AAB 9942

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

EFECTO DE LA HIPOXIA EN EXPLANTOS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO DE GESTANTES NORMOTENSAS SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} Y NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANA DE MICROVELLOSIDAD (LADO MATERNO) Y MEMBRANA BASAL (LADO FETAL) DE SINCITIOTROFOBLASTO

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

Autora: Rebeca C. Caires Mugarra

Tutor: Dr. Reinaldo Marín

Co-Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio

Caracas, Septiembre de 2007

CARTA DE APROBACIÓN

En mi carácter de Tutor del Trabajo Especial de Grado titulado: "Efecto de la hipoxia en explantos de placenta humana a término de gestantes normotensas sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+}y niveles de peroxidación lipídica en membrana de microvellosidad (lado materno) y membrana basal (lado fetal) de sincitiotrofoblasto" realizado por la bachiller Rebeca C. Caires Mugarra para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Biología y Química, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas a los once días del mes de Septiembre de 2007

Conforme,

Dr. Reinaldo Marín
Tutor
C.I. 4.245.480

Dr. Fulgencio Proverbio
Cotutor
C.I. 4.812.508

A mis papás con un inmenso amor y gratitud

A Mafe por su cariño, apoyo y alegría

A José por su comprensión y apoyo

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Reinaldo Marín, tutor y guía en todo momento. Gracias por compartir sus conocimientos, útiles consejos y tiempo.
- Al Dr. Fulgencio Proverbio, maestro que con sabiduría y cariño guió mis pasos para la realización de ésta meta. Mil gracias por todo y por su confianza.
- A la Sra. Teresa, por llenar el laboratorio de alegría y por el cariño brindado.
- A Cilia, por el apoyo y guía constante durante este tiempo. Gracias por lo enseñado.
- A Maricarmen por su incondicional apoyo, cariño, atención y tiempo dedicado. Gracias por la confianza. Muchas gracias y cariños.
- A Rafael Muñíz, por sus enseñanzas, consejos y anécdotas históricas. Su personalidad y pasión por la ciencia y lo nuevo, llegaron a mí influyendo en mi vida.
- A Eri Luz, por ser amiga y profesora, y por sus amplios conocimientos impartidos de anatomía.
- A Sandy, Ángel e Indira, por su amistad, ayuda, consejos y enseñanzas; además del buen humor que brindaban.
- A Andrés, un amigo constante. Gracias por el cariño, apoyo y consejos.
- A mis demás compañeros Desireé, Daniel, Freedy, Deliana y Hemely, por la amistad, apoyo incondicional y todos los buenos momentos juntos. Siempre estarán presentes.
- A todos mis amigos de la universidad por la amistad, apoyo y muy buenos recuerdos juntos durante este tiempo.
- A la Universidad Católica Andrés Bello (U.C.A.B.). Por las enseñanzas, experiencias y oportunidades brindadas desde el inicio de mi carrera.
- Al Comité de Bioética del I.V.I.C.
- Al Comité de Ética de la Maternidad Concepción Palacios.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.).
- Al Centro de Estudios Avanzados (C.E.A.).

ÍNDICE GENERAL

		Página
DEDICATORIA		iii
AGRADECIMIENTO		iv
LISTA DE TABLAS		vii
LISTA DE FIGURAS		viii
RESUMEN		x
INTRODUCCIÓN		1
CAPÍTULO I		3
	Planteamiento del problema	3
	Justificación de la investigación	5
	Objetivo General	7
	Objetivos Específicos	7
CAPÍTULO II		9
	Marco Teórico	9
CAPÍTULO III		21
	Metodología	21
1	Placentas Humanas	21
2	Preparación de Explantos	21
3	Homogenizados de Placenta Humana	22
4	Preparación de membranas plasmáticas de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana	22
5	Aislamiento de Membranas Plasmáticas de Microvellosidad (MVM) de placenta huma	23
6	Aislamiento de Membranas Plasmáticas Basales (MB) de placenta humana	25
7	Preincubación de membranas con SDS	25
8	Determinación de Proteínas	25
9	Actividad ATPásica de Ca^{2+}	26
10	Determinación de niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	28

11 Análisis Estadístico..... 28
CAPÍTULO IV..... 30
Resultados..... 30
1 Evaluación de la integridad de los explantos de placenta humano a término, mediante microscopía óptica..... 32
2 Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia..... 32
3 Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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
4 Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Ca^{2+} de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término..... 37
5 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..... 39
6 Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} 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..... 43
7 Efecto del sulfato de magnesio 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, cultivadas bajo condiciones de hipoxia..... 46
CAPÍTULO V..... 53
Discusión..... 53
Conclusiones..... 59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 60

LISTA DE TABLAS

TABLA

Página

I Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizado de explantos de placenta humana a término cultivados durante 18 horas a 37°C..... 36

II Actividad ATPásica de Ca^{2+} y factor de enriquecimiento aparente de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de explanto de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de normoxia..... 38

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

Página

1. Preparación y separación de membranas plasmáticas de microvellosidades y de membranas plasmáticas basales de sincitiotrofoblasto de placenta humana. 24
2. Fotografías de cortes histológicos de Vellosidades Coriónicas provenientes de placenta humana a término coloreados con hematoxilina/eosina..... 34
3. Actividad ATPásica de Ca^{2+} de 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..... 41
4. Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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..... 42
5. 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 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia..... 44
6. 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..... 45
7. Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio, 2 mM..... 47

8. Actividad ATPásica de Ca^{2+} de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidad (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, 2 mM..... 48

9. 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 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio, 2 mM..... 50

10. Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de las microvellosidades (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..... 51

11. Comparación del porcentaje de inhibición de las actividades ATPásica de Na,K y de Ca^{2+}, de membranas plasmáticas basales (panel A) y de las microvellosidades (panel B)..... 52

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

Trabajo especial de grado para optar al Título de Licenciado en Educación
Mención Biología y Química

EFECTO DE LA HIPOXIA EN EXPLANTOS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO DE GESTANTES NORMOTENSAS SOBRE LA ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+}Y NIVELES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN MEMBRANA DE MICROVELLOSIDAD (LADO MATERNO) Y MEMBRANA BASAL (LADO FETAL) DE SINCITIOTROFOBLASTO

Autora: Rebeca Caires Mugarra
Tutor: Dr. Reinaldo Marín
Cotutor: Dr. Fulgencio Proverbio
Fecha: Septiembre 2007

RESUMEN

La preeclampsia se caracteriza por una elevación de la presión arterial, proteinuria, vasoespasmo arterial generalizado y edema; apareciendo generalmente luego de las 20 semanas de gestación. En esta enfermedad hay una hipoperfusión úteroplacentaria, la cual provoca hipoxia placentaria y con ello se elevan los procesos de peroxidación lipídica en el mismo tejido. La elevación de la peroxidación lipídica conduce a una disminución de la fluidez de membrana y con ello se afecta a varias enzimas de la membrana plasmática como la ATPasa de Ca^{2+}. La actividad de esta ATPasa está disminuida en el sinciciotrofoblasto de gestantes preeclámpticas. En el presente trabajo se determinó el efecto de la hipoxia en explantos de placenta humana a término, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y los niveles de peroxidación lipídica de membranas plasmáticas de sinciciotrofoblasto. Para ello, se prepararon explantos placentarios de gestantes

normotensas a término y, se incubaron bajo condiciones de normoxia o hipoxia durante 18 horas a 37°C. Luego se aislaron las membranas plasmáticas del sinciciotrofoblasto y se determinaron TBARS y actividad ATPásica de Ca^{2+}.

Se encontró un aumento en los niveles de peroxidación lipídica y una disminución significativa de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en las membranas del sinciciotrofoblasto con la hipoxia.

En conclusión, la hipoxia placentaria provoca un aumento en la peroxidación lipídica de las membranas del sinciciotrofoblasto; lo que a su vez provoca una disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto.

Descriptores: ATPasa de Ca^{2+}, explanto, placenta humana, hipoxia, sincitiotrofoblasto, peroxidación lipídica, sulfato de magnesio.

INTRODUCCIÓN

En el mundo entero se reportan alrededor de 75.000 muertes maternas por año como consecuencia de la preeclampsia y sus complicaciones (Senior 2001). En la Maternidad "Concepción Palacios", en Caracas, la preeclampsia ocupa el segundo lugar dentro de las causas de muerte obstétrica (1993), encontrándose que hasta un 7% de los embarazos se complican con dicha patología (1988). En casi todos los países, la preeclampsia parece ser la principal causa de muerte materna y, según la Organización Mundial de la Salud, es la primera causa de mortalidad y morbilidad perinatales (Redman 1991).

La preeclampsia se ha definido como una enfermedad multisistémica, exclusiva del embarazo en el ser humano (Zeeman and Dekker 1992). El diagnóstico de esta enfermedad se fundamenta en la presencia concomitante de hipertensión arterial, edema y proteinuria. La etiología de la enfermedad aún se desconoce, y se cree que sus causas pueden ser múltiples. El resultado de las mismas es que dirigen a fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Kharfi, *et al* 2003). La fisiopatología de la enfermedad si es bien entendida, afirmándose que la disfunción endotelial juega un rol principal en muchos de los síntomas clínicos, ya que se derivan de cambios dentro del endotelio vascular materno o involucran disfunción endotelial generalizada (Davison, *et al* 2004, Roberts 1998).

El tratamiento estándar para la preeclampsia severa consiste principalmente en reposo, administración de agentes antihipertensivos y drogas anticonvulsivantes para la prevención de la eclampsia. Dentro de éstas últimas encontramos el sulfato de

magnesio, el cual es la droga de elección para el tratamiento de la preeclampsia severa desde hace más de 60 años (Scardo, *et al* 1995).

Como sea que se ha demostrado que en la preeclampsia hay una hipoperfusión placentaria, el modelo de hipoxia de explantos placentarios constituye una buena aproximación al conocimiento de los procesos celulares y moleculares que se dan en la preeclampsia. En este estudio se pretende determinar, en forma comparativa, la variación que pueda sufrir la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del sincitiotrofoblasto, tanto de la membrana basal (MB), como de las microvellosidades (MVM), sometidas a un proceso de hipoxia placentaria, y a su vez determinar el posible efecto de la presencia de sulfato de magnesio durante la hipoxia, sobre los cambios que puedan producirse en la actividad de dicha enzima.

Para ello, se incubarán cultivos de explantos de placenta humana a término, de gestantes normotensas, bajo condiciones de normoxia (explantos incubados con aproximadamente 10% de oxígeno) o de hipoxia (explantos incubados con menos de 1% de oxígeno), éstos últimos, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio. A partir de estos explantos, se aislarán membranas basales (MB) y de las microvellosidades (MVM) del sincitiotrofoblasto, a las cuales se les determinará, tanto la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, como los respectivos niveles de peroxidación lipídica.

CAPÍTULO I

Planteamiento del Problema

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica exclusiva del embarazo en el 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 las 20 semanas de gestación (Zeeman and Dekker 1992). Se ha demostrado que las gestantes preeclámpticas muestran un incremento en el calcio iónico intracelular en eritrocitos, plaquetas, linfocitos, monocitos, granulocitos y placenta en la mujer preeclámptica (Hojo, *et al* 1999, Matsubara, *et al* 1998, Pitkin 1985, Sowers, *et al* 1989). Por otro lado, en el laboratorio de Bioenergética Celular del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC, se ha encontrado que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de glóbulos rojos, de membranas plasmáticas miometriales y de la membrana basal de células del sincitiotrofoblasto de gestantes preeclámpticas, presenta una disminución importante, cuando comparada con las mismas membranas, pero provenientes de gestantes normotensas. Esta disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, podría explicar el aumento de la concentración de calcio intracelular encontrado en células de varios tejidos de pacientes preeclámpticas. En el mismo laboratorio, se ha demostrado que la actividad ATPásica de calcio en fantasmas de glóbulos rojos provenientes de pacientes preeclámpticas, se recupera a valores similares a los encontrados en las muestras provenientes de gestantes normotensas en el puerperio (López, *et al* 2003) y 24 horas después del tratamiento *in vivo* con sulfato de magnesio (Abad 2005).

Considerando el hecho de que se ha demostrado que en la preeclampsia hay una hipoperfusión úteroplacentaria, el modelo de hipoxia de explantos placentarios,

constituye una buena aproximación para tratar de investigar sobre los procesos celulares y moleculares que se dan en la preeclampsia. Este estudio enfoca y trata de determinar el efecto de la hipoxia placentaria sobre la posible variación de la actividad ATPásica de Ca^{2+} en ambas membranas del sincitiotrofoblasto, es decir, tanto en la membrana basal (lado fetal), como en la membrana de la microvellosidad (lado materno), así como el posible efecto del sulfato de magnesio sobre los parámetros estudiados. Para ello, se utilizaron cultivos de explantos de sincitiotrofoblasto sometidos a condiciones de normoxia e hipoxia, durante 18 horas a 37°C, y se evaluó la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en membranas basales (MB) y en membranas de las microvellosidades (MVM) del sincitiotrofoblasto y se correlacionaron los posibles cambios encontrados, con los niveles de peroxidación lipídica de las membranas utilizadas. Como sea que el tratamiento estándar para la preeclampsia severa es el sulfato de magnesio, en el presente estudio se evaluó el efecto de ésta sal sobre las posibles alteraciones en la actividad ATPásica de calcio en ambas membranas y los niveles de peroxidación lipídica en explantos de placenta humana cultivados bajo condiciones de hipoxia.

Lo anteriormente expuesto, permite plantear algunas interrogantes:

- *¿Cómo se afecta la actividad ATPásica de Ca^{+2} de las membranas basales (MB) y de las microvellosidades (MVM) del sincitiotrofoblasto, de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, cuando se comparan con los datos de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia?*

- *¿Existirá alguna correlación entre la posible variación de la actividad ATPásica de Ca^{+2} a producirse como efecto de la hipoxia, y los niveles de peroxidación lipídica de las membranas?*

- *¿Podrá la presencia del sulfato de magnesio prevenir las alteraciones que se producen en la actividad ATPásica de calcio y los niveles de peroxidación lipídica,*

en las membranas basales y de las microvellosidades de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia?

Justificación de la Investigación

Es conocido que la placenta está compuesta por tejido embrionario y materno, y que es el órgano fundamental en el embarazo. La placenta presenta dos caras discoideas: una que se encuentra apoyada al miometrio (lado materno), que es la placa decidual y otra, que está relacionada con la cavidad amniótica (lado fetal), y que se denomina placa coriónica. De la capa decidual, compuesta de sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto, emergen numerosas paredes perpendiculares denominadas tabiques placentarios. A pesar 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 que se conocen con el nombre de cotiledones (Langman 1976). La membrana plasmática de las células del sincitiotrofoblasto de placenta 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 membranas 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.

Se ha encontrado en ciertas patologías en las cuales está involucrada la placenta, que las actividades ATPásicas de las membranas plasmáticas pueden verse modificadas como consecuencia de procesos de stress oxidativo, que se produce por un desbalance entre fuerzas oxidantes y antioxidantes del organismo. Esta situación se traduce en un aumento en el grado de peroxidación lipídica de las membranas

plasmáticas de las células, con una consecuente liberación hacia el plasma sanguíneo de productos de lipoperoxidación, los cuales, a través de la circulación, pueden alcanzar todo el organismo, dando lugar a daños en las membranas de las células endoteliales y de distintos órganos y tejidos (Carrera, *et al* 2003, Hubel, *et al* 1989, Matteo, *et al* 1998, Nardulli, *et al* 1994). Como sea que la peroxidación lipídica y sus productos, pueden originar severos daños a proteínas y lípidos de membranas (Desai, *et al* 1964, Papahadjopoulos, *et al* 1973), el proceso puede afectar seriamente el funcionamiento de enzimas de estas membrana, una de las cuales, es la ATPasa de Ca^{2+}.

Procesos de isquemia-reperfusión o de hipoxia sostenida en un tejido, han demostrado que conducen a un elevado nivel de peroxidación lipídica en membranas celulares (Halliwell and Gutteridge 1989), como consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres. Más aún, en el caso de la placenta isquémica, 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. En este trabajo, se utilizó el cultivo de explantos bajo condiciones de hipoxia, con el fin de emular la hipoperfusión placentaria que se observa en las gestantes preeclámpticas; para así determinar de que manera se afectan las membranas celulares y, de afectarse de manera diferencial, cuál es el efecto sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} y los niveles de peroxidación lipídica, tanto de la membrana basal (MB), como de la membrana de las microvellosidades (MVM), de las mismas. Del mismo modo, se tratará de evaluar el efecto del sulfato de magnesio sobre ambos parámetros de membranas, provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, pero en presencia de sulfato de magnesio.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Estudiar el efecto de la hipoxia en explantos de placenta humana a término de gestantes normotensas, sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} y los niveles de peroxidación lipídica de membranas basales (lado fetal) y membranas de las microvellosidades (lado materno), de células de sincitiotrofoblasto.

Objetivos Específicos

- Obtener placentas humanas a término de gestantes normotensas, y aislar explantos de células del sincitiotrofoblasto de las mismas, como fuente de vellosidades coriónicas.

- Incubar los explantos de placentas humanas a término bajo condiciones de normoxia (10% oxígeno), y de hipoxia (menos de 1% oxígeno).

- Aislar las membranas de las microvellosidades (MVM) y del lado basal (MB) de células del sincitiotrofoblasto a partir de los explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de normoxia (10% oxígeno) y de hipoxia (menos de 1% oxígeno), por un período de 18 horas a 37°C.

- Determinar la actividad ATPásica de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas aisladas (MB y MVM) a partir de las células del sincitiotrofoblasto de los explantos.

- Determinar niveles de peroxidación lipídica de las mismas membranas, a través del método de cuantificación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

- Determinar el efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de calcio y los niveles de peroxidación lipídica de las mismas membranas, provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, pero en presencia de sulfato de magnesio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

La preeclampsia es la principal patología del embarazo en el ser humano, es decir, existe únicamente en *Homo sapiens*. Constituye la mayor causa de mortalidad y morbilidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial (MacGillivray 1958), y es causa 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). En el mundo entero, se reportan alrededor de 8.370.000 casos de preeclampsia por año (Villar, *et al* 2003), produciéndose 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 (1993), encontrándose que hasta un 7% de los embarazos se complican con preeclampsia (1988). En casi todos los países, la preeclampsia parece ser la principal causa aislada de muerte materna y, según la Organización Mundial de la Salud, es la primera causa de Mortalidad y Morbilidad perinatales (Redman 1991).

La preeclampsia se ha definido como una enfermedad multisistémica (Zeeman and Dekker 1992). El diagnóstico de esta enfermedad se fundamenta en la presencia concomitante de hipertensión arterial sistémica, edema y proteinuria, en embarazadas con un período de gestación mayor a las 20 semanas (Roberts 1984).

Además, éstos síntomas se vinculan con vasoespasmo, lesiones vasculares patológicas en múltiples sistemas orgánicos (incluyendo el lecho vascular

úteroplacentario), aumento de la actividad y consumo plaquetarios y, activación subsecuente del sistema de coagulación en la microcirculación (Chun, *et al* 1964, Scott 1958).

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 (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 mmHg y una proteinuria de al menos 5g en 24 horas (Lipstein, *et al* 2003, Sibai 2003). Además de esto, durante la preeclampsia severa pueden verse afectados varios órganos, por lo que puede desarrollarse: edema pulmonar, oliguria (menos de 400ml 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 Platelet Count), es una complicación, que puede ser encontrada 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 and Katz 1985). La preeclampsia desaparece varios días después del parto (Zeeman and Dekker 1992).

Desde hace varios años se conoce la preeclampsia - eclampsia, pero aún en la actualidad se desconoce su etiología, es decir, cuál o cuáles son los factores que desencadenan los desórdenes para el desarrollo de la enfermedad. A pesar de ello, se cree que dicha patología es el resultado de una combinación de factores tales como: genéticos, inmunológicos y ambientales, los cuales provocan fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Kharfi, *et al* 2003, Roberts and Cooper 2001).

La placenta es un órgano fundamental en el embarazo para el desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes e inmunoglobulinas de la circulación materna a la fetal, intercambio de gases y transporte de solutos entre la madre y el feto (Silver, *et al* 1990). Es provisional, ya que después del parto se desecha y está compuesta por tejido 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, la cara fetal. Está constituida por dos paredes discoideas, soldadas entre sí por sus bordes y, el espacio interpuesto entre ambas placas, la laguna sanguínea, ocupada por la sangre materna. La pared apoyada al miometrio (parte materna), se denomina placa decidual y, la relacionada con la cavidad amniótica (parte fetal), placa coriónica. La placa decidual está compuesta por citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto, y de ella de emergen numerosas paredes perpendiculares, denominadas tabiques placentarios, los cuales no llegan a establecer contacto con la placa coriónica, pero si dividen a la laguna sanguínea y por extensión, a la placenta, en varios compartimentos, los cuales se conocen con el nombre de cotiledones (Langman 1976).

Parecen existir suficientes indicios que sugieren a la placenta como un órgano importante en la etiología de la preeclampsia (Ness and Roberts 1996, Roberts and Redman 1993). En primer lugar, la presencia de la placenta es requisito necesario y suficiente para la aparición de preeclampsia; en efecto, 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 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).

Una de las hipótesis de la patogenia de la preeclampsia, la basan en el hecho de que en el desarrollo de la vascularización de la placenta pueden surgir irregularidades, que provocan una perfusión placentaria disminuida. Esta reducción del riego sanguíneo placentario, puede deberse a la incapacidad del tejido placentario de llevar a cabo de forma satisfactoria el mecanismo de implantación, mediante el cual la placenta asegura su sujeción al útero y asegura su irrigación, al transformar la circulación miometrial, desde un sistema de alta resistencia y bajo flujo sanguíneo, a un sistema de baja resistencia y alto flujo sanguíneo (Pritchard, *et al* 1990).

La implantación ocurre durante las primeras semanas de gestación, y es llevada a cabo por la colonización de numerosas células del citotrofoblasto extravelloso, a la decidua y miometrio adyacente. La llegada de esta migración de células del *citotrofoblasto* a los vasos espirales (arterias más profundas del útero), las lleva a reemplazar células del endotelio de los vasos maternos, destruyendo y reemplazando por citotrofoblasto, las capas elásticas y musculares de los mismos (Buhimschi, *et al* 1998). Posteriormente, una segunda invasión, más profunda y endovascular, alcanza las arterias radiales, convirtiendo de esta manera a los vasos maternos en el conducto útero-placentario, en el que se permite la dilatación de los vasos de forma pasiva, suministrando así el flujo sanguíneo requerido en el embarazo (De Wolf, *et al* 1973, Pijnenborg, *et al* 1981). Las dos migraciones trofoblásticas son determinantes en el establecimiento de una baja presión y con ello una alta conductancia del compartimiento vascular, lo que asegura un suministro constante de oxígeno y nutrientes a la placenta y, por ende, al feto (Buhimschi, *et al* 1998).

Las células trofoblásticas proliferan dando lugar a una capa interna de citotrofoblasto, formada por células separadas, y a una capa más externa de sincitiotrofoblasto, que representa una capa multinucleada y continua de protoplasma en la que no se pueden distinguir limites celulares. El citotrofoblasto comienza a sufrir mitosis de forma continua, formando células que se van incorporando y que se fusionan con el sincitiotrofoblasto en desarrollo. El sincitiotrofoblasto erosiona activamente el endometrio, permitiendo al blastocisto en conjunto introducirse más profundamente en el endometrio (implantación); continuando su proliferación e invasión hasta que el sistema vascular sanguíneo materno forme las lagunas del laberinto sincitial y las vellosidades que se dirigen hacia el lado fetal, inmersas éstas, en dichas lagunas. Estas microvellosidades se encuentran envueltas por las células del sincitiotrofoblasto, por lo que dicho tejido epitelial constituye la barrera más próxima de intercambio de nutrientes entre la madre y el feto. 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 (Mendoza 2004). 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, y en dichas membranas, se presentan enzimas de gran importancia para el transporte transepitelial de nutrientes y ciertos minerales, con lo cual se regula el intercambio de los mismos entre la sangre materna y la sangre fetal.

La ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática, es una proteína integral de la misma, la cual es imprescindible para la vida de la célula, ya que juega un papel fundamental en el mantenimiento del balance del ión calcio, por poseer las características necesarias para mantener el control preciso y a largo plazo de los niveles de calcio citosólico. El mecanismo de reacción de dicha ATPasa es el descrito para las llamadas ATPasas tipo P (Pedersen and Carafoli 1987a, Pedersen and Carafoli 1987b), donde se forma un intermediario fosforilado estable, tipo acil fosfato, en su ciclo catalítico (Katz and Blostein 1975, Knauf, *et al* 1974). Dicha ATPasa es dependiente de magnesio (Mg), es activada por concentraciones

micromolares de calcio y utiliza fundamentalmente ATP como sustrato. La ATPasa de Ca^{2+} acopla la hidrólisis del ATP al transporte de calcio a través de la membrana plasmática. Su funcionamiento es modulado por calmodulina (proteína que media los efectos de los iones calcio en numerosos sistemas biológicos y se encuentra en todas las células eucariotas), fosfolípidos, enzimas proteolíticas y ATP.

El calcio tiene en los organismos una doble función: mecánica, a través de su participación en la formación de cristales de hidroxiapatita, que constituyen el tejido óseo y donde está contenido el 99% del calcio total del organismo y, funcional, ejerciendo diversas acciones metabólicas, como control de los cambios de permeabilidad de las membranas celulares, contracción muscular, transmisión nerviosa, regulación de los procesos de secreción peptídica, mediación de la acción de diversas hormonas y enzimas y un rol importante en la generación de la actividad neuromuscular. Si bien el contenido celular de calcio es alto, el 98% del mismo se halla secuestrado, unido a proteínas o almacenado en mitocondrias y retículo endoplasmático, hacia donde es transferido por sistemas especializados (Lodish, *et al* 2002).

Estudios realizados en el laboratorio de Bioenergética Celular, en el Centro de Bioquímica y Biofísica del IVIC, demuestran que con la preeclampsia hay una disminución de alrededor del 40% en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas basales (MB) del sincitiotrofoblasto, lo cual está correlacionado con un aumento en los niveles de peroxidación lipídica de estas membranas (Borrego 1997).

Si bien la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática no es el único mecanismo encargado de mantener los niveles de calcio intracelular, la disminución de su actividad pudiera explicar, a nivel molecular, el incremento del calcio citosólico encontrado en algunos tejidos de madres preeclámpticas. Un aumento del calcio intracelular, pudiera ser responsable del incremento del tono vascular, lo cual puede conducir al incremento de la presión arterial que se observa durante la preeclampsia.

La elevación de la peroxidación lipídica de las membranas celulares afecta enzimas de estas membranas que, como la ATPasa de Ca^{2+}, dependen de su entorno lipídico para funcionar normalmente (Proverbio F 1995).

La importancia biológica del proceso de peroxidación lipídica, se basa en los cambios que ésta ocasiona a nivel de composición química y en los deterioros en la organización ultra estructural de las membranas celulares. Con un aumento en los niveles de peroxidación lipídica, disminuye la fluidez de las membranas, lo que afecta su permeabilidad, inactivando, al mismo tiempo, receptores y enzimas unidas a las membranas. Con respecto a los efectos de la peroxidación lipídica sobre las enzimas transportadoras de iones, se ha encontrado que el proceso puede causar daños en la propia estructura enzimática, a través de la oxidación de grupos sulfidrilos (-SH) de los centros activos de las mismas, o por modificación de la estructura de aminoácidos o por la formación de enlaces con otras proteínas y/o lípidos (Casart 1995). Los perfiles lípídicos de las membranas, juegan un papel fundamental en la actividad de muchas enzimas asociadas a las mismas, por lo que cambios en sus entornos lipídicos, pueden traducirse en cambios profundos y determinantes en la actividad de éstas enzimas. La hipoperfusión útero-placentaria, de la cual se hablaba anteriormente, causa liberación de radicales libres, los cuales pueden desencadena procesos patológicos, entre ellos, aumento en el grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares.

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.

El uso del sulfato de magnesio en clínica data de 1618 (McCall 1956), cuando un agricultor de nombre Henry Wickes descubrió una fuente de agua de manantial en Epson en el sur de Inglaterra, la cual contenía grandes cantidades de sulfato de magnesio, constituyéndose en las llamadas sales de Epson. Al inicio, éstas eran empleadas sólo para "bañar úlceras abiertas y afecciones dolorosas"; más tarde, Epson llegó a ser uno de los más importantes balnearios en el mundo y el sulfato de magnesio, llegó a ser uno de los más importantes medicamentos. En 1905 y 1906, se publican los primeros reportes sobre la eficacia del sulfato de magnesio para tratar las convulsiones del tétano. Veinte años después, aparecen en la literatura algunos artículos, reportando sus propiedades anticonvulsivantes en eclampsia (Lazard 1925).

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. 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 and Stone 1967). Si bien el uso del sulfato de magnesio ha sido criticado como algo irracional, ya que esta sal no es un anticonvulsivante *per se,* por lo que pudiera esperarse que fuese inefectiva para corregir las convulsiones que se producen durante la preeclampsia, su uso ha sido defendido por los obstetras "porque simplemente funciona" y, porque su administración es relativamente segura para el feto (Sibai 1990). Debido a ello, el uso del sulfato de magnesio ha sido considerado más bien como un "tratamiento empírico" (Pritchard and Pritchard 1975), que un tratamiento científicamente comprobado.

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 and 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 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 and Grether 1995).

Aunque las causas fundamentales responsables de la aparición de convulsiones en la eclampsia no han sido establecidas definitivamente (Roberts 1995), la condición preeclampsia–eclampsia está caracterizada por un intenso vasoespasmo, así como por una sensibilidad aumentada a agentes vasopresores, lo que ha llevado a la suposición de que las convulsiones pudieran ser el resultado de un reducido flujo sanguíneo cerebral (Roberts and Redman 1993). En este particular, el magnesio es un potente vasodilatador, especialmente de la red vascular cerebral, y se sabe que la administración de sulfato de magnesio a mujeres preeclámpticas, incrementa su flujo sanguíneo cerebral (Belfort and Moise 1992).

Este efecto del sulfato de magnesio pudiera ser debido a su capacidad de incrementar, tanto *in vivo* como *in vitro*, la producción de prostaciclinas, las cuales son potentes vasodilatadores endoteliales (Watson, *et al* 1986).

Por otro lado, existen reportes que indican que el magnesio actúa como un anticonvulsivante bloqueando los canales de N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor

de aminoácidos excitatorios que, cuando es estimulado, puede dirigir a convulsiones tanto electroencefalográficas como tónicas – clónicas (Cotton, *et al* 1993).

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 and Grether 1995). Otros estudios, demuestran una reducción en los índices de mortalidad neonatal, cuando se emplea sulfato de magnesio para tratar la preeclampsia (Farkouh, *et al* 2001). Por otro lado, empleando cotiledones aislados de placenta, se ha reportado que la presión de la perfusión arterial fetoplacental es mayor en placentas provenientes de pacientes preeclámpticas, disminuyendo la presión de la perfusión 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. 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 en parte por el efecto vasodilatador de este agente, a nivel del lecho vascular fetoplacental.

Hay autores que sugieren que el principal mecanismo de acción del sulfato de magnesio es el de actuar como antagonista del calcio (Iseri and French 1984), ya que el magnesio, está íntimamente ligado a la homeostasis del calcio. Así, la hipermagnesemia disminuye los niveles de calcio sérico, lo que algunos autores sugieren que se debe a que interfiere con la síntesis o liberación de la hormona paratiroidea (Eisenbud and LoBue 1976). Por otro lado, la deficiencia de magnesio

eleva el calcio sérico y la hormona paratiroidea (Buckle, *et al* 1968, Gitelman, *et al* 1968). El calcio, además de ser necesario para la contracción muscular y la vasoconstricción, puede estimular la producción de ciertas prostanglandinas y tromboxanos (Walsh, *et al* 1998), sustancias éstas últimas, capaces de estimular la vasoconstricción (Sibai, *et al* 1984). Debido a ello, el sulfato de magnesio también atenúa la vasoconstricción inducida en placenta, ya que al ser antagonista del calcio, inhibe la síntesis de prostaglandinas.

Fuera de la célula, el magnesio bloquea los canales de calcio, reduciendo la entrada de éste a la misma (McCarty 1996). De hecho, cuando se perfunden arterias *in vitro* con solución fisiológica con magnesio, se puede bloquear la entrada de calcio a las mismas e inducir su dilatación. Por el contrario, bajas concentraciones de magnesio en esas mismas condiciones, promueven la vasoconstricción (McCarty 1996).

Como ya ha sido comentado, tanto la actividad ATPásica de Ca^{2+} como la peroxidación lipídica de las membranas de glóbulos rojos, se encuentran alterados con la preeclampsia y, en este sentido, el tratamiento *in vivo* con $MgSO_4$ las lleva de nuevo a valores normales. Este resultado se puede reproducir *in Vitro,* utilizando glóbulos rojos intactos de gestantes preeclámpticas (Abad 2005).

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 puede 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 desde las membranas celulares (Henninger and 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 calcio de membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto, así como el efecto del sulfato de magnesio sobre ambos parámetros en explantos de placenta humana cultivados bajo las mismas condiciones de hipoxia, pero en presencia del magnesio.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

El siguiente estudio está autorizado por las comisiones de Bioética del IVIC, del Hospital Universitario de Caracas y de la Maternidad Concepción Palacios. Todas las participantes 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 sobre hielo y trasladadas al laboratorio, donde se procesaron, todo esto en un lapso menor a 4 horas.

2. Preparación de Explantos

Una vez en el laboratorio, se aislaron de la placenta cotiledones observados en buen estado y se les removió la placa coriónica y la decidua (0,25cm aproximadamente). Luego, se colocaron los cotiledones en una placa de *Petri* y se cortaron en trozos pequeños de 0,5cm x 0,5cm aproximadamente, removiendo los vasos sanguíneos. Todo el proceso de preparación y lavado fue realizado sobre hielo, a una temperatura de 4°C. Estos explantos primarios de placenta fresca se lavaron con solución salina estéril durante 5 veces consecutivas. Luego, se transfirieron a placas Nunclon ™ Surface® de 12 pozos, que contenían 2ml del medio DMEM-F12 (Medio Eagle Modificado Dulbecco) + 10% Suero Fetal Bovino (SFB) en cada pozo. Este

medio se encontraba a 37°C, y era complementado con agentes antimicrobianos: Penicilina cristalina 100.000 UI/ml, Gentamicina 48μg/ml y anfotericina B 3μg/ml.

Todos los explantos fueron incubados a 37°C bajo condición de normoxia durante las primeras 4 horas, una vez concluido este tiempo, el medio de cultivo era removido y se les proporcionaba medio fresco preincubado a 37°C (2 ml/pozo). Luego, los explantos se incubaron bajo condiciones de normoxia o hipoxia, durante un período de 18 horas, a 37°C, en una incubadora estéril (Shel Lab Model IR2424 CO_2 Incubator), a presiones constantes de los gases los cuales, según la condición de incubación fueron:

- Normoxia: 10% O_2, 5% CO_2, 85% N_2
- Hipoxia: 0,5% O_2, 5% CO_2, 94,5% N_2

3. Homogenizado de explantos de placenta humana.

Los explantos se removieron del medio de cultivo y se lavaron con solución salina. Una vez lavado, el tejido se pesó y se procedió a suspenderlo 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. Esta suspensión se homogenizó durante dos minutos con un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel,IKA-Labortechinick) a 24.000rpm, con una hojilla S25N, obteniendo los homogenizados totales (HT) de los explantos de placenta humana (Illsley, *et al* 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), y un esquema resumido del mismo se presenta en la Figura 1. Los

homogenizados totales de placenta (HT), se centrifugaron por 15 minutos a 10.000xg en una centrífuga Sorvall refrigerada RC-5B. El sobrenadante fue guardado y el precipitado se resuspendió en la misma solución de homogenización (solución 1) y se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 10.000xg, obteniendo de allí un segundo sobrenadante. Los sobrenadantes fueron combinados, filtrados en gasas y luego, centrifugados por 60 minutos a 47.500 x g a 4°C. El sobrenadante resultante fue descartado, y el precipitado resuspendido en la misma solución de homogenización (solución 1), a una concentración final de proteínas de 10-15mg/ml. Posteriormente, esta suspensión se colocó sobre hielo y se agitó durante 20 minutos, después de añadir $MgCl_2$ a una concentración final de 12 mM. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 2.500 x g a 4°C. De esta centrifugación, se obtuvo el sobrenadante, el cual se utilizó para asilar las membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM), y el precipitado, con el cual fueron aisladas las membranas plasmáticas basales (MB).

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

El sobrenadante que se utilizó para aislar las MVM se centrifugó a 47.500 x g durante 30 minutos. El nuevo sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó dos veces, con una solución (solución 2) que contenía (mM): Sacarosa, 250; Tris-Hepes, 10 (pH 7,2). O sea, resuspendido en dicha solución y centrifugado a 47.500 x g durante 30 minutos, por dos veces. El sedimento final fue resuspendido en la solución 2, a una concentración final de proteínas de 1 a 2 mg/ml y guardado a -20°C. La concentración de proteínas de las fracciones se determinó, en todos los casos, según el método de Bradford (1976).

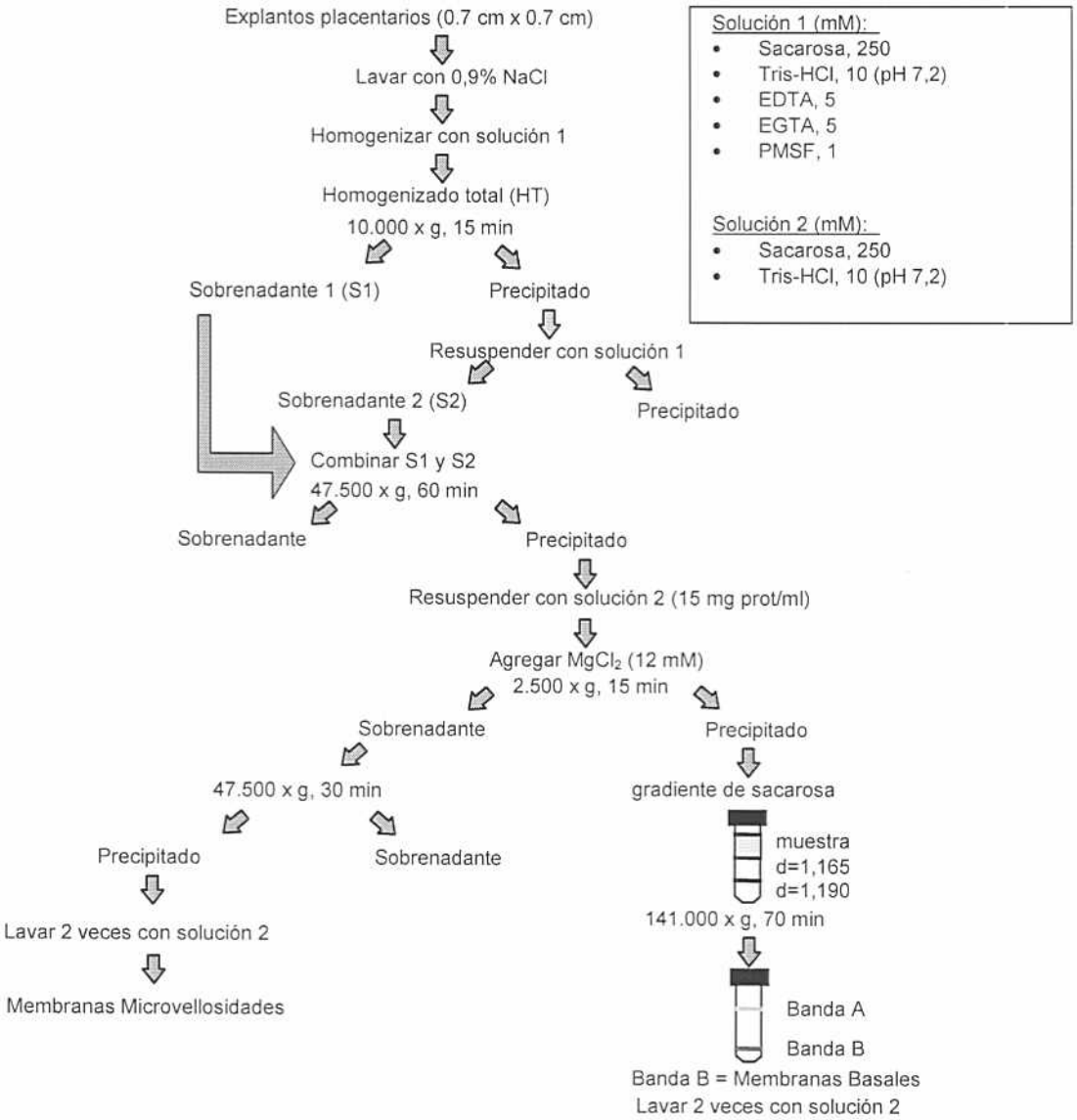

Figura 1

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

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

El precipitado que contenía la MB era resuspendido en una solución (solución 2), la cual contenía (mM): Sacarosa, 250 y Tris-HCl (pH 7,2) 10, a 0°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 gr/cc y, por encima de éste, 13,42 ml de solución sacarosa de densidad 1,165 gr/cc. El gradiente era centrifugado por 70 minutos a 141.000 x g 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 (lml/10ml) de la solución 2 y centrifugada por 30 minutos a 47.500 x g. El sobrenadante era descartado y el sedimento era resuspendido en la solución 2, a una concentración final de 1 a 2 mg/ml, y guardado a -20°C.

7. Preincubación de membranas con SDS.

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, 6,25mg/ml; albúmina, 1%; imidazol, 25mM (pH 7,2 a 37°C). Luego de transcurrida la preincubación de las membranas con SDS, se procedió a la realización de los ensayos de manera inmediata, para determinar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas.

8. Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas de los fantasmas, 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; llevando 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 790 µl 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 Ca^{2+}

La actividad ATPásica de Ca^{2+} se determinó según una modificación del método descrito por Proverbio *et al.* (Proverbio y del Castillo 1981, Proverbio, *et al* 1986). El fosfato inorgánico liberado durante la reacción, se determinó según el método de Forbush, modificado por Marín *et al.* (Forbush 1983, Marín, *et al* 1986). El medio donde se efectuó 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 se determinó según el método de Bradford (1976).

En el volumen final de 200 µl, los medios contenían:

Medio I (Medio Mg^{2+}): Tris – HCl (pH 7,4 a 37°C) 50 mM; ATP 2 mM; $MgCl_2$ 3 mM; EGTA 0,1 mM; Ouabaína 0,1 mM; KCl 15 mM; NaCl 80 mM.

Medio II (Medio Mg^{2+} + Ca^{2+}): Tris – HCl (pH 7,4 a 37°C) 50 mM; ATP 2 mM; $MgCl_2$ 3 mM; EGTA 0,1 mM; Ouabaína 0,1 mM; KCl 15 mM; NaCl 80 mM; $CaCl_2$ 0,13 mM.

El procedimiento realizado fue el siguiente: 180 µl del medio de incubación se preincubaron por dos minutos a 37°C. La reacción se inició al añadir 20 µl de la fracción de membranas. La reacción culmina a los 10 minutos, agregando 300 µl de una solución mantenida en frío conteniendo (%): dodecil sulfato de sodio (SDS) 0,72; ácido molíbdico, 0,48: ácido ascórbico, 2,86 y HCl, 2,18. Los tubos de incubación fueron luego colocados inmediatamente en hielo durante 10 minutos. Después de pasar los 10 minutos en hielo, se le añadió a cada uno de los tubos, 0,5ml de una solución conteniendo (%): arsenito de sodio, 2, citrato de sodio, 2 y ácido acético, 2 y, finalmente, los tubos de incubación se recalentaron a 37°C por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedió a medir la Absorbancia en un lector de Elisa a 705 nm. En todos los casos, se trabajo con cuatro réplicas de preparaciones diferentes. 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 fueron añadidas después de agregar los 300 µl de la solución con la cual se detiene la reacción. La actividad ATPásica de Ca^{2+} se expresa como la actividad ATPásica estimulada por calcio y dependiente de magnesio, y 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, se centrifugaron a 47.500xg durante 20 minutos y el precipitado obtenido, se resuspendió en buffer fosfato, el cual contiene (mM): fosfato de sodio, 25; NaCl, 125 (pH de 7,4). El precipitado se resuspendió en la misma solución y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 47.500xg y, finalmente, el precipitado se volvió a resuspender en el buffer fosfato.

Los niveles de TBARS de estas preparaciones se determinó mediante una modificación del método descrito por de (Feix, *et al* 1991, Kako, *et al* 1988). A tubos de microcentrífuga se les agregó 250 µl de preparación de membrana, a una concentración de proteínas entre 0,6-0,8mg/ml; 50 µl de hidroxitolueno butilado (BHT) 250mM y 375 µl de ácido tricloroacético al 20%. Los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron por 10 minutos a 3.000 rpm y se tomaron 500 µl del sobrenadante, los cuales fueron colocados en tubos de vidrio, donde se añadió además 250 µl de ácido tiobarbitúrico al 1,5%. Los tubos se colocaron rápidamente en un baño de agua hirviendo por 15 minutos y, finalmente, los tubos se enfriaron sobre hielo, a 4°C durante 3 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia de cada tubo, a una longitud de onda de 532 nm, en contra de un blanco tratado de igual manera, pero que no contiene suspensión de membranas. En cada caso, se preparó una curva de calibración, utilizando como estándar 1,1-3,3-tetrametoxi propano ($C_7H_{16}O_4$). Los resultados se expresan como nmoles de malondialdehído (MDA) por mg de proteína.

11.- Análisis Estadístico.

Los resultados se expresaron como las medias ± el error estándar, para el número de ensayos indicado en cada caso. Los errores estándar de las diferencias

fueron calculados 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 humana a término, mediante microscopía óptica.

2. *Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizados de células de sincitiotrofoblasto* de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.

3. Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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.

4. Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Ca^{2+} de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM), de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.

5. 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.

6. Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} 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.

7. 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 2, 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 del sincitiotrofoblasto.

2.- Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizado de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia.

Como sucede en general con preparaciones de membranas, parte de las mismas pueden encontrarse abiertas, y parte formando vesículas. Estas vesículas podrían interferir con las determinaciones bioquímicas de actividad ATPásica, puesto que

dependiendo de su conformación, podrían impedir la presentación del sustrato ante la enzima. Para solventar esta posible interferencia, los homogenizados de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia, fueron tratados con diferentes cantidades de dodecil sulfato de sodio (SDS) y luego, ensayados para actividad ATPásica de Ca^{2+}. En experimentos preliminares se encontró que la mejor relación [SDS]/[proteína], para esta actividad ATPásica, era de 1,25 aproximadamente. En función de estos resultados, todos los estudios enzimáticos fueron realizados tratando previamente las membranas con SDS utilizando la relación óptima [SDS]/[proteína] de 1,25. En la Tabla I se presentan los valores de actividad ATPásica de Ca^{2+} en los homogenizados de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia, previamente tratados con SDS. Los resultados de este experimento reflejan una actividad ATPásica de Ca^{2+} en estos homogenizados, calculada como la diferencia entre las actividades medidas en presencia y ausencia de 10 μM Ca^{2+} libre (Δ), de 13 ± 2 nmoles Pi/mg prot . min.

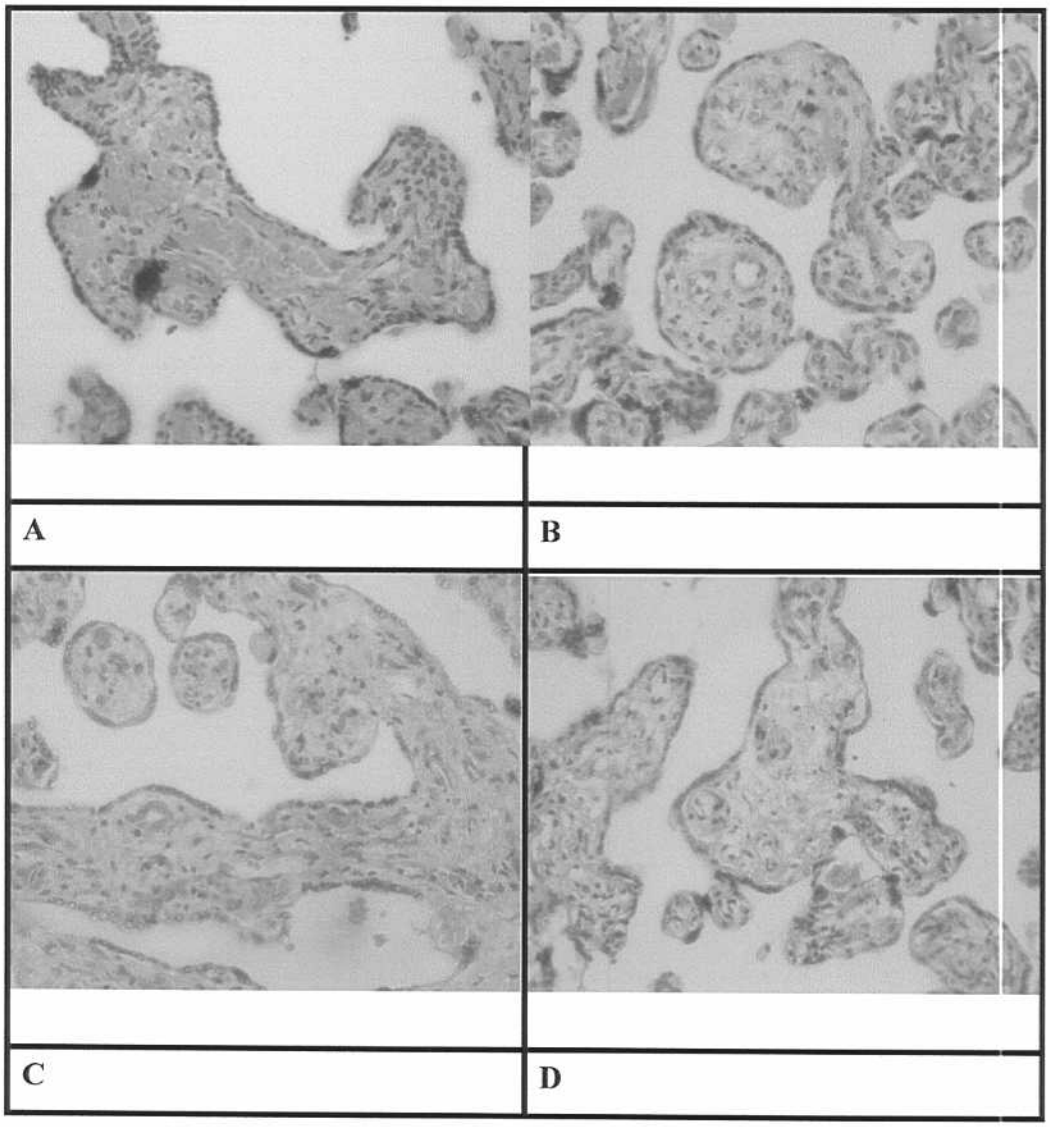

Figura 2

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.

3.- Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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.

La ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática del sincitiotrofoblasto humano, al igual que la ATPasa Na,K, se distribuye tanto a nivel de las membranas basales (lado fetal) como de las membranas de las microvellosidades (lado materno) (Lafond and Simoneau 2006, Matsubara, *et al* 1987). Por ello, su distribución en un método de aislamiento de estas membranas por centrifugación diferencial, es indicativa de cómo se distribuyen las membranas en las distintas fracciones. En general, esto se hace con la ATPasa de Na,K. En el caso de la placenta, el método de Illsley *et al.* (Illsley, *et al 1990*) utiliza la distribución de la ATPasa de Na,K, entre otros criterios, para identificar las membranas basales y las membranas de las microvellosidades. En trabajo reciente, Varela (Varela 2007), encontró que la actividad de la ATPasa de Na,K se enriquece, de manera aparente, en las membranas de las microvellosidades por encima del observado para las membranas basales, en coincidencia con lo reportado por Johansson (Johansson, *et al* 2000). Por consiguiente, decidimos evaluar tambien en este caso, el factor de enriquecimiento aparente (relación actividad fracción / actividad HT), de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, para las fracciones enriquecidas en membranas basales y de las microvellosidades, preparadas a partir de homogenizados de explantos de placenta humana a término, cultivados bajo condiciones de normoxia. Es necesario destacar que el método que utilizamos en el presente trabajo, es exactamente igual al utilizado por Varela (2007). Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla II. Nótese como las dos fracciones (membranas basales y membranas de las microvellosidades), muestran un cierto grado de enriquecimiento de la actividad ATPásica de Ca^{2+} (relación actividad fracción/actividad HT), siendo la actividad de la enzima mayor para la fracción de las microvellosidades.

TABLA I

ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} DE HOMOGENIZADO DE EXPLANTOS DE PLACENTA HUMANA A TÉRMINO CULTIVADOS DURANTE 18 HORAS A 37°C

Medio de incubación	Actividad ATPásica: nmoles Pi / mg prot . min	Δ
Mg	105 ± 4	
Mg+Ca	118 ± 4	13 ± 2

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

Estos grados de enriquecimiento aparente son muy parecidos a los obtenidos por Varela (2007) para la ATPasa de Na,K y confirman la purificación de las membranas basales y de las microvellosidades en nuestras preparaciones.

4.- Efecto de la hipoxia sobre la Actividad ATPásica de Ca^{2+} de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales (MB) y de microvellosidades (MVM) de células de sincitiotrofoblasto de explantos de placenta humana a término.

Durante la preeclampsia se presentan cuadros de hipoxia placentaria, debido a la falla en la remodelación de las arterias espirales en la porción miometrial. Estos cuadros de hipoxia conducen a que se promuevan procesos de estrés oxidativo en la placenta, con la generación de radicales libres. Estos últimos, son capaces de alterar la integridad de las membranas plasmáticas e inhibir enzimas dependientes de la fluidez de las mismas, como es el caso de la ATPasa de Calcio. Considerando que los cultivos de explantos placentarios bajo condiciones de hipoxia, representan una buena aproximación de los fenómenos moleculares que ocurren durante la preeclampsia, se decidió ensayar la actividad ATPásica de Ca^{2+} de las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales y de microvellosidades provenientes de explantos placentarios, cultivados bajo condiciones de normoxia e hipoxia durante 18 horas a 37°C, sobre todo tomando en cuenta que se ha reportado una disminución sustancial de la actividad de esta ATPasa en la placenta de mujeres con preeclampsia (Carrera, *et al* 2003).

TABLA II

ACTIVIDAD ATPásica DE Ca^{2+} 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 Aparente nmoles Pi / mg prot . min	Factor de Enriquecimiento (actividad fracción/actividad HT)
HT	13 ± 2	--
MB	51 ± 5	3,92
MVM	92 ± 4	7,07

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

Los resultados para las fracciones enriquecidas en membranas basales se observan en la Figura 3: es evidente que la actividad ATPásica de Ca^{2+}, 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 aquellas provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia. La comparación de las dos condiciones, realizada de manera individual en cada caso, arroja un 73±2% (n=5) de inhibición de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en MB con la hipoxia placentaria.

De igual forma se puede apreciar en la Figura 4, la disminución en la actividad ATPásica de Ca^{2+} 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 63±2% (n=5) de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en MVM con la hipoxia placentaria, cuando se compara con los explantos cultivados bajo condiciones de normoxia.

Estos resultados indican que la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas basales (MB) es más susceptible a la hipoxia que la de las membranas plasmáticas de las microvellosidades (MVM), dado que el porcentaje de inhibición de ésta enzima es mayor ($p<0,01$) en las membranas plasmáticas basales (73±2%), que en las membranas plasmáticas de las microvellosidades (63±2%).

5.- 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.

Una causa importante en la disminución de la actividad de una enzima unida a la membrana plasmática, lo constituye el proceso del estrés oxidativo; bien sea por

ataque de radicales libres a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que componen la bicapa lipídica de la membrana plasmática o por ataque directo a la proteína. Como sea que es bien conocido que los procesos de hipoxia generan radicales libres y que éstos, son capaces de promover la peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas, afectando su fluidez y alterando las enzimas inmersas en ellas, se decidió evaluar los niveles de peroxidación lipídica de las fracciones enriquecidas, tanto en membranas plasmáticas basales como en membranas plasmáticas de microvellosidades (medida como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, también conocidas por su acrónimo en inglés: TBARS), en busca de una explicación para la disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} encontrada en ambas fracciones provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia.

En la Figura 5, se presentan los resultados para los niveles de peroxidación lipídica de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas basales de explantos de placenta humana cultivados bajo condiciones de hipoxia. Nótese como los niveles de TBARS de estas preparaciones se encuentran elevados, cuando se comparan con aquellos provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia. Del mismo modo, como se puede ver en la Figura 6, los TBARS se encuentran también elevados con la hipoxia placentaria, a nivel de las membranas de las microvellosidades.

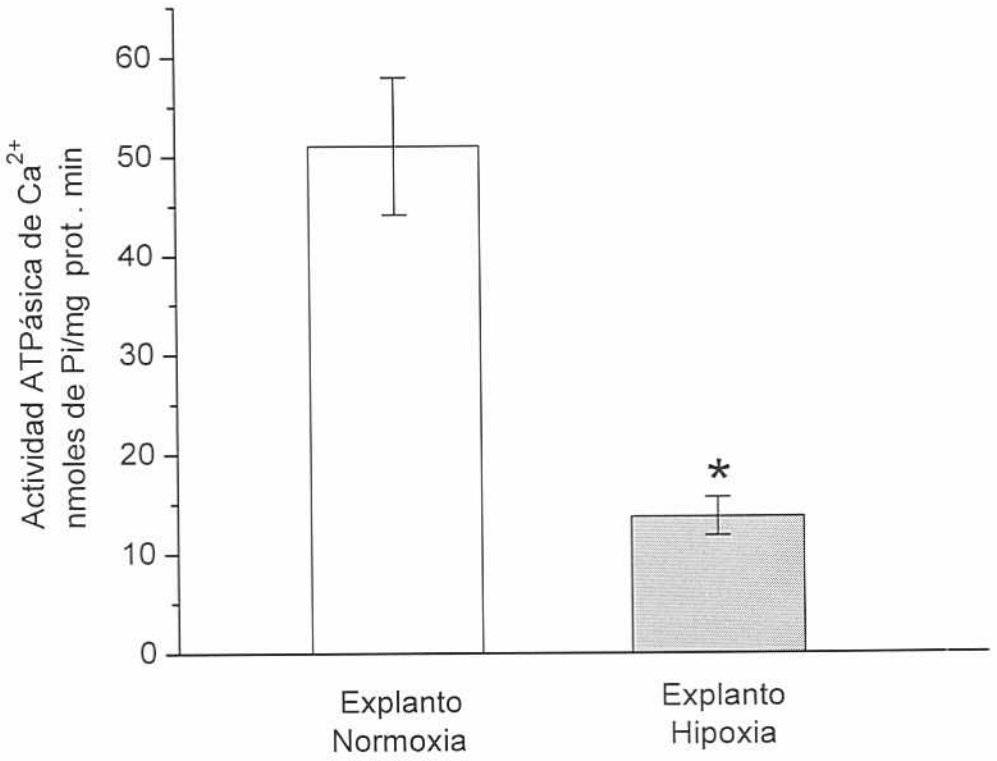

Figura 3

Actividad ATPásica de Ca^{2+} 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. Valores expresados como la media ± el error estándar para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia

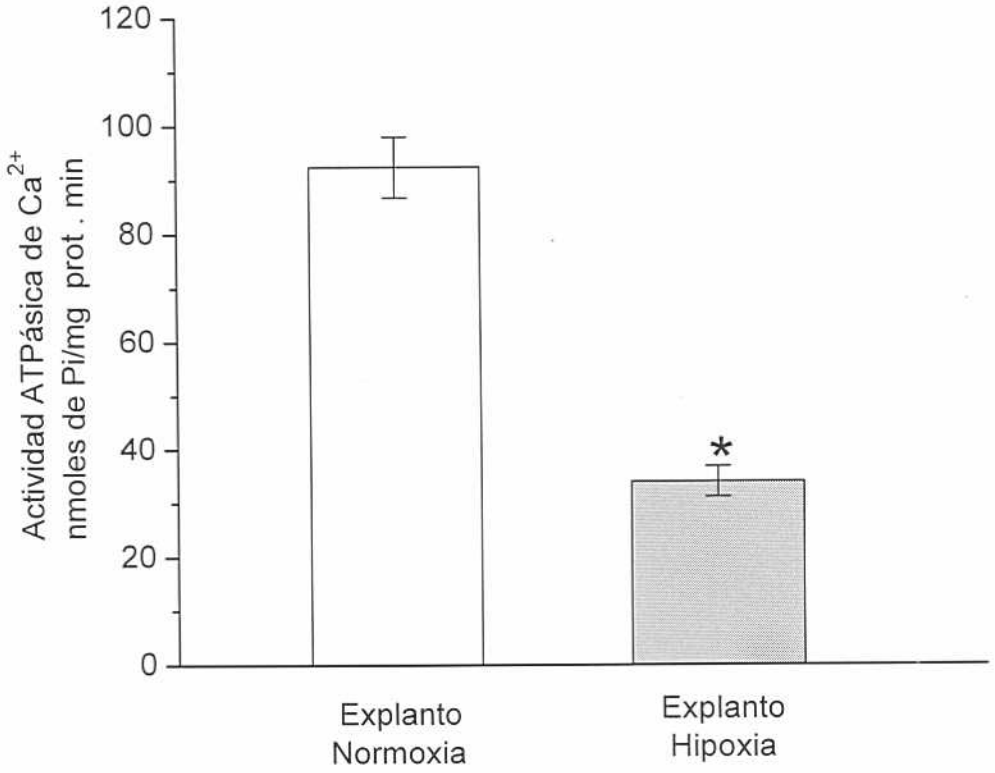

Figura 4

Actividad ATPásica de Ca^{2+} las 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 en normoxia.

6.- Efecto del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} 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.

Ha sido demostrado que el tratamiento *in vivo* con sulfato de magnesio en las pacientes preeclámpticas, es capaz de revertir la elevación de la peroxidación lipídica en las membranas de los eritrocitos y, con ello, regresar a valores normales la actividad ATPásica de Ca^{2+} de estas células (Abad, *et al* 2005). Por consiguiente, se decidió evaluar el efecto de la adición de sulfato de magnesio al medio de cultivo de los explantos placentarios sometidos a hipoxia, para luego evaluar la actividad ATPásica de Ca^{2+} en las fracciones enriquecidas en membranas basales y membranas de microvellosidades. 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 valores de actividad ATPásica de Ca^{2+} del experimento realizado, para las fracciones enriquecidas en membranas basales, se muestran en la Figura 7: obsérvese que las preparaciones de MB, provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio, presentan actividades ATPásicas de Ca^{2+} mayores a las encontradas en las preparaciones de MB provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en ausencia de esta sal. Es evidente que, la presencia de sulfato de magnesio en el medio de cultivo donde se realizó la hipoxia placentaria, logra prevenir el efecto inhibitorio de dicha hipoxia sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+}, ya que los valores de actividad ATPásica en presencia de sulfato de magnesio son similares a los obtenidos bajo condiciones de normoxia. En la Figura 8, se muestran los resultados de actividad ATPásica de Ca^{2+} de las fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidades, provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia e hipoxia, en presencia o ausencia de sulfato de magnesio. Resulta claro que los resultados de este

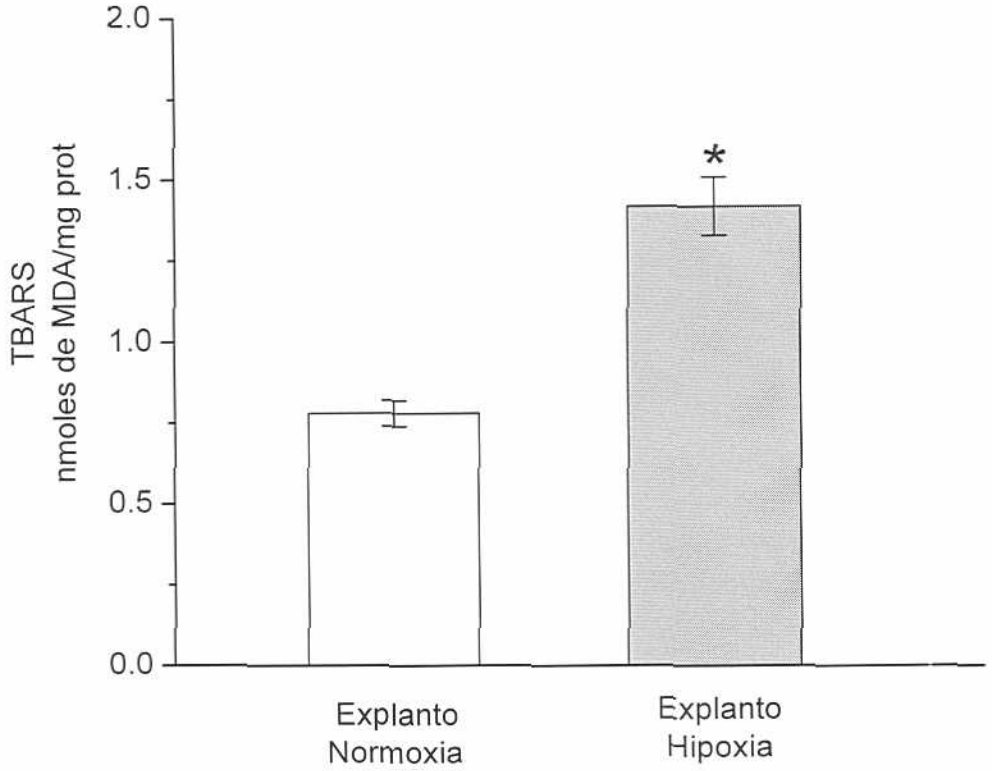

Figura 5

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.

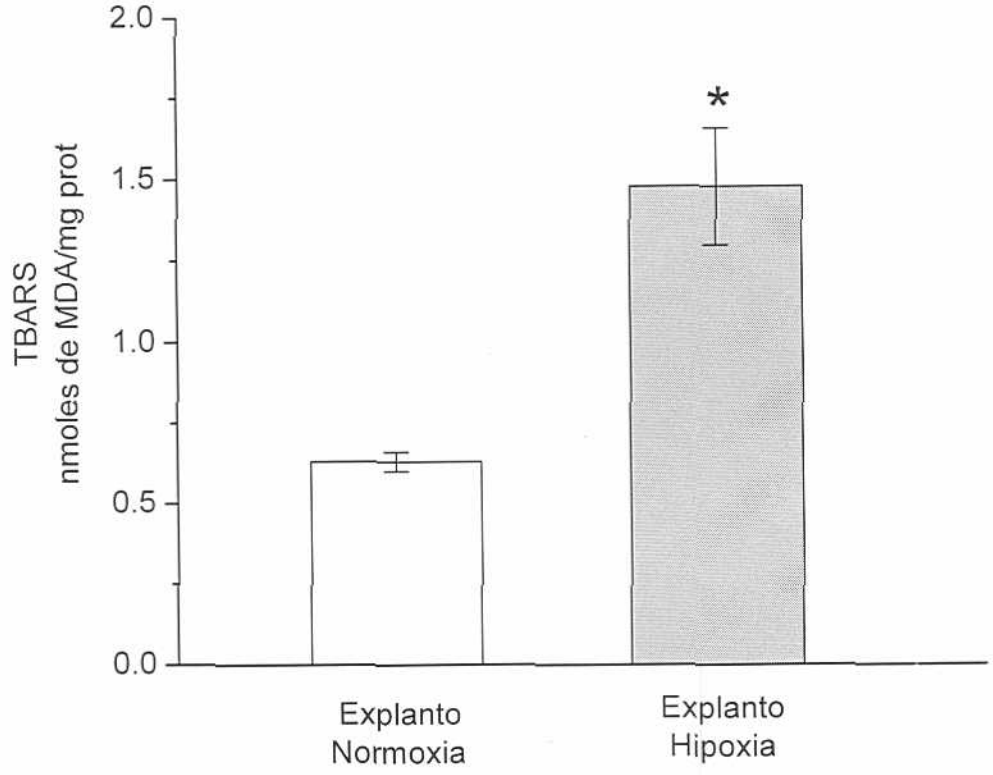

Figura 6

Niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de las 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 en normoxia.

experimento son muy similares a los obtenidos para las membranas basales. Nótese también que, como sucedido con las MB, la actividad ATPásica de Ca^{2+} de las MVM de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio es igual, desde el punto de vista estadístico, a la observada en las mismas membranas de explantos cultivados bajo condiciones de normoxia. Estos resultados indican, que el sulfato de magnesio es capaz de prevenir la disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} que se observa en explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en ausencia de sulfato de magnesio.

7.- Efecto del sulfato de magnesio 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, cultivados bajo condiciones de hipoxia.

El aumento en los niveles de peroxidación lipídica observado en fracciones enriquecidas en MB y MVM, provenientes de explantos de placenta humana a término, cultivados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de hipoxia (ver Figuras 5 y 6), bien pudiese explicar la disminución en las actividades ATPásicas de Ca^{2+} observadas para dichas membranas (ver Figuras 3 y 4). 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 Ca^{2+}, resultó indispensable el estudio que determinase, si la presencia de sulfato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos sometidos a hipoxia, era capaz de afectar los niveles de peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto.

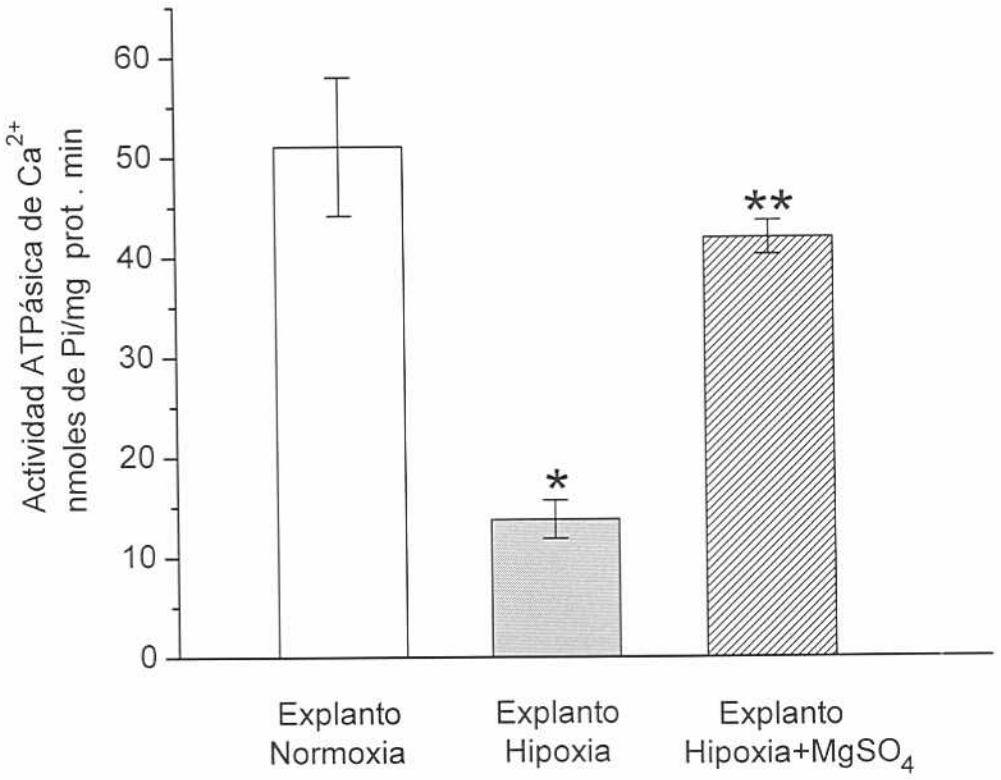

Figura 7

Actividad ATPásica de Ca^{2+} de las 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, en presencia y ausencia de sulfato de magnesio 2 mM. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n=5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia y vs explanto hipoxia + Mg SO_4.

** p = n.s. vs explanto normoxia.

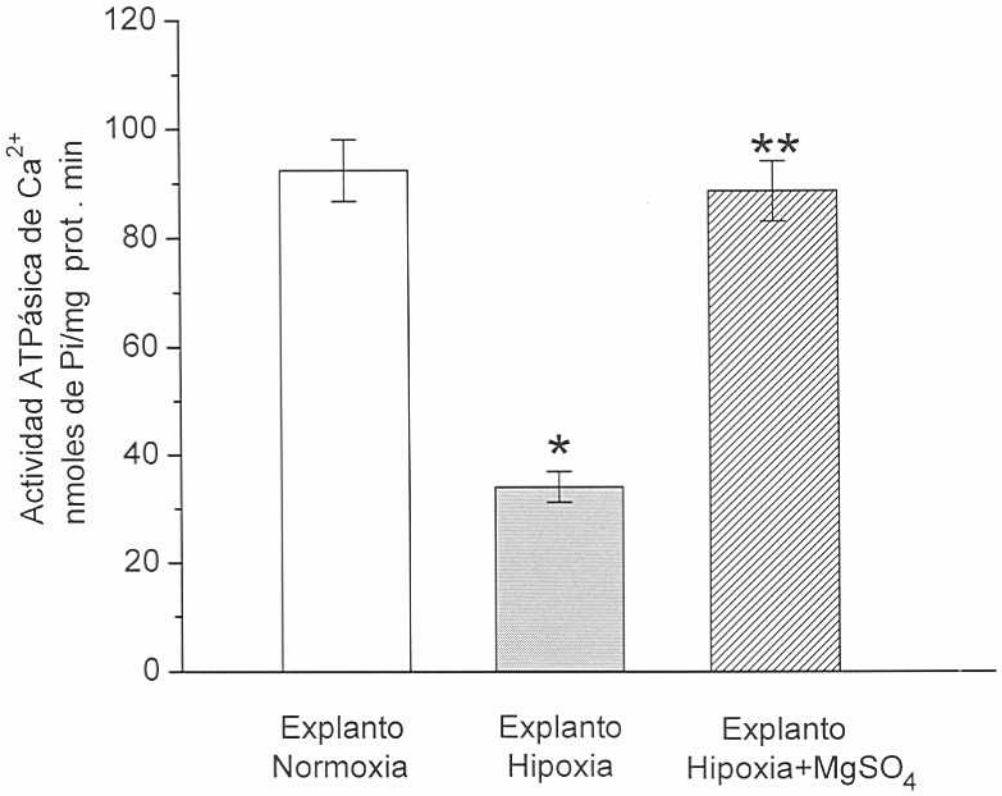

Figura 8

Actividad ATPásica de Ca^{2+} de fracciones enriquecidas en membranas plasmáticas de microvellosidad (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 2 mM. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n = 5.

* $p<0,001$ vs explanto normoxia y vs explanto hipoxia + Mg SO_4.

** p = n.s. vs explanto normoxia.

Los resultados obtenidos para este estudio, se presentan en las Figuras 9 y 10. Se puede ver claramente que, la presencia de sulfato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos sometidos a hipoxia, logra prevenir el aumento en los niveles de TBARS de MB y MVM, observados para las membranas provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en ausencia de esta sal.

Finalmente, resulta interesante comparar el comportamiento de la ATPasa de Ca^{2+} con la hipoxia, con el obtenido por Varela (Varela 2007) para la ATPasa de Na,K en preparaciones semejantes. Esta comparación se presenta en la Figura 11. Obsérvese que la ATPasa de Ca^{2+}, tanto de MB (panel A) como de MVM (panel B), es más susceptible a la hipoxia placentaria que la ATPasa de Na,K. Esto indica una mayor sensibilidad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas de sincitiotrofoblasto a la peroxidación lipídica, en comparación con la mostrada por la ATPasa de Na,K. Estos resultados coinciden con lo reportado de Matteo *et al.* (Matteo, *et al* 1998), en preparaciones de fantasmas de glóbulos rojos de gestantes normotensas.

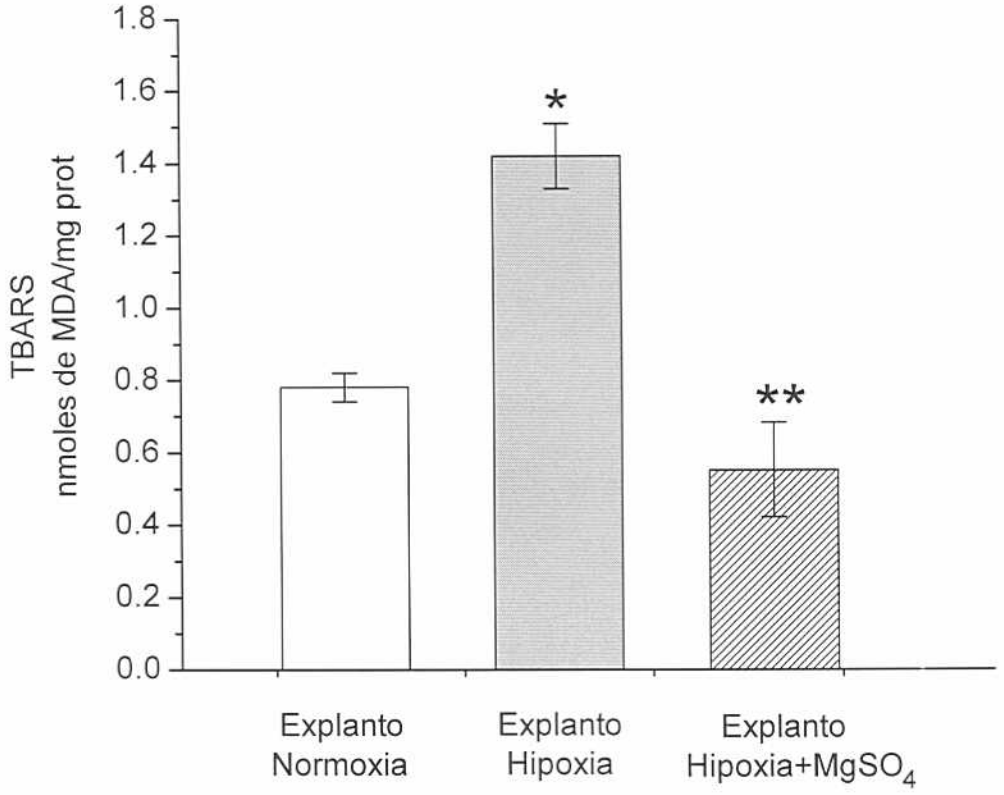

Figura 9

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 37°C, 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

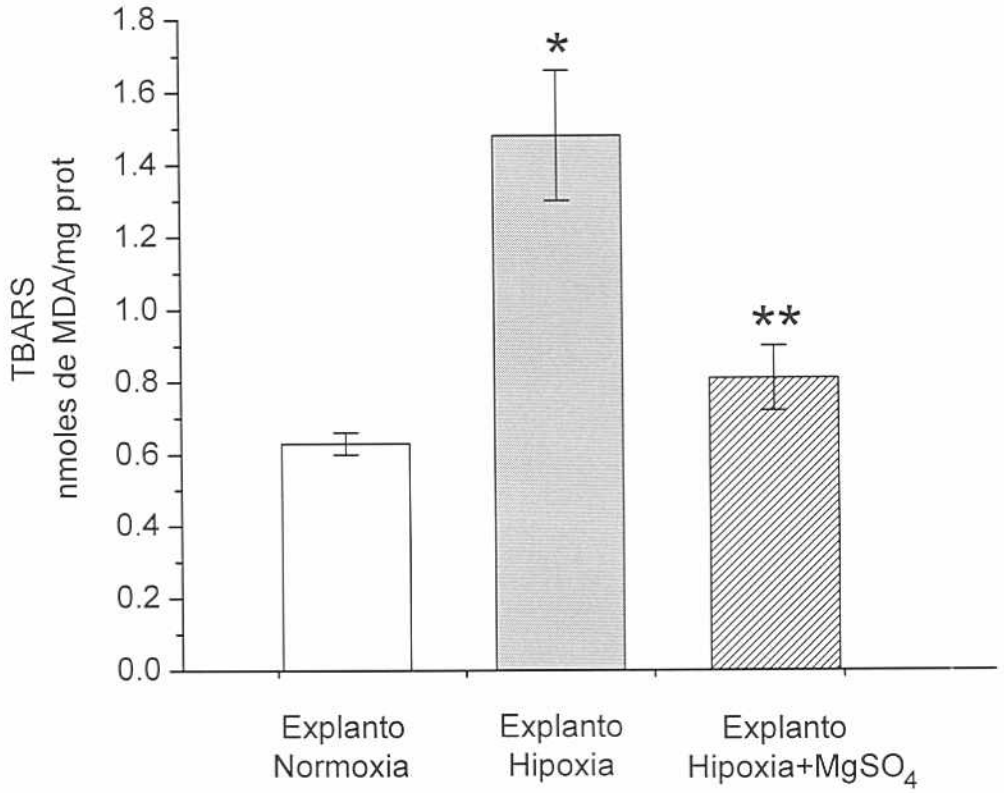

Figura 10

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 37°C, 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

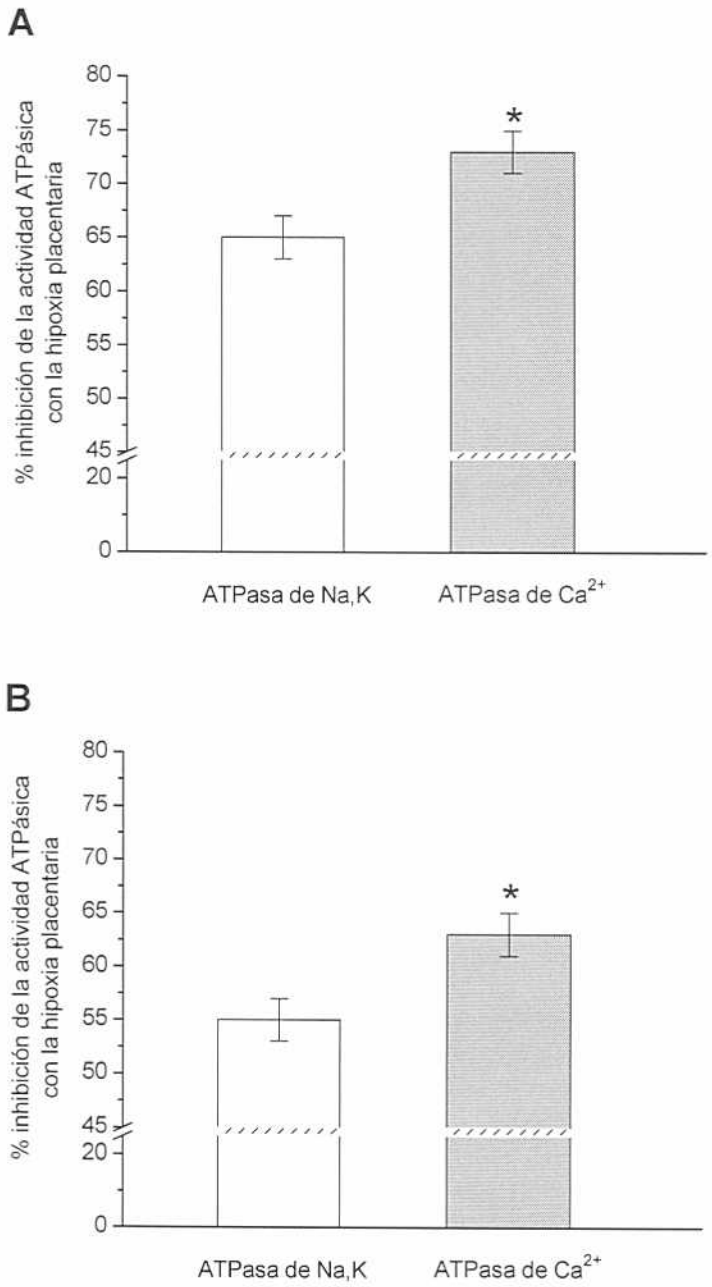

Figura 11

Comparación del porcentaje de inhibición de las actividades ATPásica de Na,K y de Ca^{2+}, en membranas plasmáticas basales (panel A) y de la microvellosidad (panel B). Los datos para la ATPasa de Na,K fueron tomados de Varela (Varela 2007) y los datos para la ATPasa de Ca^{2+} fueron calculados a partir de los datos de las Figuras 3 y 4 del presente trabajo. Valores expresados como la media ± el error estándar, para n = 5.

* $p<0,05$ vs ATPasa de Na,K

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La preeclampsia es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial (MacGillivray 1958), constituyendo una causa importante de prematuridad y de mortalidad neonatal (Sibai, *et al* 1995). Si bien la causa principal de la preeclampsia no ha sido definida aún, se conoce que la presencia de la placenta es requisito necesario y suficiente para la aparición de esta enfermedad (Myatt 2002). Este órgano es el encargado del desarrollo y crecimiento fetal, particularmente en la regulación del transporte de iones, nutrientes e inmunoglobulinas de la circulación materna a la fetal, e intercambio de gases y transporte de solutos, entre la madre y el feto (Regnault, *et al* 2002).

La membrana plasmática de las células del sincitiotrofoblasto de placenta 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 la membrana plasmática 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.

Se conoce que alteraciones en el proceso de placentación conducen a fallas en la remodelación de las arterias espirales (Brosens, *et al* 1972), lo cual se asocia con fallas parciales en la invasión del trofoblasto (Pijnenborg, *et al* 1981). Esta invasión trofoblástica disfuncional provoca la conservación de la capa muscular de las arterias espirales, lo cual puede conllevar a una perfusión placentaria intermitente (Hung and

Burton 2006), lo que conduciría a repetidos cuadros de hipoxia/reoxigenación, llevando a las membranas celulares a un proceso de peroxidación lipídica (Halliwell and Gutteridge 1989), lo que a su vez provocaría un incremento en la formación de radicales libres (Hubel, *et al* 1989), mientras que, por otro lado, los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentran disminuidos (Kharb 2000, Mikhail, *et al* 1994, Mohindra, *et al* 2002, Sagol, *et al* 1999).

El proceso de peroxidación lipídica y sus productos atacan a los lípidos de la membrana, provocando daños en los lípidos y proteínas de las mismas (Desai, *et al* 1964, Papahadjopoulos, *et al* 1973), afectando el funcionamiento de enzimas, como es el caso de la ATPasa de Ca^{2+}.

Se ha descrito un aumento del calcio iónico intracelular en eritrocitos, plaquetas, linfocitos y placenta en la mujer preeclámptica (Hojo, *et al* 1999, Matsubara, *et al* 1998, Pitkin 1985, Sowers, *et al* 1989). Esta elevación del calcio iónico intracelular pudiera explicar algunos eventos fisiopatológicos de la preeclampsia, ya que el aumento de calcio intracelular podría aumentar el tono vascular y la resistencia vascular periférica, con la consiguiente aparición de hipertensión arterial diastólica, casi siempre presente en la enfermedad. También, el incremento de calcio en plaquetas podría favorecer su activación y agregación, con formación de microtrombos, consumo de fibrinógeno y un estado de coagulación intravascular diseminada, situación que puede presentarse en formas severas de preeclampsia (Zeeman and Dekker 1992).

Estudios previos han demostrado una disminución de alrededor de un 50% de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en fantasmas de eritrocitos de embarazadas preeclámpticas, cuando comparada con la actividad de gestantes normotensas (Nardulli, *et al* 1994). Otros estudios, como el realizado por Casart (Casart, *et al* 2001) y Carreras (Carrera, *et al* 2003), demuestran una disminución de la ATPasa de Ca^{2+}, tanto de membranas plasmáticas de miometrio como de membranas basales

(lado fetal) de placenta humana, en pacientes con preeclampsia; esta disminución, representa alrededor de un 50% en ambos casos.

En el presente estudio, se determinó y comparó la actividad de dicha enzima en fracciones enriquecidas de membranas basales (MB) y de las microvellosidades (MVM), de explantos de sincitiotrofoblasto de placenta humana a término, cultivadas por 18 horas a 37°C, bajo condiciones de normoxia o hipoxia. En las fracciones de membranas cultivadas bajo las condiciones de hipoxia, se observó una disminución en la actividad de la enzima en las membranas basales (MB) de un 73±2% y, en las membranas de las microvellosidades (MVM), de un 63±2% (Figuras 3 y 4).

Estos resultados, son cónsonos con los comentados anteriormente, en cuanto a la disminución considerable de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} en las gestantes con preeclampsia. Con ello, podemos considerar al cultivo de explantos bajo condiciones de hipoxia, como un modelo que se acerca bien, respecto a los parámetro considerados, a lo que ocurre *in vivo* durante dicha patología.

Se ha reportado un incremento significativo en productos de peroxidación lipídica en plasma de embarazadas preeclámpticas, como consecuencia de la extensa peroxidación lipídica de la placenta, conjuntamente con fallas en los mecanismos antioxidantes (Hubel, *et al* 1989). Casart en 1995 (Casart 1995), demostró que membranas basales de células de placenta presentan un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en embarazadas preeclámpticas, en comparación con los valores obtenidos para las embarazadas normotensas. La peroxidación lipídica afecta la integridad de la membrana celular (Radi, *et al* 1991), disminuyendo así mismo su fluidez (Bulkley 1993) y produciendo inhibición en enzimas de membrana que dependen fuertemente de la composición lipídica de las mismas para la conservación de su actividad normal, como es el caso de la ATPasa de Ca^{2+} (Sowers, *et al* 1989). Está demostrado en fantasmas de eritrocitos, que la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} no está asociada a daños directos a la proteína, ni tampoco a

cambios en el número de ATPasas de Ca^{2+} en las pacientes preeclámpticas (Oviedo, *et al* 2006). Por consiguiente, la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, que se observa en algunos tejidos de las gestantes preeclámpticas, se ha explicado ser producida a través de la elevación de los niveles de peroxidación lipídica.

Borrego *et al.* (Borrego, *et al* 2006), dem ostraron que el aumento en los niveles de peroxidación lipídica de las membranas basales de sincititrofoblasto de placenta humana de gestantes preeclámpticas, se traduce en una concomitante inhibición de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}. Como sea que la peroxidación lipídica y sus productos, pueden originar severos daños a proteínas y lípidos de membranas (Desai, *et al* 1964, Papahadjopoulos, *et al* 1973), la inhibición de la ATPasa de Ca^{2+} de células de sincitiotrofoblasto descrita en este trabajo, pudiera ser explicada de acuerdo con alguna de las siguientes posibilidades:

1. Cambios en los fosfolípidos anulares: El daño causado por la peroxidación lipídica sobre los fosfolípidos anulares, puede conducir a una disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, ya que los mismos son esenciales para el buen funcionamiento de la enzima.

2. Cambios en la fluidez de la membrana celular: El daño a los fosfolípidos de membranas, con el deterioro de los residuos de ácidos grasos poliinsaturados de los mismos, tiende a reducir la fluidez de la membrana (Ohta, *et al* 1989, Ohyashiki, *et al* 1986, Rice-Evans, *et al* 1985). Cambios en la fluidez de la membrana, se pueden traducir fácilmente en cambios en la actividad de enzimas situadas en la misma, como es el caso de la ATPasa de Ca^{2+}.

3. Efecto inhibitorio de los lisofosfolípidos: La pérdida de fosfolípidos y ácidos grasos por las membranas, puede dar origen a la formación de lisofosfolípidos, los cuales poseen un efecto detergente (Wolf, *et al* 1991). Esto pudiera conducir a un proceso de desintegración estructural de las membranas.

Los resultados presentados en las Figuras 5 y 6, acerca del 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, se encuentran relacionados con los estudios anteriormente mencionados, ya que se observa una disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} (Figuras 3 y 4) y, al mismo tiempo, un aumento de sustancias reactivas al acido tiobarbitúrico (TBARS). Todas estas evidencias experimentales, indican claramente que la modificación del entorno lipídico de la ATPasa de Ca^{2+}, a través de un proceso de peroxidación lipídica de las membranas del sincitiotrofoblasto de los explantos sometidos a hipoxia, parece ser la responsable de la inhibición de la actividad de dicha enzima, reflejando a través de este modelo, lo que ocurre a nivel molecular durante la preeclampsia.

El tratamiento médico estándar para las gestantes con preeclampsia severa, es la administración parenteral de sulfato de magnesio ($MgSO_4$). Este tratamiento, ha demostrado ser muy eficaz en la prevención de las convulsiones que caracterizan la eclampsia (Sibai, *et al* 2005). En este particular, luego de 24 horas de iniciada la terapia con sulfato de magnesio, la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos provenientes de gestantes preeclámpticas, muestra valores similares a los observados en las gestantes normotensas (Abad, *et al* 2005). Hallazgos similares reportan recuperación de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de eritrocitos de recién nacidos con asfixia (Szemraj, *et al* 2005). Estos resultados experimentales permiten sugerir que el sulfato de magnesio tiene un efecto directo a nivel de membrana, probablemente como antioxidante, lo que le permite mantener niveles normales de actividad de la ATPasa de Ca^{2+} y de peroxidación lipídica, a pesar de estar las células bajo condiciones hipóxicas.

El posible papel del $MgSO_4$ como agente antioxidante puede ser potencialmente importante desde el punto de vista clínico. Si el $MgSO_4$ fuese un

agente antioxidante eficaz, el tratamiento de las gestantes con preeclampsia severa con esta sal, aumentaría la capacidad antioxidante de los plasmas de estas pacientes y, con ello, se ayudaría a recuperar el estatus de oxidación del organismo, severamente afectado con esta patología. El $MgSO_4$ podría tener cierta capacidad para interactuar directamente con radicales hidroxilos, disminuyendo así los procesos oxidativos mediados por la reacción de Fenton en las gestantes preeclámpticas. De ser esto así, el tratamiento con $MgSO_4$, no sólo dilataría las arterias cerebrovasculares, bloquearía los receptores de NMDA y los canales de calcio dependientes de voltaje (Peker, *et al* 2004), sino que además tendría un papel antioxidante.

CONCLUSIONES

Los hallazgos presentados en el presente trabajo, demuestran que variaciones en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membranas de células del sincitiotrofoblasto, bien sea de la membrana basal o, de la membrana de las microvellosidades, de explantos cultivados por 18 horas a 37°C, bajo condiciones de hipoxia, pudieran traducirse en consecuencias graves para la célula y, con ello, para el feto, no solamente en lo que se refiere a la regulación de la concentración intracelular del ión, sino también a la captación de nutrientes por las células del sincitiotrofoblasto.

También se pudo comprobar que la disminución de la actividad ATPásica de Ca^{2+} durante el cuadro de hipoxia ocurre en ambas membranas del sincitiotrofoblasto, siendo el efecto mayor para MB en comparación con el obtenido para MVM. Además, se pudo inferir que, la ATPasa de Ca^{2+} de estas membranas presenta una mayor sensibilidad a la peroxidación lipídica, que la encontrada para la ATPasa de Na,K.

Por último, se encontró que la presencia de sulfato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos de placenta humana a término, sometidos a hipoxia, previene la peroxidación lipídica de sus membranas celulares y, con ello, mantiene valores de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} cercanos a los obtenidos para membranas celulares de explantos incubados bajo condiciones de normoxia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, C. (2005) *Efectos del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca+2 y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas.* Centro de Estudios Avanzados, Doctora en Ciencias. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

Abad, C., Teppa-Garran, A., Proverbio, T., Pinero, S., Proverbio, F. & Marín, R. (2005) Effect of magnesium sulfate on the calcium-stimulated adenosine triphosphatase activity and lipid peroxidation of red blood cell membranes from preeclamptic women. *Biochem. Pharmacol.,* **70,** 1634-1641.

Belfort, M.A. & Moise, K.J., Jr. (1992) Effect of magnesium sulfate on maternal brain blood flow in preeclampsia: a randomized, placebo-controlled study. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **167,** 661-666.

Boletín Anual de la Maternidad Concepción Palacios. (1988). Caracas.

Borrego, E. (1997) *Efecto de la hipoxia placentaria sobre la actividad ATPásica de Ca^{2+} de membrana plasmática de células de sincitiotrofoblasto de placentas humanas a término.* Centro de Estudios Avanzados, M.Sc., Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

Borrego, E., Proverbio, T., Marín, R. & Proverbio, F. (2006) Lipid peroxidation and Ca-ATPase activity of basal plasma membranes of syncytiotrophoblast from normotensive pregnant women. *Gynecol. Obstet. Invest.,* **61,** 128-132.

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.

Brosens, I.A., Robertson, W.B. & Dixon, H.G. (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Annu.,* **1,** 177-191.

Buckle, R.M., Care, A.D., Cooper, C.W. & Gitelman, H.J. (1968) The influence of plasma magnesium concentration on parathyroid hormone secretion. *J. Endocrinol.,* **42,** 529-534.

Buhimschi, I., Saade, G., Chwalisz, K. & Garfield, R. (1998) The nitric oxide pathway in preeclampsia: pathophysiological implications. *Human Reprod. Update,* **4,** 25-42.

Bulkley, G.B. (1993) Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery,* **113,** 479-483.

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., Proverbio, T., Marín, R. & Proverbio, F. (2001) Comparative study of the calcium adenosine triphosphatase of basal membranes of human placental trophoblasts from normotensive and preeclamptic pregnant women. *Gynecol. Obstet. Invest.,* **51,** 28-31.

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 preeclámpticas. Centro de Estudios Avanzados, M.Sc., Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

Cotton, D.B., Hallak, M., Janusz, C., Irtenkauf, S.M. & Berman, R.F. (1993) Central anticonvulsant effects of magnesium sulfate on N-methyl-D-aspartate-induced seizures. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **168,** 974-978.

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

Chun, D., Braga, C., Chow, C. & Lok, L. (1964) Clinical observations on some aspects of hydatiform moles. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Comm.,* **71,** 180-184.

Davison, J.M., Homuth, V., Jeyabalan, 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.

De Wolf, F., De Wolf-Peeters, C. & Brosens, I. (1973) Ultrastructure of the spiral arteries in the human placental bed at the end normal preganacy. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **117,** 833-848.

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.

Eisenbud, E. & LoBue, C.C. (1976) Hypocalcemia after therapeutic use of magnesium sulfate. *Arch. Intern. Med.,* **136,** 688-691.

Farkouh, L.J., Thorp, J.A., Jones, P.G., Clark, R.H. & Knox, G.E. (2001) Antenatal magnesium exposure and neonatal demise. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **185,** 869-872.

Feix, J.B., Bachowski, G.J. & Girotti, A.W. (1991) Photodynamic action of merocyanine 540 on erythrocyte membranes: structural perturbation of lipid and protein constituents. *Biochim. Biophys. Acta,* **1075,** 28-35.

Forbush, B., III (1983) Assay of Na,K-ATPase in plasma membrane preparations: Increasing the permeability of membrane vesicles using sodium dodecyl sulfate buffered with bovine serum albumin. *Analyt. Biochem.,* **128,** 159-163.

Gitelman, H.J., Kukolj, S. & Welt, L.G. (1968) Inhibition of parathyroid gland activity by hypermagnesemia. *Am. J. Physiol.,* **215,** 483-485.

Greene, M.F. (2003) Magnesium sulfate for preeclampsia. *N. Engl. J. Med.,* **348,** 275-276.

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

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

Hojo, M., Suhanthiran, M., Helseth, G. & August, P. (1999) Lymphocyte intracellular free calcium concentration is increased in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **180,** 1209-1214.

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.

Hung, T.H. & Burton, G.J. (2006) Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.,* **45,** 189-200.

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,** 218-226.

Iseri, L.T. & French, J.H. (1984) Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am. Heart J.,* **108,** 188-193.

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.,* **279,** R287-294.

Kako, K., Kato, M., Matsuoka, T. & Mustapha, A. (1988) Depression of membrane-bound Na^+-K^+-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am. J. Physiol.,* **254,** C330-C337.

Katz, S. & Blostein, R. (1975) Ca^{2+}-stimulated membrane phosphorylation and ATPase activity of the human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta,* **389,** 314-324.

Kharb, S. (2000) Vitamin E and C in preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.,* **93,** 37-39.

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.

Knauf, P.A., Proverbio, F. & Hoffman, J.F. (1974) Electrophoretic separation of different phophosproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.,* **63,** 324-336.

Kovac, C.M., Howard, B.C., Pierce, B.T., Hoeldtke, N.J., Calhoun, B.C. & Napolitano, P.G. (2003) Fetoplacental 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, J. & Simoneau, L. (2006) Calcium homeostasis in human placenta: role of calcium-handling proteins. *Int. Rev. Cytol.,* **250,** 109-174.

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

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

Lindheimer, M.D. & 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.

Lodish, H., Berks, A., Zipursky, L., P., M., Baltimore, D. & Darnell, J. (2002) *Biología Celular y Molecular.* Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires.

López, T.T., Limongi, F., Proverbio, T., Oviedo, N.J., Proverbio, F. & Marín, R. (2003) Calcium-ATPase activity of red blood cell ghosts from preeclamptic women, antepartum and postpartum. *Hypertens. Pregnancy,* **22,** 247-256.

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. & Proverbio, F. (1986) Inside-out basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta,* **858,** 195-201.

Matsubara, K., Ochi, H., Kitagawa, H., Ito, M. & Oka, K. (1998) Ca^{2+} oscillation in endothelial cells and preeclampsia. *Lancet,* **351,** 1490-1491.

Matsubara, S., Tamada, T. & Saito, T. (1987) Cytochemical study of the electronmicroscopical localization of Ca++ATPase activity in the human trophoblast. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi,* **39,** 1080-1086.

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.

McCall, M.L.S., D. (1956) The action of magnesium sulfate on cerebral circulation and metabolism in toxemia of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **71,** 1089-1096.

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

Mendoza, M. (2004) *Peroxidación lipídica y actividad de la ATPasa de Na.K en membrana plasmática de células de sincitiotrofoblasto de placenta humana.* Centro de Estudios Avanzados, M.Sc. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas.

Mikhail, M.S., Anyaegbunam, A., Garfinkel, D., Palan, P.R., Basu, J. & Romney, S.L. (1994) Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **171,** 150-157.

Mohindra, A., Kabi, B.C., Kaul, N. & Trivedi, S.S. (2002) Vitamin E and carotene status in pre-eclamptic pregnant women from India. *Panminerva Med.,* **44,** 261-264.

Myatt, L. (2002) Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine,* **19,** 103-111.

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.

National High Blood Pressure Education Program Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy. (1990). *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **163,** 1691-1712.

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,** 311-318.

Oviedo, N.J., Benaim, G., Cervino, V., Proverbio, T., Proverbio, F. & Marin, R. (2006) The plasma membrane Ca^{2+}-ATPase protein from red blood cells is not modified in preeclampsia. *Biochim. Biophys. Acta,* **1762,** 381-385.

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,** 8-26.

Pedersen, P.L. & Carafoli, E. (1987a) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS,* **12,** 186-189.

Pedersen, P.L. & Carafoli, E. (1987b) Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. *TIBS,* **12,** 186-189.

Peker, S., Abacioglu, U., Sun, I., Konya, D., Yuksel, M. & Pamir, N.M. (2004) Prophylactic effects of magnesium and vitamin E in rat spinal cord radiation damage: evaluation based on lipid peroxidation levels. *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.

Pijnenborg, R., Robertson, W., Brosens, I. & Dixon, G. (1981) Trophoblast invasion and the establishment of haemochorialplacentation in man and laboratory animals. *Placenta,* **2,** 71-91.

Pitkin, R.M. (1985) Calcium metabolism in pregnancy and the perinatal period: a review. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **151,** 99-109.

Pritchard, J., MacDonald, P. & Gant, N. (1990) Williams Obstetricia. *Tercera edición Barcelona: Salvat Editores.*

Pritchard, J.A. & Pritchard, S.A. (1975) Standardized treatment of 154 consecutive cases of eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **123,** 543-552.

Pritchard, J.A. & Stone, S.R. (1967) Clinical and laboratory observations on eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **99,** 754-765.

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

Proverbio F, M.R. (1995) Investigación básica en biología de la reproducción humana. In: *Endocrinología ginecológica y Reproducción Humana* (F. Febres.Balestrini & J. Terán Dávila, eds.), pp. 719-737. Ateproca, Caracas.

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.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. & Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288,** 481-487.

Redman, C.W. (1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta,* **12,** 301-308.

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

Regnault, T.R., Galan, H.L., Parker, T.A. & Anthony, R.V. (2002) Placental development in normal and compromised pregnancies-- a review. *Placenta,* **23 Suppl A,** S119-129.

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,** 426-432.

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

Roberts, J.M. (1995) Magnesium for preeclampsia and eclampsia. *N. Engl. J. Med.,* **333,** 250-251.

Roberts, J.M. (1998) Endothelial dysfunction 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.

Sagol, S., Ozkinay, E. & Ozsener, S. (1999) Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.,* **64,** 121-127.

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.

Scott, J.S. (1958) Pregancy toxaemia associated with hydrops foetalis, hydatidiform mole and hydramnios. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Emp.,* **65,** 689-701.

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

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

Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. (2005) Pre-eclampsia. *Lancet,* **365,** 785-799.

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.

Sibai, B.M. (1990) Magnesium sulfate is the ideal anticonvulsant in preeclampsia-eclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **162,** 1141-1145.

Sibai, B.M. (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet. Gynecol.,* **102,** 181-192.

Sibai, B.M., Graham, J.M. & McCubbin, J.H. (1984) A comparison of intravenous and intramuscular magnesium sulfate regimens in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **150,** 728-733.

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,** 1914-1919.

Sowers, J.R., Zemel, M.B., Bronsteen, R.A., Zemel, P.C., Walsh, M.F., Standley, P.R. & Sokol, R.J. (1989) Erythrocyte cation metabolism in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.,* **161,** 441-445.

Szemraj, J., Sobolewska, B., Gulczynska, E., Wilczynski, J. & Zylinska, L. (2005) Magnesium sulfate effect on erythrocyte membranes of asphyxiated newborns. *Clin. Biochem.,* **38,** 457-464.

Varela, H. (2007) *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.* Facultad de Humanidades y Educación, Escuela de Educación, Licenciatura en Educación Mención Biología y Química. Universidad Católica Andrés Bello, Caracas.

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. In: *Preeclampsia* (H. Critchley, L. Poston & J.J. Walker, eds.), pp. 189-207. RCOG Press, London.

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. USA,* **83,** 1075-1078.