



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE TIPOS DE
CANALES DE POTASIO PRESENTES EN MEMBRANAS
APICALES DE SINCICIOTROFOBLASTO PLACENTARIO
HUMANO”**

NICOLE FRANCESCA DE GREGORIO CARBONELL

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

PROFESOR GUÍA: GLORIA HENA RIQUELME PINO

SANTIAGO – CHILE

2011

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.- ESTRUCTURA Y FORMACIÓN DE LA PLACENTA.....	2
1.1 Estructura de la Placenta Madura.....	2
1.2 La Membrana Placentaria.....	4
1.3 Desarrollo del Trofoblasto.....	6
1.4 Circulación de la Placenta.....	7
2.- FUNCIONES DE LA PLACENTA.....	8
2.1 Funciones Endocrinas de la Placenta.....	8
2.2 Funciones Protectivas de la Placenta.....	8
2.3 Transporte y Metabolismo.....	8
3.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES.....	10
3.1 Organización Molecular de las Membranas Biológicas.....	10
3.2 Difusión Simple.....	12
3.3 Transporte Mediado.....	12
4.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE CANALES IÓNICOS.....	14
4.1 <i>Conductancia</i>	14
4.2 <i>Selectividad</i>	15
4.3 <i>Cinética</i>	16
5.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA PLACENTA HUMANA.....	17
6.- CANALES DE POTASIO.....	18
6.1 Clasificación y Diversidad de Canales de K ⁺	19
6.1.1 Calcium-Activated K ⁺ Channels (Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺).....	19
6.1.2 Two-Pore K ⁺ Channels (Canales de Potasio de doble Poro).....	21
6.1.3 Voltage-gated K ⁺ Channels (Canales de K ⁺ dependientes de Voltaje).....	23
6.1.4 Inward Rectifier K ⁺ Channels (Canales de K ⁺ Rectificadores de Entrada (K _{IR})).....	24
6.1.5 ATP-Sensitive K ⁺ Channels (Canales de Potasio sensibles a ATP).....	25
7.- CANALES DE POTASIO EN MEMBRANA PLACENTARIA.....	25
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJEIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.- Obtención de Placentas.....	32
2.- Obtención de Membranas Purificadas de Sinciotrofoblasto.....	32
3.- Preparación de Liposomas Gigantes.....	36
4.- Técnica de Patch-Clamp.....	37
5.- Electroforesis SDS-page y Western Blot.....	39

6.- Inmunohistoquímica por el Método ABC.....	40
7.- Cuantificación de los Datos.....	42
RESULTADOS.....	44
1.- Obtención de cortes de tejido y de membranas apicales altamente purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas.....	44
2.- Detección de la presencia de distintos tipos de canales de K^+ en cortes de tejido placentario, mediante el método Inmunohistoquímico ABC.....	45
3.- Detección de la presencia de distintos tipos de canales de K^+ en membranas purificadas de placentas humanas normales a término mediante técnica de Western Blot.....	48
3.1 Expresión de $K_{IR}2.1$ en Membranas Purificadas de hSTB.....	49
3.2 Expresión de $K_V2.1$ en Membranas Purificadas de hSTB.....	50
3.3 Expresión de TASK-1 en Membranas Purificadas de hSTB.....	51
3.4 Expresión de TREK-1 en Membranas Purificadas de hSTB.....	52
3.5 Expresión de BK_{Ca} en Membranas Purificadas de hSTB.....	53
3.6 Gráfico Resumen de la Distribución Densitométrica Relativa de Canales de K^+ testeados para cada una de las membranas purificadas.....	54
4.- Reconstitución de LMVM purificada de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término en un sistema lipídico artificial y obtención de sellos de alta resistencia mediante técnica de Patch-Clamp.....	55
5.- Detección de corrientes de K^+	56
6.- Identificación de corrientes de K^+ en condiciones asimétricas de Gluconato de Potasio.....	57
7.- Caracterización de la conductancia de las corrientes unitarias de K^+ bajo condiciones simétricas de Gluconato de Potasio.....	59
8.- Reproducción electrofisiológica de corrientes de K^+ mediante bloqueos diferenciales.....	60
9.- Identificación de características específicas, por métodos electrofisiológicos, de cuatro tipos de canales de K^+ presentes en LMVM de hSTB: $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1, mediante bloqueos selectivos.....	64
DISCUSIÓN.....	73
CONCLUSIÓN.....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82

RESUMEN

La gestación, en todas las especies, es apoyada por una estructura que permite que el nuevo ser pueda desarrollarse y crecer adecuadamente dentro del vientre materno: la placenta. El transporte de solutos a través de ella se realiza, específicamente, a través de una célula epitelial multinucleada: el sincitiotrofoblasto (hSTB). Al ser un epitelio continuo, todo soluto debe atravesar, obligatoriamente, tanto su membrana apical como su membrana basal (BM). La membrana apical del hSTB se divide en dos subdominios diferentes entre sí: membrana apical pesada (MVM) y membrana apical liviana (LMVM).

Para desarrollar el modelo de transporte transplacentario, es necesario identificar las vías conductivas existentes en las membranas del hSTB. Existen numerosos estudios acerca de canales iónicos y transportadores en ellas, sin embargo, en particular, los canales de K^+ (principal ión intracelular) han sido pobremente descritos. Un estudio preliminar demostró la existencia funcional de corrientes de K^+ en LMVM de hSTB.

El objetivo del presente estudio, fue caracterizar funcional y estructuralmente que tipo de canales de K^+ son los que subyacen las corrientes identificadas previamente en LMVM de hSTB de placentas humanas normales.

Experimentos de Inmunohistoquímica revelaron la presencia de TREK-1 en membrana apical del hSTB y de BK_{Ca} en el citoplasma del sincitiotrofoblasto. Adicionalmente, mediante Immunoblotting, se detectó la presencia de $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1 en ambos subdominios de membrana apical, mientras que la expresión de BK_{Ca} fue, principalmente, en BM.

La detección funcional de los canales de K^+ que demostraron estar presentes en LMVM ($K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1) por Immunoblotting, fue realizada utilizando la técnica de Patch-Clamp en configuración parche escindido (116 sellos de 16 placentas independientes). Se utilizaron bloqueos diferenciales para poder disecar corrientes con diferentes características. Se obtuvieron corrientes de K^+ muy sensibles al bloqueo por $BaCl_2$ (69,82%) de manera reversible. Adicionalmente, se obtuvieron registros de

corrientes con sensibilidad a $MgCl_2$ y $CsCl_2$ (29% y 25%, respectivamente). Estas corrientes son características del canal $K_{IR2.1}$. Por otro lado, se obtuvieron corrientes que demostraron tener un gran sensibilidad al bloqueador TEA a concentraciones milimolares (79,86%), las que corresponderían al canal $K_V2.1$. En contraste, se obtuvieron corrientes que no presentaron efectos a los bloqueadores mencionados y que sin embargo, mostraron diferentes respuestas a la acidificación del medio. Es así como, un canal que pudiese corresponder a TASK-1 se obtuvo al registrar corrientes bloqueadas a pH 6,1 (bloqueo de un 28,92%) y una corriente que mostró una fuerte activación a pH 6,6 (63,08% de aumento sobre la corriente inicial), cuyo candidato más probable es TREK-1.

Estos experimentos demostraron, en base a su farmacología y respuesta a cambios del medio, la presencia de cuatro canales de K^+ ($K_{IR2.1}$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1) en LMVM del hSTB lo que se correlaciona directamente con lo observado mediante Western blots.

SUMMARY

The pregnancy in all species is supported by a structure that facilitates the growth and development of new being in the womb: known as the placenta. Ionic solutes transport through placenta is performed specifically by a multinucleated epithelial cell: the syncytiotrophoblast (hSTB). For its feature of being a continuous epithelium, solutes must cross through its apical membrane and its basal membrane (BM). The apical membrane of hSTB is divided into two different subdomains: high apical membrane (MVM) and light apical membrane (LMVM).

To develop a transplacental transport model, it's necessary to identify the conductive pathways in the membrane that make up on the hSTB. There are numerous studies about ion channels and carriers in them, however, in particular, K^+ channels (the main intracellular ion) have been poorly described. A preliminary study demonstrated the functional existence of K^+ currents in LMVM of hSTB.

The aim of this study was to characterize both structural and functionally what are the kinds of K^+ channels are under the previously identified currents in LMVM to hSTB of normal human placentas.

Immunostaining experiments performed in this investigation revealed the presence of TREK-1 in apical membrane of hSTB and BK_{Ca} in trophoblast cytoplasm. Additionally, detected through Immunoblotting, the presence of $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 and TREK-1 in both subdomains apical membranes, mainly, the expression of BK_{Ca} was, principally, in BM.

The functional detection of K^+ channels which proved to be present in LMVM ($K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 and TREK-1) by Immunoblotting was conducted using Patch-Clamp technique in inside-out patches (116 stamps from 16 independent placentas). Blocks were used to dissect differential currents with different characteristics. K^+ currents sensitive to blockade with $BaCl_2$ (68.2%) in a reversible manner were obtained. Furthermore, currents

records were obtained with $MgCl_2$ and $CsCl_2$ sensitivity (blockade in 29 and 25%, respectively). These currents are characteristic of the $K_{IR}2.1$ channel. On the other hand, currents that shown to have a great sensitivity to millimolar concentrations of blocker TEA (79.86%) was found, which correspond to the $K_V2.1$ channel. In contrast with these two situations, currents were obtained which showed no effect to the blockers mentioned, however, showed different responses to acidification of the medium. Thus, a channel that may correspond to TASK-1 was obtained by checking blocked currents at pH 6.1 (blocking pH 28.92%), and a current that showed a strong activation at pH 6.6 (63.08% increase over the initial currents) which most likely candidate is TREK-1.

These experiments showed based on their pharmacology and responses to the environmental changes, the presence of four K^+ channels ($K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 and TREK-1) in LMVM of hSTB, which suggest a direct correlation between this data and the Western blots.

INTRODUCCIÓN

La placenta, órgano transitorio y vital para el crecimiento y desarrollo fetal, es formada por tejidos tanto de origen materno como embrionario. El transporte realizado a través de ella, junto con la producción de hormonas y transferencia de anticuerpos son sus principales funciones. La sangre materna y la sangre fetal nunca se mezclan, esto debido a dos capas celulares completas que separan ambas sangres, el sincitiotrofoblasto placentario (hSTB) y el endotelio de los capilares fetales. En estas zonas de contacto, el CO₂ y otros residuos metabólicos del feto pasan a la madre y desde ésta pasan al feto oxígeno y nutrientes.

El hSTB es un epitelio polarizado, que constituye la principal barrera para el intercambio materno-fetal. Además es un sincicio, es decir, no contiene rutas paracelulares, por tanto las sustancias deben atravesar tanto su membrana apical como su membrana basal. Este transporte, al igual que en todas las membranas, puede ocurrir por difusión simple o mediado por proteínas integrales (transportadores y canales iónicos)

Los canales iónicos son los encargados de la regulación del volumen celular, generación del potencial de membrana y transporte de solutos electrogénicos, como el potasio. Éste es el principal catión intracelular y por tanto, su mecanismo de regulación está finamente controlado. Los canales de K⁺ se han encontrado en todos los tipos celulares y su función está ligada a la regulación del volumen celular, participación en el potencial de membrana y secreción hormonal, junto a otras funciones tanto de células epiteliales como no epiteliales.

Trabajos anteriores han demostrado la existencia de estos canales en el hSTB, siendo involucrados en estos procesos y caracterizando sus propiedades electrofisiológicas; sin embargo su expresión, funcionalidad y localización han sido escasamente estudiadas.

El objetivo principal del presente estudio es detectar tipos específicos de canales de K⁺ presentes en la membrana apical liviana del hSTB que sustentan las corrientes de K⁺ previamente detectadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- ESTRUCTURA Y FORMACIÓN DE LA PLACENTA

La placenta es un órgano altamente especializado de la gestación que, junto con las membranas fetales y el fluido amniótico, da soporte al crecimiento y desarrollo normal del feto. El crecimiento y la función de la placenta están precisamente regulados y coordinados para asegurar que los sistemas de intercambio de nutrientes y productos de desechos entre la circulación de la madre y el feto opere con la máxima eficacia (Gude *et al.*, 2004).

Las funciones placentarias son realizadas por una célula epitelial multinucleada denominada sincitiotrofoblasto que forma una interfase física, inmunológica y endocrina entre las circulaciones materna y fetal (Williams *et al.*, 2008).

1.1 Estructura de la Placenta Madura

La unidad utero-placentaria está compuesta tanto por tejido fetal derivado del saco coriónico y tejido materno derivado del endometrio (Gude *et al.*, 2004) (Imagen 2A). Como se muestra en Imagen 1 e Imagen 2A hacia el comienzo del cuarto mes, la placenta posee dos componentes: a) una **porción fetal**, formada por el corion frondoso, y b) una **porción materna** formada por la decidua basal (Sadler, 2001). Entre medio de éstas dos regiones está el espacio intervelloso, ocupado por sangre materna y revestido por sincicio de origen fetal (Sadler, 2001). El espacio intervelloso es quien contiene la principal unidad funcional de la placenta, las **estructuras vellosas** (Imagen 2B), que están extensivamente ramificadas y empaquetadas conteniendo los vasos sanguíneos fetales. En las regiones terminales de la vellosidad coriónica es donde ocurre la mayoría del intercambio materno-fetal (Gude *et al.*, 2004).

En el curso del cuarto y quinto mes, la decidua forma varios tabiques deciduales, que sobresalen en los espacios intervellosos pero no llegan a la lámina coriónica. Como consecuencia de la formación de estos tabiques, la placenta queda dividida en varios

compartimentos o cotiledones (Imagen 1). Dado que los tabiques deciduales no llegan a la lámina coriónica, se mantiene el contacto entre los espacios intervillosos en los diversos cotiledones (Sadler, 2001).

El incremento constante de las demandas metabólicas del feto en crecimiento, es equilibrado por el incremento del flujo de sangre y el crecimiento de la placenta (Gude *et al.*, 2004). El aumento del área superficial de la placenta es paralelo al del útero en expansión y durante todo el embarazo cubre aproximadamente entre 15 al 30% de la superficie interna del útero. El aumento del grosor de la placenta se debe a la arborización de las vellosidades existentes y no a la penetración ulterior en los tejidos maternos (Sadler, 2001).

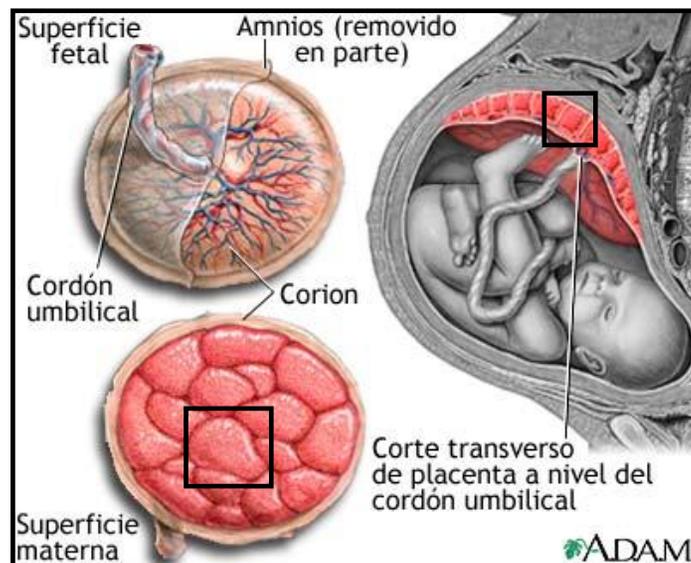


Imagen 1. Representación Macroscópica de la Placenta Madura. Cuadros negros sobre la imagen delimitan a los cotiledones formados a partir de la semana 20 de gestación (A.D.A.M. Interactive Medicine 3.0, CD).

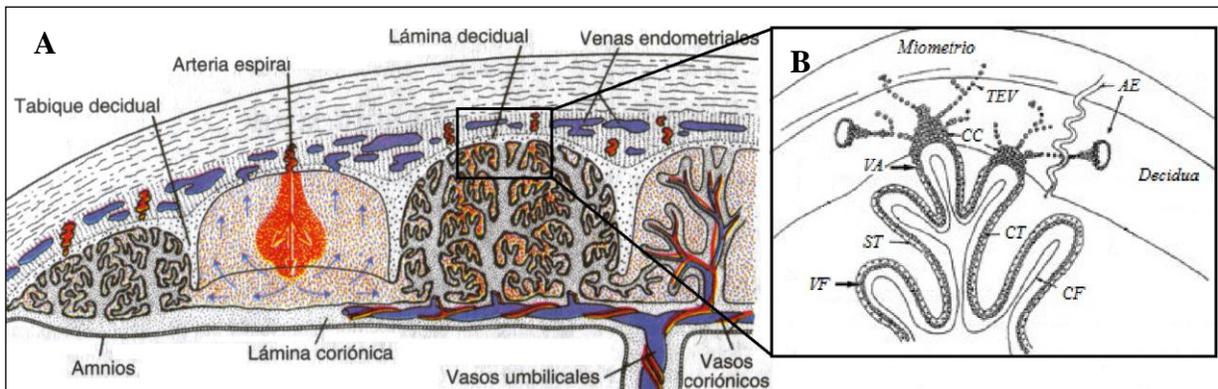


Imagen 2. Esquema microscópico de la placenta humana normal. A) Se diferencia una cara fetal, formada por el amnios y la lámina coriónica, y una cara materna constituida por la placa basal. B) En mayor detalle, se distingue la placa basal, compuesta por la decidua basal, el sinciotrofoblasto (ST) y la concha citotrofobástica (CC), que corresponde a células del citotrofoblasto (CT) que invaden la decidua. Además se observan las vellosidades de anclaje (VA) unidas a la decidua basal y las vellosidades flotantes (VF) en el espacio intervelloso (Sadler, T. (2001), Langman: Embriología médica con orientación clínica. pp.139).

1.2 La Membrana Placentaria

La membrana placentaria de término (también llamada **barrera placentaria**) se refiere a la capa de células que separan la sangre materna y la sangre fetal. Inicialmente, la membrana placentaria está constituida de cuatro capas, el sinciotrofoblasto hacia la cara materna, una capa de células citotrofoblásticas, tejido conectivo de la vellosidad y el endotelio revistiendo los capilares fetales (Imagen 3). Aproximadamente en la semana 20 de gestación, comienzan a desaparecer células de tejido conectivo (Sadler, 2001) y la capa de células del citotrofoblasto de muchas vellosidades comienza a atenuarse y desaparece; en algunas áreas es extremadamente delgada, tanto, que el sinciotrofoblasto empieza a tener contacto directo con el endotelio del capilar fetal (Imagen 3). Así, en esta posición, la sangre materna y la sangre fetal tiene una muy cercana proximidad (Gude *et al.*, 2004) y, por lo tanto, las únicas capas que separan las circulaciones materna y fetal son el sincicio y la pared endotelial de los vasos sanguíneos (Sadler, 2001).

El **sinciotrofoblasto placentario humano** (hSTB) es una estructura epitelial polarizada, sin rutas paracelulares, que forma la principal barrera para el intercambio materno-fetal (Díaz *et al.*, 2008). Este epitelio está compuesto por una larga célula multinucleada que

resulta de la fusión de las células precursoras citotrofoblásticas (Jiménez *et al.*, 2004). Su membrana plasmática microvellosa está en contacto con la sangre materna y su membrana plasmática basal está en frente de los capilares fetales. El intercambio de nutrientes ocurre a través de estas dos capas trofoblásticas (Williams *et al.*, 2008). Consecuentemente, el crecimiento y el bienestar del feto depende del desarrollo apropiado del sinciciotrofoblasto y de su función a través de la gestación (Williams *et al.*, 2008).

El sinciciotrofoblasto tiene una vida corta y está continuamente renovándose a través de la gestación por la proliferación de células citotrofoblásticas mononucleadas, que se salen del ciclo celular, diferenciándose y fusionándose con la capa sincicial subyacente. El volumen del sinciciotrofoblasto está correlacionado con el peso al nacer, y la disrupción de su renovación es propuesto como patología subyacente de enfermedades gestacionales como la preeclampsia (PE) y la restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) (Williams *et al.*, 2008).

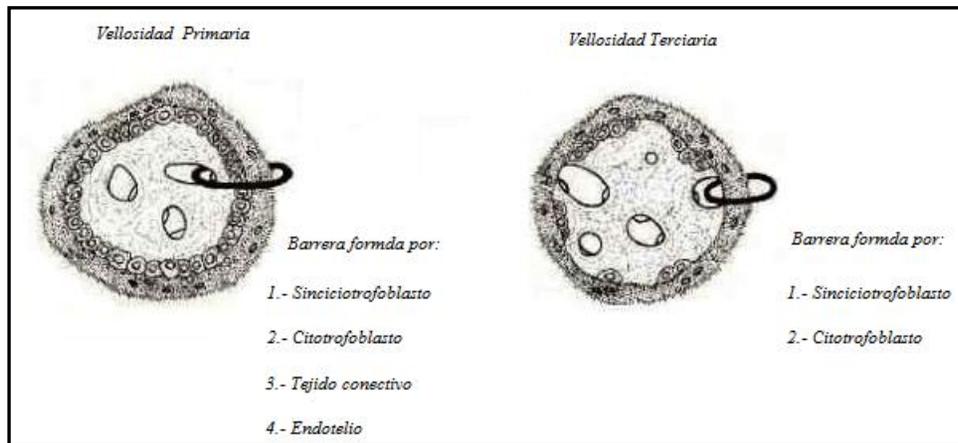
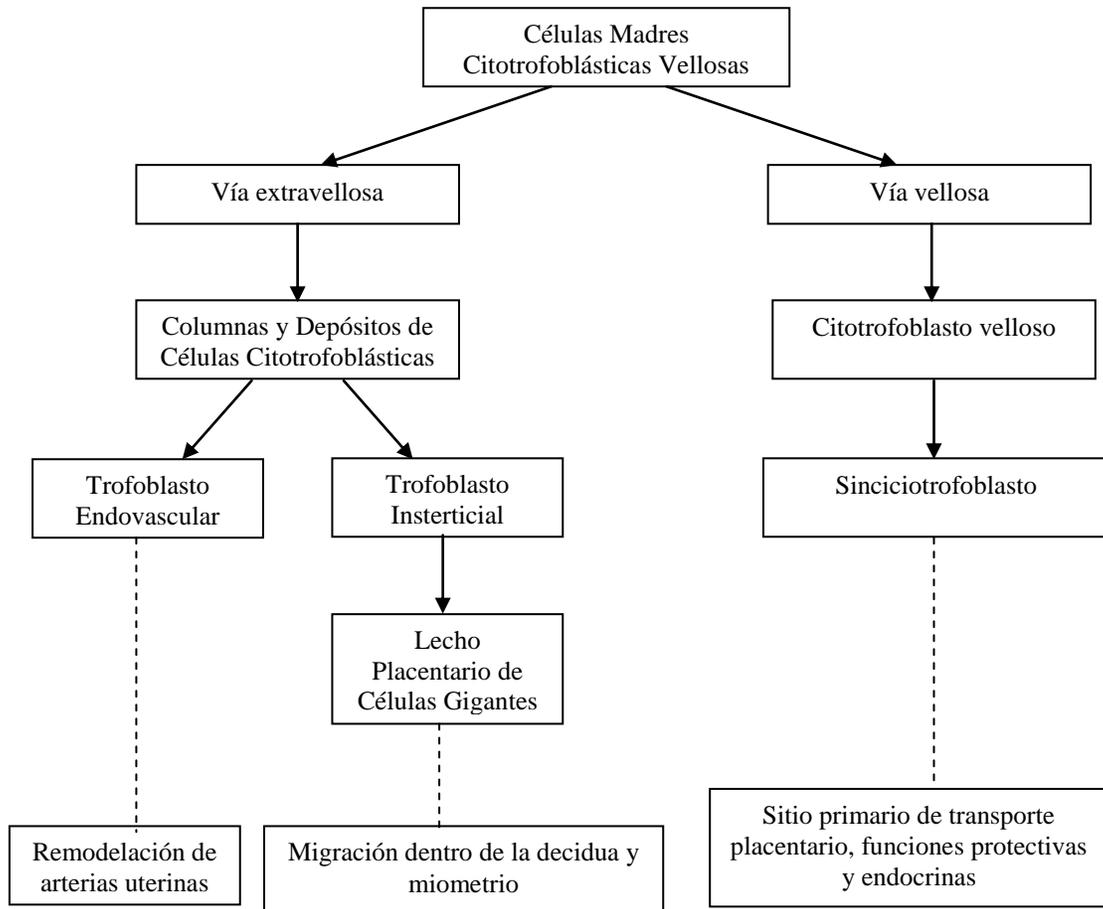


Imagen 3. Corte transversal de vellosidades coriales de primer trimestre y de término. Nótese el aumento de calibre de los vasos de la vellosidad de término, la disminución del tejido conectivo y el reducido número de células citotrofoblásticas (Sadler, T. (2001), Langman: Embriología médica con orientación clínica. pp.134).

1.3 Desarrollo del Trofoblasto

Después de una implantación exitosa y la iniciación de la placentación, las células del trofoblasto son sometidas a una extensiva proliferación y diferenciación. Existen dos vías principales por donde la diferenciación del trofoblasto puede ocurrir: la vellosa y la extravellosa, tal como se muestra en Esquema 1.



Esquema 1. Vías de diferenciación del trofoblasto y su función (Gude *et al.*, 2004).

Las células de citotrofoblasto velloso no migran, sino que proliferan, se diferencian y fusionan para formar el sinciotrofoblasto. Las células del trofoblasto extraveloso migran dentro de la decidua y remodelan las arterias uterinas. Esto facilita que la sangre fluya por la placenta vía dilatación que no responde a un control vasomotor materno. Así, el suministro de sangre materna hacia la placenta es promovido por este proceso y corresponde a cerca del 30% del flujo cardiaco materno (Gude *et al.*, 2004).

1.4 Circulación de la Placenta

Los cotiledones reciben sangre a través de las arterias espirales, que atraviesan la lámina decidual y entran en los espacios intervillosos con intervalos mas o menos regulares (Sadler, 2001).

Esta sangre se desplaza a lo largo de las vellosidades coriónicas (Imagen 4) pero, el intercambio placentario no se produce en todas las vellosidades sino, sólo en aquellas en las cuales los vasos fetales están en íntimo contacto con la membrana sincicial de revestimiento. En estas vellosidades, el sincicio tiene un ribete en cepillo formado por numerosas microvellosidades, lo cual aumenta considerablemente el área superficial y en consecuencia el índice de intercambio entre las circulaciones materna y fetal (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 (Sadler, 2001).

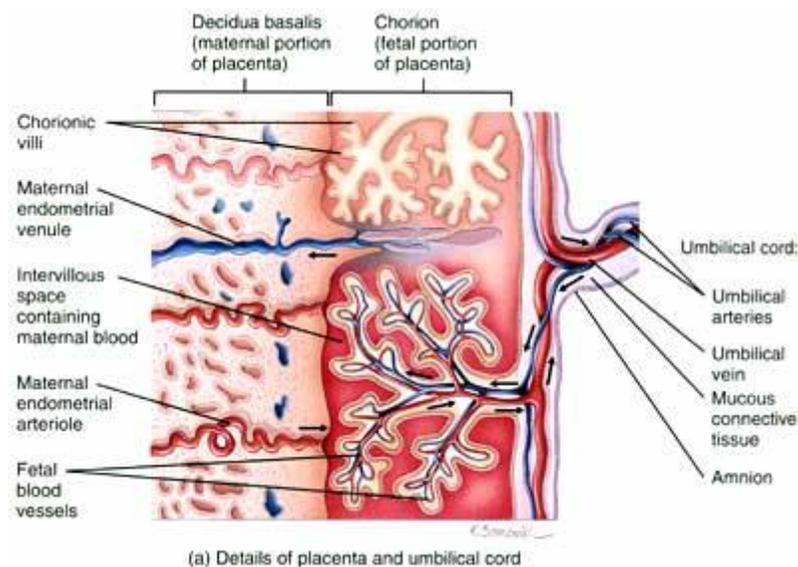


Imagen 4. Representación de la Circulación entre madre y feto. Nótese el espacio intervilloso conteniendo sangre materna. Los capilares fetales están contenidos dentro de las vellosidades coriónicas. Ambas circulaciones nunca se mezclan debido al revestimiento dado por el sinciotrofoblasto placentario humano.

2.- FUNCIONES DE LA PLACENTA

Las principales funciones de la placenta son: la **producción de hormonas** (Gude *et al.*, 2004) y el **intercambio de productos metabólicos y gaseosos** entre la circulación materna y fetal (Sadler, 2001).

2.1 Funciones Endocrinas de la Placenta

Factores endocrinos, paracrinos y/o autocrinos son producidos por la placenta incluyendo estrógeno, progesterona, gonadrofina coriónica, lactógeno placentario, hormona de crecimiento placentario y muchas otras. Todas importantes ya que regulan la gestación, metabolismo, crecimiento fetal, parto y otras funciones (Gude *et al.*, 2004).

2.2 Funciones Protectivas de la Placenta

Las características protectivas de la placenta ayudan a reducir la transferencia placentaria de sustancias potencialmente tóxicas. Estas características incluyen, las bombas de exportación en la membrana de la cara materna del sinciotrofoblasto y un gran número de enzimas de citocromos P450 que pueden metabolizar drogas, xenobióticos y otras enzimas. Sin embargo, hay muchas sustancias que pueden atravesar la placenta teniendo efectos teratogénicos (alcohol, talidomide, warfarina, etc.) (Gude *et al.*, 2004) o produciendo habituación en el feto (consumo materno de drogas como la cocaína) (Sadler, 2001).

2.3 Transporte y Metabolismo en Placenta

→ Transferencia de Gases Respiratorios

La membrana placentaria es altamente permeable a gases respiratorios (Gude *et al.*, 2004). El intercambio de oxígeno, dióxido de carbono y monóxido de carbono se realiza por difusión simple (Sadler, 2001).

→ Intercambio de elementos nutritivos y electrolitos

El intercambio de elementos nutritivos y de electrolitos, como los aminoácidos, los ácidos grasos libres, los hidratos de carbono y las vitaminas, es rápido y aumenta a medida que el embarazo avanza (Sadler, 2001).

La transferencia de minerales hacia el feto es controlado por una variedad de mecanismos desde muy simples a complejos mecanismos como el control hormonal (Stulc *et al.*, 1997).

→ Transferencia de agua

La transferencia de agua a través de la placenta es dependiente de la presión osmótica e hidrostática. Se mueve a través de la placenta pasivamente, y su transferencia puede ser facilitada por canales de agua formados por proteínas integrales expresadas en el trofoblasto (Gude *et al.*, 2004).

→ Transmisión de anticuerpos maternos

Los anticuerpos de la madre son captados por pinocitosis por el sinciciotrofoblasto y transportado después hacia los capilares fetales (Sadler, 2001).

El transporte es una de las funciones más relevantes realizada por la placenta ya que de ella depende el crecimiento y el correcto desarrollo fetal, por lo tanto, es de manera esencial el poder caracterizar los distintos mecanismos de transporte que se generan a través del hSTB.

3.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE LAS MEMBRANAS CELULARES

3.1 Organización Molecular de las Membranas Biológicas

Todas las células de procariontes y eucariontes están delimitadas por una membrana lipídica que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva. Además en las células eucariontes esta estructura es también responsable de la compartimentalización interna (Riquelme, 2008a).

En 1972, Singer y Nicolson, propusieron el *Modelo de Mosaico Fluido*, en donde conciben a la membrana como una solución bidimensional de lípidos en el cual se encuentran sumergidas las proteínas globulares y los hidratos de carbono. Según este modelo, los lípidos de la membrana suministran un medio fluido que permite los movimientos de las proteínas de membrana (Riquelme, 2008a).

→ Los **hidratos de carbono** constituyen alrededor del 10% de la masa total de la membrana y se encuentran unidos en forma covalente a moléculas de lípidos y proteínas (Riquelme, 2008a).

→ Las **proteínas** de una membrana son las macromoléculas que determinan su grado de especialización (Riquelme, 2008a).

Tipos de Proteínas de Membrana

De acuerdo al modelo de mosaico fluido de Singer y Nicolson y utilizando como criterio el método bioquímico para solubilizarlas, es posible clasificar las proteínas de membrana en dos grandes grupos:

- *Proteínas integrales o intrínsecas.* Poseen un mayor contenido de regiones hidrofóbicas y son difíciles de extraer desde la membrana. Éstas pueden tener segmentos polares a uno o a ambos lados de la membrana y presentar uno o varios

segmentos que atraviesan la bicapa, denominado segmentos transmembrana. Ejemplos son los transportadores y los canales iónicos (Riquelme, 2008a).

- *Proteínas periféricas o extrínsecas.* Estas proteínas son primordialmente de naturaleza hidrofílica y no presentan uniones covalentes al material lipídico. Jugarían un papel central en determinar la estabilidad de las membranas biológicas. Participan, además, a través del citoesqueleto, en el control del movimiento de las proteínas integrales (Riquelme, 2008a).

→ Los **lípidos**, mayoritariamente fosfolípidos, son moléculas que presentan una cabeza polar y una cola no polar formada por dos ácidos grasos de cadena larga. La tendencia de esta doble cadena anfifílica de formar una bicapa en soluciones acuosas y a sellarse formando vesículas es la propiedad crucial que determina que se forme una membrana (Riquelme, 2008a).

Una vesícula lipídica sin proteínas y que tienen sus lípidos organizados en la estructura de bicapa, se conoce con el nombre de *liposoma*.

A través de la gran mayoría de las membranas biológicas existe una diferencia de potencial eléctrico (gradiente de voltaje) que favorece la entrada a la célula de iones cargados positivamente y se opone a la entrada de iones cargados negativamente. Esta diferencia de potencial se llama potencial de membrana y se define como el *potencial eléctrico interno menos el externo*: $V_m = V_i - V_e$ (Riquelme, 2008b).

El *potencial de equilibrio* es la diferencia de potencial eléctrico que balancea exactamente la gradiente de concentración de un ión determinado.

La ecuación puede escribirse como:

Siendo:

$$V_i - V_e = \frac{RT}{zF} (\ln C_e/C_i)$$

R: 198 cal/° Kmol = 8315 joule/° K mol

T: Temperatura absoluta (°K)

F: 96500 C/mol

z: 1 para el Na⁺; 1 para el K⁺

Esta ecuación se conoce como **ECUACIÓN DE NERST**.

La diferencia $V_i - V_e$ se define como V_{eq} o *Potencial de Equilibrio*. Reemplazando:

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

Esto significa que si existe diferencia de potencial entre los compartimentos interno y externo, el ión alcanzará el equilibrio a distintas concentraciones en ambos medios. Un ión está en equilibrio si su potencial de equilibrio es igual al potencial de membrana (Riquelme, 2008b).

Puesto que las membranas no son una barrera homogénea, las propiedades de transporte de un soluto dependerán de la interacción que éste establezca con lípidos y/o proteínas. Como se muestra en la Imagen 5, de acuerdo al mecanismo utilizado por un soluto para atravesar una membrana podemos clasificar el transporte como:

- *Difusión simple*
- *Transporte mediado*

3.2 Difusión Simple

Consiste en la migración de un soluto no polar de bajo peso molecular desde una zona de alta concentración a una zona de baja concentración. Ejemplos son el movimiento de un soluto en una solución y la expansión espontánea de un gas (Riquelme, 2008b).

3.3 Transporte Mediado

Existen proteínas integrales de membrana especializadas en el transporte de moléculas polares que atraviesan muy lentamente las bicapas lipídicas, tales como iones, azúcares, aminoácido, entre otros. Estas proteínas reciben el nombre de proteínas transportadoras.

Cada proteína está destinada al transporte de un tipo especial de moléculas y con frecuencia al transporte de una sola molécula de una clase (Riquelme, 2008b).

Existen dos clases de proteínas transportadoras en la membrana, los *transportadores* (incluye transportadores pasivos y activos) y *los canales iónicos*.

→ Los *transportadores* se unen al soluto específico que va a ser transportado y sufren una serie de cambios conformacionales que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana. Movilizan solutos cargados y no cargados mediante transporte activo o pasivo. La eficiencia de transporte puede llegar a ser de 10^3 iones/segundo (Riquelme, 2008b).

→ Por otro lado, los *canales iónicos*, forman conductos hidrofílicos que cuando están abiertos pueden transportar alrededor de 10^6 iones/segundo sin experimentar alteraciones en su conformación. La apertura y cierre de los canales iónicos están regulados y éstos sí involucran cambios conformacionales (Riquelme, 2008b).

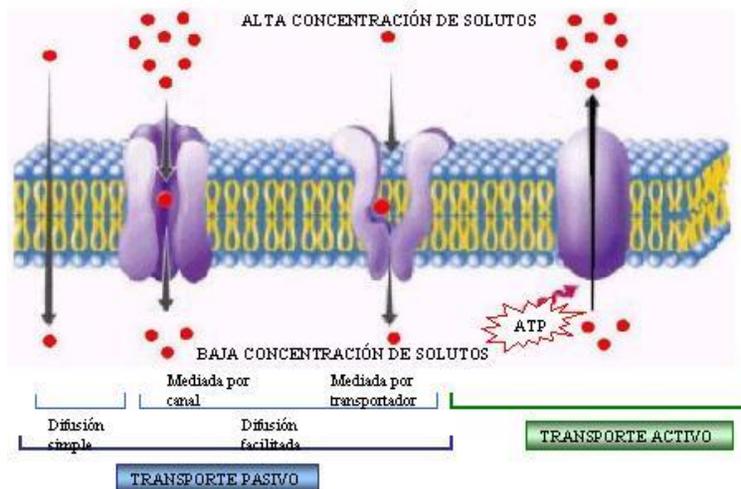


Imagen 5. Esquema de los diferentes mecanismos que utilizan las células para transportar solutos a través de su membrana plasmática. Se puede observar de izquierda a derecha: difusión simple, transporte mediado (canales y proteínas transportadoras) y finalmente transporte activo.

4.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE CANALES IÓNICOS

Los canales iónicos (Imagen 6) son proteínas integrales de membrana que tienen un poro central acuoso que atraviesa toda la anchura de la membrana y que permite regular el paso de solutos (en este caso iones) a través de la membrana (Riquelme, 2008b). Se han conservado secuencias de aminoácidos, a lo largo de la evolución, que son probablemente esenciales para el mantenimiento efectivo de la estructura y de la función del canal (Koester y Siegelbaum, 1997).

Los canales iónicos poseen las siguientes características generales (Koester y Siegelbaum, 1997):

- 1.- Transportan iones a *velocidades mucho más altas* que los transportadores, del orden de 1.000 a 10.000 veces más iones por segundo que el transportador más eficiente (Riquelme, 2008b).
- 2.- No experimentan cambios conformacionales importantes.
- 3.- Sólo transportan a favor del gradiente electroquímico (pasivamente).
- 4.- Existen variantes de cada tipo de canal iónico localizados en distintos tejidos.

Los canales iónicos tienen tres propiedades importantes (Koester y Siegelbaum, 1997):

- Conducen iones (*Conductancia*).
- Reconocen y seleccionan iones específicos (*Selectividad*).
- Se abren y cierran en respuesta a señales específicas: eléctricas, mecánicas o químicas (*Cinética*).

4.1 Conductancia

La conductancia es la capacidad de conducir iones. Se determina midiendo la corriente (flujo iónico por unidad de tiempo) que atraviesa un canal abierto en respuesta a una *fuerza electroquímica* impulsora. La fuerza electroquímica motriz neta está determinada por dos

factores: la diferencia de potencial eléctrico y la gradiente de concentración que se establece a ambos lados de la membrana (Koester y Siegelbaum, 1997).

La amplitud de la corriente que atraviesa un canal único puede obtenerse a partir de la *Ley de Ohm*:

$$i = V/R$$

Donde: *i* es la corriente que atraviesa un único canal; *V* es el voltaje a través del canal, y *R* es la resistencia del canal abierto.

Cuando se habla de canales iónicos se utiliza el inverso de la resistencia o *conductancia* ($\Omega=1/R$), ya que esta variable nos da una medida de la permeabilidad iónica. La ley de Ohm puede expresarse entonces como $i = \Omega V$ (Koester y Siegelbaum, 1997).

V_m se mide en milivoltios (mV); *i* se mide en picoamperios (pA); la conductancia es medida en siemens, y las pequeñas conductancias son medidas en picosiemens (pS) (Spencer, 1999).

En muchos canales iónicos, la relación existente entre el flujo de corriente que atraviesa el canal y el voltaje que se aplica a la membrana es lineal. Este tipo de canales se denominan “ohmicos” porque siguen la Ley de Ohm, es decir, se comportan como resistencias simples. En otros tipos de canales la relación entre la corriente y el potencial de membrana no es lineal. De estos canales se dice que “rectifican”, en el sentido de que tienden a conducir los iones más fácilmente en una dirección que en la contraria (Koester y Siegelbaum, 1997).

4.2 Selectividad

Los canales iónicos permiten el paso de sólo unos pocos tipos de iones. Esto se explica debido a que los canales tendrían zonas estrechas que actuarían como cedazos moleculares. En este *filtro selectivo* un ión se desprendería de la mayoría de las moléculas de agua de hidratación, y en su lugar establecería enlaces químicos débiles con ciertas cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen la pared del canal. Dado que la pérdida de agua de hidratación es energéticamente desfavorable para el ión, éste atravesará el canal

sólo si la energía desprendida por la interacción con el filtro selectivo es por un período de tiempo muy corto (1 microsegundo), tras el cual las fuerzas electrostáticas y de difusión fuerzan su avance por el canal (Koester y Siegelbaum, 1997).

4.3 Cinética

El canal iónico se abre y cierra siguiendo la ley del todo o nada, lo que produce breves pulsos de corriente a través de la membrana. Cada canal iónico tiene al menos un estado de apertura y uno o dos de cierre (Koester y Siegelbaum, 1997).

Los canales iónicos se regulan de tres formas (Koester y Siegelbaum, 1997):

- por voltaje (canales activados por voltaje).
- por ligandos químicos (canales activados por ligandos).
- por presión o estiramiento (canales activados mecánicamente).

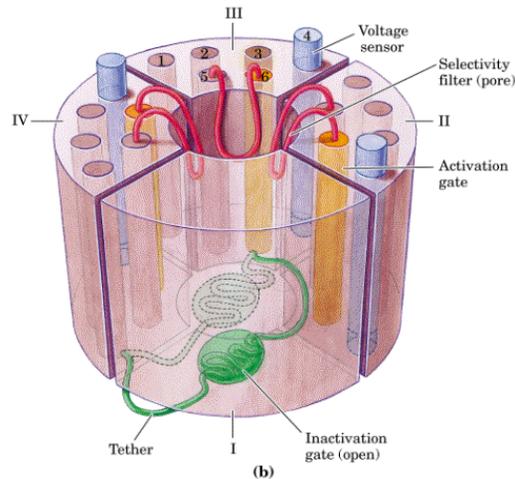
Un canal individual es, por regla general, más sensible a sólo uno de estos tipos de influencia. Es así como el paso a través del canal puede bloquearse por partículas que se unan tanto a la boca del poro acuoso como a algún lugar en el interior del mismo (Koester y Siegelbaum, 1997).

Bajo la influencia de dichos reguladores, los canales pueden entrar en uno de tres estados funcionales posibles: cerrados y activables (*en reposo*), abiertos (*activos*) y cerrados e inactivables (*refractarios*). Existen, sin embargo, muchos *canales pasivos* que están abiertos habitualmente y que contribuyen significativamente al potencial de reposo (llamados canales background o *leak*) (Koester y Siegelbaum, 1997).

Finalmente, existe más de una docena de tipos básicos de canales, cada uno de ellos incluye varias formas estrechamente relacionadas (isoformas) que difieren entre sí en la tasa de apertura y de cierre, y en su sensibilidad a distintos tipos de activadores. Estas variaciones sutiles en la estructura y función van dirigidas, posiblemente, a adaptar a los canales a funciones específicas. La gran variedad de canales iónicos existentes en los distintos tipos

de células posibilitaría el desarrollo de fármacos que pudieran activar o bloquear los canales presentes. Estos fármacos podrían, en teoría, tener un máximo de eficacia terapéutica y un mínimo de efectos secundarios (Koester y Siegelbaum, 1997).

Imagen 6. Representación esquemática de un canal iónico. En esta imagen se observa el poro conductor de iones, el filtro de selectividad ubicado dentro del poro y el sensor de voltaje.



5.- TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA PLACENTA HUMANA

La placenta se comporta como una barrera de muy baja permeabilidad y la transferencia disfuncional a través de ella es inadecuada para complacer la mayoría de las necesidades del feto (Stulc *et al.*, 1997).

La transferencia pasiva por difusión y transporte mediado es el mecanismo básico de la transferencia transplacental de todas las sustancias (Stulc *et al.*, 1997). Adicionalmente, algunos intercambios entre la madre y el feto pueden tener lugar por vía de los fluidos extrafetales y membranas fetales extraplacentarias. Sin embargo, la contribución de esta vía extraplacentaria al intercambio materno-fetal total no es fácil de evaluar debido a que la transferencia placentaria y extraplacentaria es difícil de separar una de la otra (Stulc *et al.*, 1997).

6.- CANALES DE POTASIO

El potasio (K^+) es el catión intracelular más importante. La transferencia transepitelial de K^+ se realiza a través de dos etapas que incluyen una entrada activa, por el sistema de Na^+/K^+ ATPasa y bajo ciertas condiciones o, en algunas células, por un sistema de cotransporte $Na^+/K^+/2Cl^-$ y una liberación que usualmente es vía un canal iónico (Stulc *et al.*, 1997).

Los canales de potasio son proteínas tetraméricas integrales de membrana que forman poros acuosos a través de los cuales puede fluir K^+ (Miller, 2000). Ellos permiten el transporte de K^+ a través de las membranas. Cumplen un importante rol en el control de la homeostasis del K^+ y volumen celular pero, también, cumplen funciones fisiológicas asociadas a modificaciones del potencial eléctrico de las membranas en la excitabilidad neuronal y muscular (Florian and Lazdunski, 2000). Los canales de potasio son una familia de proteínas de membrana muy diversa y ubicua tanto en células excitables como no excitables (Shieh *et al.*, 2000). Todas las secuencias genómicas- en eucariontes, eubacterias y arqueas- contienen al menos un canal de K^+ . Ningún otro tipo de canal iónico muestra esta ubicuidad (Miller, 2000).

En muchos órganos, los procesos celulares que son requeridos para el desarrollo, mantención y reparación de los tejidos, incluyendo proliferación, fusión y apoptosis, son regulados por canales de K^+ . Es así como, los canales de K^+ se convierten en importantes blancos terapéuticos para controlar la proliferación descontrolada y la apoptosis en algunas enfermedades (por ejemplo, promueven la apoptosis en el cáncer) (Williams *et al.*, 2008).

El primer acercamiento en registrar corrientes de K^+ lo obtuvieron Hodgkin y Huxley que identificaron una corriente *leak* en el axón de calamar gigante, que cambia el potencial de membrana hacia el potencial de equilibrio para el K^+ (Spencer, 1999). Desde entonces, una gran variedad de corrientes de K^+ han sido registradas in vivo, distinguibles según su funcionalidad y por sus propiedades farmacológicas (Miller, 2000).

El descubrimiento de componentes como el catión orgánico *tetraethylammonium* (TEA) y de los iones Bario (Ba^{2+}) han ayudado a caracterizar estas corrientes (Spencer, 1999).

6.1 Clasificación y Diversidad de Canales de K^+

La clasificación general, en tres familias, de los canales de K^+ está basada según su topología de transmembrana (Segmentos de Transmembrana o TMS) (Florian and Lazdunski, 2000). Éstos incluyen (Shieh *et al.*, 2000):

1.- *Canales de un poro y seis dominios de Transmembrana*. Contienen 6 TMS (S1-S6) y un poro simple. Los **Canales de Potasio Dependientes de Voltaje** (K_V) pertenecen a esta familia. En estos canales la depolarización de la membrana es requerida para causar cambios conformacionales para la apertura del canal (sensor de voltaje sería segmento S4) (Shieh *et al.*, 2000).

2.- *Canales de un poro y dos dominios de Transmembrana*. Contienen 2 TMS y un poro simple. Los **Canales de Potasio Rectificadores de Entrada** (K_{IR}) pertenecen a esta superfamilia de canales que conducen más corrientes de K^+ en la dirección de entrada que en la de salida y son importantes en la mantención del potencial de membrana (Shieh *et al.*, 2000).

3.- *Canales de doble poro y cuatro dominios de Transmembrana*. Contienen 4 TMS y un doble poro. Éstos incluyen a la familia de **Canales de Doble Poro** (K_{2P}) que son débiles rectificadores y representan, tal vez, la más abundante clase de canales de K^+ con más de 50 miembros distintos (Shieh *et al.*, 2000).

6.1.1 Calcium-Activated K^+ Channels (Canales de Potasio activados por Ca^{2+} (K_{Ca}))

Estos canales son estructuralmente similares a los Canales K_V , por lo tanto, son activados por voltaje y su particularidad es que se abren con el aumento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Spencer, 1999).

Como se muestra en Tabla 1, estos canales han sido diferenciados según sus características biofísicas (conductancia y dependencia de voltaje) y su sensibilidad diferencial a toxinas (de Shieh *et al.*, 2000) en:

Tabla 1. Clasificación y características biofísicas de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (Shieh *et al.*, 2000).

	Conductancia	Activadores	Bloqueadores	Observaciones
Canales de Gran Conductancia (BK_{Ca})	150-250 pS (Spencer, 1999)	Triterpenos glicosilados y benzimidazoles	Diterpenos como paxilina, verrucologen, penitrem A, aflatrem e iberotoxina	Componentes, en general, no muy potentes o altamente selectivos.
Canales de Conductancia Intermedia (IK_{Ca})	18-50 pS (Spencer, 1999)		- Clotrimazol - <i>Charybdotoxin</i> , una toxina aislada del veneno del escorpión (Spencer, 1999)	Inhibidores de IK _{Ca} pueden ser usados como agentes inmunosupresivos, debido a que IK _{Ca} tiene una fuerte regulación antigénica y mitogénica.
Canales de Pequeña Conductancia (SK_{Ca})	10-14 pS (Spencer, 1999)		- Apamina (veneno) - Con menor selectividad a la tubocurarina y decualinium	Moduladores de SK _{Ca} podrían tener un rol potencial en la epilepsia, apnea de sueño, desórdenes neurodegenerativos y de músculo liso.

6.1.2 Two-Pore Domain K⁺ Channels (Canales de Potasio de doble Poro (K_{2P}))

Estos canales son responsables de corrientes basales o *leak* (Spencer, 1999). Su función está relacionada con la modulación del potencial de membrana en varios tipos celulares y emergen como agentes neuroprotectivos y anestésicos (Shieh *et al.*, 2000).

Los canales K_{2P} incluyen seis grupos funcionales y estructurales (Patel y Lazdunski, 2004); a continuación, se expondrán dos tipos de éstos canales (de dos grupos funcionales independientes) como objeto de esta memoria.

TWIK-Related Acid-sensitive K⁺ channels (TASK)

Las corrientes de estos canales son constitutivamente activas, independientes del tiempo y del voltaje, es decir, se producen instantáneamente con los cambios de voltaje (no despliegan cinéticas de activación, inactivación o desactivación) (Florian y Lazdunski, 2000; Patel y Lazdunski, 2004).

Las corrientes de TASK-1, un miembro de esta familia mencionado como objeto de estudio de esta memoria, muestran una rectificación de salida en condiciones fisiológicas asimétricas de K⁺ que no es observada en condiciones simétricas. Son altamente flickereantes y tiene una conductancia unitaria de **14 pS** (Florian y Lazdunski, 2000; Patel y Lazdunski, 2004).

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los principales moduladores de TASK-1 y TASK-2 (dos miembros, de ubicación placentaria, de esta familia).

Tabla 2. Características de la Modulación de Canales TASK-1 y TASK-2 (Resumen de datos obtenidos de Florian y Lazdunski, 2000; Patel y Lazdunski, 2004; datos de otros autores fueron agregados dentro de la tabla).

	Insensibilidad	Activadores	Bloqueadores
TASK-1	Cs ⁺ , TEA, 4-AP y relativa insensibilidad a Ba ²⁺ .	<ul style="list-style-type: none"> - Anestésicos volátiles inhalatorios como el halotano e isoflurano. - Alcalinización del medio externo (Bai <i>et al.</i>, 2006). 	<ul style="list-style-type: none"> - Zn⁺ (IC₅₀=175 μM) - Anestésicos locales (lidocaína y bupivacaína). - Acidificación del medio externo (Duprat <i>et al.</i>, 1997; Florian y Lazdunski, M. 2000; Han <i>et al.</i>, 2009). - Endocannabinoide <i>anandamide</i> (Maingret <i>et al.</i>, 2001; Bai <i>et al.</i>, 2006; Lazdunski y Patel, 2004).
TASK-2			<ul style="list-style-type: none"> - Acidificación del medio externo (Morton <i>et al.</i>, 2004). - Sodio (Na⁺) (Morton <i>et al.</i>, 2004; Nimigeay y Miller, 2002).

Tanto la activación como la inhibición de la corriente no producen una modificación en la cinética de la corriente, sino que los efectos son debido a una variación del número de canales activos y no en la conductancia de canal único (Florian y Lazdunski, 2000).

Estos canales, además de jugar un rol en la mantención del potencial de membrana en reposo y en la regulación del volumen celular tanto de células no excitables como excitables, juegan un importante rol en la modulación de la actividad eléctrica de estas últimas. Adicionalmente, se ha descrito que TASK-2 juega un rol en el transporte de bicarbonato (Bai *et al.*, 2006).

TWIK-Related K⁺ channels (TREK-1)

Al igual que TASK-1, estos canales producen corrientes instantáneas (actividad basal), son rectificadoras de salida en una gradiente fisiológica de K⁺ y flickerean. Su conductancia unitaria es de **45pS** (Patel y Lazdunski, 2004). En Tabla 3 se muestran las principales modulaciones para TREK-1, miembro de esta familia de interés placentario.

Tabla 3. Características de la Modulación de Canal TREK-1 (Resumen de datos obtenidos de Florian y Lazdunski, 2000; Patel y Lazdunski, 2004; datos de otros autores fueron agregados dentro de la tabla).

	Insensibilidad	Activadores	Bloqueadores
TREK-1	TEA, 4-AP y débilmente sensible a Ba ²⁺ en altas concentraciones.	<ul style="list-style-type: none"> - Ácidos grasos poliinsaturados (<i>PUFA</i>) - Acción mecánica sobre superficie celular - Riluzole, agente neuroprotectivo - Anestésicos volátiles inhalatorios como el halotano e isoflurano (simil a TASK-1), cloroformo y dietileter - Cobre (Gruss <i>et al.</i>, 2004) - Acidificación Interna 	<ul style="list-style-type: none"> - Gd⁺ - Amiloride - Quinidina y Zinc (Leonoudakis <i>et al.</i>, 1998; Gruss <i>et al.</i>, 2004)

6.1.3 Voltage-gated K⁺ Channels (Canales de Potasio Dependientes de Voltaje (K_V))

Los canales K_V son activados por cambios en el voltaje depolarizante (Miller, 2000). El segmento cuatro de transmembrana (S4) se encuentra en todos los canales iónicos dependientes de voltaje, incluyendo canales de Na⁺ y de Ca²⁺. Este dominio contiene residuos aminoacídicos que estarían encargados de participar en censar los cambios en el potencial de membrana, cambian de orientación y abren la vía conductiva iónica (Spencer, 1999). Además, se ha establecido que son esenciales para la selectividad del canal al potasio y para la unión del canal al bloqueador TEA (Spencer, 1999).

Recientemente, se ha tenido evidencia que las familias de los canales K_V , expresados ubicuamente en los tejidos excitables, están también distribuidos en las células no excitables, incluyendo epitelios, en donde regulan el volumen celular, la cinética celular, el transporte de electrolitos y nutrientes y la secreción de hormonas (Williams *et al.*, 2008).

Los canales K_V pueden ser bloqueados por:

- 4-aminopiridine (4-AP) (Williams *et al.*, 2008).
- *Tetraethylammonium* (TEA) (Williams *et al.*, 2008).

6.1.4 Inward Rectifier K^+ Channels (Canales de K^+ Rectificadores de Entrada (K_{IR}))

Los canales rectificadores de entrada tienen propiedades electrofisiológicas únicas que los hacen esenciales en muchos tejidos para estabilizar el potencial de membrana (Spencer, 1999). Demuestran dependencia de voltaje y no tienen una dependencia lineal con la conductancia (Clarson *et al.*, 2000).

Los canales con estas características tienen un rol importante en la mantención del potencial de membrana y la regulación de toda la excitabilidad (Spencer, 1999). En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestra el efecto de los moduladores para canales K_{IR} .

Tabla 4. Moduladores de Canales K_{IR} .

K_{IR}	Bloqueadores	Observaciones	Autor
	- Magnesio (Mg^{2+})	} Bloquean la corriente de K^+ de salida desde el lado intracelular del canal iónico.	Spencer, 1999; Clarson <i>et al.</i> , 2000.
	- Poliaminas (espermina y espermidina)		
	- Bario (Ba^{2+})		
	- Cloruro de Cesio ($CsCl_2$)		Clarson <i>et al.</i> , 2000.

6.1.5 ATP-Sensitive K⁺ Channels (Canales de Potasio Sensibles a ATP (K_{ATP}))

Otro grupo ubicuo de canales de K⁺, son los sensibles a cambios en el ATP intracelular. Ellos censan el estado metabólico de la célula, se inhiben con ATP cuando el suplemento de energía es abundante y se activan cuando la energía almacenada se depleta (Shieh *et al.*, 2000).

7.- CANALES DE POTASIO EN MEMBRANA PLACENTARIA

Para desarrollar el modelo celular del transporte iónico en el hSTB, es necesario caracterizar los canales iónicos presentes en la membrana microvellosa apical y basal (BM) (Jiménez *et al.*, 2004).

En el estudio de Jiménez *et al.* (2004) se describió que la membrana apical está compuesta por dos fracciones aisladas: la membrana apical microvellosa clásica (MVM) y otra fracción de membrana apical microvellosa liviana (LMVM). Se ha encontrado recientemente que ambas fracciones de membrana apical tienen diferencias en la composición de lípidos y proteínas (Godoy *et al.*, 2008).

En común con otros epitelios, la actividad de los canales de K⁺ expresados en el sinciotrofoblasto tiene una gran influencia en el potencial de membrana, en la regulación de su volumen y transporte de solutos electrogénicos (Bai *et al.*, 2006). Sin embargo, su caracterización biofísica y sus funciones específicas en el trofoblasto son pobremente entendidas en contraste con otros epitelios no placentarios (Díaz *et al.*, 2008).

En la revisión de Stulc *et al.* (1997) se indica que la membrana plasmática del trofoblasto contiene canales de K⁺. Mylona *et al.* (1998) indicaron, además, que existe evidencia funcional de la existencia de conductancias específicas de potasio en la placenta.

Posteriormente, Birdsey *et al.* (1999) estudiaron el efecto de las soluciones hiposmóticas en el potencial de membrana (E_m) de microvellosidades del sinciotrofoblasto en aislados

vellosos maduros de placentas humanas de término. Cuando la vellosidad es expuesta a soluciones hiposmóticas, existe una hiperpolarización significativa en el E_m que es reversible cuando se remueve el estímulo hiposmótico. Además, este estímulo hiposmótico produce una hipertonicidad intracelular y, bajo estas circunstancias, los mecanismos de regulación del volumen inician el retorno del volumen celular a su valor original (regulación de la disminución de volumen [RVD]). Así, RVD es alcanzado por la pérdida desde el citoplasma celular de osmolitos inorgánicos, predominantemente K^+ y Cl^- y de solutos orgánicos, por ejemplo aminoácidos y metilaminas.

Los mecanismos predominantes que efectúan la pérdida de K^+ y Cl^- en las células epiteliales es por la activación de canales de K^+ y Cl^- (Birdsey *et al.*, 1999). Birdsey *et al.* (1999) demostraron que esto mismo ocurre en la placenta, por la activación de conductancias iónicas en la membrana apical del sinciotrofoblasto. Además, indicaron que las conductancias de K^+ son inhibidas por Ba^{2+} .

Así, se demuestra que el sinciotrofoblasto logra regular su volumen, al menos en parte, por la liberación de K^+ desde su citosol desde la membrana apical dentro de la sangre materna (Birdsey *et al.*, 1999).

La Tabla 5 muestra un resumen de trabajos que buscaron la presencia de distintos tipos de Canales de Potasio en placenta. En Tabla 6 se sugiere el rol potencial de los diferentes tipos de Canales de K^+ encontrados dentro de la estructura placentaria.

Tabla 5. Resumen de estudios realizados por diferentes investigadores en busca de distintos tipos de canales de K^+ en placentas humanas. En *Hallazgos* se detalla las sugerencias o conclusiones a las que llegaron con su investigación. En *Material de Estudio* se especifica las muestras utilizadas por cada diseño experimental. Y, finalmente, la última columna se refiere a quien realizó el estudio.

	Hallazgos	Material de Estudio	Autor
Canales K_{2P}	<p>- TASK-1 (45 kD)→ se encuentra presente en compartimiento trofoblástico.</p> <p>- TREK-1 (44 kD)→ se encuentra perinuclear dentro del compartimiento trofoblástico.</p> <p>Existe expresión diferencial de miembros de los canales TASK (1 y 2) dentro de placenta</p> <p>mRNA TASK-1 está presente en tejido placentario independiente de etapa de la gestación/ Flujos de $^{86}Rb^+$ (marcador de permeabilidad de K^+) son inhibidos por <i>anandamide</i>.</p>	<p>Células de citotrofoblasto y Tejido de Placenta de Término</p> <p>Tejido Velloso de 1^{er} y 3^{er} trimestre. Células citotrofoblásticas en estado mono y multinucleado.</p> <p>Vesículas de Placenta</p>	<p>Bai <i>et al.</i>, 2005</p> <p>Bai <i>et al.</i>, 2006</p> <p>Wareing <i>et al.</i>, 2006</p>
Canales K_{Ca}	<p>La estimulación de las células citotrofoblásticas, por hinchazón hiposmótica promueve los flujos de $^{86}Rb^+$ en parte por la estimulación de canales activados por Ca^{2+} que son sensible a <i>charybdotoxin</i> pero insensible a apamina e iberotoxina. (implicaría IK_{Ca})</p> <p>Canal selectivo a K^+ de conductancia intermedia y otro de gran conductancia</p>	<p>Células de citotrofoblasto</p> <p>Células de citotrofoblasto</p>	<p>Bai <i>et al.</i>, 2006</p> <p>Williams <i>et al.</i>, 2008</p>
Canales K_{IR}	<p>Corriente selectiva a K^+ fuertemente rectificadora de entrada, sensible a Ba^{2+} y Cesio.</p> <p>Expresión de rectificación de entrada típica de canales K_{IR} que aumenta con la diferenciación.</p> <p>Corriente de K^+ altamente rectificadora de entrada sensible a Ba^{2+} que incrementa con la multinucleación.</p>	<p>Células de citotrofoblasto en varios estados de diferenciación.</p> <p>Células de citotrofoblasto</p> <p>Células de citotrofoblasto</p>	<p>Clarson <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Bai <i>et al.</i>, 2006</p> <p>Williams <i>et al.</i>, 2008</p>
Canales K_V	<p>Sugiere que la supervivencia celular es mayor a través de la inhibición de los canales de K^+ con 4-AP y también comprobaron el efecto bloqueador de TEA sobre corrientes de K^+.</p>	<p>Células de citotrofoblasto</p>	<p>Williams <i>et al.</i>, 2008</p>

Tabla 6. Rol Potencial asociado a cuatro distintas familias de Canales de Potasio basados en su presencia dentro de tejido placentario humano.

	Funciones asociadas en tejido placentario
Canales K_{2P}	Podrían estar envueltos en procesos de diferenciación y apoptosis del citotrofoblasto y también se sugiere un rol de TASK en la homeostasis de K ⁺ del sinciotrofoblasto maduro (Bai <i>et al.</i> , 2005).
Canales K_{Ca}	Aunque proteínas y/o mRNA para los miembros de esta familia (BK _{Ca} e IK _{Ca}) están expresados en placenta, el rol funcional de estos canales es pobremente entendido (Williams <i>et al.</i> , 2008).
Canales K_{IR}	Se especula que K _{IR} 2.1 puede ser importante para la fusión de las células del citotrofoblasto y la generación de un sinciotrofoblasto multinucleado (¿causa o consecuencia de la multinucleación?) (Clarson <i>et al.</i> , 2000; Williams <i>et al.</i> , 2008).
Canales K_V	Adaptan el potencial de membrana y son, además, importantes determinantes de la actividad vascular fetoplacental (Wareing <i>et al.</i> , 2006). Importantes en la regulación endocrina de la secreción y la mantención de la integridad de las células del citotrofoblasto (Williams <i>et al.</i> , 2008).

Toda esta evidencia indica que existen diferentes canales de K⁺ que están expresados en células de citotrofoblasto, pero no existen estudios equivalentes en la membrana apical o basal del hSTB de placentas de término (Díaz *et al.*, 2008).

Así es como en un trabajo de funcionalidad reciente de Díaz *et al.* (2008), con membranas altamente purificadas de hSTB, demuestran la presencia de canales de K⁺ en LMVM del hSTB sensibles a *tetraethylammonium* (TEA) y Bario (Ba²⁺). La conductancia más frecuentemente encontrada fue aproximadamente de 73 pS, sin embargo muchos niveles de corriente fueron detectados sugiriendo la presencia de más de un tipo de canal de K⁺. Estos resultados mostraron la existencia de canales de K⁺ en LMVM, que son bloqueados por Ba²⁺ y una sub-población que también es bloqueada por TEA. Interesantemente, al menos una de estas corrientes también es sensible a Na⁺ (Díaz *et al.*, 2008).

Este último trabajo planteó la inquietud de poder darles un nombre a las corrientes de K⁺ que subyacieron los experimentos y, basándonos en la bibliografía existente sobre distintos tipos de canales de K⁺ expresados estructuralmente en la placenta humana, se preguntó si

las corrientes detectadas corresponden a los canales expresados. Todo esto con el fin de poder contribuir al desarrollo y comprensión del modelo de transporte transplacentario.

Adicionalmente, la caracterización de los canales de K^+ dentro de cada tejido tiene un interés farmacológico que gira alrededor de descubrir y desarrollar moduladores orgánicos selectivos para varias clases de canales de K^+ (Shieh *et al.*, 2000). El área más excitante podría ser la posibilidad de modular la actividad de canales de K^+ específicos para obtener efectos terapéuticos deseados (Spencer, 1999).

Esta nueva dirección en la farmacología tiene un gran potencial debido a que el número y la diversidad de los canales de K^+ es muy grande, y así, mientras la biología de los canales de K^+ es mejor comprendida, mejores blancos terapéuticos podrán ser desarrollados (Spencer, 1999).

HIPÓTESIS

Dado que existen flujos de iones K^+ en la membrana apical del hSTB cuya sensibilidad a bloqueadores específicos sugiere la presencia de subpoblaciones de estos canales, entonces, a lo menos existen dos tipos de canales de K^+ distintos que sustentan este flujo de iones potasio.

OBEJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente los tipos de canales responsables de las corrientes de K^+ y su localización dentro del tejido placentario.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Reconstituir LMVM purificada de sinciotrofoblasto de placentas humanas a término en un sistema lipídico artificial (Liposomas Gigantes).
- 2.- Reproducir electrofisiológicamente las corrientes de potasio, previamente estandarizadas, presentes en LMVM del hSTB humano a nivel de canal único (conductancia y cinética).
- 3.- Identificar funcionalmente los tipos de canales de K^+ que subyacen las corrientes detectadas en los sellos utilizando bloqueadores específicos (Ba^{2+} , TEA, Na^+ , *Charybdotoxin*, etc.).
- 3.- Detectar e identificar la presencia de dos familias de canales de potasio [Two-Pore Domain (anti-TASK-1 y anti-TREK-1) y Calcium-Activated (anti-BK_{Ca})] en membrana apical mediante Técnicas de Inmunodetección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios realizados durante esta investigación básico-clínica, fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Población de Estudio

Correspondió a placentas normales obtenidas de mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión de selección de material determinados por el Laboratorio de Electrofisiología de Membranas (LEM) del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Criterios de Selección del Material

Criterios de Inclusión:

- Placentas de 37-40 semanas de gestación, expulsadas inmediatamente después del parto
- Peso mínimo: 550 grs. Peso máximo: 900 grs.
- Edad materna: 15-35 años
- Nacionalidad madre: chilena
- Estado nutricional madre: normal
- Primípara o multípara
- Parto natural o Cesárea

Criterios de Exclusión:

- Patologías previas o asociadas a la gestación
- Sufrimiento fetal
- Embarazo múltiple
- Placenta con meconio
- Alcoholismo o drogodependencia

Tamaño muestral

El tamaño muestral de este estudio fue de 23 placentas humanas normales de término.

1.- Obtención de Placentas

Un total de 23 placentas de gestaciones normales (certificado por el Servicio de Parto del Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José) fueron obtenidas inmediatamente después del alumbramiento desde la Unidad de Maternidad de dicho recinto Hospitalario y transportadas al Laboratorio de Electrofisiología de Membranas a 4°C; previo consentimiento informado de las pacientes y en concordancia con los criterios previamente señalados.

Una vez en el laboratorio las placentas fueron sometidas a una evaluación macroscópica, en donde se examinaron características como su tamaño, color y textura, entre otros. Las placentas tuvieron una coloración rojiza y brillante, de textura suave, sin zonas fibrosas ni calcificaciones, en caso contrario las placentas fueron descartadas.

2.- Obtención de Membranas Purificadas de Sinciotrofoblasto

La purificación de las membranas de sinciotrofoblasto se realizó de acuerdo a los protocolos regentes en el LEM (Jimenez *et al.*, 2004) desde donde se obtuvieron vesículas de membrana apical altamente purificadas. Como se muestra resumidamente en Esquema 2, este protocolo permite la purificación de las fracciones de membrana plasmática a partir de una placenta en cantidades suficientes para permitir realizar estudios comparativos.

Una vez en el laboratorio y luego de su evaluación macroscópica, la decidua materna fue removida y desde la porción central, entre la cara materna y fetal, se obtuvieron 100 gr de cotiledones que se picaron con tijeras, se lavaron 4 veces con NaCl 0,9% para eliminar la sangre y se filtraron con gasa fina cada vez. Los trozos de tejido se resuspendieron en 300 ml de tampón A (250 mM sacarosa, 0,7 uM pepstatina, 1,1 uM leupeptina, 80 mM

apoptinina, 10 mM Tris-Hepes, pH 7,4) y se homogeneizaron 3 veces por 30 seg en juguera. El homogenato resultante de esta acción se centrifugó por 15 min a 5860 g, a una temperatura entre 4 - 8°C. De esta centrifugación se almacenó el sobrenadante a 4°C y el *pellet* fue resuspendido en 100 ml de tampón A, homogeneizándose 3 veces por 30 seg en juguera. El homogenato obtenido se centrifugó a 5860 g durante 15 min y el sobrenadante resultante se mezcló con el sobrenadante obtenido anteriormente, para ser centrifugado a 10000 g durante 15 min. Luego de esto se recuperó el sobrenadante y se descartó el *pellet*. El sobrenadante fue centrifugado a 124000 g por 30 min, entre 4 – 8° C. De esta centrifugación se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en 250 ml de tampón A homogeneizándose con vidrio-teflón por 30 veces. A esto se le agregó 12mM de MgCl₂ y se agitó durante 20 min a 4°C, posteriormente se centrifugó a 2500 g por 10 min. El uso de MgCl₂ y consiguiente centrifugación provocan la precipitación de la membrana basal del sinciciotrofoblasto, dejando como sobrenadante a la membrana apical.

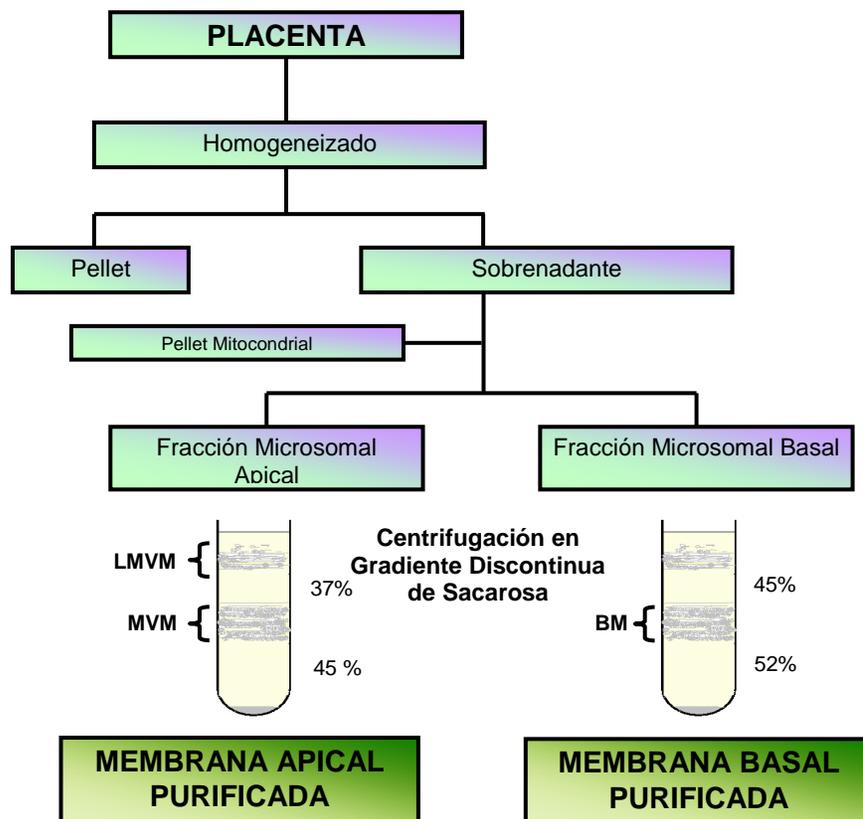
El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 12100 g por 70 min y luego resuspendido en 2 ml de tampón B (300mM sacarosa, 20 mM Tris-maleato, pH 7,4), lo que se homogeneizó 30 veces en vidrio-teflón. El resultado de este paso corresponde a la fracción microsomal de la membrana apical (mMVM), de la que se almacenaron aproximadamente 1,5 ml para la determinación de proteínas.

Por su parte el *pellet* obtenido fue resuspendido en 250 ml de tampón A y agitado por 1 h a 4°C, para luego ser filtrado por gasa fina. El filtrado fue centrifugado por 10 min a 4340 g, y el sobrenadante obtenido se centrifugó a 98500 g por 45 min. El sobrenadante de esta centrifugación fue descartado y el *pellet* fue resuspendido en 2 ml de tampón A para ser homogeneizado en vidrio-teflón 30 veces. El resultado de este paso corresponde a la fracción microsomal de la membrana basal (mBM), de la que también se guardaron a -20°C aprox. 1,5 ml para la determinación de proteínas.

Ambas fracciones microsomales fueron sometidas a gradientes discontinuas de sacarosa. Para la membrana apical la gradiente correspondió a una fase inferior de 2 ml de sacarosa 45%, y una fase superior de 2,3 ml de sacarosa 37%, ambas en tampón Tris-Maleato, 20

mM, pH 7,4. Por su parte la gradiente para purificar la membrana basal correspondió a una fase inferior de sacarosa 52% y una superior de sacarosa 45%, ambas en tampón Tris-Hepes, 10 mM, pH 7,4. Cada gradiente fue cargada aproximadamente con 2 ml de la fracción microsomal correspondiente y se centrifugaron a 9000 g durante toda la noche (mínimo 6 horas).

De las bandas resultantes de la gradiente discontinua de sacarosa, se tomaron las fracciones LMVM (interfase 10/37%) y MVM (interfase 37/45%) y se diluyeron en Tampón Lavado Apical (Tris-Maleato 20 mM, pH 7,4). Lo mismo se hizo con la fracción BM (interfase 45/52%), la que se diluyó en Tampón Lavado Basal (Tris-Hepes 10 mM, pH 7,4). Posteriormente, ambas se centrifugaron a 110000 g por 30 min. El *pellet* obtenido luego de la centrifugación se resuspendió en 0,5 ml de tampón B para cada fracción, se homogeneizó en vidrio teflón y se alicuotaron las muestras para almacenarlas en nitrógeno líquido (-150°C) hasta su utilización.



Esquema 2. Resumen Protocolo de Obtención Simultánea de Membranas Purificadas de Sinciotrofoblasto Placentario Humano.

→ Ensayos Proteicos

La concentración proteica fue medida por el método del Ácido Bicinconínico (BCA) utilizando BCA Protein Assay Kit (Sigma, Pierce Biotechnology, Inc.) para una detección colorimétrica y cuantificación de la cantidad de proteína total (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Como estándar se utilizó albúmina de suero bovino (BSA).

→ Determinaciones Enzimáticas Específicas

La pureza de las fracciones de membrana purificadas está relacionada con el enriquecimiento dado por enzimas marcadoras. La Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP) es una enzima marcadora de la membrana apical del sinciotrofoblasto como también de otras membranas apicales epiteliales (Jiménez *et al.*, 2004).

La actividad de la Fosfatasa Alcalina fue medida usando un Kit de Ensayo de Fosfatasa Alcalina-TRIS (Valtek Diagnostic, Santiago Chile) que usa como sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP). La fosfatasa alcalina cataliza la hidrólisis del p-NPP a p-nitrofenol y fosfato, produciéndose un aumento de absorbancia a 405 nm que es proporcional a la concentración de enzima de la muestra. La actividad de la enzima es expresada en UI por mg de proteína.



3.- Preparación de Liposomas Gigantes

Una vez obtenidas las membranas purificadas de una placenta humana normal de término, se realizó la técnica de Patch Clamp necesaria para registrar corrientes de canal único. Esta técnica se desarrolló mediante el pinzamiento de liposomas gigantes, una membrana artificial modelo, en donde se reconstituyó la membrana a registrar, en este caso, membrana apical liviana (LMVM).

Sabiendo previamente la cantidad de proteínas que contenía 1 μL de la fracción LMVM de cada placenta (mediante la técnica de Determinación de Proteínas detallada con anterioridad) se desarrolló el protocolo para la fusión de éstas vesículas dentro de liposomas gigantes. Este procedimiento es un protocolo estandarizado y que se desarrolla de manera habitual en el LEM (Riquelme *et al.*, 1990).

Para la obtención de liposomas gigantes la técnica consistió en mezclar 100-150 μg de proteína contenida en la fracción LMVM con 2,6 ml de suspensión de vesículas unilamelares de azolectina (13mmol/L en términos de fosfolípidos) que se llevaron a centrifugar a 40K a 4°C por 1 hora y media. El *pellet* resultante se mezcló con 75 μl de Na-Hepes 10mM pH 7,4 en 5% de etilenglicol (950 μl Na-Hepes 10mM pH 7,4, 50 μl etilenglicol). Luego de esta resuspensión se pusieron gotas de 20 μl sobre un portaobjeto y se pasó por un ciclo de deshidratación parcial por 3-3 $\frac{1}{2}$ hrs. en desecador con CaCl_2 a 4°C. Posteriormente, se rehidrató cada gota con 20 μl Na-Hepes 10mM pH 7,4 y en cámara húmeda a 4°C se dejaron reposar durante 12 hrs. Finalmente, fueron obtenidos liposomas gigantes cuyo rango de tamaño fue de 5 a 100 μm (similar al tamaño de una célula) y que sirvió para obtener registros de corrientes únicas mediante la técnica de Patch-Clamp.

4.- Técnica Patch-Clamp

Se tomaron alícuotas de entre 0,8 a 2 μ L de los liposomas gigantes previamente preparados con vesículas de LMVM y fueron sembrados en cubreobjetos dentro de la cámara de Patch (RC=28, Warner Instruments Corporation, USA) siendo luego bañados por 450 μ L de solución requerida según el tipo de canal que se deseó buscar.

Registros de canal único fueron obtenidos usando la técnica de Patch-Clamp descrita por Hamill *et al.* (1981). Giga sellos (10-20 G Ω) fueron formados en la superficie del liposoma gigante con micropipetas que contenían en su interior microelectrodos regulares de patch bañados en solución de registro (10-20 M Ω es la resistencia para el electrodo abierto). Estas pipetas fueran hechas de capilares de borosilicato sometidas al calor de Micropipette Puller.

La técnica de Patch-Clamp se desarrolló por aposición de la punta de la pipeta a la superficie del liposoma (Imagen 7A) con la ayuda de un micromanipulador y luego se aplicó una ligera succión hacia el interior de la pipeta para obtener sellos de alta resistencia. Después de que la pipeta fue sellada, se retiró cuidadosamente de la superficie del liposoma y, cuando fue necesario, rápidamente se pasó la punta de la pipeta a una interfase aire/agua resultando en un parche escindido (llamada configuración “inside-out”, como se muestra en Esquema 9). Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (T/A).

La corriente resultante del paso de iones a través del canal (Imagen 7B) fue registrada con un amplificador EPC-9 de Patch-Clamp (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalzt, Alemania) con una ganancia de 50 mV/pA, sin filtrar.

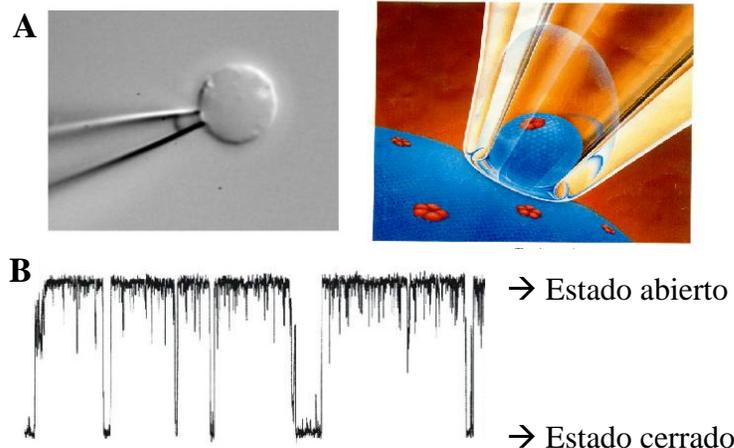
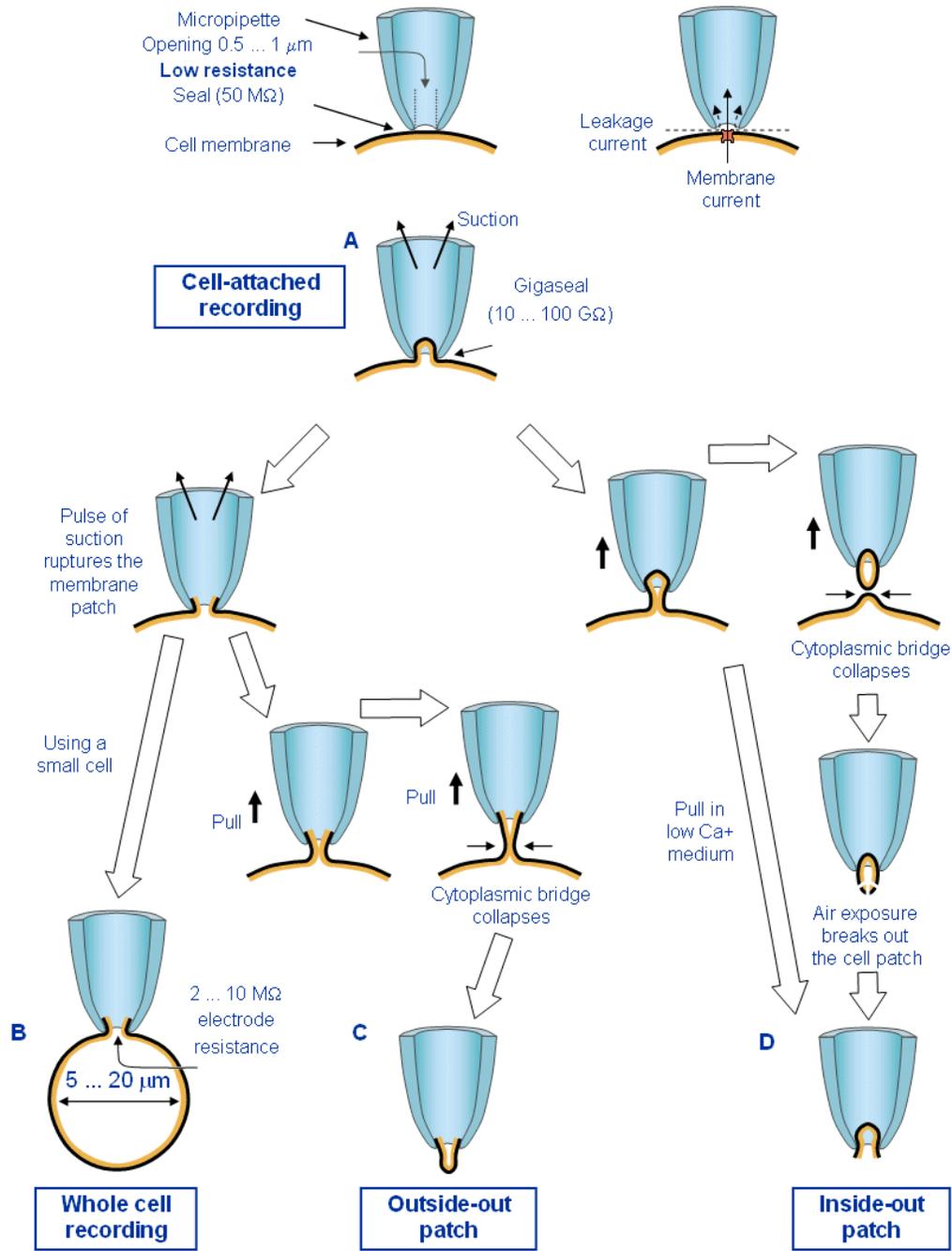


Imagen 7. A) Fotografía y representación que muestra la aposición de la pipeta sobre la membrana celular. B) Registro eléctrico de la corriente que pasa a través de un canal iónico. Se observan dos estados de cinética: abierto y cerrado.



Esquema 9. Representación esquemática que muestra las diferentes configuraciones que pueden ser utilizadas para el registro de canales iónicos por el método electrofisiológico de Patch-Clamp. La configuración que se utilizó para los registros en este estudio fue la de parche escindido (inside-out patch), representado en **D**.

5.- Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

Las tres fracciones purificadas de placentas normales fueron testeadas para la presencia de distintos tipos de canales de K^+ específicos por SDS-PAGE e Immunoblotting. 20 μ g de proteínas de vesículas LMVM, MVM y BM, fueron cargadas en un gel SDS-poliacrilamida al 8% junto al marcador de peso molecular (Perfect Protein Markers 10-225 kDa, 69079, Novagen). La electroforesis se realizó a 80V por 15 min y luego a 100V por 1½ hora. Posteriormente, el gel fue transferido a 30V overnight (4°C) a una membrana de nitrocelulosa (BioRad Laboratories). La membrana fue bloqueada para uniones inespecíficas durante 1 hora con leche descremada al 3% en tampón salino con Tween (en mmol/l: 1,38 NaCl, 2,7 KCl y Tween 20 0,05%) y lavada 3 veces con tampón salino con Tween.

Las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios contra los siguientes canales de K^+ : $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca} (Alomone Labs.) por 2 horas a T/A. Luego fueron lavadas con tampón salino con Tween e incubadas con anticuerpo secundario donkey anti-rabbit IgG-HRP (sc—2317, Santa Cruz Biothecnology) durante 45 minutos. La detección final se realizó mediante reacción de quimioluminiscencia, usando ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, UK).

Todos los anticuerpos fueron diluidos en BSA 1% (Albúmina de Suero Bovino) en PBS (128mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na_2HPO_4 , 2mM KH_2PO_4) pH 7,4. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo fueron las siguientes:

- anti-TASK-1 (Alomone Labs, APC-024) dilución 1/500
- anti-TREK-1 (Alomone Labs, APC-047) dilución 1/1500
- anti- BK_{Ca} (Alomone Labs, APC-021) dilución 1/300

Adicionalmente, dos anticuerpos fueron agregados al estudio de inmunodetección originalmente planteado:

- anti- $K_{IR}2.1$ (Alomone Labs, APC-026) dilución 1/500
- anti- $K_V2.1$ (Alomone Labs, APC-012) dilución 1/100

6.- Inmunohistoquímica por el método ABC

Una vez aceptadas las placentas humanas de gestaciones normales para su purificación se obtuvieron trozos de cotiledón de éstas que fueron lavados en NaCl 0,9% para eliminación de elementos sanguíneos. Secciones de 1cm aprox. fueron fijadas con formalina al 4% tamponada en PBS (128mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) pH 7,4 durante 48 horas a 4°C. Posterior a este periodo, fueron lavados cinco veces con tampón de inmunohistoquímica (PBS pH7.4) por 7 min cada vez. A continuación se deshidrataron en una escala ascendente de etanoles, se aclararon en dos baños de xilol y fueron impregnados en 3 baños de parafina a 60°, para finalmente ser incluidos en parafina (Merck) a T/A. Se realizaron cortes del tejido en secciones de un grosor de 5µm en un micrótopo rotatorio tipo minot.

Los cortes fueron desparafinados en xilol (Merck) para luego ser rehidratados en una batería de etanoles (Merck) graduados de manera descendente hasta el agua destilada. Se bloqueó la reactividad inespecífica con BSA 4% en PBS pH 7,4 durante 1 hora a T/A.

Posteriormente, sin lavar, las secciones fueron incubadas durante 2 horas a T/A con anticuerpos primarios policlonales contra distintos canales de K⁺ y con anticuerpo monoclonal contra fosfatasa alcalina placentaria (anti-PLAP), como marcador de la membrana apical del hSTB y de la integridad celular:

- anti-K_{IR}2.1 (Alomone Labs, APC-026) diluido 1/50.
- anti-K_V2.1 (Alomone Labs, APC-012) diluido 1/50.
- anti-TASK-1 (Alomone Labs, APC-024) diluido 1/20.
- anti-TREK-1 (Alomone Labs, APC-047) diluido 1/100 y 1/50
- anti-BK_{Ca} (Alomone Labs, APC-021) diluido 1/50.
- anti-PLAP (Monoclonal Anti-Human Placental Alkaline Phosphatase, Clone 8B6, A2951, SIGMA) diluido 1/1000.

Todos los anticuerpos fueron diluidos en BSA 2% en PBS pH 7,4. Controles negativos se realizaron incubando BSA 2% en PBS pH 7,4 sin anticuerpo primario, para asegurar la especificidad de los anticuerpos utilizados.

Posteriormente las secciones fueron lavadas con tampón de inmunohistoquímica e incubadas durante ½ hora a T/A con anticuerpo secundario GARBI (Goat anti-rabbit Biotinilado, Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L), BA-1000, Vector Laboratories) dilución 1/100 para los distintos canales de K⁺ testeados y con anticuerpo secundario GAMBI (Goat anti-mouse Biotinilado, Biotinylated Anti-Mouse IgG (H+L), BA-9200, Vector Laboratories) dilución 1/100 para anticuerpo monoclonal anti-PLAP. Posterior al lavado que siguió a este proceso, se realizó incubación con Complejo Estreptavidina-Peroxidasa (Horseradish Peroxidase Streptavidin, SA-5004, Vector Laboratories) dilución 1/200 durante ½ hora a T/A. Luego de un nuevo lavado, se hicieron reaccionar con sustrato cromógeno (VECTOR NovaRED Substrate KIT, (for peroxidase) SK-4800) durante 5-10 min (mismas condiciones para todas las placas) y se frenó esta reacción manteniéndolas durante 5 min en agua corriente. Luego, en todos los cortes, se realizó tinción con Hematoxilina (Mayer's Hematoxiline, MHS-16, SIGMA) (tinción nuclear) durante 30 segundos y se hizo viraje de la reacción manteniendo las placas durante 5 min en agua corriente. Este contraste nuclear sirvió para identificar, dentro del componente celular, los núcleos del sinciotrofoblasto y así delimitar este epitelio con mayor facilidad.

Para finalizar, se realizó la deshidratación de los cortes en una batería de etanoles graduados de manera ascendente y se pasaron a través de dos xiloles distintos para aclarar. Finalmente, las placas fueron montadas en entellán y fueron observadas utilizando Microscopía Óptica (Leitz).

7.- Cuantificación de los Datos

Análisis de Estudios Electrofisiológicos

El análisis de datos obtenidos mediante Patch-Clamp se realizó con los Programas TAC (Buxton Corporation) y Pulse Fit (Heka Electronic, Lambrecht/Pfalzt, Alemania).

En cada experimento, se obtuvo el promedio de los valores de corriente y su respectiva Desviación Estándar (DS) a diferentes potenciales (-80, -60, -40, -20, +20, +40, +60 y +80mV) tanto en la situación control como en presencia de los distintos bloqueadores. En un gráfico de intensidad de corriente versus potencial (I/V), estos datos generaron rectas para cada una de las condiciones.

La comparación entre la situación control y en presencia de bloqueadores se tomó a potenciales extremos positivos y negativos. Se eligieron los datos obtenidos a -80 y +80mV y estos fueron analizados por estadística mediante ANOVA de una vía con $p < 0.05$, con programa ORIGIN PRO 7.0, de manera de poder conocer el grado de significancia de los promedios. Se consideraron ambos valores extremos para determinar la significancia de los datos puesto que es, a estos valores, en donde es posible observar el mayor efecto esperado.

Análisis de Western Blot

Para el análisis de los resultados obtenidos mediante Western blot se realizó el análisis densitométrico de las bandas mediante el programa UN-SCAN-IT gel 4.1 (Silk Scientific Corporation) luego de escanear los films resultantes de la técnica. Para normalizar los valores obtenidos mediante este análisis, los pixeles de cada una de las fracciones purificadas se presentaron como porcentaje de los pixeles totales medidos para una placenta determinada.

Los valores son presentados como el promedio \pm DS con un grado de significancia de $p < 0,05$.

Los datos obtenidos fueron analizados por estadística mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) para determinar diferencias significativas entre cada una de las tres fracciones purificadas de placentas humanas normales.

Análisis Inmunohistoquímico

La intensidad y los patrones de distribución de la inmunotinción fueron evaluados por dos observadores ciegos e independientes a este estudio (Licenciados de Tecnología Médica) más el autor de esta Memoria de Título.

La intensidad de la marca se midió en base a una escala de cualificación visual creada para dicho propósito, la que se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7. Escala de cualificación utilizada para la evaluación de Inmunohistoquímica.	
Intensidad de Marca	Valor
No hay marca	0
Marca Leve	1
Marca Moderada	2
Marca Intensa	3

A las observaciones realizadas en cada placa se les asignó un valor de intensidad según tabla y así pudieron ser comparados los distintos canales de potasio entre sí.

RESULTADOS

1.- Obtención de cortes de tejido y de membranas apicales altamente purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas.

La purificación de LMVM, MVM y BM, se realizó por el método descrito por Jiménez *et al.* (2004) desarrollado en sección de Materiales y Métodos. Fueron purificadas un total de 23 placentas humanas a término de mujeres que no presentaban ningún tipo de patología (PN) (ni propia ni asociada a la gestación) con un peso promedio de $689,52 \pm 108,17$ gr.

El grado de purificación de dichas fracciones fue determinado por el grado de enriquecimiento de éstas mediante la actividad de Fosfatasa Alcalina. Simultáneamente, se realizó la determinación proteica de las fracciones para cada placenta. En la Tabla 8, se muestran los valores promedio \pm DS obtenidos de placentas humanas normales, en ambas determinaciones:

Tabla 8. Valores Promedio \pm DS de enriquecimiento de Fosfatasa Alcalina y determinación de Proteínas en Placentas Humanas Normales a término.		
	Fosfatasa Alcalina	Proteínas (mg/ml)
LMVM	$19,42 \pm 7,03$	$6,18 \pm 2,04$
MVM	$15,33 \pm 5,07$	$6,53 \pm 2,20$
BM	$3,74 \pm 2,49$	$5,57 \pm 2,67$

Tabla 8. En columna “Fosfatasa Alcalina” se muestra el promedio \pm DS del enriquecimiento de cada una de las fracciones respecto del homogenato placentario (el valor total de actividad enzimática en el homogenato se toma como 1 en cada preparación). En columna “Proteínas” se muestra el promedio \pm DS de la determinación proteica de cada fracción. Ambos resultados fueron obtenidos de un total de $n=23$ placentas humanas normales a término.

La Tabla 8 muestra que las tres fracciones purificadas tienen un contenido proteico más o menos similar. Se demuestra, además, que debido al enriquecimiento con Fosfatasa Alcalina obtenido para LMVM de $19,42 \pm 7,03$ veces por sobre el homogenato, según lo descrito, corresponde a membrana apical liviana altamente purificada.

2.- Detección de la presencia de distintos tipos de canales de K^+ en cortes de tejido placentario, mediante el método Inmunohistoquímico ABC.

Los experimentos de Inmunohistoquímica se realizaron usando trozos de cotiledones de un total de 7 placentas de gestaciones normales.

Evaluación de la Calidad de las Muestras

Para comprobar que la morfología de las vellosidades coriales y de sus diversos componentes se encontrara conservada, se obtuvieron cortes histológicos de muestras de placentas normales y se analizó la expresión de PLAP (n=3).

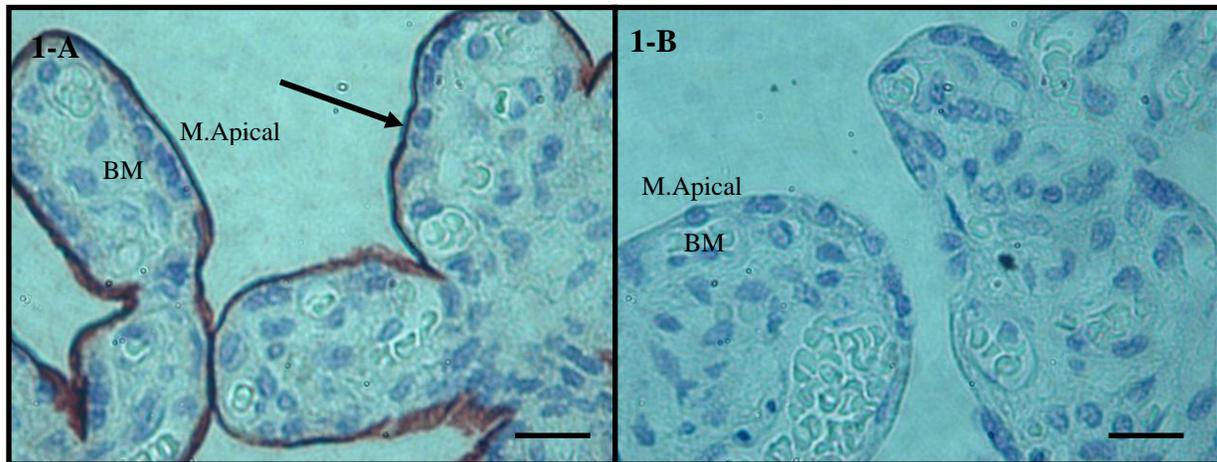


Figura 1. Microfotografía representativa de secciones de trofoblasto vellosito (5µm) y la expresión de Fosfatasa Alcalina Placentaria (anti-PLAP) en placentas humanas normales. 1-A Imagen representativa de la inmunotinción con anti-PLAP. **1-B** Control negativo. Flecha negra indica reacción positiva a la tinción con anti-PLAP en membrana apical de sinciotrofoblasto placentario. M.Apical: membrana microvellosa apical; BM: membrana basal. Barra=20µm. Núcleos en azul por tinción con hematoxilina.

La Figura 1-A muestra la membrana apical del sinciotrofoblasto placentario humano normal intensamente teñida con anti-PLAP (flecha negra). A su vez, se puede observar que la membrana basal de este epitelio no se encuentra teñida en ninguna de las dos condiciones propuestas. En contraste a la situación inicialmente detallada, el control negativo no reveló tinción en ninguna de las estructuras placentarias (Figura 1-B).

Expresión de distintos tipos de Canales de Potasio en sinciotrofoblasto de placenta humana normal

Con el objetivo de comparar cualitativamente la expresión de cinco tipos de canales de potasio ($K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca}) en el sinciotrofoblasto de las placentas en estudio, se obtuvieron cortes histológicos de placentas humanas normales a término ($n=3$) procesadas de acuerdo a lo descrito en metodología.

La Figura 2 da cuenta de la presencia de cinco tipos distintos de canales de K^+ en el sinciotrofoblasto placentario humano. Se observa que el canal $K_{IR}2.1$ (Figura 2-A), a la dilución probada, muestra una señal inespecífica dentro de todo el componente celular testeado, ya que se marca tanto el estroma de la vellosidad placentaria como el hSTB. Sin embargo, en algunas zonas de las vellosidades placentarias, se observa una tinción moderada que demarca con mayor definición el sinciotrofoblasto. Para el canal $K_V2.1$ (Figura 2-B) la situación fue distinta. La señal coloreada fue predominantemente nula en todas las vellosidades, exceptuando ciertas zonas en donde se observó tinción de sinciotrofoblasto y parénquima celular, como muestra la Figura 2-B. Sin embargo, comparativamente, esta situación no se repitió en todas las vellosidades ni en todas las placentas testeadas. Una situación similar se observó para el canal TASK-1 (Figura 2-C), en donde aparece una marca inespecífica en toda la vellosidad, incluyendo sinciotrofoblasto y parénquima celular.

Por el contrario, para el canal TREK-1 (dilución 1/50) (Figura 2-D) la tinción fue intensa (quizás, la más potente cualitativamente comparando todos los canales de K^+ probados), observándose dentro de todo el tejido placentario pero demarcando con gran afinidad la membrana apical del sinciotrofoblasto (flechas negras en Figura 2-D muestran esta situación) junto con tinción nuclear del sinciotrofoblasto (flecha roja en Figura 2-D). Sin embargo, a una dilución menos concentrada (no se muestra en Figura 2), se observa que la tinción se encuentra preferentemente dentro del componente nuclear del sinciotrofoblasto. Las causas de tal discrepancia serán objeto de discusión.

Finalmente, para el canal BK_{Ca} (Figura 2-E) la señal observada fue localizada preferentemente dentro del componente citosólico del sinciotrofoblasto. Aunque también se observó una leve tinción en el parénquima de la vellosidad placentaria.

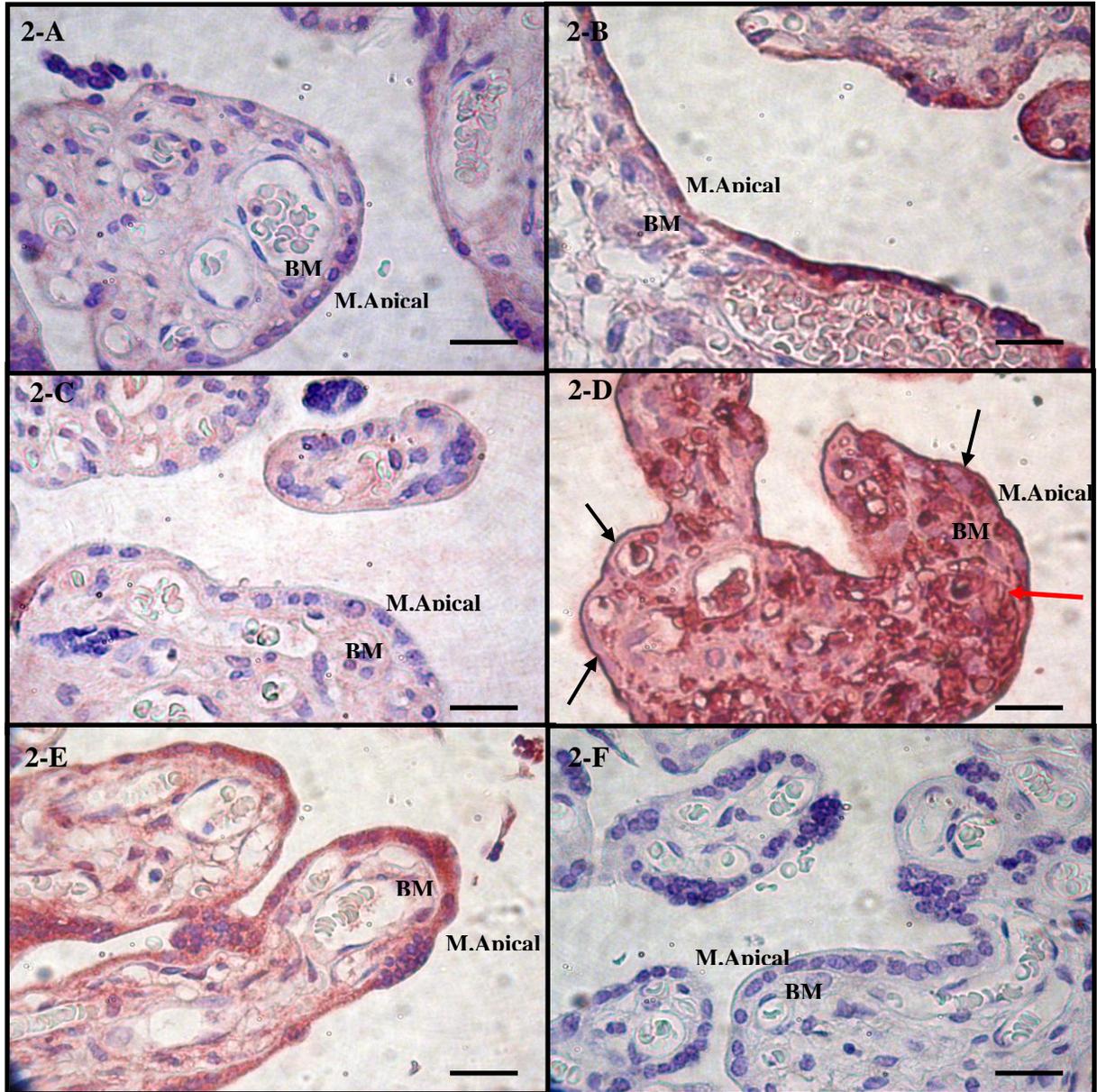


Figura 2. Microfotografía representativa de secciones de trofoblasto vellosos (5 μ m) y la expresión de $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca} en placentas humanas normales. 2-A Expresión de $K_{IR}2.1$. 2-B Expresión de $K_V2.1$. 2-C Expresión de TASK-1. 2-D Expresión de TREK-1. 2-E Expresión de BK_{Ca} . 2-F Control negativo. Flechas negras indican reacción positiva a la inmunotinción en membrana apical de sinciotrofoblasto placentario. Flecha roja indica reacción positiva nuclear. M.Apical: membrana microvellosa apical; BM: membrana basal. Barra=20 μ m. Núcleos en azul por tinción con hematoxilina.

El estudio Inmunohistoquímico, apoyado por la bibliografía consultada, sugiere la presencia de los cinco canales de K^+ probados dentro de la estructura placentaria, sin embargo, este estudio no fue decisivo, salvo para los canales BK_{Ca} y TREK-1, en donde se pudo localizar una estructura de ubicación placentaria específica. Es por este motivo que se analizaron los mismos cinco canales de K^+ probados por Inmunohistoquímica en membranas purificadas de placentas normales por el método de Western blot.

3.- Detección de la presencia de distintos tipos de canales de K^+ en membranas purificadas de placentas humanas normales a término mediante la técnica de Western blot.

Como se mencionó, el segundo paso descrito para clarificar la presencia de estos cinco canales de K^+ que fueron sugeridos para Inmunohistoquímica, fue detectar su presencia mediante Western blot pero ahora, dentro de las membranas purificadas de placentas normales (LMVM, MVM y BM).

La expresión de los distintos tipos de canales de K^+ en cada una de las fracciones purificadas obtenidas mediante Western blot, se usó para cuantificar la densidad relativa de estos canales dentro de cada una de las membranas del hSTB, de manera de poder dirigir los experimentos electrofisiológicos hacia la determinación de los canales que están más expresados en LMVM.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos, mediante la técnica de Western blot, en fracciones purificadas de sinciotrofoblasto para los siguientes anticuerpos sugeridos: $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca} .

3.1 Expresión de $K_{IR}2.1$ en Membranas Purificadas de hSTB.

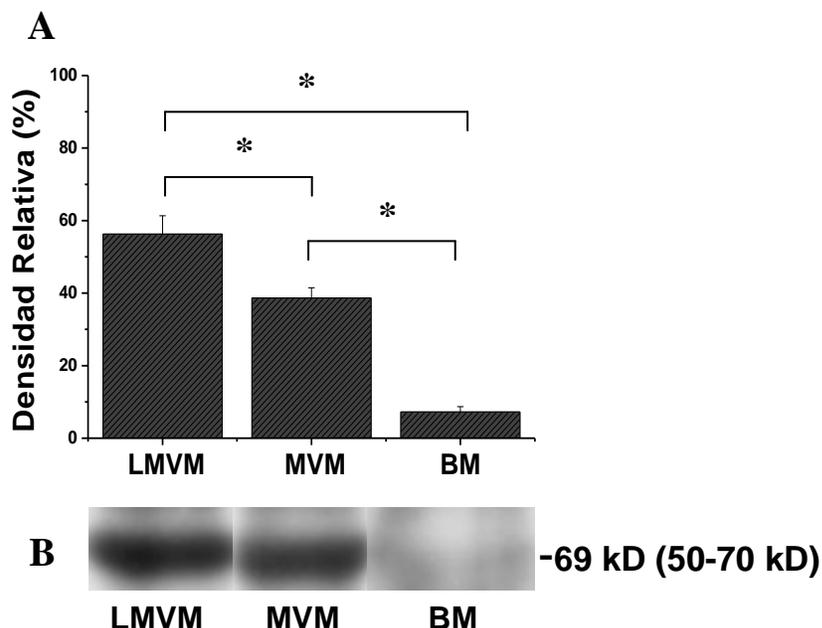


Figura 3. Expresión de $K_{IR}2.1$ en membranas purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término. **A)** Gráfico de densidad relativa para $K_{IR}2.1$ de n=3 placentas independientes para LMVM, MVM y BM de hSTB de placentas humanas normales. **B)** Western blot representativo de la presencia de $K_{IR}2.1$ en fracciones purificadas de hSTB (n=1 placenta). (*) Denota que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como muestra la Figura 3A los valores promedio obtenidos para cada una de las fracciones y su respectiva DS fue: LMVM, $56,3 \pm 5,0\%$; MVM, $38,7 \pm 2,8\%$ y BM, $7,3 \pm 1,4\%$. Se destaca la presencia de $K_{IR}2.1$ dentro de ambas fracciones apicales (LMVM y MVM). Esta situación se repitió en n=14 experimentos provenientes de 8 placentas normales independientes.

3.2 Expresión de K_v2.1 en Membranas Purificadas de hSTB

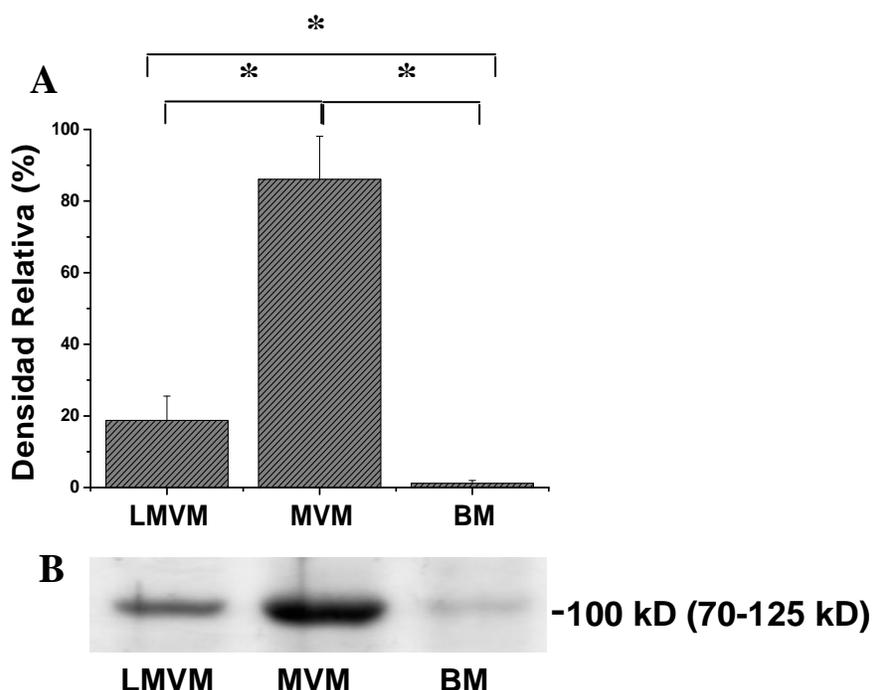


Figura 4. Expresión de K_v2.1 en membranas purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término. A) Gráfico de densidad relativa para K_v2.1 de n=3 placentas independientes para LMVM, MVM y BM de hSTB de placentas humanas normales. B) Western blot representativo de la presencia de K_v2.1 en fracciones purificadas de hSTB (n= 1 placenta). (*) Denota que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas (p<0,05).

Como se muestra en la Figura 4A los valores promedio obtenidos para cada una de las fracciones y su respectiva DS fue de: LMVM, 18,7±6,8%; MVM, 86,1±12,0% y BM, 1,2±0,8%. Se destaca su marcada presencia en MVM siendo la diferencia estadísticamente significativa comparado con LMVM (p<0,05). Esta situación se repitió en un n=7 experimentos provenientes de 5 placentas normales independientes.

3.3 Expresión de TASK-1 en Membranas Purificadas de hSTB

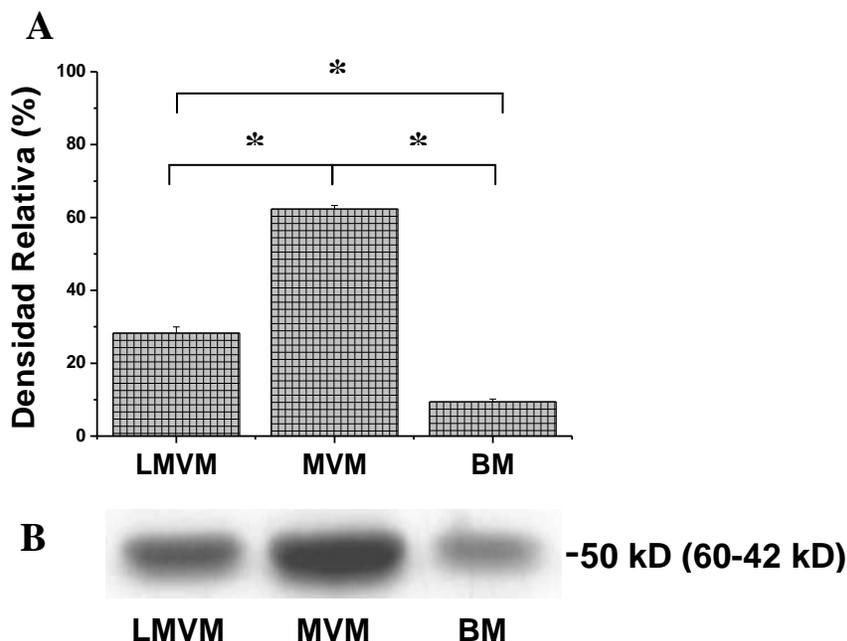


Figura 5. Expresión de TASK-1 en membranas purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término. A) Gráfico de densidad relativa para TASK-1 de n=3 placentas independientes para LMVM, MVM y BM de hSTB de placentas humanas normales. B) Western blot representativo de la presencia de TASK-1 en fracciones purificadas de hSTB (n= 1 placenta). (*) Denota que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Como se muestra en la Figura 5A los valores obtenidos para cada una de las fracciones y su respectiva DS fue: LMVM, $28,3\pm 1,7\%$; MVM, $62,3\pm 1\%$ y BM, $9,4\pm 0,8\%$. Se destaca su marcada presencia en fracción MVM siendo estadísticamente significativa la diferencia existente entre esta fracción y LMVM y entre MVM y BM ($p<0,05$). Resultados reproducidos en un n=6 experimentos provenientes de 6 placentas normales independientes.

3.4 Expresión de TREK-1 en Membranas Purificadas de hSTB

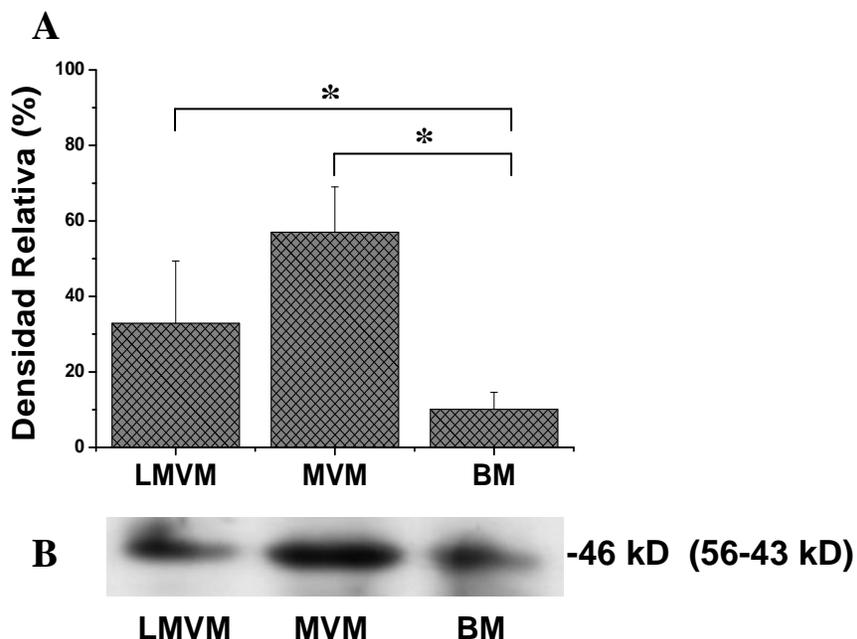


Figura 6. Expresión de TREK-1 en membranas purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término. **A)** Gráfico de densidad relativa para TREK-1 de n=3 placentas independientes para LMVM, MVM y BM de hSTB de placentas humanas normales. **B)** Western blot representativo de la presencia de TREK-1 en fracciones purificadas de hSTB (n= 1 placenta). (*) Denota que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Como muestra la Figura 6A los valores obtenidos para cada una de las fracciones y su respectiva DS fue de: LMVM, $32,9 \pm 16,5\%$; MVM, $57,0 \pm 12,0\%$ y BM, $10,0 \pm 4,5\%$. Se destaca su mayor expresión en la fracción MVM no siendo estadísticamente significativa la diferencia existente entre esta fracción y LMVM ($p < 0,05$). Esta situación se repitió en un n=9 experimentos provenientes de 5 placentas normales independientes.

3.5 Expresión de BK_{Ca} en Membranas Purificadas de hSTB

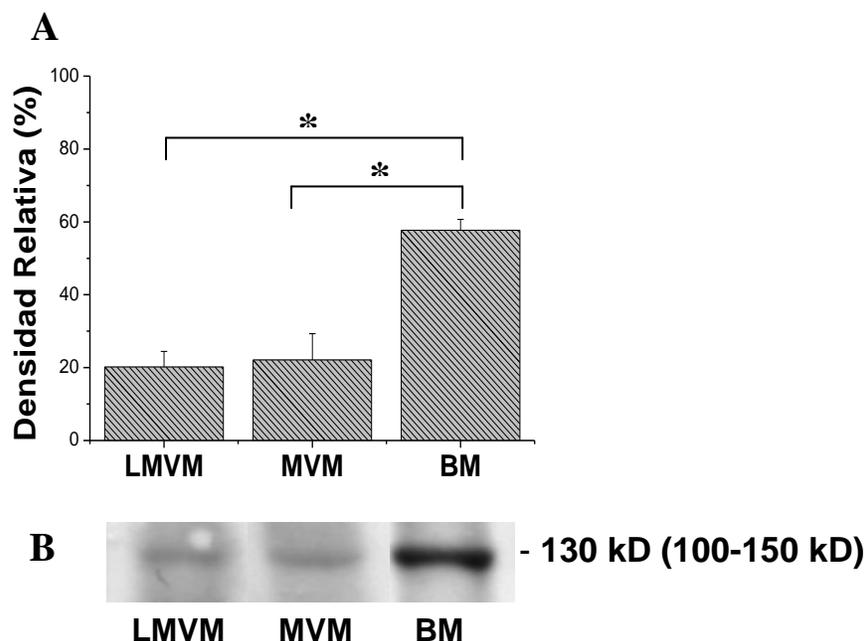


Figura 7. Expresión de BK_{Ca} en membranas purificadas de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término. **A)** Gráfico de densidad relativa para BK_{Ca} de n=4 placentas independientes en LMVM, MVM y BM de hSTB de placentas humanas normales. **B)** Western blot representativo de la presencia de BK_{Ca} en fracciones purificadas de hSTB (n=1 placenta). (*) Denota que las diferencias de expresión son estadísticamente significativas (p<0,05).

Como se muestra en la Figura 7A los valores obtenidos para cada una de las fracciones y su respectiva DS fue de: LMVM, 20,0±4,3%; MVM, 22,1±7,2% y BM, 57,7±3,0%. Se destaca su marcada presencia en fracción BM en comparación con las membranas apicales (LMVM y MVM). La expresión entre ambas membranas apicales no muestra diferencias estadísticas (p<0,05). Esta situación se repitió en un n=17 experimentos provenientes de 11 placentas normales independientes.

3.6 Gráfico Resumen de la Distribución Densitométrica Relativa de Canales de K⁺ probados para cada una de las membranas purificadas.

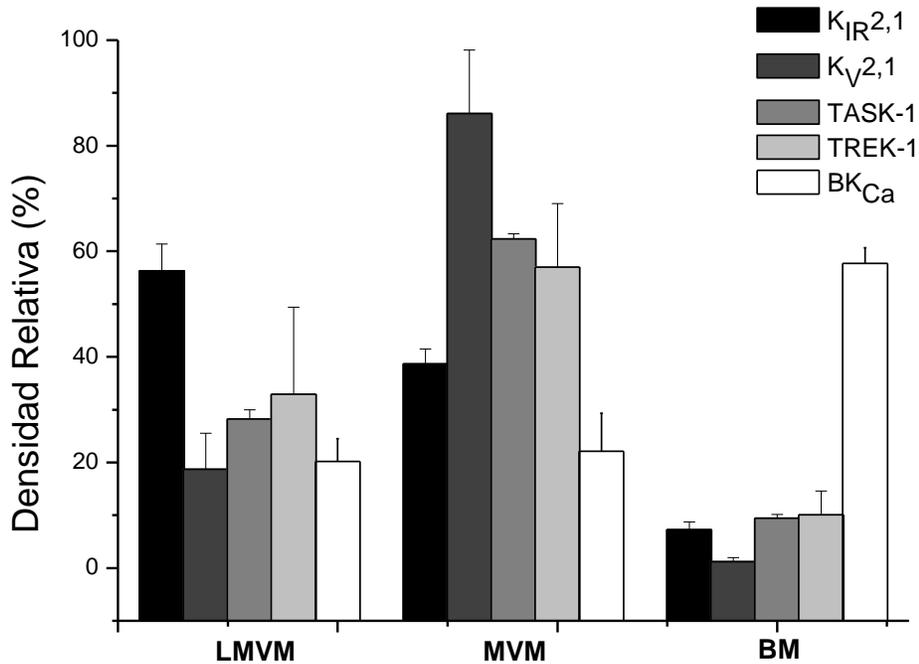


Figura 8. Gráfico resumen de la expresión de K_{IR}2.1, K_V2.1, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca} en las distintas fracciones de membrana altamente purificadas de placentas humanas normales. Cada barra corresponde al Promedio ± DS de la densitometría por membrana individual de cada uno de los anticuerpos utilizados. En el inserto superior derecho se describe nomenclatura utilizada. Diferencias estadísticas fueron entregadas en gráficos precedentes de manera individual por cada canal.

En el gráfico que muestra la Figura 8 se puede apreciar que el canal K_{IR}2.1 se encuentra mayormente expresado en LMVM (LMVM>MVM>BM), mientras que K_V2.1, TASK-1 y TREK-1 se encuentran mayoritariamente en MVM (MVM>LMVM>BM). En contraste, BM tiene una fuerte expresión de BK_{Ca} y una proporción relativamente similar y menor de los cuatro otros canales (la expresión diferencial de BK_{Ca} en las membranas purificadas fue BM>MVM>LMVM).

4.- Reconstitución de LMVM purificada de sinciotrofoblasto de placentas humanas normales a término en un sistema lipídico artificial y obtención de sellos de alta resistencia mediante Técnica de Patch-Clamp.

Los datos entregados en los experimentos precedentes, generaron un modelo para la caracterización funcional de estos tipos de canales de K^+ en una de las membranas purificadas de hSTB, específicamente en LMVM, mediante métodos electrofisiológicos. El objetivo de éste y los puntos siguientes (5, 6, 7, 8 y 9) fue, por lo tanto, identificar los cuatro tipos de canales de K^+ que están mayormente expresados en LMVM ($K_{IR2.1}$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1).

En el presente estudio, tal como se describe en sección Métodos, se reconstituyeron fracciones purificadas de LMVM mediante la fusión en vesículas lipídicas de azolectina para la formación de liposomas gigantes, que, al tener el tamaño similar a una célula, permitió realizar la técnica de Patch-Clamp para el registro de la actividad eléctrica de estos canales.

Durante el transcurso de este estudio, se reconstituyeron membranas purificadas de LMVM provenientes de 16 placentas independientes, fusionadas con un total de 27 *batches* de vesículas lipídicas provenientes de un igual número de diálisis.

En los liposomas gigantes formados, se realizaron aproximadamente 250-300 sellos de alta resistencia mediante la técnica electrofisiológica de Patch-Clamp en configuración de parche escindido (inside-out patch). De este promedio de sellos, se obtuvieron un total de 116 sellos exitosos (buena calidad, alta resistencia, sin fugas de corriente (leak), desde liposomas que permitiesen la técnica, etc.) los que fueron utilizados como resultados de este estudio.

Los sellos de alta resistencia en un liposoma gigante sin proteínas, no muestran actividad eléctrica. Todos los liposomas considerados de buena calidad, mostraron corrientes

eléctricas, lo que indicó la incorporación funcional de proteínas de LMVM dentro de la estructura del liposoma gigante.

Posterior a la obtención de sellos de alta resistencia, los registros de corrientes eléctricas se realizaron mediante dos protocolos de potencial:

- *Pulsos de potencial*: de -80 a +80mV, con intervalos de 40mV.
- *Rampas de potencial*: de -80 a +80mV o desde -120 a +120mV, pasando por todos los rangos de potencial entre estos dos voltajes extremos.

5.- Detección de corrientes de K⁺.

Para identificar que los registros eléctricos correspondieran a corrientes de potasio, se trabajó con soluciones enriquecidas con este ión. La Tabla 9 muestra las soluciones utilizadas enriquecidas en K⁺. En estas soluciones, a diferencia de las soluciones utilizadas por Díaz *et al.*, (2008), se reemplazó el cloruro por gluconato, para evitar contaminación con canales de cloruro.

Tabla 9. Soluciones utilizadas para el registro de corrientes eléctricas de K⁺.

	Gluconato de K ⁺ (mM)	KCl (mM)	K-Hepes (mM)	Mes (mM)	pH
Solución 1	140	10	10	-	7,0 y 7,4
Solución 2	140	10	-	10	6,1 y 6,6
Solución 3	30	10	10	-	7,4

Todos los registros fueron inicialmente realizados en condiciones simétricas de K⁺ con Solución 1 a pH7,4 (salvo en casos en donde se especifique una situación contraria). Luego, a través de los requerimientos de cada experimento, se hicieron cambios a las diferentes soluciones señaladas.

En la figura 9 se muestra registro típico observado en condiciones simétricas de K^+ con Solución de registro 1 (140mM Gluconato de Potasio; 10 mM KCl y 10 mM K-Hepes, pH7,4).

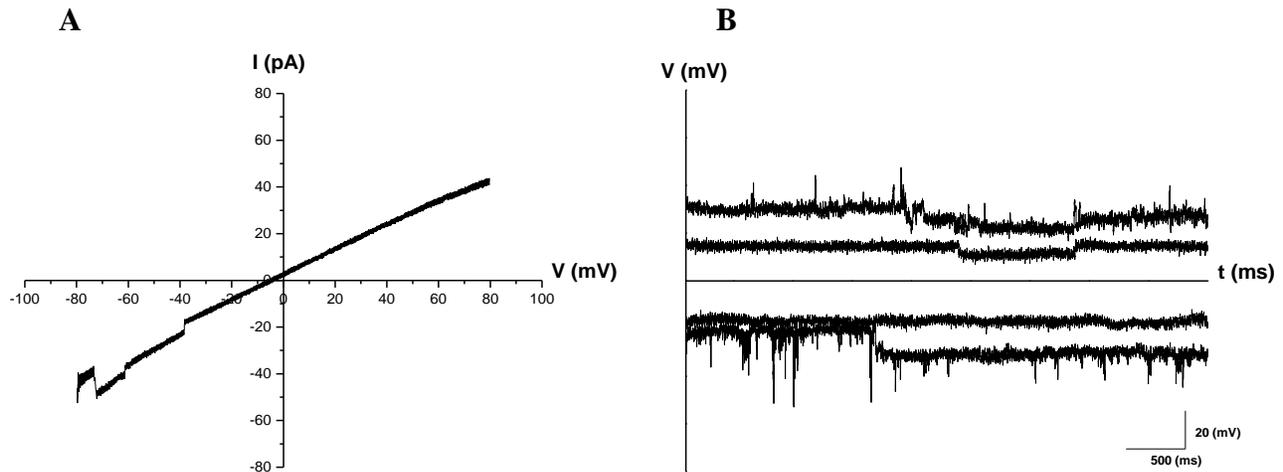


Figura 9. Registros de la actividad eléctrica de conductancias de K^+ de la membrana apical liviana de placenta humana normal. Todos los registros presentados en esta figura fueron realizados en Solución 1 a T/A. **A)** Curva corriente-potencial del registro representativo de una rampa de potencial a ± 80 mV. **B)** Registro representativo de un pulso de potencial a ± 80 MV con intervalos de 40mV.

6.- Identificación de corrientes de K^+ en condiciones asimétricas de Gluconato de Potasio.

Para poder comprobar que las corrientes detectadas son provenientes de conductancias de K^+ y no de otro elemento que estaría en las soluciones de registro (por ejemplo, cloruro, gluconato, etc.) se realizaron registros en condiciones asimétricas de K^+ .

Bajo condiciones asimétricas de K^+ las cargas positivas migran desde la zona de mayor concentración hacia la zona de menor concentración, a favor de su gradiente electroquímica.

En este estudio, la pipeta contenía un total de 160 mM de Gluconato de Potasio y el baño contenía un total de 50 mM de Gluconato de Potasio (Solución 3 = baño; Solución 1

pH7,4= pipeta). Para lograr la simetría de la solución, se adicionó a la solución de baño 110 mM de Gluconato de Potasio (49,5 μ L de Gluconato de Potasio 1M). Con este procedimiento se obtuvo la simetría de la solución.

El $\Delta V \pm DS$ experimental fue: $13,8 \pm 0,41$ mV en un total de 3 sellos de alta resistencia provenientes de 3 placentas humanas normales independientes.

Luego de obtenerse el potencial de equilibrio experimental, se calculó el potencial de equilibrio teórico para el K^+ bajo estas condiciones de concentración (160 mM Gluconato de K^+ / 50mM Gluconato de K^+) mediante la *Ecuación de Nernst*, que entrega el potencial de membrana a la cual las gradientes de concentración eléctricas y químicas son iguales y opuestas, por lo que no existe un flujo neto para una especie iónica determinada. Posteriormente, se compararon ambos resultados.

Ecuación de Nernst:

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

Reemplazando valores:

$$V_{eq} = \frac{8315 \text{ joule/}^\circ \text{ K mol} * 292^\circ \text{K}}{96500 \text{ C/mol} * 1} * \frac{\ln 160 \text{ mM}}{50 \text{ mM}}$$

$$V_{eq} = 25,160414 * \ln 3,2$$

$$V_{eq} = 25,160414 * 1,1631$$

$$V_{eq} = 29,26 \text{ mV}$$

El $V_{eq}=29,26$ mV es el corrimiento teórico esperado y el ΔV experimental= $13,8 \pm 0,41$ mV. Por lo tanto, se concluye que alrededor del 50% de la corriente que está pasado por estos sellos son corrientes de K^+ y que ningún otro ión (Cl^- o Na^+ , por ejemplo) es responsable de estas corrientes.

7.- Caracterización de la conductancia de las corrientes unitarias de K^+ bajo condiciones simétricas de Gluconato de Potasio.

Con la seguridad de que la corriente registrada corresponde a canales de potasio se procedió a determinar la conductancia promedio de los sellos registrados. Los valores de conductancia fueron obtenidos de un total de 42 sellos provenientes de 7 placentas normales independientes.

El promedio de la conductancia más frecuente fue de $51,13 \pm 3,1pS$ para canales de K^+ registrados en LMVM de hSTB y se muestra en Gráfico 1.

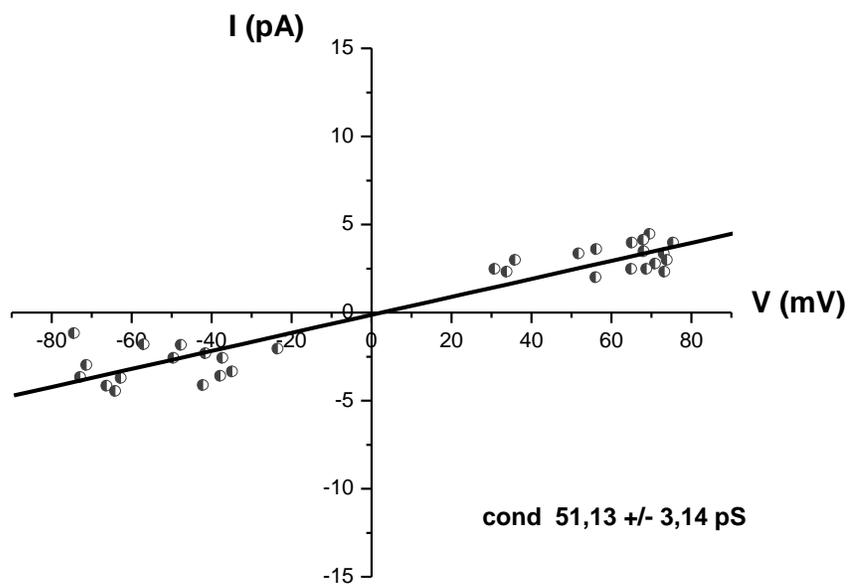


Gráfico 1. Recta corriente-voltaje (I/V) del registro de canales de K^+ en el subdominio LMVM de membrana apical de hSTB. La línea negra representa la recta obtenida de las conductancias de registros independientes. La conductancia promedio fue obtenida por la pendiente de la recta y fue de $51,13 \pm 3,14pS$. Registro realizado en condiciones simétricas de K^+ en Solución 1 pH7,4.

8.- Reproducción electrofisiológica de corrientes de K⁺ mediante bloqueos diferenciales.

Con el objeto de una adecuada comparación entre los datos previamente obtenidos y los resultados propuestos en esta Memoria de Título, fue necesario reproducir los resultados electrofisiológicos obtenidos por Díaz *et al.* (2008). Esto garantizó la reproducibilidad de ellos y fueron la base de la identificación de las características específicas de las corrientes de potasio propuestas.

Como se mencionó, Díaz *et al.* (2008) describieron la presencia de corrientes de K⁺ en LMVM bloqueables por BaCl₂ y una subpoblación de corrientes bloqueadas adicionalmente por TEA. Estos resultados preliminares no consiguieron describir que tipos de canales de K⁺ son los responsables de dichas corrientes encontradas.

8.1 Reproducción de Corrientes de K^+ bloqueadas por $BaCl_2$

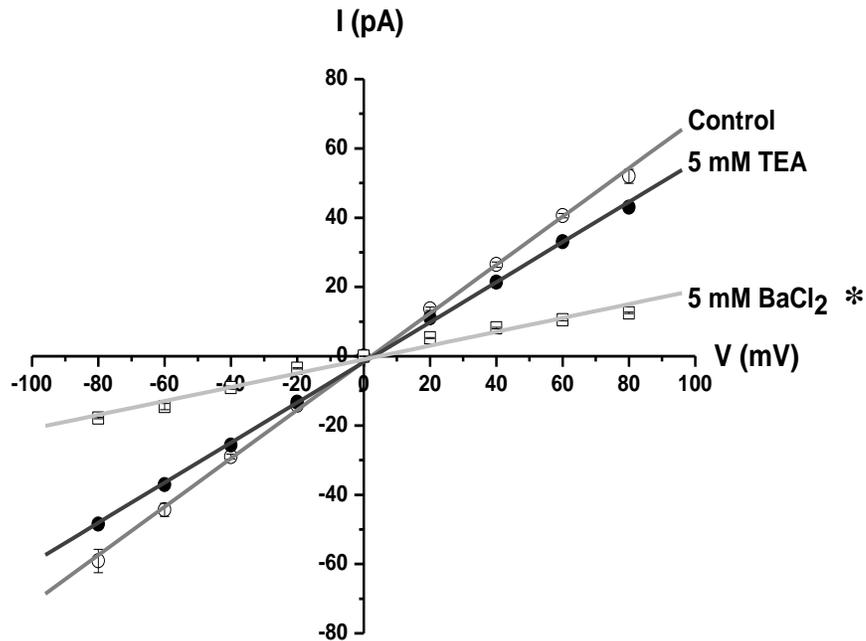


Gráfico 2. Relación corriente-potencial (I/V) para canales bloqueados por $BaCl_2$. Gráfico representativo ($n=1$) del bloqueo con $BaCl_2$. Círculos blancos= recta de registro inicial; círculos negros= recta obtenida por la adición de 5mM TEA sobre la situación inicial; cuadrados blancos= recta del efecto obtenido de 5mM $BaCl_2$ sobre los 5mM TEA adicionados inicialmente. (*) Denota que diferencias entre control y 5mM $BaCl_2$ y entre 5mM TEA y 5mM $BaCl_2$ son estadísticamente significativas ($p<0,05$).

El Gráfico 2 muestra la relación corriente potencial para un experimento realizado con una solución de baño y pipeta en Solución 1 pH 7,4 con pulsos de potencial a ± 80 mV y el efecto de TEA y posterior efecto aditivo TEA+ $BaCl_2$ sobre el registro inicial. Se observa que el bloqueador de canales de potasio TEA, en este registro, produce un bloqueo promedio a -80mV de 18,1%, en comparación con $BaCl_2$ que, a -80 mV, produce un bloqueo final promedio de 69,8% de la corriente inicial, siendo un bloqueo independiente del potencial aplicado. Las condiciones propuestas fueron repetidas en un $n=36$ sellos provenientes de 9 placentas independientes. De este total, 4 sellos mostraron un leve bloqueo a $BaCl_2$ (bloqueo entre 15 y 45% de la corriente inicial) y 15 sellos no mostraron efecto al bloqueo. Sin embargo, 6 sellos del total, mostraron un gran bloqueo frente a 5mM de $BaCl_2$ (bloqueo $>$ a 50%).

8.2 Reproducción de Corrientes de K^+ bloqueadas por TEA

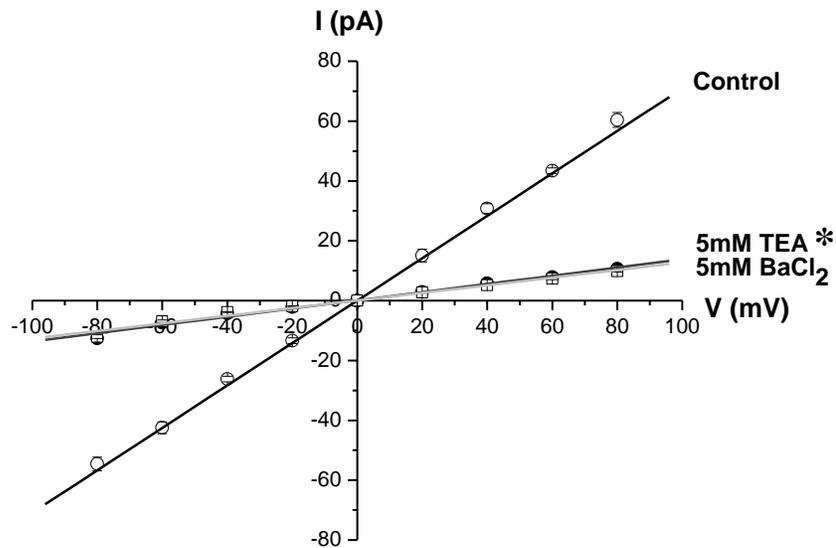


Gráfico 3. Relación corriente-potencial (I/V) para canales bloqueados por TEA. Gráfico representativo (n=1) del bloqueo con TEA. Círculos blancos= recta de registro inicial; círculos negros= recta obtenida por el efecto de la adición de 5mM TEA sobre la situación inicial; cuadrados blancos= recta obtenida por el efecto de la adición de 5mM BaCl₂ sobre los 5mM TEA adicionados con anterioridad. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa entre la situación control y la adición de 5mM TEA (p<0,05). No existen diferencias estadísticas entre el efecto TEA y el efecto aditivo de BaCl₂.

El Gráfico 3 muestra la relación corriente potencial para un experimento realizado con una solución de baño y pipeta en Solución 1 pH 7,4 con pulsos de potencial a ± 80 mV y el efecto de TEA y posterior efecto aditivo TEA+BaCl₂ sobre la situación control. Esta corriente de potasio registrada muestra una gran sensibilidad al bloqueo con TEA generando un bloqueo promedio final de un 82,3% a 5mM de TEA (círculos negros) sobre la corriente inicial del sello, siendo este bloqueo independiente del potencial aplicado. El bloqueo no aumentó al adicionar 5mM BaCl₂ (cuadrados blancos), por lo tanto, la corriente muestra una insensibilidad a este bloqueador. Un total de n=16 sellos provenientes de 5 placentas independientes fueron expuestos a los efectos del bloqueo con TEA. De éstos, 3 sellos mostraron un leve bloqueo a TEA (bloqueo < 50%) y en 6 sellos no se registró efecto bloqueador. Sin embargo, 7 sellos del total mostraron una fuerte disminución de la corrientes frente a 5mM TEA (bloqueo > a 50%).

Adicionalmente a la reproducción de éstas corrientes (similares resultados se obtuvieron en Díaz *et al.* (2008)) se encontraron corrientes de K^+ , detalladas a continuación, que no han sido identificadas funcionalmente hasta el momento y que estarían involucradas en los canales responsables de las corrientes de K^+ detectadas en los sellos.

8.3 Corrientes de K^+ insensibles al efecto de $BaCl_2$ y TEA

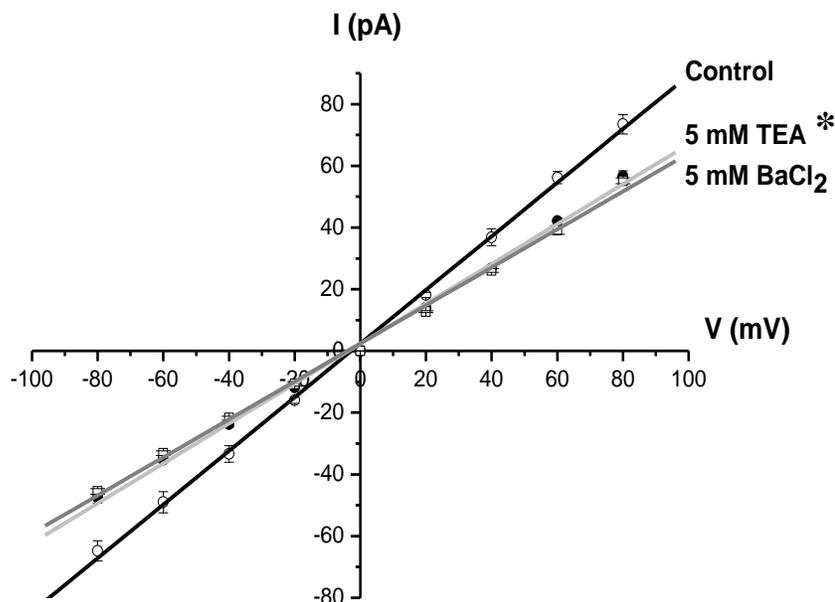


Gráfico 4. Relación corriente-potencial (I/V) de corrientes insensibles a $BaCl_2$ y TEA. Gráfico representativo (n=1) de la insensibilidad a $BaCl_2$ y TEA. Círculos blancos= recta de registro inicial; círculos negros= recta del efecto de la adición de 5mM TEA sobre la situación inicial; cuadrados negros= recta del efecto de la adición de 5mM $BaCl_2$ sobre los 5mM TEA adicionados anteriormente. (*) Existe diferencia estadísticamente significativa entre control y adición de 5mM TEA ($p < 0,05$). No existen diferencias estadísticas entre 5mM TEA y el efecto aditivo de $BaCl_2$.

El Gráfico 4 muestra la relación corriente potencial para un experimento realizado con solución de baño y pipeta en Solución 1 pH 7,4 con pulsos de potencial de ± 80 mV y el efecto de TEA y posterior efecto aditivo TEA+ $BaCl_2$ sobre la situación inicial. Este gráfico es representativo de la insensibilidad presentada por una corriente de K^+ frente a estos dos bloqueadores; TEA bloqueó un promedio de un 22,9% y al adicionar $BaCl_2$ el bloqueo aumentó en un 24,9%. Un total de n=5 sellos provenientes de 3 placetas distintas, mostraron la respuesta farmacológica presentada en el Gráfico 4.

9.- Identificación de características específicas, por métodos electrofisiológicos, de cuatro tipos de canales de K^+ presentes en LMVM de hSTB: $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1, mediante bloqueos selectivos.

Para disecar con mayor especificidad las tres corrientes obtenidas en el segmento 8, producto de su distinto comportamiento farmacológico, se realizaron registros electrofisiológicos mediante Patch-Clamp en donde se probaron bloqueos dirigidos (ayudado por literatura consultada) hacia posibles candidatos a las corrientes descritas.

Los Western blots obtenidos anteriormente, demostraron la expresión de $K_{IR} 2.1$, $K_V 2.1$, TASK-1 y TREK-1 en LMVM de hSTB. Por lo tanto, en base a la evidencia experimental de este estudio, se procedió a identificar la existencia funcional de estos cuatro canales mediante métodos electrofisiológicos.

Es así como, se realizaron experimentos mediante bloqueos diferenciales o con los activadores más idóneos dirigidos específicamente contra los canales de K^+ mayormente expresados en LMVM obtenidos por Western blots.

Se utilizó:

- $BaCl_2$ como bloqueador potente de canales K_{IR} .
- $MgCl_2$ como importante bloqueador intracelular de corrientes K_{IR} .
- $CsCl_2$ también postulado como bloqueador de canales K_{IR} .
- TEA (*tetraethylammonium*) como potente inhibidor de las corrientes de canales K_V .
- Acidificación del medio, lo que permite la diferenciación de corrientes sensibles a pH ácido, como TASK-1 (que se inhibe a pH ácidos) y TREK-1 (que es fuertemente activado a pH ácido).

9.1 Efecto $MgCl_2$

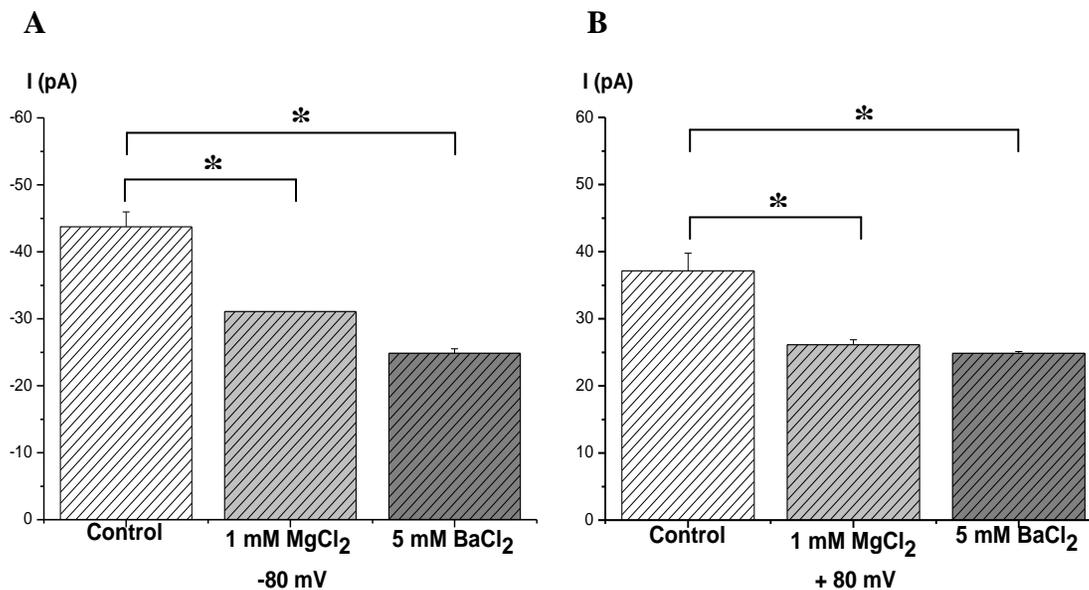


Figura 10. Efecto aditivo de $MgCl_2$ y $BaCl_2$ sobre una corriente de K^+ control. A) Gráfico que muestra el efecto del bloqueo con $MgCl_2$ sobre corriente inicial de K^+ y posterior adición de $BaCl_2$ sobre la adición de $MgCl_2$, en el mismo experimento, a -80 mV . B) Gráfico que muestra el efecto bajo las mismas condiciones mencionadas en A pero a $+80\text{ mV}$. (*) Muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tanto a -80 como a $+80\text{ mV}$. El efecto aditivo $MgCl_2 + BaCl_2$, a ambos potenciales, no es significativo estadísticamente.

La Figura 10 muestra dos gráficos representativos a -80 mV (izquierda) y $+80\text{ mV}$ (derecha) de un total de 6 sellos provenientes de 1 placenta que fueron sometidos a los efectos inhibitorios del $MgCl_2$ (1mM) y posterior adición de $BaCl_2$ (5mM). $MgCl_2$ bloquea la corriente un promedio de 29% y adicionando $BaCl_2$ se alcanza un 38% de bloqueo final sobre la corriente inicial a -80 mV . El resultado obtenido con el bloqueo aditivo de $MgCl_2 + BaCl_2$ sugiere que ambos bloqueadores actúan sobre la misma población de canales ($K_{IR2.1}$). Además, este efecto es independiente del potencial aplicado.

9.2 Efecto CsCl₂

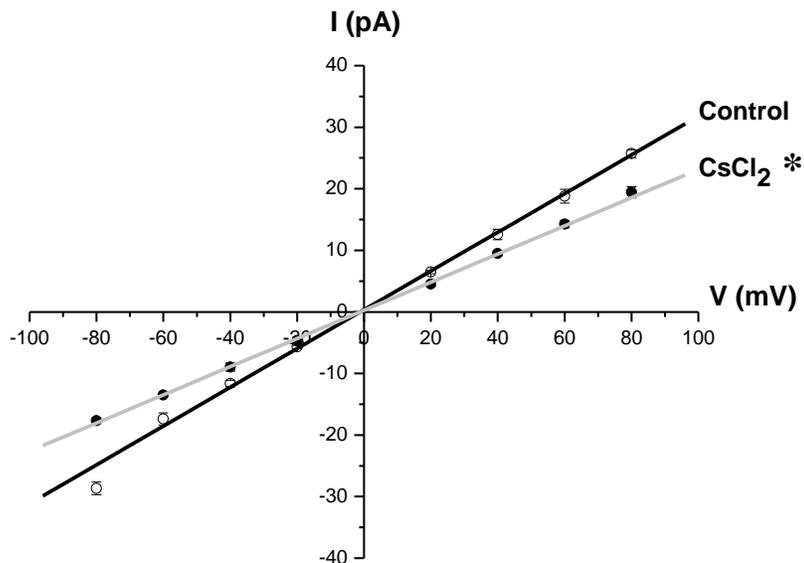


Gráfico 5. Relación corriente-potencial (I/V) del efecto de bloqueo con CsCl₂. Gráfico representativo (n=1) del efecto CsCl₂. Círculos blancos: recta de registro inicial; círculos negros: recta del efecto de 1mM CsCl₂ sobre esta corriente inicial. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones (p<0,05).

El Gráfico 5 muestra la relación corriente potencial a $\pm 80\text{mV}$ en condiciones simétricas de K^+ con Solución 1 pH 7,4 y la respuesta al bloqueo con CsCl₂, bloqueador de canales K_{IR} , sobre una corriente de K^+ inicial. CsCl₂ produce un bloqueo, a una concentración de 1mM, de un 26,2% sobre la corriente registrada inicialmente. Un total de n= 2 sellos provenientes de 1 placenta fueron bloqueados por Cesio y mostraron el efecto presentado en Gráfico 5.

9.3 Efecto Bario y reversibilidad

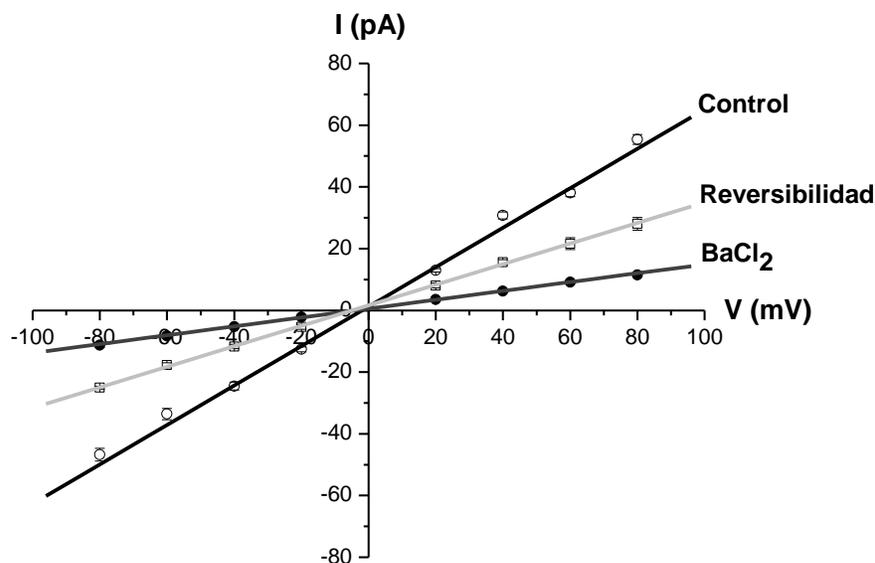


Gráfico 6. Relación corriente-potencial (I/V) de bloqueo y reversibilidad al efecto de BaCl₂. Gráfico representativo (n=1) del bloqueo y reversibilidad con BaCl₂. Círculos blancos: recta de registro inicial; círculos negros: recta del efecto de 5mM BaCl₂ sobre la corriente inicial; cuadrados blancos: recta del bloqueo reversible producido al eliminar de la solución este bloqueador.

El Gráfico 6 muestra la relación corriente potencial a $\pm 80\text{mV}$ en condiciones simétricas de K^+ con Solución 1 pH7,4 y el efecto bloqueador de BaCl₂ sobre una corriente de K^+ inicial y posterior lavado del baño con solución 1 pH7,4 sin bloqueador. Se muestra que una corriente de K^+ muy sensible al efecto bloqueador de BaCl₂ (la corriente es bloqueada un 77,5% en promedio a -80mV) puede volver, al menos en parte, a su corriente inicial al sacar de la solución de registro el bloqueador (queda con un porcentaje de bloqueo promedio de 47,5% a -80mV). Situación de n= 1 sello proveniente de 1 placenta.

9.4 Efecto TEA

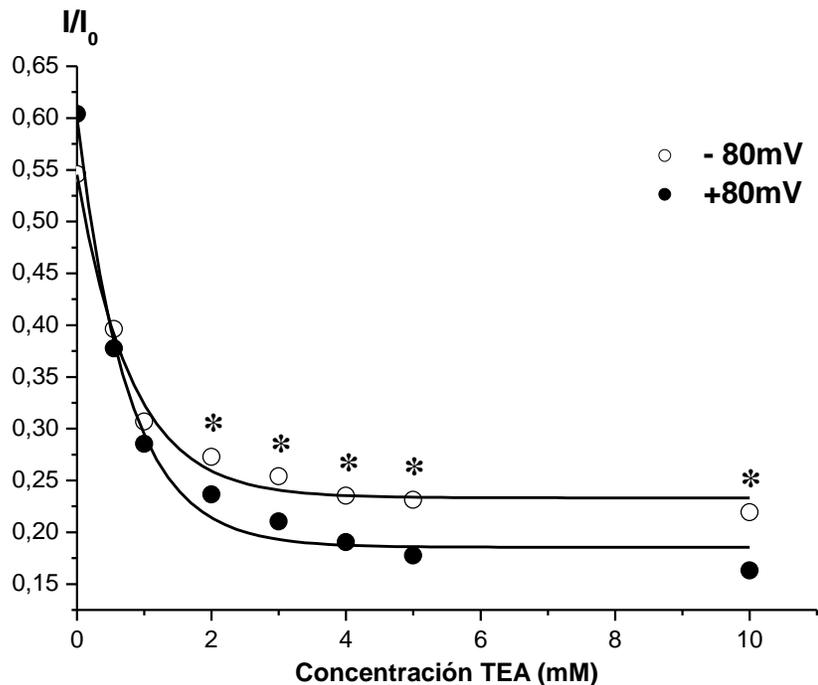


Gráfico 7. Curva dosis-respuesta a bloqueador TEA. En círculos blancos se representa el bloqueo promedio a -80mV y en círculos negros a +80mV, a diferentes concentraciones del bloqueador TEA. A los datos se les aplicó una línea exponencial de primer orden para establecer la tendencia de los datos. (*) Denota diferencias estadísticamente significativas entre ambos potenciales aplicados a la misma concentración de bloqueador ($p < 0,05$).

En el Gráfico 7 se observa que, a -80mV, TEA produce un bloqueo de un 60,4% a una concentración de 0,55mM, siendo este bloqueo máximo a 5mM TEA donde es de 78,1%. Este bloqueo es dependiente de la concentración del bloqueador adicionado y dependiente del potencial aplicado ($p < 0,05$). Esta situación se repitió en $n=3$ sellos provenientes de 2 placentas independientes.

9.5 Efecto acidificación del medio: Inhibición

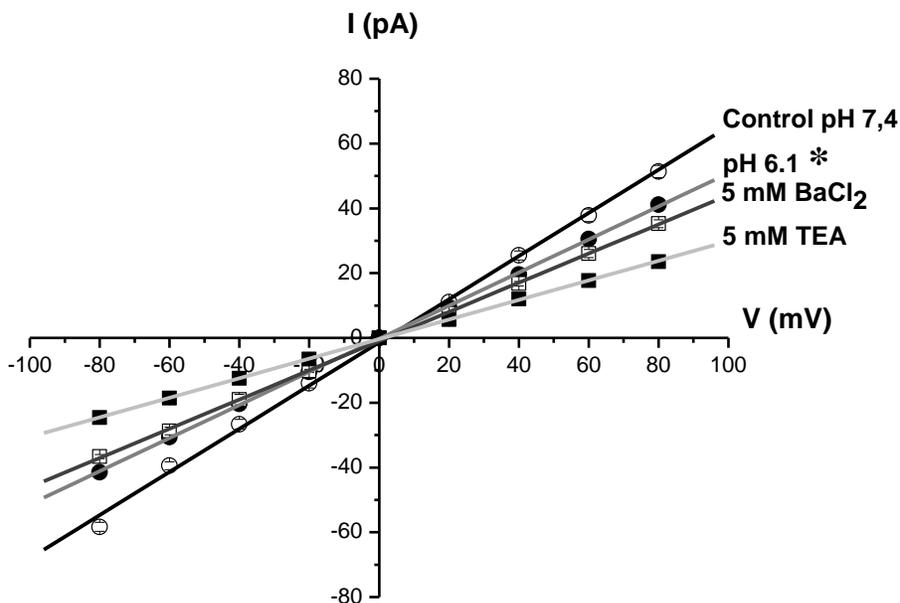


Gráfico 8. Relación corriente-potencial (I/V) para el bloqueo aditivo con pH ácido, BaCl₂ y TEA de una corriente de K⁺ inicial. Gráfico representativo (n=1) del efecto de la acidificación del medio: inhibición. Círculos blancos= recta de situación inicial a pH7,4; círculos negros= recta del efecto de la acidificación a pH6,1; cuadrados blancos= recta del efecto de la adición de 5mM BaCl₂ sobre la acidificación a pH6,1 inicial; cuadrados negros= recta del efecto de la adición de 5mM TEA sobre las dos condiciones mencionadas anteriormente. (*) Bloqueo estadísticamente significativo entre esta condición y la situación control (p<0.05).

El Gráfico 8 muestra el efecto de la acidificación del medio (desde Solución 1 pH 7,4 a Solución 2 pH 6,1) en una corriente de K⁺ inicial a ± 80 mV que es bloqueada a pH 6,1 en un 28,9%. La corriente representativa muestra, además, una combinación de corrientes, puesto que existe también un remanente de corriente sensible a BaCl₂ (aumenta el bloqueo en un 8,4%), otro componente bloqueado por TEA no sensibles a pH ácido ni a BaCl₂ y una corriente restante no sensible ni al efecto ácido ni a los bloqueadores propuestos. De un total de n=18 sellos provenientes de 3 placentas independientes sometidas a la acidificación del medio, solo un n=7 sellos provenientes de 2 placentas independientes mostraron las características de un canal bloqueado por la acidificación del medio intracelular, como se muestra en Gráfico 8.

9.6 Efecto acidificación del medio: Activación

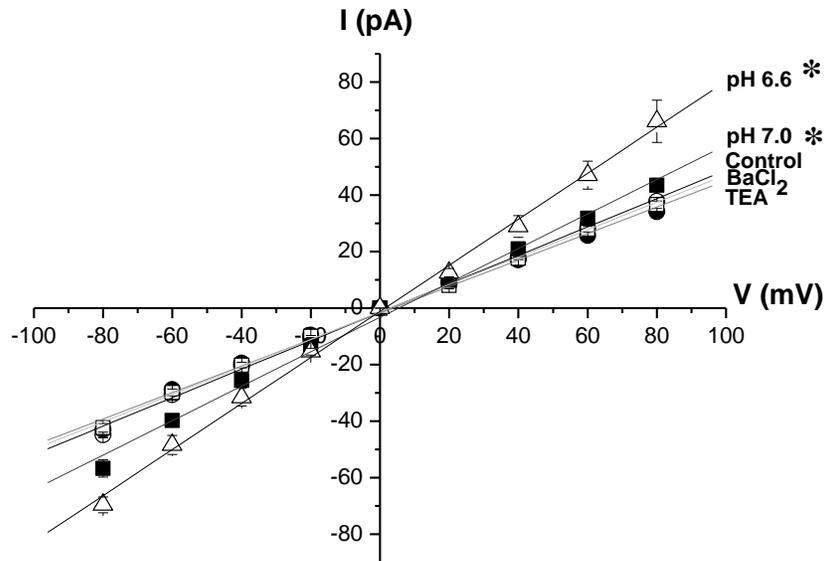


Gráfico 9. Relación corriente-potencial (I/V) para el bloqueo aditivo con BaCl₂ y TEA y activación a pH ácido de una corriente de K⁺ inicial. Gráfico representativo (n=1) del efecto de la acidificación del medio: activación. Círculos blancos= recta de situación inicial a pH 7,4; círculos negros= recta de la adición de 5mM BaCl₂; cuadrados blancos= recta 5mM TEA+5mM BaCl₂; cuadrados negros= recta del efecto de la acidificación del medio a pH 7,0 sobre las dos condiciones propuestas inicialmente; triángulos blancos= recta que representa el efecto de la acidificación a pH 6,6, sobre la acidificación anterior y los bloqueadores adicionados inicialmente, en el mismo experimento. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa entre condición y la situación control (p<0,05).

El Gráfico 9 muestra la conducta electrofisiológica de una corriente de K⁺ inicial a ± 80 mV (solución de registro inicial Solución 1 pH7,4) frente al efecto aditivo del bloqueo con BaCl₂ y posterior bloqueo aditivo BaCl₂+TEA (7,5% promedio de bloqueo total) y la acidificación del medio a dos pH consecutivos (Solución 1 pH 7,0 y luego Solución 2 pH 6,6). Mientras el pH se va haciendo más ácido (pH 6,6) el canal se hace más activo (aumenta en 63,1% de la corriente inicial con pH 6,6 v/s 26,5% con pH 7,0). Además muestra una pequeña rectificación de la corriente de salida, de ahí los grandes valores de DS hacia valores positivos. Este experimento muestra la presencia de una corriente de potasio insensible tanto al efecto Bario como al efecto TEA y que es activable con la

acidificación del medio. De un total de $n=18$ sellos provenientes de 3 placentas distintas que fueron expuestos a la acidificación del medio, $n=5$ sellos provenientes de 3 placentas independientes mostraron las características de un canal activable a pH ácido, tal como se muestra en Gráfico 9.

En los gráficos 10 y 11 se muestran las diferencias en la activación por la acidificación del medio a diferentes pHs de una corriente de K^+ inicial en Solución 1 pH 7,4 a ± 80 mV.

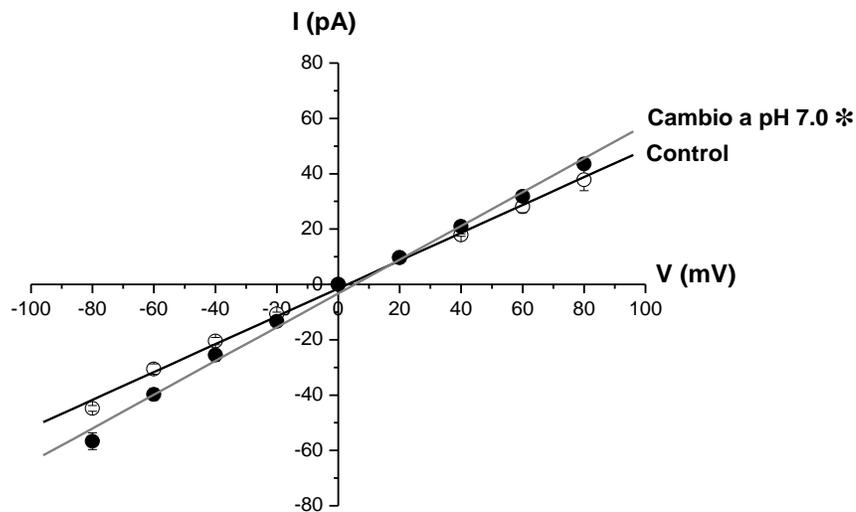


Gráfico 10. Relación corriente-potencial (I/V) del efecto a pH 7,0 de una corriente de K^+ inicial a pH 7,4. Gráfico representativo ($n=1$) de la acidificación del medio a pH 7,0. Círculos blancos= recta de situación control a pH 7,4; círculos negros= recta del efecto de la acidificación del medio a pH 7,0. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones ($p<0,05$).

El cambio de la situación control (Solución 1 pH 7,4) a Solución 1 pH 7,0 muestra una pequeña activación de la corriente en un 26,5%. Activación que, por lo demás, es estadísticamente significativa ($p<0,05$).

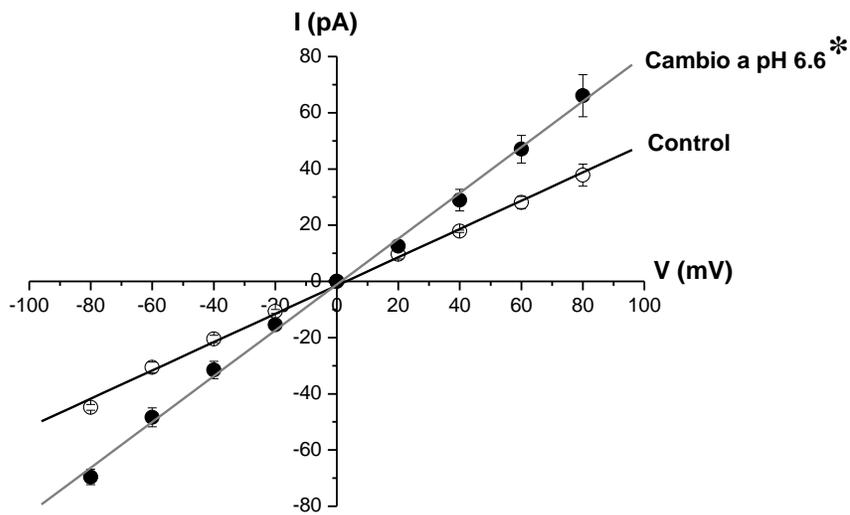


Gráfico 11. Relación corriente-potencial (I/V) del efecto a pH 6,6 de una corriente de K^+ inicial a pH 7,4. Gráfico representativo (n=1) de la acidificación del medio a pH 6,6. Círculos blancos= recta de la situación inicial a pH 7,4; círculos negros= recta del efecto de la acidificación del medio a pH 6,6. (*) Denota diferencia estadísticamente significativa entre ambas condiciones ($p < 0,05$).

El cambio desde la situación control (Solución 1 pH 7,4) a Solución 2 pH 6,6, muestra una gran activación de la corriente registrada inicialmente en un 63,1%; esta activación es estadísticamente significativa respecto de la situación control.

Estos dos últimos gráficos evidencian que para el tipo de corriente de K^+ registrada, mientras más ácido es el pH de la solución, la activación es mayor.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se identificó, por primera vez, la expresión estructural de cinco tipos de canales de K^+ en las tres fracciones de membranas purificadas de hSTB normal. Adicionalmente, se identificó funcionalmente cuatro de estos canales en la membrana LMVM de hSTB.

Para la realización de los experimentos de esta memoria de título fue necesaria la obtención de membranas de hSTB altamente purificadas. La determinación enzimática de la actividad de Fosfatasa Alcalina Placentaria (PLAP) es un buen indicador del enriquecimiento de cada una de las fracciones obtenidas, ya que es marcador de membrana apical. Adicionalmente, se detectó este mismo marcador en cortes de tejido placentario. Ambas determinaciones mostraron una fuerte expresión de PLAP en membrana apical, lo que indica que en este estudio, al igual que en el estudio de Jiménez *et al.* (2004), se fue capaz de aislar las tres fracciones de membranas altamente purificadas, con las cuales se pudo realizar con seguridad los experimentos propuestos.

Tal como se mencionó en la Revisión Bibliográfica, en el tejido placentario, al igual que en otros epitelios, se ha reportado la expresión de canales de K^+ en células de citotrofoblasto, como TASK-1 y TREK-1 (Bai *et al.*, 2006; Wareing *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha reportado la existencia de mRNA de $K_v2.1$ (Williams *et al.*, 2008) y la presencia funcional de K_{Ca} (Bai *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008) y K_{IR} (Clarson *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2008) en el mismo tejido sincicial.

Pero ninguno de estos trabajos ha dado cuenta de la distribución y función de estos canales en cada una de las membranas de sinciotrofoblasto y, es por esto que, estas interrogantes se plantearon como objetivos de esta Memoria de Título.

En este contexto nuestro estudio logró identificar, por primera vez, la expresión de $K_{IR2.1}$, $K_v2.1$, TASK-1, TREK-1 y BK_{Ca} en las membranas purificadas de hSTB normal a término (LMVM, MVM y BM). Estos resultados inéditos demuestran que cuatro de estos canales se

encuentran concentrados en las membranas apicales en comparación con su baja expresión en membrana basal ($K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1). En contraste, BK_{Ca} mostró una mayor expresión en membrana basal que en las membranas apicales.

Estos resultados son importantes para completar el modelo de transporte transplacentario, ya que es la primera evidencia que demuestra la expresión diferencial de distintos tipos de canales de K^+ en las membranas purificadas de hSTB.

Dado que los canales $K_{IR}2.1$, $K_V2.1$, TASK-1 y TREK-1 tienen una mayor expresión tanto en LMVM como en MVM, es que los estudios funcionales se realizaron buscando estos canales en membrana apical. Las conductancias de K^+ han sido obtenidas más frecuentemente en LMVM y es por este motivo que los estudios funcionales se centraron en este subdominio de membrana apical. Trabajos futuros debiesen ser conducidos de manera de identificar, funcionalmente, estos canales en el otro subdominio de membrana apical, en MVM.

Previamente, Díaz *et al.* (2008) demostraron conductancias de K^+ en LMVM de hSTB normal. Este trabajo previo mostró, de manera general, una población de corrientes de K^+ bloqueadas por bario y otra población que adicionalmente era bloqueada por TEA, ambos bloqueadores de distintos tipos de canales de K^+ .

En el presente estudio y con los antecedentes presentados, se logró identificar funcionalmente que tipos de canales de K^+ son los responsables, al menos en parte, de las corrientes descritas por Díaz *et al.* (2008).

Funcionalidad del Canal de Potasio Rectificador de Entrada $K_{IR2.1}$

Esta Memoria de Título identificó una corriente de potasio que mostraba una gran sensibilidad a $BaCl_2$ pues, como se muestra en Resultados, las corrientes de potasio fueron bloqueadas en un promedio de 69,8% con la adición de 5mM $BaCl_2$ al medio. Estos datos se condicen con lo reportado por Spencer (1999) y Clarson *et al.* (2000) quienes identificaron al Bario como un potente bloqueador de las corrientes rectificadoras de entrada de $K_{IR2.1}$. Este primer hallazgo electrofisiológico sugiere la presencia de $K_{IR2.1}$ en LMVM de hSTB, por su característica de ser una corriente altamente sensible a $BaCl_2$.

Experimentos adicionales demostraron que el bloqueo producido por $BaCl_2$ es reversible. Este resultado es similar a los estudios de Spencer (1999) y Clarson *et al.* (2000) que también demuestran que las corrientes rectificadoras de entrada son bloqueadas por $BaCl_2$ de manera reversible. Se sugiere que, debido a que la reversibilidad al bloqueo no es en un 100%, no es posible desprender la totalidad de los iones bario unidos al sitio responsable del bloqueo en el poro del canal. Spencer (1999) sugiere que el sitio primario de bloqueo para el Bario es a nivel intracelular.

Adicionalmente, se probó Magnesio ($MgCl_2$) y Cesio ($CsCl_2$), utilizados por muchos estudios (por ejemplo en el estudio de Spencer, 1999 y Clarson *et al.*, 2000), como bloqueadores de estas posibles corrientes $K_{IR2.1}$ en la LMVM del hSTB. Ambos bloqueadores consiguieron una disminución de las corrientes totales (29% para $MgCl_2$ y 25% para $CsCl_2$). Además, se evidenció que no existe efecto aditivo del $BaCl_2$ sobre el $MgCl_2$, sugeriendo que ambos bloqueadores inhiben a la misma población de canales, tal como indica Clarson *et al.* (2000). Que el bloqueo producido por $MgCl_2$ y $CsCl_2$ sea cercano al 25% no es trivial, debido a que demostraría que ambos bloqueadores estarían actuando sobre la misma población de canales $K_{IR2.1}$.

En resumen, esta investigación demostró la presencia funcional de corrientes con todas las características farmacológicas de canales $K_{IR2.1}$, sin embargo, las corrientes encontradas con estas características funcionales nunca mostraron una fuerte rectificación de entrada

como se menciona en la bibliografía acerca de este canal. Una posible explicación a esta situación la indica Clarson *et al.* (2004) que menciona que si las corrientes que predominan en el sinciciotrofoblasto no expresan corrientes de K^+ rectificadoras de entrada, pueden ser atribuidas a Corrientes Catiónicas No Selectivas (NSCC por su sigla en inglés) o a iones Cl^- . Sin embargo, las corrientes de cloruro en estos experimentos pueden ser descartadas debido a que en todas las soluciones utilizadas se reemplazó el cloruro por gluconato, para poder inhibir las corrientes de cloruro y tampoco serían NSCC, como se comentó anteriormente, puesto que responden a bloqueadores específicos.

Otra posible explicación a esta situación es el hecho de que los sellos registrados son una mezcla de distintos tipos de canales de K^+ por lo que se hace difícil ver la cinética individual de cada canal. También puede ser que al reconstituir las membranas en liposomas gigantes se pierdan elementos citosólicos responsables de dicha rectificación.

Funcionalidad del Canal de Potasio Dependiente de Voltaje $K_V2.1$

En este estudio se evidenció que bloqueos farmacológicos dirigidos a la identificación de estas corrientes (canales $K_V2.1$ son potentemente bloqueadas por TEA) mostraron que, a diferencia de lo reportado en otros tejidos para este canal, a concentraciones de 0,55 mM ya se tiene aproximadamente el 60,4% de la corriente bloqueada y se llegó a un plató de 5 mM con un 82,3% de la corriente bloqueada. Estas corrientes fuertemente bloqueables por TEA demuestran la presencia de un canal $K_V2.1$ en LMVM de hSTB que muestra una sensibilidad distinta a TEA que la reportada tradicionalmente para este canal en otros epitelios (Spencer, 1999). Estudios posteriores, en esta misma membrana, debiesen evaluar el rol potencial que estos canales juegan dentro del sinciciotrofoblasto y poder esclarecer el porqué de las diferencias en su respuesta farmacológica.

Los datos anteriormente mencionados demuestran la presencia funcional y estructural de $K_V2.1$ en LMVM de sinciciotrofoblasto placentario humano normal.

Funcionalidad del Canal de Potasio de Doble Poro TASK-1

La expresión de TASK-1 en LMVM sugirió caracterizarlo electrofisiológicamente mediante el siguiente **protocolo**: toda corriente insensible a Bario y TEA, dos bloqueadores típicos de canales de potasio, podría ser proveniente de un canal de doble poro (TASK-1 o TREK-1); esto debido a que, como menciona Lesage y Lazdunski (2000), estos canales son insensibles a ambos bloqueadores, pero muestran sensibilidad diferencial a pH ácido.

Una vez identificadas en los registros estas corrientes, se vio el efecto que tenía la acidificación del medio sobre estas corrientes insensibles a Bario y TEA. A pH 6,1 las corrientes TASK-1 son bloqueadas, en cambio las corrientes TREK-1 son activadas (Lesage and Lazdunski, 2000). Estos autores mencionan, además, que el bloqueo a pH ácido de estas corrientes, en sistemas donde sobreexpresan el canal, es muy fuerte. En nuestros experimentos el bloqueo máximo fue aproximado a un 30% al adicionar pH ácido (bajo pH 7,4). Posiblemente no fue total porque, como se explicó anteriormente, las corrientes de los sellos pueden tener una mezcla de muchos canales de K⁺ distintos.

Experimentos desarrollados por Bai *et al.* (2004) muestran una señal coloreada de TASK-1 demarcando el sinciotrofoblasto, con el mismo anticuerpo y a las mismas concentraciones que en este estudio. La señal obtenida en esta memoria de título es mucho más débil e inespecífica que la obtenida por Bai *et al.* (2004), seguramente debido a diferencias en el procesamiento de las muestras durante la Inmunohistoquímica (IHQ). Esto se argumenta puesto que, experimentos no presentados en esta memoria de título y realizados con recuperación antigénica, mostraron una señal moderada demarcando sinciotrofoblasto.

Funcionalidad del Canal de Potasio de Doble Poro TREK-1

De manera similar a lo mencionado para TASK-1, la identificación electrofisiológica de conductancias de K^+ que son insensibles tanto a $BaCl_2$ como a TEA, puede demostrar la presencia de canales de doble poro dentro del hSTB de placentas humanas normales y, como se destacó para canal TASK-1, estas corrientes también pueden ser debidas al canal TREK-1.

A diferencia de TASK-1, TREK-1 muestra una marcada activación en medios ácidos (Lesage and Lazdunski, 2000). Así, se probó el efecto de la acidificación a dos pH distintos dentro de una corriente conductora de canales K^+ que mostró insensibilidad tanto a Bario como a TEA.

Cuando a un registro que tenía todas las características de ser un canal de doble poro se le cambió la solución inicial a una con pH 7,0, las corrientes de K^+ se activaron en un 26,5%. Sin embargo, al acidificar aún más el medio a la misma corriente anterior, a pH 6,6, el aumento de la corriente llegó hasta un 63,1%, condición similar a la situación reportada por Lesage y Lazdunski (2000). Adicionalmente a la activación proporcionada por la acidificación del medio, también las corrientes mostraron una leve rectificación de salida, condición también propuesta por la revisión de Lesage y Lazdunski (2000) para el canal TREK-1, en donde observaron que la activación de este canal con pH ácido muestra rectificación de la corriente de salida.

Bai *et al.* (2005) trabajó con TREK-1 en células de citotrofoblasto (precursor de sinciotrofoblasto) y en vellosidades placentarias de término. Su análisis fue tomado como modelo respecto del anticuerpo y las diluciones utilizadas. En los experimentos obtenidos por IHQ en este estudio, se observa que el canal TREK-1 muestra una marcada señal cerca de los núcleos del sinciotrofoblasto. Esto concuerda con lo reportado por Bai *et al.* (2005), donde muestran cortes de tejido placentario que presenta una señal muy similar a la obtenida en esta memoria de título. Ellos sugieren que esta ubicación nuclear o perinuclear de TREK-1, pudiese estar relacionada directamente con la función que el canal juega dentro

del hSTB, es decir, ellos sugieren un rol en la regulación de la apoptosis y proliferación del hSTB. Adicionalmente, la inmunotinción obtenida en el presente estudio, muestra también su presencia en membrana apical del sinciciotrofoblasto, que podría tener asociada otra función fisiológica.

Toda esta evidencia, tanto funcional como estructural, demuestra la presencia del canal TREK-1 dentro de la LMVM del hSTB.

Los estudios de *Immunoblotting* realizados para el canal **BK_{Ca}**, propuesto de manera inicial en esta memoria de título como responsable de las corrientes de potasio en LMVM, mostraron su marcada expresión en BM del hSTB. Por tal motivo, en trabajos posteriores se deberán realizar los estudios funcionales correspondientes en membrana basal, ámbito no considerado en los objetivos de esta memoria de título.

En resumen, en los estudios de expresión, realizados mediante Western blot, se obtuvo que el canal K_{IR}2.1 se encuentra mayormente expresado en LMVM, mientras que la expresión de K_V2.1, TASK-1 y TREK-1 está mayoritariamente expresada en MVM. Caso opuesto para el canal BK_{Ca} que se encuentra fuertemente expresado en BM.

Finalmente, la conductancia promedio más frecuentemente encontrada en los sellos registrados fue de 53,1pS. Este dato es similar a lo reportado por Díaz *et al.* (2008), donde reportaron una conductancia cercana a 73pS. Ambos valores se correlaciona con lo reportado para el canal TREK-1 (Lesage y Lazdunski, 2000) que tiene una conductancia unitaria reportada de 45pS. Adicionalmente los estudios de Western blot, Inmunohistoquímica y Electrofisiología revelaron su presencia en LMVM. Con estos datos, se obtuvieron antecedentes inéditos de que TREK-1 se encuentra en la membrana apical liviana de hSTB y podría ser el mayor responsable de las corrientes detectadas en los sellos, como corrientes *background*.

Estudios venideros debiesen seguir ampliando la caracterización de los canales de K⁺ en las distintas membranas de hSTB de placentas humanas normales que estarían involucrados en

las corrientes de K^+ . Esta caracterización funcional es muy importante debido a que los canales de K^+ son los canales iónicos más ubicuos y con mayor cantidad de miembros en el organismo.

Algunos autores sugieren que el rol de los canales de K^+ en las vellosidades placentarias, además de la función común en todas las células del organismo, como la mantención del potencial de membrana y regulación del volumen celular (Birdsey *et al.*, 1999), tiene que ver con la fusión de las células citotrofoblásticas para formar un sincicio multinucleado (Clarson *et al.*, 2000; Bai *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008) así como también en la actividad vascular fetoplacentaria (Wareing *et al.*, 2006).

Comentario final y Sugerencias. Es necesario potenciar estudios en el futuro de manera de poder comparar las corrientes de K^+ en gestaciones normales con patologías gestacionales y poder determinar si diferencias en la expresión o funcionalidad de algún tipo particular de canal de potasio es responsable o es una consecuencia de la patología estudiada. Por ejemplo, existe una importante relación entre la vascularización vellosa y el crecimiento embrio/fetal, la cual se hace evidente en la asociación de desórdenes de la gestación que involucran un crecimiento fetal pobre (por ejemplo, en la restricción de crecimiento intrauterino y la preeclampsia) y el deterioro de la vascularización placentaria fetal (Gude *et al.*, 2004). Ambas condiciones están asociadas con una proliferación y apoptosis del citotrofoblasto alterada que reduce el volumen del sinciotrofoblasto comparado con gestaciones normales. En este mecanismo podrían estar involucrados canales de K^+ sugeridos como responsables de la correcta fusión y apoptosis del sinciotrofoblasto (Clarson *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2008).

CONCLUSIÓN

Las distintas características de las corrientes de Potasio encontradas mediante Electrofisiología junto a los análisis por Immunoblotting e Inmunohistoquímica, indicarían que los Canales de Potasio involucrados en dichas corrientes de K^+ podrían ser:

- Canales de K^+ Rectificadores de Entrada, canal $K_{IR}2.1$, sería quien subyace las corrientes de Potasio sensibles a $BaCl_2$. Adicionalmente, se sugiere que este canal también es sensible a $MgCl_2$ y $CsCl_2$.
- Canales de K^+ Dependientes de Voltaje, canal $K_V2.1$, sería el candidato a dar cuenta de las corrientes de potasio sensibles a TEA.
- Canales de K^+ de Doble Poro, canal TASK-1, sería el candidato a dar cuenta de las corrientes de potasio insensibles a TEA y Bario y que son bloqueadas a pH ácido.
- Canales de K^+ Doble Poro, canal TREK-1, podrían ser responsables de las corrientes de potasio insensibles a ambos bloqueadores y que muestran una fuerte activación a pH ácido.

El canal inicialmente planteado, BK_{Ca} , perteneciente a la familia de Canales de K^+ Activados por Calcio, se sugiere que adquiere un rol importantísimo en la BM del hSTB, debido a su casi inexistente expresión en ambas membranas apicales.

BIBLIOGRAFÍA

- **BAI, X.; GREENWOOD, S.; GLAZIER, J.; BAKER, P.; SIBLEY, C.; TAGGART, M.; FYFE, G.** 2005. Localization of TASK and TREK, Two-Pore Domain K⁺ Channels, in Human Cytotrophoblast Cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12: 77-83.
- **BAI, X.; LACEY, H.; GREENWOOD, S.; BAKER, P.; TURNER, M.; SIBLEY, C.; FYFE, G.** 2006. TASK Channel Expression in Human Placenta and Cytotrophoblast Cells. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13: 30-39.
- **BIRDSEY, T.; BOYD, R.; SIBLEY, C.; GREENWOOD, S.** 1999. Effect of hiposmotic challenge on microvillous membrane potential in isolated human placental villi. *Am. J. Physiol.* 276: R1479-R1488.
- **CLARSON, L.; GREENWOOD, S.; MYLONA, P.; SIBLEY, C.** 2001. Inwardly Rectifying K⁺ Current and Differentiation of Human Placental Cytotrophoblast Cells in Culture. *Placenta.* 22: 328-336.
- **DÍAZ, P.; VALLEJOS, C.; GUERRERO, I.; RIQUELME, G.** 2008. Barium, Tea and Sodium Sensitive Potassium Channels are Present in the Human Placental Syncytiotrophoblast Apical Membrane. *Placenta.* 29: 883-891.
- **DUPRAT, F.; LESAGE, F.; FINK, M.; REYES, R.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M.** 1997. TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *The EMBO Journal.* 16: 5464-5471.
- **GODOY, V.; RIQUELME, G.** 2008. Distinct Lipid Rafts Subdomains from Human Placental Apical Syncytiotrophoblast Membranes. *J. Membrane Biol.* 224: 21-31.

- **GRUSS, M.; MATHIE, A.; LIEB, W.; FRANKS, N.** 2004. The TWO-PORE-DOMAIN K⁺ Channels TREK-1 and TASK-3 Are Differentially Modulated by Cooper and Zinc. *Mol. Pharmacol.* 66:530-537.
- **GUDE, N.; ROBERTS, C.; KALIONS, B.; KING, R.** 2004. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.* 114: 397-407.
- **HAMILL, O.; MARTY, A.; NEHER, E.; SAKMANN, B.; SIGWORTH, F.** 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.
- **HAN, J.; TRUPELL, J.; GNATENCO, C.; KIM, D.** 2002. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. *J. Physiol.* 542: 431-444.
- **ILLSLEY, N.; WANG, Z.; GRAY, A.; SELLERS, M.; JACOBS, M.** 1990. Simultaneous preparation of paired, syncytial microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 1029:218-26.
- **JIMENEZ, V.; HENRÍQUEZ, M.; LLANOS, P.; RIQUELME, G.** 2004. Isolation and Purification of Human Placental Plasma Membranes from Normal and Pre-eclamptic Pregnancies. A Comparative Study. *Placenta.* 25: 422-437.
- **KOESTER, J.; SIEGELBAUM, S.** 1997. Canales Iónicos. **In:** Kandel, E.; Jessel, T.; Schwartz, J. *Neurociencia y Conducta.* Ed. Prentice Hall. España. pp: 122-141.
- **LEONOUDAKIS, D.; GRAY, A.; WINEGAR, B.; KINDLER, C.; HARADA, M.; TAYLOR, D.; CHAVEZ, R.; FORSAYETH, J.; SPENCER YOST, C.** 1998. An Open Rectifier Potassium Channel with Two Pore Domains in Tandem Cloned from Rat Cerebellum. *J. Neurosci.* 18: 868-877.

- **LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M.** 2000. Molecular and functional properties of two-pore domain potassium channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279: F793-F801.
- **MILLER, C.** 2000. An Overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* 1: 1-5.
- **MORTON, M.; CHIPPERFIELD, S.; ABOHANED, A.; SIVAPRASADARAO, A.; HUNTER, M.** 2005. Na⁺-induced inward rectification in the two-pore domain K⁺ channel, TASK-2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288: F162-F169.
- **MYLONA, P.; CLARSON, L.; GREENWOOD, S.; SIBLEY, C.** 1998. Expression of the K_{ir}2.1 (Inwardly Rectifying Potassium Channel) gene in the human placenta and in cultured cytotrophoblast cells at different stages of differentiation. *Mol. Hum. Reprod.* 4: 195-200.
- **NIMIGEAN, C.; MILLER, C.** 2002. Na⁺ Blok and Permeation in a K⁺ Channel of Known Structure. *J. Gen. Physiol.* 120: 323-335.
- **PATEL, A.; LAZDUNSKI, M.** 2004. The 2P-domain K⁺ channels: role in apoptosis and tumorigenesis. *Eur J. Physiol.* 448: 561-273.
- **RIQUELME, G.; LÓPEZ, E.; GARCIA-SEGURA, L.; FERRAGUT, J.; GONZÁLEZ-ROS, J.** 1990. Giant Liposomes: A Model System in Which To Obtain Patch-Clamp Recordings of Ionic Channels. *Biochemistry.* 29:11215-11222.
- **RIQUELME, G.** 2008. Apuntes Docentes de Membranas Biológicas, curso Biofísica y Fisiología. Organización Molecular de las Membranas Biológicas. Parte A. Santiago, Chile. pp: 2-17.

- **RIQUELME, G.** 2008. Apuntes Docentes de Membranas Biológicas, curso Biofísica y Fisiología. Transporte a través de Membranas. Parte B. Santiago, Chile. pp: 18-34.

- **RIQUELME, G.** 2009. Placental Chloride Channels: A Review. *Placenta*. 30: 65-669.

- **SADLER, T.W.** 2001. Capítulo 7: Membranas Fetales y Placenta. **In:** Sadler, T.W. Langman, Embriología Médica con Orientación Clínica. 8va Edición. Editorial Médica Panamericana. pp: 132-153.

- **SHIEH, C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.; GOPALAKRISHNAN, M.** 2000. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. *Pharmacol. Rev.* 52: 557-593.

- **SMITH, P.; KROHN, R.; HERMANSON, G.; MALLIA, A.; GARTNER, F.; PROVENZANO, M.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85 (published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15; 163: 279).

- **SPENCER YOST, C.** 1999. Potassium Channels. Basic Aspects, Functional Roles, and Medical Significance. *Anesthesiology*. 90: 1186-1203.

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

- **TIETZ, N.** 1976. *Fundamental of Clinical Chemistry*. Philadelphia: Saunders C.O.

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

- **WIECHELMAN, K.; BRAUN, R.; FITZPATRICK, J.** 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 175: 231-237.

- **WILLIAMS, J.; FYFE, G.; SIBLEY, C.; BAKER, P.; GREENWOOD, S.** 2008. K^+ channel inhibition modulates the biochemical and morphological differentiation of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295: R1204-R1213.