AAS2632
Tesis
ED2011
F6

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

Actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio

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

Autor: Heliantaly Jaramy Freitas Mogollón
Tutora: Dra. Cilia Abad
Co-tutor: Dr. Fulgencio Proverbio

Caracas, Septiembre 2011

CARTA DE APROBACIÓN

Por medio de la presente hago constar que acepto ser el tutor del Trabajo Especial de Grado, presentado por la bachiller Heliantaly Jaramy Freitas Mogollón, para optar al Grado de Licenciada en Educación, Mención Biología y Química, cuyo título es: "Actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio".

En la ciudad de Caracas a los diecinueve días del mes de Septiembre del año dos mil once.

Tutora: Dra. Cilia Abad

C.I.: 6.750.168

Co-Tutor: Dr. Fulgencio Proverbio

C.I.: 4.812.508

A mis padres, con agradecimiento y por su paciencia

A mi madrina Yasmín, por su atención y apoyo

A mi hermano, por su apoyo y alegría

AGRADECIMIENTOS

- A la Doctora Cilia Abad, por su guía y buena disposición para ayudarme a comprender lo concerniente al proyecto.
- A los Doctores Fulgencio Proverbio y Reinaldo Marín, por su vocación de enseñanza y por compartir sus conocimientos, siendo guías en todo momento. Gracias por su confianza.
- A Sandy Piñero y Desirée Botana, por la valiosa colaboración y constante disposición para ayudar, así como también a Indira, Deliana, Daniel, Mexys y demás personas que trabajaron temporalmente en el laboratorio, que hicieron que mi trabajo en el laboratorio fuera ameno.
- A mis profesores de la UCAB, en especial Maricarmen Eizaguirre, Rafael Muñiz y Trina Perrone, por sus siempre interesantes enseñanzas, personalidad y pasión por la ciencia.
- A Elías, por su constante apoyo y valiosa ayuda en la realización de este proyecto, y toda la carrera.
- A mis compañeros y amigos de la Universidad, Orquídea, Jheyson, José Rubén, María Teresa y Duiney, por la amistad, apoyo, ánimo brindado y todos esos buenos momentos que pasamos juntos.
- A la Universidad Católica Andrés Bello, por las experiencias y oportunidad de estudio y trabajo brindado desde el inicio de la carrera, que permitió continuar y culminar mi carrera.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por permitirme realizar mi Trabajo Especial de Grado.
- Al Comité de Ética de la Maternidad Concepción Palacios.
- A la Biblioteca "Marcel Roche", IVIC.
- Al Centro de Estudios Avanzados (C.E.A.), IVIC.

ÍNDICE GENERAL

Página

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
LISTA DE TABLAS vii
LISTA DE FIGURAS viii
RESUMEN ix
INTRODUCCIÓN 1
CAPÍTULO I 4
Planteamiento del problema 4
Objetivo General 6
Objetivos Específicos 6
Justificación de la investigación 7
CAPÍTULO II 9
Marco Teórico 9
CAPÍTULO III 19
Materiales y Métodos 19
1 Placentas Humanas 19
2 Preparación de Explantos 19
3 Homogenizados de Placenta Humana 20
4 Determinación de Proteínas 20
5 Actividad ATPásica de Ca^{2+} 21
6 Análisis Estadístico 22
CAPÍTULO IV 23
Resultados 23
1 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, en presencia de 1 μM Tapsigargina 25

2 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia..... 27

3 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia.... 29

4 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$..... 29

5 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 32

6 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$..... 34

7 Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 36

CAPÍTULO V..... 38

Discusión..... 38

Conclusiones..... 43

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.. 44

LISTA DE TABLAS

TABLA Página

I Efecto de 1 μM Tapsigargina sobre la Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, recién preparados..... 26

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Página

1. Actividad de la ATPasa Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia..... 28
2. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia..... 30
3. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$..... 31
4. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 33
5. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$..... 35
6. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$..... 37

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO

Trabajo especial de grado para optar al Título de Licenciado en Educación

Mención Biología y Química

Actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio

Autora: Heliantaly Freitas

Tutora: Dra. Cilia Abad

Cotutor: Dr. Fulgencio Proverbio

Fecha: Septiembre 2011

RESUMEN

La preeclampsia es un síndrome clínico multisistémico, exclusivo del embarazo en el ser humano. Se caracteriza por una elevación de la presión arterial, edema y proteinuria, signos éstos que aparecen en la gestante, generalmente luego de 20 semanas de gestación. Actualmente, este síndrome es primera causa de mortalidad y morbilidad, tanto materna como fetal. Si bien no se conoce aún con exactitud la etiología de este desarreglo, hay fuerte evidencia que sugiere que el proceso se inicia con un cuadro de hipoperfusión úteroplacentaria, el cual, a su vez, provoca una situación de hipoxia placentaria, que se traduce en un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en el tejido placentario desde donde, a través de la sangre, difundiría hacia todo el organismo. Una elevación en el grado de peroxidación lipídica de membranas celulares, conduce a cambios estructurales y funcionales de las mismas, que pueden traducirse en un mal funcionamiento de mecanismos adscritos a estas membranas. Un ejemplo de ello, lo constituye la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas del sinciciotrofoblasto de placenta y de membranas de

glóbulos rojos de mujeres preeclámpticas, cuya actividad está disminuida en mujeres preeclámpticas. Esta disminución de actividad de las membranas de los glóbulos rojos puede ser revertida por tratamiento *"in vivo"* de las pacientes, o *"in vitro"* de glóbulos rojos de las mismas, con sulfato de magnesio. Como sea que el sulfato de magnesio debe ser suministrado a las pacientes, necesariamente por vía endovenosa, se ha pensado en la posibilidad de su sustitución por otras sales de magnesio, que puedan ejercer los mismos efectos, pero que puedan ser ingeridas vía oral, como es el caso del gluconato de magnesio. Específicamente, en el presente trabajo se determinó la actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término, recién preparados o después de incubados bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio.

Se encontró que la actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizados de explantos placentarios humanos incubados bajo condiciones de normoxia tiene valores parecidos a los homogenizados de explantos recién preparados. Por el contrario, preincubación de los explantos bajo condiciones de hipoxia, resulta en una disminución significativa de la actividad de la enzima, la cual no se produce si la hipoxia es realizada en un medio que contenga sulfato de magnesio. Interesantemente, tampoco se produce disminución alguna, si la condición de hipoxia es realizada en presencia de gluconato de magnesio.

En conclusión, la presencia de gluconato de magnesio, al igual que el sulfato de magnesio, es capaz de evitar el efecto inhibitorio que se produce en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membranas celulares de explantos placentarios, incubados bajo condiciones de hipoxia.

Descriptores: ATPasa de Ca^{2+}, placenta humana, explanto, hipoxia, peroxidación lipídica, sinciciotrofoblasto, sulfato de magnesio, gluconato 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 (MCP, 1993), encontrándose que hasta un 7% de los embarazos se complican con dicha patología (MCP, 1993). 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 un síndrome multisistémico, exclusivo del embarazo en el ser humano (Zeeman & Dekker, 1992). El diagnóstico de este síndrome se fundamenta en la presencia concomitante de hipertensión arterial, edema y proteinuria. La etiología de la preeclampsia aún se desconoce, y se cree que sus causas pueden ser múltiples. Existen diversas teorías que tratan de explicar el origen de la preeclampsia, y muchas de ellas convergen en el concepto de fallas en la invasión trofoblástica normal y en la remodelación de las arterias uterinas (Kharfi *et al.*, 2003). La fisiopatología de la preeclampsia si es bien entendida, afirmándose que la disfunción endotelial juega un rol principal en muchos de los signos clínicos, ya que se derivan de cambios dentro del endotelio vascular materno o involucran disfunción endotelial generalizada (Roberts, 1998; Davison *et al.*, 2004).

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 para incrementar el conocimiento de los procesos celulares y moleculares que se dan en la preeclampsia.

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 estas 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). Si bien en sus inicios era un tratamiento más empírico que científicamente comprobado, hoy en día existen en la literatura algunos estudios en donde se demuestran sus efectos benéficos, tanto para la madre como para el feto. Entre los beneficios del magnesio, se pueden mencionar: aumento del flujo sanguíneo cerebral, aumento de la liberación de prostaciclinas, protección contra daño mediado por radicales libres, disminución de la vasoconstricción en la placenta humana, inhibición de la activación del receptor NMDA, disminución de la agregación plaquetaria, disminución del riesgo de parálisis cerebral en prematuros, dilatación de las arterias coronarias, disminución de la resistencia periférica total y, también, es empleado como agente tocolítico para prevenir los partos pretérmino. Más aún, a nivel celular se ha demostrado que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membrana celular de tejido placentario está disminuida en la mujer preeclámptica y que esta disminución es revertida por el sulfato de magnesio.

Cabe destacar que existen otras sales de Mg, que pueden ser suministradas por vía oral, como lo es el gluconato de magnesio. Se dice que este agente proporciona ventajas a la mujer preeclámptica, ya que estudios realizados por (Li & Tian, 1997) indican que el gluconato de magnesio en dosis bajas por vía oral puede prevenir eficazmente la preeclampsia en las mujeres de alto riesgo. En este particular, hay estudios que refieren el uso de sales orales de magnesio, como el gluconato de magnesio, las cuales además tienen una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). Además, el gluconato de magnesio es capaz de remover radicales hidroxilos y alcoxilos, por encima de la capacidad antioxidante que presenta el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En procesos de isquemia-reperfusión cardiaca, el gluconato de magnesio disminuye los daños oxidativos, a través de la disminución significativa de los niveles de radicales alcóxilos, por encima del efecto mostrado por

el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000). Por tal razón en este trabajo se pretende evaluar la actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio. Para ello, se incubarán cultivos de explantos de placenta humana a término de gestantes normotensas, bajo condiciones de normoxia (explantos incubados con aproximadamente 8% de oxígeno), o de hipoxia (explantos incubados con 2% de oxígeno), en presencia y ausencia de gluconato de magnesio. A partir de estos explantos, se obtendrán los homogenizados, a los cuales se les determinará la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}.

CAPÍTULO I

Planteamiento del problema

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica exclusiva del embarazo en el ser humano, que afecta entre 7 y 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 & 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 (Pitkin, 1985; Sowers *et al.*, 1989; Matsubara *et al.*, 1998; Hojo *et al.*, 1999). 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 membrana plasmática miometrial y de membrana plasmática de células del sinciciotrofoblasto 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 Ca^{2+} de 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 también 24 horas después del tratamiento *in vivo* e *in vitro* con sulfato de magnesio (Abad, 2005). Del mismo modo, se ha demostrado que esta recuperación de la enzima es debida fundamentalmente al ión magnesio, dado que empleando otras sales de magnesio, se ha logrado restablecer a valores normales la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de fantasmas de glóbulos rojos de pacientes preeclámpticas (Abad, 2005).

Considerando el hecho de 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. De hecho, se ha demostrado que en membranas plasmáticas de células de sinciciotrofoblasto de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, se observa una disminución en los valores de actividad de la ATPasa de Ca^{2+} (Caires *et al.*, 2007), lo cual no sucede si el cultivo es realizado en presencia de sulfato de magnesio.

En este estudio, se va a enfocar y a tratar de determinar si la presencia del gluconato de magnesio en el medio de cultivo es capaz, a semejanza del sulfato de magnesio, de evitar la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} que se produce en los homogenizados de explantos de placenta humana a término, cuando éstos son cultivados bajo condiciones de hipoxia. Para ello, se cultivarán explantos de sinciciotrofoblasto de placenta humana bajo condiciones de normoxia e hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio, durante 18 horas a 37°C, y se evaluará la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de sus homogenizados totales.

El desarrollo del estudio se realizará de acuerdo a las siguientes interrogantes:

- *¿Cómo se afecta la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, cuando comparada con explantos cultivados bajo condiciones de normoxia?*
- *¿Podrá la presencia del gluconato de magnesio prevenir las alteraciones que se producen en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia?*
- *¿Será el efecto del gluconato de magnesio sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término cultivados bajo condiciones de hipoxia, similar al observado con sulfato de magnesio?*

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Evaluar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio, y comparar el efecto que éste pueda tener, con el producido por el sulfato de magnesio.

Objetivos específicos

1. Aislar explantos placentarios, como fuente de vellosidades coriónicas.

2. Incubar los explantos placentarios bajo condiciones de normoxia (8% oxígeno), y de hipoxia (2% oxígeno), en presencia o ausencia de 4 mM gluconato de magnesio, durante 18 horas a 37°C.

3. Preparar los homogenizados totales a partir de los explantos placentarios, incubados bajo las condiciones indicadas.

4 Determinar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de los homogenizados totales.

5. Comparar el posible efecto de la presencia de gluconato de magnesio en el medio de cultivo de los explantos placentarios, con aquél producido por el sulfato de magnesio.

Justificación de la Investigación

La placenta está compuesta por tejido embrionario y materno, y 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 sinciciotrofoblasto 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 sinciciotrofoblasto 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 ha encontrado en ciertas patologías, en las cuales está involucrada la placenta, que las actividades de enzimas de la membrana plasmática pueden verse modificadas como consecuencia del proceso 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 (Hubel *et al.*, 1989; Nardulli *et al.*, 1994; Matteo *et al.*, 1998; Carrera *et al.*, 2003). 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 & Gutteridge, 1989), como consecuencia de un incremento en la formación de radicales libres. De la misma manera, 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 utilizará 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 el efecto sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, y determinar el posible efecto protector del gluconato de magnesio sobre la actividad de ésta enzima.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

La preeclampsia es la principal patología del embarazo en el ser humano, expresándose 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 neonatal (Sibai *et al.*, 1995). La tasa de incidencia de la preeclampsia se encuentra entre 2% y 7% en mujeres nulíparas, pudiendo estas cifras aumentar hasta 14%, cuando el embarazo es doble o hasta 18%, si ya se ha padecido de preeclampsia (Sibai, 2003). En la maternidad "Concepción Palacios", en Caracas, la hipertensión inducida por el embarazo ocupa el segundo lugar dentro de las causas de muerte obstétrica (MCP, 1993), encontrándose que hasta 7% de los embarazos se complican con preeclampsia (MCP, 1993). 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 un síndrome multisistémico (Zeeman & 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, estos síntomas se vinculan con vasoespasmo, lesiones vasculares patológicas en múltiples sistemas orgánicos (incluyendo el lecho vascular úteroplacentario), aumento de la actividad y consumo plaquetario y, activación subsecuente del sistema de coagulación en la microcirculación (Scott, 1958; Chun *et al.*, 1964).

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 (NHBPEPWG, 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 400 ml de orina diaria) o síntomas persistentes de alteraciones del sistema nervioso central como dolores de cabeza, visión borrosa o ceguera, estado mental alterado (Sibai, 2003) y disminución del estado consciente, lo que pronostica convulsiones incipientes (Lipstein *et al.*, 2003). Otras señales asociadas a la preeclampsia severa, son el retardo del crecimiento del feto y la elevación de la creatinina sérica (Lipstein *et al.*, 2003). El síndrome HELLP (acrónimo que viene de Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low 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 & Katz, 1985). La preeclampsia desaparece varios días después del parto (Zeeman & 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 este síndrome clínico. 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 (Roberts & Cooper, 2001; Kharfi *et al.*, 2003).

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 sinciciotrofoblasto, y de ella 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).

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 sinciciotrofoblasto, 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 sinciciotrofoblasto en desarrollo. El sinciciotrofoblasto erosiona activamente el endometrio, permitiendo al blastocisto en conjunto introducirse más profundamente en el mismo (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 sinciciotrofoblasto, 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 sinciciotrofoblasto representa la interfase entre las circulaciones materna y fetal, y es el sitio donde se ejecuta el intercambio y transporte de solutos y gases entre la

madre y el feto (Mendoza, 2004). El sinciciotrofoblasto es un epitelio polarizado con la membrana de las microvellosidades en su cara materna y con la membrana basal en su cara fetal, presentándose en dichas membranas 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 fino 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 & Carafoli, 1987b; Pedersen & Carafoli, 1987a), donde se forma un intermediario fosforilado estable, tipo acil fosfato, en su ciclo catalítico (Knauf *et al.*, 1974; Katz & Blostein, 1975). Dicha ATPasa es dependiente de magnesio, es activada por concentraciones micromolares de Ca^{2+} 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 sinciciotrofoblasto, (Borrego, 1997) y de las membranas de la microvellosidades en estas células (datos aún no publicados).

Si bien la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática no es el único mecanismo encargado de mantener los niveles de calcio intracelular, es el que posee mayor afinidad por el ión calcio, por lo que, 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.

Los lípidos 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 estas enzimas. La ATPasa de Ca^{2+} depende de su entorno lipídico para funcionar normalmente (Proverbio & Marín, 1995). Por ende, una elevación en el grado de peroxidación lipídica de las membranas celulares afecta su funcionamiento. Más aún, se ha encontrado que los procesos de oxidación pueden 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).

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, pero los primeros estudios notables del efecto del sulfato de magnesio sobre la preeclampsia, fueron realizados entre 1925 y 1926 por Dosertt, Lazard, Alton y Lincoln (McCall, 1956). En 1929, con la introducción del uso del sulfato de magnesio para la prevención de convulsiones eclámpticas en el Hospital Chicago Lying, la incidencia de eclampsia descendió desde un 36% a un 7% (Greene, 2003).

Así, el sulfato de magnesio, usado desde hace más de 60 años como terapia y profilaxis contra las convulsiones eclámpticas (Scardo *et al.*, 1995), ha llegado a ser el tratamiento estándar en los últimos 30 años y está asociado con una dramática reducción de la morbilidad materno y neonatal relacionada con eclampsia (Pritchard & Stone, 1967). 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 tradicionalmente más bien como un "tratamiento empírico" (Pritchard & 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 & 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 (Nelson & 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 & 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 & Moise, 1992).

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). También se ha demostrado su capacidad de evitar daños en la actividad de enzimas de membrana como la ATPasa de Ca^{2+} (Casart, 1995).

El uso prenatal del sulfato de magnesio protege al feto al disminuir la incidencia de hemorragias intraventriculares en neonatos de embarazadas preeclámpticas (Kuban *et al.*, 1992). Del mismo modo, se conoce que disminuye el riesgo de parálisis cerebral en prematuros (Nelson & Grether, 1995). Otros estudios, demuestran una reducción en los índices de mortalidad neonatal, cuando se emplea sulfato de magnesio para tratar la preeclampsia (Farkouh *et al.*, 2001). Por otro lado, empleando cotiledones aislados de placenta, se ha reportado que la presión de la perfusión arterial fetoplacental está aumentada en placentas provenientes de pacientes preeclámpticas, y que ésta disminuye cuando son tratados 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, al menos en parte, por el efecto vasodilatador de este agente (magnesio) a nivel del lecho vascular fetoplacental.

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).

Debido a que el sulfato de magnesio presenta la gran limitante de que sólo puede ser administrado vía intravenosa, actualmente se estudian otras sales de magnesio como tratamientos alternativos al sulfato de magnesio. Una de estas sales es el gluconato de magnesio. En este sentido, Li y Tian evaluaron el uso de gluconato de magnesio (administrado por vía oral) para prevenir la hipertensión inducida por el

embarazo. Para ello, administraron a dosis bajas (3g/día) gluconato de magnesio o placebo a mujeres embarazadas a partir de las 28 semanas de embarazo. Los resultados mostraron que el gluconato de magnesio es capaz de reducir considerablemente el riesgo de desarrollar hipertensión inducida por el embarazo (4%), comparado con las gestante que recibieron el placebo (16%) (Li & Tian, 1997). Adicionalmente, hay estudios que refieren el uso de sales orales de magnesio, como el gluconato de magnesio, las cuales además tienen una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). Además, el gluconato de magnesio es capaz de remover radicales hidroxilos y alcoxilos, por encima de la capacidad antioxidante que presenta el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En procesos de isquemia-reperfusión cardiaca, el gluconato de magnesio disminuye los daños oxidativos, a través de la disminución significativa de los niveles de radicales alcóxilos, por encima del efecto mostrado por el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000).

Tomando en cuenta que la ATPasa de Ca^{2+} depende de su entorno lipídico para funcionar normalmente (Proverbio & Marín, 1995), en este trabajo se pretende evaluar la actividad ATPásica de Ca^{2+} en homogenizados de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

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, eran colocadas sobre hielo y trasladadas al laboratorio, donde se procesaron. Todo esto en un lapso menor a 4 horas.

2. Preparación de Explantos y cultivo de los mismos.

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 se realizaba 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 2 ml 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 a 37ºC (2 ml/pozo). Luego, los explantos se incubaban bajo condiciones de normoxia o hipoxia, en presencia y ausencia de 4 mM gluconato de magnesio, 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: 8% O_2, 5% CO_2, 87% N_2
- Hipoxia: 2% O_2, 5% CO_2, 93% N_2

3. Homogenizado de explantos de placenta humana.

Los explantos se removían del medio de cultivo y se lavaban con solución salina. Una vez lavado, el tejido se pesaba y se procedía 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 homogenizaba 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. Determinación de proteínas.

La cuantificación del contenido de proteínas de los homogenizados, se realizaba según el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se utilizaba 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.

5. Actividad ATPásica de Ca^{2+}.

La actividad ATPásica de Ca^{2+}, se determinaba según una modificación del método descrito por Proverbio *et al.* (Proverbio & del Castillo, 1981; Proverbio *et al.*, 1986). El fosfato inorgánico liberado durante la reacción, se determinaba según el método de Forbush, modificado por Marín *et al.* (Forbush, 1983; Marín *et al.*, 1986). El medio donde se efectuaba 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 0,3-0,6 mg/ml. La concentración de proteínas se determinaba 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; $CaCl_2$ 0,11 mM. Ca^{2+} libre, 5,6 µM

El procedimiento era el siguiente: 180 µl del medio de incubación se preincubaban por dos minutos a 37°C. La reacción se iniciaba al añadir 20 µl de la

fracción de membranas. La reacción culminaba 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 eran luego colocados inmediatamente en hielo durante 10 minutos. Después de pasar los 10 minutos en hielo, se le añadía 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 recalentaban a 37°C por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se procedía a medir la Absorbancia en un lector de Elisa a 705 nm. En todos los casos, se trabajó 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 calcula como la diferencia en actividades entre el medio II y el medio I.

6. Análisis Estadístico.

Los resultados se expresan como las medias ± el error estándar, para el número de ensayos indicado en cada caso. Los errores estándar de las diferencias son calculados para datos pareados. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando la *"t"* de Student, siendo *"n"* el número de veces que se repitieron los ensayos, con preparaciones diferentes. Se acepta 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. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, en presencia de 1 μM Tapsigargina.

2. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia.

3. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia.

4. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$.

5. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

6. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$.

7. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

1.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, en presencia de 1 μM Tapsigargina.

La regulación fina del calcio a nivel intracelular, en general, es ejercida por un mecanismo presente en la membrana plasmática de las células, conocido como bomba o ATPasa de Ca^{2+} (PMCA). Nuestros experimentos fueron realizados con homogenizados de explantos de placenta humana a término en los cuales, además de membranas plasmáticas del sinciciotrofoblasto, hay también membranas de retículo sarcoplasmático de las mismas células, las cuales, si bien no son muy numerosas en este tejido, poseen una ATPasa de Ca^{2+} (SERCA), cuya actividad pudiera enmascarar nuestros resultados, aunque las condiciones empleadas para nuestros experimentos favorecen la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática.

En función de ello, se procedió a realizar, en primer lugar, determinación de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de nuestros homogenizados, en ausencia o presencia de Tapsigargina, un inhibidor específico de la SERCA, para evaluar si se presentaba alguna actividad ATPásica adicional debida a la misma.

En la Tabla 1, se presentan los resultados de este experimento. Nótese que los valores de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} son muy parecidos, tanto en ausencia como presencia de Tapsigargina. Este resultado, constituye una clara indicación de que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} determinada en nuestras condiciones experimentales, es debida fundamentalmente a la acción de la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA), sin detectarse prácticamente ninguna actividad de la SERCA. De todos modos, como medida de seguridad, todos los experimentos de determinación de actividad de ATPasa de Ca^{2+}, se realizaron en presencia de 1 μM Tapsigargina.

Tabla 1

Efecto de 1 μM Tapsigargina sobre la Actividad ATPásica de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, recién preparados

Condiciones de ensayo	Actividad ATPásica nmoles Pi/mg prot. min		
	Mg^{2+}	$Mg^{2+} + Ca^{2+}$	Δ
Ausencia de Tapsigargina	110 ± 6	144 ± 4	34 ± 3
Presencia de Tapsigargina	118 ± 4	146 ± 4	28 ± 1.3*

*p = n.s.

Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

2.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, o preincubados bajo condiciones de normoxia.

El objetivo fundamental de este trabajo, es investigar sobre la posible capacidad del gluconato de magnesio de proteger la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas del sinciciotrofoblasto, cuando los explantos de placenta son incubados bajo condiciones de hipoxia. Para ello es necesario, en primera instancia, evaluar si las incubaciones de los explantos bajo condiciones de normoxia, producen algún efecto sobre la actividad de la enzima.

Para contestar esta pregunta, se incubaron explantos de placenta durante 18 horas, a 37°C, bajo condiciones de normoxia, como indicado en materiales y métodos y, posteriormente, se determinó la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de sus homogenizados, comparándolos con la actividad de homogenizados de explantos recién preparados. Los resultados de este experimento, se muestran en la Figura 1. Es de notar que las actividades son muy parecidas en ambos casos, pudiéndose concluir de estos resultados que la preincubación de nuestras preparaciones bajo las condiciones indicadas, no produce efecto alguno sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las mismas.

A continuación, se procedió a evaluar si la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del sinciciotrofoblasto se ve afectada, cuando los explantos son incubados de la misma manera, pero bajo condiciones de hipoxia.

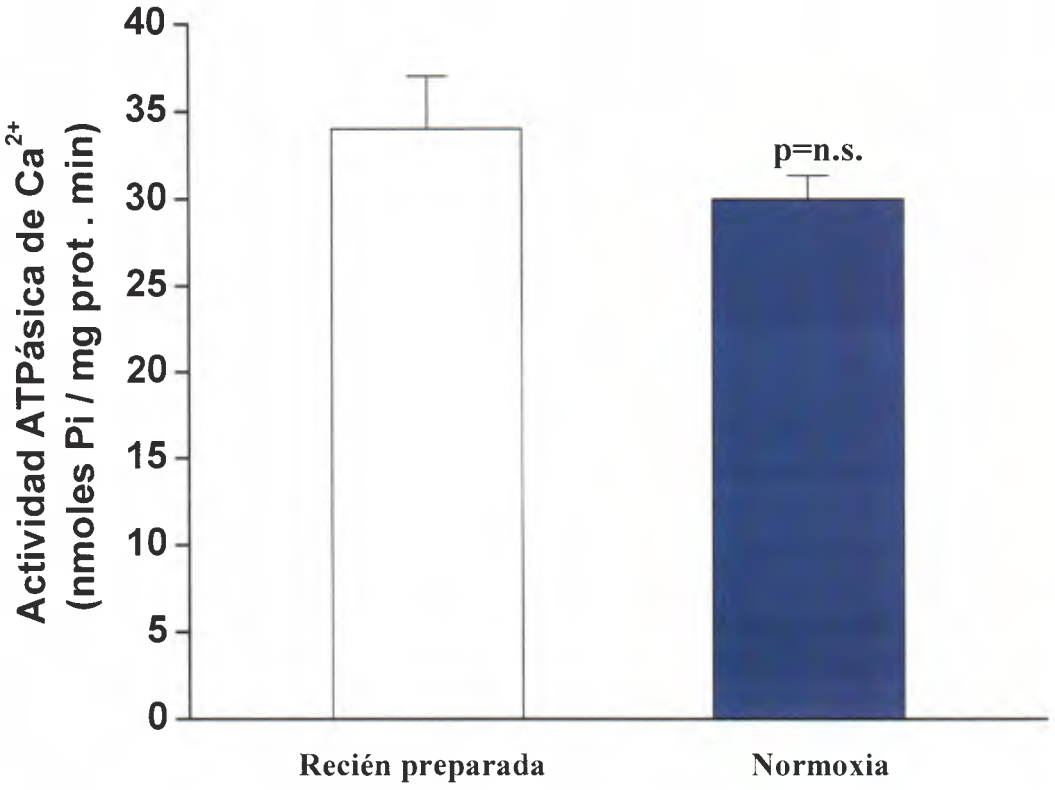

Figura 1. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados o preincubados bajo condiciones de normoxia. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

3.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia.

En función de lo indicado anteriormente, se realizó el mismo experimento, pero en esta ocasión incubando explantos bajo condiciones de hipoxia, durante 18 horas a 37° C. Los resultados de este experimento, comparados con los obtenidos para aquellos incubados bajo condiciones de normoxia, pueden verse en la Figura 2. Nótese que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} para los homogenizados de explantos incubados bajo condiciones de hipoxia sufre una disminución significativa, al compararse con la actividad de los homogenizados de explantos incubados bajo condiciones de normoxia. Estos resultados corroboran que el tejido en estudio es altamente susceptible a situaciones de hipoxia, por lo menos con respecto a la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas celulares.

4.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$.

Veamos a continuación el efecto que puede producir sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, la presencia en el medio de incubación donde se realizó la hipoxia, de un agente que ya se ha demostrado anteriormente como protector de las membranas celulares contra estos fenómenos, como es el caso específico del sulfato de magnesio. Para ello, se incubaron de nuevo explantos durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de hipoxia, pero ahora en presencia de 2 mM de sulfato de magnesio. Los valores obtenidos de este experimento, se muestran en la Figura 3, comparados con los obtenidos para explantos incubados bajo condiciones de hipoxia, en ausencia del fármaco: Obsérvese que las preparaciones de los homogenizados provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio presentan, como esperado por lo demostrado anteriormente en el laboratorio, una

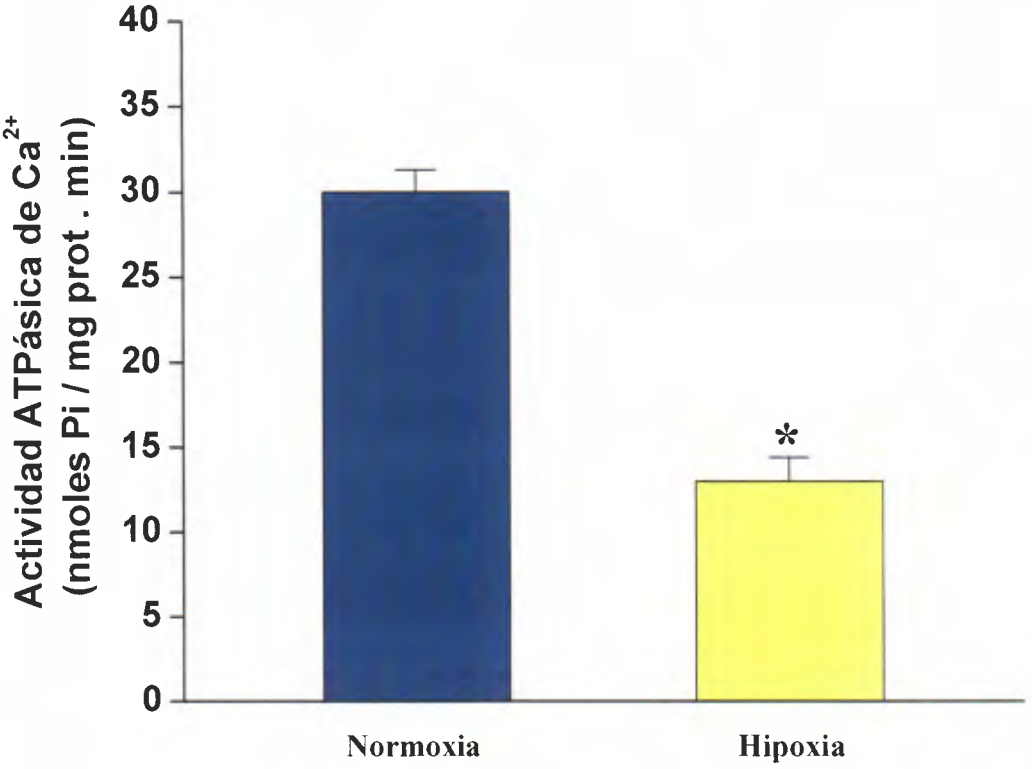

Figura 2. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término preincubados bajo condiciones de normoxia o de hipoxia. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0,001$

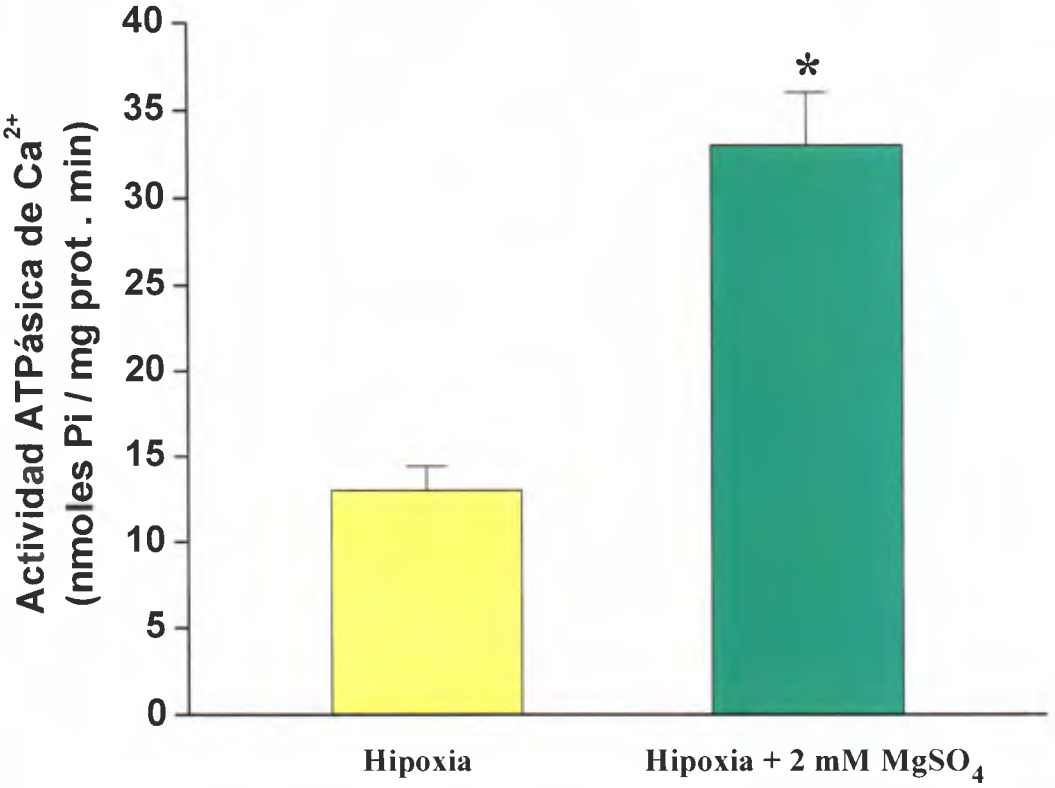

Figura 3. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término preincubados bajo condiciones de hipoxia o de hipoxia en presencia de 2 mM $MgSO_4$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0,001$

actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, con valores muy parecidos a los obtenidos para los homogenizados de explantos recién preparados (Figura 1), y significativamente superiores a los valores presentados por los homogenizados provenientes de explantos cultivados bajo condiciones de hipoxia, en ausencia de esta sal.

Pasemos ahora a enfocar el objetivo principal de nuestro trabajo, que es el de determinar si el nuevo fármaco propuesto (gluconato de magnesio), es también capaz de realizar la misma labor protectora del sulfato de magnesio, con respecto al parámetro en estudio.

5.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

Para la realización del estudio, se realizó el mismo experimento indicado en la Figura 3, pero es esta ocasión en presencia de 4mM de gluconato de magnesio. Interesantemente, los resultados de este experimento, como se ve en la Figura 4, indican que el gluconato de magnesio, al igual que el sulfato de magnesio, es también capaz de cumplir una función protectora de la ATPasa de Ca^{2+} frente a situaciones de hipoxia tisular, ya que la actividad de la enzima de los homogenizados de los explantos incubados en condiciones de hipoxia, en su presencia, arrojó valores muy similares a los de la enzima fresca recién preparada, muy superiores a los de la enzima derivada de los homogenizados de explantos incubados en condiciones de hipoxia, en ausencia del agente protector. A continuación, pasamos a investigar si el efecto protector del gluconato de magnesio, podía ser obtenido a concentraciones inferiores del fármaco en el medio de incubación bajo condiciones de hipoxia. Para ello, se realizaron los experimentos indicados en la próxima sección.

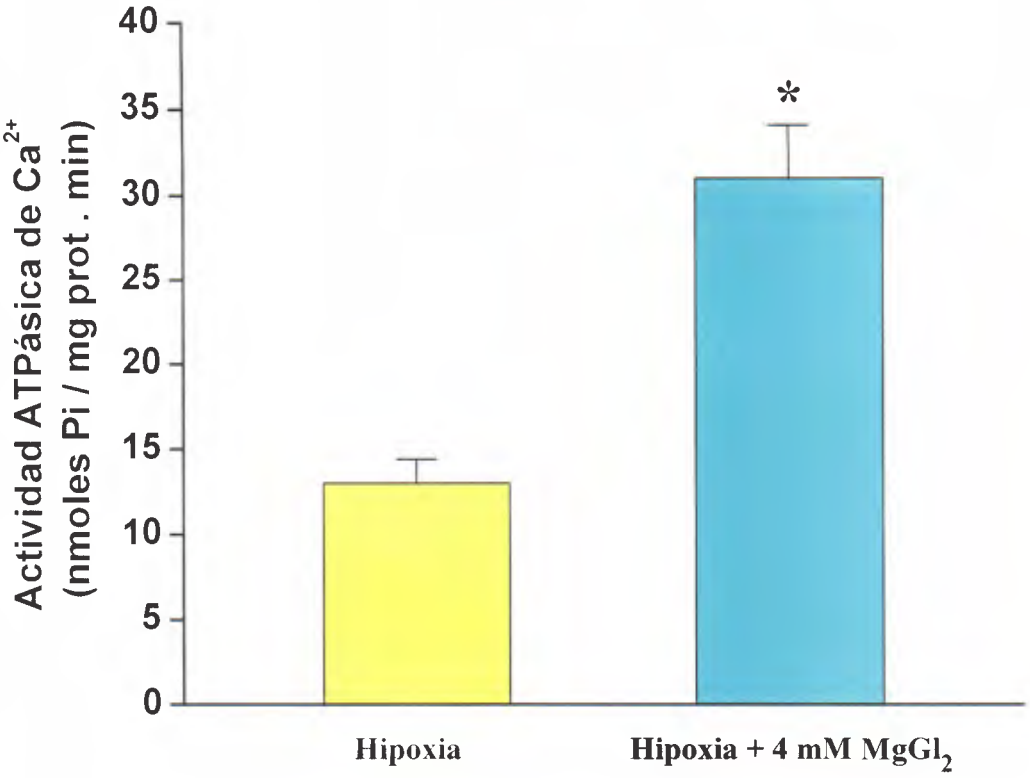

Figura 4. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, o de hipoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0,001$

6.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$.

Para la realización de este estudio, se incubaron explantos bajo condiciones de hipoxia, en presencia de 0, 1, 2 y 4 mM gluconato de magnesio y, posteriormente, se evaluó la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de sus homogenizados. Los resultados de este experimento, se muestran en la Figura 5. Es de notar que, si bien a una concentración del fármaco de 2 mM se observa ya un cierto poder protector, éste es muy débil y, nada parecido al poder protector ejercido por una concentración de 4 mM del agente. Esta concentración, por los datos registrados, puede indicarse como ideal para lograr los efectos protectores deseados.

Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora, también pudieran interpretarse como debidos a algún poder activante de la enzima ejercido por el gluconato de magnesio, que se manifiesta al incubar las membranas con una concentración adecuada del mismo. De ser esto cierto, entonces pudiera esperarse que la incubación de explantos en condiciones de normoxia, en presencia del agente, también reflejara valores más altos que cuando incubados en su ausencia. Este estudio se muestra a continuación.

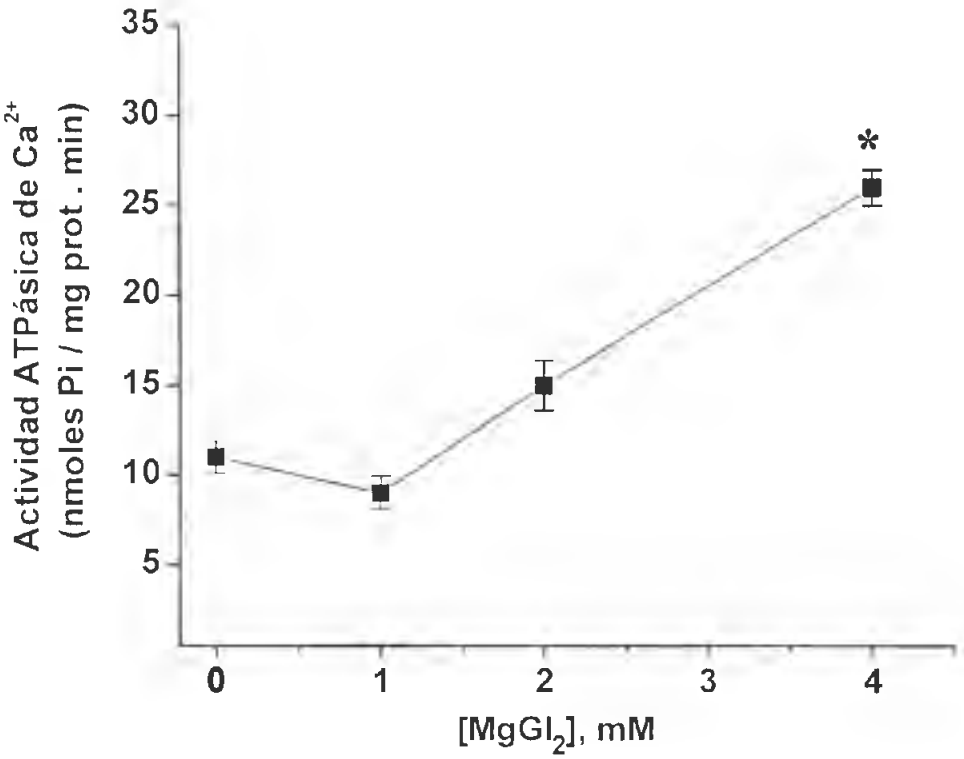

Figura 5. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término preincubados bajo condiciones de hipoxia, en presencia de distintas concentraciones de $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*$p < 0{,}001$ con respecto a todas las demás condiciones

7.- Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$.

Para la realización de este experimento, se incubaron explantos en condiciones de normoxia, en presencia o ausencia de 4 mM de $MgGl_2$, para luego determinar la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de sus homogenizados. Los resultados, según mostrado en la Figura 6, indican que no hay diferencia alguna en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} entre ambas muestras. Esto constituye una evidencia clara de que el gluconato de magnesio no actúa como activar de la enzima, sino que la protege, con respecto al parámetro considerado, en contra de daños que pudieran surgir durante el período de hipoxia al que se sometan los explantos.

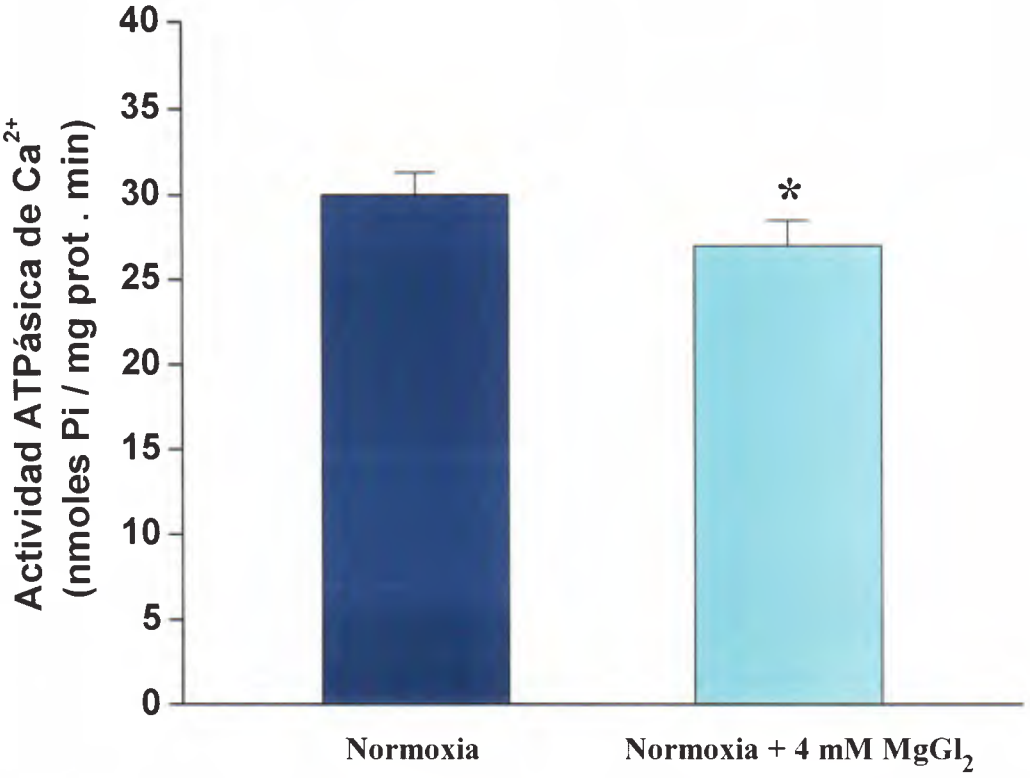

Figura 6. Actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término, preincubados bajo condiciones de normoxia, o de normoxia en presencia de 4 mM $MgGl_2$. Preincubaciones de los explantos realizadas como indicado en Materiales y Métodos. Ensayos realizados en presencia de 1 μM Tapsigargina. Valores expresados como la media ± el error estándar, de 4 muestras diferentes.

*p = n.s.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La preeclampsia es la principal y mayor causa de mortalidad y morbilidad, tanto materna como fetal, a nivel mundial (MacGillivray, 1958), y es causa de prematuridad neonatal (Sibai *et al.*, 1995). 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).

La membrana plasmática de las células del sinciciotrofoblasto de placenta juega un papel determinante en la relación entre la madre y el feto (Redman 1990). De hecho, cualquier variación que se produzca en las propiedades de las membranas de estas células, puede traducirse en un mal funcionamiento celular, lo que puede llevar, consecuentemente, al desarrollo de anomalías y enfermedades, tanto para la madre como para el feto.

Una de las hipótesis de la etiopatogenia de la preeclampsia, sugiere que en el desarrollo de la vascularización de la placenta pueden surgir irregularidades, que terminan provocando una perfusión placentaria insuficiente. Este fenómeno puede producirse por incapacidad del tejido placentario de llevar a cabo de forma satisfactoria el mecanismo de implantación (Pritchard *et al.*, 1990), lo cual, a su vez, llevaría a fallas parciales en la invasión del trofoblasto (Pijnenborg *et al.*, 1981). Una perfusión placentaria insuficiente puede ocasionar cuadros de hipoxia/reoxigenación, lo que se traduciría en un aumento en la producción de sustancias reactivas al oxígeno (ROS), con el consecuente daño a las membranas celulares y a las proteínas de las mismas. Con esto, se alteraría el funcionamiento de enzimas asociadas a las membranas celulares, como lo es el caso de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas

plasmáticas, encargada fundamentalmente del mantenimiento del balance fino del ion calcio intracelular.

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 & Dekker 1992).

Estudios previos, han demostrado una disminución de alrededor de 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 actividad de la ATPasa de Ca^{2+}, tanto de membranas plasmáticas de miometrio, como de membranas basales (lado fetal) de sinciciotrofoblasto de placenta humana, en gestantes con preeclampsia. Esta disminución, representa ser alrededor de 50% en ambos casos. Está demostrado, en fantasmas de eritrocitos, que la disminución de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de estas membranas, no está asociada a daños directos a la proteína, ni tampoco a cambios en el número de enzimas 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 por daños en la membrana, a través de la elevación de los niveles de peroxidación lipídica de las mismas.

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, constituyen un fuerte índice de 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 niveles de peroxidación lipídica, a pesar de estar las células bajo condiciones hipóxicas.

Debido a que el sulfato de magnesio presenta la gran limitante de que sólo puede ser administrado por vía intravenosa, actualmente se estudian otras sales de magnesio como tratamientos alternativos al sulfato de magnesio. Una de estas sales, es el gluconato de magnesio. En investigaciones realizadas por Li y Tian (Li & Tian, 1997), donde evaluaron el uso de gluconato de magnesio (administrado por vía oral) para prevenir la hipertensión inducida por el embarazo, mostraron que el gluconato de magnesio si era efectivamente capaz de reducir considerablemente el riesgo de desarrollar hipertensión inducida por el embarazo (4%), comparado con las gestante que recibieron placebo (16%). Adicionalmente, hay estudios que refieren el uso oral de sales de magnesio, como el gluconato de magnesio, todas las cuales tienen una capacidad antioxidante mayor que la mostrada por el sulfato de magnesio (Martin *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 1998; Mak *et al.*, 2000). Más aún, el gluconato de magnesio es capaz de remover radicales hidroxilos y alcóxilos, por encima de la capacidad antioxidante que presenta el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En procesos de isquemia-reperfusión cardiaca, el gluconato de magnesio disminuye los daños oxidativos, a través de la disminución significativa de los niveles de radicales

alcóxilos, por encima del efecto mostrado por el sulfato de magnesio (Murthi *et al.*, 2003). En otros estudios, se ha demostrado que el gluconato de magnesio es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en membranas microsomales, tratadas *in vitro* con la reacción de Fenton (Mak *et al.*, 2000).

En el presente estudio, se determinó y comparó la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de homogenizados de explantos de placenta humana a término. Los explantos eran previamente incubados durante 18 horas a 37°C bajo condiciones de normoxia e hipoxia, en presencia o ausencia de gluconato de magnesio y de sulfato de magnesio.

Una vez demostrado que la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} determinada en los homogenizados de explantos de placenta humana a término recién preparados, es reflejo de la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas plasmáticas celulares de los mismos (Tabla 1), procedimos a demostrar el efecto inhibitorio que producen estados de hipoxia del tejido, sobre la actividad de la enzima. En la Figura 1 quedó claramente demostrado este efecto, mientras que en la Figura 2, se mostró el papel protector del sulfato de magnesio sobre el efecto inhibitorio de la hipoxia.

Cuando se pasó a estudiar el posible efecto protector del gluconato de magnesio sobre la hipoxia tisular, base fundamental de nuestros objetivos, encontramos que los homogenizados de explantos incubados bajo condiciones de hipoxia en presencia de gluconato de magnesio, presentaron valores de actividad de la ATPasa de Ca^{2+} similares a la de homogenizados incubados bajo condiciones de normoxia, o de hipoxia en presencia de sulfato de magnesio (Figura 3 y 4).

Estos resultados, permiten concluir que el gluconato de magnesio efectivamente ofrece protección a las membranas de las células del tejido placentario, de los daños provocados por condiciones de hipoxia, por lo menos, en lo que se refiere al parámetro que estamos considerando.

Una vez demostrado el poder protector del gluconato de magnesio contra el efecto inhibitorio de las condiciones de hipoxia sobre la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de las membranas celulares del tejido placentario, se estudió la posibilidad de lograr los mismos efectos, a concentraciones más bajas de esta sal. Los resultados presentados en la Figura 5, indican que si bien a una concentración de 2 mM del agente se nota ya un efecto protector, éste es muy débil, por lo que los experimentos "*in vitro*" deberán realizarse a 4 mM del fármaco, concentración ésta, capaz de producir un efecto protector máximo. Es importante señalar que, cuando en estudios futuros se proceda a estudiar el efecto "*in vivo*" del gluconato de magnesio, se hará necesario determinar la dosis adecuada, para que ejerza su efecto eficazmente.

Finalmente, se estudió la posibilidad de que el gluconato de magnesio pudiera estar produciendo algún efecto activador de la enzima. De ser esto cierto, los homogenizados de explantos incubados bajo condiciones de normoxia en presencia de 4mM gluconato de magnesio, pudiera esperarse que presentaran una actividad de la ATPasa de Ca^{2+} mayor al que presenten los homogenizados incubados sólo bajo condiciones de normoxia. Los resultados de la Figura 6, indican claramente que éste no es el caso y que, efectivamente, se está frente a un papel protector del gluconato de magnesio frente a situaciones de hipoxia. Evidentemente, tanto el sulfato como el gluconato de magnesio, durante las incubaciones de los explantos pasan a las membranas celulares, desde donde logran ejercer su efecto beneficioso y protector contra las situaciones de hipoxia.

Nuestros hallazgos abren un camino, que pudiera llegar a ser importante para atacar esa condición amenazadora de las mujeres embarazadas y sus hijos, que constituye la preeclampsia. Por supuesto que, mucho camino queda por recorrer y, pensamos que lo próximo, debiera ser el estudiar el posible efecto protector del gluconato de magnesio "*in vivo*".

CONCLUSIONES

Los hallazgos presentados en el presente trabajo, demuestran claramente que la presencia de gluconato de magnesio en el medio de incubación, logra prevenir la disminución de la ATPasa de Ca^{2+} que se observa en homogenizados de explantos de placenta humana a término, incubados bajo condiciones de hipoxia.

También, se puede concluir que el gluconato de magnesio realiza su labor gracias a un efecto protector de las membranas celulares contra daños que se producen al estar el tejido expuesto a condiciones de hipoxia.

La aparente concentración de gluconato de magnesio para ejercer máxima protección del tejido placentario, cuando se expone a condiciones de hipoxia "*in vitro*", es 4 mM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad C (2005) Efectos del sulfato de magnesio sobre la actividad ATPásica de Ca^{+} y la peroxidación lipídica en fantasmas de glóbulos rojos de gestantes preeclámpticas, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Belfort MA & Moise KJ, 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.

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. Trabajo de Grado M.Sc.

Bradford MM (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.

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

Caires R, Proverbio F, Abad C, Piñero S, Proverbio T, Varela H, Mota AR, Chiarello DI & Marín R (2007) Effect of hypoxia on the Ca-ATPase activity and lipid peroxidation level in the syncytiotrophoblast plasma membranes. In *III Latin-American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta:Basic & Clinical Research*. Córdoba, Argentina.

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 YC (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. Trabajo de Grado M.Sc.

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.

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

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 JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R & Luft FC (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 ID, Sawant PL & Tappel AL (1964) Peroxidative And Radiation Damage To Isolated Lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 86, 277-285.

Dickens BF, Weglicki WB, Li YS & Mak IT (1992) Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Lett.* 311, 187-191.

Farkouh LJ, Thorp JA, Jones PG, Clark RH & Knox GE (2001) Antenatal magnesium exposure and neonatal demise. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 869-872.

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.

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

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

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 CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rogers GM & McLaughlin MK (1989) Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161, 1025-1034.

Illsley NP, Wang ZQ, Gray A, Sellers MC & Jacobs MM (1990) Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 1029, 218-226.

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

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

Knauf PA, Proverbio F & Hoffman JF (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 CM, Howard BC, Pierce BT, Hoeldtke NJ, Calhoun BC & Napolitano PG (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 KC, 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.

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

Li S & Tian H (1997) Oral low-dose magnesium gluconate preventing pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 32, 613-615.

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

Lipstein H, Lee CC & Crupi RS (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*, Segunda ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.

López TT, Limongi F, Proverbio T, Oviedo NJ, 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 MJ, Leveno KJ & Cunningham FG (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.

Mak IT, Komarov AM, Kramer JH & Weglicki WB (2000) Protective mechanisms of Mg-gluconate against oxidative endothelial cytotoxicity. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 46, 1337-1344.

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.

Martin RW, Gaddy DK, Martin JN, Jr., Lucas JA, Wiser WL & Morrison JC (1987) Tocolysis with oral magnesium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156, 433-434.

Martin RW, Perry KG, Jr., Martin JN, Jr., Seago DP, Roberts WE & Morrison JC (1998) Oral magnesium for tocolysis: a comparison of magnesium gluconate and enteric-coated magnesium chloride. *J. Miss State Med. Assoc.* 39, 180-182.

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

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.

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

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

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

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

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

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.

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

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

Roberts JM (1984) Pregnancy related hypertension. In *Maternal-fetal medicine: Principles and practice* [RK Creasy and R Resnik, editors]. Philadelphia: WB Saunders.

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

Roberts JM (1998) Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 5-15.

Roberts JM & Cooper DW (2001) Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 357, 53-56.

Roberts JM & Redman CWG (1993) Preeclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 341, 1447-1451.

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

Scott JS (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.

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

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

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

Silver RK, Turbov JM, Beaird JA & 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 JR, Zemel MB, Bronsteen RA, Zemel PC, Walsh MF, Standley PR & Sokol RJ (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.

Walsh SW, Romney AD, Wang Y & Walsh MD (1998) Magnesium sulfate attenuates peroxide-induced vasoconstriction in the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 178, 7-12.

Watson KV, Moldow CF, Ogburn PL & Jacob HS (1986) Magnesium sulfate: rationale for its use in preeclampsia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1075-1078.

Zeeman GG & Dekker GA (1992) Pathogenesis of preeclampsia: a hypothesis. *Clin. Obstet. Gynecol.* 35, 317-337.