los *rafts*. Lo cual ha permitido que actualmente exista un sinnúmero de reportes de microdominios en distintos tejidos.

Por su parte, el tejido placentario no ha estado exento del estudio de microdominios, tanto así que Godoy y Riquelme en el 2008 fueron pioneras en el aislamiento de *Lipid Rafts* en ambos subdominios de membrana Apical del hSTB. Este protocolo no se implementó en Membrana Basal del hSTB debido a que no existen reportes de la presencia de microdominios en ésta membrana, a diferencia de la Membrana Apical que se ha estudiado en profundidad en diversos tipos de tejidos epiteliales (Kunding y cols., 2010).

Uno de los objetivos de ésta investigación memoria de título fue el de reproducir el protocolo planteado por Godoy y Riquelme (2008), de manera de continuar con el estudio de *Lipid Rafts* en el hSTB.

Por regla, para confirmar que la metodología fue correctamente implementada se utilizó la técnica de *Western Blot*, donde las 11 fracciones obtenidas fueron testeadas para marcadores *Rafts* como la PLAP (anteriormente utilizada como marcador de membrana apical) y el esfingolípidio GM1 (mediante *Dot Blot*, variante de *Western Blot*) y no-*Rafts* como el Receptor de Transferrina Humano (hTf-R). La expresión de PLAP y de GM1 mostró un *Peak* entre las fracciones 1-5 (*rafts*), mientras que hTf-R se expresó únicamente en sitios no-*rafts*. Estos resultados garantizan que se efectuó un correcto aislamiento de Microdominios a partir de ambos subdominios de membrana Apical. Siendo además coincidentes con lo reportado por Godoy y Riquelme (2008).

En síntesis, los resultados descritos que concluyen con la obtención y caracterización de las 11 fracciones *rafts* y no-*rafts* según el protocolo reportado, dan cuenta nuevamente de la existencia de microdominios lipídicos en ambos subdominios de membrana apical del hSTB. Además constatan que los microdominios obtenidos son distintos entre MVM y LMVM, dada la expresión diferencial de los marcadores *rafts*, confirmando así la idea propuesta por Godoy y Riquelme (2008) que ambos subdominios presentan desiguales características. Por lo tanto, los *Rafts* obtenidos se consideran adecuados para cumplir con el objetivo principal de ésta memoria de título.

Adicionalmente, se estudió por primera vez la expresión de Flotillina-1 en el hSTB, una proteína que se ha utilizado ampliamente como marcador de *lipid rafts* en otros tejidos

(Bickel y cols., 1997, López y Kolter, 2010). Mediante *Western Blot*, se observó la expresión de ésta proteína en las membranas enteras, sin embargo en las 11 fracciones *rafts* y *no-rafts* los resultados no son concluyentes.

En el laboratorio de Electrofisiología de Membranas, desde mucho antes del aislamiento de microdominios lipídicos en el hSTB, se han caracterizado una serie de proteínas transportadoras, principalmente canales iónicos, encargados del traspaso de solutos cargados entre la madre y el feto. Por otra parte, existe numerosa evidencia que la asociación entre canales iónicos y microdominios tiene implicancias en las características funcionales del canal, más específicamente, parece ser que ciertos canales son modulados por su entorno lipídico.

Los canales iónicos que fueron seleccionados para el estudio de su relación con microdominios, fueron los canales de potasio, debido a dos razones fundamentales. En primer lugar, existe una amplia evidencia que dichos canales se han identificado en tejido placentario, pese a que su caracterización estructural y funcional aún está en curso. Estos canales son; el canal de potasio dependiente de voltaje K_V 2.1, el canal de potasio rectificador de entrada K_{IR} 2.1 y los canales de potasio de Doble Poro TREK-1 y TASK-1 (Bai y cols., 2005; Birdsey y cols., 1999; Clarson y cols., 2001; Wareing y cols., 2006). Además, existe evidencia funcional de corrientes de potasio en membrana apical del hSTB (Díaz y cols., 2008). En segundo lugar, se han realizado una serie de estudios de la asociación de distintos tipos de canales de potasio a *lipid rafts* en tejidos no placentarios, conllevando implicancias en las funciones de la membrana (Martens y cols., 2000; Martens y cols., 2001; Romanenko y cols., 2002; Ganapathi y cols., 2010). Es por estas razones, que el objetivo central de éste estudio es observar la segregación de los canales de potasio mencionados en las fracciones *rafts* y *no-rafts*, previamente aisladas, de los subdominios de membrana apical de hSTB.

Un aporte adicional realizado por esta tesis, fue mostrar la distribución de los cuatro canales de potasio descritos en placenta, en las distintas fracciones de membrana del hSTB, lo cual no se había caracterizado previamente. Dentro de los resultados obtenidos, se observa que los cuatro canales se expresan en las tres fracciones de membrana del hSTB, siendo más abundantes en membrana apical (LMVM sumado a la MVM) que en membrana

basal. En particular, K_V 2.1 se encuentra notoriamente más expresado en MVM que en el resto de las membranas enteras, el K_{IR} 2.1 está mas expresado en MVM pero sin diferencias significativas con la LMVM, y finalmente, TASK-1 y TREK-1 muestran diferencias estrechas entre las tres membranas. Para explicar mejor los resultados, en la figura 25 se ilustra la proporción que hay entre estos cuatro canales en las diferentes fracciones.

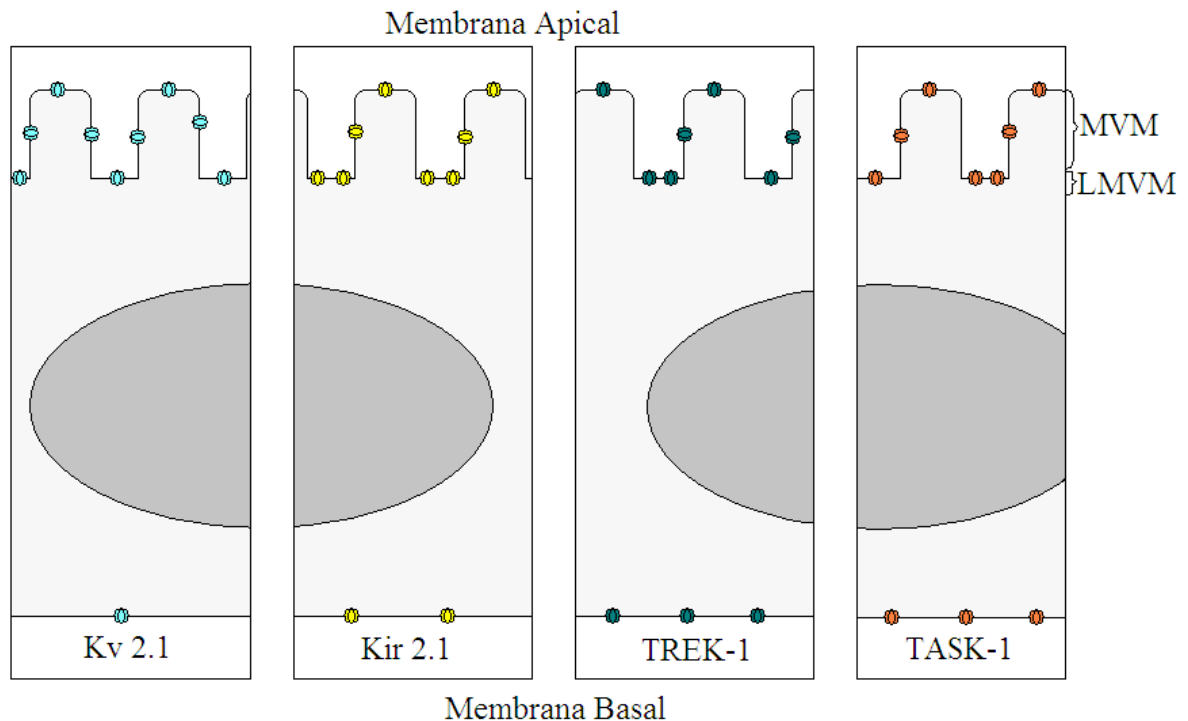


Figura 25 Dibujo de la relación porcentual para cada canal de potasio entre MVM, LMVM y BM. El número de círculos muestra la proporción de la presencia de los canales en las distintas fracciones de membrana del hSTB. La relación de K_V 2.1 entre MVM, LMVM y BM respectivamente es de 6:3:1, es decir, por cada 6 canales en MVM, hay 3 en LMVM y 1 en BM. En el caso de K_{IR} 2.1 es de 4:4:2 y para TREK-1 y TASK-1 es de 4:3:3.

Por su parte, se aceptan las diferencias de expresión que existen entre MVM y LMVM para cada canal, dado que se ha mencionado que son fracciones de membrana apical muy diferentes entre sí, lo cual puede tener implicancias estratégicas en la organización de la membrana microvellosa.

Estos resultados confirman la presencia de los cuatro canales de potasio en las fracciones de membrana del hSTB y su expresión mayoritaria en las fracciones de membrana apical. Esto podría significar que se requieren más de éstos canales en éste

dominio de membrana que en la membrana basal, lo cual puede tener implicancias en la función de transporte del hSTB.

Además, esta distribución podría verse alterada en patologías, ya que se ha descrito la importancia de los canales de potasio en la vasculatura fetoplacental en pre-eclampsia y RCIU. Un ejemplo de ello, es que canales de potasio de la musculatura lisa vascular están involucrados en la respuesta de vasoconstricción hipóxica aguda fetoplacental en RCIU. (Hampl y Jakoubek 2009). También, los canales de potasio K_v 2.1 y 9.3 tienen sus genes menos expresados ante variaciones en la oxigenación (Corcoran y cols., 2008) en la misma patología. Con estos datos, se piensa que la expresión de los canales de potasio identificados en hSTB también podría estar alterada en condiciones patológicas. Por lo tanto, sería interesante estudiar la expresión de estos canales en placentas provenientes de gestaciones con Preeclampsia y RCIU y compararla con estos resultados.

Para proseguir con nuestro objetivo, se realizaron experimentos de *Western Blot* en las mismas 11 fracciones *rafts* y *no-rafts* de MVM y LMVM obtenidas al inicio de éste estudio. Los cuatro canales presentaron comportamientos muy distintos entre sí en cuanto patrón de distribución e intensidad de la banda obtenida en el *Western Blot*. Como se resume en la Tabla 2, uno de ellos tiene una expresión muy definida en sitios *no-Rafts* (K_v 2.1), mientras que otro se ubicó en zonas *rafts* (K_{IR} 2.1). En cuanto al TASK-1 y TREK-1, manifestaron resultados no concluyentes.

Canal de Potasio	<i>Rafts</i>	<i>no-Rafts</i>
K_{IR} 2.1	Si	Si
K_v 2.1	No	Si
TASK-1	Dudoso	Si
TREK-1	Si (sólo en LMVM)	Si

Tabla 2. Tabla Resumen de expresión de los cuatro Canales de Potasio en fracciones *Rafts* y *no-Rafts*. La tabla indica la existencia o no de expresión de cada canal ya sea en fracciones *rafts* como en *no-Rafts*. Se define como dudoso a los resultados de expresión que no son concluyentes.

A continuación me referiré a los canales de potasio que presentaron una expresión definida, mientras que aquellos que mostraron resultados no concluyentes requerirán estudios futuros para esclarecer su segregación.

El canal de potasio K_v 2.1 mostró una definida expresión en fracciones *no-rafts*,

hallazgo no coincidente con los resultados obtenidos en otros tejidos. En células excitables éste canal se segrega en sitios *rafts* y además su funcionamiento se encuentra altamente regulado por el colesterol ubicado en los microdominios (Martens y cols., 2000). Este último punto no indica que éste canal en el hSTB no pueda ser regulado por el colesterol de membrana, puesto que se han descrito algunos casos, donde existen canales que son regulados por colesterol sin necesariamente pertenecer a sitios *rafts* (Levitan y cols., 2010).

El canal de potasio K_{IR} 2.1 por su parte, se segrega claramente en sitios *Rafts*, siendo su segregación en sitios no-*Rafts* similar. Al comparar dichos resultados con otros autores, la segregación es muy similar. Tikku y cols. (2007), describieron que K_{IR} 2.1 y 2.3 se segregan en dominios *rafts* y no-*rafts*, sugiriendo con ello que los canales se distribuyen en diferentes ambientes lipídicos, idea que podría ser considerada en este estudio.

Para confirmar la presencia de K_{IR} 2.1 en *rafts* se recurrió a disgregar los Microdominios mediante un tratamiento con metil- β -ciclodextrina, oligosacárido altamente afín a esteroides, quien extrae la molécula de colesterol del *rafts* desarmando así su estructura. El tratamiento se realiza previo a la incubación con tritón-X-100, en ambos subdominios de membrana apical, continuando con el protocolo de obtención de *rafts* ya descrito. Luego, se verificó el efecto observando la expresión del canal K_{IR} 2.1 mediante *Western Blot* en las 11 fracciones. Los resultados indican claramente que, luego de aplicar el tratamiento en ambos subdominios de membrana apical, el canal sólo se distribuye en fracciones no-*rafts*. Este hallazgo demuestra que al remover el colesterol de membrana el canal pierde su ensamble a la estructura a la cual está inserto.

El tratamiento con ciclodextrina de la membrana es muy relevante, debido a que existen evidencias de que los canales de potasio en otros tejidos se comportan de diversas formas frente a condiciones carentes de colesterol. Estudios de electrofisiología señalan que la extracción de colesterol con ciclodextrina, genera cambios funcionales en el Canal K_V 2.1 (Martens y cols., 2000). Por otra parte, estudios realizados en líneas celulares K1 de Ovario de Hámster Chino señalan que la extracción de colesterol de membrana permite la activación del canal K_{IR} 2.1. (Tikku y cols., 2007). Frente a nuestros resultados y a la evidencia existente, se concluye que al modificar levemente el ambiente lipídico de una proteína inserta en *Rafts*, ésta puede reaccionar de diversas formas, ya sea desde un simple desplazamiento a un cambio funcional. Destacando así lo relevante que es para una proteína

la matriz lipídica en la cual está inserta.

En resumen, ésta tesis ha permitido confirmar la existencia de microdominios lipídicos y de los canales de potasio K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1 en la membrana apical del hSTB. Además, se descubre que existe asociación entre ambos hallazgos al observar presencia de K_{IR} 2.1 en microdominios lipídicos, siendo un importante indicio de que ésta asociación esta involucrada en la función de transporte de membrana apical del hSTB.

El aporte de ésta memoria de título, es que por primera vez se reporta un canal de potasio placentario que se segrega en *lipid rafts*. Con ello se plantearan a futuro diversas interrogantes acerca de su rol y funcionamiento en la membrana apical del hSTB y la relevancia de su presencia en microdominios, dado que en otros tejidos ha demostrado ser fuertemente influenciado por su ambiente lipídico de membrana. Se sugiere que para estudios posteriores, se analice el comportamiento funcional de este canal, mediante electrofisiología, ya sea en condiciones normales como frente a condiciones lipídicas diferentes, dado que el colesterol de membrana jugaría un rol fundamental en su funcionamiento.

Estos resultados permiten cumplir con nuestro objetivo principal que es el de identificar la segregación de los canales de potasio K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TREK-1 y TASK-1 presentes en el sinciotrofoblasto placentario humano entre dominios *Rafts* y *no-Rafts* de membrana apical, siendo fundamental plantearse el estudio del mecanismo de interacción entre los canales que otorgaron resultados concluyentes en ésta memoria de título y su respectivo microambiente lipídico.

Queda abierta la interrogante de que si en patologías asociadas al embarazo, como la Pre-eclampsia y la restricción de crecimiento intrauterino, este patrón de segregación se replica. Si no es el caso, podría deberse a alteraciones de los canales con su entorno lipídico y, por lo tanto, la siguiente interrogante sería si aquellas alteraciones afectan el proceso de transporte entre la madre y el feto.

CONCLUSIONES

- 1) Los cuatro canales de potasio K_V 2.1, K_{IR} 2.1, TASK-1 y TREK-1, previamente descritos en placenta, están presentes en las fracciones de membrana del hSTB (LMVM, MVM y BM).
- 2) Esta presencia tiene una distribución que no es igual para todos los canales; K_V 2.1 se expresa notoriamente más en MVM, K_{IR} 2.1 más en LMVM y MVM comparado con BM, mientras que TREK-1 y TASK-1 se expresan de manera similar entre las tres fracciones.
- 3) El canal de potasio K_{IR} 2.1 se segrega en sitios *Rafts*, siendo sensible a la remoción de colesterol con metil- β -ciclodextrina.
- 4) El canal de potasio K_V 2.1 se segrega en sitios no-*Rafts*.

BIBLIOGRAFÍA

BABIYCHUK, E. y DRAEGER, A. 2006 Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem J.* 397(3):407-16.

BAI, X.; GREENWOOD, S.; GLAZIER, J.; BAKER, P.; SIBLEY, C.; TAGGART, M.; FYFE, G. 2005. Localization of TASK and TREK, Two-Pore Domain K⁺ Channels, in Human Cytotrophoblast Cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12(2): 77-83.

BICHET, D; HAASS, FA; JAN LY. 2003 Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):957-67

BICKEL, P; SCHERER P; SCHNITZER, J; OH, P; LISANTI, M; LODISH H. 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272(21):13793-802.

BIRDSEY, T.; BOYD, R.; SIBLEY, C.; GREENWOOD, S. 1999. Effect of hiposmotic challenge on microvillous membrane potential in isolated human placental villi. *Am. J. Physiol.* 276: R1479-R1488.

BONALES, E. 2004. Monografía de Estructura y función de los Microdominios de Membrana.http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Edgar_Octavio_Bonales_Alatorre.pdf

BROWN, D y ROSE, J. 1992 Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68(3):533-44.

CHRISTIAN, A; HAYNES, M; PHILLIPS, M; ROTHBLAT, G. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res.* 38(11):2264-72

CLARSON, L.; GREENWOOD, S.; MYLONA, P.; SIBLEY, C. 2001. Inwardly Rectifying K⁺ Current and Differentiation of Human Placental Cytotrophoblast Cells in Culture. *Placenta.* 22(4): 328-336

CORCORAN, J; LACEY, H; BAKER, P; WAREING, M. 2008. Altered potassium channel expression in the human placental vasculature of pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Hypertens Pregnancy.* 27(1):75-86.

DÍAZ, P.; VALLEJOS, C.; GUERRERO, I.; RIQUELME, G. 2008. Barium, Tea and Sodium Sensitive Potassium Channels are Present in the Human Placental Syncytiotrophoblast Apical Membrane. *Placenta.* 29(10): 883-891.

FANTINI, J.; GARMY, N.; MAHFOUD, R.; YAHY, N. 2002 Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases. *Expert Rev Mol Med.* 4(27):1-22.

GANAPATHI, S; FOX, T; KESTER, M; ELMSLIE, K. 2010. Ceramide modulates HERG potassium channel gating by translocation into lipid rafts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 299(1):C74-86

GODOY, V. 2006. Tesis “Caracterización de Microdominios Lipídicos en membranas apicales de Sincitiotrofoblasto placentario humano”. Consultado en http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/godoy_v/sources/godoy_v.pdf

GODOY, V. y RIQUELME, G. 2008. Distinct lipid rafts in subdomains from human placental apical syncytiotrophoblast membranes. *J Membr Biol.* 224(1-3):21-31

GUDE, N.; ROBERTS, C.; KALIONS, B.; KING, R. 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114: 397-407.

HAMPL, V. y JAKOUBEK, V. 2009. Regulation of fetoplacental vascular bed by hypoxia. *Physiol Res.* 58 Suppl 2:S87-93.

JANICH, P. y CORBEIL, D. 2007. GM1 and GM3 gangliosides highlight distinct lipid microdomains within the apical domain of epithelial cells. *FEBS Lett.* 581(9):1783-7.

JIMENEZ, V.; HENRÍQUEZ, M.; LLANOS, P.; RIQUELME, G. 2004. Isolation and Purification of Human Placental Plasma Membranes from Normal and Pre-eclamptic

Pregnancies. *A Comparative Study. Placenta.* 25(5): 422-437.

KARNOVSKY, M; KLEINFELD A; HOOVER, R; KLAUSNER, R. 1982. The concept of lipid domains in membranes. *J Cell Biol.* 94(1):1-6.

KUNDING, A; CHRISTENSEN S; DANIELSEN, E; HANSEN, G. 2010. Domains of increased thickness in microvillar membranes of the small intestinal enterocyte. *Mol Membr Biol.* 27(4-6):170-7.

LEVITAN, I; FANG, Y; ROSENHOUSE-DANTSKER, A; ROMANENKO, V. 2010. Cholesterol and Ion Channels. *Subcell Biochem,* 51:509-549.

LÓPEZ, D y KOLTER, R. 2010. Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes dev.*

MARTENS, J; NAVARRO-POLANCO, R; COPPOCK, E; NISHIYAMA, A; PARSHLEY, L; GROBASKY, K; TAMKUN, M. 2000. Differential targeting of Shaker-like potassium channels to lipid rafts. *J Biol Chem.* 275(11):7443-6.

MARTENS, J; SAKAMOTO, N; SULLIVAN, S; GROVASKY, T; TAMKUN M. 2001. Isoform-specific localization of voltage-gated K⁺ channels to distinct lipid raft populations. Targeting of Kv1.5 to caveolae. *J Biol Chem.* 276(11):8409-14.

MARTENS, J.; O`CONNELL, K.; TAMKUN, M. 2004 Targeting of ion channels to membrane microdominios: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci.* 25(1):16-21.

PIKE, L. 2008. The Challenge of Lipid Rafts. *J Lipid Res.* 50 Suppl:S323-8.

RIQUELME, G. 2009 Placental chloride channels: a review. *Placenta.* 2009 (8):659-69.

ROMANENKO, V; ROTHBLAT, G; LEVITAN, I. 2002. Modulation of endothelial inward-rectifier K⁺ current by optical isomers of cholesterol. *Biophys J.* 83(6):3211-22

ROMANENKO, V; FANG, Y; BYFIELD, F; TRAVIS, A; VANDERBERG, C; ROTHBLAT, G; LEVITAN, I. 2004. Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys J.* 2004 87(6):3850-61.

SADLER, T. 2001. "Membranas Fetales y Placenta". En Langman. Embriología Médica. Con orientación Clínica, 8ª edn, (pp. 133-153). Editorial Médica Panamericana, U.S.A.

SASLOWSKY, D; LAWRENCE, J; REN, X; BROWN, D; HENDERSON, R; EDWARDSON, M. 2002. Placental Alkaline Phosphatase Is Efficiently Targeted to Rafts in Supported Lipid Bilayers. *J Biol Chem.* 277(30):26966-70.

SIMONS, K. y IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 5; 387(6633):569-72.

SIMONS, K y TOOMRE, D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):31-9.

SINGER, J. y NICOLSON, G. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-731.

STULC, J. 1997. Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol. Rev.* 77:805-836.

SZABO, I; ADAMS, C; GULBINS, E. 2004 Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflugers Arch.* 448(3):304-12

TANG, Q. y EDIDIN, M. 2001. Vesicle trafficking and cell surface membrane patchiness. *Biophys J.* 81(1):196-203.

TIKKU, S; EPSHTEIN, Y; COLLINS, H; TRAVIS, A; ROTHBLAT, G; LEVITAN, I. 2007. Relationship between Kir2.1/Kir2.3 activity and their distributions between cholesterol-rich and cholesterol-poor membrane domains. *Am J Physiol Cell Physiol.* 293(1):C440-50.

VALLEJOS, C y RIQUELME, G. 2007. The maxi-chloride channel in human syncytiotrophoblast: a pathway for taurine efflux in placental volume regulation?. *Placenta*. 28(11-12):1182-91. .

WAREING, M.; BAI, X.; SEGHER, F.; TURNER, C.; GREENWOOD, S.; BAKER, P.; TAGGART, M.; FYFE, G. 2006. Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291(2): R437-R446.

WAUGH, M y HSUAN, J. 2009. Preparation of membrane rafts. *Methods Mol Biol.* 462:403-14.