



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**CARACTERIZACIÓN DE LAS CORRIENTES TOTALES
PRESENTES EN MEMBRANA BASAL DE SINCICIO
TROFOBLASTO PLACENTARIO HUMANO
TRANSPLANTADO EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS**

GONZALO JAVIER MADRID CAMPOS

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

PROFESOR GUÍA: GLORIA RIQUELME PINO

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1070695

SANTIAGO, CHILE
2010

INDICE

INDICE.....	2
RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:	7
• Placenta.....	7
○ Desarrollo placentario.....	7
○ Placenta de término	9
○ Funciones placentarias.....	10
• Transporte celular en general	11
• Transporte placentario	15
• Canales de cloruro (Cl ⁻).....	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
• Obtención y preparación de placentas.....	20
○ Determinación de proteínas	21
• Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y tratamientos realizados.....	22
○ Aislamiento de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
○ Inyección de MB en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	23
• Registros electrofisiológicos de corrientes totales por el método de Voltage clamp	24
○ Criterios morfológicos de inclusión de ovocitos	24
○ Registro de corrientes totales de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> mediante el metodo de <i>Voltage clamp</i>	24
○ Criterios funcionales de inclusión de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> para su registro	25
○ Soluciones de registro.....	25
• Análisis de los datos obtenidos por Voltage clamp.....	27
○ Presentación de los datos y análisis estadístico	27
RESULTADOS	28
• Demostración de la incorporación funcional de corrientes exógenas provenientes de membrana basal purificada de sincitiotrofoblasto a ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	28
○ Cuantificación de la conductancia total de la corriente proveniente de MB trasplantada en ovocitos de <i>Xenopus</i>	32
○ Distribucion de los ovocitos inyectados con MB según su respuesta en intensidad de corriente	33
• Análisis de las corrientes exógenas provenientes del trasplante de MB a ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	37
• Reemplazo iónico del sodio en la solución de registro.	39
• Permeabilidad a distintos aniones de MB trasplantada a ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	43
• Efecto de bloqueadores farmacológicos sobre las corrientes totales de ovocitos trasplantados con MB	45

○ Efecto DIDS	45
○ Efecto DPC	50
○ Efecto aditivo de DIDS y DPC.....	55
○ Análisis de corrientes exógenas obtenidas desde los ovocitos inyectados con MB	59
DISCUSIÓN.....	61
• Incorporación funcional de MB de sinciotrofoblasto placentario humano en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	61
• Efecto del reemplazo catiónico sobre las corrientes totales de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con MB	63
• Permeabilidad de los canales de Cl ⁻ de MB a diferentes aniones.....	64
• Efecto de bloqueadores farmacológicos sobre las corrientes totales de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> inyectados con MB	65
○ Efecto de DIDS.....	65
○ Efecto DPC	65
○ Efectos aditivos de DIDS y DPC.....	66
• Conclusiones.....	67
BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

El sinciotrofoblasto presenta una membrana apical y una membrana basal, que constituyen la principal barrera para el intercambio materno fetal.

El cloruro (Cl^-) es el principal ión extracelular y su paso a través de la membrana apical ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, en la membrana basal el transporte de cloruro ha sido poco estudiado. El presente trabajo es el primero en describir las vías conductivas de cloruro existentes en la membrana basal (MB) del sinciotrofoblasto trasplantado a ovocitos de *Xenopus laevis* a través del método de *Voltage clamp*.

Al transplantar MB a ovocitos de *Xenopus Laevis*, estos muestran un aumento de corrientes de al menos 3 veces en comparación a ovocitos controles y un aumento de conductancia de cuerda a 40 mV de 5,9 μS promedio. Además a 30 mV las corrientes exógenas disminuyeron en un 51,8% al agregar ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico (DIDS) y en un 52,8% al agregar ácido difenilamina-2-carboxílico (DPC), ambos conocidos bloqueadores de canales de Cl^- . Estos datos demuestran la presencia de vías conductivas para Cl^- en la MB del sinciotrofoblasto placentario humano.

SUMMARY

The syncytiotrophoblast presents an apical membrane and a basal membrane, which are the main barrier to maternal-fetal exchange.

Chloride (Cl^-) is the major extracellular ion and its passing through apical membrane has been extensively studied. However, in the basal membrane chloride transport has been poorly studied. This is the first work to describe the chloride conductive pathways presents in the syncytiotrophoblast basal membrane transplanted to *Xenopus Laevis* oocytes through Voltage Clamp method.

The analysis of the data to suggest that the Cl^- channels presents on the human syncytiotrophoblast membrane are sensitive to DIDS and DPC ($p < 0.05$), leaving open the possibility of the existence of some channels sensitive to both or neither blocking agents.

Once basal membrane were transplanted to *Xenopus Laevis* oocytes, this shows a current increase of at least 3 times control oocytes and a string conductance increase at 40 mV of 5,9 μS mean. Plus at 30 mV the exogenous currents decrease in a 51,8% when 4,4'-diisothiocyanostilbene -2,2'-disulphonic acid (DIDS) was added and a 52,8% when diphenyl-amine-2-carboxylic acid (DPC) was added, both very popular Cl^- channels blockers. This data shows the presence of conductive pathways for Cl^- in human syncytiotrophoblast basal membrane.

INTRODUCCIÓN

La placenta humana es un órgano transitorio, propio del embarazo, de forma discoide que se encuentra inserto en la cara interna de la pared uterina. Es un órgano mixto, es decir, materno y fetal. La placenta cumple funciones orientadas al desarrollo y crecimiento fetal, estas funciones se dividen en funciones endocrinas, que permiten la regulación del metabolismo materno y la mantención del embarazo y funciones de transporte, que permiten al feto recibir un adecuado flujo de nutrientes para sostener una alta velocidad de crecimiento y eliminar los desechos de sus reacciones metabólicas.

La placenta está cubierta por una capa celular epitelial multinucleada y fusionada, el sincitiotrofoblasto, que presenta una membrana apical o materna y una membrana basal o fetal, y que separa efectivamente las fuentes de sangre materna y fetal. Por lo tanto, como no existen rutas paracelulares, el sincitiotrofoblasto constituye la principal barrera para el intercambio materno fetal. Por todo esto, el análisis del transporte transplacental involucra el estudio en las dos membranas celulares, la materna y la fetal.

El transporte de sustancias a través de la membrana celular puede ser realizado por difusión, o por medio de diferentes proteínas de membrana, las cuales que pueden ser transportadores o canales iónicos.

El cloruro es el principal ión extracelular, y durante todas las etapas gestacionales se encuentra más concentrado en el feto que en la sangre materna. Aún cuando la mayor cantidad de estudios de transporte de cloruro se han enfocado en el transporte a través de la membrana apical, existen algunos estudios del transporte de cloruro a través de la membrana trofoblástica placentaria basal todos estos estudio describen el transporte de cloruro a través de canales iónicos. Debido a la naturaleza del Sincitiotrofoblasto hasta la fecha este transporte ha sido descrito solo usando métodos indirectos, por lo que se ha hecho necesario utilizar estudios electrofisiológicos alternativos. La presente memoria de título tuvo como objetivo describir las vías conductivas existentes en la membrana basal del sincitiotrofoblasto a través del método de *Voltage clamp*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Placenta

La placenta humana es un órgano transitorio, propio del embarazo, que se inserta en la superficie interna de la pared uterina. Ella es la responsable de la compleja coexistencia entre madre y feto, ya que cumple un rol mediador, desarrollando funciones orientadas al desarrollo y crecimiento fetal que en el organismo adulto son propias de órganos específicos. De esta forma, la placenta es la responsable en gran medida del éxito de una gestación y del crecimiento de un individuo normal (Pérez y Donoso, 1999).

Desarrollo placentario

A partir del cuarto día después de la fecundación, el embrión se encuentra completamente rodeado de una capa de células llamado trofoblasto. Estas se diferenciarán en todos los otros tipos de células encontrados en la placenta humana.

A partir del tercer día el trofoblasto empieza a producir gonadotropina coriónica humana (hCG), esta hormona asegura que el útero será receptivo a la implantación. En los siguientes días el trofoblasto se ancla al útero y lo invade comenzando el a proliferar, cinceland, a través de la mucosa uterina, un camino hacia la circulación materna.

A los nueve días el embrión esta rodeado de dos capas de trofoblasto: el citotrofoblasto y sinciotrofoblasto. La capa interna es la conocida como citotrofoblasto, ésta se encuentra constituida por células con límites celulares precisos, presentando mitosis activa contribuyendo con células que darán origen al sinciotrofoblasto. Este último, capa externa y más gruesa, se caracteriza, histológicamente, por ser un tejido sincicial altamente polarizado, lo que denota el hecho que todas sus células se fusionan en una sola masa continua, con citoplasma multinucleado y sin rutas paracelulares.

Este sinciotrofoblasto se distinguen dos membranas: una apical (cara materna) y una basal (cara fetal). Debido a la naturaleza sincicial de este epitelio, es capaz de separar eficientemente la sangre materna y fetal,

constituyendo la principal barrera al transporte de solutos entre la madre y el feto.

A fines del primer trimestre la placenta ha alcanzado una madurez morfológica, la mayoría de las células citotrofoblásticas ha desaparecido junto con algunas células de tejido conectivo. Desde este periodo en adelante las únicas capas que separan la sangre materna de la fetal son el sinciotrofoblasto y la pared endotelial de los vasos sanguíneos, pero al ser estos últimos de naturaleza fenestrada no constituyen parte esencial de la barrera materno-fetal. (Figura 1)

La placenta se encuentra rodeada por la lámina coriónica en el lado fetal y por la decidua basal en el lado materno. Entre la lámina coriónica y la decidua basal se encuentran los llamados espacios intervellous, ocupados por sangre materna.

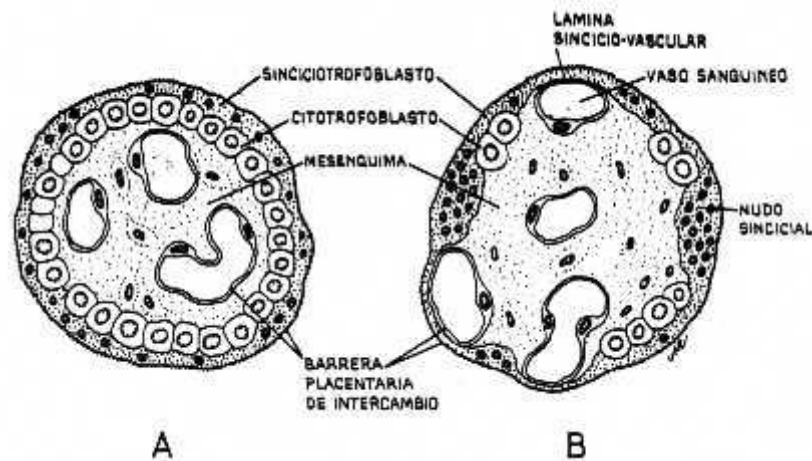


Figura 1. Estructura de las vellosidades en diferentes etapas del desarrollo. (A) Durante la cuarta semana. (B) Durante el cuarto mes.

Durante el cuarto a quinto mes la decidua basal forma varios tabiques. Éstos poseen un núcleo central de tejido materno, pero su superficie está cubierta por una capa de células sinciciales, de tal manera que en todo momento hay una capa sincicial separando la sangre materna que se encuentra en los espacios intervillosos. Como consecuencia de la formación de los tabiques, la placenta queda dividida en varios cotiledones.

Placenta de término.

La placenta de término es de forma discoidal, presenta un diámetro de 15 a 20 cm, con un espesor de 3 cm aproximadamente, pesa entre 500 a 600 gramos y es de tipo hemocoriónica, es decir, la sangre materna baña directamente las vellosidades coriónicas, sin la interposición de otros elementos y sin la presencia de endotelio vascular (Cingolani y Houssay, 2000). Una vez ocurrido el parto, alrededor de 30 minutos después, la placenta se desprende de la pared uterina y es expulsada fuera del útero.

Al observar la placenta (Figura 2), se puede advertir que por el lado materno se encuentran los cotiledones, los cuales están cubiertos por una delgada capa de decidua. El lado fetal de la placenta, está constituida por la lámina coriónica. Adicionalmente el cordón umbilical se encuentra inserto en la cara fetal.

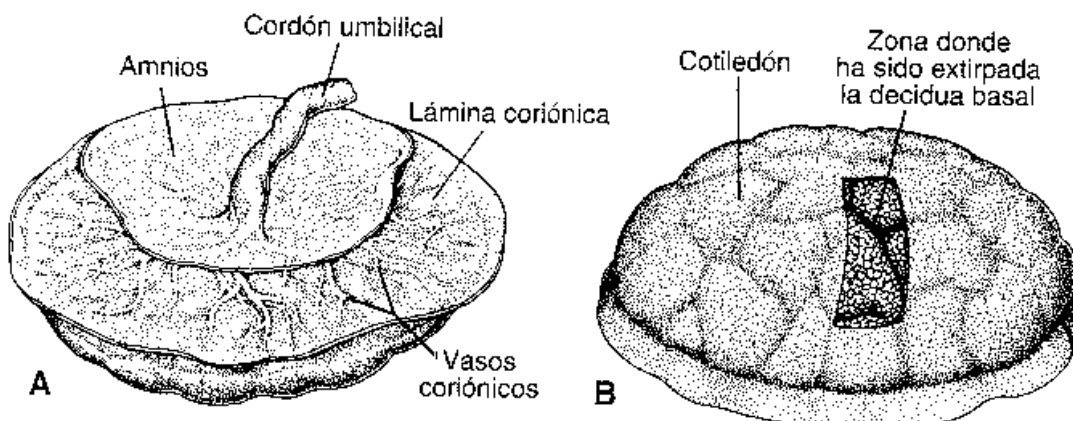


Figura 2. Placenta de término. (A) Vista por lado fetal, (B) Vista por el lado materno.

Funciones placentarias

La placenta cumple múltiples funciones orientadas al desarrollo y crecimiento fetal, análogas a las que después del nacimiento desarrollarán los pulmones, los riñones, el intestino, la piel, el hígado así como también las glándulas endocrinas.

Una de las funciones placentarias es la función inmunológica. Los anticuerpos maternos pasan a través del sinciciotrofoblasto hacia los capilares fetales (inmuno globulinas G).

Otro ejemplo de funciones de éste órgano son las endocrinas, secretando hormonas como progesterona, estrógenos, gonadotrofina coriónica hCG, (en los primeros meses de embarazo) y somatotrofina. Todas ellas hormonas involucradas en el embarazo, desarrollo embrionario y preparación a la maternidad.

Sumado a lo anterior, la placenta cumple un rol en el transporte, entre la madre y el feto, específicamente en el intercambio de elementos nutritivos y electrolitos, como aminoácidos, ácidos grasos libres, hidratos de carbonos, vitaminas e iones. Este trabajo se enmarca dentro de la función de transporte de la placenta.

Todos los requerimientos fetales deben ser entregados a través de la circulación sanguínea. De esta manera, los solutos de intercambio deben, necesariamente, atravesar la barrera placentaria, siendo el sinciciotrofoblasto la principal barrera para el intercambio materno-fetal en la placenta humana. Es así como el análisis del transporte transplacentario involucra el estudio de los mecanismos de transporte en sus dos caras, la materna y la fetal (Jiménez *et al.*, 2004). Para ello es necesario conocer los mecanismos de transporte a través de las membranas biológicas, las cuales se revisarán a continuación.

Transporte celular en general

Las membranas celulares son barreras de permeabilidad selectiva que separan al citoplasma del medio extracelular. El modelo aceptado para las membranas biológicas está basado en el mosaico fluido de Singer y Nicholson (1972). La membrana está formada por una doble capa lipídica delgada (5 nm) donde existen numerosas proteínas asociadas, ellas pueden ser intrínsecas, llamadas también integrales (atravesan por completo la bicapa) o extrínsecas (unidas parcialmente a la bicapa).

Esta bicapa lipídica es libremente atravesable por solutos no polares de bajo peso molecular mediante un proceso llamado difusión simple. Al mismo tiempo, la bicapa no es fácilmente permeable a las moléculas grandes (azúcares o aminoácidos) o a las partículas cargadas como los iones (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , etc.). Dichos iones pueden pasar a través de la membrana sólo por medio de proteínas transportadoras especiales existentes en ella. Un subgrupo de ellas son las vías conductivas o canales iónicos que permiten un flujo rápido de solutos (iones, aminoácidos, entre otros) a través de la membrana a favor de la gradiente electroquímica (transporte pasivo). Otras proteínas transportadoras de membrana son los denominados transportadores o “carriers” para iones y otros solutos, transportándolos con rangos de eficiencia mucho menores que los canales iónicos, tanto en contra de una gradiente electroquímica como a favor de ella (Aidley y Stanfield, 1996).

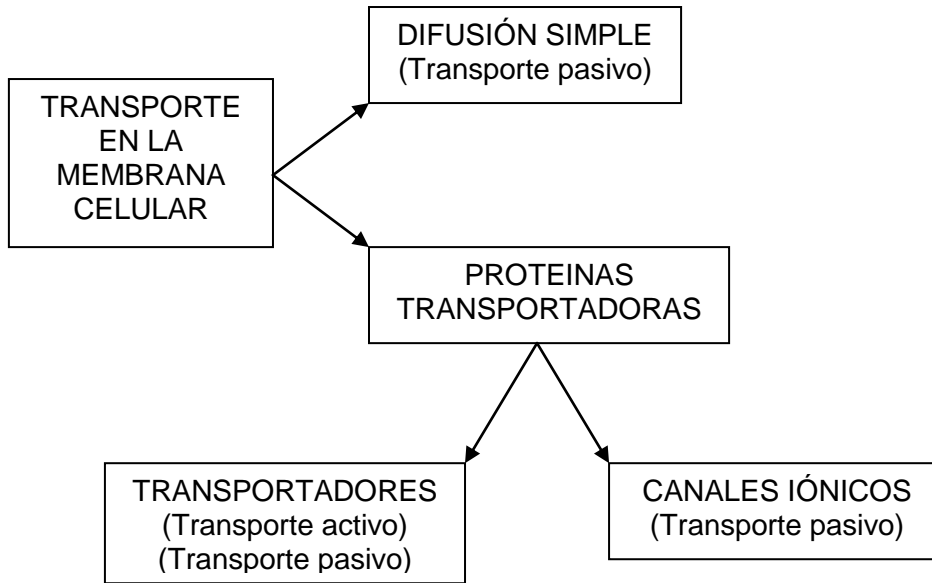


Figura 3. Tipos de transporte a través de la membrana celular.

Se revisará a continuación brevemente en que consisten.

Difusión simple: Transporte pasivo de una sustancia a favor de una gradiente de concentración (desde un sitio de mayor concentración a otro de menor concentración). El agua, el oxígeno y el CO₂ son sustancias que utilizan este medio de transporte.

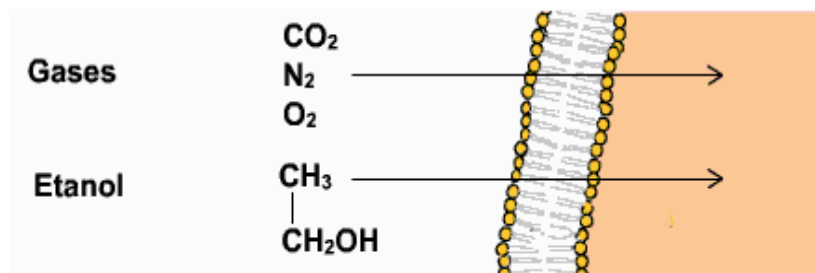


Figura 4. Esquema con ejemplos de soluto que se transportan por difusión simple a través de la membrana celular.

Transportadores: Son proteínas integrales de la membrana celular, capaces de unirse a un soluto específico y luego translocarlo al otro lado de la membrana, mediante cambios conformacionales complejos. Este tipo de transporte puede ser pasivo, a favor de una gradiente electroquímica, o activo,

en contra de una gradiente electroquímica. Ejemplo de transporte activo son las bombas como la de Na^+/K^+ y la bomba de Ca^{+2} . Gracias a este tipo de transporte es posible transportar elementos como iones, algunos aminoácidos y azúcares como la glucosa. La eficiencia de transporte de estas proteínas es menor que la de los canales iónicos, pudiendo llegar a ser hasta de 10^3 iones/segundo. (Latorre *et al.*, 1996).

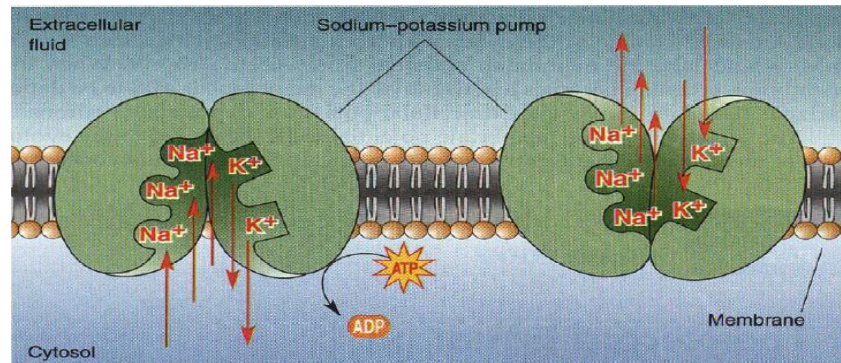


Figura 5. Representación de proteínas transportadoras.

Canales iónicos: Son proteínas integrales de la membrana plasmática que están formadas por varias subunidades. Contienen un poro central que puede abrirse mediante un cambio conformacional, permitiendo a los iones, o a otros solutos como aminoácidos, pasar de un lado de la membrana a otro de forma pasiva (a favor de una gradiente electroquímica). Esto permite a los iones fluir a través de la membrana a velocidades de hasta 10^6 moles por segundo, por lo que son altamente eficientes y capaces de generar respuestas muy rápidas. (Strange *et al.*, 1996).

Existen distintas vías por las que un canal puede ser activado: por el potencial eléctrico (canales activados por potencial), por transmisores químicos (canales activados por ligandos) y por presión o estiramiento (canales activados mecánicamente). Un canal es, por regla general, más sensible a sólo uno de estos tipos de estímulos (Aidley y Stanfield, 1996).

Las principales características de los canales iónicos incluyen:

Conductancia: es la capacidad del canal de conducir corriente eléctrica. Se establece como la relación existente entre la intensidad de corriente (i) versus el potencial de membrana (V). Su unidad de medida es en Siemens (S). La conductancia (g) corresponde a la pendiente de la curva. Cuando la corriente es proporcional a la diferencia de potencial se dice que el conductor cumple con la ley de Ohm ($i = gV$) (canal óhmico).

La concentración de los iones a ambos lados de la membrana C_1 y C_2 , junto con el campo eléctrico generado por la diferencia de potencial, determina la dirección del movimiento, es decir desde el intracelular al extracelular o viceversa. Entonces se dice que el movimiento iónico es generado por un gradiente electroquímico ($\bar{\Delta\mu}$) definida mediante la siguiente ecuación:

$$\bar{\Delta\mu} = RT \ln C_2/C_1 + zF \Delta V$$

Donde $\bar{\Delta\mu}$ corresponde a la gradiente electroquímica, R a la constante de los gases, T a la temperatura absoluta, z a la valencia del ión, F a la constante de Faraday, C_1 a la concentración interna del ión, C_2 a la concentración externa del ión y ΔV a la diferencia de potencial.

Selectividad: es la capacidad de seleccionar los iones que atraviesan por un canal. Gracias a esta propiedad los canales iónicos se han agrupado en diferentes familias. Dentro de estas familias algunas seleccionan sólo cationes y otras sólo aniones, pudiendo ser además catiónicos o aniónicos no específicos (permiten el paso de diferentes iones) o catiónicos o aniónicos selectivos (que seleccionan preferentemente un tipo de ión), ejemplos de ellos son los canales de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Cl^- (Hille, 1992).

Contrario a lo que se podría esperar el proceso de selección es independiente del tamaño del ión. El proceso de selección iónica por parte del canal es

realizado a través un filtro de selectividad que se encuentra al interior de estos, dicho filtro está formado por un conjunto de aminoácidos específicos.

Cinética: Los canales iónicos, a través de cambios conformacionales, oscilan a lo largo del tiempo al menos entre dos estados principales: abierto y cerrado. Esta oscilación sucede con una cierta frecuencia la que es conocida como cinética.

En el estudio de la cinética de un canal, se llama probabilidad de apertura a la probabilidad de que un canal se encuentre abierto en un determinado tiempo bajo ciertas condiciones dadas.

La cinética específica de un canal puede ser modulada a través de: potencial, químicos, condiciones osmolíticas, etc. Por lo tanto resulta de gran importancia el estudio de la cinética de un canal para poder inferir los procesos fisiológicos en los que este participa. (Aidley y Stanfield, 1996).

Transporte placentario

La placenta transporta en forma selectiva diversos nutrientes como glucosa, lactato, aminoácidos, ácidos grasos libres, trazas de metales, vitaminas, inmunoglobulinas (IgG), agua, aniones, cationes y oxígeno principalmente desde la madre al feto y CO₂, urea y bilirrubina, entre otros desde el feto a la madre (Pérez y Donoso, 1999).

Las funciones de transporte en la placenta tienen gran importancia para el crecimiento y desarrollo fetal. El sinciotrofoblasto placentario humano es un epitelio polarizado, que forma la principal barrera para el intercambio materno fetal (Shennan *et al.*, 1986). Como no existen rutas paracelulares, todos los solutos pasan directamente a través de las dos membranas del trofoblasto (apical y basal).

En el sinciotrofoblasto placentario, como en otras células epiteliales y no epiteliales, el transporte iónico está asociado con numerosas funciones, mantención del potencial de membrana, regulación de volumen celular, etc.

Específicamente en la placenta se ha demostrado que los canales iónicos participan en procesos tales como la regulación del potencial de membrana durante la gestación (Birdsey *et al.*, 1997); la regulación del volumen celular, mediado por K^+ y Cl^- (Birdsey *et al.*, 1999); transporte de aminoácidos en respuesta a cambios en el volumen celular (Bernucci y Riquelme, 2006; Vallejos y Riquelme, 2007) tanto en tejido fresco (Shennan, 1999), como en cultivos celulares (Remsbury *et al.*, 1997).

Este conocimiento es necesario para completar el modelo de transporte transplacentario y de esta manera explicar la función fisiológica del transporte en la placenta. Hay un conjunto de trabajos que reportan la presencia de canales iónicos como canales de Na^+ (Montalbetti *et al.*, 2005), canales de Ca^{+2} (Riquelme *et al.*, 2006) y un canal catiónico inespecífico (Llanos *et al.*, 2002) en las membranas apical y basal del sincitiotrofoblasto. Cabe destacar dentro de los canales reportados el Maxi-canal de cloruro (Riquelme *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1993; Llanos *et al.*, 2004), que ha sido ampliamente estudiado y caracterizado en el laboratorio de electrofisiología de membranas donde se realizó este trabajo, tanto en condiciones normales como patológicas (Bernucci *et al.*, 2003).

Canales de cloruro (Cl⁻)

Tanto en el feto, como en el adulto, el Cl⁻ es el principal ión extracelular, durante todas las edades gestacionales el Cl⁻ es 5 a 6 mmol/L mayor en la sangre fetal que en la sangre materna (Bissonette *et al.*, 1994).

El Cl⁻ puede entrar a las células en cotransporte con Na⁺, con K⁺, o con ambos, intercambiándose por otros aniones (bicarbonato), o bien ingresar por canales iónicos. El Cl⁻ sale de la célula a través de canales, intercambiadores aniónicos o en cotransporte con K⁺.

Los distintos sistemas transportadores de Cl⁻ participan en la transferencia iónica y de fluidos a través de los epitelios o pueden estar involucrados en la regulación del volumen celular y pH. (Stulc, 1997). Los canales de Cl⁻ difieren mucho en sus propiedades, incluso en una misma célula, han sido clasificados en términos de su conductancia en tres grandes grupos: 1) maxi-canales de alta conductancia, 2) canales intermedios, y 3) pequeños canales.

Históricamente, datos de flujos en vesículas de membrana apical (MVM) han demostrado diferentes vías para el transporte de Cl⁻ a través del sincitiotrofoblasto placentario humano, siendo una mediante un intercambiador aniónico (responsable de un 50% del transporte) y otra, vía canales dependientes de potencial de membrana. Estos canales han sido clasificados en dos grupos: canales de Cl⁻ sensibles a DPC (ácido difenilamina-2-carboxílico) y canales de Cl⁻ sensibles a DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico), (Stulc, 1997) cabe destacar dentro de estos últimos el Maxi-canal de Cl⁻ (Riquelme *et al.*, 1995, 2007).

Respecto a la membrana basal de sincitiotrofoblasto placentario humano (MB), vesículas provenientes de placentas de término, analizadas por detección específica de proteínas por electroforesis (Western Blot), mostraron la presencia de un intercambiador aniónico, en cantidades 12 veces menores que en MVM. Además, experimentos de flujo de Cl⁻ en vesículas de MB sugirieron la presencia de vías conductivas para cloruro sensibles a DIDS o a DPC. Sin embargo, los mecanismos para el transporte de Cl⁻ siguen sin

conocerse (Powell *et al.*, 1998). Por ende es escasa la información existente acerca de cuáles vías son fisiológicamente importantes para el intercambio materno fetal de este ión.

Es por esta razón importante identificar dichas vías conductivas en las membranas basales. Sin embargo dada la naturaleza sincicial del trofoblasto, es muy difícil el acceso para estudiar sus canales iónicos por los métodos electrofisiológicos tradicionales particularmente en el caso de las membranas basales donde no es accesible directamente la membrana; es así que, con el fin de determinar las propiedades biofísicas y regulación de los canales iónicos, se ha desarrollado una línea de trabajo incluyendo métodos alternativos para la realización de electrofisiología, contemplando la purificación de membranas placentarias y su posterior reconstitución en liposomas gigantes, o bien, transplantando dichas membranas en ovocitos de *Xenopus laevis* (Riquelme *et al.*, 1995; Ivorra *et al.*, 2002).

Previamente en el laboratorio en que se realizó esta memoria de título se ha reportado la incorporación funcional de canales de Cl⁻ de membrana apical de sinciotrofoblasto humano al ser transplantados a ovocitos de *Xenopus laevis*, permitiendo llevar a cabo registros de las corrientes totales provenientes de dichos canales (Ivorra *et al.*, 2002). Este método de trasplante de proteínas transportadoras ha sido reportado anteriormente numerosas veces por autores, trabajando en distintos tejidos (Ivorra *et al.*, 2002; Miledi *et al.*, 2004 ; Miledi *et al.*, 2006; Palma *et al.*, 2003).

Hasta la fecha se desconocen cuales son las vías conductivas que subyacen las corrientes descritas por Powell, en la MB. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar las corrientes de Cl⁻ provenientes de la MB de sinciotrofoblasto utilizando como metodología el trasplante de MB purificada en ovocitos de *Xenopus laevis* para el registro de corrientes totales mediante la técnica de *Voltage clamp*.

HIPÓTESIS

Durante el embarazo el Cl^- es el principal ión en la sangre fetal. Dado que en las membranas basales de epitelios de otros tejidos existen canales de Cl^- involucrados en la fisiología celular, se postula la existencia de canales funcionales de Cl^- en la membrana basal del sinciciotrofoblasto humano involucrados en la fisiología del mismo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de canales de Cl^- funcionales en la membrana basal del sinciciotrofoblasto humano, transplantada a ovocitos de *Xenopus laevis*, y registrados mediante la técnica de *Voltage clamp*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Transplantar membrana basal de sinciciotrofoblasto normal purificada a ovocitos de *Xenopus laevis*.
2. Registrar las corrientes totales de ovocitos controles y transplantados, por la técnica de *Voltage clamp*, comparando sus magnitudes.
3. Identificar las corrientes totales de Cl^- en ovocitos controles y transplantados mediante la técnica de *Voltage clamp*.
4. Determinar la selectividad de los canales de Cl^- a otros aniones.
5. Identificar el efecto de bloqueadores de canales de Cl^- , en ovocitos controles y transplantados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de placentas.

Placentas de término provenientes de partos normales o cesáreas (500 – 800 g.), fueron obtenidas inmediatamente después del parto desde el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital San José, y rápidamente llevadas en un recipiente hermético con hielo (4° C) al laboratorio de Electrofisiología de Membranas dentro de un plazo no superior a 60 min.

Se tomaron 100 g. de cotiledones de placenta, los que fueron luego resuspendidos en Tampon A (250mM sacarosa, 10mM Tris (hidroximetilaminometano)-Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2 etansulfónico), pH 7,4 e inhibidores de proteasas: 0,7µM pepstatina A, 1,1µM leupeptina, 80mM aprotinina), siendo posteriormente homogenizado 3 veces por 30 segundos cada vez.

A continuación, el tejido fue sometido a varias etapas de centrifugación diferencial, para eliminar los diversos organelos intracelulares, el citosol y particularmente las mitocondrias.

Posteriormente se realizó una incubación en agitación en presencia de MgCl₂ 12mM, procedimiento que mediante centrifugación, logra la separación de las membranas apicales (sobrenadante) del sedimento enriquecido en membranas basales (pellet) del sinciotrofoblasto.

Este sedimento fue resuspendido en Tampon B (300mM sacarosa, 20mM Tris-maleato, pH 7,4) para ser llevado a una gradiente discontinua de sacarosa, en que la membrana basal se obtiene en la interfase entre las concentraciones de 45 y 52% de sacarosa. Esta banda fue lavada, resuspendida en Tampon B, y almacenada alícuotas en nitrógeno líquido hasta su utilización (Jiménez *et al.*, 2004).

Determinación de proteínas

Se cuantificó la concentración de proteínas totales en MB a través de un método colorimétrico, utilizando una prueba de determinación de proteínas (Sigma, Pierce) bicinchoninic acid (BCA). Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA). Las fracciones de membranas fueron diluidas con agua bidestilada entre 20 y 80 veces antes de ser determinadas. Generalmente estas determinaciones arrojaron resultados, en la membrana basal, en un rango entre 6 y 11 mg/mL de proteína.

La pureza y enriquecimiento fue caracterizada usando marcadores específicos de membrana basal tales como adenilato ciclasa y receptores β -adrenérgicos. Además, se midió la actividad de fosfatasa alcalina como marcador de contaminación con membrana apical. También para evaluar la contaminación con membrana mitocondrial se evaluó la actividad de citocromo-c oxidasa y succinato deshidrogenasa. Estas determinaciones avalaron que las membranas utilizadas poseen baja contaminación cruzada con otras membranas y de alta pureza en marcadores de MB (Jiménez *et al.*, 2004).

La figura explica de manera general el proceso de aislamiento y purificación de membrana basal de sincitiotrofoblasto placentario humano.

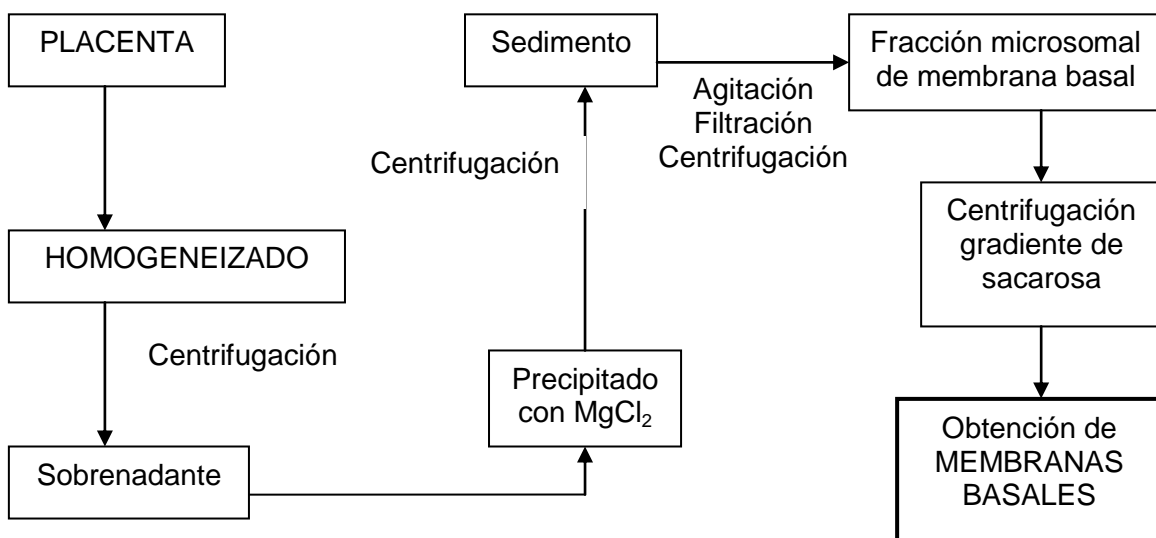


Figura 6. Esquema de protocolo utilizado para la obtención de MB purificadas.

Obtención de ovocitos de Xenopus laevis y tratamientos realizados.

Ranas hembras adultas fueron transportadas al laboratorio en un recipiente con agua desclorificada a temperatura ambiente desde el ranario del Programa de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Cada rana fue anestesiada por inmersión en tricaina 0,1-0,2 % durante 45 min-1hr, hasta que no responda a ningún estímulo.

A cada rana se le realizó una incisión en la zona abdominal inferior, izquierda o derecha, obteniendo luego un trozo de ovario con ovocitos. Posteriormente cada rana fue suturada en un total de dos planos de sutura (muscular y cutánea).

Los trozos de ovario obtenidos fueron puestos en una placa petri con solución de Barth (en mM 88 NaCl, 1 KCl, 0,33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,41 $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,82 $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2,4 NaHCO_3 , 10 HEPES, pH 7,4) suplementada con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (0,1 mg/ml).

Los trozos de ovario sumergidos en la solución de Barth se observaron bajo lupa y luz fría (no aumenta la temperatura de la solución) con el fin de comprobar la integridad y normalidad macroscópica de ellos, manteniéndolos todo el tiempo entre 15 – 16 °C.

Aislamiento de ovocitos de *Xenopus laevis*

Los trozos de ovario obtenidos fueron disgregados con pinzas Dumont nº5 para ser sometidos posteriormente a un tratamiento de digestión en colagenasa 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich Inc.) en solución OR-2 libre de Ca^{+2} (en mM: 82.5 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl, 5 Hepes; pH 7,4), durante 40 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. Este procedimiento remueve las células foliculares y tejido conectivo, que rodea a cada ovocito, dejándolos completamente separados.

Los ovocitos se lavaron 8 – 10 veces en solución OR-2 libre de Ca^{2+} a temperatura ambiente, para remover la colagenasa, con agitación.

Luego fueron llevados nuevamente a solución de Barth con el fin de seleccionar aquellos ovocitos con adecuado grado de maduración en estadíos V y VI (Dumont, 1972).

Inyección de MB en ovocitos de *Xenopus laevis*

Una vez que los ovocitos fueron seleccionados, se les inyectó a nivel intracitoplasmático, un volumen de vesículas de membrana basal purificadas de sinciotrofoblasto correspondientes a una cantidad de proteína en un rango de 250 a 300 ng y a un volumen no superior a 65 nL. Para esto se utilizó un inyector adecuado para estos volúmenes (Nanoliter Inyector A203, WPI). Como muestra control se dejaron ovocitos sin inyectar.

Registros electrofisiológicos de corrientes totales por el método de Voltage clamp

Una vez inyectados los ovocitos fueron mantenidos en solución de Barth entre 15 – 16°C en una incubadora por 12- 24 horas, para el posterior registro de las corrientes mediante *Voltage clamp* con dos electrodos (Oocyte Clamp 75-C, World Precision Inc.), según lo descrito por Marsal *et al.*(1995).

Criterios morfológicos de inclusión de ovocitos

Tanto los ovocitos controles como los inyectados se evaluaron con los siguientes criterios morfológicos, para ser incluidos en el grupo a registrar.

- Presentar forma esférica.
- Ser turgentes.
- Poseer una superficie celular íntegra.
- Tener polos claramente delineados.

Registro de corrientes totales de ovocitos de *Xenopus laevis* mediante el método de Voltage clamp

Una vez seleccionados los ovocitos, fueron dispuestos en una cámara de registro con capacidad de 500µL y sumergidos en solución de Ringer normal (en mM 115 NaCl, 2 KCl, 1,8 CaCl₂, 5 Hepes, pH 7,0). Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (20-25°C).

A continuación, se introdujeron dos electrodos al citoplasma del ovocito, uno de corriente y uno de potencial (de resistencias 1-4MΩ; llenados con KCl 3M) dejando un tercer electrodo (electrodo de baño) en la solución de registro.

La incorporación funcional de canales iónicos exógenos dependientes de potencial se evaluó a través del registro de corrientes totales de membrana en respuesta a los siguientes estímulos de potencial predeterminados:

- Pulsos de potencial desde -100 mV hasta 40 mV, en segmentos de 20 mV, por 6 segundos cada uno (con un potencial de mantención o holding potential (Vh) de -60mV).
- Rampas de potencial desde -100 a 40mV, durante 10 segundos (Vh - 60mV)

Criterios funcionales de inclusión de ovocitos de *Xenopus laevis* para su registro

Con el fin de determinar la viabilidad de cada ovocito en su registro, se evaluaron los siguientes criterios funcionales para su inclusión:

- Al insertar el electrodo de potencial, estos debían presentar un potencial de membrana límite de -15mV.
- Ser capaces de mantener el potencial dado (clamp).
- No debían tener pérdidas de corriente (*leak*).

Soluciones de registro

La solución Ringer Normal (RN) constituye la base a partir de la cual, modificando algunos iones, se prepararon las soluciones a utilizar para registrar las corrientes. Soluciones bajas en Cl⁻ fueron hechas sustituyendo el NaCl por una cantidad equimolar de NaI, NaBr o Na-gluconato. Soluciones libres de Na⁺ se prepararon reemplazando NaCl por cantidades equimolares de N-metil-d-glucamina cloruro (NMDGCl). Soluciones con bloqueadores farmacológicos fueron hechas a partir de Ringer NMDG-Cl agregando la concentración deseada de bloqueador (DIDS y DPC).

La siguiente tabla muestra las soluciones utilizadas:

Concentración (mM)	RN	R-NMDG-Cl	R-NaI	R-NaBr	R-NaGluc	R-NMDG-Cl-DIDS	R-NMDG-Cl-DPC
NaCl	115		15	15	15		
KCl	2	2	2	2	2	2	2
CaCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Na-Hepes pH 7,4	5	5	5	5	5	5	5
NMDG-Cl		115				115	115
NaI			100				
NaBr				100			
NaGluc					100		
DIDS						1	
DPC							0,6

Tabla 1. Cuadro resumen de las soluciones de registro y sus respectivas composiciones de solutos.

Análisis de los datos obtenidos por Voltage clamp

Para la adquisición y análisis de las corrientes registradas en ovocitos controles e inyectados con MB, se utilizó el programa J. Dempster WinWCP V3.5.8 (Universidad de Strathclyde).

El criterio de inclusión utilizado para el análisis de ovocitos inyectados que incorporaron MB fue que presentaran una intensidad de corriente, a 40mV de potencial, al menos 60% mayor a la registrada por el promedio de los ovocitos controles pertenecientes a la misma donadora.

Presentación de los datos y análisis estadístico

Los resultados gráficos relacionados con el comportamiento poblacional de ovocitos frente a estímulos determinados de potencial, se presentan normalizados (%); es decir, el promedio de la intensidad de corriente del grupo control a un potencial de 40mV, fue tomado como el 100% para determinar el porcentaje en el grupo de ovocitos inyectados.

Se utilizó el programa Origin 7.0 (OriginLab Corporation) para el análisis estadístico de los resultados. Estos se expresaron como promedio \pm S.E.M (error estándar del promedio). A los distintos datos se les aplicó un test de análisis de varianza (ANOVA) de una vía más Bonferroni, previo test de Shapiro-Wilk y se consideraron significativos aquellos datos cuyo valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Demostración de la incorporación funcional de corrientes exógenas provenientes de membrana basal purificada de sinciotrofoblasto a ovocitos de *Xenopus laevis*.

Se inyectó un total de 362 ovocitos con MB, provenientes de 6 placentas normales independientes, los ovocitos provinieron de 15 donadoras. De estos 362 ovocitos 309 sobrevivieron 24 horas después de su inyección (85%). Tomando estos 309 como un nuevo total, 229 (74%) cumplieron con los criterios morfológicos y funcionales de inclusión descritos en materiales y métodos, siendo entonces sometidos a registros de corrientes totales por la técnica de *Voltage clamp*. Paralelamente se obtuvo un total de 143 ovocitos controles provenientes de las mismas 15 donadoras. De este total 63 ovocitos se utilizaron para registro (44%). Finalmente, de este número de ovocitos 45 resultaron aptos para su registro (71%).

Posteriormente, utilizando el criterio funcional de análisis para evaluar la incorporación de MB, en donde los ovocitos inyectados debían presentar una intensidad de corriente al menos 60% mayor a la registrada en el promedio de ovocitos controles a +40 mV, pertenecientes a la misma donadora; un 35% de la población de ovocitos inyectados con MB, presentó una corriente total superior a los controles, lo que evidencia una corriente exógena, en solución Ringer Normal. Un 65% de ellos exhibió una magnitud de corriente igual o cercana a la del grupo control de ovocitos sin inyectar (similar a sus corrientes endógenas). El grupo que presentó una corriente exógena fue el que se analizó en este trabajo (figura 7).

Los ovocitos que presentaron corrientes exógenas mostraron un potencial de membrana distinto (V_m) a los ovocitos controles. En promedio, el V_m obtenido para los ovocitos inyectados fue de $-24,1 \text{ mV} \pm 0.86 \text{ mV}$ ($n= 59$; 15 donadoras, 6 placentas independientes) en comparación a la población de ovocitos controles con un V_m promedio de $-48.8 \text{ mV} \pm 1.9 \text{ mV}$ ($n=43$ ovocitos; 15 donadoras) (ANOVA-test < 0.05).

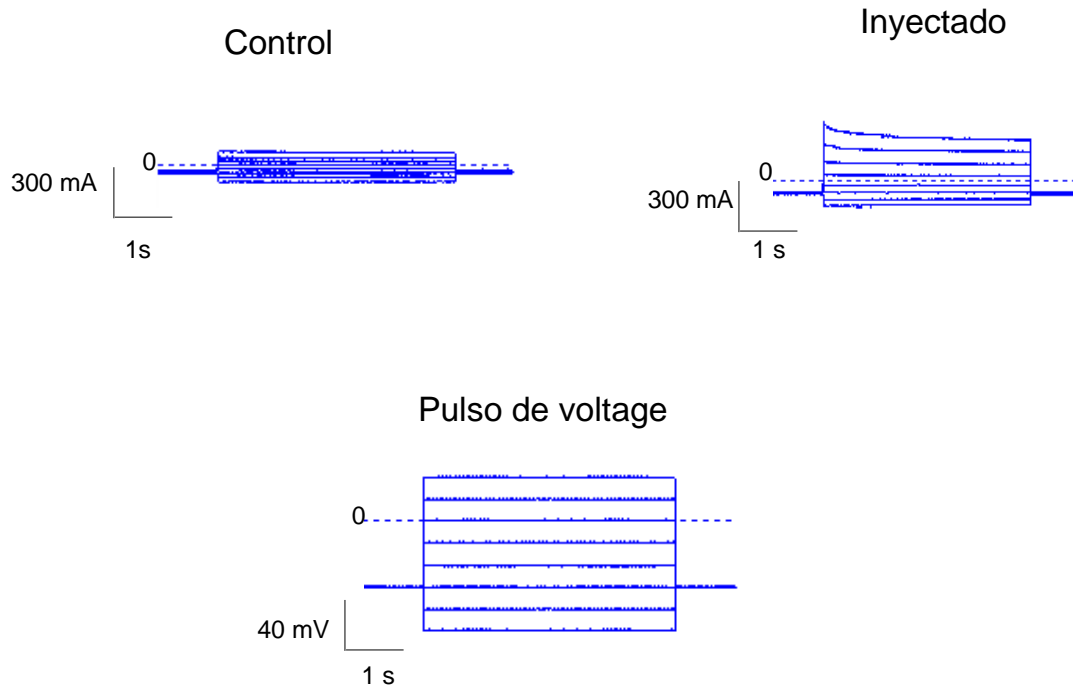


Figura 7. Respuesta en corriente de ovocitos controles e inyectados frente a un mismo estímulo de pulsos de potencial (V_m) desde -100 hasta +40mV y con un potencial de mantención (V_h) de -60 mV. La línea punteada representa 0 mV. La parte superior muestra la respuesta en intensidad de corriente (I_m) de los ovocitos. Se puede observar que la magnitud de la corriente generada por el ovocito inyectado con MB es mayor a la del ovocito control.

Este V_m es un valor medido directamente a través del equipo de registros y puede ser comparado con un valor experimental obtenido de la curva de corriente versus potencial de membrana (curva I/V). El punto calculado en que la corriente de esta curva es igual a 0 se llama potencial de inversión (V_{rev} ; potencial en el cual la membrana tiene una corriente neta igual cero, por lo tanto el flujo total de cargas a través de ella es nulo).

El V_{rev} en estos ovocitos presentó un desplazamiento hacia potenciales más despolarizantes en comparación con sus respectivos ovocitos controles (Figura 8). Este resultado es consecuente con los V_m obtenidos anteriormente, siendo por lo tanto un indicador de la calidad de los registros obtenidos.

Además para la construcción de la figura 8 y los posteriores análisis, se normalizó la corriente de cada ovocito inyectado con MB respecto a la corriente presentada por el promedio de los ovocitos controles a +40mV (considerándose este valor como el 100%), esto con el fin de lograr que las respuestas de corriente de los ovocitos fuesen comparables entre distintas donadoras.

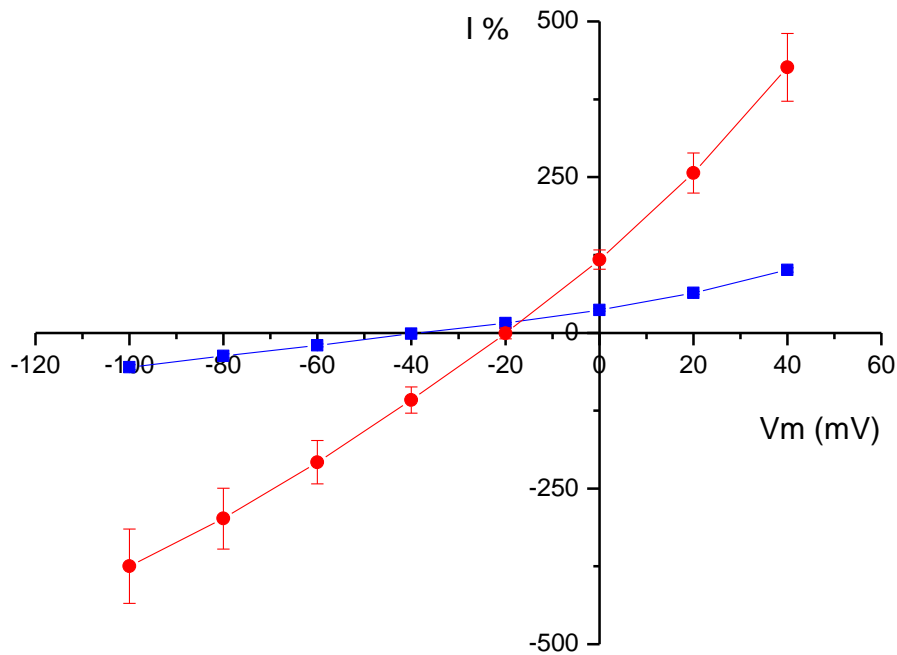


Figura 8. Curva I/V intensidad de corriente de ovocitos inyectados normalizada según la corriente del promedio de los ovocitos controles de la misma donadora a +40 mV ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40}$), al someter a pulsos de potencial desde -100 a 40mV con intervalos de 20mV (Vh-60mV) en solución Ringer Normal (RN), a ovocitos inyectados con MB (●, n=46) de 6 placentas independientes y ovocitos controles (■, n=37) pertenecientes a 15 donadoras. Se observa además que existe un desplazamiento estadísticamente significativo (ANOVA-test < 0.05) del potencial de inversión (Vrev) en promedio desde -39,1 mV ± 1,7 mV en ovocitos controles hacia un potencial más despolarizante de -23,3 mV ± 0,89 mV en promedio para ovocitos inyectados con MB presentando un ΔV_{rev} de 15,1 mV. Resulta importante notar que el Vrev de los ovocitos inyectados con MB es cercano al potencial de inversión teórico para el ión Cl⁻ (-26,2 mV).

Cuantificación de la conductancia total de la corriente proveniente de MB trasplantada en ovocitos de Xenopus.

Para el análisis de las corrientes proveniente de canales, podemos definir la conductancia (g) como el inverso de la resistencia, es decir $g=I/V$. La conductancia de cuerda es una medida de la corriente total que fluye a través de la membrana un potencial determinado.

$$g = I / (V - V_{rev})$$

Siendo en la fórmula (I) la corriente obtenida a un valor de potencial dado, (V) el potencial previamente elegido y (V_{rev}) el potencial de inversión. el resultado se expresa en Siemens (S).

En el caso de los ovocitos en estudio, se calculó la conductancia de cuerda a potenciales de -80 mV siendo esta de $1,5 \pm 0,2\mu S$ para ovocitos controles y de $5,5 \pm 0,7\mu S$ para ovocitos inyectados. A un potencial de 40 mV, los ovocitos controles presentaron una conductancia de cuerda de $2,3 \pm 0,2\mu S$ y los inyectados de $8,2 \pm 0,6\mu S$. Este aumento de la corriente en ovocitos inyectados da cuenta nuevamente de la incorporación funcional de una corriente exógena en ovocitos trasplantados con MB.

Distribucion de los ovocitos inyectados con MB según su respuesta en intensidad de corriente

En el proceso de análisis de los datos obtenidos, se identificaron distintas magnitudes de respuesta en intensidad de corriente, luego de la normalización antes descrita ($I=I*100/I_{\text{control } +40\text{mV}}$), de los ovocitos inyectados con MB. Estas variaciones de magnitud fueron independientes de la donadora que provenían, es decir, a partir de una misma donadora se podían obtener ovocitos con distintas magnitudes de corriente.

Se agrupó entonces a los ovocitos inyectados según su magnitud de corriente y conductancia:

- Ovocitos de baja conductancia, grupo que lo constituyeron ovocitos cuyas conductancias de cuerda promedio fueron 2,8 μS a -80 mV y 4 μS a +40 mV, y cuyas magnitudes de corriente fueron de entre 101 y 500% la corriente de los controles a +40mV.
- Ovocitos de mediana conductancia, grupo formado por ovocitos con conductancias promedio de 9,9 μS a -80 mV y 12,6 μS a +40 mV, cuyas magnitudes de corriente correspondieron a 501 y 1000% de la corriente de los ovocitos controles a +40mV.
- Ovocitos de alta conductancia, grupo formado por ovocitos con conductancias de 18,1 μS a -80 mV y 21,1 μS a +40 mV y con respuestas de corrientes entre 1001 y 1500% de la corriente de los ovocitos controles a +40mV.

La figura 9 muestra las distintas respuestas en corrientes de los diferentes grupos de ovocitos inyectados con BM comparándolos contra los controles. Las intensidades de corrientes fueron generadas en respuesta a pulsos de potencial desde -100 a +40 mV ($V_h = -60$ mV).

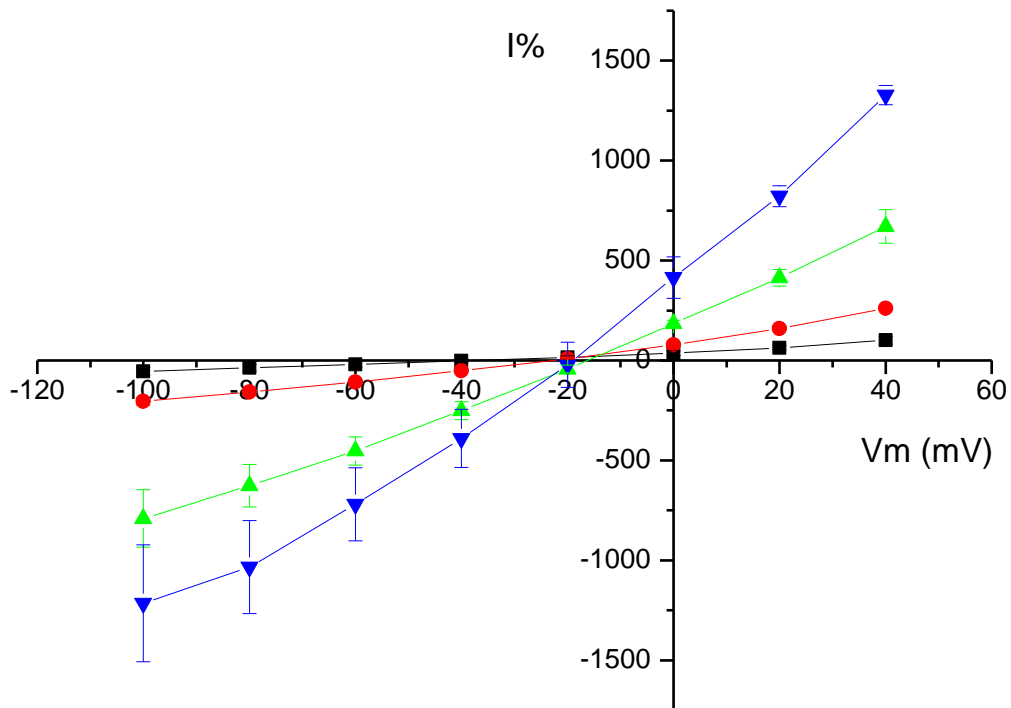


Figura 9. Curvas I/V para los diferentes grupos de ovocitos controles e inyectados con MB ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control} +40 \text{ mV}}$). Se aprecian las diferencias en los potenciales de inversión para cada uno de estos grupos, los que fueron: $-39,1 \pm 1,75 \text{ mV}$ para ovocitos controles (■ n= 37; 15 donadoras), $-24 \pm 0,8 \text{ mV}$ para el grupo ovocitos de baja conductancia (● n= 46; 15 donadoras), $-17 \pm 1,7 \text{ mV}$ para ovocitos de mediana conductancia (▲ n=5; 3 donadoras), $-23 \pm 8.04 \text{ mV}$ para ovocitos de alta conductancia (▼ n=3; 2 donadoras).

En los análisis anteriores se aprecian las diferencias en las características de los diferentes grupos de ovocitos, pero resulta interesante analizar también la cantidad de ovocitos obtenidos dentro de los distintos grupos. La figura 10 muestra los distintos grupos de ovocitos inyectados según su conductancia y su frecuencia de aparición entre el total de ovocitos inyectados:

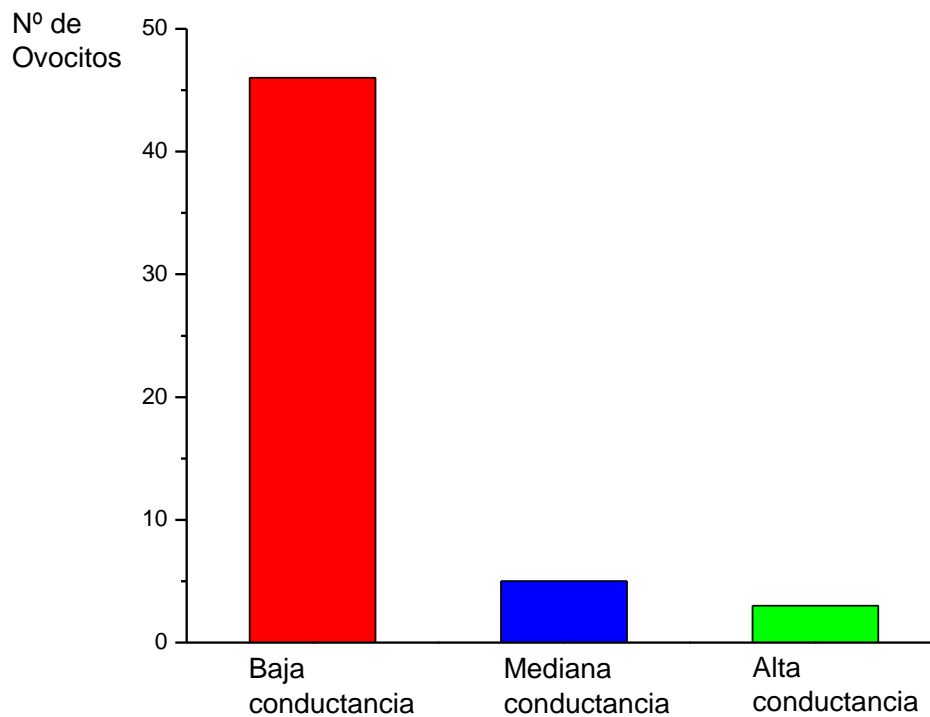


Figura 10. Número de ovocitos inyectados obtenidos por cada grupo de conductancia.

Con estos datos se aprecia la alta frecuencia presentada por los ovocitos inyectados de baja conductancia, esto justificó la decisión de trabajar únicamente con este grupo en los posteriores análisis.

La figura 11 muestra entonces solo el grupo de baja conductancia comparado con los ovocitos controles. Esto representa el patrón típico de la población de corrientes totales de los ovocitos inyectados con MB.

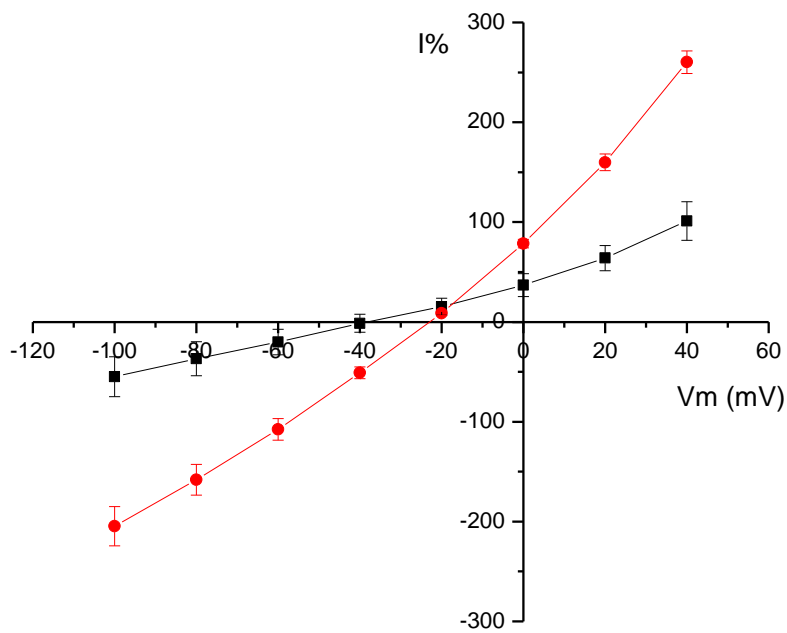


Figura 11. Curva I/V ovocitos controles (■) vs inyectados con MB de baja conductancia (●), estas corrientes ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40 \text{ mV}}$) fueron obtenidas al someter a pulsos de potencial desde -100 a +40mV con intervalos de 20mV ($V_h = -60\text{mV}$) en solución Ringer Normal (RN). Los ovocitos inyectados fueron significativamente diferentes de los inyectados (ANOVA-test $p < 0.05$).

Análisis de las corrientes exógenas provenientes del trasplante de MB a ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los análisis anteriores muestran un aumento en las corrientes totales de los ovocitos al ser inyectados con MB. Este aumento de corriente es debido a la incorporación funcional de MB en la membrana celular propia del ovocito, con sus respectivas características conductoras.

Es así como la corriente total de un ovocito inyectado estará compuesta de dos corrientes principales: la corriente endógena que es la corriente típica que presenta un ovocito de *Xenopus laevis* y la corriente exógena que es la porción nueva de corriente extra manifestada por el ovocito, explicada por la incorporación de MB en su membrana celular.

Para entender cuales son los iones que sustentan este aumento de la corriente en los ovocitos inyectados, previamente se debe conocer cuales son las corrientes endógenas presentes en el ovocito de *Xenopus laevis*, y así posteriormente poder hacer el análisis de la identificación de la corriente exógena trasplantada con MB.

Los ovocitos a nivel endógeno presentan distintos tipos de conductancias en su membrana plasmática principalmente para Na^+ , K^+ y Cl^- (Weber, 1999). Teniendo esto presente, se considera que la corriente exógena trasplantada en el ovocito la que es de naturaleza desconocida, será la contribución de los principales iones intra y extra celulares. Con lo que:

$$I_T = I_{\text{K}^+} + I_{\text{Cl}^-} + I_{\text{Na}^+}$$

Donde la corriente total (I_T) será la sumatoria de las corrientes de potasio (I_{K^+}), cloruro (I_{Cl^-}) y sodio (I_{Na^+}) respectivamente.

Las corrientes macroscópicas registradas en el ovocito, representan la suma de los flujos iónicos a través de numerosos canales, generalmente más de un tipo. Por convención, una corriente es de entrada cuando un ión positivo

(Na⁺ y K⁺) se mueve desde el exterior al interior de la célula (corriente negativa) y una corriente de salida es el movimiento inverso (corriente positiva). Si el ión es negativo (Cl⁻), una corriente es de salida cuando el ión se mueve desde el interior hacia el exterior (corriente negativa); si lo hace en sentido inverso, se conoce como corriente de entrada (corriente positiva) (Kandel *et al.*, 1997).

El primer paso en la interpretación de estas corrientes será su separación en los componentes que la conforman, cada uno asociado a un tipo particular de canal iónico.

Reemplazo iónico del sodio en la solución de registro.

Con el fin de comenzar a diseccionar la corriente total exógena de los ovocitos inyectados con MB, se recurrió a hacer un reemplazo iónico en la solución de registro Ringer Normal (tabla 1), cambiando el ión Na^+ (abundante en esta solución) por N-metil-D-glucamina (NMDG^+), un catión impermeable de gran tamaño.

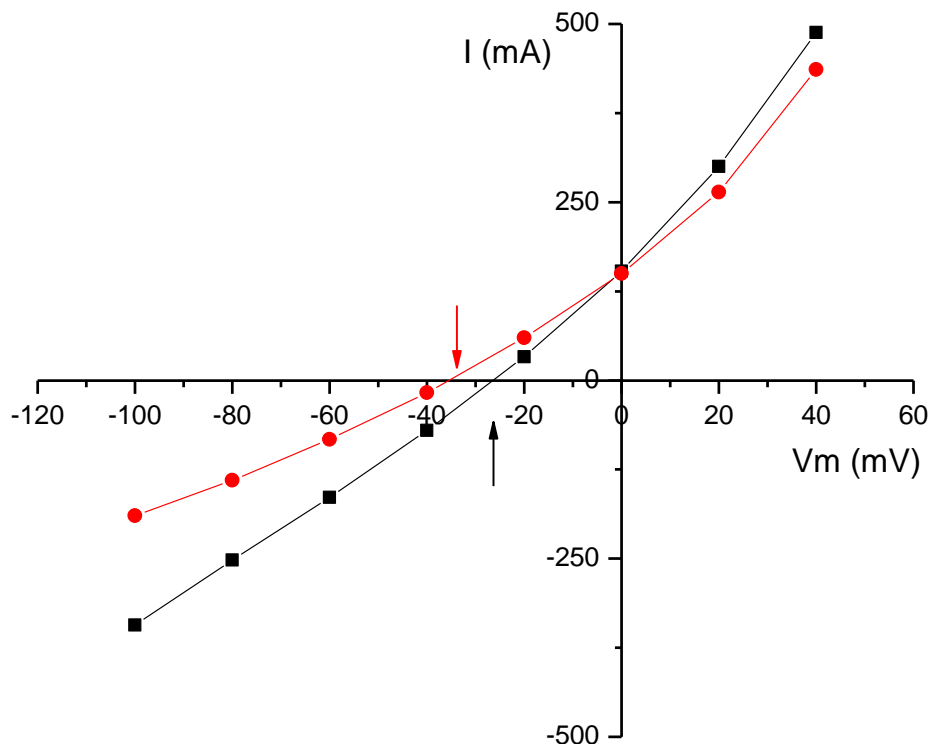


Figura 12. Curva I/V con el reemplazo iónico del Na^+ en la solución Ringer Normal (■) por NMDG^+ (●), en un ovocito inyectado con MB representativo aplicando en cada caso un estímulo de pulsos de potencial desde -100 mV a +40 mV con intervalos de 20 mV ($V_h = -60$ mV).

La figura 12 muestra corrimiento en el V_{rev} hacia potenciales hiperpolarizantes, este corrimiento en presencia de una solución en la cual se removió el Na^+ , estaría indicando un cambio en la permeabilidad relativa de la membrana en los ovocitos trasplantados que presentan corrientes exógenas.

Al efectuar el reemplazo del cation Na^+ a nivel de población de ovocitos la tendencia fue la misma, el V_{rev} de los ovocitos controles cambio desde $-39,1 \pm 1,75$ mV hasta $-44 \pm 2,98$ (n= 24; 12 donadoras, 6 placentas), obteniéndose un ΔV_{rev} de $-4,9$ mV estadísticamente no significativo, este resultado es concordante con Ivorra *et al.*, 2002.

Las conductancias de cuerda en solución Ringer-NMDG⁺ para ovocitos controles, a -80 mV de potencial fueron de $1,5 \pm 0,1 \mu S$ y de $2,4 \pm 0,2 \mu S$ a los $+40$ mV. Al comparar cada una de estas conductancias con las obtenidas en Ringer Normal las diferencias no fueron estadísticamente significativas (ANOVA-test $p < 0,05$). Estos resultados nos indican que a nivel endógeno, la presencia de conductancias para Na^+ posee poca relevancia dentro del total de conductancias que el ovocito posee (Figura 13).

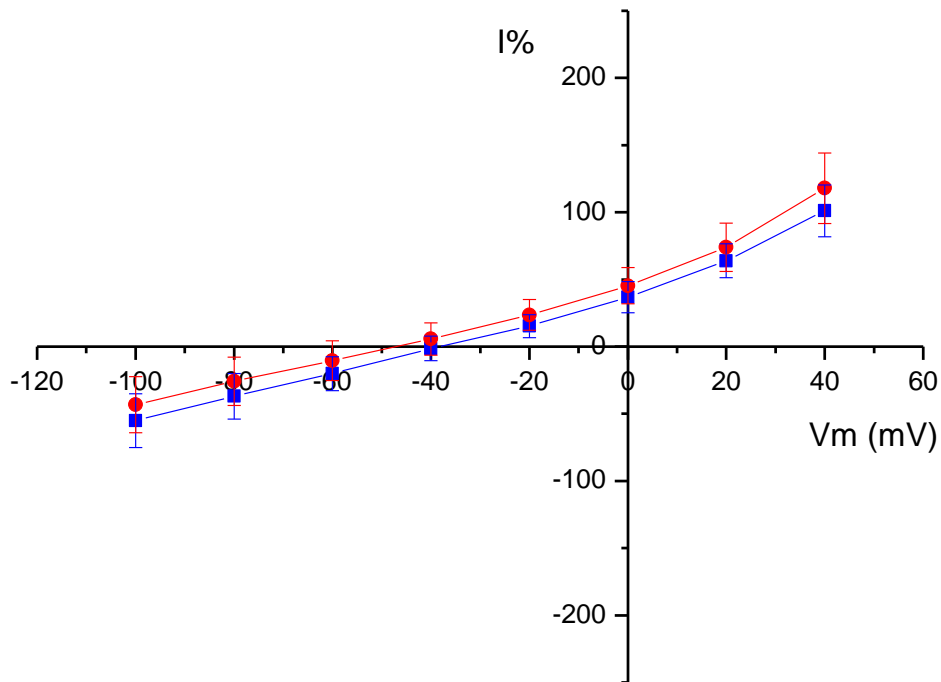


Figura 13. Curva I/V con las respuestas en intensidad de corriente ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40 \text{ mV}}$) al aplicar un protocolo de pulso de -100 a +40 mV en intervalos de 20 mV ($V_h = -60$), en ovocitos controles en soluciones RN (■) y NMDG-Cl (●).

Por otra parte, el potencial de inversión promedio en ovocitos inyectados con MB al efectuar la remoción del Na^+ de la solución de baño, se trasladó desde $-24 \pm 0,88 \text{ mV}$ hasta $-32,3 \pm 1,2 \text{ mV}$ ($n=27$; 12 donadoras) con un ΔV_{rev} de $-8,3 \text{ mV}$ siendo este desplazamiento estadísticamente significativo (ANOVA-test $p < 0,05$) (Figura 14).

En cuanto a las conductancias de cuerda de los ovocitos inyectados con MB en Ringer NMDG-Cl, estas fueron de $4,1 \pm 0,5 \mu\text{S}$ a -80 mV y de $6,4 \pm 0,7 \mu\text{S}$ a $+40 \text{ mV}$. Estas conductancias de cuerda no fueron estadísticamente diferentes de las conductancias mostradas en RN (ANOVA-test $p < 0,05$). Sin embargo la tendencia de las corrientes mostradas por la figura 14 es que la corriente de entrada disminuye debido a la remoción del Na^+ .

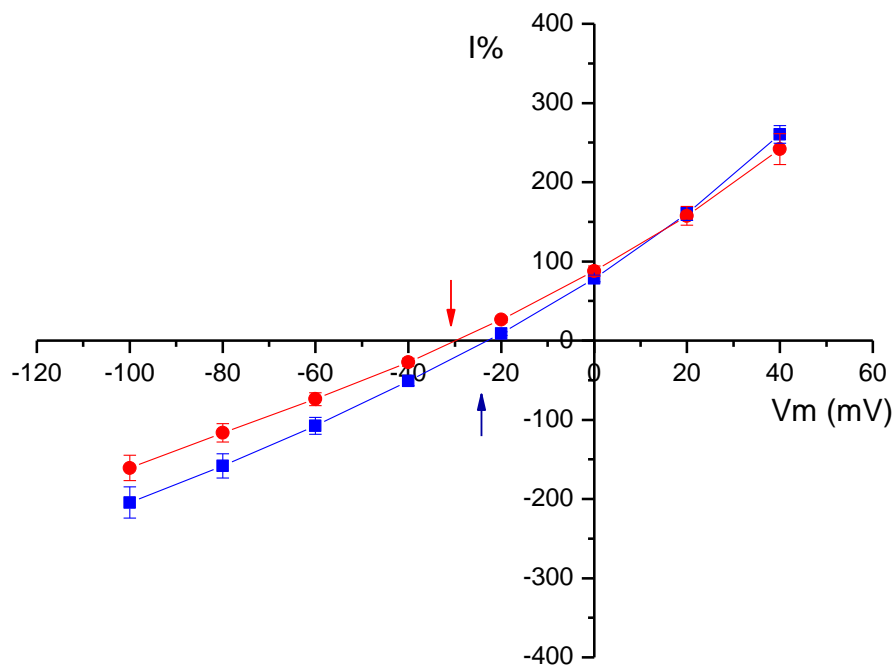


Figura 14. Curva I/V con las respuestas en intensidad de corriente ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control}+40\text{mV}}$) al aplicar un pulso de -100 a +40 mV en intervalos de 20 mV ($V_h = -60\text{mV}$), en ovocitos inyectados con MB en solución RN (■) y NMDG-CI (●).

Como se puede apreciar estas corrientes de Na^+ están presente en los ovocitos inyectados, aunque no son una componente muy grande en las corrientes totales mostradas por los ovocitos inyectados con MB, los experimentos posteriores se realizaron a partir de la solución NMDG-CI (libre de Na^+), para reducir la contaminación con estas corrientes.

Permeabilidad a distintos aniones de MB trasplantada a ovocitos de *Xenopus laevis*.

Con el fin de determinar cuál(es) aniones eran más permeables a la MB, es decir la atraviesan con mayor facilidad, se realizaron experimentos de reemplazo aniónico del Cl⁻, cambiando secuencialmente los aniones en el baño (tabla 1). Primero se les aplicó a los ovocitos un protocolo de rampa desde -100 a +40 mV (Vh= -60 mV) en solución Ringer Normal (abundante en NaCl) y luego se les aplicó el mismo protocolo en soluciones experimentales Ringer NaI, Ringer NaBr y finalmente en Ringer NaGluconato. De esta manera se mantuvo constante la concentración catiónica, teniendo como única variable la concentración aniónica.

La permeabilidad relativa puede ser determinada cuando el medio intracelular no es controlado pero es constante, como es el caso de los ovocitos. Para hacer esto, el Vrev de los canales en estudio debe ser medido dos veces: la primera vez solo con el Ion X en la solución externa (VrevX) y luego sólo con el Ion experimental Y en la solución externa (VrevY). Bajo estas condiciones, la permeabilidad relativa puede ser obtenida de la diferencia entre estas dos mediciones. La siguiente ecuación explica la manera de calcular estas permeabilidades relativas:

$$P_Y/P_X = ([Y]_{ext}/[X]_{ext}) \exp[zF(VrevY - VrevX)/ RT]$$

Donde P_X es la permeabilidad relativa para el Ion X (en este caso Cl⁻), P_Y es la permeabilidad relativa para el Ion experimental o ión Y, [X]_{ext} e [Y]_{ext} representan las concentraciones externas de los iones respectivos, z la valencia del ion, F la constante de Faraday, es decir 96500 C/mol, (VrevX – VrevY) corresponde al ΔVrev, R= 1.98 cal /°K mol constante de disociación de los gases y finalmente T es la temperatura absoluta (°K).

La figura 15 muestra el registro de un ovocito inyectado con MB representativo, en cada situación se compara la solución Ringer normal (RN) con la solución experimental a analizar.

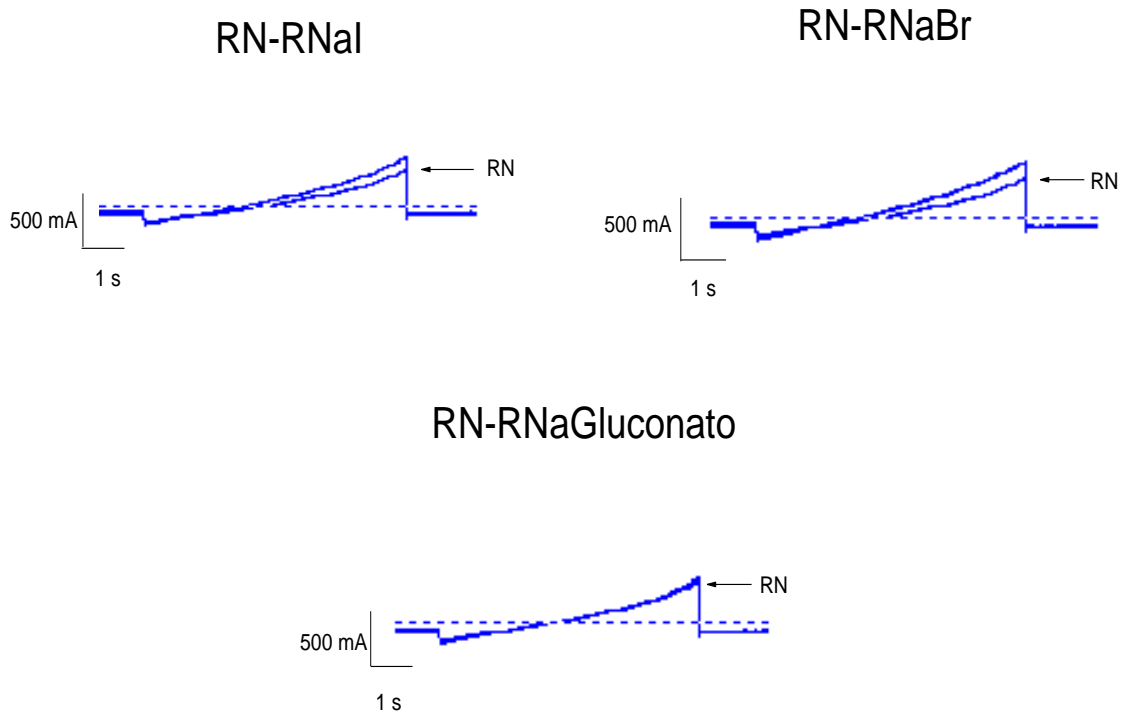


Figura 15. Registros representativos del comportamiento de un ovocito en diferentes soluciones de reemplazo aniónico. Resultados obtenidos al aplicar un protocolo de rampa -100 a $+40$ mV, durante 10 segundos ($V_h - 60$ mV). Todos los registros son comparados con un registro en RN (indicado por una flecha).

Los ΔV_{rev} para las distintas soluciones experimentales fueron: $-9,1 \pm 4,7$ mV al cambiar el Cl^- por I^- , $-8,7 \pm 4,2$ mV al reemplazar el Cl^- por Br^- y $0,9 \pm 2,8$ mV al cambiar Cl^- por $Gluconato^-$ ($n=12$ ovocitos, 3 donadoras, 3 placentas).

Con estos datos y sabiendo la concentración externa de los iones (descrita en materiales y métodos), las permeabilidades relativas para los distintos aniones fueron: $P_{I^-} = 0,59 P_{Cl^-}$; $P_{Br^-} = 0,59 P_{Cl^-}$; $P_{Gluconato^-} = 0,86 P_{Cl^-}$. En resumen la secuencia de permeabilidades resultante es: $Cl^- > Gluc^- > Br^- \sim I^-$.

Efecto de bloqueadores farmacológicos sobre las corrientes totales de ovocitos trasplantados con MB

Los datos analizados anteriormente dan a entender que las corrientes exógenas manifestadas por los ovocitos inyectados con MB son mayoritariamente corrientes de Cl^- , ya que al remover el Na^+ las corrientes remanentes aún eran de alta magnitud.

Con el fin de comprobar que las corrientes exógenas presentadas por los ovocitos al inyectar MB son mayoritariamente corrientes provenientes de canales iónicos de Cl^- , se aplicaron dos conocidos bloqueadores de canales de Cl^- , DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico) y DPC (ácido difenilamina-2-carboxílico), en ovocitos inyectados con MB y en controles sin inyectar.

Efecto DIDS

Para medir el efecto de DIDS sobre las corrientes exógenas de los ovocitos trasplantados con MB se utilizaron protocolos de rampa desde -100 a +40 mV ($V_h = -60$ mV). Los ovocitos fueron registrados en RN, luego en RNMDG-Cl con el fin de eliminar corrientes de Na^+ que pudiesen aportar a las corrientes totales. Finalmente sobre RNMDG-Cl se agregó el bloqueador DIDS, se dio un tiempo de 5 minutos de espera para que el bloqueador alcanzara su sitio de unión y se registró el cambio en las corrientes totales.

Se buscó la concentración con la que DIDS alcanzara su máximo efecto de bloqueo sobre las corrientes totales. Pequeñas cantidades de este inhibidor se fueron agregando en el baño repetidamente, aumentando así su concentración desde a 0.5 mM hasta llegar a (3mM figura 16). Finalmente se concluyó que la concentración mas adecuada era de 1 mM ($n=2$, 2 donadoras, 2 placentas independientes).

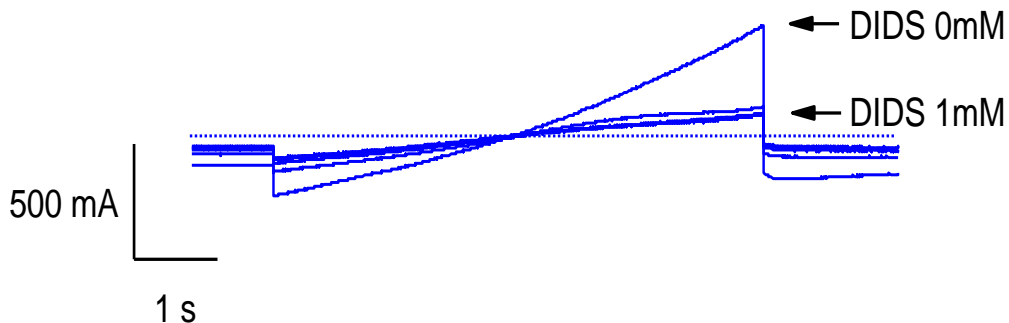


Figura 16. Rampa de potencial desde -100 mV hasta +40 mV, que muestra la respuesta en intensidad de corriente al ir agregando concentraciones crecientes de DIDS de un ovocito inyectado con MB. Cabe destacar que el registro con las corrientes más altas, tanto a potenciales negativos como positivos, corresponde al mismo ovocito en solución NMDG-Cl. Es así como en los registros siguientes se muestra una disminución en las corrientes totales.

La figura 17 muestra el efecto de las distintas concentraciones de DIDS sobre las corrientes de ovocitos inyectados con MB a potenciales de -90 y +30 mV, cada gráfico se obtuvo al aplicar una rampa de -100 a +40 mV:

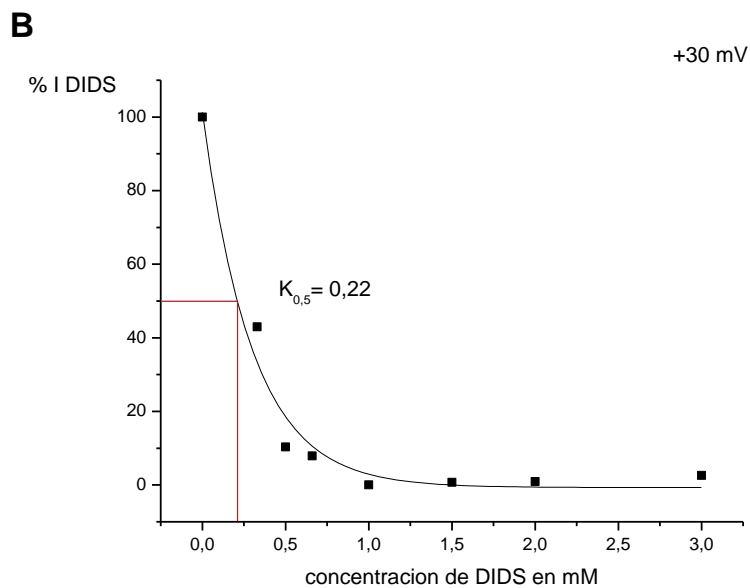
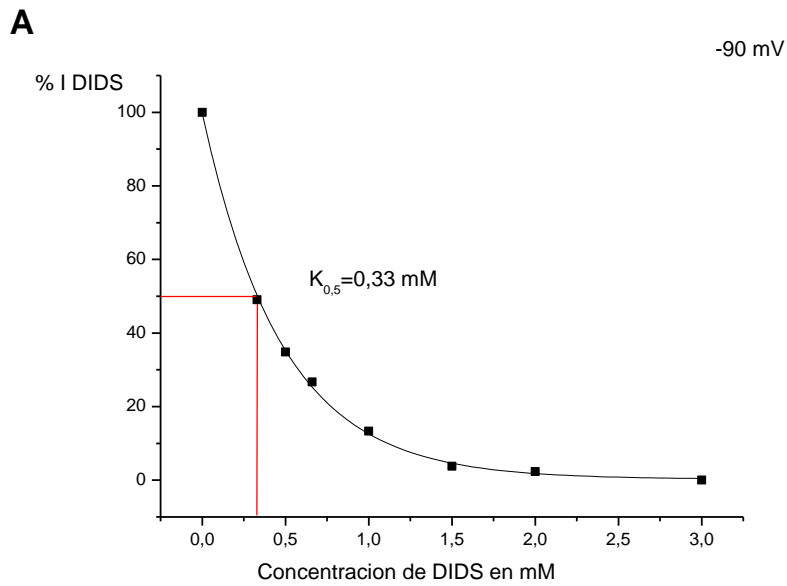


Figura 17. Efecto en ovocitos inyectados con MB de distintas concentraciones de DIDS al ir aumentando de forma progresiva, sobre el porcentaje de corriente normalizada por el efecto máximo logrado por dicho bloqueador. A representa el efecto a -90 mV y B el efecto logrado a +30 mV. El valor de $K_{0,5}$ menor a +30 mV demuestra que el efecto de DIDS es dependiente de potencial.

Los gráficos anteriores permiten determinar que con la concentración del bloqueador de 1mM ocurre gran parte del efecto bloqueador de DIDS a un potencial de -90 mV, mientras que al potencial de +30 mV DIDS 1mM alcanza su mayor efecto y al seguir aumentando la concentración del bloqueador la corriente no sigue decreciendo. De esta manera se decidió trabajar con esta concentración en los posteriores experimentos.

A continuación, se procedió a hacer el estudio poblacional con DIDS 1mM (n=9, 4 donadoras, 3 placentas independientes) utilizando siempre los protocolos de pulsos antes especificados. Posteriormente se analizó el efecto de bloqueo sobre las corrientes a potenciales negativos y positivos -90 y +30 mV respectivamente. Los mismos protocolos los fueron aplicados a Tanto en ovocitos controles (n= 8, 6 donadoras) como en ovocitos inyectados con el fin de cuantificar el bloqueo de DIDS sobre las corrientes endógenas (ovocito control) y así, cuantificar luego cuanto del bloqueo total sobre los ovocitos inyectados correspondió a un bloqueo de corrientes exógenas.

El bloqueo total promedio sobre las corrientes de los ovocitos inyectados con MB fue de 21,5% a -90 mV, mientras que a +30 mV fue de 31%. Este efecto bloqueo fue estadísticamente significativo al comparar el porcentaje de corriente restante contra el 100% de corriente representada por el promedio de la corriente mostrada por los ovocitos inyectados con MB en solución NMDG-Cl. Por otra parte al hacer esta misma comparación en la población de ovocitos controles no se vio diferencia significativa (ANOVA-test $p < 0,05$). La figura 18 muestra el efecto sobre las corrientes totales tanto en ovocitos inyectados como en ovocitos controles, a potenciales negativos y a potenciales positivos:

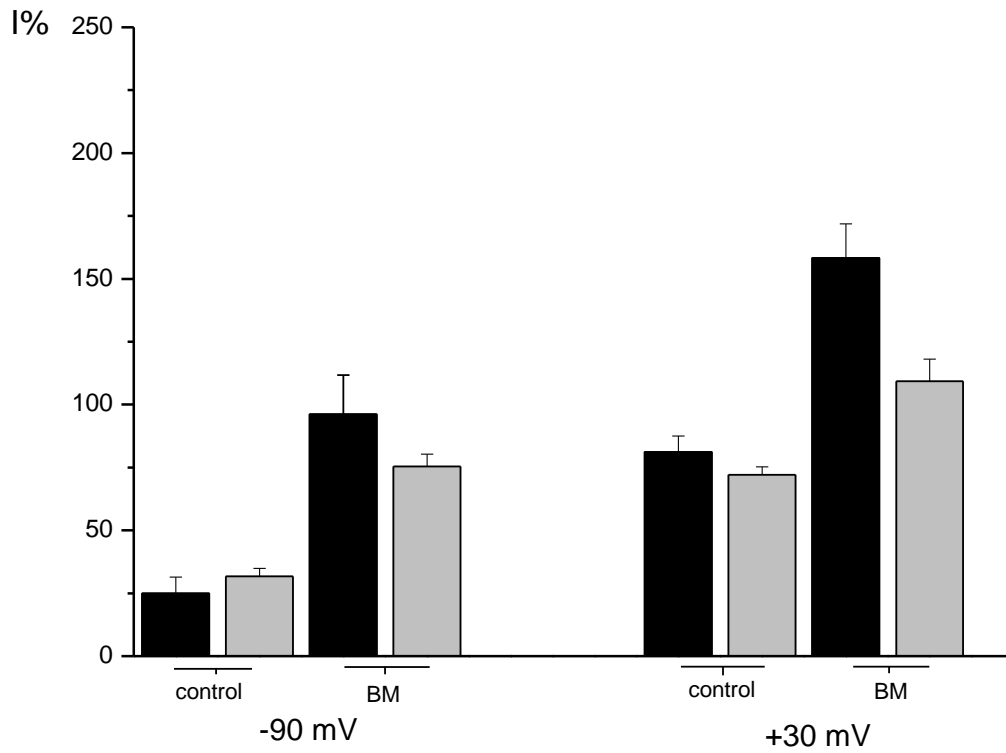


Figura 18. Efecto de DIDS 1mM (barras grises) sobre la corrientes ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40 \text{ mV}}$) de ovocitos controles e inyectados con MB, en solución NMDG-Cl (barras negras) a potenciales de -90 y +30 mV.

Efecto DPC

Continuando con el análisis para depurar las corrientes exógenas, se analizó el efecto de DPC otro conocido bloqueador de canales de Cl⁻. Este análisis fue realizado de la misma manera en que se analizó el efecto de DIDS.

El primer paso entonces, fue determinar la concentración adecuada de DPC a usar en los experimentos. Esta estimación se hizo probando la respuesta de intensidad de corriente de ovocitos inyectados con MB, al aplicarles el protocolo de rampa antes descrito, frente a diferentes concentraciones de DPC desde 0,2 mM hasta 0,8 mM (n=2, 2 donadoras, 2 placentas independientes). Gracias a esto se determinó que 0,6 mM era una concentración adecuada de DPC para trabajar experimentalmente (figura 19), esto porque a esta concentración el efecto del bloqueador era casi completo y tolerable por la membrana del ovocito.

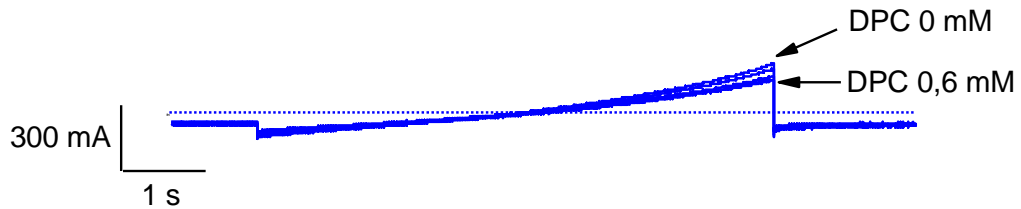


Figura 19. Rampa de potencial desde -100 mV hasta +40 mV, que muestra la respuesta en intensidad de corriente al agregar diferentes concentraciones de DPC de un ovocito inyectado con MB. Cabe destacar que el registro con las corrientes más altas, tanto a potenciales negativos como positivos, corresponde al mismo ovocito en solución NMDG-Cl. Es así como en los registros siguientes se muestra una disminución en las corrientes totales.

Al analizar las corrientes provenientes de estos ovocitos inyectados con MB sometidos a concentraciones crecientes de DPC se pueden construir los siguientes gráficos:

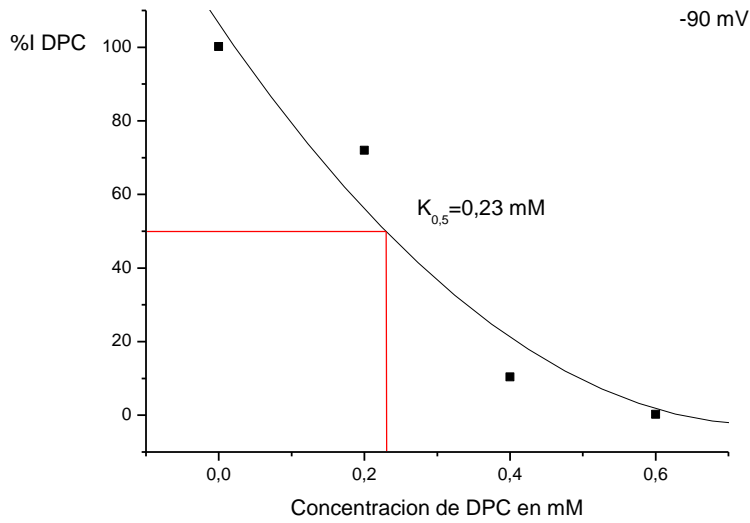
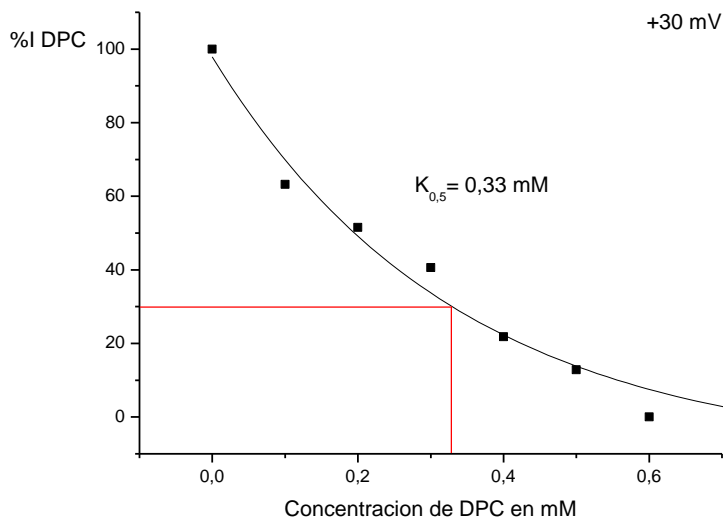
A**B**

Figura 20. Efecto en ovocitos inyectados con MB de distintas concentraciones de DPC al ir aumentando de forma progresiva, sobre el porcentaje de corriente normalizada por el efecto máximo logrado por dicho bloqueador. A representa el efecto a -90 mV y B el efecto logrado a +30 mV. Si bien el ajuste de la curva en A no es exacto, muestra una tendencia que permite decidir trabajar con DPC 0,6mM, sin embargo $K_{0,5}$ no resulta ser un parámetro comparable entre ambas curvas.

A partir del grafico anterior, se puede deducir que con una concentración de 0,6 mM se obtiene el mayor efecto de bloqueo a potenciales negativos y positivos. Se decidió entonces usar dicha concentración del bloqueador en los siguientes experimentos.

Se procedió entonces a hacer el experimento en una población de ovocitos, consistente en someter ovocitos inyectados con MB (n= 8 ovocitos, 4 donadoras, 3 placentas) y controles sin inyectar (n= 4, 3 donadoras) a 0,6mM. Se analizó el efecto de bloqueo sobre las corrientes a potenciales negativos y positivos -90 y +30 mV respectivamente. Con el fin de cuantificar el bloqueo de DPC sobre las corrientes endógenas del ovocito (control) y sobre las corrientes de los ovocitos inyectados con MB.

El bloqueo total promedio sobre las corrientes de los ovocitos inyectados con MB fue de 33,7% a -90 mV, mientras que a +30 mV fue de 38,5%. Este efecto bloqueo fue estadísticamente significativo al comparar el porcentaje de corriente restante contra el 100% de corriente representada por el promedio de la corriente mostrada por los ovocitos en solución Ringer NMDG-Cl, por otra parte al hacer este mismo análisis sobre los ovocitos controles la diferencia no fue significativa (ANOVA-test $p < 0,05$).

La figura 21 muestra el efecto sobre las corrientes totales tanto en ovocitos inyectados como en ovocitos controles, a potenciales negativos y a potenciales positivos:

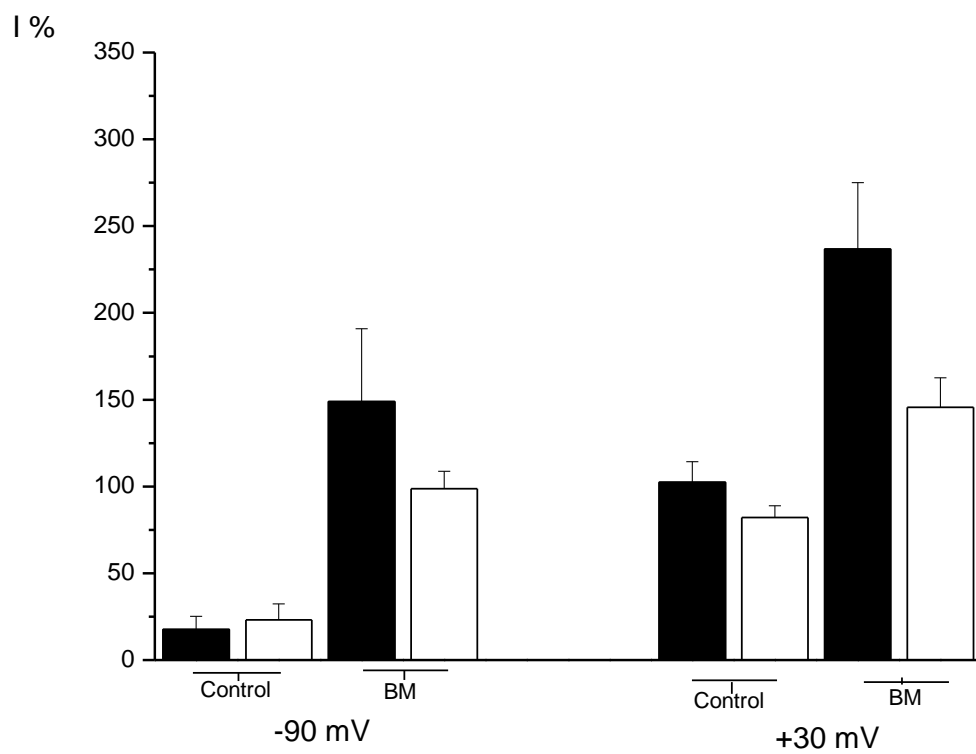


Figura 21. Efecto de DPC 0,6 mM (barras blancas) sobre la corrientes ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control} +40 \text{ mV}}$) de ovocitos controles e inyectados con MB, en solución RNMDG-CI (barras negras) a potenciales de -90 y +30 mV.

Efecto aditivo de DIDS y DPC.

Se analizó el efecto aditivo de DIDS y DPC sobre las corrientes totales tanto en ovocitos controles como en ovocitos inyectados con MB, para esto se uso el mismo protocolo de rampa utilizado anteriormente para el análisis de los efectos de los bloqueadores por separado.

En primer lugar se estudió el efecto sobre las corrientes de los ovocitos al agregar DIDS 1mM y a continuación DPC 0,6mM, el siguiente es el registro de un ovocito inyectado con MB representativo.

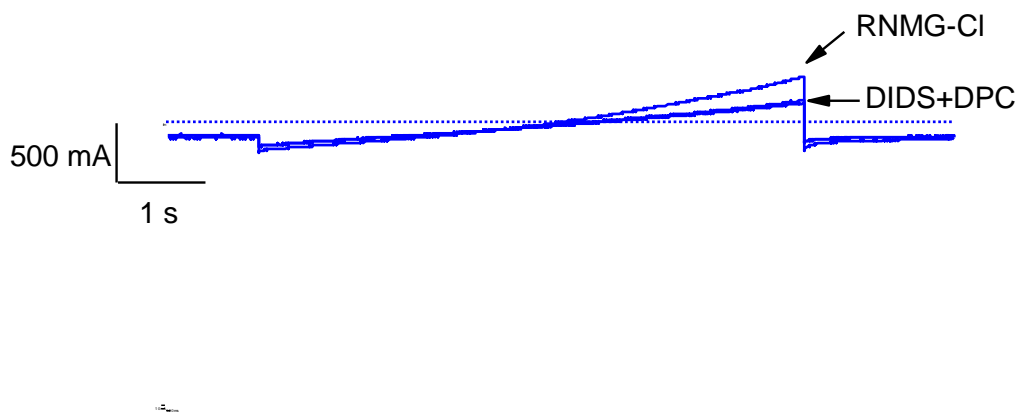


Figura 22. Registro de la respuesta en intensidad de corriente, al agregar DIDS 1mM y luego DPC 0,6 mM, de un ovocito inyectado con MB. Este registro fue obtenido al aplicar pulsos de rampa de potencial desde -100 mV hasta +40 mV en cada situación.

Este registro muestra un efecto de disminución de las corrientes totales al agregar los bloqueadores, la mayor disminución de la corriente mostrada por el ovocito se visualiza al agregar el primer bloqueador, en este caso DIDS 1mM.

Los siguientes experimentos fueron realizados en distintos ovocitos (n=6, 3 donadoras, 3 placentas independientes), cuyo bloqueo promedio a -90

mV fue de 25,9% y de 44,8% a +30 mV al agregar DIDS + DPC en el baño.

La figura 23 muestra el efecto bloqueador aditivo al agregar DIDS y luego DPC sobre las corrientes totales de los ovocitos inyectados con MB y controles:

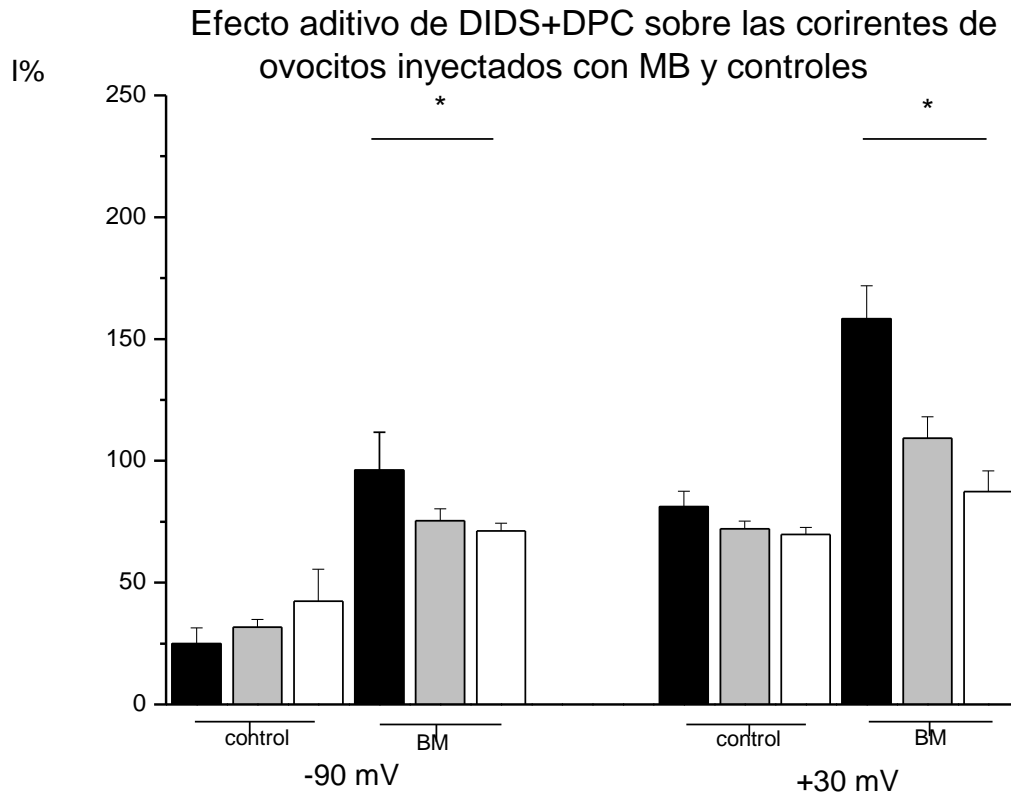


Figura 23. Efecto aditivo logrado sobre las corrientes ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40 \text{ mV}}$) de ovocitos controles e inyectados en solución RNMDG-CI (barras negras) al agregar DIDS 1 mM (barras grises) y luego DPC 0,6 mM (barras blancas), el efecto se aprecia a -90 mV y +30 mV. Ambas adiciones de bloqueadores demostraron ser significativamente diferente al compararla con la situación sin bloqueador en ovocitos inyectados con MB.

Se buscó también el efecto aditivo al agregar los bloqueadores en orden inverso, es decir, primero DPC 0,6 mM y luego DIDS 1mM. El siguiente es el registro de un ovocito inyectado con MB representativo sometido a estas situaciones.

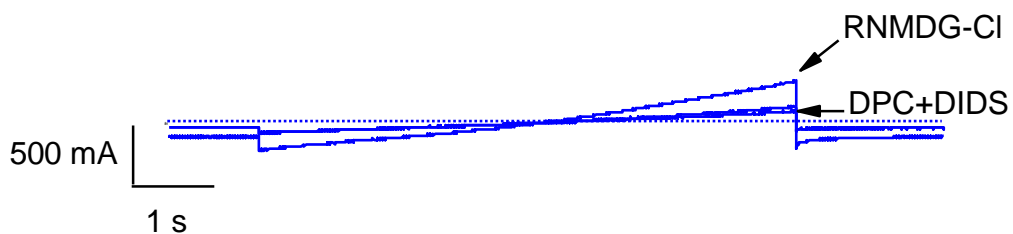


Figura 24. Registro de la respuesta en intensidad de corriente, al agregar DPC 0,6 mM y luego DIDS 1mM, de un ovocito inyectado con MB. Este registro fue obtenido al aplicar pulsos de rampa de potencial desde -100 mV hasta +40 mV en cada situación.

Estos experimentos para visualizar los efectos aditivos (n=6, 4 donadoras, 3 placentas), arrojaron un bloqueo promedio a -90 mV de 43,9% y de 55,1% a +30 mV. La siguiente figura muestra el efecto de bloqueo aditivo al agregar DPC 0,6 mM y DIDS 1 mM, sobre las corrientes totales de ovocitos inyectados con MB y controles.

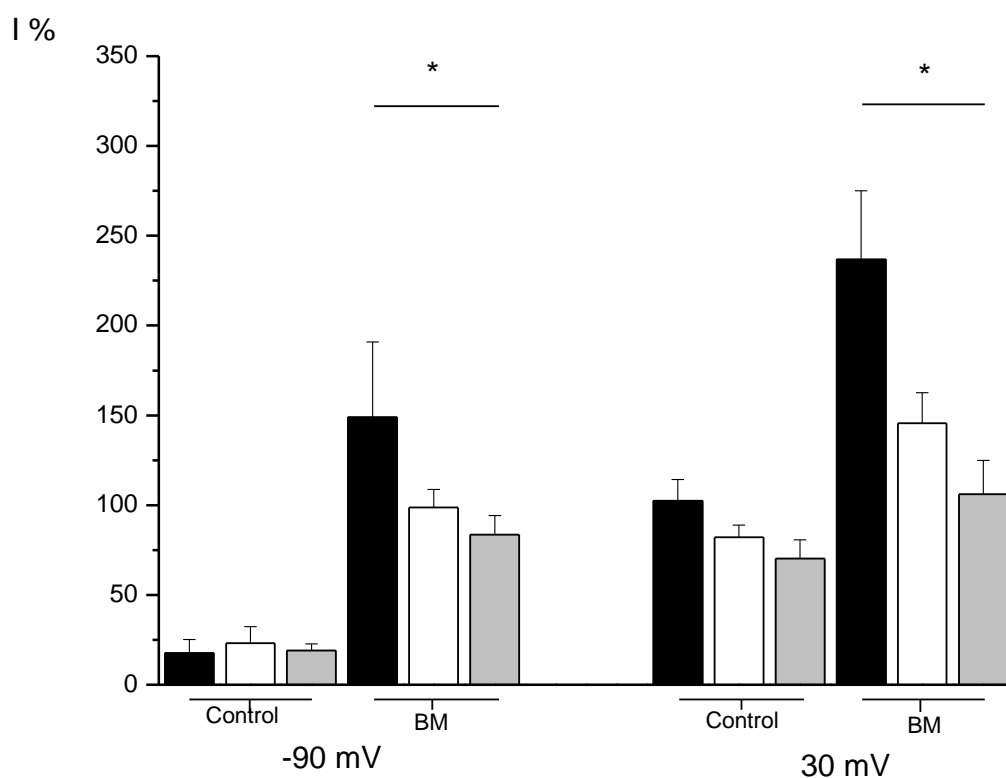


Figura 25. Efecto aditivo logrado sobre las corrientes ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +40 \text{ mV}}$) de ovocitos controles e inyectados en solución RNMDG-Cl (barras negras) al agregar DPC 0,6 mM (barras blanca) y luego DIDS 1 mM (barras gris), el efecto se aprecia a -90 mV y +30 mV. Ambas adiciones de bloqueadores demostraron ser significativamente diferente al compararla con la situación sin bloqueador en ovocitos inyectados con MB.

Análisis de corrientes exógenas obtenidas desde los ovocitos inyectados con MB

De manera de hacer mas demostrativo el efecto real de los bloqueadores farmacológicos sobre las corrientes de Cl^- de la MB, se calculó la cantidad de corriente total que correspondía a corriente exógena. Es decir las corrientes extras que se agregaron a las corrientes normales de un ovocito una vez que les fue transferida una porción de MB.

Estas corrientes exógenas fueron obtenidas al restar las corrientes endógenas (corrientes mostradas por los ovocitos controles) de las corrientes totales de los ovocitos inyectados con MB (normalizadas a +40 mV). Este calculo se realizó en cada situación respectiva, por ejemplo a la corriente total de los ovocitos inyectados en DIDS 1 mM se le restó la corriente de los ovocitos controles en dicha situación, esto fue hecho para potenciales negativos y positivos separadamente.

Los siguientes son los porcentajes de bloqueos logrados por los agentes farmacológicos sobre el total de las corrientes exógenas presentadas por el promedio de ovocitos inyectados con MB:

- El bloqueo de corrientes exógenas al agregar solo DIDS 1 mM fue de 38,6% mientras que a +30 mV el bloqueo fue de 51,8%.
- El efecto de DPC 0,6 mM sobre las corrientes exógenas a -90 mV fue de 42,5% mientras que a +30 mV el bloqueo fue de 52,8%.
- Luego el bloqueo de corrientes exógenas al agregar DIDS 1mM + DPC 0,6mM fue de 59,5% a -90 mV y a 77,3% a +30 mV.
- Al aplicar DPC 0,6mM y luego DIDS 1mM el bloqueo correspondió a 50,9% a -90 mV y a 73,3% a +30 mV.

Se construyeron a continuación gráficos que muestran el efecto de dichos bloqueadores sobre las corrientes exógenas mostradas por los ovocitos inyectados con MB (Figura 26),

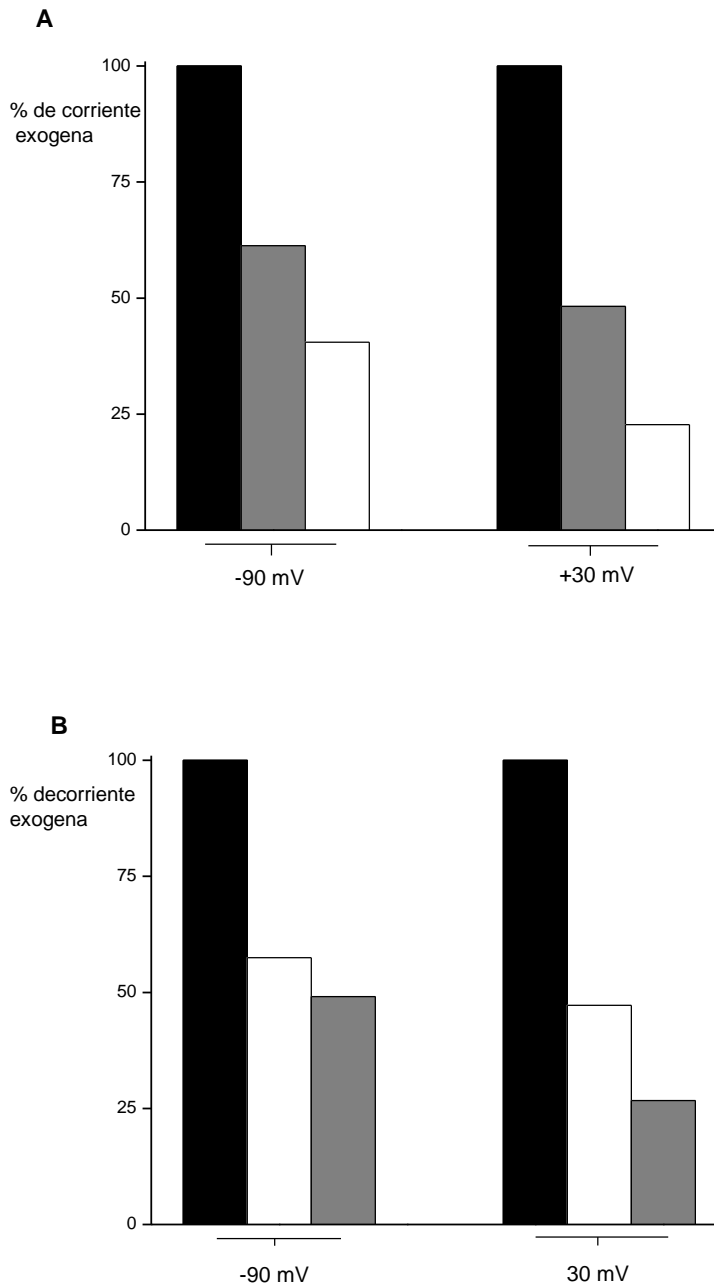


Figura 26. Efecto aditivo de DIDS y DPC sobre las corrientes exógenas de los ovocitos trasplantados con MB. A) efecto sobre el 100% de las corrientes exógenas (barras negras) de DIDS 1 mM (barras gris) y DIDS 1 mM + DPC 0,6 mM (barras blancas) a potenciales positivos y negativos. B) efecto sobre el 100% de las corrientes exógenas (barras negras) de DPC 0,6 mM (barras blancas) y DIDS + DPC (barras grises) a potenciales positivos y negativos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró la incorporación funcional de canales de cloruro en ovocitos de *Xenopus laevis* provenientes de membranas basales de placenta humana y la posterior caracterización de estas corrientes mediante el método de *Voltage clamp*. Las corrientes de cloruro identificadas fueron sensibles a DIDS y a DPC, selectivos a cloruro y otros aniones con una secuencia de permeabilidades: $\text{Cl}^- > \text{Gluc} > \text{Br}^- \sim \text{I}^-$. A continuación la discusión se ha organizado de modo de analizar cada uno de los temas involucrados.

Incorporación funcional de MB de sinciotrofoblasto placentario humano en ovocitos de *Xenopus laevis*.

Si bien la sobrevida fue en términos relativos, similar en los ovocitos controles al compararlos con los inyectados con MB, al aplicar los criterios funcionales y de inclusión de membranas exógenas, el porcentaje de sobrevida de ovocitos inyectados cae radicalmente. Este resultado es concordante con Ivorra (2002) en que el porcentaje de ovocitos que integraban funcionalmente la membrana inyectada era menor respecto a los ovocitos totales inyectados. La explicación más simple para este fenómeno sería el hecho de que al inyectar una membrana ajena al ovocito este es sometido a un alto grado de estrés.

En relación al potencial de membrana obtenido para ovocitos controles, este es muy similar al descrito en la literatura (Ivorra *et al.*, 2002). Sin embargo, este valor es diferente al mostrado por los ovocitos inyectados con MB, esto da cuenta de un cambio en la permeabilidad de la membrana plasmática del ovocito al trasplantar MB del sinciotrofoblasto placentario. Consecuente con esto, es que el potencial de potencial de inversión experimental se desplazó hacia potenciales más despolarizantes en comparación con el mostrado en ovocitos controles. Dando cuenta de la buena calidad de los registros obtenidos y de las nuevas propiedades adquiridas por la membrana celular de un ovocito inyectado, específicamente de un cambio en la permeabilidad relativa de la membrana plasmática por la incorporación de canales iónicos exógenos.

Durante el proceso de análisis de datos, mediante la normalización de las corrientes de ovocitos inyectados con MB respecto a las corrientes de los ovocitos controles provenientes de la misma donadora, se pudo agrupar las repuestas en intensidad de corriente de los ovocitos en diferentes intervalos. Estas diferencias, además, fueron independientes de la donadora, es decir en una misma donadora aparecían tanto ovocitos de baja conductancia como de alta conductancia o de conductancia intermedia. Se decidió entonces trabajar solamente con el grupo de baja conductancia debido a su mayor frecuencia de presentación.

Los ovocitos integrarían una cantidad variable de MB en su propia membrana celular, siendo además esta cantidad de MB variable en composición de canales iónicos. Aquí radica la explicación más probable a la aparición de estos ovocitos con conductancias superiores a las de la mayoría de los ovocitos inyectados con MB.

Trabajando ya sólo con el grupo de ovocitos de baja conductancia, al calcular las conductancias de cuerda tanto a potenciales negativos (-80 mV) como a potenciales positivos (+40 mV) se observó que a ambos tipos de potenciales la conductancia de los ovocitos inyectados era alrededor de 3 veces mayor que la de ovocitos controles, esto indicaría nuevamente un cambio en las propiedades de la membrana celular de los ovocitos inyectados.

Finalmente tomando en cuenta los cambios ocurridos en el potencial de membrana (potencial de inversión), comportamiento de los ovocitos ante los mismos estímulos de potencial y conductancias de cuerda de la membrana celular, se puede concluir que estos cambios serían debidos a la integración funcional de una nueva fracción de membrana celular a la membrana de un ovocito, demostrándose así la incorporación funcional de membrana basal de sinciotrofoblasto.

Efecto del reemplazo catiónico sobre las corrientes totales de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con MB

Al analizar los potenciales de inversión resultantes luego del reemplazo iónico de Na^+ en las soluciones, el único cambio significativo encontrado es el cambio presentado por los ovocitos inyectados con MB desde -24 mV hacia potenciales más hiperpolarizantes de -32,3 mV.

Para comprender el significado de estos valores se debe entender las corrientes totales mostradas por un ovocito como la sumatoria de las corrientes aniónicas principalmente de Cl^- y las corrientes catiónicas principalmente las de Na^+ y K^+ , siendo los potenciales de equilibrio (V_{eq}) teóricos para estos iones de: 57,9 mV para Na^+ , -26,2 mV para Cl^- y de -102,6 mV para K^+ . Estos V_{eq} son los valores calculados donde la corriente se hace 0 para la membrana del ovocito en presencia solo del ión indicado.

Los valores obtenidos reflejan entonces que en presencia de Na^+ en el baño (RN) el potencial de inversión es cercano al potencial de equilibrio teórico del Cl^- , mientras que al anular las corrientes de Na^+ , el potencial de inversión, un valor experimental, se desplaza hacia potenciales más hiperpolarizantes.

Esto indicaría que dentro de las corrientes totales presentadas por los ovocitos inyectados con MB habría un componente de corrientes de sodio, un componente de corrientes de K^+ que traslada el potencial de inversión en dirección al valor del potencial de equilibrio teórico del K^+ , no llegando a alcanzarlo, cuando las corrientes de sodio son removidas. Pero, el componente más importante dentro de estas corrientes totales, sería las corrientes de Cl^- ya que ambos valores de potenciales de inversión son relativamente cercanos al potencial de equilibrio teórico del Cl^- .

Al observar las corrientes totales restantes, una vez removido el sodio, a potenciales negativos las corrientes disminuyen en magnitud, aunque las diferencias no demostraron ser estadísticamente diferentes de las obtenidas bajo condiciones estándar (Ringer Normal). Sin embargo, este hecho es consecuente con el cambio de potencial al remover el sodio, esto reafirma el hecho de que hay conductancias de Na^+ dentro de las corrientes totales exógenas presentadas por los ovocitos inyectados con MB.

Permeabilidad de los canales de Cl⁻ de MB a diferentes aniones

Los experimentos realizados demuestran la permeabilidad de los canales de cloruro presentes en la MB de sinciotrofoblasto placentario humano a otros aniones, como I⁻, Br⁻, gluconato. Las permeabilidades calculadas fueron $P_{Cl} = 0,59 P_I$; $0,59 P_{Br}$; $0,86 P_{gluc}$. Esto significa que, tomando como ejemplo el caso del I⁻, durante el tiempo que demora 1 molécula de Cl⁻ en atravesar la MB, solamente 0,59 moléculas de I⁻ lo hacen. Se puede decir entonces que el Cl⁻ es más permeable que el I⁻ en la MB, es decir, la atraviesa de manera más eficiente.

De esta manera, se puede construir una secuencia de permeabilidades relativas para los diferentes aniones estudiados, la que sería: Cl⁻ > Gluc > Br⁻ ~ I⁻. Esta secuencia de permeabilidades revela la alta eficiencia de estos canales en el transporte aniónico específicamente en el transporte del ión Cl⁻.

Efecto de bloqueadores farmacológicos sobre las corrientes totales de ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados con MB

Efecto de DIDS

El probar el efecto del bloqueador DIDS en las corrientes totales a diferentes concentraciones permitió encontrar una concentración óptima de inhibición, esta concentración es de 1mM. Los gráficos de concentraciones versus porcentaje de bloqueo obtenido muestran claramente como al aumentar la concentración de DIDS se alcanza un *plateau* a partir de la concentración de 1mM, demostrando que su bloqueo es dosis dependiente. Esto además es consistente con los resultados de $K_{0,5}$ cuyo valor es mas bajo a potenciales positivos, lo que indica que el bloqueador es mas eficiente a estos potenciales.

El análisis específico del efecto de bloqueo de DIDS en las corrientes exógenas al aplicar DIDS 1 mM, fue de 38,6% a -90 mV y a +30 mV de 51,8%. Esto es una evidencia de que existen canales iónicos de Cl^- sensibles a DIDS en la MB del sinciotrofoblasto, además indica que el efecto de dicho bloqueador seria mayor sobre corrientes de entrada de Cl^- , es decir a potenciales positivos.

Efecto DPC

Análogamente al análisis anterior, el efecto de DPC fue probado a diferentes concentraciones en la solución de baño, siendo seleccionada la concentración de 0,6 mM la que mostró tener un máximo efecto bloqueo sin producir un efecto perjudicial para el registro del ovocito.

El efecto logrado al utilizar este bloqueador de canales de Cl^- sobre las corrientes exógenas fue de 42,5% a -90 mV y a +30 mV el bloqueo fue de 52,8%. Esto demuestra la existencia de canales para Cl^- sensibles a DPC, los cuales además tendrían una mayor actividad a potenciales positivos, cuando son generadas las corrientes de entrada de Cl^- . Resulta interesante el comparar el valor de $K_{0,5}$ a potenciales positivos, entre DIDS y DPC si en el resultado de este número menor para DIDS que para DPC, lo que indica que DIDS seria un bloqueador mas efectivo.

Todos estos resultados están en acuerdo con lo propuesto por Powell (1998), quien también identificó el flujo de iones Cl^- a través de la MB, proponiendo además que estos serían por vías conductivas bloqueados por DIDS y DPC.

Efectos aditivos de DIDS y DPC

Al agregar de forma sucesiva DIDS y DPC sobre el mismo ovocito, se observó un efecto aditivo. De esta manera al combinar los dos bloqueadores se obtuvo un bloqueo de corrientes exógenas mayor al obtenido con cualquiera de ellos por sí solo, aunque no corresponde exactamente a la suma de ambos efectos independientes. Este resultado es sugerente de la existencia de poblaciones de canales cloruro diferentes.

Los bloqueos de corrientes exógenas totales son de 59,5% a -90 mV y 77,3% a +30 mV respectivamente, similares a los bloqueos de corrientes exógenas obtenidos al agregar los mismos bloqueadores en orden inverso, es decir, DPC y luego DIDS. Correspondiendo estos últimos bloqueos a 50,9% a -90 mV y a 73,3% a +30 mV. Las diferencias observadas en los porcentajes totales de bloqueos de corrientes exógenas pueden ser explicadas por error normal entre los experimentos, siendo lo más relevante de estos resultados la demostración de que la mayor parte de las conductancias obtenidas desde la MB corresponden a corrientes de Cl^- .

De gran importancia resulta también el observar el efecto dependiente potencial en los bloqueos, que se mantiene en todos los experimentos efectuados con bloqueadores, observándose el mayor efecto de los agentes farmacológicos sobre las corrientes de Cl^- a potenciales despolarizantes.

Conclusiones

- El análisis de los datos permite afirmar que en la MB del sinciotrofoblasto placentario humano existen canales de Cl⁻.
- En la MB del sinciotrofoblasto placentario humano existen canales de Cl⁻ sensibles a DIDS.
- En la MB del sinciotrofoblasto placentario humano existen canales de Cl⁻ sensibles a DPC.
- Estos resultados dejan, además, abierta la posibilidad de la existencia de algunos canales sensibles a ambos agentes bloqueadores.
- Queda también abierta la posibilidad de la existencia de canales de Cl⁻ no sensibles a ninguno de los bloqueadores antes mencionados.
- Los resultados de esta tesis constituyen el primer trabajo que reporta la caracterización de corrientes totales de cloruro de las membranas basales de sinciotrofoblasto placentario mediante métodos electrofisiológicos (*Voltage clamp*).

BIBLIOGRAFÍA

AIDLEY. D., STANFIELD. R., 1996. Ion channels. Cambridge University Press. USA. Pp. 121-222.

BERNUCCI. L., UMAÑA. F., LLANOS. P., AND RIQUELME. G., 2003. Large chloride channel from pre-eclamptic human placenta. *Placenta* 24: 895-903.

BERNUCCI. L., HENRIQUEZ. M., DIAZ. P., AND RIQUELME. G., 2006 Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. *Placenta* 27(11-12): 1082-95.

BIRDSEY. T., BOYD. R., SIBLEY. C., AND GREENWOOD. S., 1997 Microvillous membrane potential (Em) in villi from first trimester human placenta: comparison to Em at term. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273: 1519.

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

BISSONNETE, J. M., WEIRNER, C.P. & POWER, G.G., Jr. 1994. Amino acid uptake and chloride conductances in human placenta. *Placenta*; 15(4): 445-6.

BROWN P. D., GREENWOOD S. L., ROBINSON J. AND BOYD R. D. 1993. Chloride channels of high conductance in the microvillous membrane of term human placenta. *Placenta* 14: 103-115.

CINGOLANI, H.; HOUSSAY, A. 2000. *Fisiología Humana*. Editorial El Ateneo, 7ma. Edición. Pp 728-751.

DUMONT. J., 1972 Oogenesis in *Xenopus Laevis* (Daudin).I. stages of oocytes development in laboratory maintained animals *J. Morphol.* 136, 153-180.

HILLE. B., 1992. Ionic Channels of Excitable Membranes, Second Edition (1992). Sinauer Associates Inc. Publishers 11, 291-315; 12, 315-337.

IVORRA. I., HENRIQUEZ. M., LAX. P., RIQUELME. G., MORALES. A., 2002. Functional transplatation of chloridle channels from the human sycytiotrophoblast microvillous membrane to Xnopus oocytes. Pflugers Arch 444(6): 685-691.

JIMENEZ. V., HENRIQUEZ. M., LLANOS. P., RIQUELME. G. 2004. Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. A comparative study. Placenta 25:422-437.

KANDEL. E.R., JESSEL. T. M. & SCHWARTZ. J. H. 1997 in Neurociencia y Conducta (Editorial Prentice Hall, España). Pp. 124-193.

LATORRE. R., LÓPEZ-BARNEO. J., BEZANILLA. F., LLINÁS. R. 1996. Biofísica y fisiología celular. Universidad de Sevilla. España. pp. 217-282

LLANOS. P., HENRIQUEZ. M., RIQUELME. G. 2002. A low conductance, non-selective cation channel from human placenta. Placenta 23(2-3): 184-91.

LLANOS. P., RIQUELME. G., TISCHNER. E., NEIL. T., CAMPOS. B. 2004 Annexin 6 Modulates the Maxi-chloride Channel of the Apical Membrane of Syncytiotrophoblast Isolated from Human Placenta. J. Biol. Chem 279: 50601 - 50608.

MARSAL. J., TIGYI, G., MILEDI, R. 1995. Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ Channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. Proc Natl Acad Sci USA 92:5224-5228.

MILEDI. R., DUEÑAS. Z., MARTINEZ-TORRES. A., KAWAS. CH., EUSEBI. F. 2004. Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(6):1760-1763.

MILEDI. R., PALMA. E., EUSEBI. F. 2006. Microtransplantation of neurotransmitter receptors from cells to *Xenopus* oocyte membranes: new procedure for ion channel studies. Methods Mol Biol. 2006; 322:347-355. Review.

MONTALBETTI. N. LI., Q. GONZALEZ-PERRETT. S., SEMPRINE. J., CHEN. X. Z., & CANTIELLO. H. F. 2005. Effect of hydro-osmotic pressure on polycystin-2 channel function in the human syncytiotrophoblast. Pflugers Arch. 451(1): 294-303.

PALMA. E., TRETTEL. F., FUCILE. S., RENZI. M., MILEDI. R., EUSEBI. F. 2003. Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5):2896-2900.

PEREZ, A.; DONOSO, E. 1999. Obstetricia. Editorial Mediterráneo, 3º Edición. Pp. 120 – 124.

POWELL. T., LUNDQUIST. C., DOUGHTY. I., GLAZIER. J., JANSON. T., 1998. Mechanisms of chloride transport across the syncytiotrophoblast basal membrane in the human placenta. Placenta 19:315-321.

RIQUELME. G., STUTZIN. A., BARROS. L. F. AND LIBERONA. J. L. 1995. A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. Am.J.Obstet.Gynecol. 173: 733-738.

RIQUELME. G. 2006. Apical Maxi-chloride channel from human placenta: 12 years after the first electrophysiological recordings. Biol Res 39: 437-445.

REMBSBURY. A. L., SIBLEY. C. P. SHENNAN. D. B. & GREENWOOD. S. L. 1997 Hyposmotic shock induces a tamoxifen sensitive H-taurine efflux from human placental cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* 18(5-6), A48.

SHENNAN. D.; DAVIS. B.; BOYD. C. 1986. Chloride transport in human placental microvillus membrane vesicles. I. Evidence for anion exchange. *Pflugers Arch* 406(1):60-64.

SHENNAN. D. B. 1999. Properties of volume-activated taurine and iodide efflux from term human placental tissue. *Placenta* 20: 485-491.

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

STRANGE. K. & JACKSON. P. S. (1995) Swelling-activated organic osmolyte efflux: a new role for anion channels. *Kidney Int* 48, 994-1003.

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

VALLEJOS. C., & 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.

WEBER. W. (1999) Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim. Biophys. Acta* 1421, 213-233.