



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



**“CARACTERIZACIÓN DE CORRIENTES DE CLORURO EN
SINCICIOTROFOBLASTO HUMANO PROVENIENTE DE PLACENTAS CON
RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO INTRAUTERINO”**

BÁRBARA PAZ MORALES TORO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: GLORIA HENA RIQUELME PINO

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1070695

SANTIAGO – CHILE

2011

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
1. Restricción de Crecimiento Intrauterino (RCIU)	6
1.1 Definición y características	6
1.2 Etiología	7
1.3 Diagnóstico	8
1.4 Alteraciones placentarias y fenotipo placentario.....	9
2. Importancia de la Taurina.....	10
3. Placenta humana	12
3.1 Estructura.....	12
3.2 Circulación y barrera placentaria	13
3.4 Función placentaria de transporte.....	14
3.5 Transporte de Cl ⁻ en placenta.....	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
1. Purificación de membranas placentarias	19
1.1 Criterios de selección de material	19
2. Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> y tratamientos realizados	22
2.1 Obtención de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
2.2 Aislamiento de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
2.3 Inyección de MVM en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	22
3. Registro de corrientes totales en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> por el método de <i>Voltage Clamp</i>	23
3.1 Criterios morfológicos de inclusión de ovocitos	23
3.2 Registro de corrientes totales mediante <i>Voltage Clamp</i>	23

3.3 Criterios funcionales de inclusión de ovocitos para su registro	24
3.4 Soluciones de registro	24
3.5 Determinación de permeabilidad relativa de las corrientes totales.....	25
4. Concentraciones iónicas intra y extracelulares en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	26
5. Adquisición y análisis de datos obtenidos por <i>Voltage Clamp</i>	26
5.1 Presentación de resultados y análisis estadístico.....	26
RESULTADOS.....	27
1. Obtención de membranas purificadas de placentas normales (PN) y con RCIU.....	27
2. Trasplante de MVM de sinciotrofoblasto con RCIU a ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	29
3. Incorporación funcional de MVM, en membranas plasmáticas de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	29
4. Corrientes exógenas provenientes de MVM RCIU.....	30
4.1 ¿Qué clase de canales generaron la corriente exógena?	32
4.2 ¿Cuáles son las conductancias de las corrientes exógenas?	33
5. Características de las corrientes provenientes de MVM trasplantada en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	34
5.1 Identificación de la corriente exógena de Cl ⁻ en MVM trasplantada y cuantificación de su conductancia.	34
5.2 Efecto de DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico), bloqueador específico de canales de Cl ⁻ , sobre las corrientes exógenas.	35
5.3 Identificación de permeabilidades relativas de las corrientes totales.	37
6. Comparación de corrientes de Cl ⁻ obtenidas por Voltage Clamp en PN y con RCIU.....	40
6.1 Potencial de inversión (V _{rev}).	40
6.2 Conductancia.	41
6.3 Bloqueo por DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico).....	42
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	47

RESUMEN

El sincitiotrofoblasto placentario (hSTB) constituye la principal barrera para el intercambio materno fetal. Es de vital importancia que se lleve a cabo un adecuado transporte de solutos y nutrientes para que el feto pueda desarrollarse de forma normal. La Restricción de Crecimiento Intrauterino (RCIU) es la incapacidad del feto para alcanzar su potencial de crecimiento, una posible causa podría ser alteraciones en el transporte a través del hSTB, ya que se han reportado cambios en cuanto a funcionalidad y expresión de algunos transportadores en esta patología, sin embargo, no se ha estudiado mayormente lo que ocurre con un tipo de proteínas de transporte denominadas canales iónicos. En particular, es de importancia entender lo que ocurre con el Maxi-canal de Cl^- , ya que se ha visto que éste muestra alteraciones en sus características biofísicas en otra patología del embarazo, la Preeclampsia. El objetivo del presente estudio fue caracterizar las corrientes de Cl^- en el ovocito de *Xenopus laevis* trasplantado con membrana apical (MVM) proveniente de hSTB con RCIU, a través de la técnica de *Voltage Clamp*. Las corrientes provenientes de ovocitos inyectados fueron significativamente mayores que las obtenidas de ovocitos controles sin inyectar, evidenciando la incorporación funcional de los canales exógenos provenientes de MVM RCIU. Estas corrientes exógenas fueron sensibles a DIDS, un conocido bloqueador de canales de Cl^- , el cual disminuyó las corrientes de manera voltaje dependiente, 45 % a -100 mV y 78 % a +40 mV, sugiriendo que las corrientes exógenas fueron principalmente de Cl^- . En cuanto a las corrientes evocadas en ovocitos inyectados con MVM normal, no fueron significativamente distintas de las corrientes provenientes de MVM RCIU. Por otro lado, el bloqueador DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico) mostró su efecto sólo a potenciales positivos, disminuyendo las corrientes en un 36 % a +40 mV, siendo también voltaje dependiente, pero en menor magnitud.

SUMMARY

The human syncytiotrophoblast (hSTB) is the main barrier for maternal fetus exchange. It is of vital importance to make an appropriate transport of solutes and nutrients, in order to a normal fetus development. Intrauterine growth restriction (IUGR) is the inability of the fetus to achieve its growth potential; a possible cause might be alterations in transport through hSTB, due to it has been reported changes in functionality and expression of some carriers at this pathology, however, it is not been studied much what occurs with the ionic channels. In particular is important what occurs to the Maxi-chloride channel, because it has been reported changes in their biophysical characteristics in different pregnancy pathology, Preeclampsia. The objective of this study is characterizing the chloride currents in transplanted *Xenopus laevis* oocyte whit apical membrane (MVM) from hSTB with IUGR, through *Voltage Clamp*. The currents from oocytes injected were significantly higher than those obtained from uninjected control oocytes, demonstrating the functional incorporation of exogenous channels from MVM of IUGR, compared with control oocytes (non-injected). These exogenous currents were sensitive to DIDS, a known chloride channel blocker; which decreased the flow of voltage-dependent manner, 45 % at -100 mV and 78 % to +40 mV, suggesting that the currents were principally exogenous chloride. As for the currents evoked in oocytes injected with normal MVM were not significantly different from currents MVM of IUGR. On the other hand, the blocker DIDS showed its effect only at positive potentials, reducing the current 36 % to +40 mV, and is also voltage-dependent, but to a lesser extent.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento fetal es el resultado del potencial genético modulado por el ambiente nutricional y endocrino. Cambios que influyan en el suministro de solutos y nutrientes al feto pueden alterar su trayectoria de crecimiento y llevar a una condición patológica conocida como RCIU (Restricción de Crecimiento Intrauterino).

Para que este crecimiento se lleve a cabo de forma normal existe un órgano de vital importancia en el embarazo, la placenta, órgano transitorio imprescindible para el desarrollo fetal. Sus principales funciones son la producción de hormonas, la transferencia de anticuerpos y el transporte de solutos; en este órgano, la sangre materna y la fetal nunca se mezclan, debido a una barrera formada por el endotelio de los capilares fetales y un epitelio especializado denominado hSTB (sincitiotrofoblasto placentario humano), constituyendo este último la principal barrera para el intercambio materno-fetal. El transporte a través del hSTB, al no poseer rutas paracelulares, necesariamente implica atravesar tanto la MVM (Membrana Apical Microvellosa, cara materna) como la membrana basal (BM, cara fetal) de este epitelio, para pasar desde la sangre materna a la fetal o viceversa.

La RCIU se correlaciona con un fenotipo placentario específico (placentas pequeñas, disminución del área de intercambio, aumento del espesor del hSTB, etc.) y se ha reportado la alteración de diversos tipos de transportadores, entre ellos Ca^{2+} ATPasa, Na^+/K^+ ATPasa, intercambiador Na^+/H^+ , entre otros, sin embargo, sobre la posible alteración de canales iónicos no hay información.

El Cl^- es el principal ión extracelular, su transporte se realiza mediante proteínas transportadoras como el intercambiador aniónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, o por canales iónicos que están involucrados en funciones como la generación del potencial de membrana, regulación del volumen celular, transporte de solutos. Dentro de ellos uno que se ha estudiado mucho y ha sido bien caracterizado en el laboratorio es el Maxi-canal de Cl^- , el cual particularmente presenta alteraciones en sus características biofísicas, en otras patologías del embarazo, como la Preeclampsia. Teniendo como antecedente que el Maxi-canal de Cl^- además transporta aminoácidos como la taurina, es de interés saber qué ocurre con las propiedades biofísicas de este canal en RCIU, donde la concentración de taurina fetal se encuentra disminuida.

En este contexto, el objetivo de este estudio fue caracterizar, mediante electrofisiología, lo que sucede con las corrientes de Cl^- , en MVM de hSTB en placentas con RCIU, trasplantado en ovocitos de *Xenopus laevis*. Anteriormente Díaz (2003) demostró la incorporación estructural de MVM de placenta normal, en la membrana plasmática de estos ovocitos. A través de inmunofluorescencia indirecta, utilizando el marcador de MVM de hSTB fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), realizó un seguimiento temporal a nivel morfológico de las vesículas de MVM, desde su inyección hasta su fusión en la membrana plasmática del ovocito. Estos resultados morfológicos fueron correlacionados con los resultados de Ivorra *et al.* (2002), quienes a través de *Voltage Clamp* demostraron que los ovocitos de *Xenopus* eran capaces de incorporar funcionalmente en su membrana la fracción MVM como una corriente exógena. Esta corriente se debió fundamentalmente a la incorporación funcional de canales de Cl^- , dado que el reemplazo iónico de este anión en la solución de registro, demostró que este era el principal ión permeante.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Restricción de Crecimiento Intrauterino (RCIU)

1.1 Definición y características

Existen diferentes patologías que se presentan durante el embarazo, una de ellas es la RCIU la cual es consecuencia de la supresión del potencial genético de crecimiento fetal que ocurre como respuesta a la reducción del aporte de sustratos, o, más infrecuentemente, a noxas genéticas, tóxicas o infecciosas. En cualquiera de estos casos, RCIU implica una restricción anormal del crecimiento en un individuo (feto) que tiene un potencial de desarrollo mayor. Se presenta entre un 3 a 10 % de los embarazos (Oyarzún, 1997).

La definición más aceptada de RCIU es un crecimiento fetal por debajo del percentil 10 para la edad gestacional, en una curva de crecimiento intrauterino en base a la población de referencia.

Los fetos afectados por RCIU pueden clasificarse como:

- RCIU simétrico o tipo I: todos los órganos internos fetales están reducidos de tamaño y todo el cuerpo es proporcionalmente pequeño. Tiene mal pronóstico cuando es severo y de instalación precoz, porque se asocia con malformaciones e infecciones congénitas. Cuando es leve y de instalación tardía mejora el pronóstico (Espinoza *et al.*, 2003).
- RCIU asimétrico o tipo II: implica un feto que dirige la mayor parte de su energía a mantener el crecimiento de órganos vitales como cerebro, corazón, a expensas de hígado, músculo y grasa (Peleg *et al.*, 1998). Los niños que presentan este tipo tienen una dimensión normal de cabeza, pero una menor circunferencia abdominal y miembros delgados. Suele asociarse con patologías placentarias y se instala después de las 24 semanas.

Según Espinoza *et al.* (2003) la magnitud de la RCIU puede clasificarse en:

- Leve: si el peso fetal estimado cursa entre los percentiles 5-10.
- Moderada: si el peso fetal cursa entre los percentiles 2-5.
- Severa: si el peso fetal cursa bajo el percentil 2.

Existe una mayor incidencia de morbimortalidad perinatal y complicaciones en fetos y neonatos con RCIU. Las complicaciones pueden ser inmediatas como: asfixia perinatal, aspiración de meconio, hipoglicemia e hipocalcemia, hipotermia, policitemia, trastornos de coagulación, hemorragia pulmonar y cerebral, disminución de depósitos de grasas y glicógeno, mayor frecuencia de anomalías genéticas y riesgo de muerte súbita del lactante. En cuanto a las secuelas a mediano y largo plazo se pueden presentar: parálisis cerebral, convulsiones, retardo mental, retraso del aprendizaje, hipertensión arterial crónica, diabetes, enfermedad coronaria, accidente vascular encefálico, entre otras (Oyarzún, 1997).

1.2 Etiología

Según Espinoza *et al.* (2003) la etiología de la RCIU es multifactorial, se reconocen factores de riesgo maternos, fetales y ovulares.

Factores de riesgo maternos:

- Peso gestacional menor de 50 kg y talla menor de 150 cm.
- Escasa ganancia de peso en la gestación y desnutrición materna previa.
- Enfermedad vascular materna: hipertensión, diabetes.
- Enfermedad renal crónica.
- Hipoxia crónica: madres que viven a grandes alturas o con insuficiencia respiratoria crónica.
- Drogadicción.
- Infecciones: toxoplasmosis, rubeola, herpes virus.
- Anomalías uterinas: útero bicorne, miomas.

Factores de riesgo fetales:

- Embarazo múltiple.
- Malformaciones.
- Anomalías cromosómicas.
- Síndromes genéticos.
- Embarazo prolongado.
- RCIU previo: recurrencia de un 25 % cuando no hay causa obvia en el embarazo precedente.

Factores de riesgo ovulares:

- Anomalías placentarias: desprendimiento crónico, placenta previa, insuficiencia placentaria.
- Anomalías del cordón: inserción velamentosa, arteria umbilical única.

Si habiendo realizado el diagnóstico de RCIU no se encuentran causas o factores de riesgo específicos se denomina RCIU idiopática, que es la de interés en este estudio.

1.3 Diagnóstico

Para identificar esta patología, es necesario identificar a la población de riesgo, para ello se debe verificar la presencia de los factores de riesgo antes mencionados. La altura uterina es un método simple para evaluar el crecimiento fetal, si la altura uterina no corresponde para la edad gestacional, es sugerente de RCIU. Para mayor seguridad se hace un seguimiento a través de una curva que relaciona altura uterina/edad gestacional, si esta relación está bajo el percentil 10 se considera RCIU.

Las pruebas diagnósticas específicas a realizar para asegurar el diagnóstico de RCIU son:

1. Ultrasonido obstétrico: a través de éste se evalúa el diámetro biparietal, circunferencia craneana (CC), circunferencia abdominal (CA) y largo del fémur (LF). Se han desarrollado fórmulas que, a partir de estos datos, pueden estimar el peso fetal; adicionalmente han sido establecidos los percentiles que relacionan cada uno de estos parámetros con la edad gestacional, por lo tanto, son útiles para el diagnóstico de RCIU. Por ejemplo, la circunferencia abdominal es un sensible indicador de RCIU simétrica o asimétrica. También la razón CC/CA es de utilidad, ya que normalmente entre las 20-36 semanas de gestación esta relación disminuye casi linealmente desde 1,2 a 1, esta relación se mantiene en un feto con restricción simétrica de crecimiento, pero aumenta en fetos con restricción asimétrica de crecimiento (Peleg *et al.*, 1998). La razón LF/CA es independiente de la edad gestacional y sus valores normales deberían estar entre 0,20 y 0,24.

Otra utilidad del ultrasonido es la estimación de la cantidad de líquido amniótico, como prueba de evaluación de la unidad feto-placentaria, ya que la combinación de Oligohidroamnios y RCIU presagia un resultado desfavorable, debiéndose adelantar el parto en algunos casos (Peleg *et al.*, 1998).

Además, el ultrasonido puede identificar malformaciones que expliquen la RCIU.

2. Doppler: permite el estudio de la circulación útero-placentaria y fetal. En general un aumento en la resistencia en la arteria umbilical traduce la presencia de insuficiencia placentaria, que se asocia con un aumento del riesgo de muerte perinatal. Además la velocimetría Doppler de arterias uterinas es una técnica útil para la pesquisa de pacientes con riesgo de desarrollar Preeclampsia o RCIU (Oyarzún, 1997).
3. Cordocentesis: es un procedimiento invasivo para extraer sangre del cordón umbilical. Esta técnica permite el estudio del RCIU severo y de inicio precoz que responde a etiología infecciosa y enfermedades cromosómicas (Espinoza, 2003).

1.4 Alteraciones placentarias y fenotipo placentario

La placenta juega un rol crucial durante el desarrollo del feto, ya que es la encargada de entregar los nutrientes necesarios para su desarrollo. Se han encontrado alteraciones en placentas de niños que han sufrido RCIU, donde el transporte y metabolismo placentarios están significativamente afectados. Recientes estudios morfológicos han demostrado distintas anormalidades en las vellosidades que pueden estar asociadas a la enfermedad, por ejemplo, vellosidades rectas con menos interconexiones de lo normal, disminución del área de intercambio del hSTB y aumento del espesor de la barrera. Junto con lo anterior, se observa un incremento en la apoptosis placentaria, que podría estar asociado con los cambios en el tamaño y arquitectura del órgano (Sibley *et al.*, 2005).

Jansson y Powell (2007), proponen que la placenta con RCIU presenta un fenotipo placentario específico, que permite una mejor representación del ambiente intrauterino que el peso al nacimiento. Se caracteriza por cambios en los transportadores de nutrientes, en actividad o expresión, que llevan a un inadecuado suministro de nutrientes, cambios en la morfología placentaria y el flujo de sangre. Un alterado fenotipo placentario podría indicar un marcado compromiso del ambiente intrauterino, incluso cuando el peso al nacimiento está dentro de los rangos normales.

En cuanto a las alteraciones en el flujo sanguíneo en RCIU, análisis de velocimetría Doppler han mostrado un disminuido flujo sanguíneo en arterias uterinas y umbilicales, además de una mayor resistencia al flujo sanguíneo en la arteria umbilical (Jansson y Powell, 2007). Muestras de sangre venosa uterina presentaron altos niveles de O₂, pero un disminuido coeficiente de extracción de O₂, lo que sugiere una alteración en la habilidad del feto para extraer O₂ desde la sangre materna.

Desde el punto de vista funcional, se encuentran afectados algunos transportadores de solutos. Por ejemplo: Ca²⁺ ATPasa (Strid *et al.*, 2003), Na⁺/K⁺ ATPasa (Johansson *et al.*, 2003), el intercambiador Na⁺/H⁺ (Johansson *et al.*, 2002), involucrados en la homeostasis celular, y el transportador de taurina TAUT (Ross *et al.*, 2004), alterados en su expresión y/o actividad en RCIU. La lipoproteína lipasa es crucial para liberar los ácidos grasos incorporados en las lipoproteínas circulantes en la sangre materna; esto constituye el primer paso para la transferencia transplacentaria de ácidos grasos. Se ha reportado que en RCIU la actividad de esta lipoproteína está reducida en MVM, por lo tanto hay una menor razón feto-maternal para ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), los cuales son necesarios para la síntesis de lípidos estructurales y para un normal desarrollo del tejido cerebral (Cetin y Alvino, 2009).

Es importante notar que algunos transportadores no muestran cambios, como es el caso del transportador de glucosa GLUT1, el cual no se ve afectado en su expresión ni actividad en RCIU.

Usualmente los fetos con RCIU presentan menor concentración plasmática de aminoácidos que un feto normal, debido a una disminución en la actividad o expresión de transportadores placentarios de aminoácidos. Ejemplo de ello es lo que ocurre con el transporte de aminoácidos como leucina, lisina, taurina, glicina, serina, alanina (Sibley *et al.*, 2005).

La disminución del transporte de taurina es de crucial importancia, debido a que durante la vida fetal la transferencia de este aminoácido desde la sangre materna a la sangre fetal es la principal fuente para el feto, ya que no se encuentra en condiciones para sintetizarlo.

Dado que en placenta normal se ha reportado un canal de Cl⁻ en MVM que es permeable a taurina, es necesario revisar qué importancia tiene la taurina para el feto.

2. Importancia de la Taurina

La Taurina es un β aminoácido libre, muy abundante en muchos tejidos y con importantes funciones fisiológicas como conjugación con ácidos biliares, defensa contra radicales libres, regulación de la excitabilidad neuronal y regulación del volumen celular. En omnívoros es semi esencial, ya que puede provenir de la dieta, principalmente de la carne y el pescado, o ser sintetizada a partir de cisteína y metionina. Pero durante la vida fetal es considerada como un aminoácido esencial, ya que la capacidad de síntesis está disminuida o ausente en el feto humano, por lo tanto, es absolutamente dependiente del transporte placentario para un adecuado suministro (Norberg *et al.*, 1998).

Durante la preñez, la taurina se acumula en hígado y músculo materno. En placenta, es el aminoácido más abundante y su concentración aumenta hacia el final de la gestación; su concentración en tejido placentario es 100 a 200 veces mayor que en la sangre materna (Aerts y Van Assche, 2002). Hacia el final de la gestación, se acumula principalmente en cerebro fetal y también aumenta su concentración en el hígado fetal. En este último, la taurina está involucrada en la degradación de colesterol y absorción de grasas, lo que podría explicar la asociación entre bajo niveles de taurina y bajo peso fetal. También aumentan sus niveles hacia el final de la gestación en el corazón fetal, donde está relacionada con la osmorregulación y protección del corazón contra anomalías cardíacas del desarrollo. Luego del parto los niveles de taurina comienzan a disminuir en el neonato. Durante la lactancia los requerimientos para la síntesis de leche promueven la liberación de aminoácidos desde el tejido materno y las reservas de taurina se ven especialmente afectadas (Aerts y Van Assche, 2002).

En el recién nacido también es considerada un aminoácido esencial, ya que la habilidad para sintetizar taurina es muy limitada y, por lo tanto, dependiente de la ingestión vía leche materna. También se acumula en cerebro, hígado y plasma del recién nacido, pero su concentración va disminuyendo a medida que se acerca el destete. La habilidad de adaptarse a cambios en la dieta es más limitada en individuos jóvenes, debido a la inmadurez del sistema transportador de taurina (Aerts y Van Assche, 2002).

Por lo anteriormente mencionado, el normal desarrollo fetal y neonatal es muy dependiente de una adecuada disponibilidad de taurina. Se ha observado, en experimentos con animales, que la deficiencia de taurina durante la preñez y lactancia está asociada a una falla en el crecimiento, desarrollo celular anormal, degeneración retinal, daño cardíaco y deteriorado desarrollo del sistema nervioso central y páncreas endocrino. Un estudio realizado en ratas sometidas a una dieta baja en proteínas durante la preñez, demostró una

asociación entre deficiencia fetal de taurina, desarrollo y funcionalidad anormal del páncreas fetal; la suplementación de taurina durante la preñez y lactancia normalizó la vascularización y la cantidad de células β en el páncreas fetal, restableciendo en parte la funcionalidad de éste (Hultman *et al.*, 2007).

Las concentraciones de taurina en placenta son mucho mayores que las concentraciones en sangre materna, lo que implica la presencia de un transporte activo altamente eficiente en la MVM. Según lo reportado por Ross *et al.* (2004), el transporte a través del hSTB involucra dos pasos fundamentales:

1. El transporte a través de la MVM, por transporte activo acoplado a Na^+ (TAUT).
2. El transporte a través de la BM hacia la circulación fetal, por transporte pasivo.

TAUT (Taurine Transporter), es una proteína transportadora que ha sido ampliamente estudiada, dependiente de Na^+ y Cl^- . Norberg *et al.* (1998) estudiaron el transporte de taurina en BM y mostraron que la absorción de taurina dependiente de Na^+ , en BM, fue solo un 6 % de la MVM, demostrando que este sistema TAUT está casi exclusivamente en la MVM.

En RCIU el transporte y los niveles fetales de taurina están disminuidos, ya que la actividad del transportador TAUT está alterada. El óxido nítrico (NO) inhibe a TAUT, pudiendo disminuir el transporte placentario de taurina y contribuir a los reducidos niveles fetales de taurina, debido a los altos niveles de NO en la patología (Ross *et al.*, 2004).

El hSTB debe ser capaz de regular su volumen, como lo hacen otras células, debido a la arquitectura placentaria, los mecanismos de transporte sensibles a volumen están ubicados en la MVM. Shennan (1999), describe las propiedades del transporte de taurina activado por volumen, concluyendo que la placenta puede liberar aminoácidos en paralelo con K^+ y Cl^- en respuesta a un aumento del volumen celular, confirmando que un desafío hipo osmótico incrementa la liberación de taurina desde la MVM del hSTB. Además, esta liberación de taurina fue inhibida por bloqueadores de canales aniónicos como DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico), sugiriendo una vía conductiva común para aminoácidos y aniones.

Un posible candidato para esta vía conductiva es el Maxi-canal de Cl^- , que se encuentra presente en la MVM de hSTB, es sensible a DIDS y en otras células es activado por un aumento de volumen celular. Vallejos y Riquelme (2007), demostraron que el Maxi-canal de Cl^- de MVM de hSTB es permeable a taurina y otros dos aminoácidos, aspartato y glutamato.

3. Placenta humana

3.1 Estructura

La placenta es un órgano transitorio, vital para el desarrollo y crecimiento del feto. Las principales funciones de la placenta son: intercambio de gases, de elementos nutritivos y electrolitos, transporte de anticuerpos maternos, producción de hormonas y desintoxicación de algunas drogas.

Hacia el comienzo del cuarto mes de gestación posee dos componentes: a) una porción fetal formada por el corion frondoso y b) una porción materna formada por la decidua basal. En el lado fetal la placenta está rodeada por la lámina coriónica; en el lado materno por la decidua basal, cuya lámina decidual es la porción más íntimamente incorporada en la placenta. En este momento la mayor parte de las células citotrofoblásticas han degenerado. Entre las láminas coriónica y decidual están los espacios intervillosos ocupados por sangre materna y revestidos por sincicio de origen fetal. Las vellosidades arborizadas (tejido fetal), crecen dentro de los espacios intervillosos, bañados por sangre materna, sin embargo, la circulación fetal se halla separada de la materna (Fig. 1B).

Hacia el quinto mes de gestación se forman tabiques a partir de la decidua basal. Estos poseen un núcleo central de tejido materno, pero su superficie está cubierta por una capa de células sinciciales, de modo que en todo momento hay una capa sincicial separando la sangre materna, que se encuentra en los espacios intervillosos, del tejido fetal de las vellosidades. Producto de estos tabiques, la placenta queda dividida en varios compartimentos o cotiledones.

La placenta de término es discoidal, tiene un diámetro de 15 a 25 cm y aproximadamente 3 cm de espesor, pesa alrededor de 500-600 g. Unos minutos después del parto es expulsada de la cavidad uterina. Por el lado materno se distinguen los cotiledones, cubiertos por una delgada capa de decidua basal. La superficie fetal está cubierta por completo por la lámina coriónica, se observan los vasos coriónicos que convergen hacia el cordón umbilical. A su vez, el corion está cubierto por el amnios (Fig. 1A) (Sadler, 2001).

Dado que la sangre materna que se encuentra en los espacios intervillosos está separada de la sangre fetal por un derivado coriónico se considera que la placenta humana es de tipo Hemocorial.

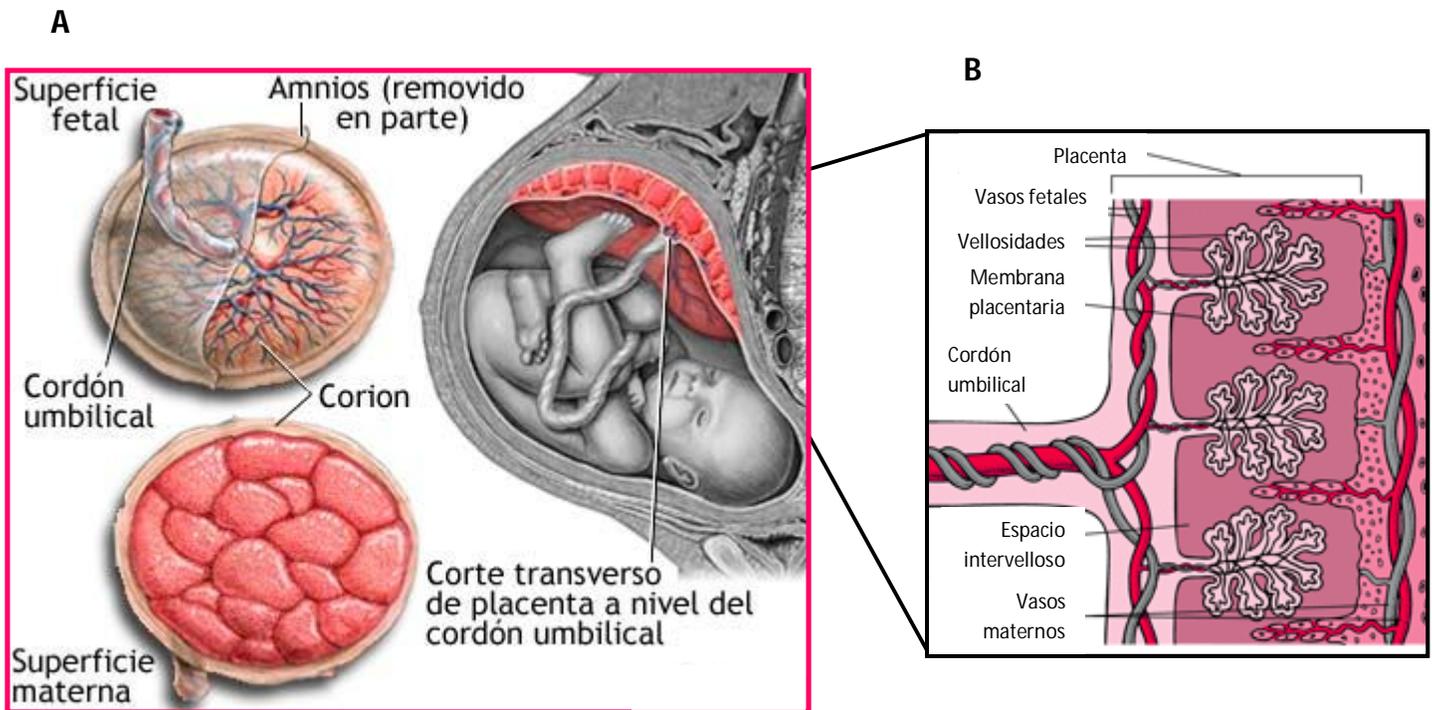


Figura 1. Placenta humana de término. **A)** Vista macroscópica de la placenta, con su superficie fetal y materna. **B)** Esquema de las estructuras placentarias. Se observa un corte transversal de varios cotiledones, donde se aprecia la circulación sanguínea del feto en la vellosidad placentaria, la cual está rodeada de sangre materna que se encuentra en el espacio intervelloso. La sangre materna se encuentra separada de la sangre fetal por la barrera placentaria. <http://www.medhelp.org/medical-information/show/2531/Anatomy-of-a-normal-placenta>

3.2 Circulación y barrera placentaria

La sangre materna llega al espacio intervelloso a través de las arterias espirales que atraviesan la lámina decidual. La luz de la arteria espiral es reducida, esto produce un aumento de la presión de la sangre que la impulsa hacia la profundidad del espacio intervelloso, bañando las vellosidades con sangre oxigenada. Al disminuir la presión, la sangre retorna desde la lámina coriónica hacia la decidua, donde entra en las venas endometriales (Sadler, 2001).

La sangre fetal desoxigenada abandona al feto por las arterias umbilicales, éstas pasan a través del cordón umbilical y se ramifican posteriormente para capilarizarse en las vellosidades coriónicas. A nivel de las vellosidades libres se realiza el intercambio metabólico madre-feto, a través de la denominada barrera placentaria. Los capilares se continúan con las venas vellositarias, las que retornan al feto con sangre oxigenada a través de la vena umbilical (Bosco, 1999).

La barrera placentaria separa la sangre materna de la fetal y está formada en un principio por cuatro capas: a) el revestimiento endotelial de los vasos fetales; b) tejido conectivo de las vellosidades;

c) citotrofoblasto y d) hSTB, que corresponde a un epitelio multinucleado originado por diferenciación del citotrofoblasto. Alrededor de las 20 semanas de gestación la capa de células citotrofoblásticas se atenúa y desaparece, al igual que el tejido conectivo. Subsecuentemente, el hSTB queda en contacto directo con el endotelio de los capilares fetales separando la sangre materna y fetal (Gude *et al.*, 2004), aumentando significativamente el índice de intercambio (Fig. 2).

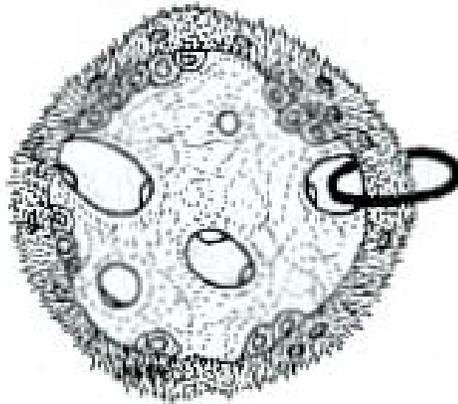


Figura 2. Corte transversal de una vellosidad. Lo que está encerrado en el círculo corresponde a la barrera placentaria, formada por el hSTB y el endotelio de los capilares (Sadler, 2001).

3.4 Función placentaria de transporte

El crecimiento y desarrollo fetal depende de las funciones de transporte de la placenta. Dado que el hSTB es un epitelio multinucleado que no presenta rutas paracelulares, todos los solutos (agua, nutrientes como aminoácidos, electrolitos, etc.) deben pasar directamente a través de sus membranas, MVM en la cara materna y BM en la cara fetal, constituyendo la principal barrera para el intercambio materno-fetal (Ivorra *et al.*, 2002). Por lo tanto, es necesario detenerse para revisar los mecanismos generales involucrados en el transporte de solutos a través de las membranas biológicas.

La membrana plasmática no es una barrera homogénea, sino un mosaico formado principalmente por lípidos y proteínas; por ello, las propiedades de transporte de un soluto dependerán de la interacción que éste establezca con los componentes de la membrana (Latorre *et al.*, 1996). Existen distintos tipos de transporte (Fig.3):

1. Un soluto no polar, de bajo peso molecular, podrá atravesar sin dificultad la bicapa lipídica por un mecanismo denominado **Difusión Simple**, un tipo de transporte pasivo (sin gasto energético), en el cual la migración de un soluto se realiza a favor de una gradiente de concentración. En la placenta, este

mecanismo está involucrado en el intercambio de gases como oxígeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, un porcentaje de agua, urea y creatinina, entre otros.

2. El transporte de moléculas polares y apolares grandes es mediado por proteínas integrales de membrana especializadas, denominadas proteínas transportadoras las cuales son de dos clases:

a. **Transportadores o Carriers:** que movilizan solutos cargados y no cargados mediante transporte pasivo o activo, según sea a favor o en contra de la gradiente electroquímica, se unen al soluto a ser transportado y sufren una serie de cambios conformacionales que permiten el paso de éste a través de la membrana. En la placenta, como en otros epitelios, estas proteínas están involucradas en el transporte de múltiples solutos tales como glucosa, aminoácidos, bicarbonato, etc. (Stulc, 1997).

b. **Canales iónicos:** son proteínas integrales que atraviesan la membrana celular y que se encuentran en todas las células del organismo. Los solutos a transportar pueden ser iones inorgánicos como también orgánicos (aminoácidos). El transporte que median estos canales es de carácter pasivo. Son altamente eficientes y capaces de generar respuestas muy rápidas. Tienen tres propiedades importantes:

I. **Conductividad:** es la capacidad de conducir cargas (iones). Se establece como la relación existente entre la intensidad de corriente (I) versus el potencial de membrana (V). Es medida en Siemens (S).

II. **Selectividad:** son altamente selectivos para iones específicos. Esto es realizado a través de un filtro de selectividad que se encuentra al interior del canal y está formado por un conjunto de aminoácidos específicos.

III. **Cinética:** a través de cambios conformacionales se abren o cierran en respuesta a estímulos variados, ya sean de tipo mecánico, químico o eléctrico (Koester y Siegelbaum, 1997).

Los canales se regulan de tres formas: por voltaje (canales activados por voltaje), por transmisores químicos (canales activados por ligandos) y por presión o estiramiento (canales activados mecánicamente). Un canal individual es más sensible a sólo uno de estos tipos de influencia.

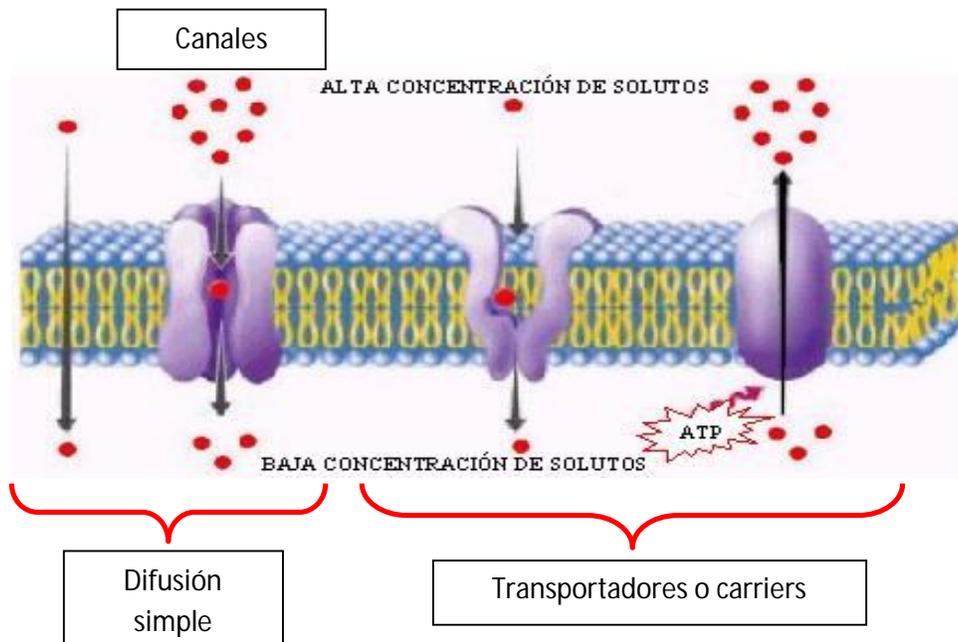


Figura 3. Esquema de los distintos tipos de transporte que existen en membrana plasmática.
http://www.educarchile.cl/UserFiles/P0001/Image/Mod_1_contenidos_estudiantes_biologia.

En el hSTB, así como en otros tipos celulares epiteliales, los canales iónicos cumplen diversas funciones, tales como la generación del potencial de membrana, regulación del volumen celular y transporte de nutrientes. Se ha postulado que los canales iónicos en placenta son de gran relevancia para el desarrollo fetal. Ejemplo de ello son los resultados del trabajo de Birdsey *et al.* (1999) quienes, mediante estudios de flujo, demuestran que canales de K^+ y Cl^- están involucrados en la generación del potencial de membrana y la regulación del volumen celular. También, por los canales pasan aminoácidos (ej. Taurina), que están involucrados en la regulación del volumen celular (Vallejos y Riquelme, 2007).

El mantenimiento de la homeostasis del Na^+ , K^+ y Cl^- es imprescindible para la vida del feto, siendo estos iones aportados por la sangre materna (Stulc, 1997).

En conclusión, el transporte de iones a través de la placenta es crucial para el desarrollo y crecimiento fetal. En particular, los canales de Cl^- , están involucrados en múltiples funciones placentarias, de modo que alteraciones directas o indirectas de estos canales pueden tener relación con algunas enfermedades.

3.5 Transporte de Cl⁻ en placenta

El Cl⁻ es el principal ión en el fluido extracelular fetal, no obstante, en todas las edades gestacionales el Cl⁻ se encuentra más concentrado en el feto que en la sangre materna. El Cl⁻ puede entrar o salir de las células por un sistema de transporte acoplado con Na⁺, K⁺ o ambos, en intercambio por otros aniones o a través de vías conductivas (canales iónicos) (Stulc, 1997).

Los distintos sistemas transportadores de Cl⁻ participan en la transferencia de solutos a través de los epitelios o pueden estar involucrados en diferentes funciones tales como la regulación del volumen celular, pH y otras. Los canales de Cl⁻ difieren en sus propiedades incluso en una misma célula, pudiendo ser clasificados en tres grandes grupos según la magnitud de su conductancia: a) Maxi-canales o de gran conductancia, b) Canales de conductancia intermedia y c) Canales de pequeña conductancia.

Estudios de flujos en vesículas de MVM han demostrado diferentes vías para el transporte de Cl⁻ a través de la MVM de placenta humana; una de ellas es un intercambiador aniónico (Cl⁻/HCO₃⁻), responsable de un 50 % del transporte y otra vía corresponde a canales iónicos dependientes de voltaje. Estos canales han sido clasificados en dos grupos según su sensibilidad a dos bloqueadores: a) canales de Cl⁻ sensibles a DPC (ácido difenilamina-2-carboxílico) y b) canales de Cl⁻ sensibles a DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbena-2,2-disulfónico). Cabe destacar dentro de este último al Maxi-canal de Cl⁻, un canal ya descrito en otras células epiteliales y no epiteliales.

El Maxi-canal de Cl⁻ en placenta, al igual que en otros epitelios, es un canal de gran conductancia (200-350 pS), dependiente de voltaje, inhibido por DIDS, pero insensible a DPC, selectivo para aniones sobre cationes y transporta aminoácidos como glutamato, taurina y aspartato, esto último puede implicar que este canal esté involucrado en la regulación de volumen placentario y subyacer la salida de taurina activada por volumen (Brown *et al.*, 1993; Riquelme *et al.*, 1995; Vallejos y Riquelme, 2007).

Bernucci *et al.* (2003), demostraron que las características biofísicas de este canal, proveniente de una patología del embarazo llamada Preeclampsia, fueron diferentes a las observadas en una gestación normal. Este maxi-canal preeclámptico mostró una menor conductancia y su probabilidad de apertura, dependiente de voltaje, también varió. Esta es la primera evidencia de una alteración funcional en canales iónicos provenientes de una patología del embarazo.

Dada la estructura morfológica de la placenta, es muy difícil estudiar sus canales iónicos por los métodos electrofisiológicos tradicionales. Por este motivo, tiene gran utilidad el estudio de membranas placentarias humanas purificadas trasplantadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, obteniendo el registro de las corrientes totales por el método de *Voltage Clamp* (Miledi, 1982), siendo posible medir la actividad de una población de canales iónicos exógenos incorporados en la membrana plasmática del ovocito.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar lo que ocurre con las corrientes de Cl⁻ en placentas con RCIU, en especial lo que ocurre con el Maxi-canal de Cl⁻, que podría tener alteradas sus características biofísicas y afectar la regulación de volumen celular y el transporte de taurina, como ocurre en la Preeclampsia.

HIPÓTESIS

Corrientes de Cl⁻ en MVM de hSTB presentan características biofísicas alteradas en placentas con RCIU.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y características biofísicas de corrientes de Cl⁻ en MVM de hSTB, provenientes de placentas con RCIU, trasplantado a ovocitos de *Xenopus laevis*, mediante la técnica de *Voltage Clamp*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener membranas purificadas de placentas con RCIU (por primera vez en el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas).
- Trasplantar MVM de hSTB con RCIU a ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Demostrar la fusión de MVM en membranas plasmáticas de ovocitos de *Xenopus laevis*, dando origen a corrientes exógenas, mediante detección de corrientes totales a través de *Voltage Clamp*.
- Determinar diferencias en características biofísicas de corrientes de Cl⁻ de MVM trasplantadas, en comparación con corrientes provenientes de ovocitos sin inyectar.
- Con respecto a la corriente total proveniente de la MVM trasplantada en los ovocitos de *Xenopus laevis*:
 - Identificar corrientes exógenas de Cl⁻ en la MVM trasplantada.
 - Cuantificar su conductancia.
 - Identificar las permeabilidades relativas de la corriente.
 - Estudiar el efecto de DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico), bloqueador específico de canales de Cl⁻.
- Comparar las corrientes de Cl⁻ obtenidas por *Voltage Clamp* en placentas normales y con RCIU.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Purificación de membranas placentarias

1.1 Criterios de selección de material

Criterios de inclusión:

- Placentas a término de partos vaginales o cesáreas.
- Sin patologías asociadas (idiopáticas).
- Placentas de fetos con diagnóstico de RCIU ecográfico (bajo el décimo percentil para la población de referencia).

Criterios de exclusión:

- Pacientes extranjeras.
- Placentas con patologías asociadas (Obesidad, Diabetes, Preeclampsia, Malformaciones genéticas).
- Placentas de partos con sufrimiento fetal y presencia de meconio.
- Placentas de pacientes que han consumido sustancias químicas abusivas durante el embarazo (drogas, tabaco, alcohol).

La purificación de membranas de hSTB fue realizada utilizando el protocolo descrito por Jiménez *et al.* (2004), el cual separa simultáneamente BM de MVM de una misma placenta, a través de centrifugaciones diferenciales.

Se obtuvieron 18 placentas humanas provenientes de embarazos sin complicaciones y 5 con RCIU idiopática, sin patologías asociadas, previo consentimiento de la paciente, desde los hospitales San Borja Arriarán, San José y J. J. Aguirre. Fueron trasladadas en hielo hasta el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas, en el transcurso máximo de una hora entre el alumbramiento y la llegada al laboratorio.

Una vez recibida la placenta en el laboratorio, tanto normal como con RCIU, se extrajeron 100 g de cotiledones, se trituraron y lavaron con NaCl 0,9 %, para remover los restos de sangre, luego fue filtrado en gasa. El tejido fue suspendido en tampón A (sacarosa 250 mM, Tris-HEPES 10 mM, pH 7,4, e inhibidores de proteasas: Pepstatina A 0,7 µM, Leupeptina 1,1 µM, Aprotinina 0,8 µM) y homogeneizado en juguera 3 veces, por 30 seg. El homogeneizado fue centrifugado a 5860 x g por 15 min conservando el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en tampón A y rehomogeneizado por 30 seg. 3 veces. El segundo homogeneizado fue centrifugado a 5860 x g por 15 min, el sobrenadante obtenido fue mezclado con el sobrenadante anterior y

fueron centrifugados a 10000 x g por 15 min. Se descartó el sedimento obtenido de esta última centrifugación, rico en componentes mitocondriales.

El sobrenadante fue centrifugado a 124000 x g por 30 min, el sedimento resultante fue resuspendido en 250 ml de tampón A y homogeneizado en vidrio-teflón, luego se le agregó 12 mM de $MgCl_2$ y se dejó agitando por 20 min a 4 °C. Luego de los 20 min de agitación, la solución con $MgCl_2$ se centrifugó a 2500 x g por 10 min. El tratamiento con $MgCl_2$ se utilizó para separar MVM (sobrenadante) de BM (sedimento), ya que el $MgCl_2$ precipita con BM.

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

El sedimento que contenía la BM fue resuspendido en tampón A, agitado en frío por 60 min, filtrado en gasa, y posteriormente centrifugado a 4340 x g por 45 min. El sobrenadante fue centrifugado a 98500 x g por 45 min y el sedimento resultante fue resuspendido en tampón A. Esto correspondió a la fracción microsomal basal (mBM).

Se preparó una gradiente discontinua de sacarosa, con una porción superior de 45 % y una inferior de 52 % para la fracción mBM, y de 37 % y 45 % para la fracción mMVM. Estas soluciones fueron tamponadas en Tris Hepes 10 mM y Tris Maleato 20 mM, pH 7,4, respectivamente. Se tomaron 2 a 3 ml de cada fracción microsomal, fueron sobrepuestas en la gradiente y centrifugadas a 90000 x g por un mínimo de 6 horas a 4 °C. Las bandas en la interfase 10/37 % y 37/45 % corresponden a la fracción de Membrana Apical Liviana (LMVM) y fracción de Membrana Apical Pesada (MVM), respectivamente. Por otro lado la BM se obtiene de la interfase 45/52 % de sacarosa.

Estas fracciones fueron recolectadas y diluidas con tampón Tris Maleato 20 mM para MVM y LMVM y Tris Hepes 10 mM para BM, luego fueron centrifugadas a 110000 x g por 30 min. Los sedimentos finales fueron resuspendidos en tampón B, alicuotados y almacenados a -150 °C en nitrógeno líquido. La figura 4 es un esquema que resume los pasos generales del proceso de aislamiento.

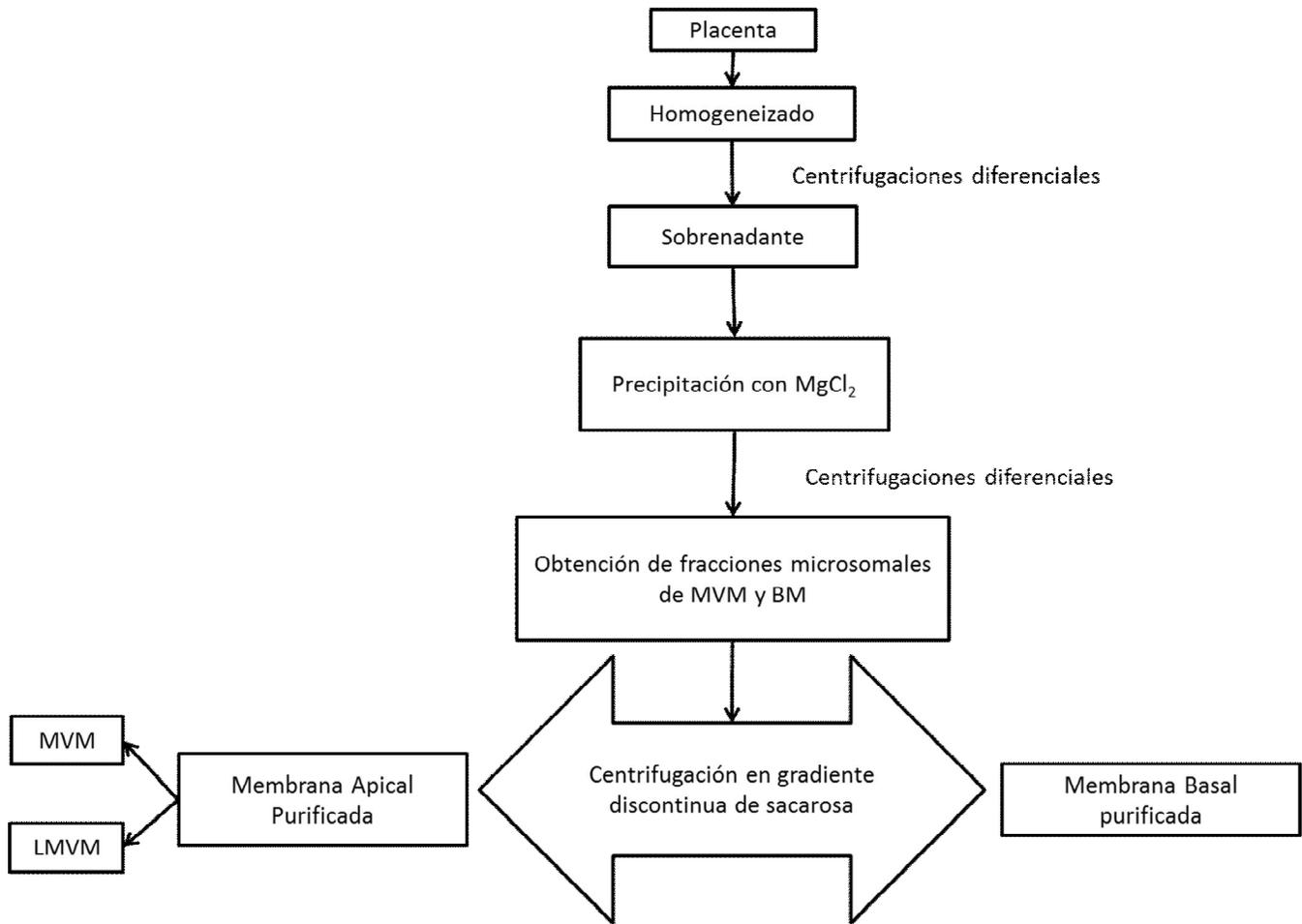


Figura 4. Esquema general de la purificación y aislamiento de membranas placentarias.

Para la cuantificación de proteínas totales se realizó una detección colorimétrica a través del método del Ácido Bicinconínico (BCA), utilizando el Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc.), con albúmina de suero bovino como estándar.

Se utilizó la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), marcador de MVM, para evaluar la pureza de las membranas. La actividad de esta enzima se determinó utilizando un kit de ensayo para fosfatasa alcalina (Valtek Diagnostics), que contiene p-nitrofenilfosfato como sustrato, produciéndose un aumento de absorbancia a 405 nm, proporcional a la concentración de enzima en la muestra. Posteriormente se calcula el enriquecimiento de cada fracción purificada con respecto al homogeneizado placentario.

2. Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis* y tratamientos realizados

2.1 Obtención de ovocitos de *Xenopus laevis*

Se utilizaron ranas hembras adultas, transportadas hasta el laboratorio en un recipiente con agua, 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 con Benzocaína al 0,02 %, durante 30-45 min hasta que no respondió frente a ningún estímulo.

Se realizó una incisión a nivel abdominal inferior derecho o izquierdo, se encontró el ovario y se extrajo un trozo de éste con ovocitos. Posteriormente se suturó en dos planos, capa muscular primero y luego la piel.

El trozo de ovario obtenido fue mantenido en solución de Barth (NaCl 88 mM, KCl 1 mM, Ca(NO₃)₂ 0,33 mM, CaCl₂ 0,41 mM, MgSO₄ 0,82 mM, NaHCO₃ 2,4 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4), suplementada con penicilina (100 UI/ml) y estreptomina (0,1 mg/ml) (Morales *et al.*, 1995); se observó a través de lupa la integridad macroscópica de los ovocitos y luego se mantuvieron en incubadora a una temperatura de 15-16 °C.

2.2 Aislamiento de ovocitos de *Xenopus laevis*

Se disgregó el trozo de ovario con pinzas Dumont n° 5, para luego ser sometido al tratamiento de digestión con colagenasa 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich Inc.) en solución OR-2 libre de Ca²⁺ (NaCl 82,5 mM, KCl 2 mM, MgCl 1 mM, Hepes 5 mM; pH 7,4), durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante. Mediante este proceso se logró remover tejido conectivo y células foliculares que rodeaban a cada ovocito, dejándolos completamente separados.

Posterior al tratamiento con colagenasa los ovocitos fueron lavados 5-6 veces con solución OR-2 libre de Ca²⁺, a temperatura ambiente, para remover la colagenasa.

Luego del lavado los ovocitos fueron puestos nuevamente en solución de Barth y, utilizando lupa y luz fría, se seleccionaron aquellos que se encontraron en los estadios V-VI de maduración (Dumont, 1972).

2.3 Inyección de MVM en ovocitos de *Xenopus laevis*

Una vez que los ovocitos fueron seleccionados, se les inyectó a nivel intracitoplasmático un volumen determinado de fracción de MVM purificada, no mayor de 65 nL, correspondiente a 200-300 ng de proteínas totales. Para ello se utilizó un inyector Nanoliter A203, WPI. Como control se dejaron ovocitos sin inyectar (Ivorra *et al.*, 2002).

Tanto ovocitos inyectados como controles fueron mantenidos en solución de Barth, en incubadora, entre 15-16 °C, durante 16-24 horas, tiempo suficiente para la correcta incorporación de la membrana purificada en la membrana plasmática del ovocito, para realizar posteriormente el registro electrofisiológico.

3. Registro de corrientes totales en ovocitos de *Xenopus laevis* por el método de Voltage Clamp

3.1 Criterios morfológicos de inclusión de ovocitos

Previo al registro electrofisiológico se evaluaron cuatro criterios morfológicos, tanto en ovocitos inyectados como controles, para ser incluidos en el estudio. Estos fueron:

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

3.2 Registro de corrientes totales mediante Voltage Clamp

Aquellos ovocitos que cumplieron los criterios de inclusión antes mencionados fueron sometidos al registro de corrientes totales. Cada ovocito fue ubicado en una cámara especial para el flujo continuo de soluciones, con una capacidad de 500 µL de volumen. Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente (20-25 °C).

Se introdujeron 2 electrodos en el citoplasma del ovocito, uno de corriente y otro de potencial (de resistencias 1-4 MΩ; llenados con KCl 3 M) 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, utilizando la técnica de *Voltage Clamp* de dos electrodos (Miledi, 1982) mediante un amplificador Oocyte Clamp 75-C (World Precision Instruments. Inc.), en respuesta a los siguientes estímulos de potencial dados:

- Pulsos de potencial desde -100 hasta +40 mV, en intervalos de 20 mV, con un potencial de mantención o *Holding potential* (Vh) de -60 mV.
- Rampas de potencial desde -120 hasta +40 mV, de 10 segundos de duración, Vh de -60 mV.

3.3 Criterios funcionales de inclusión de ovocitos para su registro

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

- Al insertar el electrodo de potencial, los ovocitos debían presentar un potencial de membrana mínimo de -15 mV.
- Ser capaces de mantener el potencial dado (clamp).
- No debían presentar pérdidas de corriente.

3.4 Soluciones de registro

La solución base para el registro electrofisiológico de los ovocitos fue Ringer Normal (RN; NaCl 115 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, Na-Hepes 5 mM, pH 7,4). Todas las soluciones a utilizar para registrar las corrientes se hicieron en base a ésta. Soluciones bajas en Cl⁻ fueron hechas sustituyendo el NaCl por una cantidad equimolar de NaI, NaF, NaBr o Na-gluconato. Soluciones con bloqueadores farmacológicos fueron hechas a partir de RN agregando la concentración deseada de bloqueador DIDS.

Las soluciones utilizadas se encuentran descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Soluciones utilizadas para el registro electrofisiológico de ovocitos mediante *Voltage Clamp*.

Concentración (mM)	RN	RN-DIDS	RNaF	RNaBr	RNaI	RNa gluc
NaCl	115	115	15	15	15	15
KCl	2	2	2	2	2	2
CaCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Na-Hepes	5	5	5	5	5	5
NaF			100			
NaBr				100		
NaI					100	
Na gluconato						100
DIDS		1				

3.5 Determinación de permeabilidad relativa de las corrientes totales

Para determinar la permeabilidad a otros aniones de las membranas trasplantadas se realizaron experimentos de reemplazo del Cl^- , cambiando secuencialmente por Br^- , I^- , gluconato y F^- en el baño. Se aplicó un protocolo de rampa desde -120 a +40 mV ($V_h = -60$ mV) en solución RN, luego se aplicó el mismo protocolo en soluciones experimentales Ringer NaBr, Ringer NaI, Ringer NaGluconato y Ringer NaF (ver soluciones en tabla 1). 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 esto, el V_{rev} de los canales en estudio debe ser medido dos veces: la primera vez sólo con el ión X en la solución externa (V_{revX}) y luego sólo con el ión experimental Y en la solución externa (V_{revY}). 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:

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

P_X : permeabilidad relativa para el ión X (en este caso Cl^-)

P_Y : permeabilidad relativa para el ión experimental Y

$[X]_{ext}$ e $[Y]_{ext}$: concentraciones externas de los iones respectivos

z: valencia del ión (en este caso -1)

F: constante de Faraday, 96500 C/mol

$(V_{revY} - V_{revX})$: corresponde al ΔV_{rev}

R: constante de disociación de los gases, 8,31 J /K/ mol

T: temperatura absoluta (°K), a 25 °C= 298 °K

RT/F a 25 °C= 25,69

4. Concentraciones iónicas intra y extracelulares en ovocitos de *Xenopus laevis*

Teniendo en consideración los datos aportados por la literatura, podemos citar las concentraciones iónicas intracelulares promedio, de los iones más importantes, para ovocitos de *Xenopus laevis*, pudiendo existir variaciones entre ovocitos (Weber, 1999). Las concentraciones iónicas extracelulares se consideraron según la composición de la solución de registro, RN. Ambas concentraciones se muestran a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones iónicas intra y extracelulares en ovocitos de *Xenopus laevis*, en solución RN.

	Concentración intracelular (mM)	Concentración extracelular (mM)
Na ⁺	10,4	120
K ⁺	108,6	2
Cl ⁻	43,5	120,6
Ca ⁺²	~100x10 ⁻⁶	1,8

5. Adquisición y análisis de datos obtenidos por *Voltage Clamp*

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

Se incluyeron en el análisis de ovocitos inyectados que incorporaron MVM, aquellos que presentaron una intensidad de corriente, a +40 mV de potencial, 60 % superior a la registrada en los ovocitos controles pertenecientes a la misma rana.

5.1 Presentación de resultados y análisis estadístico

Los resultados relacionados con el comportamiento poblacional de ovocitos frente a estímulos determinados de potencial, se presentan normalizados (%) de acuerdo a lo siguiente: el promedio de la intensidad de corriente del grupo control a un potencial de +20 mV, 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). Los promedios fueron comparados por prueba pareada de t de Student (*t-test*) y se consideraron significativos aquellos datos cuyo $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Obtención de membranas purificadas de placentas normales (PN) y con RCIU.

La patología del embarazo denominada RCIU es la incapacidad del feto para alcanzar su potencial de crecimiento, al momento del nacimiento el peso es bajo el 10° percentil para la población de referencia. La placenta con RCIU presenta un fenotipo placentario específico, caracterizado por placentas más pequeñas, con alteraciones tanto morfológicas como de flujo sanguíneo. En este caso se utilizaron placentas con RCIU que no presentaron patologías asociadas.

Las PN (n=18) y RCIU (n=5) se obtuvieron de los Hospitales San Borja Arriarán, San José y J.J. Aguirre y se trasladaron hasta el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas, para su posterior purificación y aislamiento de membranas, a través del protocolo descrito por Jiménez *et al.* (2004), detallado en la sección de Materiales y Métodos. El peso promedio para PN fue de 623 ± 84 g, con $38 \pm 1,8$ semanas promedio de gestación (n=18), y para RCIU fue de $486 \pm 54,1$ g con $38 \pm 1,1$ semanas promedio de gestación (n=5).

La determinación de la pureza y enriquecimiento de la MVM purificada de hSTB se midió mediante el marcador específico PLAP (Fosfatasa Alcalina Placentaria), previa determinación de concentración de proteínas, a través del método colorimétrico de BCA, descrito en Materiales y Métodos.

La tabla 3 muestra la concentración promedio de proteínas para cada fracción de membrana y el enriquecimiento de ellas en PLAP. El enriquecimiento se determina comparando la actividad enzimática promedio de cada fracción en relación a la actividad enzimática promedio del homogenato placentario en la siguiente razón: actividad fracción / actividad homogenato.

Tabla 3. Promedios de determinación de concentración de proteínas y enriquecimiento de PLAP para cada fracción obtenida de la purificación de membranas, en PN y con RCIU.

	Concentración de proteínas totales (mg/ml)	
	PN(n=6)	RCIU(n=5)
LMVM (Membrana Apical Liviana)	7,3 ± 1,7	7,1 ± 1,6
MVM (Membrana Apical Pesada)	6,9 ± 1,9	5,2 ± 1,7
BM (Membrana Basal)	6,7 ± 2,3	5,4 ± 1
	Enriquecimiento de PLAP *	
	PN(n=6)	RCIU(n=5)
LMVM (Membrana Apical Liviana)	23,7 ± 2,4	31,1 ± 5,4
MVM (Membrana Apical Pesada)	18,8 ± 2,5	27,9 ± 4,7
BM (Membrana Basal)	5,1 ± 1,9	5,7 ± 1,6

* El enriquecimiento es obtenido a través de la razón: actividad fracción / actividad homogenato.

Como se puede observar, los valores obtenidos de proteína y enriquecimiento de PLAP para PN y RCIU son similares. Por lo tanto, las características de la MVM RCIU son similares, en su grado de purificación y enriquecimiento, a PN.

Estas membranas purificadas, tanto de PN como RCIU, fueron utilizadas para los experimentos electrofisiológicos que se describen a continuación.

2. Trasplante de MVM de sinciotrofoblasto con RCIU a ovocitos de *Xenopus laevis*.

Dada la naturaleza sincicial de este epitelio, no se pueden aplicar técnicas tradicionales para el registro de corrientes totales mediante *Patch Clamp*. Por ello es de gran utilidad el estudio de estas membranas placentarias purificadas trasplantadas en ovocitos de *Xenopus laevis* y registradas posteriormente por el método de *Voltage Clamp*. De esta manera es posible medir la actividad de una población de canales iónicos exógenos, pertenecientes a la membrana placentaria, incorporados en la membrana plasmática del ovocito.

Por lo tanto, el primer paso para la detección de corrientes totales, es el trasplante de ovocitos con MVM purificada de placentas con RCIU; para ello se utilizaron 925 ovocitos, provenientes de 12 donadoras independientes, de los cuales 795 fueron inyectados y 130 ovocitos fueron dejados como controles sin inyectar. De los inyectados sobrevivieron 469 ovocitos, de los controles, 85 sobrevivieron; aquellos que cumplieron con los criterios morfológicos y funcionales de inclusión fueron sometidos a registro de corrientes totales por la técnica de *Voltage Clamp*. En el caso de los ovocitos inyectados, 66 (14 %) fueron registrados y de los controles se registraron 41 (48,2 %).

3. Incorporación funcional de MVM, en membranas plasmáticas de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Los ovocitos que cumplieron con los criterios de inclusión fueron seleccionados y dispuestos en una cámara diseñada para el flujo continuo de soluciones y perfundidos con solución RN, a temperatura ambiente (20-25 °C). Para realizar el registro de corrientes totales, mediante *Voltage Clamp*, se introdujeron dos electrodos al citoplasma del ovocito, uno de corriente y otro de potencial, de resistencia 1-4 M Ω ; llenados con KCl 3 M.

La incorporación funcional de canales iónicos exógenos dependientes de potencial se evaluó a través del registro de corrientes totales de membrana en respuesta a estímulos predeterminados: Pulsos de potencial desde -100 mV hasta +40 mV, en intervalos de 20 mV, (Vh -60 mV) y rampas de potencial desde -120 mV a +40 mV, (Vh -60 mV).

En los ovocitos inyectados el criterio utilizado para evaluar un trasplante exitoso, fue la presencia de una intensidad de corriente 60 % mayor a la registrada en ovocitos controles pertenecientes a la misma donadora, a un potencial de +20 mV. Del total de ovocitos inyectados registrados, un 72 % presentó una corriente total que superó ampliamente este criterio, en solución RN y, un 28 % de ellos, exhibió una magnitud de corriente igual o cercana a la del grupo control de ovocitos sin inyectar.

4. Corrientes exógenas provenientes de MVM RCIU.

La figura 5A muestra las corrientes generadas en respuesta a un protocolo de pulsos de potencial en un ovocito control *versus* un inyectado, como se mencionó en el párrafo anterior se puede observar que la magnitud de la corriente es mayor en el ovocito inyectado. Esta conducta se puede ilustrar en una curva de intensidad de corriente *versus* potencial (curva I/V). La figura 5B muestra una curva I/V con la respuesta promedio de la intensidad de corriente de ovocitos inyectados con MVM (n=66) y controles (n=41), frente a un protocolo de pulsos de potencial desde -100 a +40 mV con intervalos de 20 mV (Vh -60 mV). Estos datos fueron normalizados (%) con respecto al valor promedio de ovocitos controles a +20 mV de potencial ($I \% = I * 100 / I_{control +20}$). Al comparar ambos grupos, se puede observar que existe una diferencia estadísticamente significativa en la intensidad de corriente (t-test $p < 0,05$), casi 3 veces superior en ovocitos inyectados con MVM (~440 %) con respecto a los ovocitos controles sin inyectar a un potencial de +40 mV. Esta diferencia también fue significativa a -100 mV de potencial. Estos resultados confirman la tendencia mostrada a nivel individual (fig. 5A), donde el conjunto de ovocitos trasplantados con MVM presentaron una intensidad de corriente mayor a la de los controles. Esta diferencia en intensidad de corriente entre inyectados y controles es lo que se conoce como corriente exógena, ya que proviene de los canales exógenos trasplantados.

Adicionalmente, los ovocitos inyectados que presentaron corrientes exógenas, mostraron un cambio en el potencial de inversión (V_{rev} ; potencial en el cual la membrana tiene una corriente neta igual a cero, el flujo total de cargas es nulo), siendo $-39,4 \pm 1,8$ mV en ovocitos controles, se desplazó a $-25,7 \pm 1,2$ mV en ovocitos inyectados.

Tanto el aumento de corriente como el desplazamiento del V_{rev} en la población de ovocitos inyectados, es el reflejo de la participación de canales exógenos catiónicos y/o aniónicos que fueron incorporados en la membrana del ovocito.

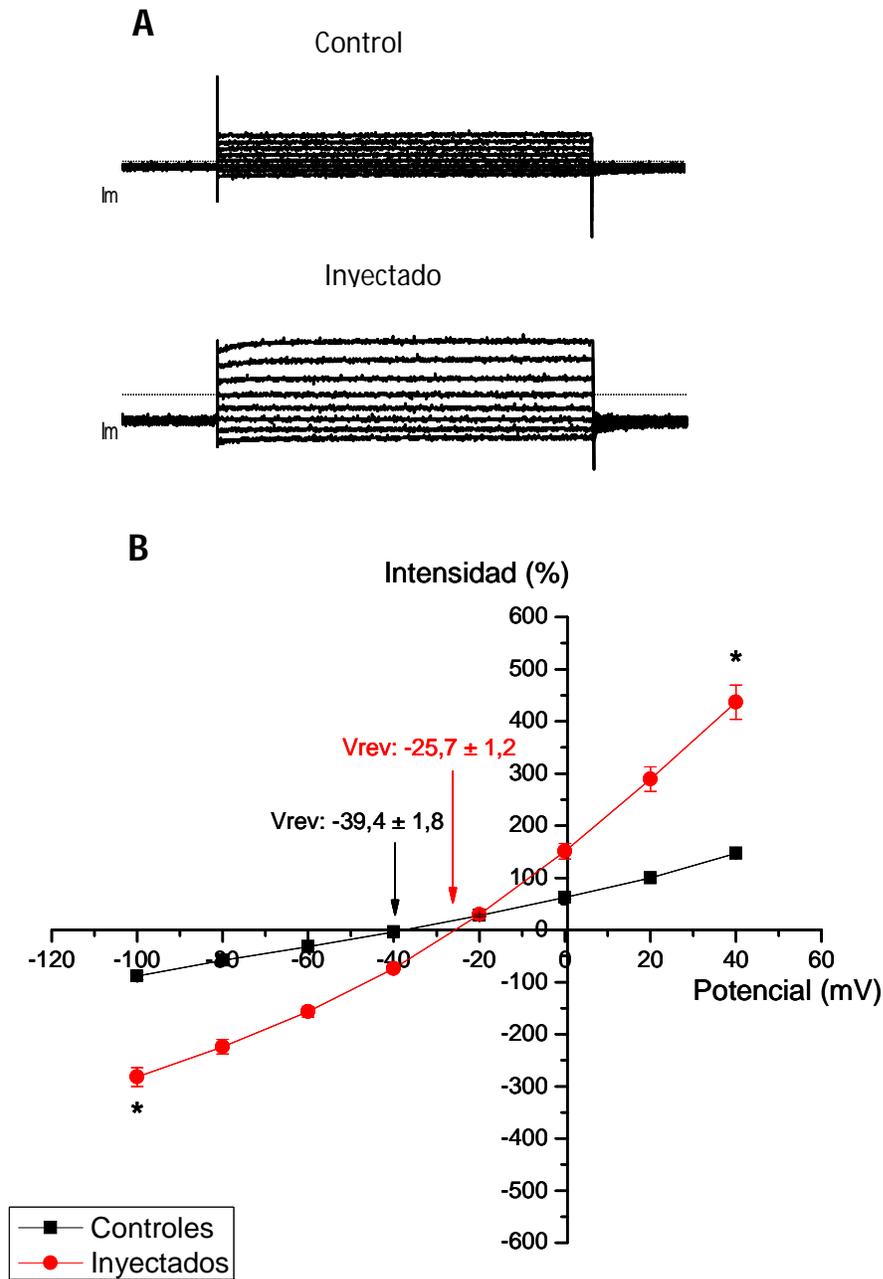


Figura 5. Incorporación funcional de MVM de sinciotrofoblasto con RCIU en membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus laevis* a nivel poblacional. A. Registro representativo de corrientes de membrana registradas en un ovocito sin inyectar y otro inyectado provenientes de la misma donadora. B. Curva I/V para la intensidad de corriente normalizada obtenida al someter a pulsos de potencial de -100 a +40 mV con intervalos de 20 mV (V_h -60 mV) en solución RN, a ovocitos inyectados con MVM ($n = 66$) y a ovocitos controles ($n = 41$) pertenecientes a 12 donadoras. La flecha negra indica el valor promedio del potencial de inversión (V_{rev}) para la curva de ovocitos controles. La flecha roja indica el respectivo

valor promedio del V_{rev} para ovocitos inyectados. Normalización (%) con respecto al valor promedio de ovocitos controles a +20 mV de potencial ($I \% = I * 100 / I_{control +20}$). * T-test $p < 0,05$.

4.1 ¿Qué clase de canales generaron la corriente exógena?

Para determinar qué tipo de canales, aniónicos o catiónicos, estarían involucrados en la corriente exógena generada en los ovocitos trasplantados con MVM, se tomaron los valores del potencial de equilibrio teórico (V_{eq}) para los principales iones participantes en el medio intra y extracelular del ovocito; con este propósito la ecuación de Nernst entrega el potencial de membrana al cual los gradientes de concentración eléctricos y químicos son iguales y opuestos, por lo que no existe un flujo neto para una especie iónica determinada.

$$V_{eq} = RT/zF (\ln C_e/C_i)$$

R: constante universal de los gases ideales, 8315 joule/°K mol.

T: temperatura en grados Kelvin (°K)

F: constante de Faraday, 96500 C/mol

z: carga del ion

C_e : concentración extracelular del ión

C_i : concentración intracelular del ión

Utilizando los valores teóricos de las concentraciones intracelulares del ovocito, dadas por Weber (1999), conociendo las concentraciones de los principales componentes iónicos de nuestro sistema, Na^+ , K^+ y Cl^- y las concentraciones en la solución utilizada (ver tabla 2 en Materiales y Métodos) se calcularon los potenciales de equilibrio teórico para cada ión. Estos valores se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Potenciales de equilibrio teórico (V_{eq}) para Na^+ , K^+ y Cl^- .

Solución de registro	$V_{eq} Cl^-$	$V_{eq} Na^+$	$V_{eq} K^+$
RN	-25,4 mV	61,7 mV	-100,8 mV

Valores obtenidos utilizando la ecuación de Nernst para los principales iones intra y extracelulares en ovocitos de *Xenopus laevis*, en solución de registro RN.

Como se puede deducir en la tabla 4, el potencial de equilibrio teórico del Cl^- es cercano al potencial de inversión experimental ($-25,7 \pm 1,2$ mV) alcanzado por los ovocitos inyectados en solución RN (fig. 5B), esto sugiere que el principal componente de estas corrientes totales es el Cl^- .

4.2 ¿Cuáles son las conductancias de las corrientes exógenas?

La inyección de MVM en ovocitos produjo cambios significativos en las propiedades de membrana, tal como se mostró en el punto 4.1, en los ovocitos inyectados el potencial de membrana (V_m) promedio fue menor a los ovocitos sin inyectar, acercándose mucho más al V_{eq} de Cl^- . Esto sugiere que el responsable de la corriente exógena es fundamentalmente Cl^- y que este ión pasa a través de canales de Cl^- provenientes de MVM placentaria.

Una forma de medir la corriente macroscópica que fluye a través de la membrana a un potencial determinado, es la conductancia de cuerda (g). Siendo: $g = I / (V - V_{rev})$; expresada en Siemens (S). Ésta fue mayor en ovocitos inyectados, comparado con los controles.

Las diferencias entre ovocitos inyectados y controles son las que se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades de membrana de ovocitos controles sin inyectar *versus* ovocitos inyectados con MVM RCIU.

	V_m (mV)	V_{rev} (mV)	g -100 mV (μS)	g +40 mV (μS)
Controles	$-32,01 \pm 2,1$ (41; 12)	$-39,4 \pm 1,8$ (41; 12)	$1,48 \pm 0,09$ (41; 12)	$1,94 \pm 0,2$ (41; 12)
Inyectados	$-24,7 \pm 1,7$ (66; 12)	$-25,7 \pm 1,2^*$ (66; 12)	$3,76 \pm 0,5^*$ (66;12)	$6,64 \pm 0,9^*$ (66; 12)

Se muestran los respectivos valores de potencial de membrana (V_m), potencial de inversión (V_{rev}) y conductancia de cuerda (g) a -100 y +40 mV, para los ovocitos en solución RN. Valores corresponden a promedio \pm DS. Adyacente a cada valor, número de ovocitos y su respectivo número de donadoras (# ovocitos; # donadoras). * T-test $p < 0,05$.

5. Características de las corrientes provenientes de MVM trasplantada en ovocitos de *Xenopus laevis*

5.1 Identificación de la corriente exógena de Cl^- en MVM trasplantada y cuantificación de su conductancia.

Los ovocitos inyectados que incorporaron funcionalmente canales provenientes de MVM trasplantada presentaron una corriente total mayor a la de los ovocitos sin inyectar. La figura 6 muestra el comportamiento individual de dos ovocitos, provenientes de la misma donadora, uno sin inyectar y otro inyectado con MVM, al aplicarles un estímulo de potencial desde -100 a +40 mV, con intervalos de 20 mV (V_h : -60 mV), en una curva de intensidad de corriente *versus* potencial. Se puede observar que la magnitud de corriente en el ovocito inyectado es muy superior a la que presenta el ovocito control, esta diferencia es lo que se conoce como corriente exógena. Además se calculó la conductancia de cuerda a -100 y +40 mV, siendo mayor en el inyectado a ambos potenciales. Este aumento en la conductancia da cuenta de la incorporación funcional de una corriente exógena en los ovocitos trasplantados con MVM, que correspondería a la diferencia entre inyectados y controles, como lo señala la figura 6 a nivel individual, para un ovocito control *versus* un inyectado.

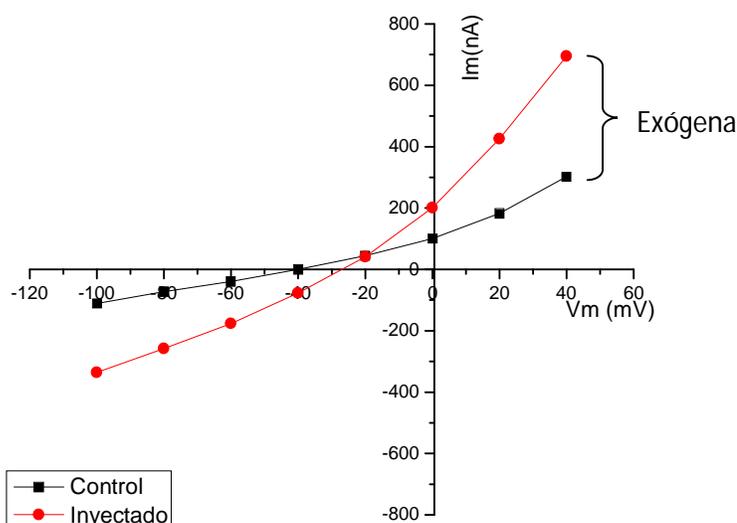


Figura 6. Incorporación funcional de MVM y generación de una corriente exógena a nivel individual. Curva I/V que grafica la respuesta en intensidad de corriente obtenida en un ovocito control *versus* un inyectado, pertenecientes a la misma donadora, frente a pulsos de potencial de -100 a +40 mV, con intervalos de 20 mV (V_h : -60 mV) en solución RN. La llave indica la diferencia en magnitud de corriente entre inyectado y control, es decir la corriente exógena. La conductancia de cuerda (g) calculada para el ovocito control fue $1,84 \mu\text{S}$ a -100 mV y $3,77 \mu\text{S}$ a +40 mV. En el ovocito inyectado fue de $4,59 \mu\text{S}$ a -100 mV y $10,37 \mu\text{S}$ a +40 mV.

La figura 7 muestra lo que ocurre a nivel poblacional, en un total de 41 ovocitos controles *versus* 66 ovocitos inyectados, sometidos a pulsos de potencial de -100 a +40 mV, con intervalos de 20 mV. Si comparamos lo que ocurre a potenciales de -100 y +40 mV, podemos ver que los inyectados presentan más corriente que los controles, esta diferencia corresponde a la corriente exógena. La conductancia de cuerda obtenida a nivel poblacional fue mayor en los ovocitos inyectados (tabla 5). Las corrientes fueron normalizadas con respecto al valor promedio, predeterminado en 100 % a +20 mV de potencial.

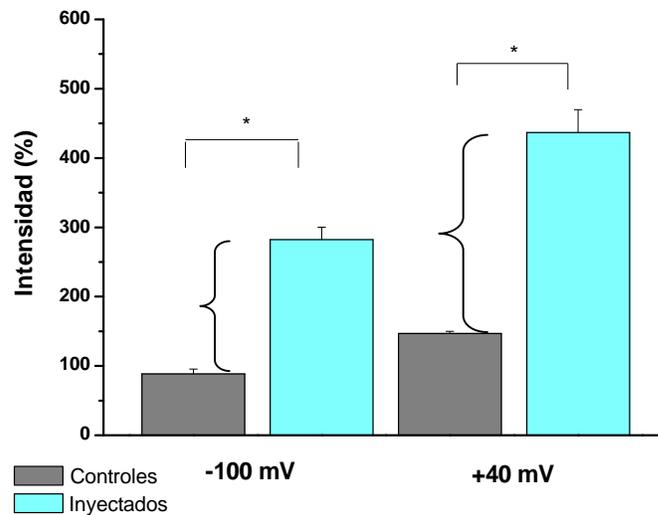


Figura 7. Identificación de corriente exógena a nivel poblacional en ovocitos de *Xenopus laevis*. La barra gris corresponde a la corriente proveniente de los ovocitos controles (n= 41) y la barra verde a la corriente proveniente de los inyectados (n= 66), a -100 y +40 mV. La diferencia entre éstas es la corriente exógena, indicada por la llave. * T-test p<0,05.

5.2 Efecto de DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbena-2,2 disulfónico), bloqueador específico de canales de Cl⁻, sobre las corrientes exógenas.

Con el fin de comprobar que las corrientes exógenas presentadas por los ovocitos inyectados con MVM son mayoritariamente corrientes provenientes de canales iónicos de Cl⁻, se aplicó un conocido bloqueador de canales de Cl⁻, DIDS, en ovocitos inyectados y en controles sin inyectar.

La figura 8 muestra lo que sucede a nivel individual con un ovocito inyectado, sometido a un protocolo de pulsos desde -100 a +40 mV, registrado en RN y luego aplicando DIDS en concentración 1mM. Se observó una disminución en la intensidad de corriente de aproximadamente un 56 % luego de aplicar DIDS a -100 y +40 mV.

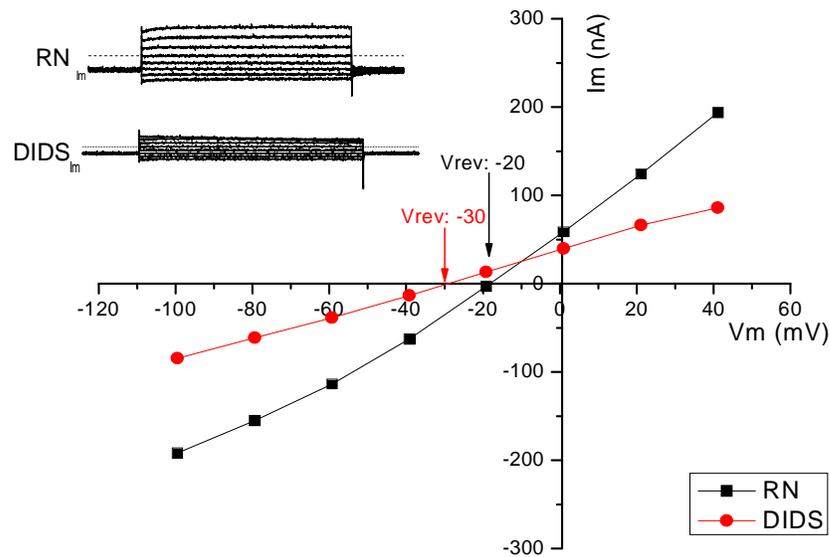


Figura 8. Curva I/V donde se representa el efecto del bloqueo con 1 mM de DIDS sobre un ovocito inyectado con su respectivo registro con y sin DIDS. Además de la diferencia en intensidad de corriente, se observa un desplazamiento en el potencial de inversión, desde -20 mV en RN a -30 mV al agregar DIDS.

Utilizando el mismo protocolo de pulsos para ovocitos controles e inyectados se cuantificó el bloqueo de DIDS sobre las corrientes endógenas (ovocitos controles) para así poder cuantificar, cuánto del bloqueo total sobre los ovocitos inyectados correspondió a un bloqueo de corrientes exógenas. A la corriente total de los ovocitos inyectados en RN se le restó la corriente de los ovocitos controles, lo mismo con DIDS; esto fue hecho para potenciales negativos y positivos por separado.

La figura 9 muestra el efecto de DIDS 1 mM sobre la corriente exógena presente en los ovocitos inyectados, el porcentaje de bloqueo logrado fue de 45 % a -100 mV y 78 % a +40 mV.

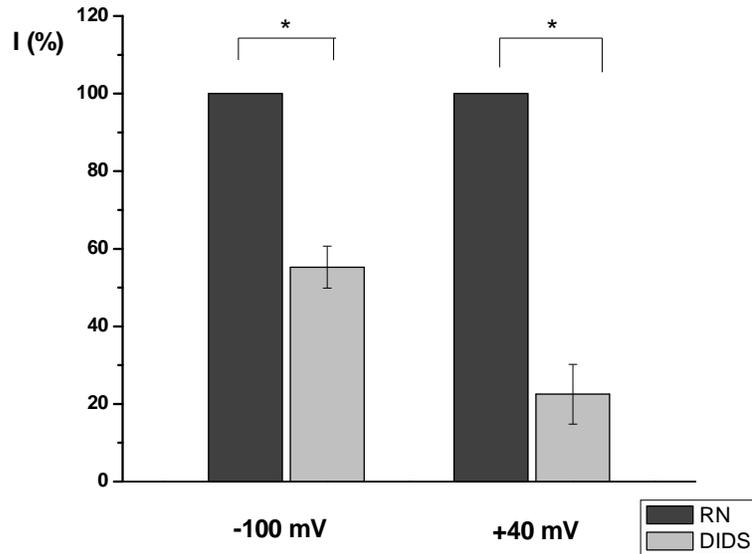


Figura 9. Gráfico de barras que muestra el efecto de DIDS 1 mM sobre la corriente exógena de ovocitos trasplantados (n= 18), a potenciales positivos y negativos. La barra gris oscuro representa el 100 % de la corriente exógena en solución RN, la barra gris claro es la corriente exógena restante luego de añadir DIDS 1 mM. * T-test $p < 0,05$.

5.3 Identificación de permeabilidades relativas de las corrientes totales.

Para determinar la permeabilidad relativa a otros aniones en las membranas trasplantadas, se realizaron experimentos de reemplazo de Cl^- por Br^- , I^- , gluconato y F^- , aplicando un protocolo de rampa desde -120 a +40 mV ($V_h = -60$ mV). La figura 10 muestra lo que sucede con un ovocito inyectado con MVM, en las distintas soluciones experimentales, representado en una curva I/V para cada situación. En cada caso se compara la solución RN con la solución experimental a analizar y se puede ver que presentan distintos V_{rev} .

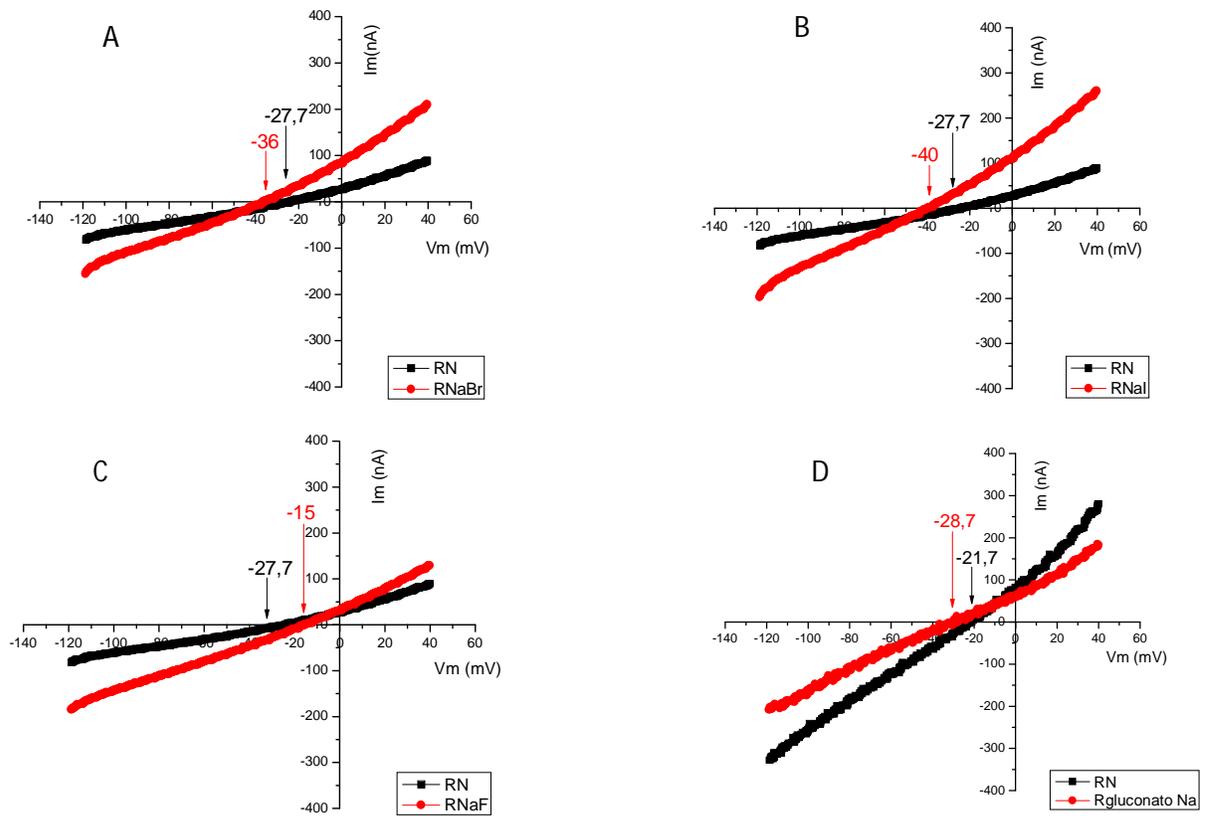


Figura 10. Curvas I/V representativas del comportamiento de un ovocito inyectado, sometido a un protocolo de rampa, en diferentes soluciones de reemplazo aniónico. El ovocito fue registrado bajo un protocolo de rampa de -120 a +40 mV (V_h : -60 mV), se aprecia el desplazamiento del potencial de inversión al cambiar de solución, desde RN a la solución en estudio. En cada caso individual el potencial de inversión para cada solución fue: A) RN: -27,7 mV; RNaBr: -36 mV. B) RN: -27,7 mV; RNal: -40 mV. C) RN: -27,7 mV; RNaF: -15 mV. D) RN: -21,7 mV; R Na gluconato: -28,7 mV.

La tabla 6 muestra los ΔV_{rev} y las permeabilidades relativas obtenidas en las distintas soluciones experimentales, al cambiar el Cl^- por Br^- , I^- , F^- y gluconato. Estos resultados fueron obtenidos de un total de 15 ovocitos registrados bajo el protocolo de rampa desde -120 a +40 mV (V_h : -60 mV), en las soluciones experimentales Ringer NaBr, Ringer Nal, Ringer NaF y Ringer gluconatoNa.

Tabla 6. Permeabilidad relativa resultante del reemplazo aniónico de Cl⁻ por Br⁻, I⁻, F⁻, Gluconato, en ovocitos inyectados con MVM proveniente de placenta con RCIU.

Ion X	Ion experimental Y	ΔV_{rev}	Py/Px
Cl ⁻	Br ⁻	-6,2 ± 1,1 (n=5)	1,1
Cl ⁻	I ⁻	-11,6 ± 2,2 (n=5)	1,3
Cl ⁻	F ⁻	9,8 ± 2,5 (n=5)	0,6
Cl ⁻	Gluconato	-8,6 ± 2,3 (n=4)	1,2

Estos resultados se obtuvieron de un total de 15 ovocitos inyectados, que fueron sometidos al cambio de solución.

Esto significa que por cada molécula de Cl⁻ que difunde a través de la MVM también lo hacen 1,1 de Br⁻; 1,3 de I⁻; 0,6 de F⁻ y 1,2 de gluconato. Por lo tanto, la secuencia de permeabilidades resultantes es: I⁻ > gluconato > Br⁻ > Cl⁻ > F⁻.

6. Comparación de corrientes de Cl⁻ obtenidas por Voltage Clamp en PN y con RCIU.

Experimentos realizados con MVM proveniente de PN se usaron para realizar una comparación entre las corrientes obtenidas a partir de PN y RCIU. La figura 11 muestra la corriente obtenida, normalizada ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +20}$), de una población de ovocitos inyectados con MVM PN, otra población inyectada con MVM RCIU y otra población de ovocitos sin inyectar. Ambos grupos inyectados presentaron más corriente que los controles, lo que implica que se realizó una incorporación funcional de la MVM trasplantada, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre las poblaciones inyectadas.

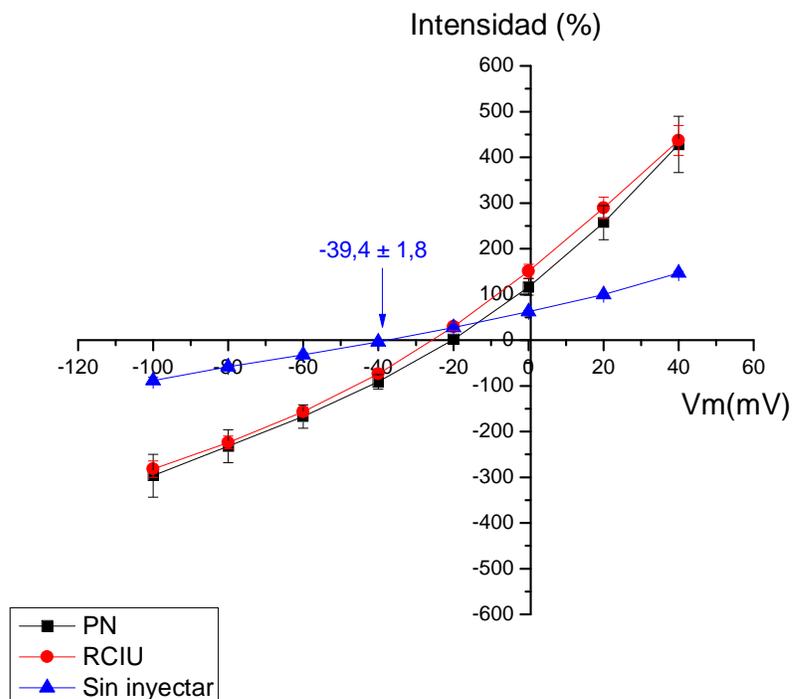


Figura 11. Curva I/V que compara lo que ocurre con ovocitos controles e inyectados con PN y RCIU. Curva I/V para la intensidad de corriente normalizada obtenida al someter a pulsos de potencial de -100 a +40 mV con intervalos de 20 mV (Vh: -60 mV) en solución RN, a ovocitos controles (n=41), ovocitos inyectados con MVM RCIU (n= 66) y ovocitos inyectados con MVM PN (n= 22). Normalización (%) con respecto al valor promedio de ovocitos controles a +20 mV de potencial ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control } +20}$).

Las figuras 11 y 12 muestran que:

6.1 Potencial de inversión (Vrev).

Los potenciales de inversión para los ovocitos inyectados fueron $-20,1 \pm 1$ mV (n= 22) para PN, $-25,7 \pm 1,2$ mV (n= 66) para RCIU, $-39,4 \pm 1,8$ mV (n= 41) para ovocitos sin inyectar, y no hubo diferencias significativas entre PN y RCIU.

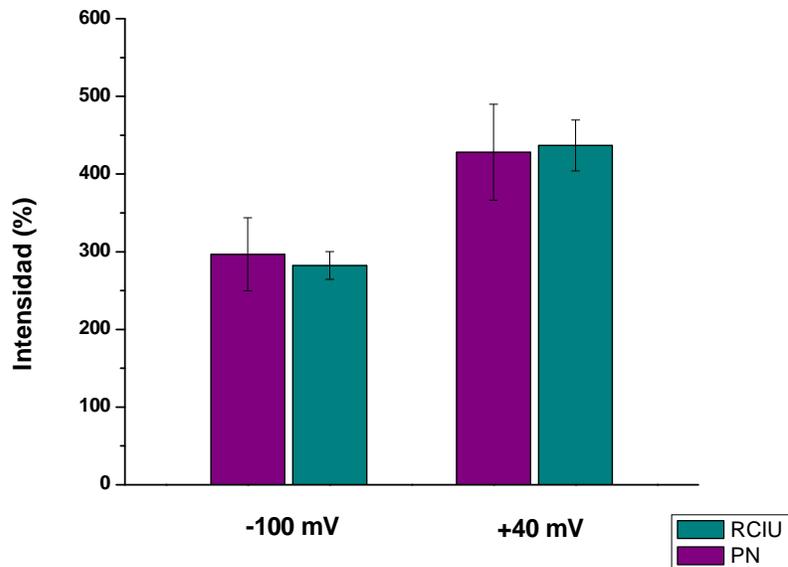


Figura 12. Comparación entre PN versus RCIU a potenciales de -100 y +40mV. Comparación de datos normalizados ($I\% = I \cdot 100 / I_{\text{control} +20}$), provenientes de ovocitos inyectados con MVM PN (barra color morado, n=22) e inyectados con MVM RCIU (barra color verde, n=66), sometidos a pulsos de potencial de -100 a +40 mV, con intervalos de 20 mV (Vh: -60 mV).

6.2 Conductancia.

Como se puede observar las corrientes obtenidas de los ovocitos inyectados con MVM RCIU fueron similares a las obtenidas a partir de MVM PN, siendo las conductancias de cuerda (g) para los ovocitos inyectados con PN: $2,9 \pm 0,09 \mu\text{S}$ a -100 mV, $5,7 \pm 0,4 \mu\text{S}$ a +40 mV. En el caso de RCIU fueron: $3,76 \pm 0,5 \mu\text{S}$ a -100 mV y $6,64 \pm 0,9 \mu\text{S}$ a +40 mV.

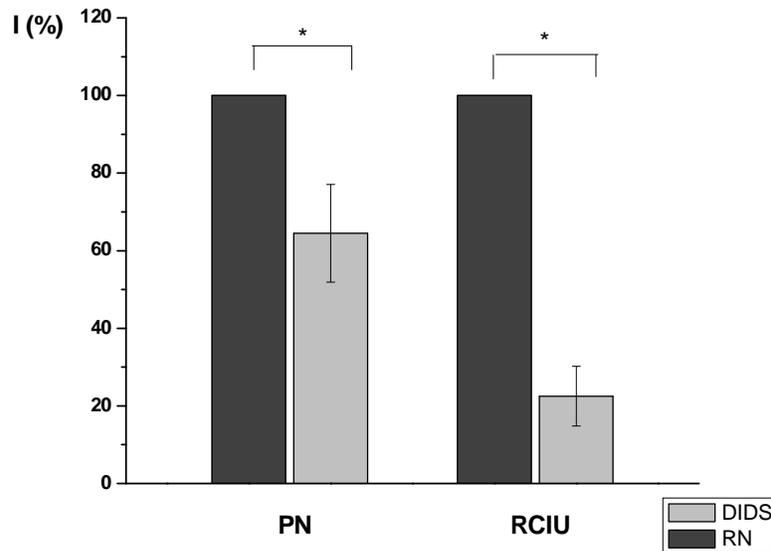


Figura 13. Efecto de DIDS 1 mM sobre la corriente exógena de ovocitos trasplantados con PN (n= 5) y RCIU (n= 18), a potencial de +40 mV. La barra gris oscuro representa el 100 % de la corriente exógena en solución RN, la barra gris claro es la corriente exógena restante luego de añadir DIDS 1 mM. * T-test $p < 0,05$.

6.3 Bloqueo por DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico).

En cuanto a la sensibilidad de estas corrientes provenientes de MVM PN, al bloqueador de canales de Cl^- DIDS, la figura 13 muestra el efecto de DIDS 1 mM, sobre la corriente exógena presente en ovocitos inyectados con PN (n= 5) y RCIU (n= 18), a potencial positivo de +40 mV. En PN el bloqueo fue de 36 %, mientras que en RCIU fue de 78 %. Estos datos sugieren una mayor sensibilidad a este bloqueador de las corrientes de Cl^- provenientes de MVM RCIU.

DISCUSIÓN

El aporte fundamental del presente trabajo fue la incorporación funcional de corrientes de Cl^- provenientes de MVM de placenta con RCIU, en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus laevis*, caracterizadas mediante la técnica de *Voltage Clamp*. El 72 % de los ovocitos inyectados presentó corrientes casi tres veces superiores a los ovocitos sin inyectar, demostrando la incorporación de una corriente exógena proveniente de MVM RCIU (Restricción de Crecimiento Intrauterino). Además esta corriente exógena fue sensible a DIDS (ácido 4,4-diisotiocianatostilbeno-2,2 disulfónico), bloqueador de canales de Cl^- .

Las membranas utilizadas en este estudio se obtuvieron a través de un protocolo de purificación de MVM y BM a partir de una misma placenta (Jiménez *et al.*, 2004). Este método es utilizado rutinariamente para la purificación de membranas provenientes de PN (Placenta Normal), sin embargo, fue la primera vez que se utilizó en la purificación de membranas provenientes de placentas con RCIU. Las membranas purificadas obtenidas de PN (n= 6) y RCIU (n= 5), fueron sometidas a la determinación de proteínas y enriquecimiento de PLAP, marcador específico de MVM. Las membranas purificadas, normales y patológicas, no presentaron diferencias entre ellas en concentración de proteínas y PLAP en las tres fracciones, LMVM, MVM y BM. Por lo tanto, los resultados para PN son concordantes con lo reportado por Jiménez *et al.* (2004), y además son similares a los obtenidos para RCIU. Resultados obtenidos en un trabajo paralelo en cortes histológicos de hSTB provenientes de PN y RCIU, donde se realizó inmunotinción con α PLAP, demostraron una reacción positiva a la tinción con anti α PLAP sólo en MVM, tanto en PN como RCIU, corroborando que el marcador PLAP es adecuado para la calificación de MVM purificada (Bastías, 2010).

Para los experimentos electrofisiológicos, los ovocitos utilizados como controles sin inyectar presentaron un V_m de -32 mV, concordante con lo descrito por la literatura, que los sitúa entre -30 y -70 mV, pudiendo existir diferencias estacionales en estos valores (Weber, 1999). Respecto al V_{rev} en estos controles fue de -39 mV, cercano a -34 mV reportado por Díaz *et al.* (2008). Esto demuestra que la población de ovocitos controles utilizados reprodujo las características entregadas por la literatura.

Los ovocitos inyectados con MVM PN y MVM RCIU presentaron incorporación de canales exógenos, lo que se reflejó en el aumento de las corrientes registradas en comparación con los ovocitos sin inyectar. En el caso de PN la incorporación funcional de la membrana trasplantada originó un V_{rev} de -20 mV y conductancias de cuerda de 2,9 μS a -100 mV y 5,7 μS a +40 mV. Respecto al efecto del bloqueador DIDS, obtuvimos un 36 % de bloqueo. Existen diferencias entre nuestros resultados y los reportados por la literatura, que pueden atribuirse a que el número de ovocitos inyectados con MVM PN fue reducido.

Esto hace necesario enfocar esta discusión comparando los resultados obtenidos para RCIU con los dos conjuntos de datos de placentas normales, el generado por este estudio y lo reportado por Ivorra *et al.* (2002).

Los resultados descritos en anteriormente muestran que los ovocitos trasplantados con MVM RCIU tienen algunas características similares a PN y otras diferentes, es así que:

- El potencial de membrana de los ovocitos inyectados con RCIU fue -24,7 mV, para nuestras PN fue de -22,8 mV, para Ivorra *et al.* (2002) fue de -28,1 mV. Concordando estos valores en las tres situaciones mencionadas.

- El V_{rev} experimental fue -25 mV para RCIU, -20 mV para nuestras PN y -19 mV para Ivorra *et al.* (2002). En todos los casos este V_{rev} obtenido fue cercano al potencial de equilibrio teórico del cloruro (V_{eq}) -25,4 mV. Esto sugiere que el principal componente de estas corrientes totales es el Cl^- tanto en RCIU como en PN.

- La conductancia de cuerda obtenida para ovocitos inyectados con MVM RCIU fue similar a la obtenida para nuestros ovocitos inyectados con PN, pero menores a lo reportado por Ivorra *et al.* (2002).

- El efecto del bloqueador de canales de Cl^- , DIDS, sobre corrientes totales de los ovocitos inyectados con MVM RCIU fue muy superior al efecto detectado en nuestros ovocitos PN. El porcentaje de bloqueo alcanzó un 44,8 % a -100 mV y 77,5 % a +40 mV.

- La permeabilidad aniónica de los canales de Cl^- provenientes de MVM RCIU a diferentes aniones fue: Br: I: F: gluconato = 1,1: 1,3: 0,6: 1,2.

Así se obtiene la siguiente secuencia de permeabilidad: $I^- > gluconato^- > Br^- > Cl^- > F^-$.

Esto presenta una pequeña variación con lo reportado por Ivorra *et al.* (2002), cuya secuencia de permeabilidad es: $I^- > Br^- > Cl^- > metanosulfonato \approx gluconato$. Esta diferencia podría deberse a la patología.

En resumen, se obtuvieron corrientes de Cl^- provenientes de MVM RCIU, trasplantadas en ovocitos de *Xenopus laevis*, que tuvieron conductancias, potencial de membrana, potencial de inversión diferentes a los ovocitos sin inyectar, demostrando que hay corrientes exógenas provenientes de MVM RCIU. Dado que su potencial de inversión corresponde a corrientes de Cl^- , con características similares a las provenientes de PN, podemos decir que hemos obtenido corrientes exógenas de Cl^- provenientes de placentas con RCIU. Sin embargo, estas corrientes tienen algunas características diferentes que podrían ser producto de la patología. Esto es, por ejemplo, que las corrientes de Cl^- de RCIU son mucho más sensibles al bloqueador DIDS comparadas con las corrientes de PN, así como también, los estudios de permeabilidad sugieren diferencias. Esta es la primera vez que se describen estas corrientes en MVM provenientes de placentas con esta patología, sugiriendo además que hay alteraciones en el transporte de Cl^- asociado a canales presentes en ellas.

La importancia de los resultados expuestos en este trabajo, es que son la base para saber qué ocurre con el transporte de Cl^- en esta patología. Como fue demostrado por Vallejos y Riquelme (2007), este canal de Cl^- es permeable a taurina, un aminoácido muy importante para el desarrollo del feto, involucrado en la

regulación del volumen celular. Se ha visto que en Preeclampsia este canal permanece abierto por más tiempo y sigue siendo permeable a taurina (Bernucci *et al.*, 2003), por lo que podría ser una ruta de escape de taurina hacia el lado materno, llegando menos hacia el feto; de suceder lo mismo en RCIU podría explicar la disminución de los niveles fetales de taurina. Por lo tanto, sería de gran importancia seguir investigando qué ocurre con este aminoácido en la RCIU.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron membranas purificadas provenientes de placentas con RCIU, apropiadas para el trasplante en ovocitos de *Xenopus laevis* y su caracterización a través de la técnica electrofisiológica de *Voltage Clamp*.
- Se identificaron corrientes de Cl^- provenientes de membrana apical de placenta con RCIU.
- Las corrientes de Cl^- identificadas fueron sensibles a DIDS.
- Existen diferencias entre las corrientes de Cl^- provenientes de placenta normal versus RCIU en cuanto a la sensibilidad a DIDS, bloqueador de canales de Cl^- .

BIBLIOGRAFÍA

- **AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A.** 2002. Taurine and taurine deficiency in the perinatal period. *Journal of Perinatal Medicine*. 30(4): 281-286.
- **BASTIAS, N.** 2010. Detección y caracterización de expresión de citoqueratinas 7, 18 y 19 en sinciotrofoblasto placentario humano normal y afectado con preeclampsia y con restricción de crecimiento intrauterino. Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile. pp: 1-64.
- **BERNUCCI, L.; UMAÑA, F.; LLANOS, P.; RIQUELME, G.** 2003. Large chloride channel from pre-eclamptic human placenta. *Placenta*. 24(8-9): 895-903.
- **BIRDSEY, T.; BOYD, R.; SIBLEY, C.; GREENWOOD, S.** 1999. Effect of hiposmotic challenge on microvillous membrane potential in isolated human placental villi. *American Journal of Physiology*. 276: R1479-R1488.
- **BOSCO, C.** 1999. Placenta. **In:** Embriología Humana. Depto. Morfología Experimental. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile. pp: 89-107.
- **BROWN, P.D.; GREENWOOD, S.L.; ROBINSON, J.; BOYD, R.D.** 1993. Chloride channels of high conductance in the microvillous membrane of term human placenta. *Placenta*. 14: 103-115.
- **CETIN, I.; ALVINO, G.** 2009. Intrauterine Growth Restriction: Implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta*. 30(23): S77-S82.
- **DIAZ, P.** 2003. Seguimiento inmunohistoquímico de proteínas en tejido y en ovocitos de *Xenopus laevis* microinyectados con membranas placentarias purificadas. Escuela de Tecnología Médica. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Chile. pp: 1-71.
- **DIAZ, 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: 883-891.
- **DUMONT, J.** 1972 Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin).I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*. 136(2): 153-179.

- **ESPINOZA, R.; LAGOS, R.; GUERRA, F.** 2003. Restricción del crecimiento intrauterino. [en línea] <<http://www.cedip.cl/Guias/Guia2003/capitulo14.swf>> [consulta: 19 Agosto 2010].
- **GUDE, N.; ROBERTS, C.; KALIONIS, B.; KING, R.** 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* 114: 397-407.
- **HULTMAN, K.; ALEXANDERSON, C.; MANNERAS, L.; SANDBERG, M.; HOLMANG, A.; JANSSON, T.** 2007. Maternal taurine supplementation in the late pregnant rat stimulates postnatal growth and induces obesity and insulin resistance in adult offspring. *Journal of Physiology*. 579.3: 823-833.
- **ILLSLEY, N.P.; WANG, Z.Q.; GRAY, A.; SELLERS, M.C; JACOBS, M.M.** 1990. Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1029 (2): 218-226.
- **IVORRA, I.; HENRÍQUEZ, M.; LAX, P.; RIQUELME, G.; MORALES, A.** 2002. Functional transplantation of chloride channels from the human syncytiotrophoblast microvillous membrane to *Xenopus* oocytes. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 444(6): 685-691.
- **JANSSON, T.; POWELL, T.L.** 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*. 113: 1-13.
- **JIMÉNEZ, 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.
- **JOHANSSON, M.; JANSSON, T.; GLAZIER, J.D.; POWELL, T.L.** 2002. Activity and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger is reduced in syncytiotrophoblast microvillous plasma membranes isolated from preterm intrauterine growth restriction pregnancies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 87: 5686-5694.
- **JOHANSSON, M.; KARLSSON, L.; WENNERGREN, M.; JANSSON, T.; POWELL, T.L.** 2003. Activity and protein expression of Na⁺/K⁺ ATPase are reduced in microvillous syncytiotrophoblast plasma membranes isolated from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88: 2831-2837.
- **KOESTER, J.; SIEGELBAUM, S.** 1997. Canales iónicos. In: Kandel, E.; Jessel, T.; Schwartz, J. *Neurociencia y Conducta*. España. Editorial Prentice Hall. pp: 122-141.

- **LATORRE, R., LÓPEZ-BARNEO, J., BEZANILLA, F., LLINÁS, R.** 1996. Biofísica y fisiología celular. Universidad de Sevilla. España. pp. 3-49.
- **MILEDI, R.** 1982. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences. 215(1201): 491-497.
- **MORALES, A.; ALEU, J.; IVORRA, I.; FERRAGUT, J.A.; GONZALEZ-ROS, J.M.; MILEDI, R.** 1995. Incorporation of reconstituted acetylcholine receptors from Torpedo into the *Xenopus* oocyte membrane. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 92(18): 8468-8472.
- **NORBERG, S.; POWELL, T.L.; JANSSON, T.** 1998. Intrauterine growth restriction is associated with a reduced activity of placental taurine transporters. Pediatric Research. 44: 233-238.
- **OYARZÚN, E.** 1997. Retardo de crecimiento intrauterino. **In:** Oyarzún, E. y Badía, J. Manual de alto riesgo obstétrico. [en línea] <<http://escuela.med.puc.cl/publ/AltoRiesgo/RCIU01.html>> [consulta: 19 Agosto 2010].
- **PELEG, D.; KENNEDY, C.M.; HUNTER, S.K.** 1998. Intrauterine growth restriction: Identification and management. American Family Physician. 58(2):453-460.
- **RIQUELME, G.; STUTZIN, A.; BARROS, L.F.; LIBERONA, J.L.** 1995. A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. American Journal of Obstetrics and Gynecology. 173: 733-738.
- **ROSS, S.; POWELL, T.L.; JANSSON, T.** 2004. Human placental taurine transporter in uncomplicated and IUGR pregnancies: cellular localization, protein expression, and regulation. American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative Physiology. 287(4): R886-R893.
- **SADLER, T.W.** 2001. Membranas fetales y placenta. **In:** Langman. Embriología médica con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana. pp: 133-153.
- **SHENNAN, D. B.** 1999. Properties of volume-activated taurine and iodide efflux from term human placental tissue. Placenta 20: 485-491.

- **SIBLEY, C.; TURNER, M.A.; CETIN, I.; AYUK, P.; BOYD, C.A; D'SOUZA, S. W.; GLAZIER, J.D.; GREENWOD, S.L.; JANSSON, T.; POWELL, T.** 2005. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatric Research*. 58(5):827-832.
- **STRID, H.; BUCHT, E.; JANSSON, T.; WENNERGREN, M.; POWELL, T.** 2003. ATP-dependent Ca²⁺ transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes. *Placenta*. 24: 445-452.
- **STULC, J.** 1997. Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiological Reviews*. 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):1182-1191.
- **WEBER, W.M.** 1999. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1421: 213-233.