



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL MAXI-CANAL  
DE CLORURO EN PLACENTAS PREECLAMPTICAS**

**FELIPE IGNACIO UMAÑA CERON**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal.

**PROFESOR GUÍA: GLORIA RIQUELME PINO**

**SANTIAGO, CHILE  
2004**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
DE CIENCIAS VETERINARIAS

## CARACTERIZACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DEL MAXI-CANAL DE CLORURO EN PLACENTAS PREECLAMPTICAS

**FELIPE IGNACIO UMAÑA CERON**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: GLORIA RIQUELME P.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: VICTOR HUGO PARRAGUEZ G.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI C.	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
**2004**

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
1. Preeclampsia	5
2. Placenta	6
2.1 Estructura del trofoblasto	7
2.2 Placenta de término	10
2.3 Placenta preecláptica	10
2.4 Intercambio materno fetal	11
2.5 Función de la placenta	13
2.5.1 Intercambio metabólico y mecanismos de transporte	14
3. Transporte iónico placentario	16
3.1 Propiedades de los canales iónicos	18
3.1.a Conductancia	19
3.1.b Selectividad	21
3.1.c Cinética	22
3.2 Transporte de Cl <sup>-</sup> en la placenta	23
3.2.1 Vías conductivas para el Cl <sup>-</sup> en la placenta	23
3.2.2 Maxi canal de Cl <sup>-</sup> de la placenta humana	24
3.2.3 Maxi canal de Cl <sup>-</sup> en placentas preeclápticas	26
4. Objetivo General	28
5. Objetivos específicos	28
<b>METODOLOGIA</b>	29
1. Purificación de la membrana apical y basal del trofoblasto humano	29
1.1 Obtención de las placentas y preparación de las membranas apicales	29
1.2 Centrifugación en gradiente de sacarosa	30
1.3 Determinación de marcadores enzimáticos	31
2. Reconstitución de la membrana apical en liposomas gigantes	34
3. Registros electrofisiológicos	35
3.1 Soluciones	38
3.2 Análisis estadístico	38
<b>RESULTADOS</b>	40
1. Obtención de membranas apicales purificadas de sinciotrofoblasto de placentas de pacientes preeclápticas	40

1.1 Registro de corrientes unitarias del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas y normales, mediante la técnica de patch clamp de membranas apicales puras reconstituidas en liposomas gigantes	42
2. Características Biofísicas del Maxi canal de cloruro	45
2.1 Conductancia	45
2.1.1 Múltiples niveles de corriente.	45
2.1.2 Probabilidad de apertura del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas	49
2.2 Modulación del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas por DIDS y DPC	52
2.3 Deactivación del Maxi canal de Cl <sup>-</sup> de placenta preeclámptica comparado con Maxi canal de Cl <sup>-</sup> de placenta normal	53
2.4 Modulación del Maxi canal de Cl <sup>-</sup> por estradiol	55
<b>DISCUSIÓN</b>	56
<b>CONCLUSIÓN</b>	61
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	62

## Resumen

El transporte de  $\text{Cl}^-$  mediante vías conductivas está asociado a numerosas funciones epiteliales, tales como la mantención del potencial de membrana, transporte de solutos y regulación de volumen celular. Existe evidencia de que el transporte de  $\text{Cl}^-$  transepitelial en el sinciotrofoblasto placentario, un epitelio carente de vías paracelulares, también podría estar involucrado en tales funciones. Un candidato molecular para el transporte conductivo de  $\text{Cl}^-$  en la membrana apical del sinciotrofoblasto es un Maxi-canal de  $\text{Cl}^-$  con características biofísicas particulares: múltiples sub estados, conductancia de 240 pS, probabilidad de apertura ( $P_o$ ) dependiente de voltaje en forma de campana, modulación por ácidos grasos y hormonas esteroidales, y permeabilidad a diversos aniones incluyendo aminoácidos.

La preeclampsia (PE) es una patología presente solo en el embarazo. Su etiología es desconocida y su impacto en la morbimortalidad materno fetal es importante. La morbilidad fetal depende, entre otras cosas, de la restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), la cual estaría mediada por una disminución del flujo sanguíneo a la placenta, aunque la contribución de otros factores es desconocida. Las propiedades biofísicas del Maxi-canal de  $\text{Cl}^-$  sugieren que alteraciones en su función podrían estar involucradas en el IUGR asociado a la PE y en otras disfunciones de mecanismos celulares básicos que contribuyen a la generación de un sinciotrofoblasto disfuncional.

La placenta intacta es de difícil acceso para métodos electrofisiológicos convencionales. Una buena aproximación es la reconstitución de membranas purificadas en liposomas gigantes, accesibles al método de *patch clamp*. La membrana apical purificada de placentas obtenidas inmediatamente después

del alumbramiento, se obtiene usando un protocolo que incluye centrifugaciones diferenciales, separación de membrana apical y basal con cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) y gradiente de sacarosa discontinua.

Se realizaron 32 experimentos independientes (n=6 placentas preeclámpticas), registrándose un canal de  $\text{Cl}^-$ , con múltiples sub estados y una  $P_o$  dependiente de voltaje. Sin embargo, este canal, presentó diferencias significativas en sus características biofísicas comparadas con las del canal de placentas normales. En el 50% de los sellos, la conductancia es menor (138 pS), y la dependencia de potencial de la  $P_o$  muestra una curva aplanada (n=16), con un valor de la  $P_o$  de 0.8 sobre  $\pm 80$  mV, comparado con 0.6 para los controles.

En conclusión, el Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  está en la membrana apical del sinciotrofoblasto de placentas preeclámpticas. Los resultados sugieren que a lo menos, una sub población, posee características biofísicas que difieren del canal de  $\text{Cl}^-$  de membranas no patológicas.

# INTRODUCCIÓN

El transporte a través de la placenta es de vital importancia en el desarrollo y crecimiento del feto. El trofoblasto placentario es un sincicio (epitelio sin rutas paracelulares), lo que implica que todos los solutos deben pasar directamente a través de las membranas apicales y basales del sinciciotrofoblasto. Este transporte es realizado por distintos mecanismos, incluyendo los mediados por canales iónicos. Estos canales han sido poco estudiados tanto en sinciciotrofoblasto normal como en patológico.

Una patología frecuente durante el embarazo de mujeres primogestas, es la preeclampsia, que cursa con un gradual desarrollo de hipertensión, proteinuria y edema (Phyllis y Burton, 2001), generalmente en el tercer trimestre. Además, produce un retardo en el crecimiento intrauterino (IUGR), presentando un feto de menor talla y menor peso que los normales con un mayor riesgo de mortalidad fetal. Se cree que el transporte de iones y nutrientes por el sinciciotrofoblasto de placentas provenientes de pacientes con preeclampsia estaría alterado, afectando así el normal desarrollo del feto.

Se sugiere que el transporte iónico a través de canales iónicos en el trofoblasto placentario, jugaría un rol similar a los descritos para otros epitelios (regulación del volumen celular, mantención del potencial de membrana, procesos de absorción y secreción, y otras). Algunos autores además, han sugerido que el transporte de iones estaría asociado a la conducción de nutrientes (Clarson *et al.*, 2001; Shennan, 1995). Por esto, el realizar un estudio comparativo del funcionamiento de los canales iónicos de membranas de sinciciotrofoblasto de placentas provenientes tanto de pacientes con preeclampsia como de

embarazos normales, podría aportar información valiosa para la comprensión y tratamiento de esta patología.



# Revisión Bibliográfica.

## 1 Preeclampsia.

La preeclampsia es una patología presente en el embarazo de mujeres primigestas, generalmente en el tercer trimestre de gestación, presentando un gradual desarrollo de hipertensión, proteinuria y edema (Phyllis y Burton, 2001). Su etiología es desconocida pero se conoce un conjunto de elementos que forman un cuadro característico. Se sabe que es un desorden multisistémico con una disfunción en la circulación uteroplacentaria. Su incidencia es del 6-8% de la totalidad de las mujeres gestantes sobre 20 semanas de embarazo, su impacto en la morbimortalidad materno fetal es importante (Dekker y Sibai, 1998; Phyllis y Burton, 2001). La morbilidad fetal depende, entre otras cosas, de la restricción de crecimiento intrauterino (IUGR), la cual estaría mediada por una disminución del flujo sanguíneo a la placenta, aunque la contribución de otros factores a la IUGR es desconocida (Regnault *et al.*, 2002).

En placentas de pacientes preeclámpticas se sugiere que el transporte iónico estaría alterado (Torbergsen *et al.*, 1989). Algunos autores además, han sugerido que el transporte de iones estaría asociado a la conducción de nutrientes (Shennan y McNeillie, 1995; Clarson *et al.*, 2001).

También se cree que actuaría un factor inmunológico, ya que la incidencia de presentación en primigestas es de 11,9%, en multigravidas 4,7%, multigravidas con nuevo padre 24,5% (Phyllis y Burton, 2000).

## **2 Placenta.**

En mamíferos superiores, la placenta es un tejido transitorio cuyo origen es, inicialmente, de tipo fetal, proveniente del corion (membrana extra embrionaria). Luego de la implantación, se agrega un componente materno, derivado de la decidua basal, región del endometrio que está por debajo del sitio de implantación (Sadler, 1998).

La placenta es la responsable de la compleja coexistencia entre madre y feto, ya que en su rol mediador desarrolla funciones que en un organismo adulto son privativas de órganos específicos. Por ejemplo, es el órgano excretor, realiza el intercambio de gases, es la fuente de nutrición y la defensa inmunológica, entre otras. De esta manera, en ella recae la responsabilidad del éxito de una gestación, y el crecimiento de un individuo normal (Sadler, 1998).

En particular, la placenta posee un rol insustituible en el intercambio entre la madre y el feto, tanto de elementos nutritivos como de electrolitos, aminoácidos, ácidos grasos libres, hidratos de carbonos, iones y vitaminas (Shennan y Boyd, 1987).

Por varias décadas ha sido de interés clínico y científico comprender los mecanismos involucrados en el transporte de nutrientes desde la madre al feto, conocer su fisiología y las implicancias que podría tener en el desarrollo embrionario y fetal, en la fisiopatología del embarazo y las consecuencias de una alteración en este transporte, como en el caso de la preeclampsia (Torbergson *et al.*, 1989).

## 2.1 Estructura del trofoblasto.

En humanos, al tercer día después de la fecundación, el embrión se encuentra completamente rodeado de una capa de células llamada trofoblasto.

El trofoblasto consta de dos capas de células: el citotrofoblasto y el sinciotrofoblasto. La capa interna es la conocida como citotrofoblasto. Esta se encuentra constituida por células con límites celulares precisos, presentando mitosis activa que contribuye con células que darán origen al sinciotrofoblasto, que se caracteriza histológicamente, por ser un tejido sincicial altamente polarizado, donde todas sus células se fusionan en una sola masa continua, con citoplasma multinucleado y sin límites paracelulares. El trofoblasto placentario es un epitelio y por lo tanto tiene membranas polarizadas: una apical (cara materna) y una basal (cara fetal). Debido a la naturaleza sincicial este epitelio (escaso en rutas paracelulares), se constituye en la principal barrera al transporte de solutos entre la madre y el feto (Shennan y Boyd, 1987).

Hacia el comienzo del cuarto mes de gestación, desaparecen las células citotrofoblásticas y algunas células del tejido conectivo lograrían así su madurez morfológica (**Fig 1-2**). Así las únicas capas que separan la sangre materna de la fetal son el sinciotrofoblasto y la pared endotelial de los vasos sanguíneos. En el lado fetal, la placenta está rodeada por la lámina coriónica y en el lado materno por la decidua basal. Entre la lámina coriónica y la decidua basal se encuentran los llamados espacios intervillosos, ocupados por sangre materna (Sadler, 1998).

En el curso del cuarto o quinto mes se forman varios 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 tal manera 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. Como consecuencia de la formación de tabiques, la placenta queda dividida en varios cotiledones (Sadler, 1998).

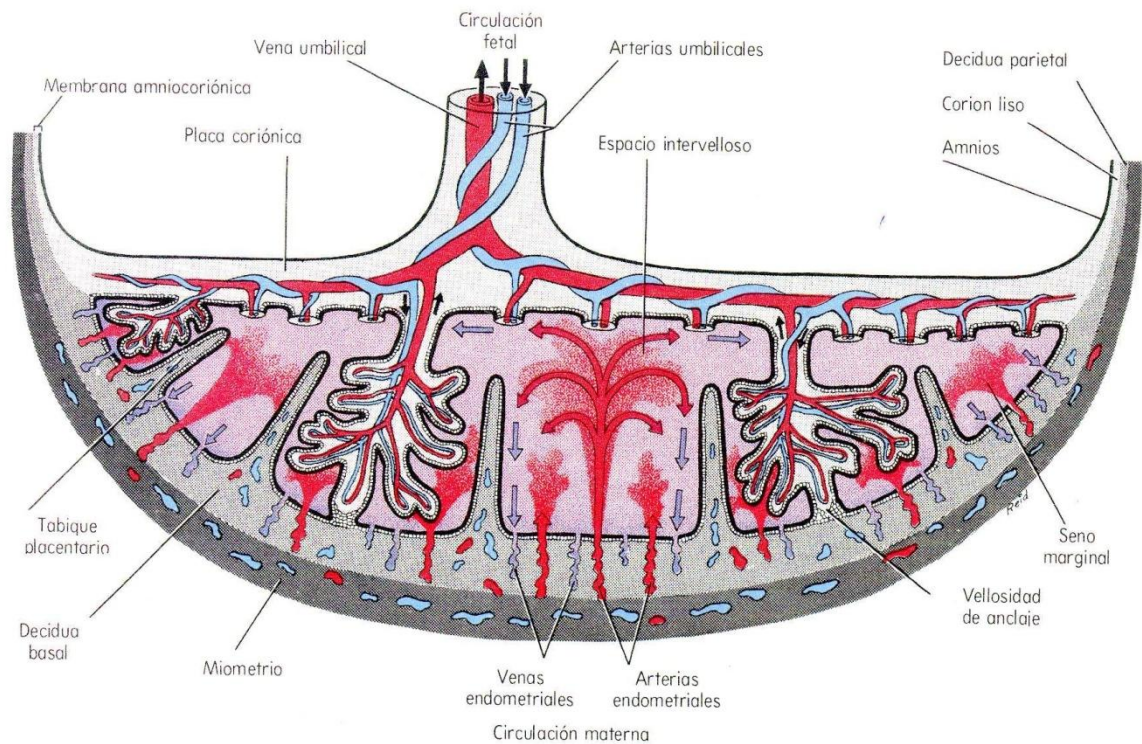


Figura 1. Esquema de la placenta Humana (Figura modificada del texto: Reproductive Endocrinology. Yen, Jaffe)

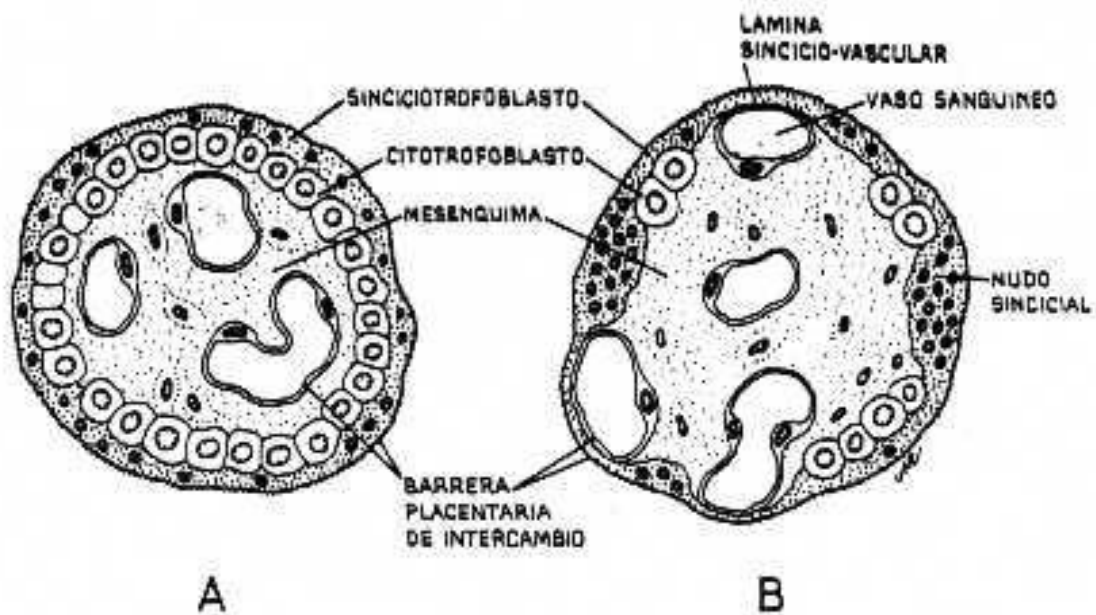


Figura 2. Estructura de las vellosidades en diferentes etapas del desarrollo. (A) Durante la cuarta semana. (B) Durante el cuarto mes. (Figura modificada del texto: Reproductive Endocrinology. Yen, Jaffe.)

## 2.2 Placenta de término.

La placenta de término es discoidal, presenta un diámetro de 15 a 20 cm., con un espesor de 3 cm., aproximadamente. Pesa entre 500 y 600 gramos.

Una vez ocurrido el parto, alrededor de 30 minutos después, ésta se desprende de la pared uterina y es expulsada fuera del útero (Fig 3) (Sadler, 1998).

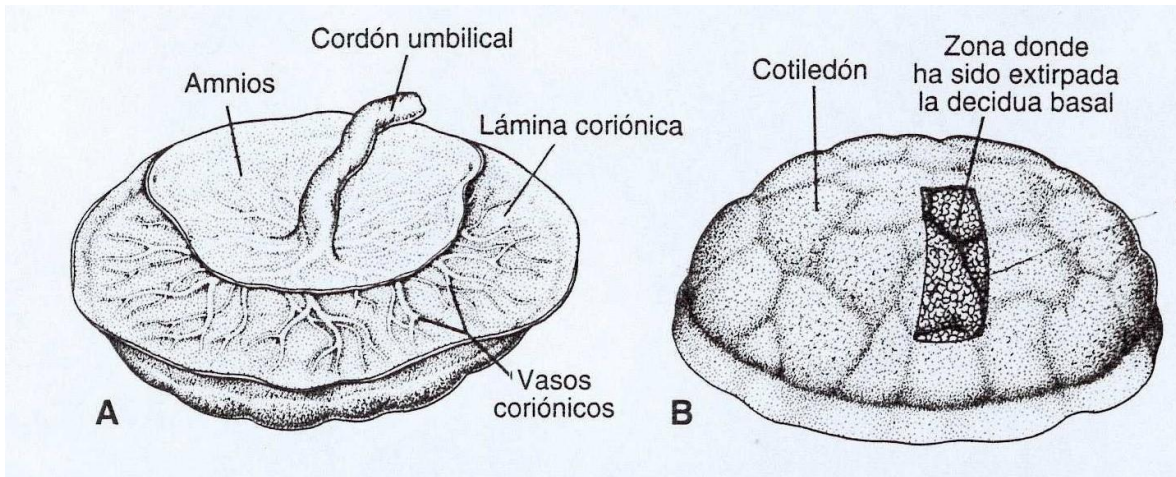


Figura 3. Placenta de término (A) Vista por el lado fetal, (B) Vista por el lado materno. (Figura del texto: Langmann. Embriología médica Sadle)

### 2.3 Placenta preecláptica.

La placenta proveniente de pacientes con preeclampsia no difiere de forma significativa en sus características estructurales con respecto a las placentas normales, aunque se sugiere que estaría alterada su función de intercambio materno fetal (Torbergsen *et al.*, 1989). En estas placentas existiría una falla en la diferenciación del citotrofoblasto que alteraría la función del trofoblasto. Se menciona una alteración en la apoptosis (muerte celular programada de las células) que estaría aumentada en la preeclampsia y también una proteína llamada sincitina, que está en el sinciotrofoblasto placentario humano (mayormente) y que *in vitro* induce a fusión celular, por lo que se cree que *in vivo* podría ser un mediador para la fusión del citotrofoblasto para la formación del trofoblasto. Esta proteína en las placentas preeclámpticas cambia de posición en las membranas del sinciotrofoblasto.

En placentas normales se encuentra en la membrana basal, cambiando de posición hacia la membrana apical en placentas preeclámpticas (Knerr *et al.*, 2002).

#### **2.4 Intercambio materno fetal.**

La placenta es la principal barrera en el intercambio materno fetal, el cual no tiene lugar en todas las vellosidades, sino sólo en aquellas en que los vasos fetales están en íntimo contacto con la membrana sincicial de recubrimiento. En estas vellosidades, el sinciciotrofoblasto tiene un ribete en cepillo (“brush border” o membrana apical), formado por numerosas microvellosidades, lo cual aumenta considerablemente la tasa de intercambio entre las circulaciones materno y fetal (Challier, 1989).

La denominada barrera placentaria separa la sangre materna de la fetal y en un principio esta formada por cuatro capas: a) el revestimiento endotelial de los vasos fetales; b) el tejido conectivo del núcleo de las vellosidades; c) la capa citotrofoblástica y d) el sinciciotrofoblasto. A partir del cuarto mes, la barrera placentaria se adelgaza, dado que el endotelio de los vasos fetales se pone en íntimo contacto con la membrana sincicial, aumentando considerablemente la tasa de intercambio. Por lo tanto, en ella se encontraría la función selectiva para el paso de elementos desde la madre al feto (Bosco 1996), puesto que no dispone de rutas paracelulares que permitan el paso de solutos (Challier, 1989).

El intercambio materno fetal es de vital importancia para el buen desarrollo del feto, por lo que una alteración del transporte puede llevar a diversas patologías fetales. Una de ellas es el IUGR que produce fetos de menor talla y peso. Esta patología es asociada a cuadros de preeclampsia, en

la que algunos estudios sugieren que el transporte de nutrientes estaría alterado (Shennan, 1995; Torbergsen *et al.*, 1989).

El intercambio materno fetal se realiza por distintas vías. Una de ellas es el Maxi canal de Cl<sup>-</sup> al que se le asocian distintas funciones como la regulación de volumen celular, la mantención del potencial de membrana (Birdsey *et al.*, 1999) y posiblemente el transporte de algunos aminoácidos (Shennan y McNeillie, 1995). No se tiene claro si el IUGR provocado por cuadros de preeclampsia, se deba a alguna alteración en el mecanismo de transporte implicado en el paso de nutrientes, por lo que realizar un estudio de estos mecanismos, en particular del Maxi canal de Cl<sup>-</sup> en placentas preeclámpicas, nos entregará información valiosa para el futuro entendimiento de esta patología.

## **2.5 Función de la placenta.**

A través de la circulación sanguínea materno-fetal, son suministrados todos los requerimientos básicos para el desarrollo del embrión y del feto. De esta manera, los materiales de intercambio deben, necesariamente, atravesar la barrera placentaria.

La placenta presenta múltiples funciones, entre ellas la inmunológica. Los anticuerpos de las madres son captados por pinocitosis por el sincitiotrofoblasto y llevados después hacia los capilares fetales. De esta manera, el feto recibe anticuerpos maternos del tipo de inmunoglobulinas G (IgG) contra diversas enfermedades infecto-contagiosas y adquiere una inmunidad pasiva contra ellas (Leeson *et al.*, 1998).

Otro ejemplo de funciones de este órgano es la endocrina, secretando hormonas como la progesterona, responsable de mantener la implantación,



disminuir la acción de la insulina e inhibir la respuesta inmune de la madre. Hacia el final del cuarto mes la placenta produce progesterona en cantidad suficiente para mantener la gestación en caso de extirpación o falta de la función adecuada del cuerpo lúteo. Además, produce estrógenos, sobre todo  $17\beta$  estradiol, en cantidades cada vez mayores, hasta inmediatamente antes de completarse la gestación, con el fin de contribuir con el crecimiento del útero, al desarrollo de la glándula mamaria y al aumento del tamaño de los genitales externos de la madre. Además, los estrógenos relajan los diversos ligamentos pelvianos de la madre, de modo que, las articulaciones sacroilíacas se vuelven bastante más flexibles y la sínfisis del pubis adquiere elasticidad.

Con estos cambios se hace mas fácil el paso del feto por el canal del parto. Otra hormona elaborada por la placenta es la somatomamotrofina o también conocida como lactógeno, sustancia semejante a la hormona del crecimiento, que le confiere al feto prioridad sobre la madre en la utilización de la glucosa sanguínea, permitiendo que haya más glucosa disponible para éste (Leeson *et al.*, 1998).

### **2.5.1 Intercambio metabólico y mecanismos de transporte.**

El intercambio metabólico entre la madre y el feto constituye una de las funciones más importantes de la placenta, por lo tanto, es necesario revisar los mecanismos de transporte, involucrados en el traspaso de solutos a través de las membranas biológicas (Stulc, 1997). La membrana celular es un mosaico de lípidos y proteínas que constituye una barrera para el intercambio intra y extra celular, por lo que las propiedades de transporte de un soluto, dependerán de la interacción que éste establezca con cada uno de los

componentes de la membrana. Un soluto no polar o de baja polaridad podrá atravesar sin dificultad la bicapa de lípidos por un mecanismo denominado difusión simple, en la cual la migración de un soluto depende de las concentraciones de éste a cada lado de la membrana de la célula. Un soluto se moverá desde una zona de mayor concentración a una de menor concentración, como resultado de un movimiento al azar de las moléculas de soluto. En la placenta este mecanismo está involucrado en el intercambio de oxígeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono, agua, urea y creatinina, entre otros (Stulc, 1997).

Las membranas biológicas también son permeables a diversos solutos polares, aunque la bicapa lipídica es prácticamente impermeable al paso de estos. Por lo tanto las moléculas cargadas atraviesan la membrana mediante proteínas especializadas llamadas proteínas transportadoras. Estas proteínas integrales de membrana poseen uno o más segmentos polipéptidicos que atraviesan la bicapa lipídica varias veces constituyendo una vía de paso para los solutos cargados. Este tipo de transporte se denomina transporte mediado y en general es específico, es decir, hay uno para cada tipo de molécula a ser transportada. Existen dos clases de proteínas transportadoras, las llamadas transportadores o carriers, que se unen al soluto que va a ser transportado, sufriendo una serie de cambios conformacionales que permiten la transferencia de éste a través de la membrana. En la placenta, como en otros epitelios, los transportadores están involucrados en el transporte de glucosa, aminoácidos, bicarbonato y algunos iones.

Otra clase de proteínas transportadoras son las denominadas canales, que forman conductos hidrofílicos en la membrana y que cuando están abiertos

dejan pasar millones de iones por segundo. Este constituye uno de los mecanismos más eficientes en el transporte de iones y se le atribuyen una serie de funciones involucradas en la homeostasis celular de la placenta y de muchos otros tejidos (Stulc, 1997). Se sugiere que en pacientes con preeclampsia alguna de estas funciones, como la del transporte de iones y nutrientes por el sinciciotrofoblasto, estarían alteradas (Torbergsen *et al.*, 1989), afectando así el normal desarrollo del feto. En esta memoria se abordó el estudio del transporte iónico, en particular de Cl<sup>-</sup> ya que el transporte de este ion se asocia al paso de nutrientes (Shennan, 1995) imprescindibles para el desarrollo y viabilidad del feto.

### **3 Transporte iónico placentario.**

En las células, el movimiento de iones a través de la membrana plasmática mediante proteínas mantiene la homeostasis celular. En efecto, el transporte iónico interviene en la regulación del volumen celular, la absorción y secreción, la contractibilidad muscular, la transmisión del impulso nervioso, la transducción de señales intracelulares, entre otras. La homeostasis del sodio, potasio y cloruro, es imprescindible para la vida del feto, estos son aportados por la sangre materna (Stulc, 1997). De ellos, el ión cloruro es el más abundante en el fluido extracelular, tanto en la madre como en el feto, siendo 5-6 mmoles/L mayor en la sangre fetal que en la madre (Bissonnette *et al.*, 1994).

Recientemente, el estudio del transporte de cloruro y su regulación en epitelios secretores y absortivos ha tomado un lugar de importancia, debido al rol que cumple en la mantención de la homeostasis celular; (Ravel *et al.*, 1985; Maly y Lüthi, 1986; Vanderpuye y Smith, 1987; Sakbun *et al.*, 1987; Sullivan *et*

*al.*, 1996; von Weikersthal *et al.*, 1999). En particular, en la placenta, para el ion cloruro, se han descrito, a lo menos, tres vías para su transporte en la membrana apical: el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{HCl}_3^-$  realiza un 50% del transporte y la diferencia es realizada a través de vías conductivas. Estas vías conductivas se diferencian por sensibilidad farmacológica a dos bloqueadores de canales de  $\text{Cl}^-$ : a) una sensible a DIDS (4,4-diisociano-2,2-disulfónico estibeno) y b) una sensible a DPC (difenilamina 2-carboxilato) (Shennan *et al.*, 1986; Illsley y Sellers, 1992; Byrne *et al.*, 1993; Faller *et al.*, 1995). En el laboratorio que se realizó este estudio (Laboratorio de electrofisiología de membranas "LEM"), se ha caracterizado electrofisiológicamente el canal de  $\text{Cl}^-$  sensible a DIDS (Riquelme y Parra, 1999). En la placenta, este canal podría estar involucrado en el crecimiento fetal, modulando la absorción de aminoácidos y la incorporación de iones y agua por parte del feto (Ravel *et al.*, 1985; Vanderpuye y Smith, 1987; Sakbun *et al.*, 1987; Bissonnette *et al.*, 1994; Stulc, 1997; Clarson *et al.*, 2001). En particular, hay hipótesis que asocian el transporte de  $\text{Cl}^-$  por vías conductivas con el transporte de aminoácidos (Shennan, 1995).

Hay antecedentes que en placentas de pacientes preeclámpticas, el transporte iónico estaría alterado (Torbergsen *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la actividad de la bomba  $\text{Ca}^{++}$ -ATPasa está disminuida en un 50% en mujeres con preeclampsia cuando se compara con la de preñez normal (Casart *et al.*, 2001). Estudios realizados en eritrocitos de mujeres preeclámpticas, sugerirían una disminución de la permeabilidad de sodio y potasio (Heilmann *et al.*, 1993).

### **3.1 Propiedades de los canales iónicos.**

Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana. Tienen la función de facilitar el camino para que una molécula cargada atraviese la bicapa de lípidos y están implicados en múltiples procesos biológicos.

Los avances en biología molecular han permitido establecer una correlación entre la estructura del canal iónico y su función. La anomalía en el funcionamiento de los canales iónicos ha dado origen a una nueva rama en medicina denominada canalopatología.

La actividad de un canal se puede registrar a través de saltos de corriente entre un estado conductor de la proteína (estado abierto) y uno no-conductor (estado cerrado). Estos saltos de corriente son del orden de 10 picoAmperes (pA) y duraciones del orden de los milisegundos (ms) (Neher y Sakmann, 1992).

El transporte a través de canales es “rápido” (se mueven alrededor de  $10^6$  –  $10^7$  iones/segundo), comparados con los transportadores (ejemplo, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa mueve  $10^3$  iones/ segundo), lo que justifica su participación en procesos biológicos que requieren alta eficiencia en el transporte de iones.

Las características fundamentales de los canales iónicos son:

Su capacidad de conducir (Conductancia)

Su capacidad de seleccionar (Selectividad)

Su capacidad de responder a señales eléctricas, mecánicas, entre otras (Cinética, modulación)

### **3.1.a Conductancia**

El flujo de iones que atraviesa la membrana plasmática genera una corriente eléctrica. La eficiencia de la conducción iónica es cuantificada por la propiedad de los elementos conductores conocida como conductancia (g). La conductancia de un conductor eléctrico, está determinada por la relación existente entre el flujo de carga por unidad de tiempo, corriente (i), y la diferencia de potencial a través de la membrana (V). Cuando la corriente es proporcional a la diferencia de potencial, se dice que el conductor cumple con la ley de Ohm, en este caso particular se denomina canal óhmico.

$$g = i / V$$

Ecuación de conductancia (Ley de ohm)

La dirección en que se mueven los iones desde el espacio intracelular al extracelular o viceversa, depende de la gradiente de concentración iónica y el campo eléctrico generado por la diferencia de potencial entre estos compartimentos que separa la membrana plasmática. De esta manera, el movimiento iónico tiene su fuente de energía en una gradiente electroquímica ( $\Delta\mu$ ) entre dos zonas de diferente concentración  $C_1$  y  $C_2$ . La siguiente ecuación define  $\Delta\mu$ , en donde R corresponde a la constante de los gases, T la temperatura absoluta, z valencia del ion, F la constante de Faraday y  $\Delta V$  es la diferencia de potencial.

Recordemos que la diferencia de potencial químico entre dos zonas de concentraciones  $C_1$  y  $C_2$  ( $C_1 > C_2$ ) es:

$$\Delta\mu = RT \ln C_2 / C_1 \text{ energía química}$$

Los iones en solución están en constante movimiento debido a la agitación térmica y pueden *difundir* libremente de una región a otra en función de dos condiciones: *la gradiente de concentración* y el campo eléctrico generado por la *diferencia de potencial*. Por lo tanto, el movimiento (electrodifusión) tendrá su fuente de energía en una *gradiente electroquímica* (*potencial electroquímico*) ( $\Delta\mu$ ).

La energía necesaria para llevar una carga  $Q$  desde el punto de potencial  $V_1$  a uno de potencial  $V_2$  es:

$$E_{\text{elec}} = \Delta V \quad (\text{con } Q = zF) \quad \text{energía eléctrica}$$

Luego la diferencia de potencial electroquímico  $\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$  es:

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

Ecuación del gradiente electroquímico

Donde:  $R = 8.315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$   
 $F = 9.648 * 10^4 \text{ C mol}^{-1}$   
 $T = \text{temperatura en grados Kelvin}$

### 3.1.b Selectividad

Los canales iónicos son capaces de seleccionar los iones que transportan. Esta propiedad caracteriza a las diferentes familias de canales, encontrándose canales selectivos a cationes y familias diferentes selectivas a aniones. Entre los primeros hay familias de canales específicos para potasio, sodio o calcio y otros que no discriminan entre sodio y potasio (catiónicos no selectivos) (Hille, 1992).

La selectividad es una propiedad intrínseca del canal y que no corresponde, necesariamente, a una selección por tamaño, sino que en el interior de los canales se encuentra una zona estrecha denominada “filtro de selectividad”, constituida por un conjunto de aminoácidos específicos y característicos para cada tipo de canal. En los últimos años, se han identificado, en varios canales, los aminoácidos asociados al poro de selectividad (Hille, 1992).

### **3.1.c      *Cinética***

Los canales iónicos están en constante cambio conformacional. Su actividad en el tiempo oscila, a lo menos, entre dos estados conductores: estado abierto y cerrado. La frecuencia de oscilación entre ambos estados es conocida como cinética.

Los mecanismos en la apertura y cierre de los canales han sido extensamente estudiados. Este mecanismo puede ser modulado por señales eléctricas, químicas, mecánicas, entre otros (Hille, 1992). Por ello, es crucial identificar la cinética del canal, para dar cuenta de las posibles funciones que desempeñan los canales iónicos en los procesos fisiológicos.



## **3.2 Canales de Cl<sup>-</sup> en la placenta.**

Las evidencias de transporte de Cl<sup>-</sup> por la vía de canales iónicos son de larga data. Todos los trabajos previos fueron realizados mediante estudios de flujo de Cl<sup>-</sup> en membranas de sinciotrofoblasto. Como se mencionó anteriormente, estos estudios indirectamente aportaron información sobre canales de Cl<sup>-</sup> presentes en estas membranas, concluyendo que las vías conductivas (canales de Cl<sup>-</sup>), darían cuenta de la mitad del transporte de Cl<sup>-</sup> en el sinciotrofoblasto (Shennan *et al.*, 1986; Dehecchi y Cabrini, 1988; Faller y Ryan, 1992; Doughty *et al.*, 1998).

### **3.2.1 Primeras evidencias de vías conductivas para el Cl<sup>-</sup> en la placenta.**

Como se ha mencionado anteriormente, de los trabajos de flujo, los resultados indirectos apuntan que, a lo menos, habrían dos vías conductivas para el transporte de Cl<sup>-</sup> en la membrana apical de placenta dependiendo de su respuesta farmacológica (Faller y Ryan, 1992; Byrne *et al.*, 1993; Faller *et al.*, 1995; Riquelme y Parra, 1999),. Sin embargo, no había una caracterización por métodos electrofisiológicos de estos canales propuestos. La caracterización biofísica de los mismos es necesaria puesto que el transporte iónico a través de canales en el trofoblasto placentario, jugaría un rol similar a los descritos para otros epitelios. Ejemplo de lo anterior es la regulación del volumen celular, mantención del potencial de membrana, procesos de absorción y secreción (Birdsey *et al.*, 1999).

### 3.2.2 Maxi canal de Cl<sup>-</sup> de la placenta humana.

Los estudios de canales de Cl<sup>-</sup> en la placenta, han demostrado que el más frecuente es un canal de Cl<sup>-</sup> sensible a DIDS. Su presencia ha sido demostrada tanto en registros de actividad del canal por la técnica de “patch clamp” en tejido intacto (Brown *et al.*, 1993), como en membranas apicales purificadas de sinciciotrofoblasto, reconstituidas en liposomas gigantes y bicapa (Riquelme *et al.*, 1995; Grosman *et al.*, 1997). Estos canales son de conductancia superior a 250 pico Simens ( $pS = 10^{-12}$  Simens, 1 Simens = 1/ohm ) en 150 mM Cl<sup>-</sup>. En el LEM, se ha caracterizado electrofisiológicamente el canal de Cl<sup>-</sup> sensible a DIDS, regulado por ácido araquidónico y otros ácidos grasos insaturados (Riquelme y Parra, 1999) y bloqueado por hormonas esteroidales, que actúan directamente sobre el canal modificando su actividad (Henriquez y Riquelme, 2003). También se sabe que la permeabilidad a aniones es superior a la de los cationes, característica que han llevado a denominarlos “Maxi canales” de Cl<sup>-</sup> y que son permeables a aminoácidos como el aspartato y el glutamato (comunicación personal: datos obtenidos en el laboratorio, sin publicar). Otras propiedades de los Maxi canales son sus múltiples sub estados de conductancia, la dependencia de potencial que resulta en una probabilidad de apertura en forma de campana y una cinética de cierre, en respuesta a pulsos de potencial, desde un potencial en que el canal se encuentra frecuentemente abierto, a potenciales donde la probabilidad de apertura es menor (Schlichter *et al.*, 1990; Nobile y Galletta, 1988). El Maxi canal de Cl<sup>-</sup> descrito en el LEM, presenta estas características al igual que el descrito para otros epitelios (Riquelme y Parra, 1999; Henriquez y Riquelme, 2003).

En general a este tipo de canales, presentes tanto en epitelios secretores como absortivos, se les atribuyen funciones tales como: regulación de volumen, sensor de cambios osmóticos y la comunicación intercelular (Hurnák y Zachar, 1992; Mitchell *et al.*, 1997; Birdsey *et al.*, 1999). Sin embargo, en muchos otros casos, incluida la placenta, su papel es desconocido.

### **3.2.3 Maxi canal de Cl<sup>-</sup> en placentas preeclámpticas.**

Como fue referido en el punto 3.0, alteraciones en el transporte pueden ser causa o efecto de fenómenos como el IUGR. Sin embargo no se sabe si este fenómeno asociado a cuadros de preeclampsia, se deba a alguna alteración en el mecanismo de transporte implicado en el paso de nutrientes. Nuevas evidencias apoyan esta posibilidad, entre ellas, los trabajos que sugieren que el transporte iónico estaría asociado a la conducción de nutrientes a través del sinciotrofoblasto (Clarson *et al.*, 2001). En particular, se asocia el transporte de Cl<sup>-</sup> por vías conductivas con el transporte de aminoácidos como la taurina (Shennan, 1995).

En este contexto, alteraciones en el Maxi canal de Cl<sup>-</sup> podrían estar involucrados en el IUGR asociado a la preeclampsia y en otras disfunciones de mecanismos celulares básicos que contribuyen a la generación de un sinciotrofoblasto disfuncional. Desde esta perspectiva nuestro propósito ha sido la caracterización del Maxi-canal de Cl<sup>-</sup> de la membrana apical de placentas provenientes de pacientes portadoras de preeclampsia moderada, para determinar diferencias con respecto a sus características biofísicas entre éste y el canal proveniente de placentas normales, lo que nos permitiría dilucidar las siguientes interrogantes: ¿Están los Maxi canales de Cl<sup>-</sup> alterados en la preeclampsia?; ¿Están involucrados en el retardo del crecimiento del feto?; ¿Está afectada su modulación por hormonas?. Si fuese así se podría llegar a comprender mejor algunas de las alteraciones o parte de ellas producidas por esta patología.

#### **4 Objetivo General.**

Identificar y caracterizar electrofisiológicamente los canales de  $\text{Cl}^-$  presentes en la membrana apical del sinciotrofoblasto de placentas preeclámpticas.

#### **5 Objetivos específicos.**

1.- Reconstituir membranas apicales purificadas de sinciotrofoblasto de placentas de pacientes preeclámpticas, en un sistema lipídico artificial (liposoma gigante).

2.- Caracterizar biofísicamente los canales encontrados en términos de su conductancia, selectividad y cinética.

3.- Determinar si los canales de  $\text{Cl}^-$  son afectados por bloqueadores específicos como el DIDS (4,4-diisotiocyanatostilbene-2,2-sulfonic acid) y DPC (diphenylamine-2-carboxylate) o si son regulados por hormonas como el estradiol.

## **Metodología.**

### **1 Purificación de la membrana apical y basal del trofoblasto humano.**

#### **1.1 Obtención de las placentas y preparación de membranas apicales**

Las placentas, tanto de embarazos normales como de pacientes con preeclampsia leve a moderada sin patología asociada, se obtuvieron del servicio de maternidad del Hospital San José (existe un convenio formal para estos efectos). Inmediatamente después del parto, las placentas fueron colocadas a 4°C y trasladadas al laboratorio de electrofisiología de membrana.

La purificación de membranas se hizo a partir de una placenta. El método de purificación de membranas, descrito a continuación, adoptado en el LEM, es una modificación del método de Illsley (Illsley *et al.*, 1990), introduciéndole pasos específicos (Jimenez *et al.*, 2003). La cara fetal fue trozada finamente y fue lavada tres veces con 250 mL de NaCl 0.9%. Luego, el tejido fue resuspendido en una solución tampón de homogenización (300 mM Sacarosa, 0.7 uM Pepstatina, 1.1 uM Leupeptina, 80 mM Aprotinina, 10 mM TrisHEPES, pH 7.4) y homogeneizado en un Polytron tres veces por 30 segundos a 4°C. Se realizó una centrifugación a 10000× g durante 15 minutos para eliminar la posible contaminación con mitocondrias. A la suspensión final se le agregó  $Mg^{++}Cl_2$  hasta una concentración final de 12 mM, se agitó a 4°C por 20 minutos, para una primera separación de las membranas apicales de las basolaterales. Estas últimas tienden a precipitar en presencia de altas concentraciones de  $Mg^{++}$ . La mezcla se centrifugó a 2500× g durante 10 minutos y el sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 12100× g por 70

minutos, obteniéndose un sedimento que fue resuspendido en 7 mL de una solución de 300 mM Sacarosa, 20 mM Tris Maleato pH 7.4.

El sedimento fue resuspendido en la solución de homogeneización y fue sometido a un ciclo de centrifugaciones; obteniéndose una fracción microsomal cruda que se resuspendió en 7 ml de una solución de: 250 mM Sacarosa, 0.7 uM Pepstatina, 1.1 uM Leupeptina, 80 mM Aprotinina, 10 mM Tris HEPES pH 7.4.

## **1.2 Centrifugación en gradiente de sacarosa**

La fracción microsomal obtenida con los procedimientos previos, fue purificada en una gradiente discontinua de sacarosa de dos fases 47% y 52%, para membrana basal y 45% y 37% para membrana apical. Todas las soluciones tamponadas a pH 7.4 con 10 mM de Tris Maleato para membrana basal y 20 mM Tris Maleato para membrana apical. La gradiente fue centrifugada a 90000 g por 6 hrs. para membrana basal y por 2 hrs. para membrana apical a 4°C. La interfase que se formó entre las bandas es la más enriquecida en membrana apical y basal, la membrana apical fue colectada y diluida con una solución de lavado que contiene 20 mM Tris Maleato. La membrana basal fue colectada y diluida con una solución de lavado que contiene Tris HEPES 10 mM pH 7.4. Ambas fracciones fueron centrifugadas a 110000 g por 30 minutos. El sedimento fue resuspendido en un volumen mínimo, de 1 ml de solución de almacenamiento de membrana apical (250 mM Sacarosa, 0.7 uM Pepstatina, 1.1 uM Leupeptina, 80 mM Aprotinina, 10 mM TrisHEPES pH 7.4) y en 1 ml para membrana basal (300 mM Sacarosa, 20 mM

Tris Maleato pH 7.4). La fracción fue dividida en pequeños volúmenes de 25 - 30µl y que se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

### **1.3 Determinación de marcadores enzimáticos.**

La calidad de las membranas purificadas se determinó utilizando marcadores bioquímicos específicos. Para membrana apical se utilizó la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y para membrana basal la unión de dihidroalprenolol titriado (Jiménez et al., 2003). Para descartar contaminación con membrana basal. Para determinar contaminación mitocondrial se utilizó la succinato deshidrogenasa.

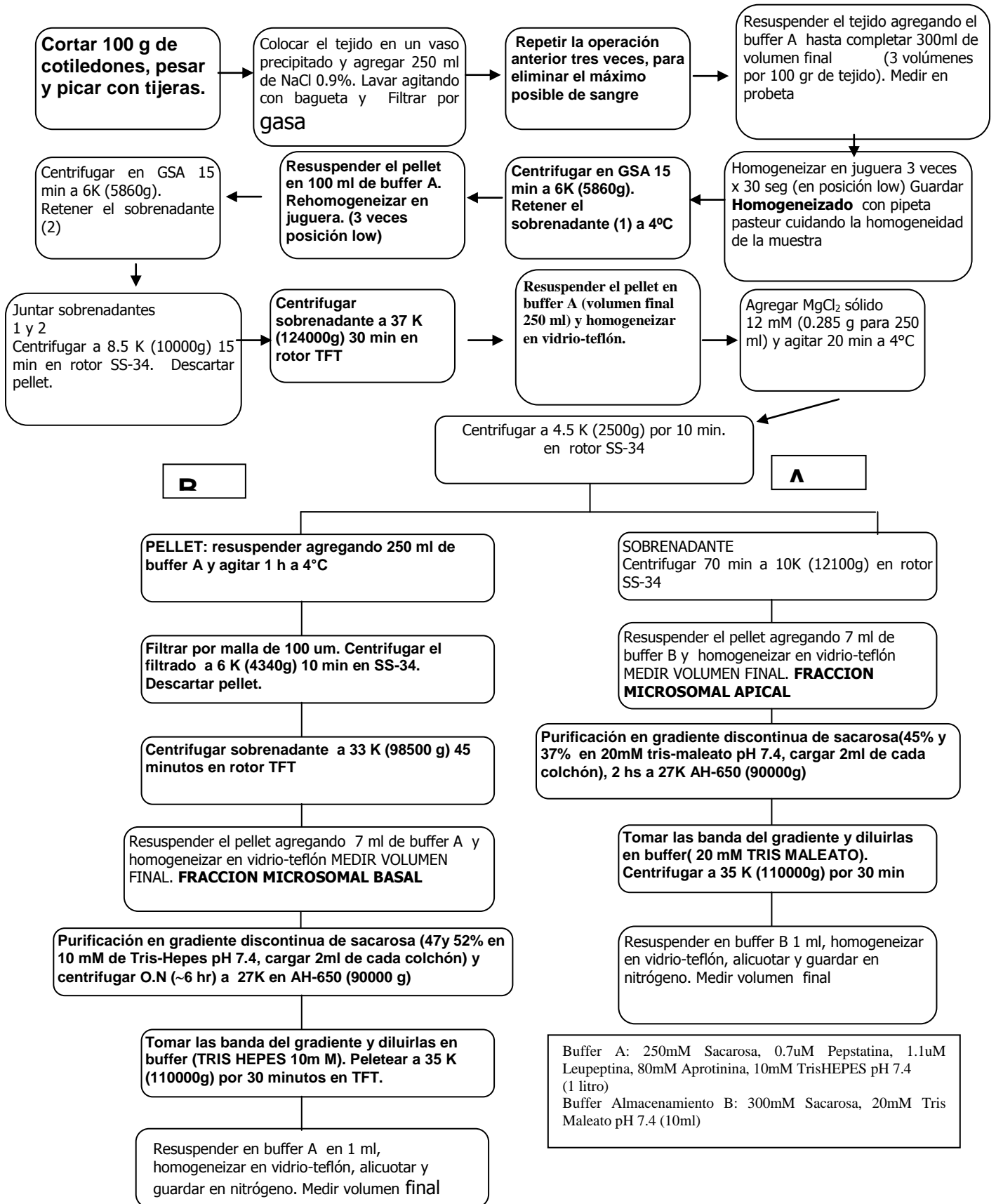
La actividad de la fosfatasa alcalina, fue medida por el método de Young descrita en 1972. La fosfatasa alcalina actúa sobre el sustrato sintético HMP-benzofuranonafosfato (HMPBF) en un tampón pH 10.2. Posteriormente, al agregar el reactivo revelador, se obtiene un cromógeno azul en forma proporcional a la concentración de la enzima.

Para determinar la contaminación mitocondrial, se le agregó a la membrana purificada succinato más un tampón fosfato. La succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias actúa sobre el succinato liberando protones. Luego se le agregó un colorante receptor de estos protones (iodonitrotetrazolium) obteniéndose una coloración azul, la cual es medida en un espectrofotómetro a 490 nm.

A continuación se presenta un esquema del protocolo simultáneo de obtención de membranas apicales y basales de sinciotrofoblasto, utilizada en esta memoria.



# PROTOCOLO SIMULTANEO DE OBTENCION DE MEMBRANAS APICALES Y BASALES DE SINCICIOTROFOBLASTO HUMANO.

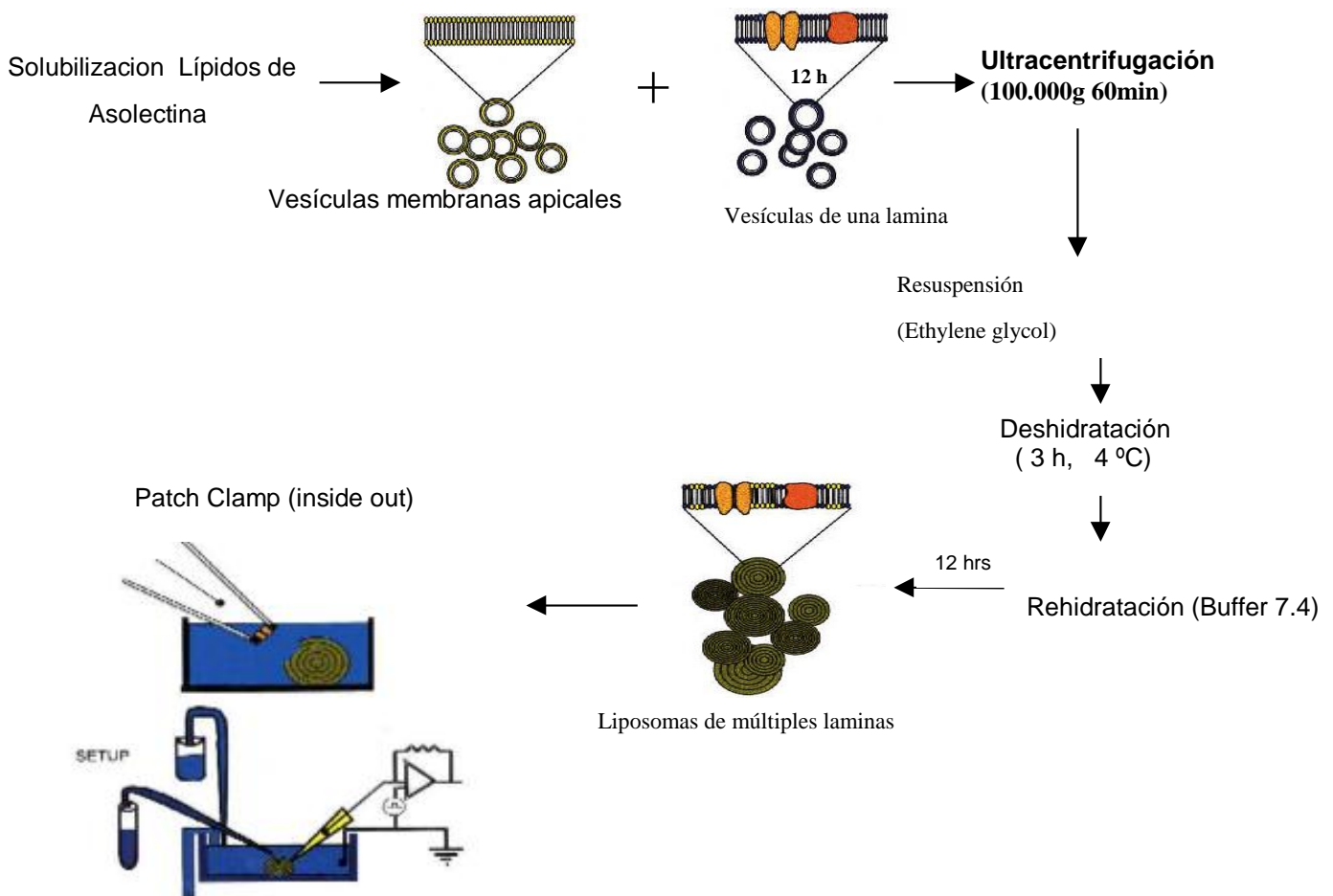


## **2 Reconstitución de la membrana apical en liposomas gigantes.**

Los liposomas gigantes fueron preparados mediante la fusión de la membrana apical purificada y vesículas lipídicas artificiales de asolectina, mediante un ciclo de deshidratación y rehidratación, según Riquelme *et al* (1990).

Alícuotas de vesículas de membranas nativas purificadas de sinciotrofoblasto (50-100  $\mu\text{g}$  de proteína) fueron mezcladas con 2 a 2.5 mL de vesículas lipídicas artificiales previamente dializadas. Estas se centrifugaron y el sedimento se resuspendió de una solución que contiene 5% v/v de etilenglicol, 10 mM Na-Hepes, pH 7,4. Se depositaron sobre un porta objetos en gotas de 20  $\mu\text{l}$ , las cuales son disecadas con cloruro de calcio por 3h a 4°C. Posteriormente, se agregaron 20  $\mu\text{l}$  de un tampón de baja fuerza iónica para rehidratar toda la noche, obteniéndose liposomas de múltiples laminas de diámetros entre 5-100  $\mu\text{m}$  accesibles a métodos electrofisiológicos como el *patch clamp* (Fig 4).

## Reconstitución de membranas apicales de sinciciotrofoblasto en liposomas gigantes



**Figura 4.** Pasos para la reconstitución de membranas apicales de sinciciotrofoblasto en liposomas gigantes

### 3 Registros electrofisiológicos.

Se depositaron alícuotas de 3-6  $\mu$ l de liposomas gigantes en una cámara de *patch* (RC-28, Warner Instruments Corporation, USA) con 0.4 ml de solución de registro (140 mM NMDGCl, 2.6 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM NaHEPES, pH 7.4). Los registros de canal único se obtuvieron mediante la técnica de “*patch clamp*”, descrita por Hamill (1981).

La técnica de *patch-clamp* consiste en poner en contacto con la membrana celular (en el caso de liposomas, en su bicapa lipídica externa) una micropipeta de vidrio que contiene en su interior un electrodo conectado a un

sistema de amplificación y registro. Este electrodo va bañado por una solución conductora adecuada. Mediante la aplicación de una presión negativa en el interior de la micropipeta (succión), la membrana plasmática de la célula se adhiere a la micropipeta, formando un sello de alta resistencia eléctrica, también llamado gigasello (se llama así ya que el parche tiene una resistencia del orden de varios gigaohms ( $\text{giga}=10^9$ ). Este parche es separado de la membrana celular por medio de una tracción de la micropipeta, (configuración de parches aislados (Fig 5 b), permitiendo así controlar la solución tanto a uno como a otro lado del parche y controlar o fijar (clamp) el potencial eléctrico a través del parche mediante un sistema electrónico de retroalimentación negativa.

Los sellos de alta resistencia (10-20 GOhm) se forman con pipetas de vidrio de borosilicato estiradas en un Puller modelo PP-83 (Narishige, Japón) (Fig 5 a). En el sello quedan contenidos los canales iónicos a investigar. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

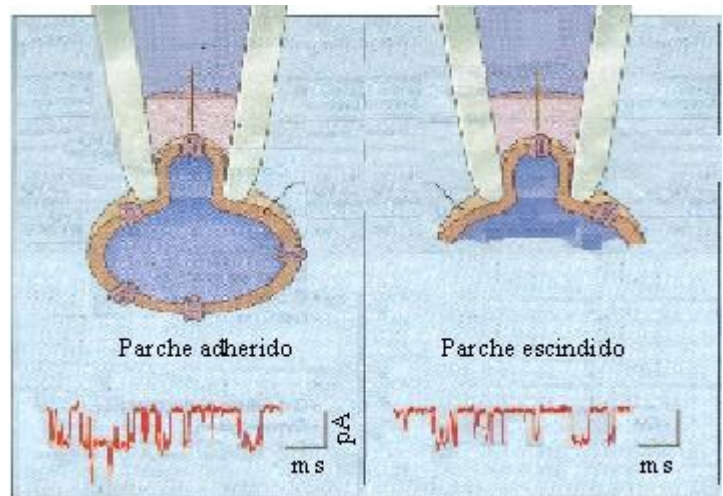
En estas condiciones se registra la actividad individual (corrientes iónicas unitarias) de los pocos canales iónicos presentes en el parche (técnica de canal único). Estas corrientes unitarias en general son del orden de unos pocos pA ( $10^{-12}$  A). El sentido y amplitud de las corrientes van a estar determinadas por la fuerza impulsora sobre el ión utilizado y de la conductancia del canal para ese ión. Cada tipo de canal posee una conductancia y cinética características. Para investigar si estas propiedades son afectadas por bloqueadores específicos o regulados por hormonas como el estradiol, se agregó directamente, a la solución que baña al sello, los bloqueadores u hormonas a probar.

Para registrar las corrientes unitarias, se utilizó un amplificador de *patch-clamp* EPC9 (HEKA, Lambrech/Pfalz, Germany), con una interfase para PC Pentium 133 MHz, que se utiliza para la aplicación de los protocolos de pulsos, almacenamiento y posterior análisis de los datos.

A.- Pipeta de patch clamp aproximándose a un liposoma



B.- Técnica de patch clamp configuración parche aislado



### 3.1 Soluciones

La solución de la pipeta y la solución del baño contaron con la siguiente composición (en mmol/L): 140 N-metil-D-glucamina cloruro (NMDGCl), 2.6 cloruro de calcio, 1.3 cloruro de magnesio, y 10 sodio HEPES, pH 7.4.

### 3.2 Análisis de los datos y significancia estadística.

El análisis de las corrientes se realizó con el programa Pulse-Pulsefit (HEKA, Alemania) y TAC (Bruxton Corporation, Alemania) y los resultados se representaron en el programa Microcal Origin 5.0 (Microcal Software Inc., EEUU) que permite medir conductancia y probabilidad de apertura del canal a partir de los registros electrofisiológicos.

El análisis particular de los experimentos y el número de datos que le dio origen está especificado en cada caso en el capítulo de Resultados.

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  SEM. La significancia de los mismos en el caso de estudios comparativos, fueron obtenidos mediante la aplicación del test de Student. Los valores p iguales o menores 0.05 fueron considerados significativos.

# RESULTADOS

## **1 Obtención de membranas apicales purificadas de sinciotrofoblasto de placentas de pacientes preeclámpticas.**

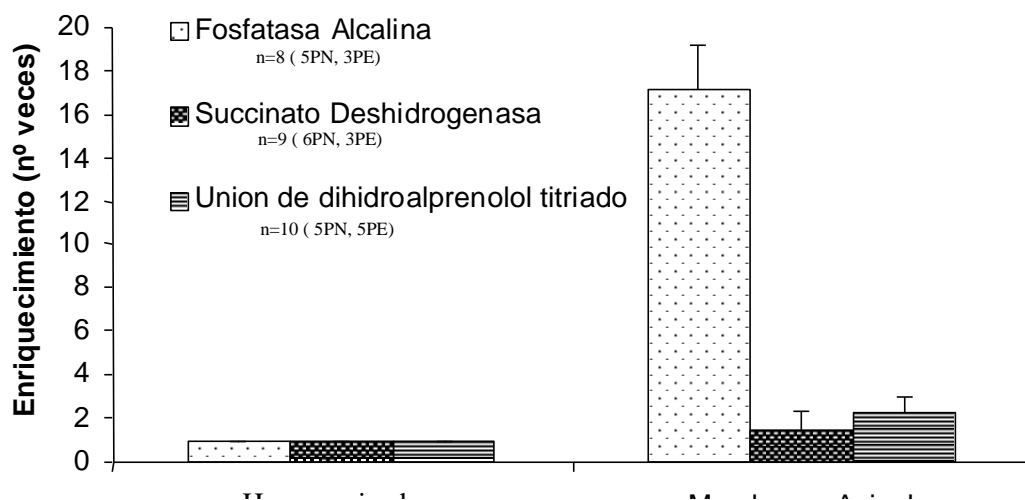
El criterio que determina el grado de purificación de la membrana apical del trofoblasto placentario, es el enriquecimiento de la actividad de enzimas específicas que se encuentran en la fracción purificada. El marcador enzimático más utilizado en esta técnica es la fosfatasa alcalina, enzima asociada a la membrana apical de dicho epitelio, también se utilizan marcadores específicos para membrana basal como la unión de dihidroalprenolol titriado como control de contaminación cruzada con membrana basal y la succinato deshidrogenasa para determinar la contaminación mitocondrial.

Los resultados presentados a continuación provienen de membranas purificadas independientemente de 6 placentas preeclámpticas, sin patología asociada, de acuerdo a la información clínica obtenida en el servicio de parto del Hospital San José, y de 4 placentas de embarazos normales, cada placenta provee material para varias decenas de experimentos.

El promedio de datos proveniente de 9 purificaciones independientes muestran que la fracción recogida de la interfase de la gradiente de sacarosa (37/45% p/v) es 17.1 veces más enriquecida en la actividad de la fosfatasa alcalina que el homogeneizado inicial y es esencialmente libre de membrana basal y mitocondrial (Figura 6). Esto indica que esta fracción es muy enriquecida en membrana apical y es de alto grado de pureza, de modo que los canales provenientes de ella pueden atribuirse a la membrana apical.



### Marcadores específicos de membranas

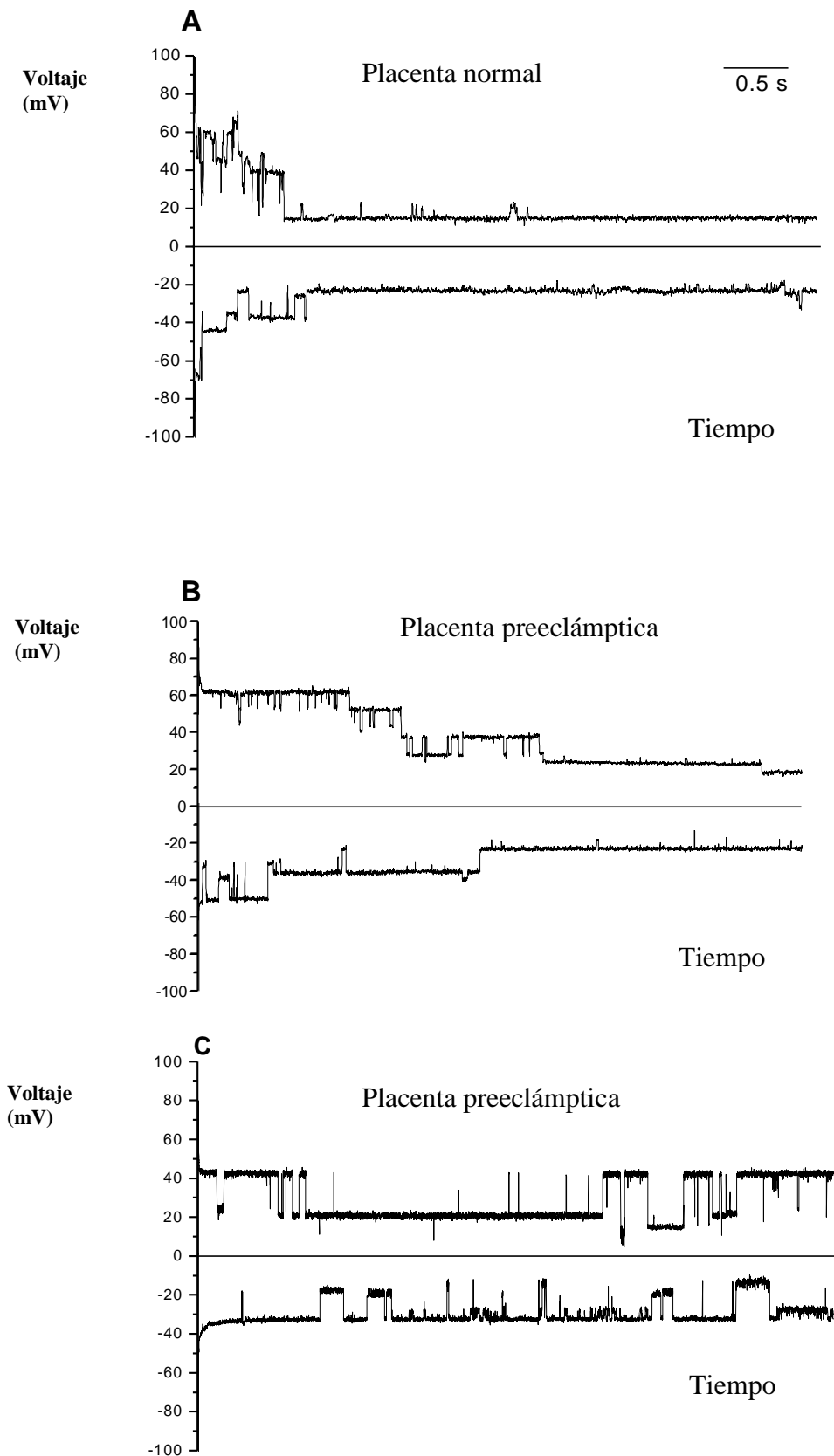


**Figura 6:** Valores de los distintos marcadores para el homogenato y las fracciones microsomales apicales, el numero de placentas utilizadas se describe entre paréntesis, PN para Placentas normales y PE para Placentas preeclámpticas. Los valores para la fracción microsomal apical de fosfatasa alcalina fueron de  $17,3 \pm 0,94$  (homogenato = 1), para succinato deshidrogenada de  $1,45 \pm 0,3$  y para unión de dihidroalprenolol titriado fue de  $2,36 \pm 0,51$ . no se encontró diferencias significativas entre el enriquecimiento y la contaminación del purificado proveniente de

## **1.1 Registro de corrientes unitarias del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámplicas y normales, mediante la técnica de patch clamp de membranas apicales puras reconstituidas en liposomas gigantes.**

Los resultados acerca de las propiedades biofísicas de los canales estudiados se realizaron sobre la base de un conjunto de datos correspondientes a un total de 62 registros. Todos ellos en parches escindidos de liposomas gigantes que contenían membrana apical de placenta normal o preeclámptica; 29 de estos sellos provienen de 15 placentas con embarazo normal y los restantes 33 sellos, fueron obtenidos de 6 placentas con preeclampsia moderada. Utilizando soluciones simétricas de 140mM NMDGCl, se registró la presencia de corrientes unitarias similares a las ya descritas para el Maxi canal de Cl<sup>-</sup> de placenta humana normal (Fig 7-A), para la cual se describen distintos niveles de conductancia lo que también se observó en los registros de Maxi canal de Cl<sup>-</sup> de placentas preeclámplicas (Fig 7-B-C), observándose en estos últimos dos comportamientos característicos, uno similar al descrito en placenta normal control (Fig 7-A) y un comportamiento distinto al caso de los controles (Fig 7-B-C).

## Registros representativos a $\pm 80$ mV



**Figura 7:** Registros representativos a  $\pm 80$  mV mostrando diferencias en la cinética de deactivación entre Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de membrana apical de placenta normal (A) y Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de membrana apical de placenta preecláptica (B-C). La actividad eléctrica de la conductancia de  $\text{Cl}^-$  muestra una cinética rápida de deactivación para placenta normal (A), y lenta (B) o ausencia de deactivación (C) para placenta preecláptica. Registros realizados en solución simétrica de (en mmol/L) 140 NMDGCl, 2.6  $\text{CaCl}_2$ , 1.3  $\text{MgCl}_2$ , 10 Na-HEPES.

En todos los registros obtenidos en placenta preeclámptica, se observó un canal permeable a cloruro, ya que bajo concentraciones asimétricas de  $\text{Cl}^-$  (148 mmol/L  $\text{Cl}^-$  en pipeta y 308 mmol/L  $\text{Cl}^-$  en baño) en una solución de NMDGCl, el potencial de inversión cambia de 0 a +15mV (Fig 8), cercano al potencial de equilibrio del  $\text{Cl}^-$  (+18mV). Bajo concentraciones asimétricas de  $\text{Cl}^-$  (148 mmol/L  $\text{Cl}^-$  en pipeta y 308 mmol/L  $\text{Cl}^-$  en baño) en una solución de NaCl (150 mmol/L  $\text{Na}^+$  en pipeta y 310 mmol/L  $\text{Na}^+$  en baño), el cálculo de la permeabilidad de  $\text{Cl}^-$  sobre  $\text{Na}^+$  ( $P_{\text{Cl}}/P_{\text{Na}}$ ) fue de  $3.0 \pm 0.28$  ( $n=5$ ), lo que indica que toda la actividad eléctrica corresponde a canales de  $\text{Cl}^-$ . La comparación de estos datos indica que los canales presentaron un comportamiento biofísico similar a las del Maxi-canal de  $\text{Cl}^-$  descrito en placentas normales. Sin embargo, se detectaron, diferencias significativas en cuanto a algunas de sus características tales como la conductancia (Fig 10) y la probabilidad de apertura (Fig 11).

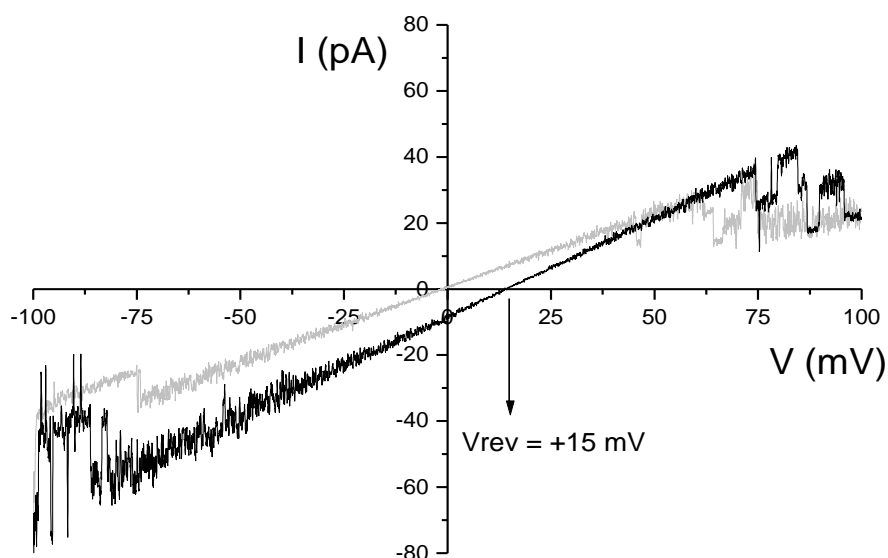


Figura 8: **Rampa de voltaje representativa en condiciones simétricas** (línea gris) y en condición de gradiente (línea negra), muestra el desplazamiento del potencial de inversión ( $V_{\text{rev}}$ ) que indica la permeabilidad al cloruro. Condición simétrica (mmol/l): 140 NMDGCl, 2.6  $\text{CaCl}_2$ , 1.3  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\text{Na-HEPES}$ . Condición de Gradiente: 140 NMDGCl en pipeta, 300 NMDGCl en baño, el resto de los iones iguales.

## 2 Características Biofísicas del Maxi canal de cloruro.

### 2.1 Conductancia.

#### 2.1.1 Múltiples niveles de corriente.

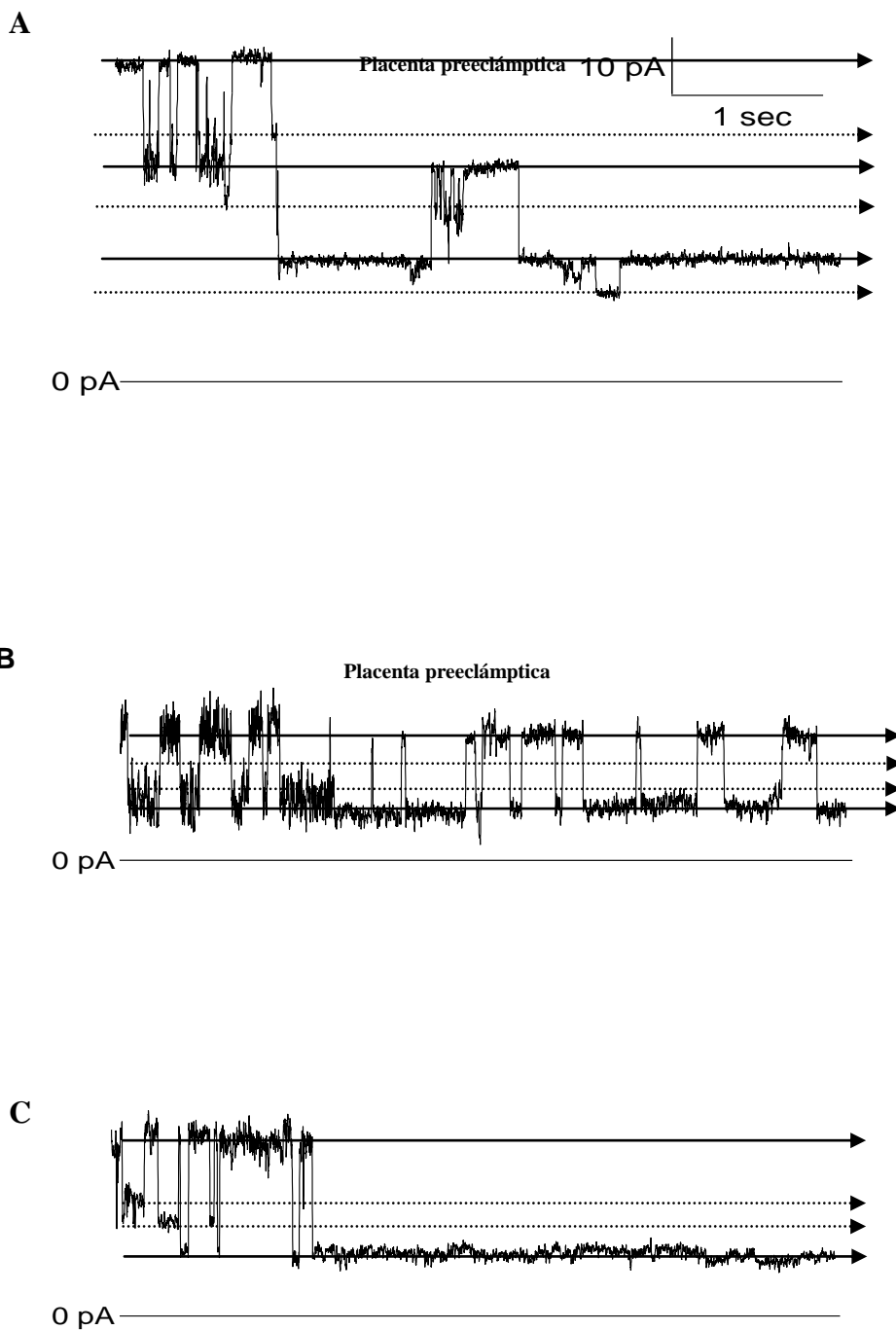
En las condiciones de soluciones simétricas ya mencionadas, el canal muestra cierres en distintos niveles de corriente o sub estados de conductancia concordante con lo descrito previamente (Fig 9), tanto en sellos con membrana apical normal como en preecláptica durante la aplicación de un potencial de  $\pm 80$  mV.

La Fig 9 muestra el segmento de 5 segundos representativo de varios minutos de registro para cada potencial, generando datos de cientos de eventos a promediar en cada caso.

En los Maxi canales de  $\text{Cl}^-$  la conductancia se describe de acuerdo a su sub-estado principal. En los registros de placentas normales el nivel predominante o sub estado predominante, fue de aproximadamente 250 pS (Fig 9 C). En los sellos de placentas preeclápticas se presentaron dos sub-estados principales, uno similar al encontrado en el Maxi-canal de  $\text{Cl}^-$  de placentas normales, con una conductancia de  $235 \pm 2,7$  pS ( $n=20$ ) (Fig 9 A) y un sub estado de conductancia menor de  $138 \pm 2,3$  pS ( $n=27$ ) (Fig 9 B). De acuerdo al predominio de cada sub estado en el sello registrado, se clasificó un  $n=20$  de sellos como **tipo I** (Fig 9 A ) (subconductancia mayor) y un  $n=27$  de sellos como **tipo II** (Fig 9 B) (subconductancia menor).

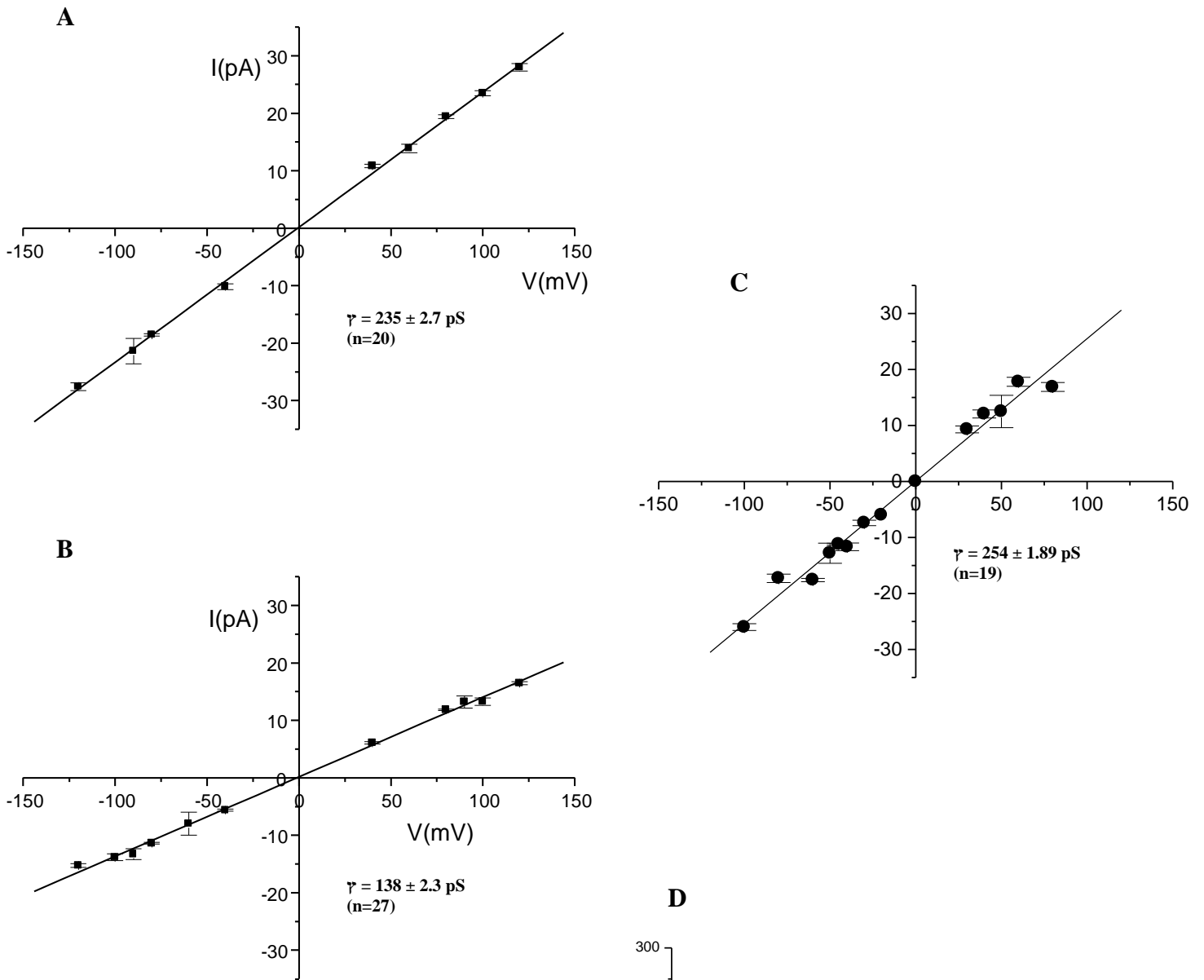
En la Fig 10 se muestra la relación entre corriente unitaria versus potencial para el promedio de los datos correspondientes a los sub estados principales, obtenidos en parches aislados en condiciones simétricas de la solución. La conductancia, calculada como la pendiente de una recta (regresión lineal, Fig 10) muestra en todos los casos valores superiores a 100 pS por lo que entrarían en la categoría de Maxi-canales descritos tanto en placenta, como en otros epitelios.

## Registros representativos a + 80 mV



**Figura 9:** Registros representativos a + 80mV. (A) Registro típico de Maxi-canal de Cl<sup>-</sup> de membrana apical de placenta preecláptica donde se aprecian 6 sub estados con un intervalo de aprox. 250pS (**Tipo I, líneas continuas**). (B) Registro típico de Maxi-canal de Cl<sup>-</sup> de membrana apical de placenta preecláptica donde se aprecian 4 sub estados con un intervalo de aprox. 163pS (**Tipo II, líneas continuas**). (C) Registro típico de Maxi-canal de Cl<sup>-</sup> de membrana apical de placenta normal en el que se aprecian 4 sub estados donde el sub estado mayor es el más frecuente y corresponde a 275pS. Se observan 2 canales cada uno con su estado principal (**líneas continuas**). Estos registros fueron obtenidos en condiciones simétricas usando una solución (mmol/l) 140 NMDGCl-, 2.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 10 Na-HEPES.

# Relación corriente-potencial

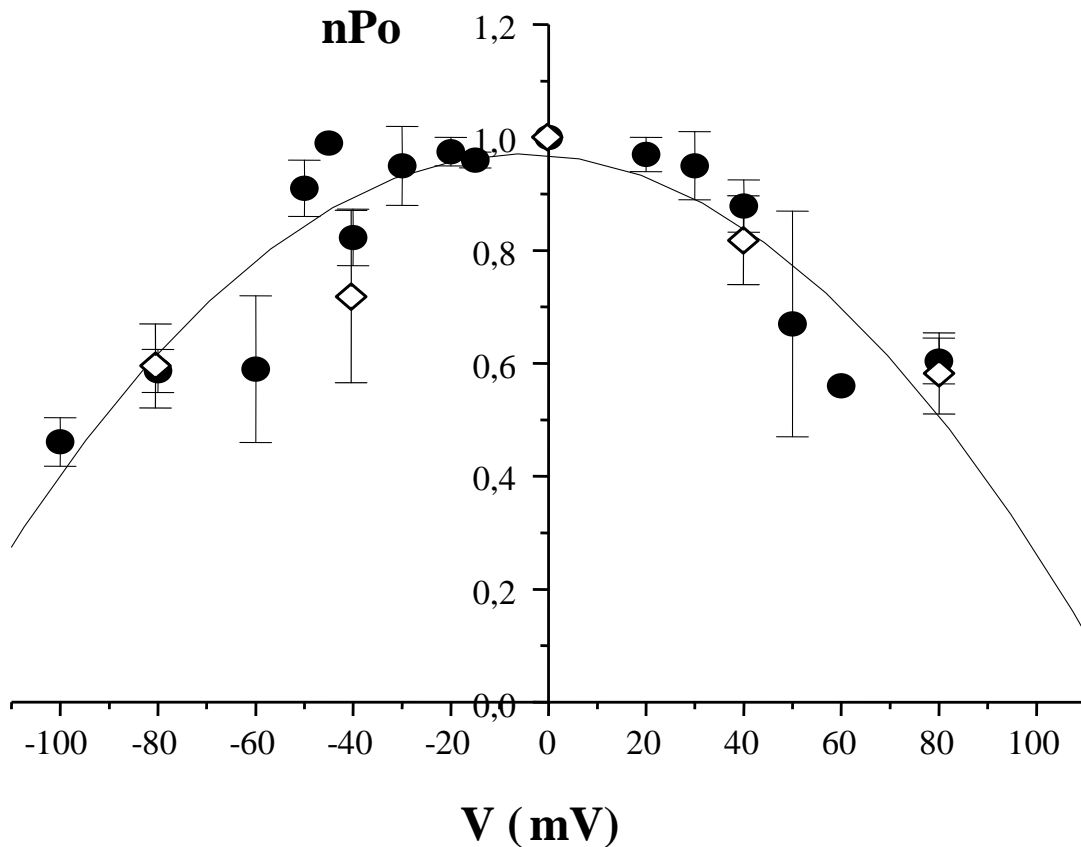


**Figura 10.** Relación corriente unitaria versus potencial para el promedio de los sub estados principales, obtenidos en parches aislados de membrana apical de placentas preeclámpticas,(A-B) y en parches aislados de membrana apical de placentas normales(C), en condiciones simétricas de la solución 140mM NMDGCl, 2.6mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 Mg Cl<sub>2</sub>, 10 Na-Hepes, pH 7.4. El calculo de la conductancia se realiza a partir de la pendiente de la recta (regresión lineal) y en todos los casos es mayor a 100 pS. D grafico comparativo de las conductancias A, B y C



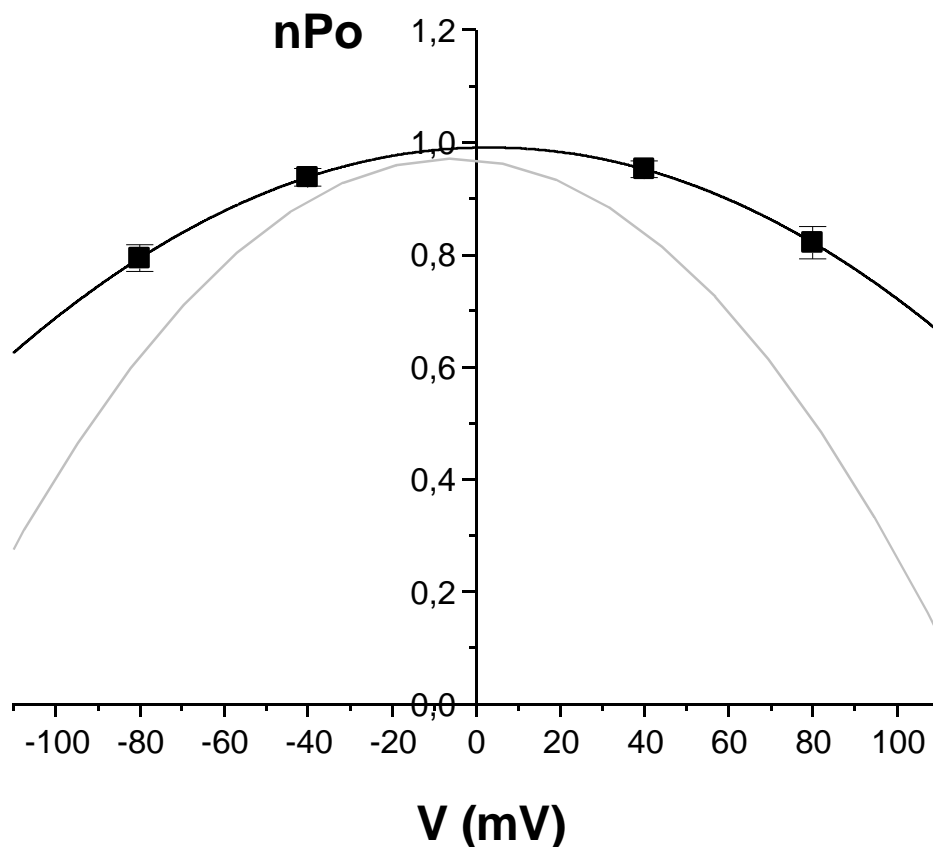
### 2.1.2 Probabilidad de apertura ( $P_o$ ) del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas.

En relación a las características descritas anteriormente para la  $P_o$  del Maxi canal de cloruro de placentas normales ( $n=17$ ), se describe la relación  $P_o$  versus voltaje como una curva en “forma de campana”, donde el canal se encuentra mayormente abierto a potenciales menores a  $-50\text{mV}$  y  $+50\text{mV}$  y se cierra a potenciales extremos. Al obtener datos de  $P_o$  como control para este estudio ( $n=3$ ), las características fueron similares (Fig 11).



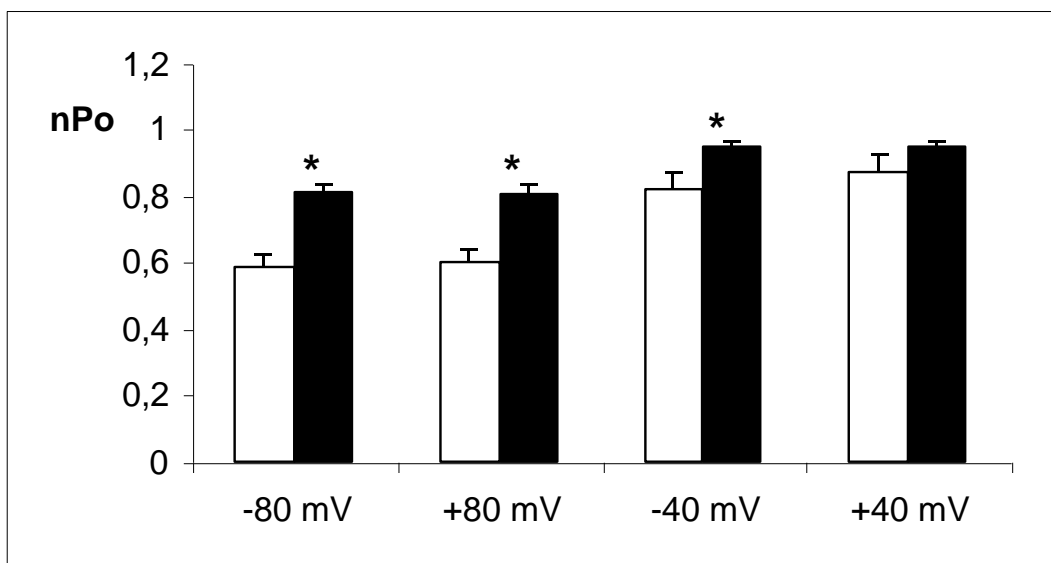
**Figura 11: Probabilidad de apertura del Maxi-canal de  $\text{Cl}^-$  de placentas normales:** los puntos provienen de 17 experimentos independientes ( $n=17$ ) (círculos negros) y probabilidad de apertura control de este estudio donde los puntos provienen de 3 experimentos independientes ( $n=3$ ) (rombos blancos). La línea negra muestra la tendencia esperada para la  $P_o$  del canal a diferentes potenciales.

Estos datos fueron obtenidos mediante la aplicación de rampas de voltaje con un rango de  $-120\text{mV}$  a  $+120\text{mV}$  a una velocidad de  $40\text{mV}$  por segundo. La  $P_o$  se obtuvo mediante el promedio de 4 a 30 rampas de voltaje consecutivas aplicadas al  $n=20$  sellos independientes (Fig. 11). Los valores de  $P_o$  fueron calculados como  $P_o=(I/V)G_{\text{max}}$ , donde  $I$  es la corriente del sello,  $V$  es el voltaje y  $G_{\text{max}}$  es la máxima conductancia del sello (cercana a  $0\text{mV}$ ). Como se observa en la Fig 11, en el caso de las placentas normales, el canal se cierra a potenciales extremos, situación diferente a la placenta preecláptica en la cual el canal esta prácticamente abierto para todos los potenciales probados (Fig 12).



**Figura 12. Probabilidad de apertura del Maxi canal de cloruro de placentas preeclápticas** ( $n=18$ ) (cuadrado negro) comparado con la tendencia esperada para la probabilidad de apertura del Maxi canal de cloruro de placentas normales (línea gris).

El Maxi-canal de placentas preeclámpticas muestra una  $P_o$  estadísticamente mayor ( $p < 0.01$ ) (Fig 12-13) a  $\pm 80\text{mV}$  en comparación al Maxi-canal de placentas normales, obteniéndose a  $-80\text{mV}$  un promedio de  $0.59 \pm 0.04$  para normales ( $n=10$ ) y de  $0.81 \pm 0.02$  para preeclámpticas ( $n=16$ ), y para  $+80\text{mV}$  un promedio de  $0.60 \pm 0.04$  para normales ( $n=10$ ) y de  $0.81 \pm 0.03$  para preeclámpticas ( $n=16$ ) (Fig 13).



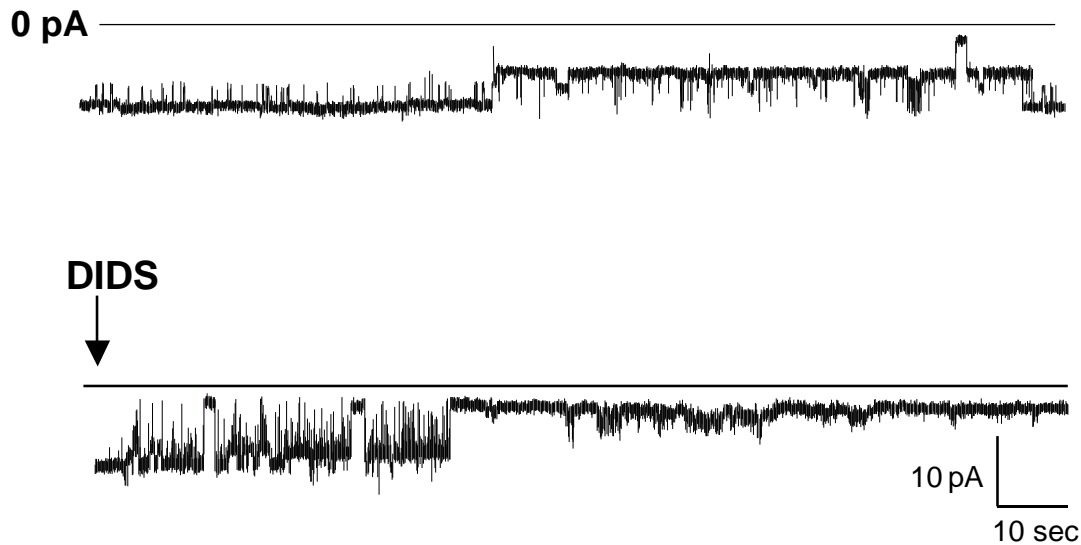
**Figura 13. Comparación de probabilidad de apertura entre placentas normales y preeclámpticas.** Las barras blancas representan la probabilidad de apertura del Maxi canal de cloruro de placentas normales y las barras negras representan la probabilidad de apertura del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas. El \* indica valores  $p < 0.01$ , obtenidos de experimentos independientes. En estos valores se incluye  $\pm$  sem.

La curva en “forma de campana” obtenida de placentas preeclámpticas, es más aplanada que la curva obtenida de placentas normales, lo que indica que la conductancia de los canales de cloruro de placentas preeclámpticas, tiene una menor dependencia de voltaje para su  $P_o$  que las normales.

## **2.2 Modulación del Maxi canal de cloruro de placentas preeclámpticas por DIDS y DPC.**

El efecto del DIDS (4.4-diisothiocyanatostilbene-2.2-sulfonicacid, conocido bloqueador de canales aniónicos) en el Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta preeclámptica se muestra en la Figura 14, donde se obtuvo la corriente de un sello de canal único a un potencial de  $-40$  mV en condiciones control (0 mmol/L DIDS) y después de la adición de un total de 1 mmol/L DIDS. Al incorporar sobre 1 mmol/L de DIDS al baño, el total de la corriente disminuyó en un 48% con respecto al control, correspondiendo a un periodo inicial de aperturas y cierres consecutivos rápidos, seguido de un estado de no-conductancia (bloqueo). Al adicionar DIDS a una concentración de 0.1 mmol/L usando un potencial de  $+40$  mV se observó una disminución del  $64 \pm 3\%$  del total de la corriente del control ( $n=3$ ), sugiriendo un bloqueo voltaje independiente y dosis dependiente. Comparativamente estos resultados son similares a los obtenidos para Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta normal (Brown et al., 1993; Riquelme y Parra, 1999).

## Control



**Figura 14:** Registro representativo de la actividad eléctrica del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de membrana apical de placenta preecláptica, en condiciones simétricas da  $-40$  mV, caso control y después de la adición de 1mmol/L de DIDS.

Al realizar experimentos con DPC (Diphenylamine-2-carboxilate), no se observó ningún efecto sobre la actividad cinética del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta preecláptica, al igual que lo descrito para el Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta normal (Brown *et al.* 1993).

### 2.3 Deactivación del Maxi canal de $\text{Cl}^-$ de placenta preecláptica comparado con Maxi canal de $\text{Cl}^-$ de placenta normal.

El Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de membrana apical de placenta normal muestra una deactivación de la corriente que es voltaje y tiempo dependiente a potenciales positivos y negativos (Fig 7 A). Esta es coincidente con lo descrito anteriormente para placenta normal (Riquelme *et al.* 1995; Riquelme y Parra, 1999).

La deactivación, en el caso de los registros de placenta preecláptica, muestran diferencias con respecto al comportamiento normal (Fig 7 B y C). La

Figura 7 muestra registros representativos de corriente a  $\pm 80\text{mV}$  donde se puede apreciar esta diferencia existente entre ambas situaciones. Como se puede apreciar, la caída de la corriente es más rápida en los registros de placentas normales (Fig 7-A) comparado con los registros de placentas preeclámpticas, donde la deactivación se hace más lenta (Fig 7-B) o se pierde totalmente (Fig 7-C).

La probabilidad de apertura ( $P_o$ ) predice el comportamiento observado. Sin embargo es necesario un análisis de deactivación a tiempo constante entre sellos de placenta normal control y sellos de placenta preeclámptica para obtener las exponenciales de ajuste que den cuenta de este comportamiento. Probablemente sería necesario un gran número de experimentos para así lograr ver una diferencia entre estas 2 poblaciones.

## **2.4 Modulación del Maxi canal de $\text{Cl}^-$ por $17\beta$ estradiol**

Dado que en placenta, el  $17\beta$  estradiol modifica la probabilidad de apertura del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de membrana apical (Henriquez y Riquelme, 2003), se llevaron a cabo experimentos con membranas de placenta preeclámptica usando el mismo protocolo que en placentas normales. Al agregar el  $17\beta$  estradiol, no se observó cambios en el porte del canal (conductancia) ni en la cinética de éste ( $P_o$ ).

## Discusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran la presencia de canales de  $\text{Cl}^-$  en membrana apical de placentas preeclámpticas. Estos resultados constituyen la primera descripción por métodos electrofisiológicos de canales únicos provenientes de membrana apical purificada de placenta patológica.

Los experimentos realizados, muestran un canal de  $\text{Cl}^-$  presente en la membrana apical de placenta preeclámptica con un patrón general de comportamiento similar al del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  descrito en membrana apical de placenta normal. El Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  ha sido identificado en la membrana apical de placenta normal usando métodos electrofisiológicos (Brown *et al.*, 1993; Riquelme *et al.*, 1995; Riquelme y Parra, 1999), también en epitelios secretorios y absortivos (Halm y Frizzell, 1992) y en otros tipos de células (Blatz y Magleby, 1983; Gray *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1984; Nobile y Galletta, 1988). Estos canales presentan una conductancia superior a 250 pS, sensible a DIDS, regulados por ácido araquidónico y otros ácidos grasos insaturados (Riquelme y Parra, 1999), y bloqueados por hormonas esteroidales (Henriquez y Riquelme, 2003), también se sabe que la permeabilidad para aniones es superior a la de cationes y que son permeables a aminoácidos como el aspartato y el glutamato (comunicación personal: datos obtenidos en el laboratorio, sin publicar). Otras propiedades de los Maxi canales son sus múltiples subestados de conductancia y la dependencia de potencial que resulta en una probabilidad de apertura en “forma de campana” (Brown *et al.*, 1993; Riquelme y Parra, 1999).

El canal de  $\text{Cl}^-$  obtenido en las membranas de placenta patológica, posee múltiples estados de subconductancia, es inhibido por DIDS, presenta una alta conductancia, pero a diferencia del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placentas normales, en este caso se distinguen dos grupos de registros, uno de ellos con una conductancia del estado principal muy similar al normal; de alrededor de 250 pS y otro grupo en que la conductancia del estado principal es menor que 150 pS.

Otra diferencia significativa es que en los canales provenientes de placentas preeclámpticas, la curva de la probabilidad de apertura del canal versus el potencial es menos pronunciada, cambiando la “forma de campana” típica descrita (Brown et al., 1993; Riquelme y Parra, 1999), a una más plana con poca diferencia entre los potenciales de máxima apertura y los valores extremos, tanto positivos como negativos. Esto indica una disminución de la dependencia de la apertura del canal en función del potencial. Por otro lado, al agregarle  $17\beta$  estradiol, no presentó diferencias con respecto al canal normal, aunque no se descarta que al realizar un estudio más detallado si se encuentre efecto por parte del  $17\beta$  estradiol en el Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta preeclámptica

La pregunta que queda abierta es si el canal proveniente de la membrana apical de placenta preeclámptica, es una variante molecular del Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  de placenta normal o si el canal normal está modificado en su funcionalidad en esta patología. Para estas dos alternativas de explicación aún no tenemos respuesta. No se conoce la estructura molecular del canal normal, sin embargo trabajos en curso en el LEM tienen como objetivo la identificación de su estructura molecular, esto permitirá compararlo con el proveniente de tejido



patológico. La segunda alternativa podría deberse a cambios en la composición lipídica o de las proteínas reguladoras de los microdominios que rodean al canal, sin embargo aún no hay trabajos reportados en este sentido. En el LEM, se pretende estudiar a futuro, la composición lipídica de las membranas, ya que hay evidencias del rol modulador de los entornos lipídicos en la actividad de los canales iónicos (Hajdu et al., 2003).

Aunque aún es una tarea a futuro comprender el porque de las diferencias observadas entre las características biofísicas de los canales provenientes de membranas normales y membranas patológicas, lo importante del presente trabajo es haber detectado y reportado una alteración funcional de los canales provenientes de tejido de placentas con preeclampsia. Defectos en la función de canales iónicos son actualmente de gran interés, no solo por la capacidad de abrir grandes estrategias terapéuticas, sino que también porque estas alteraciones ayudan al entendimiento de la función de los canales iónicos.

Canales sensibles a DIDS, de conductancias aniónicas, se han reportado como el camino responsable del transporte de  $\text{Cl}^-$  involucrado en la generación de parte del potencial del sinciotrofoblasto y estas conductancias están aparentemente involucradas en la regulación del volumen celular (Birdsey et al., 1997; Birdsey et al., 1999). Aunque el canal iónico específico involucrado en estas funciones no está bien identificado, el Maxi canal de  $\text{Cl}^-$  es un candidato para realizarlas. En el último tiempo se ha reportado que el transporte de nutrientes a través del sinciotrofoblasto es controlado por el potencial de membrana, ya que depende del gradiente electroquímico (Birdsey et al. 1999). Considerando los antecedentes anteriores, defectos en la función del canal iónico proveniente de placentas preeclámpticas, podría afectar el

transporte y otras funciones de las placentas provenientes de pacientes con preeclampsia.

El rol del Maxi-canal de Cl<sup>-</sup>, tanto en sinciotrofoblasto de placentas normales como de placentas patológicas, es aun desconocido. Sin embargo, las diferencias detectadas pueden ser importantes en la generación del modelo de transporte de solutos a través de la placenta. En particular, estos resultados pueden ayudar al entendimiento de los mecanismos involucrados en importantes funciones, tales como la secreción de Cl<sup>-</sup> en placenta normal y patológica. Además, si estos canales contribuyen a la generación del potencial de membrana, su alteración podría tener consecuencias en el transporte y entrega de nutrientes al feto. La caracterización de estos canales, podría ayudar a comprender su posible rol en el transporte transplacentario, tanto en tejido placentario normal como en el patológico ayudando así al estudio de patologías del embarazo lo que permitiría abrir nuevas sendas para la adecuada supervisión, manejo y puesta en práctica de invalorable aplicaciones clínicas dirigidas al tratamiento de estas patologías.

## Conclusiones

- 1.- Se logró reconstituir membranas purificadas de placentas de embarazos con preeclampsia en un sistema lipídico artificial, adecuado para llevar a cabo la técnica de patch clamp.
- 2.- Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la presencia de un canal de cloruro en la membrana apical de placentas preeclámpticas.
- 3.- El canal de membrana de placentas patológicas presenta diferencias en algunas de sus características biofísicas, con respecto al canal de membrana de placentas normales:
  - Presencia de dos subconductancias principales, a diferencia de la única subconductancia principal del canal de placentas normales.
  - Disminución de la dependencia de voltaje de la probabilidad de apertura en potenciales extremos.
- 4.- El canal de membrana de placentas patológicas es bloqueado por DIDS al igual que el canal de placentas normales.
- 5.- No se detectó efecto del  $17\beta$  estradiol en membrana apical de placenta preeclámptica.

## Bibliografía

**Bernucci L., Umana F., Llanos P., and Riquelme G.** (2003) Large chloride channel from pre-eclamptic human placenta. *Placenta* **24**, 895-903.

**Birdsey T. J., Boyd R. D., Sibley C. P., and Greenwood S. L.** (1997) Microvillous membrane potential (Em) in villi from first trimester human placenta: comparison to Em at term. *Am J Physiol* **273**, R1519-R1528.

**Birdsey T. J., Boyd R. D., Sibley C. P., and Greenwood S. L.** (1999) Effect of hyposmotic challenge on microvillous membrane potential in isolated human placental villi. *Am J Physiol* **276**, R1479-R1488.

**Bissonnette J. M., Weiner C. P., and Power G. G. J.** (1994) Amino acid uptake and chloride conductances in human placenta [letter]. *Placenta* **15**, 445-446.

**Blatz A. L. and Magleby K. L.** (1983) Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys J* **43**, 237-241.

**Bosco C.** (1996) Placenta, *In Embriología Humana* (Montenegro M. A., Mena M., Illanes J., and Lemus D., eds, Depto. de Morfología Experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Chile., Santiago, Chile, pp. 89-107

**Brown P. D., Greenwood S. L., Robinson J., and Boyd R. D.** (1993) Chloride channels of high conductance in the microvillous membrane of term human placenta. *Placenta* **14**, 103-115.

**Byrne S., Glazier J. D., Greenwood S. L., Mahendran D., and Sibley C. P.**

(1993) Chloride transport by human placental microvillous membrane vesicles.

*Biochem Biophys Acta* **1153**, 122-126.

**Casart Y., Proverbio T., Marin R., and Proverbio F.** (2001) Comparative

study of the calcium adenosine triphosphatase of basal membranes of human placental trophoblasts from normotensive and preeclamptic pregnant women.

*Gynecol Obstet Invest* **51**, 28-31.

**Challier J. C.** (1989) The placental barrier: structure, resistance, asymmetry.

*Reprod Nutr Dev* **29**, 703-716.

**Clarson L. H., Greenwood S. L., Mylona P., and Sibley C. P.** (2001) Inwardly

rectifying K(+) current and differentiation of human placental cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* **22**, 328-336.

**Dehecchi M. C. and Cabrini G.** (1988) Chloride conductance in membrane

vesicles from human placenta using a fluorescent probe. Implications for cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* **945**, 113-120.

**Dekker G. A. and Sibai B. M.** (1998) Etiology and pathogenesis of

preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 1359-1375.

**Doughty I. M., Glazier J. D., Powell T. L., Jansson T., and Sibley C. P.**

(1998) Chloride transport across syncytiotrophoblast microvillous membrane of first trimester human placenta. *Pediatr Res* **44**, 226-232.

**Faller D. and Ryan M. P.** (1992) Factors affecting chloride conductance in

apical membrane vesicles from human placenta. *J Membr Biol* **130**, 227-239.

**Faller D. P., Egan D. A., and Ryan M. P.** (1995) Evidence for location of the CFTR in human placental apical membrane vesicles. *Am J Physiol* **269**, C148-C155.

**Gray P. T., Bevan S., and Ritchie J. M.** (1984) High conductance anion-selective channels in rat cultured Schwann cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **221**, 395-409.

**Grosman C., Mariano M. I., Bozzini J. P., and Reisin I. L.** (1997) Properties of two multisubstate Cl<sup>-</sup> channels from human syncytiotrophoblast reconstituted on planar lipid bilayers. *J Membr Biol* **157**, 83-95.

**Hajdu P., Varga Z., Pieri C., Panyi G., and Gaspar R., Jr.** (2003) Cholesterol modifies the gating of Kv1.3 in human T lymphocytes. *Pflugers Arch* **445**, 674-682.

**Halm D. R. and Frizzell R. A.** (1992) Anion permeation in an apical membrane chloride channel of a secretory epithelial cell. *J Gen Physiol* **99**, 339-366.

**Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., and Sigworth F. J.** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391**, 85-100.

**Heilmann L., von Tempelhoff G. F., and Ulrich S.** (1993) The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> co-transport system in erythrocytes from pregnant patients. *Arch Gynecol Obstet* **253**, 167-174.

**Henriquez M. and Riquelme G.** (2003) 17  $\beta$ -estradiol and tamoxifen regulate a maxi-chloride channel from human placenta. *J Membr Biol* **191**, 59-68.

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

**Hurnák O. and Zachar J.** (1992) Maxi chloride channels in L6 myoblasts. *Gen Physiol Biophys* **11**, 389-400.

**Illsley N. P. and Sellers M. C.** (1992) Ion conductances in the microvillous and basal membrane vesicles isolated from human placental syncytiotrophoblast. *Placenta* **13**, 25-34.

**Illsley N. P., Wang Z. Q., Gray A., Sellers M. C., and Jacobs M. M.** (1990) Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim Biophys Acta* **1029**, 218-226.

**Jimenez, V, Henriquez, M, Llanos, P, and Riquelme, G.** (2003) Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and preeclamptic pregnancies. A Comparative Study. *Placenta* in press.

**Knerr I., Beinder E., and Rascher W.** (2002) Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Obstet Gynecol* **186**, 210-213.

**Leeson T., Leeson C., and Paparo A.** (1998) Aparato Reproductor Femenino, *En Texto/Atlas de Histología*. Interamericana Mc Graw-Hill, pp. 599-634.

**Maly P. and Lüthi C.** (1986) Purification of the type I insulin-like growth factor receptor from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun* **137**, 695-701.

**Mitchell C. H., Wang L., and Jacob T. C.** (1997) A large-conductance chloride channel in pigmented ciliary epithelial cells activated by GTPgammaS. *J Membr Biol* **158**, 167-175.

**Neher E. and Sakmann B.** (1992) The patch clamp technique. *Sci Am* **266**, 28-35.

**Nelson D. J., Tang J. M., and Palmer L. G.** (1984) Single-channel recordings of apical membrane chloride conductance in A6 epithelial cells. *J Membr Biol* **80**, 81-89.

**Nobile M. and Galletta L. J.** (1988) A large conductance Cl<sup>-</sup> channel revealed by patch-recordings in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **154**, 719-726.

**Phyllis A. and Burton D.R.** (2001) Pathogenesis and clinical features of preeclampsia. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).

**Phyllis A. and Burton D.R.**(2001) Pathogenesis and Clinical Features of Preeclampsia. UpToDate 2001.

**Ravel D., Chambaz J., Pepin D., Manier M. C., and Bereziat G.** (1985) Essential fatty acid interconversion during gestation in the rat. *Biochim Biophys Acta* **833**, 161-164.

**Regnault T. R., Galan H. L., Parker T. A., and Anthony R. V.** (2002) Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta* **23 Suppl A**, S119-S129.



**Riquelme G., Lopez E., Garcia S. L., Ferragut J. A., and Gonzalez R. J.** (1990) Giant liposomes: a model system in which to obtain patch-clamp recordings of ionic channels. *Biochemistry* **29**, 11215-11222.

**Riquelme G. and Parra M.** (1999) Regulation of human placental chloride channel by arachidonic acid and other cis unsaturated fatty acids. *Am J Obstet Gynecol* **180**, 469-475.

**Riquelme G., Stutzin A., Barros L. F., and Liberona J. L.** (1995) A chloride channel from human placenta reconstituted into giant liposomes. *Am J Obstet Gynecol* **173**, 733-738.

**Sadler T.W.** (1998) Membranas fetales y placenta, In *Embriología médica*. Editorial médica Panamericana, pp. 94-113

**Sakbun V., Koay E. S., and Bryant-Greenwood G. D.** (1987) Immunocytochemical localization of prolactin and relaxin C-peptide in human decidua and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **65**, 339-343.

**Schlichter L. C., Grygorczyk R., Pahapill P. A., and Grygorczyk C.** (1990) A large, multiple-conductance chloride channel in normal human T lymphocytes. *Pflugers Arch* **416**, 413-421.

**Shennan D. B.** (1995) Identification of a high affinity taurine transporter which is not dependent on chloride. *Biosci Rep* **15**, 231-239.

**Shennan D. B. and Boyd C. A.** (1987) Ion transport by the placenta: a review of membrane transport systems. *Biochim Biophys Acta* **906**, 437-457.

**Shennan D. B., Davis B., and Boyd C. A.** (1986) Chloride transport in human placental microvillus membrane vesicles. I. Evidence for anion exchange. *Pflugers Arch* **406**, 60-64.

**Shennan D. B. and McNeillie S. A.** (1995) Volume-activated amino acid efflux from term human placental tissue: stimulation of efflux via a pathway sensitive to anion transport inhibitors. *Placenta* **16**, 297-308.

**Stulc J.** (1997) Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev* **77**, 805-836.

**Sullivan R., Kunze D. L., and Kroll M. H.** (1996) Thrombin receptors activate potassium and chloride channels. *Blood* **87**, 648-656.

**Torbergesen T., Oian P., Mathiesen E., and Borud O.** (1989) Pre-eclampsia--a mitochondrial disease? *Acta Obstet Gynecol Scand* **68**, 145-148.

**Vanderpuye O. A. and Smith C. H.** (1987) Proteins of the apical and basal plasma membranes of the human placental syncytiotrophoblast: immunochemical and electrophoretic studies. *Placenta* **8**, 591-608.

**von Weikersthal S. F., Barrand M. A., and Hladky S. B.** (1999) Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. *J Physiol (Lond)* **516**, 75-84.