AA8992-1

Universidad Católica Andrés Bello
Facultad de Humanidades y Educación
Escuela de Educación
Mención: Biología y Química

# *EFECTO DE LA HIPOXIA EN EXPLANTOS PLACENTARIOS HUMANOS A TÉRMINO SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K Y NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANA DE MICROVELLOSIDAD (LADO MATERNO) Y MEMBRANA BASAL (LADO FETAL) DE SINCITIOTROFOBLASTO.*

Trabajo de grado para optar al título de Licenciada en Educación Mención Biología y Química en la Universidad Católica Andrés Bello.

Autor (a): Hemely N. Varela Aponte
Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio
Co-Tutor: Dr. Reinaldo Marín

Caracas, Septiembre de 2007

# ÍNDICE GENERAL


| | | Página |
|---|---|---|
| LISTA DE TABLAS | | ix |
| LISTA DE FIGURAS | | x |
| RESUMEN | | xii |
| INTRODUCCIÓN | | 1 |
| CAPÍTULO I | | 2 |
| | Planteamiento del problema | 2 |
| | Justificación | 3 |
| | Objetivo General | 6 |
| | Objetivos Específicos | 6 |
| CAPÍTULO II | | 7 |
| | Marco Teórico | 7 |
| CAPÍTULO III | | 19 |
| | Metodología | 19 |
| 1 | Placentas Humanas | 19 |
| 2 | Preparación de Explantos | 19 |
| 3 | Homogenizados de Placenta Humana | 20 |
| 4 | Preparación de Membranas Plasmáticas de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana | 20 |
| 5 | Aislamiento de Membranas Plasmáticas de Microvellosidad (MVM) de placenta huma | 21 |
| 6 | Aislamiento de Membranas Plasmáticas Basales (MB) de placenta humana | 21 |
| 7 | Preincubación de membranas con SDS | 23 |
| 8 | Determinación de Proteínas | 23 |
| 9 | Actividad ATPásica de Na,K | 24 |
| 10 | Determinación de niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 25 |
| 11 | Análisis Estadístico | 26 |
| CAPÍTULO IV | | 27 |
| | Resultados | 27 |

1 Evaluación de la integridad de los explantos de placenta humano a término, mediante microscopía óptica..... 29

2 Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término..... 29

3 Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia..... 31

4 Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia..... 35

5 Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término..... 35

6 Efecto de la hipoxia sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término..... 37

7 Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia..... 40

8 Efecto del sulfato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia..... 46

CAPÍTULO V..... 49

Discusión..... 49

Conclusiones..... 57

BIBLIOGRAFÍA..... 58

# LISTA DE TABLAS


| TABLA | | Página |
|---|---|---|
| I | Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de células de placenta humana a término | 33 |
| II | Actividad ATPásica de Na,K, de homogenizado de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia | 34 |
| III | Actividad ATPásica de Na,K y factor de enriquecimiento aparente de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de normoxia | 36 |

# LISTA DE FIGURAS

**FIGURA** **Página**

1. Representación esquemática de la distribución de los principales mecanismos de transporte iónico en el sincitiotrofoblasto..... 12

2. Preparación y separación de membranas plasmáticas de microvellosidades y de membranas plasmáticas basales de sincitiotrofoblasto de placenta humana..... 22

3. Fotografías de cortes histológicos de Vellosidades Coriónicas provenientes de placenta humana a término coloreados con hematoxilina/eosina..... 30

4. Actividades ATPásicas de Na,K en homogenizado de placenta humana, en función de distintas cantidades de SDS durante la preincubación..... 32

5. Actividad ATPásica de Na,K de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia..... 38

6. Actividad ATPásica de Na,K de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia..... 39

7. Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de basales (MB) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia..... 41

8. Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18

horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia..... 42

9. Actividad ATPásica de Na,K de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de basales (MB) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM..... 44

10. Actividad ATPásica de Na,K de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de microvellosidad (MVM) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM..... 45

11. Niveles de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS)de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM..... 47

12. Niveles de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS)de las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) en explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM..... 48

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN.

***EFECTO DE LA HIPOXIA EN EXPLANTOS PLACENTARIOS HUMANOS A TÉRMINO SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K Y NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANA DE MICROVELLOSIDAD (LADO MATERNO) Y MEMBRANA BASAL (LADO FETAL) DE SINCITIOTROFOBLASTO.***

**Autora**: Hemely. N. Varela Aponte.
**Tutor**: Dr. Fulgencio Proverbio
**Co-Tutor**: Dr. Reinaldo Marín.

**Caracas, 2007**

## Resumen

La preeclampsia es una patología exclusiva del embarazo humano, existiendo únicamente en *Homo sapiens*. Esta enfermedad constituye la mayor causa de morbilidad y mortalidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial, y es una causa importante de prematuridad y de mortalidad neonatal. La preeclampsia se ha definido como una enfermedad multisistémica. El diagnóstico de esta enfermedad se fundamenta en la aparición concomitante de hipertensión arterial sistémica, edema y proteinuria en embarazadas con más de 20 semanas de gestación.

En el presente trabajo, se determinó el efecto de la hipoxia placentaria sobre la actividad ATPásica de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica en membrana de microvellosidad (lado materno) y membrana basal (lado fetal) de sincitiotrofoblasto.

Se encontró una disminución de la actividad de la ATPasa de Na,K, tanto en membrana basal como en microvellosidad y un aumento de la peroxidación lipídica de las mismas con la hipoxia placentaria.

En conclusión, se demostró que la hipoxia placentaria conduce a una elevación de los niveles de peroxidación lipídica, lo cual conduce a una disminución de la actividad de la ATPasa de Na,K, tanto de las membranas basales como de la microvellosidad del sinciciotrofoblasto.

**Descriptores:** preeclampsia, ATPasa de Na,K, hipoxia, sincitiotrofoblasto, peroxidación lipídica.

# INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo, hemos estudiado el efecto de la hipoxia en células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, sobre la actividad ATPásica de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica, tanto a nivel de las membranas de las microvellosidades (cara materna), como de las membranas basales (cara fetal). En este sentido, se evaluó la sensibilidad de estas membranas a los procesos de peroxidación lipídica que se producen por la hipoxia, y su influencia sobre el transporte de $Na^+$ y $K^+$ mediado por la ATPasa de Na,K, a través del sincitiotrofoblasto. Así mismo, se evaluó el efecto del sulfato de magnesio sobre estos parámetros alterados por la hipoxia.

Se considera que la hipoperfusión placentaria es uno de los factores que desencadenan la preeclampsia, por lo que el modelo de hipoxia de muestras de tejido placentario, constituye una buena vía para indagar sobre los procesos celulares y moleculares que se dan en la preeclampsia. En este estudio, se aislaron fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) a partir de cultivos de explantos placentarios, incubados bajo condiciones de normoxia (explantos incubados con aproximadamente 10% de oxígeno), o de hipoxia, (explantos incubados con menos de 1% de oxígeno), en presencia y ausencia de sulfato de magnesio, y se determinó la actividad de la ATPasa de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica de las membranas.aisladas.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica exclusiva del embarazo del ser humano, que afecta entre el 7 y el 10% de las gestantes a nivel mundial. Se caracteriza por una elevación de la presión arterial, proteinuria y edema, todo lo cual aparece luego de 20 semanas de gestación. En el laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, se ha demostrado que la preeclampsia afecta la actividad de la ATPasa de $Ca^{2+}$, tanto a nivel de glóbulos rojos, como de miometrio y de membranas basales (lado fetal) de sincitriotrofoblasto de placenta humana a término. También se ha demostrado que la disminución de la actividad ATPásica es debida, fundamentalmente, a una elevación en los niveles de peroxidación lipídica de membrana plasmática de células de estos tejidos. Del mismo modo, se ha demostrado que tanto la actividad ATPásica de calcio como los niveles de peroxidación lipídica en membranas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas, se recuperan alcanzando valores similares a los observados en muestras provenientes de gestantes normotensas en el postparto y 24 horas después del tratamiento con sulfato de magnesio.

La elevación de la peroxidación lipídica pudiera afectar la actividad de otras proteínas de membrana, como por ejemplo la ATPasa de Na,K, la cual es una enzima de gran importancia biológica, ya que es responsable de la generación de los gradientes de $Na^+$ y de $K^+$ transmembrana, esenciales para la producción de potenciales de acción por las células excitables. El gradiente celular de sodio, es además utilizado para el funcionamiento de varios mecanismos de co- y contransporte celular. Una disminución en la actividad ATPásica de Na,K a nivel del tejido placentario, pudiera traer consecuencias perjudiciales para la nutrición del feto, ya que estaría alterando el transporte de $Na^+$ a través de las membranas de las células de la placenta, afectando así mecanismos de transporte secundarios que dependen del mismo, como el mecanismo de control del pH intracelular, de los niveles de calcio, y del transporte de aminoácidos y azúcares.

En el presente estudio, se simuló lo que ocurre durante la preeclampsia, por lo menos en lo que respecta a la hipoperfusión placentaria, por medio del cultivo de explantos de placenta humana a término de gestantes normotensas, durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de hipoxia, y se evaluó el efecto de la hipoxia sobre la actividad ATPásica de Na,K, y los niveles de peroxidación lipidíca del sincitiotrofoblasto, tanto a nivel de la membrana basal (MB), como de la membrana de la microvellosidad (MVM). Del mismo modo, se estudió el efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica de membranas de sincitiotrofoblastos de explantos de placenta humana, cultivados bajo condiciones de hipoxia.

## JUSTIFICACIÓN

La membrana plasmática de las células del sincitiotrofoblasto de placenta humana juega un papel determinante en la relación entre la madre y el feto (Redman, 1990), por lo que cualquier variación que se produzca en las propiedades de la membrana plasmática basal, de las microvellosidades, o de ambas membranas de sincitiotrofoblasto, puede traducirse en un mal funcionamiento celular y, con ello, en el desarrollo de anomalías y enfermedades, tanto por parte de la madre, como del feto.

Procesos de isquemia-reperfusión o de hipoxia sostenida en un tejido, se ha demostrado que conducen a un proceso de peroxidación lipídica en las células del mismo (Halliwell & Gutteridge, 1989), como consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres. Más aún, en el caso de una hipoxia placentaria, radicales libres y productos de peroxidación lipídica pueden pasar a la sangre y, a través de ella, ser transportados a todo el organismo, con lo que el daño puede llegar a generalizarse.

La peroxidación lipídica y productos derivados de la misma, pueden originar daños severos a proteínas y lípidos de las membranas (Halliwell & Gutteridge, 1989). De esta manera, el proceso puede afectar seriamente el funcionamiento de enzimas de membrana,

que dependan de su entorno lipídico, tales como la ATPasa de Ca y la ATPasa de Na,K, entre otras. Las inhibiciones de las actividades ATPásicas inducidas por el grado de peroxidación lipídica pudieran ser explicadas como consecuencias de diversos eventos, entre los cuales tenemos:

1. **Cambios en los fosfolípidos de membrana:** el daño causado por la peroxidación lipídica sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática, puede conducir a una disminución en la actividad de la ATPasa de Na,K, ya que los mismos son esenciales para el buen funcionamiento de la misma.

2. **Cambios en la fluidez de la membrana celular:** el daño a los fosfolípidos de membrana, con el deterioro de los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los mismos, tiende a reducir la fluidez de la membrana (Ohta, Mohri, & Ohyashiki, 1989; Ohyashiki, Ohtsuka, & Mohri, 1986; Rice-Evans et al., 1985). Cambios en la fluidez de la membrana se pueden traducir fácilmente en cambios en la actividad de proteínas integrales, como es el caso de la ATPasa de Na,K.

3. **Efecto inhibitorio de los lisofosfolípidos:** la ataque a fosfolípidos y a ácidos grasos de las membranas, puede dar origen a la formación de lisofosfolípidos, los cuales poseen un efecto detergente (Wolf, Saito, Dudek, & Bing, 1991). Esto pudiera conducir a un proceso de desintegración estructural de las membranas. Además, los lisofosfolípidos se han demostrado que inhiben *per se* a las actividades ATPásicas (Marín, Rodríguez, & Proverbio, 1992).

En el sincitiotrofoblasto de placenta, como en la gran mayoría de células eucarióticas, la ATPasa de Na,K es responsable por el mantenimiento de una baja concentración de sodio intracelular. Gracias a su actividad, las células son capaces de mantener un gradiente electroquímico para este ión, el cual es vital para una serie de funciones celulares, como captación de nutrientes, regulación del pH, propagación de señales nerviosas y regulación del volumen intracelular (Johansson et al., 2000; Maxwell et al., 1998; Rabini et al., 1996; Sibley et al., 2002). A diferencia de la mayoría de las células,

en las cuales la ATPasa de Na,K se distribuye de forma más o menos uniforme por toda la membrana plasmática, en las células epiteliales su distribución está polarizada, fundamentalmente hacia la membrana laterobasal. Esto es característico de epitelios de transporte clásicos, como lo son el riñón y los intestinos. Sin embargo, se ha demostrado que en el sincitiotrofoblasto de placenta humana, la ATPasa de Na,K se localiza tanto en las membranas basal (lado fetal), como en las membranas de las microvellosidades (lado materno), siendo su actividad mayor en la membrana plasmática de las microvellosidades (lado materno), que en la membrana plasmática basal (lado fetal). Por consiguiente, el sincitiotrofoblasto representa un epitelio de excepción en cuanto a la distribución de la ATPasa de Na,K, así como en el manejo transepitelial del transporte de $Na^+$ ( Mendoza, 2004).

Dado que nuestro modelo de hipoxia en explantos de placenta humana a término, representa una muy buena aproximación a la hipoperfusión placentaria que ocurre en las pacientes preeclámpticas y, basados en el hecho que la ATPasa de Na,K es una enzima sumamente importante para una gran cantidad de funciones vitales para la célula y para el transporte de nutrientes de la madre al feto, resulta muy interesante evaluar de que manera se afectan las membranas celulares de sincitiotrofoblasto, con respecto a su grado de peroxidación lipídica y la actividad ATPásica de Na,K, con nuestro modelo de hipoxia.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la hipoxia en explantos de placenta humana a término, sobre la actividad ATPásica de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica en membranas celulares, tanto de microvellosidad (lado materno), como del lado basal (lado fetal) del sincitiotrofoblasto.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incubar los explantos durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia (explantos incubados con aproximadamente entre 8-10% de oxígeno) y de hipoxia (explantos incubados con menos de 1% de oxígeno).

- Aislar membranas celulares de las microvellosidades (lado materno) y de la membrana basal (lado fetal) de sincitriotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de normoxia.

- Aislar membranas celulares de las microvellosidades (lado materno) y de la membrana basal (lado fetal) de sincitriotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de hipoxia.

- Determinar la actividad ATPásica de Na,K de membranas de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de normoxia o de hipoxia.

- Determinar los niveles de peroxidación lipídica de las membranas de sincitiotrofoblasto ya mencionadas, y correlacionarlos con las actividades ATPásicas, en cada caso.

# CAPÍTULO II

## MARCO TEÓRICO

La preeclampsia es una patología exclusiva del embarazo humano, existiendo únicamente en *Homo sapiens* (Garmendia & Feo-Figarella, 1996, Robillard, 2002, Robillard et al., 2003). Esta enfermedad constituye la mayor causa de morbilidad y mortalidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial (MacGillivray, 1958), y es una causa importante de prematuridad y de mortalidad neonatal (Sibai et al., 1995). La tasa de incidencia de la preeclampsia se encuentra entre el 2% y el 7% en mujeres nulíparas, pudiendo estas cifras aumentar hasta un 14%, cuando el embarazo es doble o hasta un 18%, si ya se ha padecido de preeclampsia (Sibai, 2003). Aproximadamente el 70 % de las mujeres diagnosticadas con hipertensión arterial inducida por el embarazo, desarrollan preeclampsia (Sibai, 2003). En el mundo entero, se reportan alrededor de 8.370.000 casos de preeclampsia por año (Villar et al., 2003), produciendo alrededor de 75.000 muertes maternas (Senior, 2001). En la maternidad "Concepción Palacios", en Caracas, la hipertensión inducida por el embarazo ocupa el segundo lugar dentro de las causas de muerte obstétrica (1939-1993), encontrándose que alrededor de un 7% de los embarazos se complican con preeclampsia (1988).

La preeclampsia se ha definido como una enfermedad multisistémica (Zeeman & Dekker, 1992). El diagnóstico de esta enfermedad se fundamenta en la aparición concomitante de hipertensión arterial sistémica, edema y proteinuria en embarazadas con más de 20 semanas de gestación (Roberts, 1984). La hipertensión arterial se define como un valor de 90 mm de Hg o mayor de presión diastólica, o niveles mayores de 140 mm de Hg de presión sistólica. Sin embargo, valores inferiores de presión arterial sugieren preeclampsia, si representan un incremento igual o mayor de 30 mm de Hg sistólicos y 15 mm de Hg diastólicos, con respecto a las cifras registradas en la primera mitad del embarazo (Cavanagh & Knuppel, 1992). La proteinuria, es definida como una excreción de proteínas superior a los 300 mg, en muestras de orina de 24 horas (Pritchard et al., 1990). El edema representa la acumulación excesiva de líquido en el tejido subcutáneo, que conlleva al aumento de volumen de los tegumentos y a la desaparición de los pliegues

cutáneos, siendo dicho edema, en la preeclampsia, más severo y difuso que el que acompaña con frecuencia el embarazo normal (Pritchard et al., 1990).

La preeclampsia se clasifica en tres estadios con respecto a su severidad, lo que representa probablemente la evolución progresiva de la enfermedad hacia formas más graves (Consensus, 1990). En su forma más benigna se denomina "leve", y se caracteriza por su evolución satisfactoria y su aparición más bien tardía en el embarazo, con una hipertensión arterial $\geq$ 140/90 mmHg, proteinuria $\geq$ 300 mg/24 horas y edema (Lipstein et al., 2003). La preeclampsia se considera severa, cuando se presenta una presión sanguínea $\geq$160/110 mm Hg y una proteinuria de al menos 5 g en orina de 24 horas (Lipstein et al., 2003, Sibai, 2003). Además, durante la preeclampsia severa pueden verse afectados varios órganos, por lo que puede desarrollarse: edema pulmonar, oliguria (menos de 400 ml de orina diaria) o síntomas persistentes de alteraciones del sistema nervioso central como dolores de cabeza, visión borrosa o ceguera, estado mental alterado (Sibai, 2003) y disminución del estado consciente, lo que pronostica convulsiones incipientes (Lipstein et al., 2003). Otras señales asociadas a la preeclampsia severa, son el retardo del crecimiento del feto y la elevación de la creatinina sérica (Lipstein et al., 2003). El síndrome HELLP (acrónimo que viene de Hemolysis, Elevated Liver enzymes and Low Platelets count), es una complicación severa, que también puede ser hallada en pacientes con preeclampsia severa (Sibai, 2003). Este síndrome consiste en hemólisis, elevación de las enzimas hepáticas y trombocitopenia (conteo de plaquetas menor a 100.000/mm$^3$). El aumento de enzimas hepáticas, está asociado a un dolor epigástrico persistente, o dolor de la parte superior derecha del abdomen (Sibai, 2003). Por último, la preeclampsia puede transformarse en eclampsia, al aparecer convulsiones y/o coma materno, con gran riesgo de muerte materna y fetal (Lindheimer & Katz, 1985).

A pesar de que se conoce la preeclampsia – eclampsia desde hace varios siglos, aún en la actualidad se desconoce cuál o cuáles son los factores que desencadenan los múltiples desórdenes que se desarrollan durante esta enfermedad. La etiología de la preeclampsia está todavía abierta a debate, y se cree que esta patología resulta de una combinación de factores genéticos, inmunológicos y ambientales, los cuales llevan a fallas en la invasión

trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Kharfi et al., 2003, Roberts & Cooper, 2001). La invasión trofoblástica anormal que se produce con la preeclampsia, impide el establecimiento del circuito de baja resistencia y alto flujo en el eje materno-fetal que se observa en el embarazo normal. La consecuencia fundamental de este hecho, radica en que las gestantes preeclámpticas presentan una hipoperfusión placentaria, lo cual conduce a procesos repetidos de isquemia-reperfusión.

Si bien, el evento primario de origen de la preeclampsia permanece desconocido, su fisiopatología es bien entendida, y se afirma que la disfunción endotelial juega un rol principal en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. Muchos de los síntomas clínicos de la preeclampsia como hipertensión, proteinuria y edema, se derivan de cambios dentro del endotelio vascular materno o involucran disfunción endotelial generalizada (Davison et al., 2004, Roberts, 1998). El endotelio es una monocapa de células planas poligonales que se extienden continuamente sobre la superficie luminal de la vasculatura, constituyendo una barrera biológica estratégicamente localizada entre la capa de músculo liso vascular y el torrente sanguíneo. Las funciones del endotelio son numerosas y variadas (Endemann & Schiffrin, 2004); participa en el control de la homeostasis primaria, defensa del huésped, transporte de nutrientes y otros solutos, en la activación/desactivación de varias hormonas vasoactivas y participa en la modulación del tono vascular, controlando la secreción de importantes factores que regulan la respuesta contráctil del músculo liso (Vanhoutte et al., 1986).

La placenta es un órgano endocrino complejo y es responsable en gran medida de la respuesta inmune materna hacia el embarazo. Parecen existir suficientes indicios que sugieren a la placenta como un órgano importante en la etiología de la preeclampsia (Ness & Roberts, 1996; Roberts & Redman, 1993). En primer lugar, la presencia de la placenta es requisito necesario y suficiente para la aparición de preeclampsia, de hecho, esta patología es frecuente en casos de mola hidatidiforme, en la que existe una degeneración hidrópica (vesicular) de la placenta, sin la presencia del feto (Page,1939). La descripción de la preeclampsia en embarazos abdominales, también sugiere que la distensión uterina o la

relación del binomio feto-placenta con el útero, no son requisitos para la aparición de la enfermedad (Piering et al., 1993).

La placenta es un órgano fundamental durante el embarazo, es provisional y está compuesta por tejidos embrionario y materno; es decir, por células que poseen genotipos diferentes. Tiene una apariencia de disco, con el cordón umbilical inserto en la parte central de una de sus caras. Está constituida por dos paredes discoideas, soldadas entre si por sus bordes y, el espacio interpuesto entre ambas placas, la laguna sanguínea, está ocupada por sangre, que proviene de la madre. La pared apoyada al miometrio, parte materna, se denomina placa decidual y, la relacionada con la cavidad amniótica, parte fetal, placa coriónica. La decidua, está compuesta por citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto y de ella emergen numerosas paredes perpendiculares, denominadas tabiques placentarios. A pesar de que no llegan a establecer contacto con la placa coriónica, estos tabiques dividen a la laguna sanguínea y por extensión, a la placenta, en varios compartimientos, los cuales se conocen con el nombre de cotiledones (Langman,1976).

La placenta humana juega un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes e inmunoglobulinas de la circulación materna a la fetal. La capa de células epiteliales del sincitiotrofoblasto representa la interfase entre las circulaciones materna y fetal, y es el sitio donde se ejecuta el intercambio y transporte de solutos entre la madre y el feto (Silver,Beaird, &Golbus, 1990).

Es bien conocido que en el embarazo se establecen dos zonas de contacto directo entre la madre y el feto: el sincitiotrofoblasto, bañado por sangre materna y, el citotrofoblasto extravelloso, dentro de la decidua. El endometrio modificado por la presencia del embrión, recibe el nombre de decidua. Las células trofoblásticas son heterogéneas, presentan fenotipos diversos y, se encuentran en circulación en el torrente sanguíneo materno desde la semana 18 de la gestación (Silver et al., 1990).

El sincitiotrofoblasto es un epitelio polarizado, con la membrana de las microvellosidades en su cara materna y con la membrana basal en su cara fetal. La placenta tiene la propiedad de ser una barrera de baja permeabilidad, por lo tanto, los nutrientes y substratos necesarios para el crecimiento fetal, incluyendo minerales, requieren de mecanismos de transporte, como el transporte activo (Jansson, Liben,Wennergren, & Powell,2002; Kamath & Smith,1994).

La membrana plasmática de las células del sincitiotrofoblasto de la placenta, juega un papel determinante en la relación entre la madre y el feto (Redman, 1990). Previamente, han sido reportadas modificaciones en las propiedades enzimáticas de estas membranas durante la preeclampsia, tales como reducción de la actividad de la ATPasa de Ca (Casart, 1995). También, se ha reportado que durante la preeclampsia, se produce un aumento en los niveles de productos de peroxidación lipídica circulante en el plasma sanguíneo (Redman, 1990), los cuales pudieran atacar los lípidos de las membranas plasmáticas de muy distintos tejidos, y ocasionar un amento de la peroxidación lipídica de las mismas.

El $Na^+$ es el principal catión extracelular. El gradiente electroquímico de $Na^+$ a través de las membranas celulares, provee el medio de mover, entre el citoplasma y el líquido intersticial, a un número de sustancias a través de co- o contratransportadores, es decir, de mecanismos que mueven sustancias que, o bien acompañan al $Na^+$, o bien son intercambiadas por el ión, en su incesante entrada a las células, gracias a la existencia de su gradiente, mantenido por el funcionamiento de la bomba de Na,K, que continuamente expulsa $Na^+$, en forma activa, desde el interior célular hacia el intersiticio (Aceves, 1977; Glynn, 1984; Kaplan, 1983; Katz, 1982; Kiil, 1978; Lechene, 1988).

Se han demostrado distintos sistemas de entrada pasiva de $Na^+$ a las membranas de las microvellosidades (ver Figura 1), entre los cuales están: intercambio $Na^+/H^+$, inhibido por amilorida, cotransporte $Na^+$/fosfato, cotransporte $Na^+$/aminoácidos, cotransporte $Na^+$/succinato, cotransporte $Na^+$/biotina. En la membrana basal (ver Figura 1), se ha

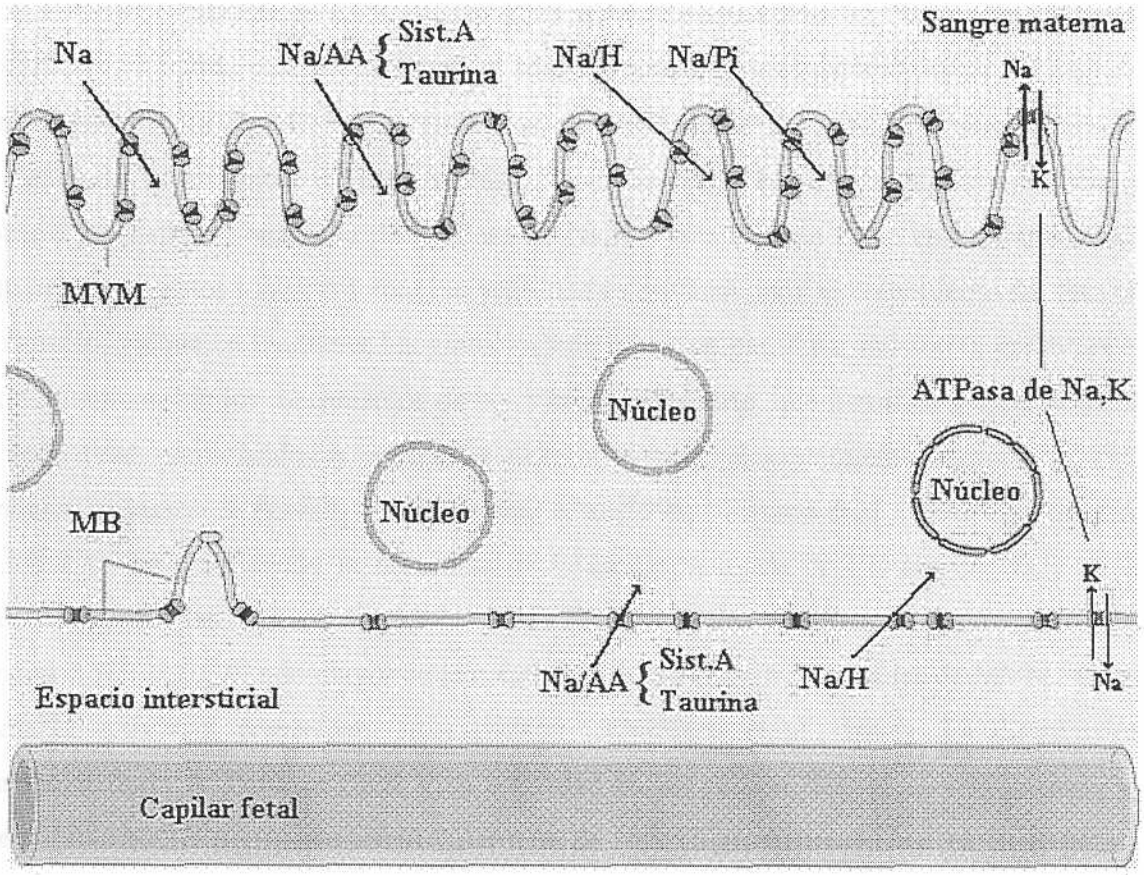


**Figura 1**

Representación esquemática de la distribución de los principales mecanismos de transporte iónico en el sincitiotrofoblasto.

encontrado un intercambiador $Na^+$ /$H^+$ distinto al de la membrana de las microvellosidades y un cotransportador $Na^+$ /aminoácidos.

Aunque existen diversos mecanismos mediante los cuales el $Na^+$ puede entrar al trofoblasto, la salida es efectuada por un solo mecanismo, representado por la ATPasa de Na,K (ver Figura 1). En las membranas de las células del sincititrofoblasto, se ha evidenciado la presencia de una ATPasa, dependiente de $Mg^+$, estimulada por sodio y potasio y sensible a ouabaína: la ATPasa de Na,K. Esta enzima actúa en la homeostasis intracelular de estos iones. Además, su actividad es esencial para el crecimiento del feto en desarrollo, ya que, al mantener los gradientes de iones, en particular del sodio, garantiza el funcionamiento de los mecanismos de co- y contratransporte, que permiten acumular hacia el lado fetal aminoácidos y nutrientes necesarios para el crecimiento normal del feto (Johansson.Jasson & Powell, 2000;Maxwell et al.,1998; Rabino et al., 1996). En estudios previos, se ha demostrado la presencia de la isoforma $\alpha_1$ de la ATPasa de Na,K en la membrana de las microvellosidades (MVM) y en la membrana basal (MB) del sincitiotrofoblasto, siendo mayor en la membrana de las microvellosidades de MVM, tanto para la actividad, como para su expresión (Johansson et al., 2000). La distribución particular de la ATPasa de Na,K y su actividad en las células del sincitiotrofoblasto, es compatible con el transporte transcelular neto de $Na^+$. El gradiente de $Na^+$ es clave para la regulación del pH intracelular, y está involucrado en el transporte neto de $Na^+$ hacia el feto, permitiendo así la expansión del volumen extracelular (Johansson et al., 2000; Maxwell et al., 1998; Rabini et al., 1996; Sibley et al., 2002).

La actividad de los transportadores de $Na^+$ con aminoácidos o del intercambiador $Na^+/H^+$, se ha demostrado que es mayor en la membrana de las microvellosidades que en la membrana fetal. Existen canales de $Na^+$ en esta membrana, por lo que el balance entre la entrada y salida del ión, favorece el influjo neto de $Na^+$ en el lado de la MVM y el eflujo del mismo por la cara fetal, lo que sugiere que el transporte neto de $Na^+$ se efectúa de la madre hacia el feto (Johansson et al., 2000; Sibley et al., 2002).

El $K^+$ es el principal catión intracelular, entra a la célula a través de la ATPasa de Na,K, mientras que el eflujo se produce a través de canales de $K^+$ y por el cotransportador $K^+$-$Cl^-$. La alta concentración de $K^+$ intracelular es esencial para la síntesis de ATP y de proteínas. El transporte de $K^+$ a través de membrana, es un proceso de dos estadios: una fase activa de influjo por la ATPasa de Na,K, y una fase pasiva de eflujo a través de los canales y distintos mecanismos. Estudios previos indican que efectivamente, es a través de la ATPasa de Na,K como el $K^+$ entra a las células del trofoblasto en la placenta (Johansson et al., 2000; Stulc, 1997).

Todo lo dicho, indica que la ATPasa de Na,K es una proteína integral de la membrana plasmática que es imprescindible para la vida de la célula, ya que juega un papel fundamental en el mantenimiento del balance iónico, al encargarse de mantener altas concentraciones intracelulares de $K^+$ y concentraciones bajas de $Na^+$. Con la hidrólisis de una molécula de ATP, transporta 3 $Na^+$ hacia fuera de la célula, intercambiándolos por 2 $K^+$ que entran a la misma. El gradiente electroquímico que genera este mecanismo, es crucial para mantener el balance osmótico de las células, la regulación del volumen celular, la excitabilidad nerviosa y muscular, la regulación del pH, el transporte de aminoácidos, carbohidratos y vitaminas (Glynn,1984; Kaplan,1983; Lechene,1988).

La ATPasa de Na,K es un oligómero compuesto por dos polipéptidos principales, las subunidades $\alpha$ y $\beta$. La subunidad $\alpha$ presenta las isoformas $\alpha_1$, $\alpha_2$, $\alpha_3$ y $\alpha_4$, las cuales son altamente reguladas y poseen una distribución específica para cada tejido, responsable de las propiedades catalíticas y de transporte de la enzima: contiene los sitios de unión para los cationes, para el ATP y para el inhibidor ouabaína. La subunidad $\beta$ presenta las isoformas $\beta_1$ y $\beta_2$, son esenciales para la actividad normal de la enzima, y modulan la afinidad para $Na^+$ y $K^+$ (Blanco & Mercer, 1998; Maxwell, Tao,Seely, Repke, & Graves,1998).

La peroxidación lipídica es un proceso que normalmente ocurre a un nivel bajo en todas las células y tejidos, produciéndose una oxidación de ácidos grasos insaturados a productos primarios, como hidroperóxidos lipídicos y otros metabolitos secundarios (Gutteridge & Halliwell, 1990). Un mecanismo importante generador de peroxidación

lipídica a nivel celular, es el de los procesos de isquemia-reperfusión, en los cuales hay períodos alternos de hipoxia seguidos de períodos de reoxigenación (Marín, Proverbio, Rodríguez, & Tiskow, 1993). Gran parte del estudio de la peroxidación lipídica sobre la actividad de la ATPasa de Na,K, ha sido realizado *in Vitro,* a través de sistemas generadores de radicales libres, tales como irradiación de luz UV o tratamiento con agentes químicos.

Se ha encontrado en ciertas patologías en las que está involucrada la placenta, que las actividades ATPásicas de las membranas plasmáticas de células de este tejido pueden verse modificadas como consecuencia de procesos de stress oxidativo. Estos procesos se producen como consecuencia de un desbalance entre fuerzas oxidantes y antioxidantes, lo que se traduce en un aumento en el grado de peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas de las células, con una consecuente liberación de productos de lipoperoxidación hacia la circulación, con lo que pueden alcanzar todo el organismo, dando lugar a daños en las membranas de las células endoteliales (Carrera, Casart, Proverbio, Proverbio, & Marín, 2003; Hubel et al., 1989; Matteo, Proverbio, Córdova, Proverbio, & Marín, 1998; Nardulli, Proverbio, Limongi, Marín, & Proverbio, 1994). La peroxidación lipídica puede producir alteraciones en proteínas de membrana, llevando a modificaciones en la estructura y función de dichas proteínas, lo que termina traduciéndose en alteraciones de varios parámetros, como: fluidez y/o permeabilidad de la membrana (Rice-Evans, Baysal, Pashby, & Hochstein, 1985); actividad de enzimas, canales, proteínas transportadoras, receptores, etc.

El tratamiento de la preeclampsia no ha cambiado en décadas (Watson et al., 1986), y consiste en: reposo, administración de agentes antihipertensivos para la preeclampsia leve y, administración de agentes anticonvulsivantes o antiepilépticos, para la profilaxis y prevención de las convulsiones. Entre estos últimos, encontramos drogas antiepilépticas convencionales, tales como diazepam y fenitoína, y el tratamiento de elección, que es la infusión endovenosa de sulfato de magnesio.

Los primeros estudios notables del efecto del sulfato de magnesio sobre la preeclampsia, fueron realizados entre 1925 y 1926 por Dorsett, Lazard, Alton y Lincoln. Dorsett, reportó la importancia del uso del sulfato de magnesio en gestantes preeclámpticas, cuando era administrado intramuscularmente (Dorsett, 1926). Para la misma condición, Lazard propuso el uso del sulfato de magnesio por vía intravenosa (Lazard, 1925), mientras que Alton y Lincoln propusieron su uso por vía intratecal (Alton & Lincoln, 1925). En 1929, con la introducción del uso del sulfato de magnesio para la prevención de convulsiones eclámpticas en el Hospital Chicago Lying, la incidencia de eclampsia descendió desde un 36% a un 7% (Greene, 2003).

Así, el sulfato de magnesio, usado desde hace más de 60 años como terapia y profilaxis contra las convulsiones eclámpticas (Scardo et al., 1995), ha llegado a ser el tratamiento estándar en los últimos 30 años y está asociado con una dramática reducción de la morbilidad materno y neonatal relacionada con eclampsia (Pritchard & Stone, 1967).

Estudios más recientes (Sibai, 1990), indican que el sulfato de magnesio, independientemente de su eficacia como anticonvulsivante, tiene una serie de efectos benéficos para la madre preeclámptica (Lucas et al., 1995, Nelson & Grether, 1995). Entre ellos podemos mencionar: incremento del flujo sanguíneo cerebral; rápida disminución del índice de resistencia sistémica vascular; incremento del flujo sanguíneo uterino; incremento del flujo sanguíneo renal; incremento de la liberación de prostaciclinas por células endoteliales; disminución de la actividad de la renina plasmática; disminución de los niveles de la enzima convertidora de angiotensina; atenuación de la respuesta vascular a sustancias vasopresoras; protección contra daño isquémico; reducción de la agregación plaquetaria. En el caso de los neonatos, se ha demostrado que disminuye el riesgo de parálisis cerebral en prematuros (Lucas et al., 1995, Nelson & Grether, 1995).

El magnesio, ha sido demostrado *in vitro* que puede actuar como agente protector contra el daño mediado por radicales libres en células endoteliales (Dickens et al., 1992), siendo capaz de disminuir la vasoconstricción inducida por peróxidos en la placenta humana (Walsh et al., 1998).

El uso prenatal del sulfato de magnesio, protege al feto al disminuir la incidencia de hemorragias intraventriculares en neonatos de embarazadas preeclámpticas (Kuban et al., 1992). Del mismo modo, se conoce que disminuye el riesgo de parálisis cerebral en prematuros (Nelson & Grether, 1995). Otros estudios, demuestran una reducción en los índices de mortalidad neonatal, cuando se emplea sulfato de magnesio para tratar la preeclampsia o el trabajo de parto pretérmino (Farkouh et al., 2001). Por otro lado, empleando cotiledones aislados de placenta, se ha reportado que la presión de la perfusión arterial fetoplacental, que es mayor en placentas provenientes de pacientes preeclámpticas, disminuye en las mismas, cuando son tratadas con sulfato de magnesio (Kovac et al., 2003). Todos estos hallazgos, sugieren que la incrementada vasoconstricción fetoplacental que se produce en la preeclampsia, puede ser revertida por el sulfato de magnesio. Por ello, la disminución de los índices de morbilidad y mortalidad neonatal, que se observa para las embarazadas preeclámpticas que son tratadas con sulfato de magnesio, puede ser explicada, aunque sea en parte, por el efecto vasodilatador de este agente, a nivel del lecho vascular fetoplacental.

Al ser el magnesio un cofactor esencial para proteínas transportadoras de membranas, como la ATPasa de Na,K, una deficiencia intracelular de este elemento pudiera afectar la actividad de la enzima, lo que disminuiría los niveles intracelulares de potasio y aumentaría los de sodio (McCarty, 1996). Por otro lado, la reducción de la actividad de la ATPasa Na,K aumenta indirectamente la concentración de calcio, al disminuir el gradiente de sodio transmembrana, ya que un menor gradiente de sodio, se traduciría en un disminución de la actividad del mecanismo de contratransporte $Na^{+}/Ca^{2+}$ (McCarty, 1996a), inhibiéndose de esa manera la expulsión del ión calcio de la célula.

Los niveles plasmáticos de sulfato de magnesio considerados terapéuticos, basados en la experiencia clínica, oscilan entre 4 a 8 mg/dl (Sibai, 1990). La primera señal de intoxicación por sulfato de magnesio es la pérdida de reflejos patelares, lo que ocurre con niveles plasmáticos entre 9 –12 mg/dl del agente. Los signos tempranos de intoxicación con magnesio incluyen náusea, aumento de la temperatura corporal, somnolencia, visión doble,

dificultad para hablar y debilidad. Si la pérdida de reflejos patelares es ignorada y la concentración en plasma incrementa por encima de 12 mg/dl, el deterioro de los músculos involucrados en la respiración pueden llevar a una peligrosa hipoxia. A niveles plasmáticos de sulfato de magnesio entre 15 a 17 mg/dl, se puede desarrollar parálisis muscular y paro respiratorio, mientras que a niveles entre 30 a 35 mg/dl, puede desarrollarse un paro cardíaco.

El antídoto ante la intoxicación con sulfato de magnesio es el gluconato de calcio, siendo el tratamiento muy efectivo cuando ocurre compromiso respiratorio (Chesley, 1979). La debilidad neuromuscular inducida por la hipermagnesemia y revertida por el gluconato de calcio, pareciera estar relacionada con la habilidad del calcio de desplazar al magnesio de las membranas celulares (Henninger & Horst, 1997).

En el presente trabajo, se evaluó el impacto de la hipoxia placentaria sobre los niveles de peroxidación lipídica y la actividad de la ATPasa de Na,K, en membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto. Además, se evaluó el efecto del sulfato de magnesio sobre ambos parámetros, es decir, niveles de peroxidación lipídica y actividad de la ATPasa de Na,K, en explantos de placenta humana cultivados bajo condiciones de hipoxia.

# CAPÍTULO III

# METODOLOGÍA

El siguiente estudio fue autorizado por las Comisiones de Bioética del IVIC, del Hospital Universitario de Caracas y de la Maternidad Concepción Palacios. Todas las donantes de placenta firmaron un consentimiento escrito.

## 1. Placentas Humanas.

Se recolectaron placentas humanas a término (38-41 semanas) de pacientes sin ninguna patología asociada. Las placentas obtenidas inmediatamente después del alumbramiento por parto vaginal, fueron colocadas inmediatamente en hielo y trasladadas al laboratorio, en donde se procesaron en un tiempo no mayor de 2 a 4 horas.

## 2. Preparación de Explantos.

Una vez en el laboratorio, se aíslaron de la placenta cotiledones observados en buen estado y se les removió el plato coriónico y la decidua (0.25 cm aproximadamente). Luego, se coloco el cotiledón en una placa de *Petri* y se cortaron en trozos pequeños de 0,5 cm x 0,5 cm aproximadamente, removiendo los vasos sanguíneos en el proceso. Todo el proceso de preparación y lavado se realizó sobre hielo, a una temperatura de 4°C. Estos explantos de placenta humana se lavaron con solución salina estéril por 5 veces consecutivas, para limpiar los restos de sangre presentes en ellos. Luego, se transfirieron a placas Nunclon™ Surface® de 12 pozos conteniendo 2 ml del medio DEMEM-F12 + 10% Suero Fetal Bovino (SFB) en cada pozo. Este medio era precalentado a 37°C y se encontraba complementado con agentes antimicrobianos: penicilina cristalina 100.000 UI/ml, gentamicina 48 μg/ml y anfotericina B 3μg/ml.

Todos los explantos fueron primero incubados bajo condiciones de normoxia (10% $O_2$, 5%$CO_2$, 85% $N_2$) durante las primeras 4 horas, una vez transcurrido este tiempo, el

medio de cultivo era removido y se les proporcionaba medio fresco (preincubado a 37°C, 2ml/pozo). Luego, los explantos se incubaron durante un período de 18 horas a 37°C, bajo las siguientes condiciones:

- Normoxia: 10% $O_2$, 5%$CO_2$, 85% $N_2$
- Hipoxia: 0.5% $O_2$, 5% $CO_2$, 94.5%$N_2$

**3. Homogenizados de explantos de placenta humana.**

Los explantos eran removidos del medio de cultivo y lavados con solución salina. Una vez lavado, el tejido era pesado y se resuspendía en 3 volúmenes (ml/g) de una solución fría (solución 1) que contenía (mM): sacarosa, 250; Tris-Hepes (pH 7,2); etilenglicol-bis-(β-amino-etil ester) N,N-ácido tetraacético (EGTA), 5; ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), 5; fenilmetil-sulfonil fluoruro (PMSF), 1. Luego el tejido era homogenizado durante dos minutos con un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel,IKA-Labortechinick) a 24.000 rpm, con una hojilla S25N, obteniendo los homogenizados totales (HT) de los explantos de placenta humana (Illslesy,Wang,Sellers, &Jacobs.1990).

**4. Preparación de membranas plasmáticas de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana.**

El método que se utilizó consiste en una modificación del método descrito por Illsley et al. 1990 (Illsley et al.,1990) y un esquema resumido del mismo se presenta en la Figura 2. Los homogenizados totales de placenta (HT), se centrifugaron por 15 minutos a 10.000xg en una centrífuga Sorvall refrigerada RC-5B. El sobrenadante se guardó y el precipitado era resuspendido en la misma solución de homogenización (solución 1) y se centrifugaba nuevamente por 15 minutos a 10.000xg, obteniendo de allí un segundo sobrenadante. Los sobrenadantes eran combinados, filtrados en gasas y luego centrifugados por 60 minutos a 47.500xg a 4°C. El sobrenadante resultante era descartado, y el precipitado era resuspendido en la misma solución de homogenización (solución 1), a una

concentración final de proteínas de 10-15 mg/ml. Posteriormente, esta suspensión se colocaba sobre hielo y se agitada durante 20 minutos, después de añadir $MgCl_2$ a una concentración final de 12 mM. Luego, se centrifugaba por 15 minutos a 2.500xg a 4°C. De esta centrifugación, se obtenían un sobrenadante, el cual se utilizaba para aislar las membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM), y un precipitado, con el cual se aislaban las membranas plasmáticas basales (MB).

**5. Aislamiento de membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM) de placenta humana.**

El sobrenadante utilizado para aislar las fracciones purificadas de membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM), era centrifugado a 47.500xg durante 30 minutos. El nuevo sobrenadante era descartado y el precipitado era lavado dos veces con una solución (solución 2) que contenía (mM): sacarosa, 250; Tris-Hepes (pH 7,2), para lo cual se resuspendía en dicha solución y era centrifugado a 47.500xg durante 30 minutos por dos veces. El sedimento final era resuspendido en la solución 2, a una concentración final de proteínas de 1-2 mg/ml y guardado a -20°C. La concentración de proteínas de las fracciones se determinaba, en todos los casos, según el método de Bradford (Bradford,1976).

**6. Aislamiento de las membranas plasmáticas basales (MB) de placenta humana.**

El precipitado que contenía las MB era resuspendido en la misma solución 2, siempre a 4°C. Esta suspensión se homogenizaba con 8 golpes en un homogenizador manual "Potter-Elvehjem", con un émbolo de teflón, a 2.500 rpm. De la suspensión anterior, se tomaban 11,84 ml y se colocaban en el tope de un gradiente discontinuo de sacarosa, formado por 4,73 ml de solución de sacarosa de densidad 1,190 g/cc y, por encima de éste, 13,42 ml de solución sacarosa de densidad 1,165 g/cc. El gradiente era centrifugado por 70 minutos a 141.000xg en una ultracentrifuga Sorvall Combiplus, utilizando un rotor Beckman SW 27 swing-out (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). La fracción que quedaba en la interfase entre la capa inferior y superior de sacarosa, era removida y resuspendida en 10 volúmenes de solución 2 (10 ml/ml) y centrifugada por 30

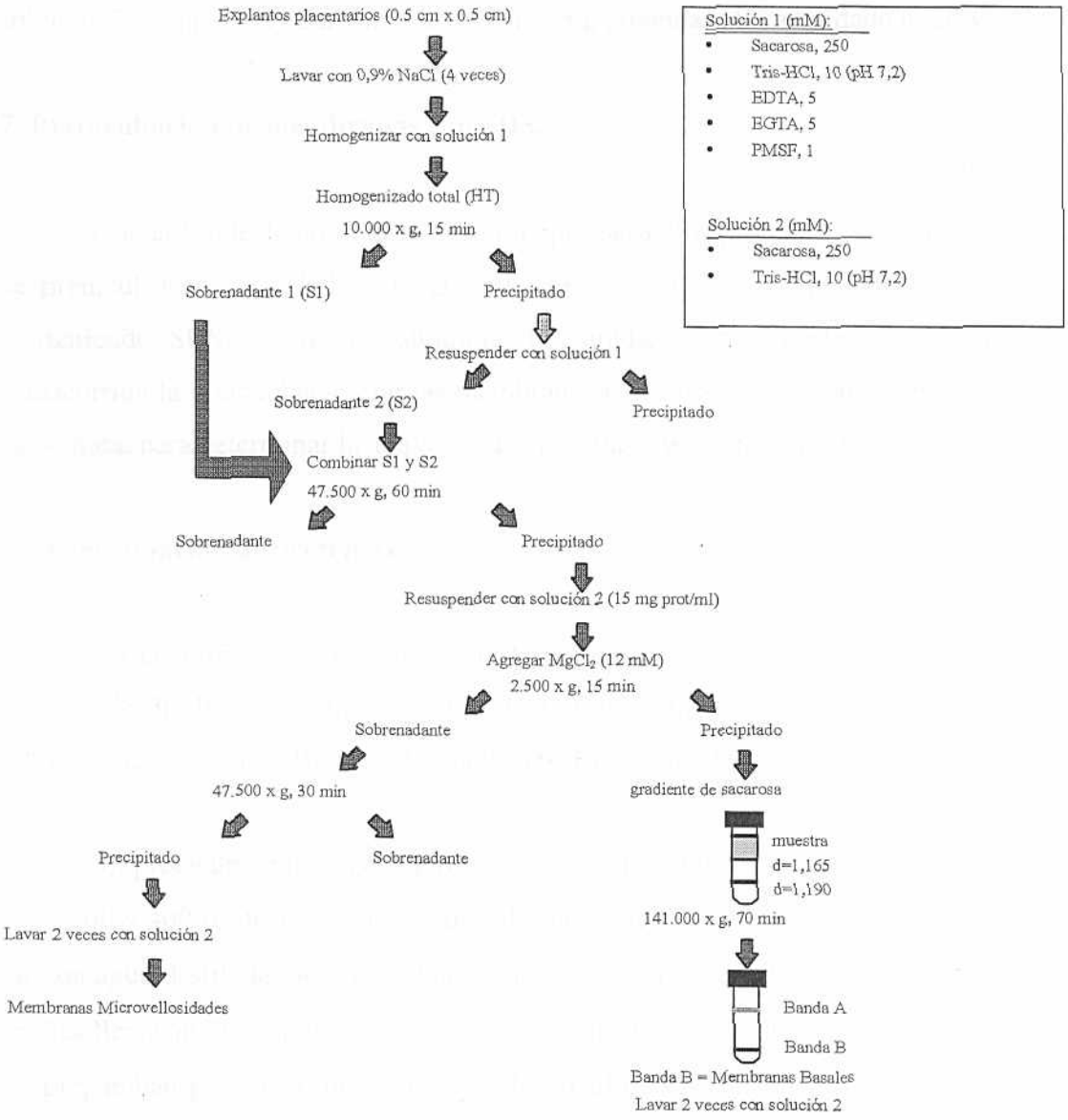


**Figura 2**

Preparación y separación de membranas plasmáticas de microvellosidades y de membranas plasmáticas basales de sincitiotrofoblasto de placenta humana (Illsley et al., 1990).

minutos a 47.500 xg. El sobrenadante era descartado y el sedimento era resuspendido en la solución 2 a una concentración final de 1 a 2 mg proteína/ml, y guardado a -20ºC.

**7. Preincubación de membranas con SDS.**

Con el fin de determinar la relación óptima [SDS]/[proteínas], 250 µl de membranas se preincubaron a 37°C durante 20 min con 0, 2, 4, 6, 8 µl de una solución de SDS conteniendo: SDS, 6,25 mg/ml; albúmina, 1%; imidazol, 25 mM (pH 7,2 a 37°C). Luego de transcurrida la preincubación de las membranas con SDS, éstas eran ensayadas de manera inmediata, para determinar la actividad de la ATPasa de Na,K de las mismas.

**8. Determinación de proteínas.**

La cuantificación del contenido de proteínas de las fracciones, se realizó según el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se utilizó el reactivo concentrado de azul brillante de Coomasie (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A).

El procedimiento era el siguiente: se preparaba una curva de calibración empleando 100, 200 y 400 µl de albúmina, 25 µg/ml; que se llevaban luego a un volumen final de 800 µl con agua destilada. Se preparaban cuatro blancos para calibrar el espectrofotómetro, los cuales llevaban 790 µl de agua destilada y 10 µl del medio de resuspensión. Las muestras se preparaban por cuadruplicado, llevando 10 µl de suspensión de membranas y 790µl de agua destilada. Tanto a las muestras, como a los blancos y curva de calibración se les añadía 200 µl del reactivo, se agitaban y se dejaban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaban 200 µl de cada uno de los tubos y se colocaban en placas de ELISA de 96 pozos para luego medir la absorbancia en un lector ELISA Sunrise (Tecan) a 595 nm. La densidad óptica es lineal para un rango de concentración de proteínas entre 0,07 mg/ml y 2,7 mg/ml.

**9. Actividad ATPásica de Na,K.**

La actividad ATPásica de Na,K se determinó según una modificación del método descrito por Proverbio *et al.* (Proverbio & del Castillo, 1981; Proverbio, Proverbio, & Marín, 1986). El fosfato inorgánico liberado durante la reacción era determinado según el método de Forbush, modificado por Marín *et al.* (Forbush, 1983; Marín, Proverbio, & Proverbio, 1986) (Anexo 1). El medio donde se realizaba la reacción enzimática constaba de 180 µl del medio de incubación y 20 µl de la suspensión de membranas, a una concentración de proteínas de 0,1-0,6 mg/ml. La concentración de proteínas era determinada según el método de Bradford (Bradford, 1976). En el volumen final de 200 µl, los medios contenían:

**Medio I:** $MgCl_2$, 5 mM; Tris-HCl (pH 7,5 a 37 °C), 10 mM; NaCl, 100 mM; KCl, 20 mM; ATP (disódico), 3mM.

**Medio II:** $MgCl_2$, 5 mM; Tris-HCl (pH 7,5 a 37 °C), 10 mM; NaCl, 100 mM; KCl, 20 mM; ATP (disódico), 3mM; Ouabaína, 1 mM.

El procedimiento era el siguiente: 180 µl del medio de incubación se preincubaban por dos minutos a 37°C y la reacción se iniciaba añadiendo 20 µl de la fracción de membranas. La reacción era finalizada a los 10 minutos, agregando 300 µl de una solución mantenida en frío (solución A) que contenía (%): Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0,72; ácido molíbdico, 0,48; ácido ascórbico, 2,86 y HCl 2,18. Los tubos de incubación eran colocados inmediatamente en hielo durante 10 minutos. Después de transcurridos los 10 minutos en hielo, se añadía a cada uno de los tubos, 0,5 ml de una solución (solución B) que contenía (%): Arsenito de sodio, 2; citrato de sodio, 2 y ácido acético, 2 y, finalmente, los tubos de incubación eran recalentados a 37 °C por 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaban 200 µl de cada uno de los tubos y se colocaban en placas de ELISA de 96 pozos para luego medir la absorbancia en un lector ELISA Sunrise (Tecan) a 705 nm. En todos los casos había al menos cuatro réplicas. La actividad ATPásica se expresa como nanomoles de fosfato liberado, por mg de proteína por minuto de incubación, después de

sustraer un blanco incubado en paralelo sin proteínas, las cuales se le añadían después de agregar los 300 µl de la solución A. Las actividad ATPásica de Na,K, expresada como la actividad ATPásica sensible a ouabaína, se calculó como la diferencia en actividades entre el medio II y el medio I.

**10. Determinación de niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

Las preparaciones de membranas eran centrifugadas a 47.500xg durante 20 minutos y el precipitado obtenido, se resuspendía en buffer fosfato, el cual contenía (mM): fosfato de sodio, 25; NaCl, 125 (pH 7,4). El precipitado, una vez resuspendido en la misma solución, era centrifugado nuevamente por 20 minutos a 47.500xg y, finalmente, el precipitado se resuspendía nuevamente en el mismo buffer fosfato.

Los niveles de TBARS de estas preparaciones se determinaron por el método de Feix *et al.* (Feix, Bachowski, & Girotti, 1991). A tubos de microcentrífuga se les agregaba 250 µl de preparación de membrana, a una concentración de proteínas entre 0,6 -0,8 mg/ml; 50 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) 250 mM y 375 µl de ácido tricloroacético al 20%. Los tubos eran colocaros inmediatamente en hielo y se incubaban durante 10 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, eran centrifugaron por 10 minutos a 3.000 rpm y se tomaban 500 µl del sobrenadante, los cuales eran colocados en tubos de vidrio, donde se les agregaba, además, 250 µl de ácido tiobarbitúrico al 1,5%. Los tubos eran colocados rápidamente en un baño de agua hirviendo por 15 minutos y, finalmente, los tubos eran enfriados sobre hielo, a 4°C durante 3 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaban 200 µl de cada uno de los tubos y se colocaban en placas de ELISA de 96 pozos, para luego medir la absorbancia en un lector ELISA Sunrise (Tecan) a 532 nm. Posteriormente, a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos se le restaba el valor de absorbancia de un blanco, tratado de igual manera, pero que no contenía suspensión de membranas. En cada caso, se preparaba una curva de calibración, utilizando como estándar 1,1-3,3-tetrametoxi propano ($C_7H_{16}O_4$). En todos los casos, había al menos cuatro réplicas. Los resultados se expressan como nmoles de malondialdehido (MDA) por mg de proteína.

**11. Análisis Estadístico.**

Los resultados se expresaron como las medías ± el error estándar, para el número de ensayos indicado en cada caso. Los errores estándar de las diferencias se calcularon para datos pareados. El análisis estadístico de los datos fue realizado utilizando la *"t"* de Student, siendo *"n"* el número de veces que se repitieron los ensayos, con preparaciones diferentes. Se aceptó como nivel de significancia estadística una probabilidad menor a 0,05.

# CAPÍTULO IV

# RESULTADOS

Para la presentación de los resultados, se seguirá el siguiente esquema:

1. Evaluación de la integridad de los explantos de placenta humano a término, mediante microscopía óptica.

2. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término.

3. Actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.

4. Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.

5. Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.

6. Efecto de la hipoxia sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.

7. Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia.

8. Efecto del sulfato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia.

**1.- Evaluación de la integridad de los explantos de placenta humano a término, mediante microscopía óptica.**

Para demostrar que las células del sincitiotrofoblaso no están siendo afectadas por el cultivo, se tomaron muestras de tejido tanto de placenta fresca, como de los explantos cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de sulfato de magnesio.

Estas muestras fueron procesadas en el servicio de microscopía óptica del Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, donde se realizaron cortes histológicos de cada una de las muestras y se colorearon con hematoxilina/eosina, para finalmente ser observadas al microscopio.

La Figura 3, muestra las imágenes correspondientes a los cortes histológicos. En **A,** se aprecian los cortes de las vellosidades coriónicas provenientes de placenta fresca, mientras que en **B, C y D,** se observan los cortes provenientes de los explantos cultivados bajo condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia en presencia de sulfato de magnesio, respectivamente. Se puede observar que las imágenes son bastantes similares para todas las condiciones, lo que nos sugiere que el cultivo de las células del sincitiotrofoblasto no afecta la integridad de las mismas. Además, se puede destacar que el cultivo bajo condiciones de hipoxia tampoco modifica la estructura celular.

**2.- Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término.**

Como sucede en general con preparaciones de membranas, parte de las mismas pueden encontrarse abiertas, y parte formando vesículas: ya sea en conformación correcta, o sea con el lado intracelular hacia el interior de la vesícula, o en conformación invertida, o sea, con el lado intracelular hacia el exterior de la vesícula. Por tal motivo, los homogenizados de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término fueron tratados con diferentes cantidades de un detergente, el dodecil sulfato de sodio (SDS) y

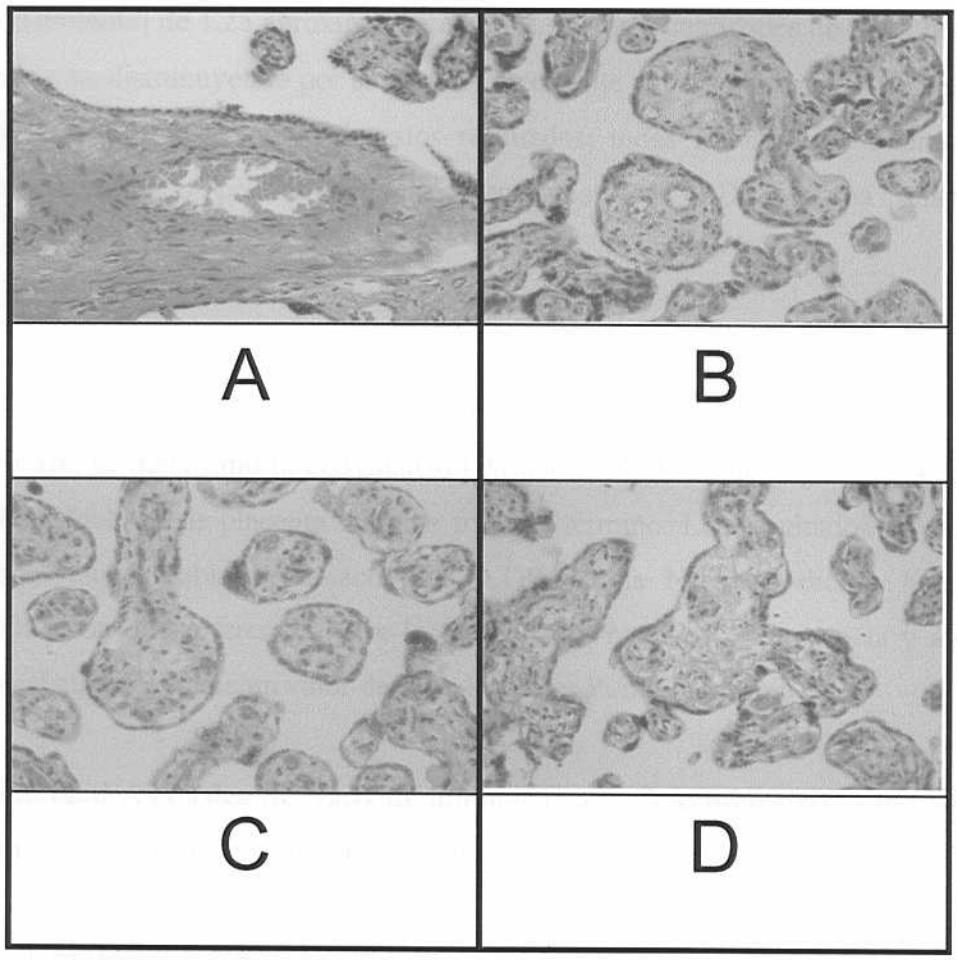


**Figura 3**

Fotografías de cortes histológicos de Vellosidades Coriónicas provenientes de placenta humana a término coloreados con hematoxilina/eosina.

**A.** Placenta Fresca.
**B.** Explanto cultivado durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia.
**C.** Explanto cultivado durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de hipoxia.
**D.** Explanto cultivado durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio.

luego ensayadas para actividad ATPásica de Na,K. La Figura 4, muestra los resultados de este experimento. Nótese que al aumentar la cantidad de SDS durante la preincubación, se produce un aumento en la actividad de la ATPasa de Na,K, la cual alcanza un máximo de actividad cuando la preparación es tratada con alrededor de 25 μg de SDS (relación [SDS]/[proteína] de 1,25 aproximadamente). A mayores cantidades de SDS, la actividad de la enzima va disminuyendo por acción del detergente sobre la integridad de las membranas (Forbush, 1983). En función de estos resultados, todos los estudios enzimáticos fueron realizados tratando previamente las membranas con SDS, a una relación óptima [SDS]/[proteína] de 1,25.

Utilizando condiciones óptimas de actividad establecidas previamente en nuestro laboratorio, se determinó la actividad ATPásica de Na,K de homogenizados de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana fresca a término. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla I. La actividad ATPásica de Na,K en dichos homogenizados, calculada como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y ausencia de 1 mM ouabaína (Δ), tiene un valor de 16 ± 1 nmoles Pi/mg prot . min .

**3.- Actividad ATPásica de Na,K de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.**

Empleando las mismas condiciones que en homogenizados de placenta humana fresca a término, se determinó la actividad ATPásicas de Na,K de homogenizados de explantos de sincitiotrofoblasto de placenta humana incubados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia. Los resultados de este experimento, se muestran en la Tabla II. Nótese que la actividad ATPásica de Na,K en dichos homogenizados tiene un valor de 17 ± 2 nmoles Pi/mg prot . min,, el cual no presenta una diferencia significativa respecto al de homogenizados de placenta fresca. Este resultado nos sugiere que la actividad enzimática, por lo en lo que se refiere a la ATPasa de Na,K, no se ve afectada por las condiciones de cultivo.

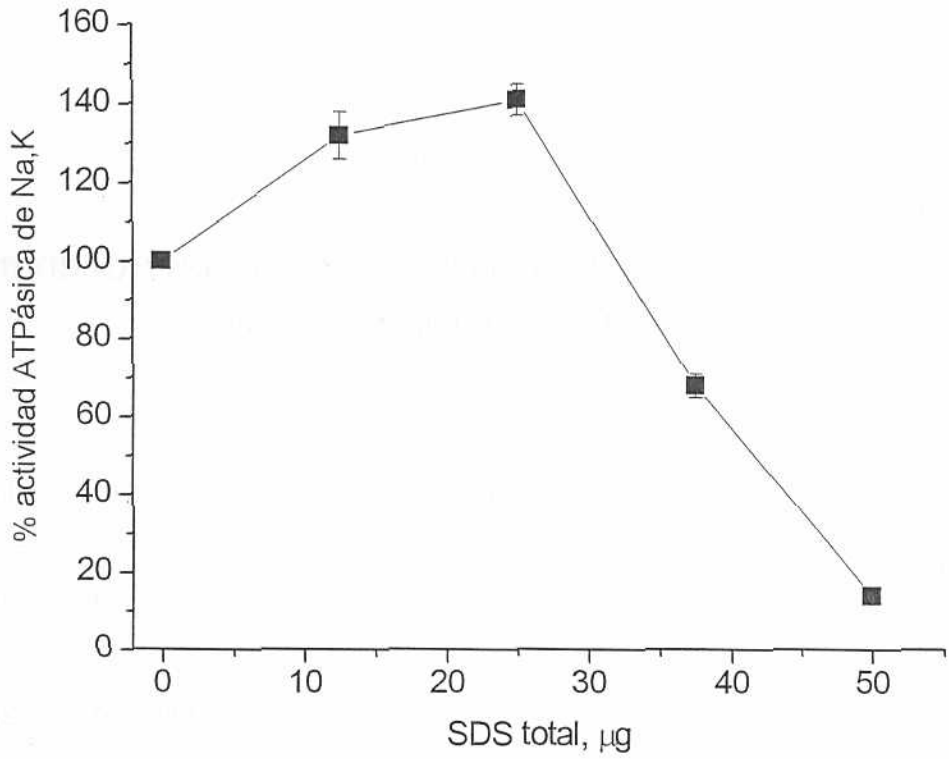


**Figura 4**

Actividad ATPásica de Na,K en homogenizados de placenta humana, en función de distintas cantidades de SDS durante la preincubación. Valor 100% para la actividad de la ATPasa de Na,K fue de 12 ± 1 nmoles Pi/mg prot . min. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n = 6.

TABLA I

ACTIVIDAD ATPásica DE Na, K, DE HOMOGENIZADOS DE CÉLULAS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO

| Medio de incubación | Actividad ATPásica: nmoles Pi / mg prot . min | Δ |
|---|---|---|
| Mg+Na+K | 129 ± 5 | |
| Mg+Na+K+ouab | 113 ± 6 | 16 ± 1 |

Valores de actividad expresados como la media ± el error estándar, para n=6

TABLA II

ACTIVIDAD ATPásica DE Na, K, DE HOMOGENIZADOS DE EXPLANTOS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO CULTIVADOS DURANTE 18 HORAS A 37°C BAJO CONDICIONES DE NORMOXIA

| Medio de incubación | Actividad ATPásica: nmoles Pi / mg prot . min | Δ |
|---|---|---|
| Mg+Na+K | 125 ± 5 | |
| Mg+Na+K+ouab | 108 ± 6 | 17 ± 2 |

Valores de actividad expresados como la media ± el error estándar, para n=3

**4.-Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.**

Las fracciones resultantes del proceso de purificación fueron ensayadas para determinar la actividad de la ATPasa de Na,K. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla III. Nótese, en primer lugar, que la actividad ATPásica de Na,K es mayor en la fracción MVM que en la fracción MB.

Es bien conocido que la ATPasa de Na,K es un marcador de membranas plasmáticas, que en el caso de la placenta corresponde tanto a las membranas basales, como de las microvellosidades (LaFond, Kennedy, Harrison, & Villee, 1988; Whitsett & Tsang, 1980). Las dos fracciones (membranas basales y membranas de las microvellosidades), muestran un cierto grado de enriquecimiento aparente de la actividad ATPásica de Na,K, (relación actividad fracción/actividad HT), siendo éste mayor en MVM que en MB.

**5.- Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.**

Es bien sabido que las gestantes preeclámpticas presentan una hipoperfusión placentaria, lo cual origina cuadros de hipoxia en la placenta, que conduce a que se promuevan procesos oxidativos en la misma. Estos procesos afectan la integridad de las membranas e inhiben la actividad de enzimas inmersas en ellas, como es el caso de la ATPasa de Na,K. Como sea que los cultivos de explantos placentarios incubados bajo condiciones de hipoxia a 37°C, representan una buena aproximación de la hipoperfusión placentaria que ocurre durante la preeclampsia, se decidió preparar estos cultivos y aislar las membranas plasmáticas basales y de microvellosidades en estas preparaciones, con el fin de evaluar el impacto de la hipoxia sobre la actividad ATPásica de Na,K de las mismas.

TABLA III

ACTIVIDAD ATPásica DE Na,K Y FACTOR DE ENRIQUECIMIENTO APARENTE DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN MEMBRANAS PLASMÁTICAS BASALES (MB) Y DE MICROVELLOSIDADES (MVM) DE EXPLANTOS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO CULTIVADOS BAJO CONDICIONES DE NORMOXIA

| Fracción | Actividad ATPásica nmoles Pi / mg prot . min | Factor de Enriquecimiento Aparente (actividad fracción/actividad HT) |
|---|---|---|
| HT | 15 ± 2 | --- |
| MB | 60 ± 3 | 4,00 |
| MVM | 97 ± 7 | 6,47 |

Valores de actividad expresados como la media ± el error estándar para n=5 .

Los experimentos se realizaron y, como puede observarse en la Figura 5, la actividad ATPásica de Na,K, de las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, se encuentra disminuida con respecto a los valores obtenidos para las muestras cultivadas bajo condiciones de normoxia. Esta disminución fue de un 65±2% (n=5).

Del mismo modo, se puede apreciar en la Figura 6 la disminución en la actividad ATPásica de Na,K de las fracciones enriquecidas en membranas de microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia. Estos datos, al igual que para MB, fueron analizados de manera individual y se obtuvo una inhibición del 55±2% (n=5) de la actividad de la ATPasa de Na,K en MVM con la hipoxia placentaria, cuando se compara con los explantos cultivados bajo condiciones de normoxia.

Un detalle sumamente interesante de estos resultados, lo constituye el hecho de que las membranas plasmáticas basales (MB) son más susceptibles a la hipoxia que las membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM), por lo menos a lo que se refiere a la actividad ATPásica de Na,K, dado que el porcentaje de inhibición de ésta enzima es mayor ($p<0,02$) en las membranas plasmáticas basales (65±2%) que en las membranas plasmáticas de microvellosidad (55±2%).

**6.- Efecto de la hipoxia sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.**

Es bien conocido que durante la hipoxia se generan estados oxidativos que estimulan la producción de radicales libres con la capacidad de promover procesos de peroxidación lipídica y afectar la composición de los lípidos de las membranas plasmáticas.

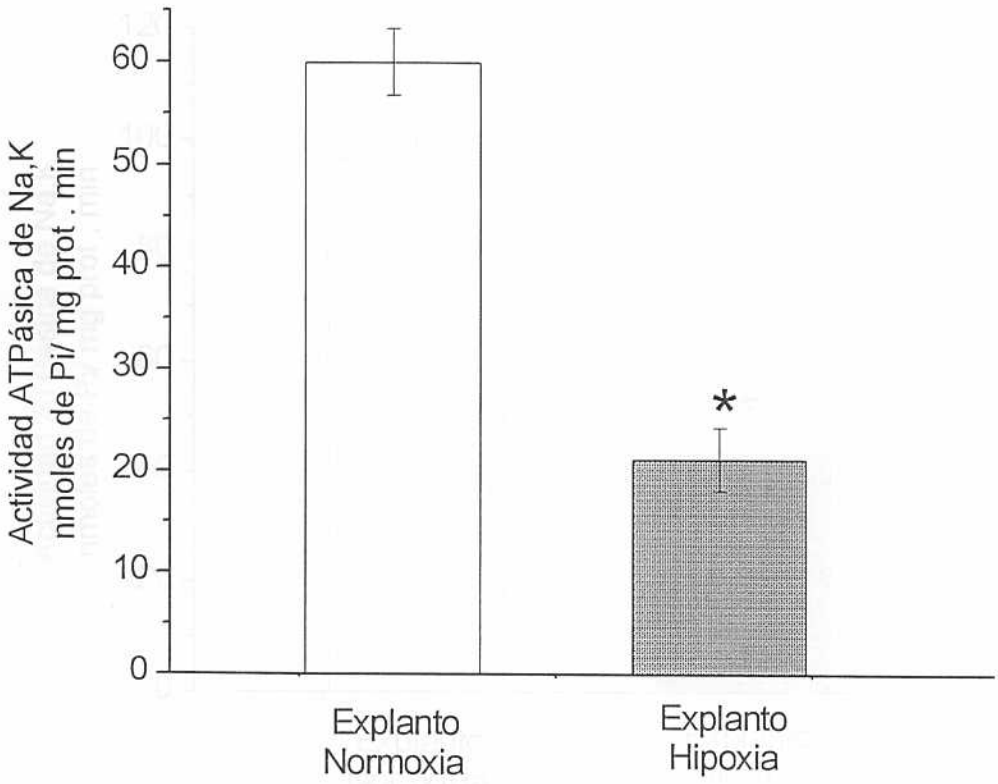


**Figura 5**

Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) de explantos de placenta humana a término, cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia.

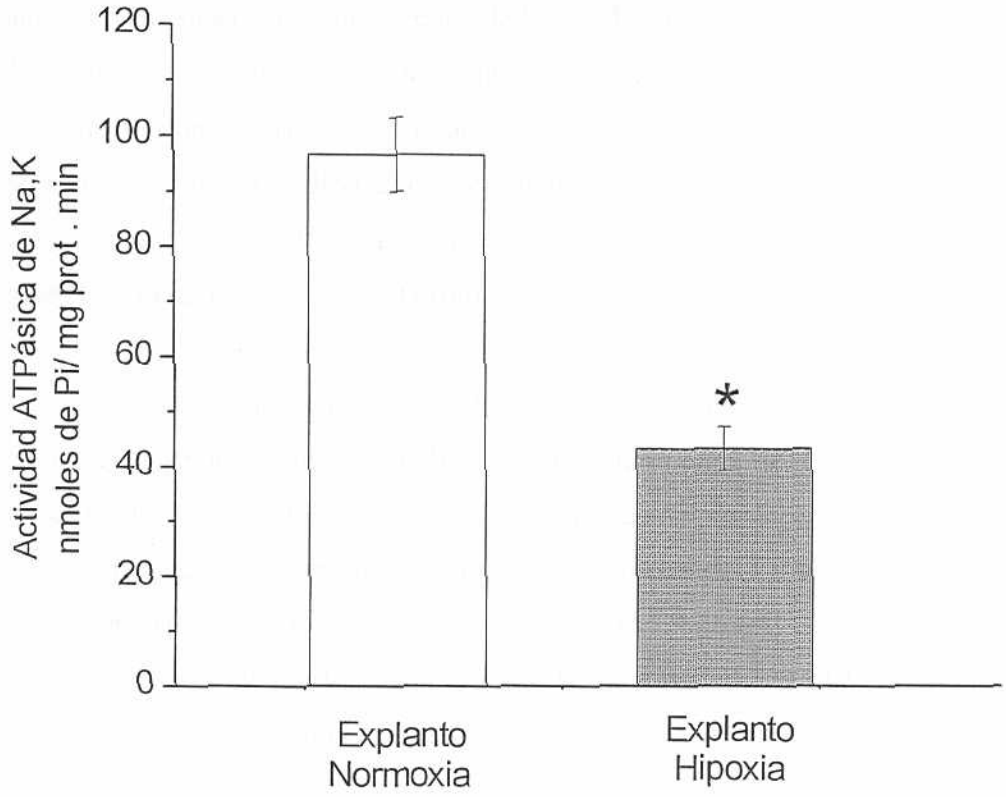


**Figura 6**

Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término, cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia.

De esta forma, se puede modificar la actividad enzimática de proteínas inmersas en estas membranas, sobre todo de aquellas que poseen una fuerte dependencia de la interacción lípido-proteína. Consecuentemente, se decidió evaluar los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas tanto en membranas plasmáticas basales (MB), como en membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM), provenientes de explantos cultivados tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Para ello, se determinaron los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (también conocidas por su acrónimo en inglés como TBARS), el cual es un ensayo ampliamente utilizado para evaluar los niveles de peroxidación lipídica, tanto en fluidos biológicos como en células de muy diversos tejidos (Feix, Bachowski, & Girotti, 1991).

En la Figura 7, se presentan los resultados de los TBARS de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB), provenientes tanto de explantos de placenta humana cultivados bajo condiciones de normoxia, como de hipoxia. Nótese como la hipoxia ocasiona una elevación significativa en los niveles de TBARS de las MB de los explantos placentarios, cuando comparados con los TBARS de MB de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia. Un comportamiento similar al de las MB, se observa en las fracciones enriquecidas en membranas de microvellosidades (Figura 8).

**7.- Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y en microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia.**

El tratamiento estándar para la preeclampsia severa en los últimos 60 años ha sido el sulfato de magnesio. Recientemente, nuestro grupo reportó que el tratamiento *in vivo* de gestantes preeclámpticas revierte la elevación de la peroxidación lipídica de los eritrocitos y con ello reconstituye a valores normales la actividad ATPásica de calcio de estas células. (Abad, 2005).

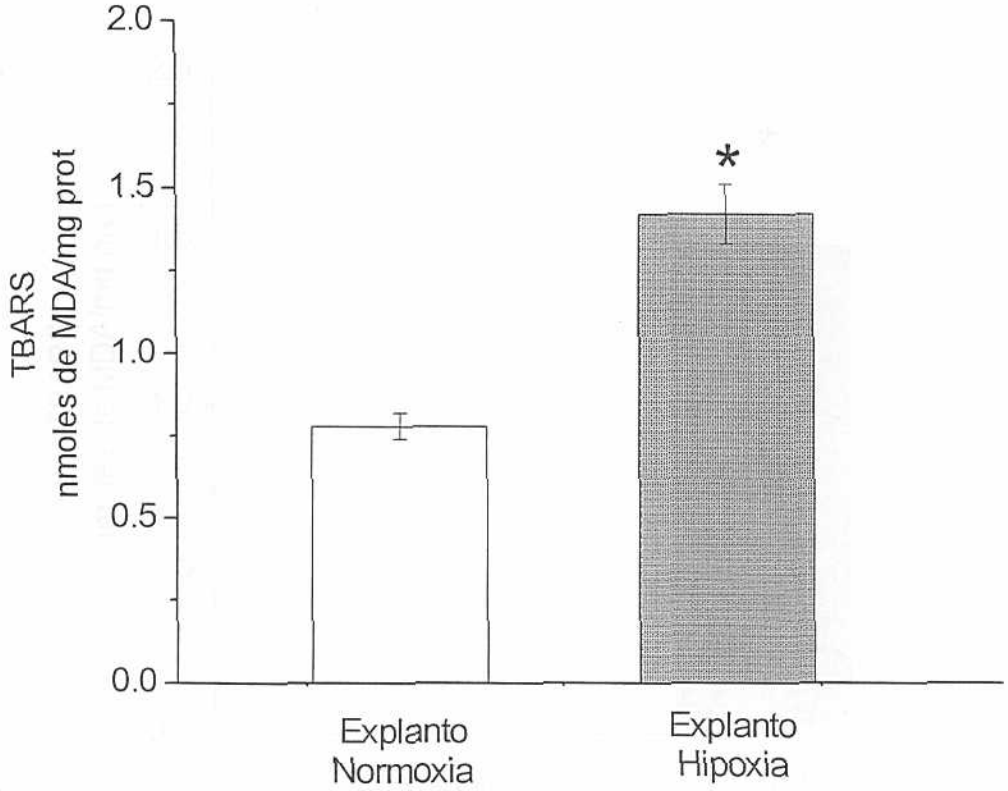


**Figura 7**

Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de basales (MB) de explantos de placenta humana a término, cultivados durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=4.

* $p<0,05$ vs explanto normoxia.

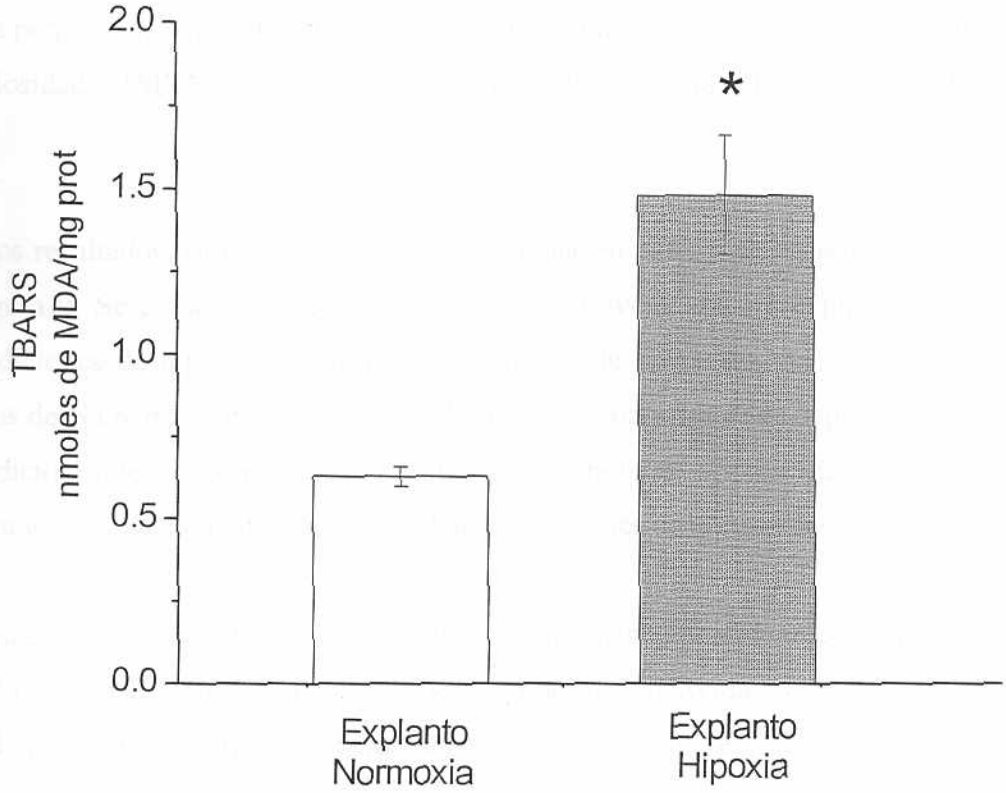


**Figura 8**

Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término, cultivados durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=4.

* $p<0,01$ vs explanto normoxia.

Esto nos llevó a evaluar el efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas basales y en membranas de microvellosidades de explantos de placenta humana, cultivados bajo condiciones de hipoxia. Para ello, se cultivaron explantos durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o de hipoxia, con o sin sulfato de magnesio, a una concentración final de 2 mM. Luego, se prepararon fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM), con el fin de determinar la actividad ATPásica de Na,K de las mismas.

Los resultados para las fracciones enriquecidas en membranas basales, se muestran en la Figura 9. Se evidencia que las preparaciones provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio, presentan actividades ATPásicas de Na,K mayores a las encontradas en las preparaciones de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, en ausencia de esta sal ($p<0,01$) y, parecidas a las obtenidas con preparaciones de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia ($p$ = n.s).

Para las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidades, se observó la misma conducta (Figura 10). Nótese como las actividades ATPásicas de Na,K de MVM de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de sulfato de magnesio, son similares a las observadas en las mismas membranas de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia ($p$ = n.s).

Los resultados presentados en las Figuras 9 y 10 indican que la presencia de sulfato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos sometidos a hipoxia, es capaz de prevenir el efecto inhibitorio de la hipoxia placentaria sobre la actividad ATPásica de Na,K, tanto de MB como de MVM.

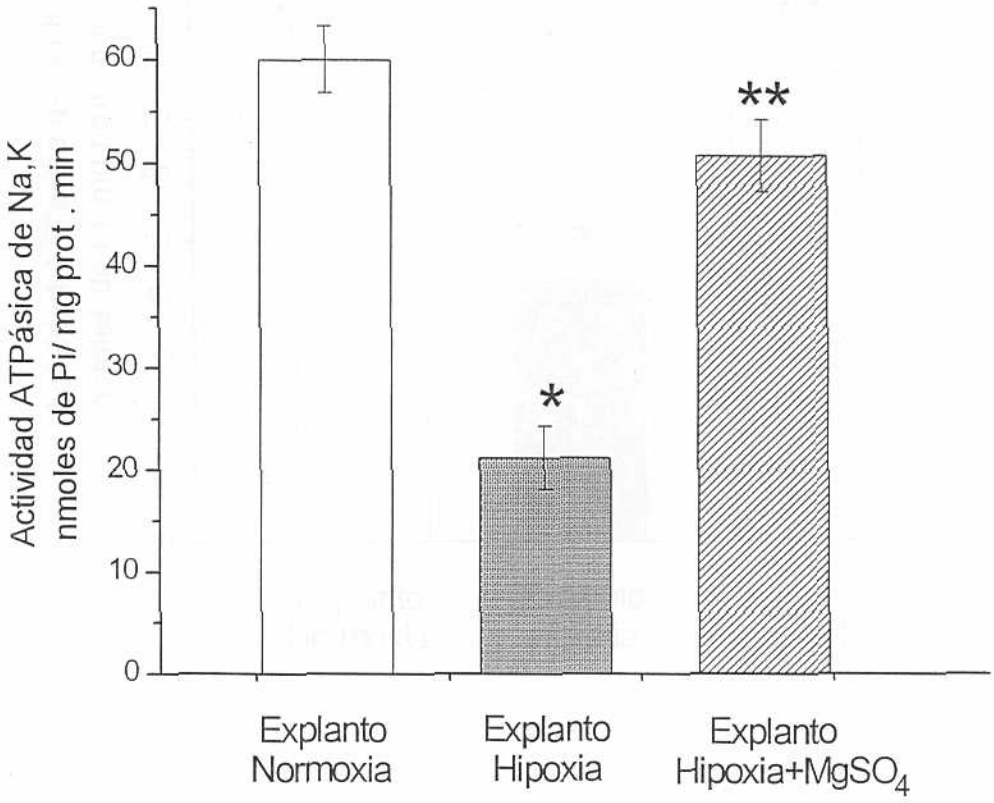


**Figura 9**

Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de basales (MB) de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2mM. Valores expresados como la media ± el error estándar para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia

** p n.s. vs explanto normoxia; $p<0,001$ vs explanto hipoxia

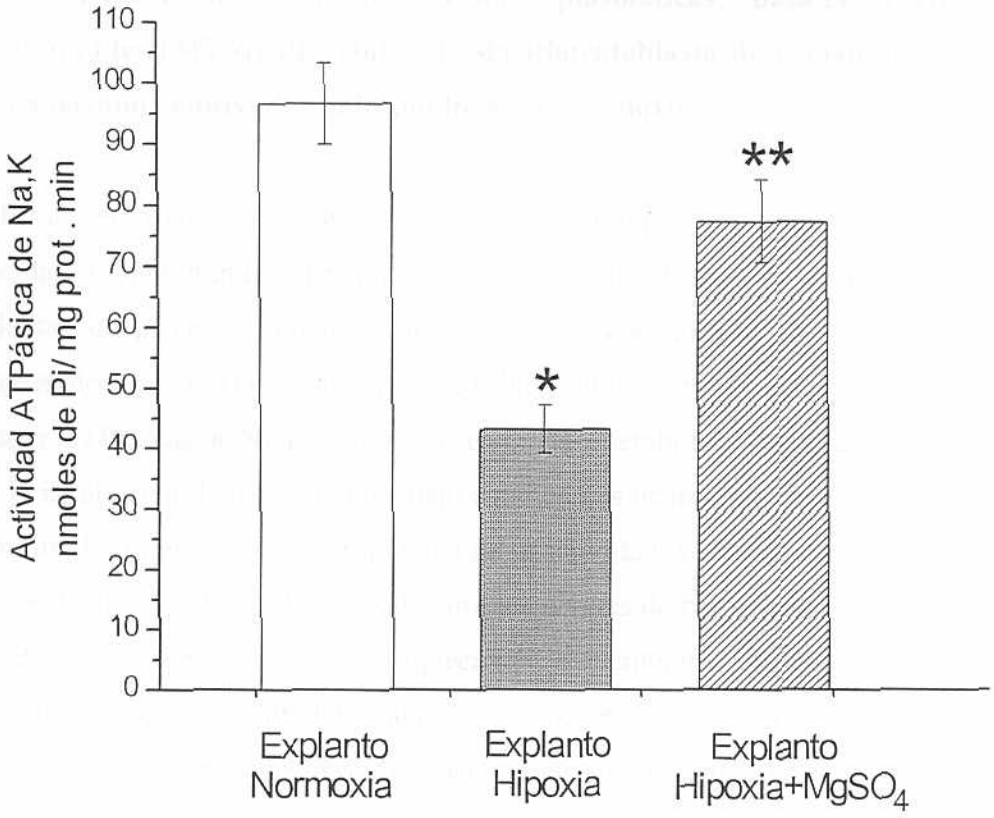


**Figura 10**

Actividad ATPásica de Na,K de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2mM. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia

** p n.s. vs explanto normoxia; $p<0,01$ vs explanto hipoxia

**8.- Efecto del sulfato de magnesio sobre los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y en microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivadas bajo condiciones de hipoxia.**

El aumento en los niveles de peroxidación lipídica, observados en las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales y en membranas de las microvellosidades, de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de hipoxia (ver Figuras 7 y 8), bien pudiese explicar la disminución de las actividades ATPásicas de Na,K observadas en dichas membranas (ver Figuras 5 y 6). Como sea que la incubación de los explantos bajo condiciones de hipoxia, en presencia de sulfato de magnesio, logra prevenir la disminución de la actividad ATPásica de Na,K, resultó muy interesante evaluar el efecto de esta sal sobre los niveles de peroxidación lipídica, medidos como TBARS, en las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales y de microvellosidades. Los resultados obtenidos, se presentan en las Figuras 11 y 12. Tanto para las fracciones enriquecidas en membranas basales, como para las fracciones enriquecidas en membranas de las microvellosidades, la presencia de 2 mM sulfato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos sometidos a hipoxia, se tradujo en un nivel inferior de TBARS que aquel presentado por las membranas de los explantos sometidos a hipoxia en ausencia del magnesio.

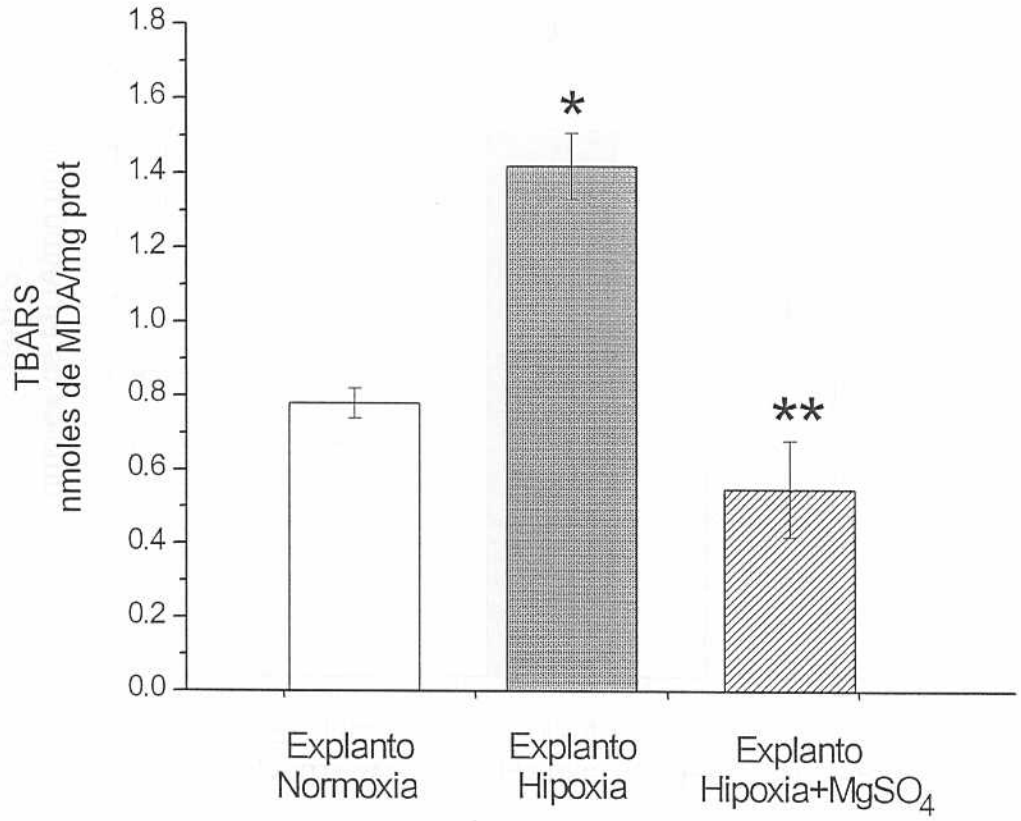


**Figura 11**

Niveles de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37ºC, bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM. Valores expresados como la media ± el error estándar para n=4.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia

** p n.s. vs explanto normoxia; $p<0,01$ vs explanto hipoxia

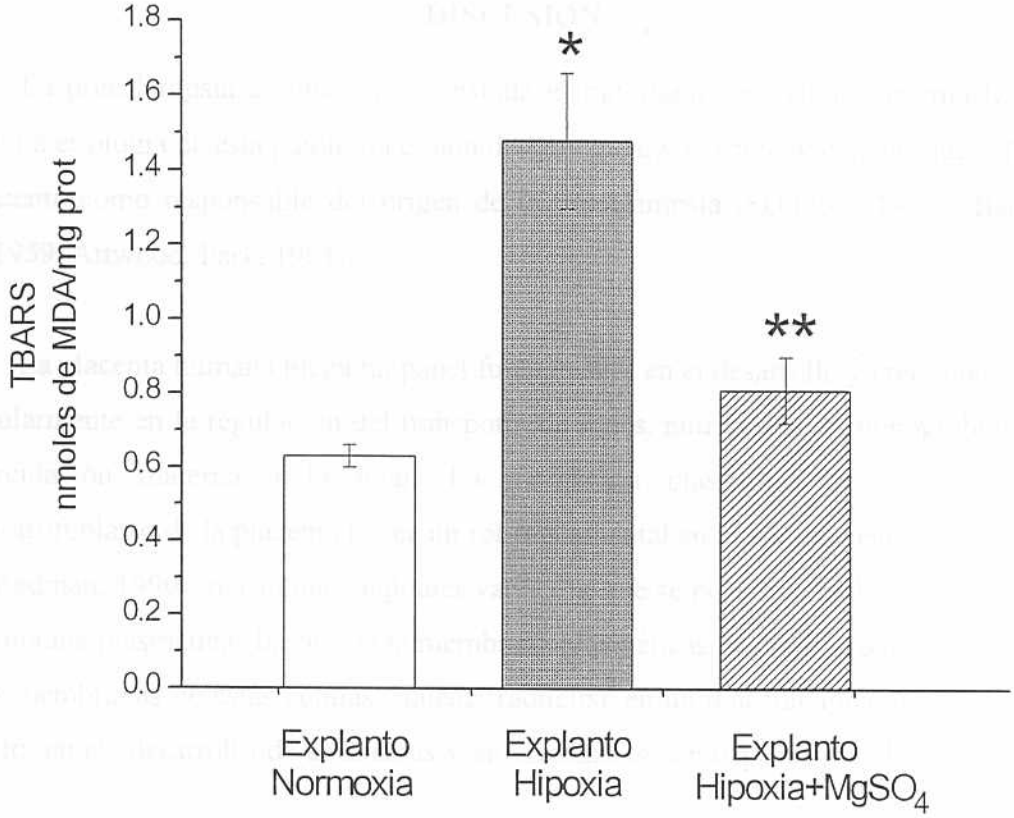


**Figura 12**

Niveles de sustancias reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM) de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37ºC, bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM. Valores expresados como la media ± el error estándar para n=5.

* $p<0,01$ vs explanto normoxia

** p n.s. vs explanto normoxia; $p<0,05$ vs explanto hipoxia

# CAPÍTULO V

## DISCUSIÓN

La preeclampsia es una causa aislada e importante de muerte materna (Zuspan, 1984). La etiología de esta patología es aún desconocida, y existen evidencias que señalan a la placenta como responsable del origen de la preeclampsia (Schmorl, 1978; Badawill, Toy, 1959; Attwood, Park, 1961).

La placenta humana juega un papel fundamental en el desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes e inmunoglobulinas de la circulación materna a la fetal. La membrana plasmática de las células del sincitiotrofoblasto de la placenta posee un rol fundamental en la relación entre la madre y el feto (Redman, 1990), por lo que cualquier variación que se produzca en las propiedades de la membrana plasmáticas basal, de la membrana plasmáticas de las microvellosidades o de ambas membranas de estas células, puede traducirse en un mal funcionamiento celular y, con ello, en el desarrollo de anomalías y enfermedades, tanto para la madre como para el feto.

Por otro lado, un proceso de isquemia-reperfusión o de hipoxia sostenida en un tejido, se ha demostrado que conduce a procesos de peroxidación lipídica en las células de dicho tejido (Halliwell, Gutteridge, 1989). En este particular, se ha comprobado que en mujeres preclámpticas, los niveles de peroxidación lipídica de membranas de células de placenta están elevados (Casart, 1995, Hubel *et al.* 1989), como consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres. Más aún, radicales libres y productos de la peroxidación lipídica pueden pasar a la sangre y, a través de ella, ser transportados a todo el organismo, con lo que el daño puede llegar a generalizarse.

La peroxidación lipídica y sus productos, pueden originar severos daños a proteínas y lípidos de membranas (Desai et al., 1964; Papahadjopoulos, Cowden, & Kimelberg,

1973) y, con ello, puede afectar seriamente el funcionamiento de enzimas de membrana, una de las cuales es la ATPasa de de Na,K.

Motivados por estos hallazgos, en este trabajo se evaluó si el cultivo de explantos placentarios bajo condiciones de hipoxia, se traducía en un incremento en los niveles de peroxidación lipídica de sus membranas celulares y, si estos procesos oxidativos, podían ser capaces de modificar la actividad ATPásica de Na,K de las membranas, tanto del lado de la microvellosidad (lado materno) como del lado basal (lado fetal). Además, se evaluó el efecto de la presencia de $MgSO_4$ en el medio de cultivo de los explantos sometidos a hipoxia, sobre los niveles de peroxidación lipídica y la actividad ATPásica de Na,K.

Después de determinar la existencia de una actividad ATPásica de Na,K en los homogenizados de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término (Tabla I), y de establecer condiciones para eliminar la posible presencia de vesículas en las preparaciones (Figura 4), se procedió a estudiar la actividad ATPásica de Na,K en homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de normoxia (Tabla II) y se comparó con los resultados obtenidos para los homogenizados de placenta fresca (Tabla I). Estos resultados permiten afirmar que la actividad ATPásica de Na,K no se modifica bajo las condiciones del cultivo de explanto placentario.

Al medir la actividad ATPásica de Na,K de membranas plasmáticas basales (MB) y de las microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia (Tabla III), se pudo observar como esta enzima muestra un cierto grado de enriquecimiento aparente en ambas fracciones, indicando que la enzima se encuentra en ambas caras de la célula. Esto coincide con lo encontrado con el grupo de Johansson (Johansson et al., 2000), quienes demostraron que las dos fracciones (membranas basales y membranas de las microvellosidades), muestran un cierto grado de enriquecimiento de la actividad ATPásica de Na,K, (relación actividad fracción/actividad HT), lo cual les permitió concluir que la enzima se encuentra en las dos caras del sincitiotrofoblasto. Un detalle que necesita ser analizado lo constituye

el hecho de que el factor aparente de enriquecimiento de la enzima se ve mayor en MVM que en MB. Si bien esto pareciera indicar que se está purificando más una fracción que la otra, nosotros no creemos que eso sea lo que está sucediendo. Si bien no podemos probarlo con los datos que tenemos a mano, lo más probable es que, como ya establecido por Johansson (2000), el número de ATPasas presentes en las MVM es mayor que las presentes en la MB y por ende, las fracciones purificadas en MVM presentan una actividad ATPásica de Na,K mayor que las fracciones purificadas en MB. Esto, por supuesto, siempre y cuando la velocidad de reciclaje de la enzima sea la misma en ambas caras de las células, lo cual es probable, ya que en ambas se ha descrito la presencia de la isoforma $\alpha_1$ de la ATPasa de Na,K (Johansson et al., 2000).

Cuando se evaluó el efecto de la hipoxia placentaria sobre la actividad ATPásica de Na,K de membranas plasmáticas basales (MB) y de las microvellosidades (MVM), se encontró (Figuras 5 y 6) que este proceso ocasiona una disminución diferencial de la actividad ATPásica en las dos membranas, siendo relativamente mayor la inhibición para la actividad en las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas basales que en las fracciones enriquecidas de membranas plasmáticas de microvellosidades (65±2% MB vs 55±2% MVM, n=5, p<0,02).

La disminución de la actividad ATPásica de Na,K podría ser consecuencia de un aumento de la peroxidación lipídica de las membranas con la hipoxia placentaria. En este particular, efectivamente, la hipoxia placentaria ocasionó un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en ambas membranas (Figuras 7 y 8). Ahora bien, como sea que los valores de TBARS que se encontraron en ambas membranas provenientes de explantos sometidos a hipoxia, fueron similares (1,42±0,09 nmoles MDA/mg prot MB vs 1,48±0,18 nmoles MDA/mg prot MVM, n=4, p n.s.), se pudiera postular que la ATPasa de Na,K de MB es más sensible a la peroxidación lipídica que esta enzima en MVM. Una explicación a este fenómeno, puede ser derivada del hecho de que el daño inducido por la peroxidación lipídica a los componentes de membrana, es consecuencia de distintos efectos, tales como: cambios en los fosfolípidos de la membrana, cambios en la fluidez de la membrana celular y/o efecto inhibitorio de los lisofosfolípidos. En este particular, resulta interesante resaltar

que se ha reportado que MB presenta una dominancia de residuos de ácidos grasos insaturados, mientras que MVM presenta una dominancia de residuos de ácidos grasos saturados (Powell et al., 1999), lo que conlleva a una interacción lípido-proteína entre la ATPasa de Na,K y su entorno diferente para cada membrana. Esto pudiera explicar por qué, a pesar de tener las dos membranas niveles de peroxidación lipídica similares luego de la hipoxia placentaria, la ATPasa de Na,K de MB sea más sensible que la de MVM a estos cambios: al encontrarse inmersa en un entorno lipídico más insaturado, las relaciónes lípido – proteína se verán mayormente afectadas, lo que conducirían a un mayor efecto sobre la actividad de la enzima.

Del mismo modo, se evaluó el efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas basales y en membranas de microvellosidades de explantos de placenta humana cultivados bajo condiciones de hipoxia. Para ello, se cultivaron explantos durante 18 horas a 37°C, bajo condiciones de hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio, a una concentración final de 2 mM. Los resultados indicaron que los explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio, presentan actividades ATPásicas de Na,K mayores a las encontradas en las preparaciones de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en ausencia de esta sal y parecidas a las obtenidas con preparaciones de explantos controles, cultivados bajo condiciones de normoxia. Resultados similares han sido reportados para fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas, donde la actividad ATPásica de calcio retorna a valores similares a los observados en las gestantes norotensas 24 horas después del tratamiento *in* vivo con sulfato de magnesio.

En nuestro modelo, la presencia del sulfato de magnesio pareciera estar protegiendo a las membranas plasmáticas del daño mediado por radicales libres, evitando que los niveles de peroxidación lipídica incrementen con la hipoxia, protegiendo así la integridad de la membrana y, con ello, preservando la actividad ATPásica de Na,K.

Por otro lado, también ha sido reportado que el tratamiento con $MgSO_4$ modifica los niveles de peroxidación lipídica (medida como dienos conjugados y TBARS) de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes preeclámpticas, para las cuales, 24 horas después de iniciada la terapia, éstos parámetros muestran valores similares a aquellos observados en las controles normotensas. Efectos similares a los producidos por del tratamiento *in vivo* con $MgSO_4$, también se observan cuando glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas sin tratamiento, son incubados *in vitro* con $MgSO_4$ por 24 horas a 4ºC.

Hallazgos similares han sido reportados por Maulik y colaboradores (Maulik et al., 2001). Este grupo ha demostrado que la hipoxia cerebral en cobayos, produce un incremento en los niveles de peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas de este tejido, y disminuye la actividad de la ATPasa de Na,K del mismo. Asimismo, el tratamiento post-hipoxia con magnesio, revierte estos efectos, regresando los niveles de peroxidación lipídica de las membranas y la actividad ATPásica de Na,K de las mismas a sus valores normales.

Se ha demostrado que la deficiencia de $Mg^{2+}$ está asociada con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, y con una importante reducción en los niveles de glutatión celular (Zhou et al., 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que la administración de $Mg^{2+}$ revierte estos efectos (Dickens et al., 1992, Maulik et al., 2001). Estos resultados han sido explicados considerando que el $Mg^{2+}$, al unirse a los receptores de NMDA, estaría disminuyendo el influjo de $Ca^{2+}$ hacia las células, afectando de esta forma las vías de generación de radicales libres estimuladas por calcio, tales como fosfolipasas, lipooxigenasas y ciclooxigenasas (Lipton & Nicotera, 1998, Lipton & Rosenberg, 1994). Más aún, la síntesis de glutatión, un importante antioxidante celular y sustrato de la glutatión peroxidasa, es dependiente de $Mg^{2+}$, por lo que oscilaciones en las concentraciones de $Mg^{2+}$ modificarían el nivel de oxidación celular. Finalmente, hay que destacar el hecho de que se ha observado un efecto antioxidante del $MgSO_4$, inyectado intravenoso a pacientes con intoxicaciones con fosfuro de aluminio (Chugh et al., 1997). Este efecto, pudiera ser debido a la capacidad del ión de incrementar los niveles de glutatión circulante.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo con el sulfato de magnesio son de gran importancia. El sulfato de magnesio, usado desde hace más de 60 años como terapia y profilaxis contra las convulsiones eclámpticas (Scardo et al., 1995), ha llegado a ser el tratamiento estándar de las mismas en los últimos 30 años y está asociado con una dramática reducción de la morbilidad materno y neonatal relacionada con eclampsia (Pritchard & Stone, 1967). En este trabajo, demostramos que la presencia de 2 mM sulfato de magnesio en el medio de cultivo de explantos de placenta sometidos a hipoxia, es suficiente para prevenir el aumento en los niveles de peroxidación lipídica de sus membranas celulares, tanto de MB como de MVM, que se produce con la hipoxia (Figuras 11 y 12) y, con ello, evitar la disminución de la actividad ATPásica de Na,K de estas membranas (Figuras 9 y 10). Analizando más profundamente este efecto, consideremos el posible papel del $MgSO_4$ como agente antioxidante, ya que el mismo puede ser potencialmente importante desde el punto de vista clínico. Es un hecho conocido que el tratamiento con $MgSO_4$, aumenta la capacidad antioxidante de los plasmas de las pacientes preeclámpticas (Abad, 2005). Este efecto puede producirse por alguna capacidad del $Mg^{2+}$ de interactuar directamente con radicales hidroxilos, disminuyendo así los procesos oxidativos mediados por la reacción de Fenton en las gestantes preeclámpticas. En este particular, se ha propuesto que el $Mg^{2+}$ puede disminuir la severidad del daño neuronal y endotelial que se produce en los procesos de isquemia-reperfusión, a través de la inhibición directa de la peroxidación lipídica y el mantenimiento de los niveles celulares de glutatión (Dickens et al., 1992, Regan et al., 1998).

En el sincitiotrofoblasto, como en la gran mayoría de células eucarióticas, la ATPasa de Na,K es responsable por el mantenimiento de una baja concentración de sodio intracelular. Gracias a su actividad, las células son capaces de mantener un gradiente electroquímico para este ión, el cual es vital para una serie de funciones celulares, como captación de nutrientes, regulación del pH y del calcio celular, propagación de señales nerviosas y regulación del volumen intracelular (Johansson et al., 2000; Maxwell et al., 1998; Rabini et al., 1996; Sibley et al., 2002). A diferencia de la mayoría de las células, en las cuales la ATPasa de Na,K se distribuye de forma más o menos uniforme por toda la

membrana plasmática, en las células epiteliales, su distribución está polarizada fundamentalmente hacia la membrana laterobasal. Esto es característico de epitelios de transporte clásico, como riñón e intestinos. Sin embargo, como visto en este trabajo y ya demostrado por otros autores (Johansson et al., 2000), en el sincitiotrofoblasto de placenta, la ATPasa de Na,K se localiza en ambas membranas plasmáticas, siendo su actividad mayor en la membrana plasmáticas de las microvellosidades (lado materno), que en la membrana plasmática basal (lado fetal). Por consiguiente, el sincitiotrofoblasto representa un epitelio de excepción en cuanto a la distribución de la ATPasa de Na,K, así como en el manejo transepitelial del transporte de $Na^+$.

En estudios de flujos unidireccionales de $Na^+$ a través de las células placentarias del sincitiotrofoblasto, se ha demostrado que el flujo unidireccional de $Na^+$ hacia el feto es de 10-100 veces mayor que la tasa de captación del ión por el feto (Stulc, 1997). Esto significa que casi todo el $Na^+$ transferido hacia el feto regresa a la madre, lo que equivale a decir que el movimiento transepitelial de $Na^+$ es bidireccional y bastante simétrico.

La concentración de sodio en el plasma fetal no es significativamente diferente de la concentración del ión en el plasma materno, aunque puede ser ligeramente inferior, por lo que no hay una obvia necesidad de que el sodio sea transportado activamente desde el lado materno hacia el lado fetal (Stulc, 1997). No obstante, a semejanza de otras células vivientes, las membranas plasmáticas de las células del sincitiotrofoblasto poseen diversos sistemas de transporte de $Na^+$, que participan en la transferencia de nutrientes hacia el feto, o en la manutención de la homeostasis de su citoplasma (Johansson et al., 2000; Maxwell et al., 1998; Rabini et al., 1996; Sibley et al., 2002). La actividad de los transportadores de $Na^+$ con aminoácidos o el intercambio $Na^+/H^+$, se ha demostrado que es mayor en la membrana de las microvellosidades (lado materno) que en la membrana plasmática (lado fetal) (Sibley et al., 2002). Aunque, como dicho, existen varios mecanismos por los cuales el ión $Na^+$ puede penetrar al sincitiotrofoblasto, la expulsión del ión del mismo, para mantener el gradiente necesario para todos los co- y contratransportes que dependen de él, estaría basada en un mecanismo: la ATPasa de Na,K, la cual está presente en las membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto, tanto de lado materno como del lado fetal.

Una variación en el mecanismo de expulsión de $Na^+$ de las células del sincitiotrofoblasto, bien sea por la cara materna, bien sea por la cara fetal, o bien por ambas caras, pudiera traducirse en situaciones graves para la célula y con ello, para el feto, no solamente para la regulación de la concentración del ión por el lado fetal, sino también para la captación de nutrientes, muchos de los cuales dependen, en última instancia, del gradiente de $Na^+$ de las células del sincitiotrofoblasto. En este sentido, se ha reportado que pacientes preeclámpticas pueden presentar complicaciones maternas que incluyen aborto, abruptio placentario y parto pretérmino. Entre las complicaciones fetales y neonatales se presentan prematuridad y recién nacido de bajo peso, que según la OMS correspondería a recién nacidos con menos de 2500 g de peso. En el desarrollo de estos efectos, pudiera jugar un papel importante la actividad ATPásica de Na,K, ya que al afectarse la misma, se afecta de manera directa la actividad de sistemas de transporte de nutrientes hacia el feto, cuya fuerza depende del gradiente de $Na^+$, generado por la actividad de la ATPasa de Na,K, a través de la membrana plasmática.

# CONCLUSIONES

Los hallazgos presentados en el presente trabajo, nos permiten concluir que la actividad de la ATPasa de Na,K se ve afectada por la hipoxia placentaria. Este efecto se encontró, tanto en membrana basal (MB) como en membrana de microvellosidad (MVM). También podemos concluir que la disminución de la actividad ATPásica, resulta como consecuencia de un proceso de peroxidación lipídica de las membranas celulares donde ella está inserta.

El hecho de que, según encontrado en el presente trabajo para la ATPasa de Na,K, el lado materno del sincitiotrofoblasto es más resistente a la peroxidación lipídica que el lado fetal, pudiera traducirse como un mecanismo de defensa que permitiría a la célula seguir captando por el lado materno nutrientes cuya entrada a la célula es dependiente del gradiente de $Na^+$, aún en condiciones de peroxidación lipídica de sus membranas, para las cuales el lado fetal ya ha sido afectado.

El efecto de el sulfato de magnesio sobre la actividad ATPasa de Na,K y los niveles de peroxidación lipídica en explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, puede ser indicativo de que esta sal tiene, entre otros, un papel como agente antioxidante removiendo radicales libres. Esto le permitiría prevenir la peroxidación lipídica que se produciría de lo contrario y, con ello, mantener en valores normales la actividad de la ATPasa de Na,K.

# BIBLIOGRAFÍA

(1939-1993). Servicio de Estadística y Archivo. Caracas: Maternidad "Concepción Palacios".

(1988). Boletín Anual. Caracas: Maternidad "Concepción Palacios".

Abad, C. (2005). Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de $Ca^{2+}$ y la peroxidación lipidia en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclampticas. Tesis de grado, Dr. en Ciencias.CEA, IVIC.

Aceves, J. (1977). Pumped movements of sodium and potassium ions in the isolated epithelium of the frog skin. *Pflügers Arch., 371*, 201-209.

Alton, B. H. & Lincoln, G. C. (1925). Citado por McCall y Sass, 1956. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 9, 167.

Attwood, H.D., Park, W.W. (1961). Embolism to the lungs by trophoblast. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Comm.,* 68: 611-617.

Bardawill, W.A., Toy, R.L. (1959). The natural history of choriocarcinoma. Problems of immunity and spontaneous regression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* 80:197-261.

Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol, 275*(5 Pt 2), F633-650.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem., 72*, 248-254.

Carrera, F., Casart, Y., Proverbio, T., Proverbio, F., & Marín, R. (2003). Preeclampsia and calcium-ATPase activity of plasma membranes from human myometrium and placental trophoblast. *Hypertens. Pregnancy, 22*, 295-304.

Casart, Y.C. (1995). Caracterización de la ATPasa de $Ca^{2+}$ de membrana plasmática de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término de pacientes control y preclámpticas. Trabajo de grado, Mg. Sc., CEA, IVIC.

Cavanagh, D. & Knuppel, R. (1992). Obstetricia y perinatología. Principios y práctica., Primera edn, pp. 1276-1280. Editado por L. Iffy & H. A. Kaminetzky. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Chesley, L. C. (1979). Parenteral magnesium sulfate and the distribution, plasma levels, and excretion of magnesium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **133**, 1-7.

Consensus (1990). Consensus Report: National High Pressure Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **163**, 1689-1712.

Davison, J. M., Homuth, V., Jeyabalam, A., Conrad, K. P., Karumanchi, S. A., Quaggin, S., Dechend, R. & Luft, F. C. (2004). New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2440 - 2448.

Desai, I. D., Sawant, P. L., & Tappel, A. L. (1964). Peroxidative And Radiation Damage To Isolated Lysosomes. *Biochim Biophys Acta, 86*, 277-285.

Dickens, B. F., Weglicki, W. B., Li, Y. S. & Mak, I. T. (1992). Magnesium deficiency *in vitro* enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett.* **311**, 187-191.

Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS, 15*, 129-135.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*.Oxford, U.K.: Clarendon Press.

Henninger, R. W. & Horst, J. (1997). Magnesium toxicosis in two horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **211**, 82-85.

Hubel, C. A., Roberts, J. M., Taylor, R. N., Musci, T. J., Rogers, G. M., & McLaughlin, M. K. (1989). Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am.J.Obstet.Gynecol., 161*, 1025-1034.

Illsley, N. P., Wang, Z. Q., Gray, A., Sellers, M. C., & Jacobs, M. M. (1990). Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim Biophys Acta, 1029*(2), 218-226.

Jansson, T., Ylven, K., Wennergren, M., & Powell, T. L. (2002). Glucose transport and system A activity in syncytiotrophoblast microvillous and basal plasma membranes in intrauterine growth restriction. *Placenta, 23*(5), 392-399.

Johansson, M., Jansson, T., & Powell, T. L. (2000). Na(+) -K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 279*(1), R287-294.

Kamath, S. G., & Smith, C. H. (1994). Na+/Ca2+ exchange, Ca2+ binding, and electrogenic Ca2+ transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast. *Pediatr Res, 36*(4), 461-467.

Kaplan, J. H. (1983). Sodium ions and the sodium pump: transport and enzymatic activity. *Am. J. Physiol., 245*, G327-G333.

Kaptanoglu, E., Beskonakli, E., Okutan, O., Surucu, S. & Taskin, Y. (2003). Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *J. Clin. Neurosci.* **10**, 329-334.

Katz, A. I. (1982). Renal Na-K-ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport. *Am. J. Physiol., 242*(3), F207-F219.

Kharfi, A., Giguere, Y., Sapin, V., Masse, J., Dastugue, B. & Forest, J. C. (2003). Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin. Biochem.* **36**, 323-331.

Kiil, F. (1978). Principles of active sodium reabsorption in the kidney. *Scand. J. Clin. Lab. Invest., 38*, 597-602.

Kovac, C. M., Howard, M. D., Pierce, B. T., Hoeldtke, N. J., Calhoun, B. C. & Napolitano, P. G. (2003). Fetoplancetal vascular tone is modified by magnesium sulfate in the preeclamptic ex vivo human placental cotyledon. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **189**, 839-842.

Kuban, K. C., Leviton, A., Pagano, M., Fenton, T., Strassfeld, R. & Wolff, M. (1992). Maternal toxemia is associated with reduced incidence of germinal matrix hemorrhage in premature babies. *J. Child Neurol.* **7**, 70-76.

LaFond, R. E., Kennedy, S. W., Harrison, R. W., & Villee, C. A. (1988). Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptors in cells, cytoplasts, and nucleoplasts. *Exp Cell Res, 175*(1), 52-62.

Lang-Lazdunski, L., Heurteaux, C., Dupont, H., Widmann, C. & Lazdunski, M. (2000). Prevention of ischemic spinal cord injury: comparative effects of magnesium sulfate and riluzole. *J. Vasc. Surg.* **32**, 179-189.

Langman, J. (1976). *Embriología médica. Desarrollo humano normal y anormal.*México: Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V.

Lazard, E. M. (1925). A preliminary report on the intravenous use of magnesium sulphate in puerperal eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **9**, 178-188.

Lechene, C. (1988). Overview: Physiological role of the Na-K pump. In J. C. Skou, J. G. Nørby, A. B. Maunsbach & M. Esmann (Eds.), *The $Na^+$,$K^+$-pump. Part B: Cellular Aspects* (pp. 171-194). New York: Alan R. Liss, Inc.

Lindheimer, M. & Katz, A. (1985). Hypertension in pregnancy. *N. Eng. J. Med.* **313**, 675-680.

Lipstein, H., Lee, C. C. & Crupi, R. S. (2003). A current concept of eclampsia. *Am. J. Emerg. Med.* **21**, 223-226.

Lucas, M. J., Leveno, K. J. & Cunningham, F. G. (1995). A comparison of magnesium sulfate with phenytoin for the prevention of eclampsia. *N. Engl. J. Med.* **333**, 201-205.

MacGillivray, I. (1958). Some observations on the incidence of preeclampsia. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.* **65**, 536-539.

Marín, R., Proverbio, T., Rodríguez, A., & Tiskow, G. (1993). Peroxidación lipídica y actividades ATPásicas. *Act Cient Venez, 44*, 125-130.

Marín, R., Rodríguez, A. J., & Proverbio, T. (1992). Partial characterization of the inhibitory effect of lipid peroxidation on the ouabain-insensitive Na-ATPase of rat kidney cortex plasma membranes. *J. Bioenerg. Biomembr., 24*(3), 329-335.

Matteo, R., Proverbio, T., Córdova, K., Proverbio, F., & Marín, R. (1998). Preeclampsia, lipid peroxidation, and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghost. *Am. J. Obstet. Gynecol., 178*, 402-408.

Maxwell, C. V., Tao, Q. F., Seely, E. W., Repke, J. T., & Graves, S. W. (1998). Regulation of the sodium pump in pregnancy-related tissues in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol, 179*(1), 28-34.

Mendoza, M. (2004). Peroxidación lipídica y actividad de la ATPasa de Na,K en membrana plasmática de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana. Trabajo de Grado, Mg. Sc., CEA, IVIC.

McCarty, M. F. (1996). Complementary vascular-protective actions of magnesium and taurine: a rationale for magnesium taurate. *Med. Hypotheses* **46**, 89-100.

Miller R., Genbacev O. , Turner M., Aplin J., Caniggia I., & Huppertz B. (2004). Human Placental Explants in Culture: Approaches and Assessments. *Current Topic*, 26, 439-448.

Nardulli, G., Proverbio, F., Limongi, F. G., Marín, R., & Proverbio, T. (1994). Preeclampsia and calcium adenosine triphosphatase activity of red blood cell ghosts. *Am. J. Obstet. Gynecol., 171*, 1361-1365.

Nelson, K. B. & Grether, J. K. (1995). Can magnesium sulfate reduce the risk of cerebral palsy in very low birthweight infants? *Pediatrics* **95**, 263-269.

Ness, R. B. & Roberts, J. M. (1996). Heterogeneous causes constituing the single syndrome of preeclampsia: A hypothesis and its implications. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **175**, 1365-1370.

Ohta, A., Mohri, T., & Ohyashiki, T. (1989). Effect of lipid peroxidation on membrane-bound $Ca^{2+}$-ATPase activity of the intestinal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta, 984*, 151-157.

Ohyashiki, T., Ohtsuka, T., & Mohri, T. (1986). A change in the lipid fluidity of the porcine intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. Studies using pyrene and fluorescent stearic acid derivatives. *Biochim Biophys Acta, 861*(2), 311-318.

Page, E. W. (1939). The relation between hydatid moles, relative ischemia of the gravid uterus, and the placental origin of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **37**, 291-293.

Papahadjopoulos, D., Cowden, M., & Kimelberg, H. (1973). Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta, 330*(1), 8-26.

Peker, S., Abacioglu, U., Sun, I., Konya, D., Yüksel, M. & Parmir, N. M. (2004). Prophylactic effects of magnesium and vitamin E in rat spinal cord radiation damage: evaluation based on lipid peroxidation leves. *Life Sci.* **75**, 1523-1530.

Piering, W. F., Garancis, J. G., Becker, C. G., Beres, J. A. & Lemann, J. (1993). Preeclampsia related to a functióning extrauterine placenta: report of a case and 25-year follow-up. *Am. J. Kidney Dis.* **21**, 310-313.

Powell, T.L., Jansson, T., Illsley, N.P., Wennergren, M., Korotkova, M, Strandvik, B. (1999). Composition and permeability of syncytiotrophoblast plasma membranes in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Biochim. Biophys. Acta* **1420**, 86-94.

Proverbio, F., & del Castillo, J. R. (1981). $Na^+$-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta, 646*, 99-108.

Proverbio, F., Proverbio, T., & Marín, R. (1986). $Na^+$-ATPase is a different entity from the ($Na^+$+$K^+$)-ATPase in rat kidney basolateral plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta, 858*, 202-205.

Rabini, R. A., Zolese, G., Staffolani, R., Lucarelli, G., Amler, E., Cester, N., et al. (1996). $Na^+$,$K^+$-ATPase of human placenta during gestational hypertension: a biochemical-biophysical study. *Clin. Sci., 91*(6), 719-723.

Redman, C. W. G. (1990). The fetal allograft. *Fetal Med. Rev., 2* , 21-27.

Rice-Evans, C., Baysal, E., Pashby, D. P., & Hochstein, P. (1985). t-butyl hydroperoxide-induced perturbations of human erythrocytes as a model for oxidant stress. *Biochim. Biophys. Acta, 815*(3), 426-432.

Roberts, J. M. (1984). Pregnancy related hypertension. En *Maternal-fetal medicine: Principles and practice*. Editado por R. K. Creasy & R. Resnik. Philadelphia: WB Saunders.

Roberts, J. M. (1998). Endothelial dysfunctions in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16**, 5-15.

Roberts, J. M. & Cooper, D. W. (2001). Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* **357**, 53-56.

Roberts, J. M. & Redman, C. W. G. (1993). Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* **341**, 1447-1451.

Robillard, P. Y. (2002). Interest in preeclampsia for researches in reproduction. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 279-287.

Robillard, P. Y., Hulsey, T. C., Dekker, G. A. & Chaouat, G. (2003). Preeclampsia and human reproduction. An essay of a long term reflection. *J. Reprod. Immunol.* **59**, 93-100.

Scardo, J. A., Hogg, B. B. & Newman, R. B. (1995). Favorable hemodynamic effects of magnesium sulfate in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 1249-1253.

Sibai, B., Gordon, T., Thon, E., Caritis, S., Klebanoff, M., McNellis, D. & Paul, R. (1995). Risk factors for preeclampsia in healthy nuliparous women: A prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **172**, 642-648.

Sibley, C. P., Glazier, J. D., Greenwood, S. L., Lacey, H., Mynett, K., Speake, P., et al. (2002). Regulation of placental transfer: the Na(+)/H(+) exchanger--a review. *Placenta, 23 Suppl A*, S39-46.

Silver, R. K., Turbov, J. M., Beaird, J. A., & Golbus, J. (1990). Soluble factors produced by isolated first-trimester chorionic villi directly inhibit proliferation of T cells. *Am J Obstet Gynecol, 163*(6 Pt 1), 1914-1919.

Senior, K. (2001). A possible molecular explanation for pre-eclampsia. *Lancet* **357**, 1857.

Stulc, J. (1997). Placental transfer of inorganic ions and water. *Physiol Rev, 77*(3), 805-836.

Taber, E. B., Tan, L., Chao, C. R., Beall, M. H. & Ross, M. G. (2002). Pharmacokinetics of ionized versus total magnesium in subjects with preterm labor and preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **186**, 1017-1021.

Vanhoutte, P., Rubanyi, G., Miller, V. & Houston, D. (1986). Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann. Rev. Physiol.* **43**, 307-320.

Villar, K., Say, L., Gülmezoglu, A. M., Merialdi, M., Lindheimer, M. D., Betran, A. P. & Piaggio, G. (2003). Eclampsia and pre-eclampsia: a health problem for 2000 years. *Preeclampsia*, pp. 189-207. Editado por M. A. Critchley H, Poston L, Walker JJ. London: RCOG Press.

Walsh, S. W., Romney, A. D., Wang, Y. & Walsh, M. D. (1998). Magnesium sulfate attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **178**, 7-12.

Watson, K. V., Moldow, C. F., Ogburn, P. L. & Jacob, H. S. (1986). Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 1075-1078.

Wolf, A., Saito, T., Dudek, R., Bing, R. J. (1991). The effect of lysophosphatidylcoline on coronary and renal circulation in the rabbit. *Lipids*, 26: 223-226.

Zeeman, G.G., Dekker, G.A (1992). Patogenia de la preeclampsia: Una hipótesis. *Clínicas Obstétricas y Ginecológicas.*, 2: 311-351.

Zuspan, F. P. (1966). Treatment of severe preeclampsia and eclampsia. *Clin Obstet Gynecol* **9**, 954-972.