

Tesis Doctoral

Transporte iónico en una línea celular derivada de trofoblasto humano (BeWo) y en placenta humana

Marino, Gabriela Inés

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marino, Gabriela Inés. (2012). Transporte iónico en una línea celular derivada de trofoblasto humano (BeWo) y en placenta humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marino, Gabriela Inés. "Transporte iónico en una línea celular derivada de trofoblasto humano (BeWo) y en placenta humana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Transporte iónico en una línea celular derivada de trofoblasto humano (BeWo) y en placenta humana

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Gabriela Inés Marino

Director de tesis: **Dr. Basilio Arístides Kotsias**

Director Asistente: **Dra. Yanina Andrea Assef**

Consejero de Estudios: **Dr. Enrique Rodríguez**

Lugar de trabajo: **Laboratorio de Canales Iónicos- Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari- CONICET- Facultad de Medicina- Universidad de Buenos Aires**

Buenos Aires, 2012

Transporte iónico en una línea celular derivada de trofoblasto humano (BeWo) y en placenta humana

Estudiamos los canales aniónicos ORCC y CFTR y el canal de sodio ENaC en la línea BeWo derivada de trofoblasto humano. La actividad iónica fue estudiada con la técnica de *patch clamp* en las configuraciones de canal único (*inside out* y *cell-attached*) y célula entera (*whole cell*). La expresión de las proteínas fue analizada con técnicas corrientes de biología molecular. Los tres objetivos fueron: 1) identificar y caracterizar la actividad de esos canales con la ayuda de agentes farmacológicos, 2) estudiar la expresión de las proteínas de los canales clonados; 3) analizar la participación de esos canales en la proliferación, y la migración celular por medio del modelo de cierre de la herida. Los principales resultados fueron: Las células BeWo tienen canales aniónicos y catiónicos funcionales que se expresan en la membrana. Las corrientes de Na^+ por el canal ENaC sensible al amiloride y las corrientes transportadas por el ORCC y CFTR participan en la migración o proliferación celular. La aldosterona que estimula la metilación de ENaC juega un papel importante en el mecanismo por el cual el ENaC participa en la migración celular. En conclusión, fuimos capaces de aislar y caracterizar canales aniónicos y catiónicos en las células BeWo y establecer su papel en la migración y proliferación celular.

Palabras claves: placenta humana- células BeWo- actividad iónica- *patch clamp*- ORCC- ENaC- CFTR- migración celular-proliferación celular.

Ion transport in a cell line derived from human trophoblast (BeWo) and human placenta

Anion channels such as ORCC and CFTR and the sodium channel ENaC were studied in the human trophoblastic cell line BeWo. Ion channel activity was recorded in the cell attached and inside out and in the whole cell configurations with patch-clamp technology and the expression of the proteins were studied with current techniques of molecular biology. Three main objectives were planned: 1) to identify and characterize the activity of these channels with pharmacological tools; 2) to study the expression of the cloned channels in the cell membranes; 3) to analyze the participation of these channels in the cellular processes and migration with the aid of a wound healing model. The main results were: BeWo cells have functional anionic and cationic channels and they are expressed in the membranes. Na⁺ currents mediated by the amiloride sensitive ENaC and currents transported by CFTR and ORCC are involved in either cell migration or cell proliferation. Aldosterone which stimulates protein methylation of ENaC seems to play an important role in the mechanism of action of ENaC in the migration process. In conclusion we were able to identify clearly anionic and cationic channels in BeWo cells and to establish their participation in the migration and proliferation processes.

Keywords: human placenta- BeWo cells- patch-clamp- ionic activity- ENaC- CFTR- ORCC- cell migration- cell proliferation.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todos los que colaboraron en el desarrollo de esta tesis:

- A mi director de tesis, Dr. Basilio Aristidis Kotsias.
- A mi directora asistente, Dra. Yanina Andrea Assef.
- A mi consejero de estudios, Dr. Enrique Rodríguez.
- A mis compañeros del laboratorio: Silvana del Mónaco, Luciano Galizia y Alejandro Ojea.
- A los integrantes del laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis del Instituto de Investigaciones Médicas que dirige la Dra. Mónica Costas.
- A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.
- A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LA PLACENTA HUMANA.....	2
1.1. Transporte de solutos a través de la placenta.....	5
1.2. Transporte aniónico y catiónico a través del SCT.....	6
1.3. Síndrome de hipertensión gestacional (preeclampsia)	7
1.4. Línea celular BeWo	8
2. LOS CANALES IÓNICOS	9
2.1. Características generales de los canales iónicos	12
2.2. Clasificación de los canales iónicos.....	13
2.3. El CFTR.....	13
2.3.1. Características del CFTR.....	15
2.3.2. Alteraciones relacionadas con el CFTR.....	16
2.4. Canal de cloruro ORCC.....	16
2.4.1. Regulación del ORCC.....	17
2.5. Canal de sodio ENaC.....	18
2.5.1. Estructura del ENaC	19
2.5.2. Regulación del ENaC	20
2.6. Migración y proliferación celular. Actividad de canales iónicos	22
3. GENERALIDADES	25
3.1. Ley de Ohm	25
3.2. Relación corriente-voltaje	26
3.3. Potencial de equilibrio y Ecuación de Nernst	27
3.4. Permeabilidad, conductancia y selectividad	28
4. MEDICIÓN DE CORRIENTES CELULARES	29
4.1. Técnica de <i>patch clamp</i>	29
4.1.1. Fundamentos de <i>patch clamp</i>	29
4.1.2. Equipo de <i>patch clamp</i>	32
4.2. Análisis de registros de corrientes totales.....	32
4.2.1. La membrana como un capacitor.....	32
4.2.2. Resistencias en serie	34

4.2.3. Difusión entre pipeta y células	34
4.2.4. Conductancia macroscópica	35
4.3. Análisis de registros de canal único	36
4.3.1. Amplitud de la corriente	36
4.3.2. Conductancia unitaria	37
4.3.3. Probabilidad de apertura.....	38
II. HIPÓTESIS.....	39
III. OBJETIVOS.....	44
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	47
V. RESULTADOS	60
1. Canales de cloruro en células BeWo de trofoblasto humano y su participación en la proliferación celular	61
2. Canal de sodio epitelial ENaC y su participación en la migración celular en células derivadas de trofoblasto humano	101
VI. DISCUSIÓN	126
VII. CONCLUSIONES	150
VIII. REFERENCIAS.....	154

I. INTRODUCCIÓN

1. LA PLACENTA HUMANA

Para sobrevivir y crecer durante la vida intrauterina, un embrión debe mantener una relación estrecha con el cuerpo de la madre que le permita adquirir oxígeno y nutrientes, y eliminar los desechos del producto de su metabolismo (Carlson, 2000). La placenta sirve como interfase entre el embrión y la madre, satisfaciendo estos requisitos. Es un órgano vital durante el embarazo porque a pesar de contar con una vida útil muy breve, es capaz de funcionar como riñón, intestino, pulmón, hígado, glándula endócrina y brindarle inmunidad al feto (Johansson y col., 2000).

La formación del complejo placentario es el resultado de la interacción entre los tejidos extraembrionarios y los tejidos endometriales de la madre. Durante la implantación, se producen las etapas de anclaje y de penetración del blastocisto al epitelio endometrial. En una segunda etapa, células derivadas del trofoblasto que conservan la capacidad de división (citotrofoblasto, CT), se fusionan para formar el sinciotrofoblasto multinucleado (SCT). Este tejido que rodea al embrión, posee la característica de ser altamente invasivo y se abre camino erosionando el estroma endometrial (Figura 1).

El SCT emite proyecciones que se introducen entre las células epiteliales uterinas, envuelven porciones de los vasos sanguíneos del endometrio (arterias espirales) erosionando la pared y dejando que la sangre materna llene lagunas aisladas que se han estado formando en el trofoblasto. Al final de la segunda semana de desarrollo se forman proyecciones del citotrofoblasto llamadas vellosidades primarias. Poco después aparece una invasión mesenquimatosa en el interior de la vellosidad, transformándose en vellosidad secundaria, y la misma se convierte en terciaria cuando en el mesénquima entran los vasos sanguíneos fetales y se ramifican (Carlson, 2000).

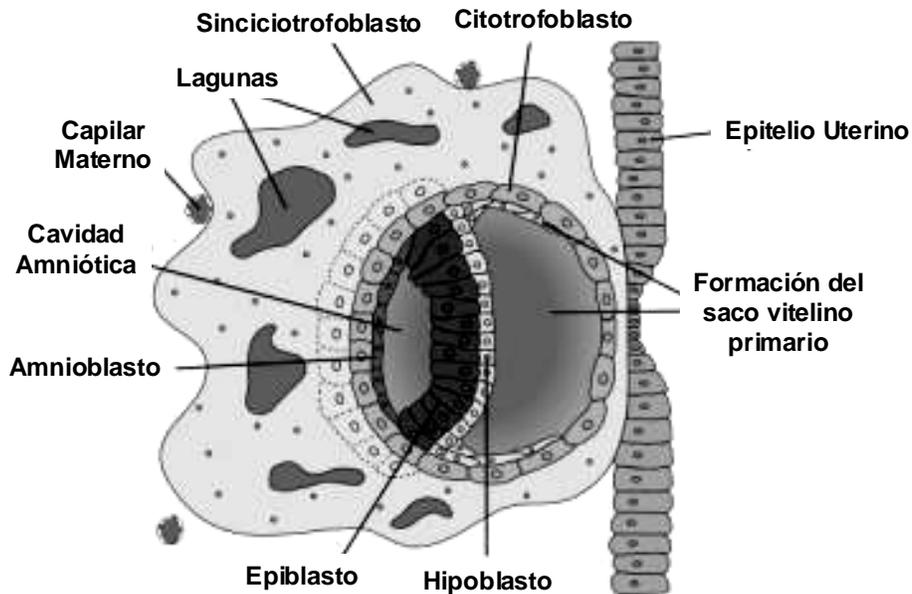


Figura 1: Últimas etapas de la implantación de un embrión humano. El embrión penetró en el endometrio materno. La implantación casi ha terminado y hay una formación precoz de lagunas trofoblásticas, cavidad amniótica y saco vitelino. El próximo paso es la formación de las vellosidades primarias (citotrofoblasto). Se puede observar la invasión del SCT sobre el endometrio materno.

La placenta humana es de tipo hemocorial: las vellosidades están tapizadas de SCT, en contacto directo con la sangre materna, en recambio continuo (Stulc, 1997, Carlson 2000) (Figura 2.A).

Las vellosidades coriónicas maduras constituyen una masa muy compleja de ramas aparentemente entrecruzadas (Figura 2.B). El núcleo de la vellosidad está compuesto por vasos sanguíneos y mesénquima, cubierto por una capa continua de SCT, con pocas células de citotrofoblasto remanente debajo de él (Figura 2.C). La superficie del SCT posee microvellosidades que aumentan la superficie total de la placenta y que varían de acuerdo a las condiciones ambientales a las que esté

expuesta (nutrición materna, transporte de oxígeno, etc.). A su vez, la superficie del trofoblasto no es homogénea, sino que está organizada en territorios, con distintos componentes funcionales: una gran variedad de sistemas de transporte de sustancias que van desde iones hasta macromoléculas, receptores de hormonas, factores de crecimiento y enzimas. Para poder cumplir con su papel activo tanto en la síntesis como en el transporte, el SCT tiene una alta densidad y amplia diversidad de orgánulos subcelulares (Carlson, 2000, Gilbert, 2005).

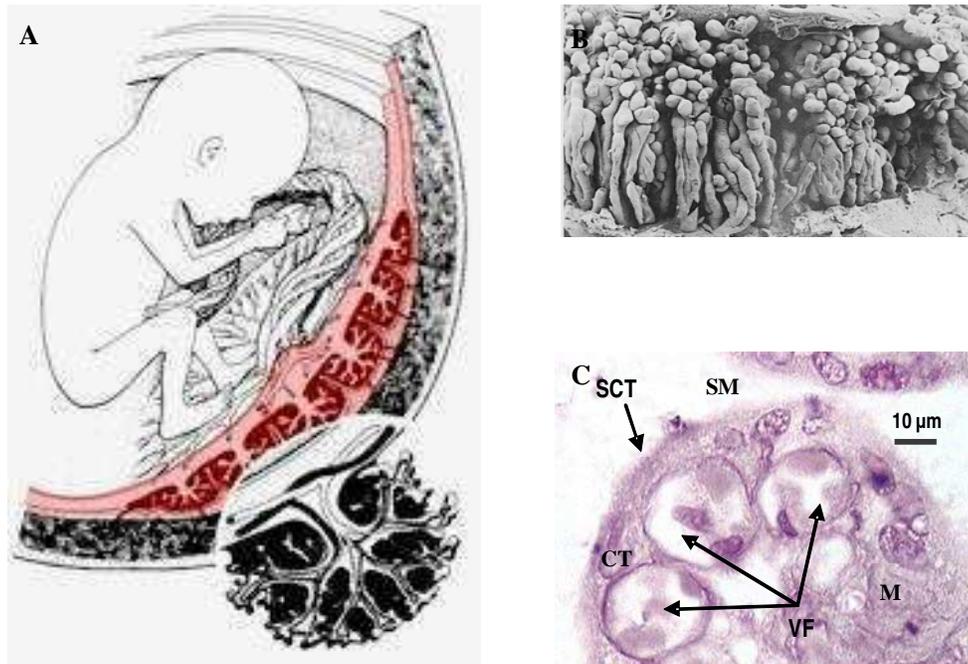


Figura 2: Vellosidades coriónicas maduras. **A.** Esquema de un feto en el útero materno. Se muestra la placenta con un corte transversal y en el círculo el detalle de un árbol de vellosidades coriónicas. **B.** Microscopía electrónica de barrido de las vellosidades de una placenta humana, 200X. **C.** Corte transversal de vellosidades terciarias. Microscopía óptica, tinción con hematoxilina-eosina, 400X. SCT: sinciotrofoblasto, VF: vaso fetal, SM: sangre materna, M: mesénquima laxo, CT: citotrofoblasto.

1.1. Transporte de solutos a través de la placenta.

La placenta posee sistemas de transporte específicos que funcionan de acuerdo a mecanismos homeostáticos fetales. La placenta como órgano de transporte se asemeja a la mucosa intestinal o al epitelio renal (Stulc, 1997). Las células que forman el SCT están polarizadas en su función y contenido de canales iónicos y transportadores, con una cara con las microvellosidades orientada hacia el lado materno y la otra hacia el feto, equivalentes a las membranas apical y basal de los epitelios (Johansson y col., 2000).

En la placenta humana, el tejido que separa la sangre materna de la fetal se denomina barrera placentaria y se compone de las siguientes estructuras: el sinciotrofoblasto, su lámina basal, la lámina basal de los capilares fetales y el endotelio capilar (Shennan y Boyd, 1987; Stulc, 1997, Carlson, 2000) (Figura 3.A).

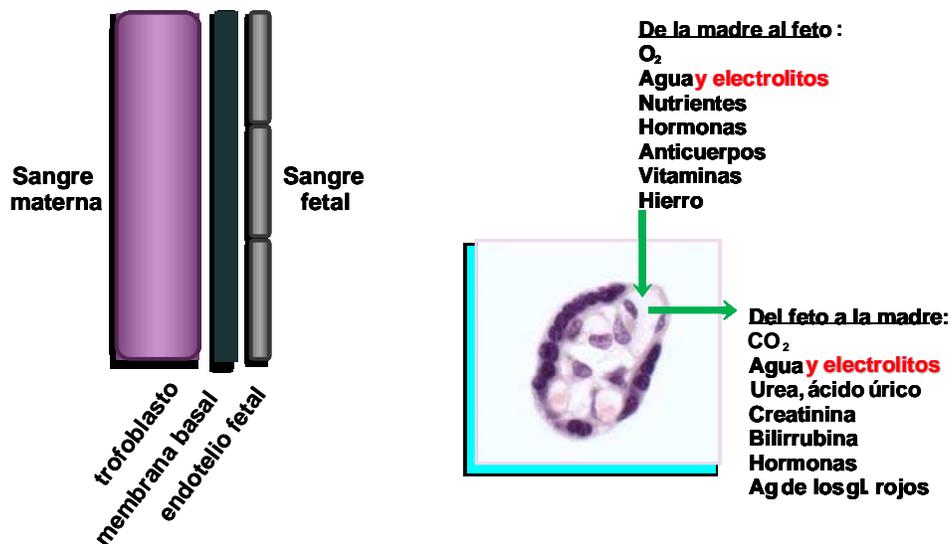


Figura 3: Barrera placentaria. A. Esquema de los principales tipos histológicos que componen la barrera placentaria de una placenta humana a término (Extraído de Stulc, 1997). **B.** Corte transversal de una vellosidad terciaria. En el lugar donde entran y salen las flechas se puede observar el adelgazamiento del SCT y la ubicación del capilar fetal para favorecer el intercambio de solutos (placa epitelial). Microscopía óptica, tinción con tricrómico de Masson, 1000X. En la figura se enumeran las sustancias intercambiadas entre madre y feto.

Aproximadamente del 5 al 10 % de la superficie de la placenta humana consta de áreas dispersas donde la barrera entre la sangre fetal y la materna es muy delgada, midiendo unas pocas micras. Estas áreas, que en ocasiones se llaman placas epiteliales, parecen ser adaptaciones morfogenéticas cuyo fin es facilitar la difusión de sustancias entre las circulaciones materna y fetal (Figura 3.B). La transferencia de sustancias tiene lugar en ambas direcciones a través de la placenta, y la mayor parte de las que se transfieren de la madre al feto son oxígeno y nutrientes. La placenta constituye el medio para la eliminación final del dióxido de carbono y otros materiales fetales de desecho hacia la circulación materna (Carlson, 2000).

1.2. Transporte aniónico y catiónico a través del SCT.

Se han caracterizado varios canales iónicos en la membrana apical del SCT de placenta humana. Entre ellos, canales de K^+ de rectificación entrante (Clarson y col., 2001), maxi-canal de Cl^- (Riquelme, 2006), un canal catiónico no selectivo (Llanos y col., 2002), el canal de cloruro de regulación transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (Faller, 1995; Mylona, 1996), canales de Ca^{2+} de alta permeabilidad: activado por voltaje tipo-L y TRPV5–TRPV6 (Moreau y col., 2003; Bernucci y col., 2006), el canal de la policistina-2 (TRPP-2) (Gonzalez-Perret y col., 2002). Además, se ha detectado en placenta de cerdo por técnicas de biología molecular el ARNm de la subunidad α del canal de sodio epitelial (ENaC) (Page y col., 2003), como así también se han observado los ARNm de las subunidades α y γ del canal en células de cultivo primario de citotrofoblasto de placenta humana (Driver y col., 2003), y canales de cloruro activados por calcio en este mismo tipo celular (Kibble y col., 1996). También se ha detectado la expresión y actividad de un canal de K^+ en células endoteliales y músculo liso de la vasculatura fetoplacentaria (Wareing y Greenwood, 2011). En nuestro grupo hemos encontrado la expresión del canal de sodio epitelial ENaC en SCT de placenta humana y

en la línea celular BeWo derivada de trofoblasto humano (del Mónaco y col., 2006, 2008a, 2009).

1.3. Síndrome de hipertensión gestacional (preeclampsia).

La hipertensión arterial inducida por el embarazo o preeclampsia es una de las complicaciones más comunes y causa más frecuente de morbimortalidad materna, fetal y perinatal, afectando al 5-8 % de los embarazos en el mundo. La preeclampsia es un síndrome hipertensivo agudo de la gestación caracterizado por hipertensión y proteinuria. En el feto se produce retardo del crecimiento y/o asfixia perinatal. En la madre puede llevar a un grave deterioro de la salud y puede agravarse por edema masivo, coagulación intravascular diseminada, hemorragias, compromiso neurológico con infarto cerebral y convulsiones (eclampsia) (Mushambi y col., 1996; Huppertz, 2008). Se ha estimado que 40000 mujeres mueren por año en los países en desarrollo debido a estas complicaciones. El 80 % de los casos de preeclampsia se manifiesta después de la semana 34 del embarazo con escasa repercusión en el feto, sin alteraciones en el flujo sanguíneo umbilical y pocas anormalidades en el desarrollo de las arterias espiraladas. Está asociada a una mayor masa placentaria por diabetes, embarazos múltiples, anemia y vivir en grandes alturas. El 20% restante se manifiesta antes de la semana 34 con cambios en el flujo sanguíneo intrauterino y en el flujo umbilical, y signos de menor crecimiento fetal, manifestaciones que se confunden con el cuadro de restricción de crecimiento intrauterino (Huppertz, 2008).

Numerosas investigaciones analizan el valor de proteínas plasmáticas como las endoglinas y la PP13 como marcadores para la detección temprana de la preeclampsia (Nadeem y col., 2011; Orendi y col., 2011).

La preeclampsia ocurre sólo en presencia de la placenta; la remoción de la misma normaliza la sintomatología en la mayoría de los casos, siendo la placenta primordial en su desarrollo. No se conoce la causa del síndrome pero existen varias hipótesis, todas ellas con una profusa literatura que las avala: insuficiencia placentaria, reacción

autoinmune, el estrés oxidativo, liberación de fragmentos de trofoblasto apoptóticos, disminución en la síntesis de aldosterona, disminución de sustancias anti-angiogénicas, entre otras. Otro posible mecanismo en la preeclampsia sería un defecto en la migración de células trofoblásticas que llevaría a un inadecuado desarrollo e invasión de las arterias espiraladas del trofoblasto que alterarían el desarrollo de la vasculatura materno-fetal y por consecuencia un defecto en la implantación fetal, con menor irrigación de la decidua (Sibai, 2005). Durante el embarazo normal las células del trofoblasto invaden la pared uterina y a las arterias espirales, reemplazando su endotelio. Esto lleva a un remodelado de la arteria que pierde la capa muscular con una disminución en la resistencia del árbol vascular y la consiguiente dilatación y aumento del flujo sanguíneo (Huppertz, 2008).

1.4. Línea celular BeWo.

Las células BeWo representan una línea celular obtenida a partir de trofoblasto humano, establecida en cultivos continuos por Pattillo y Gey en el año 1968. Estas células mantienen propiedades bioquímicas y morfológicas similares a las reportadas para el citotrofoblasto proliferativo *in utero* durante el último trimestre de embarazo (Figura 4). Presentan los requerimientos mínimos para células trofoblásticas, expresan las hormonas gonadotrofina coriónica humana (GCH), lactógeno placentario progesterona y estrógeno, y se caracterizan por los siguientes marcadores: CK7⁺, HLA-I⁺, CD9⁺ (Sullivan, 2004). A su vez, pueden ser sincicializadas *in vitro* como ocurre con los cultivos primarios de citotrofoblasto (son fusigénicas), y generan una polarización de la expresión de marcadores de membrana apical/basolateral con la presencia de uniones estrechas (Al-Nasiry y col., 2006).

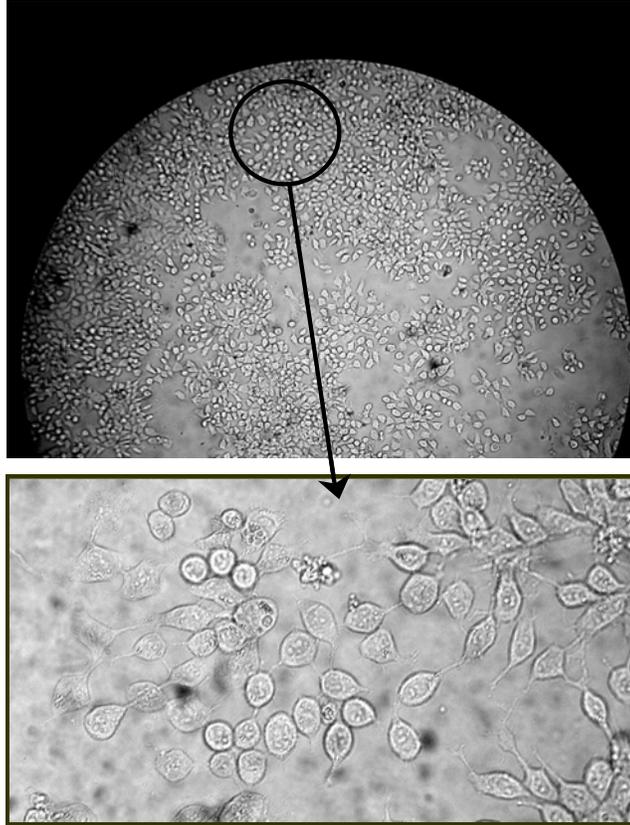


Figura 4: Células BeWo. Arriba: Fotografía de una observación de células BeWo por microscopía óptica, (100X). Abajo: Detalle amplificado de las células en el que se observan las características morfológicas de la línea (1000X).

Los sistemas de transporte que expresan las células BeWo se corresponden ampliamente con los reportados en el trofoblasto humano normal, por lo tanto estas células han sido utilizadas como modelos para la investigación de los mecanismos de transporte placentarios, principalmente de aminoácidos, glucosa, inmunoglobulinas, lípidos y hierro (Moe y col., 1994; Campbell y col., 1997; Ellinger y col., 1999; Eaton y Sooranna, 2000; Huang y Swaan, 2001; Takahashi y col., 2001; Vardhana y Illsley, 2002; Schmid y col., 2003; Keating y col., 2006; Jones y col., 2006; Heaton y col., 2008).

En cuanto a transportadores y canales iónicos, se han detectado en las células BeWo la subunidad α_{1S} del canal de Ca^{2+} tipo L, la proteína transportadora de calcio tipo 1 (CaT1), la Ca^{2+} -ATPasas de membrana plasmática (PMCA1-4), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1 y NCX3) (Moreau y col., 2003), los intercambiadores Na^+/H^+ (NHE1 y

NHE3) (Silva y col., 1997) y el cotransportador Na-K-2Cl (Zhao y Hundal, 2000); y el canal catiónico de la policistina-2 (TRPP-2) (Ramos y col., 2008); entre otros. Como mencionamos más arriba, nosotros demostramos la expresión del canal ENaC y la presencia de corrientes por este canal cuando se estimula con aldosterona (del Mónaco y col., 2006; del Mónaco y col., 2008 a, b). Sin embargo hasta el presente, no se registra información sobre la presencia de canales aniónicos en células BeWo (Marino y col., 2010).

2. LOS CANALES IÓNICOS

Las membranas biológicas son impermeables a los iones, dada la naturaleza hidrófoba de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos que las componen. Es por ello que los iones permean a través de glicoproteínas intrínsecas de membrana que configuran poros proteicos, denominados canales iónicos (Figura 5).

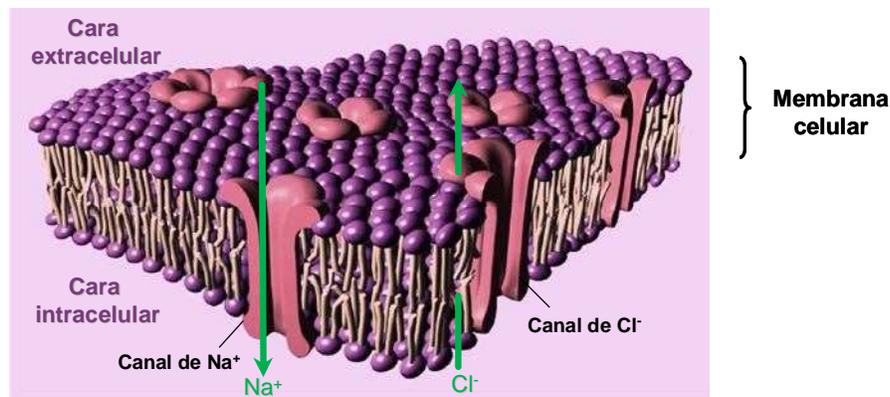


Figura 5: Canales iónicos. Esquema de una membrana celular (bicapa lipídica) en la que se encuentran insertos canales con distinta selectividad iónica. Se detallan un canal en el que ingresa Na⁺ a la célula, y un canal en el que sale Cl⁻ (cortes transversales).

La presencia de estas proteínas en las membranas biológicas aumenta su permeabilidad y selectividad (propiedad fundamental que define la funcionalidad del canal) al paso de determinados iones, que atraviesan los canales en una dirección determinada, en función de la diferencia de potencial electroquímico a ambos lados de la membrana (Hille 1992; DUBYAK, 2004).

Cada vez se conocen más características de la estructura de los canales iónicos por los avances de análisis genéticos, bioquímicos, electrofisiológicos, y la caracterización estructural de los mismos. Por ejemplo, en los canales catiónicos tetraméricos, que es la superfamilia de canales iónicos mejor caracterizada, la selectividad surge de un entorno único estructural y químico dentro de una zona del poro del canal denominada filtro de selectividad donde se encuentra el sitio de unión a los iones. En esta zona la estructura está formada por hélices del poro orientadas hacia el extremo C-terminal hacia la cavidad central como para estabilizar el ión en el interior (Alam y Jiang, 2011). Estudios recientes sobre la estructura de los canales sensibles al ácido 1 (ASIC 1) mostraron que los mismos están conformados por una compleja arquitectura trimérica. Cada subunidad tiene dos hélices transmembrana, un ectodominio intracelular altamente organizado, y extremos N- y C- terminal intracelulares. Hallazgos recientes han comenzado a dilucidar los elementos estructurales que permiten que estos canales detecten y respondan a los factores extracelulares. El dominio extracelular y los residuos de los dominios transmembrana extracelulares detectan cambios en el medio extracelular y esto se traduce en cambios en los eventos de cierre y apertura del canal (Carattino 2011).

Los canales iónicos son elementos fundamentales de las membranas celulares, ya que producen y traducen las señales eléctricas. Controlan numerosos procesos fisiológicos incluyendo la conducción del impulso nervioso, transmisión sináptica, iniciación de la contracción muscular, establecimiento y control del potencial de membrana, control del volumen celular, regulación del flujo de iones a través de células epiteliales de tejidos secretorios y absortivos, entre otras. Esta diversidad de funciones es un reflejo de la variedad de canales iónicos que se pueden expresar en una célula (Hille, 1992; Kotsias 2002).

Todas las células requieren de los canales iónicos para su funcionamiento y defectos en estas proteínas tienen un impacto fisiológico importante. En la última década se han identificado numerosas mutaciones en genes que codifican para canales o

moduladores de canales iónicos que están asociadas a enfermedades hereditarias llamadas canalopatías (Hübner y Jentsch, 2002; Magby y col., 2011).

2.1. Características generales de los canales iónicos

- Poseen una elevada tasa de transporte que permite a un canal abierto el pasaje de 10^6 – 10^7 iones/s, generando un cambio rápido en el potencial de membrana (Vm). Debido a esta capacidad de transporte y a la alta capacitancia de la membrana celular ($1\mu\text{F}/\text{cm}^2$), se requiere un número pequeño de canales para generar una señal eléctrica.
- Son proteínas de membrana capaces de interactuar con otras proteínas, el citoesqueleto y el entorno lipídico. Pueden participar en la transducción de señales desde el exterior de la célula para generar una respuesta interna, por cambios en la composición iónica del medio y el Vm de la célula.
- Una sola célula puede expresar diversos tipos de canales iónicos, que junto a la actividad de bombas y receptores determinan la permeabilidad celular. La presencia de canales iónicos no está restringida a células excitables, sino que están expresados en todas las células eucariotas y procariontas.
- La actividad de los canales, independientemente del estímulo inicial que requieran para su apertura, puede ser modificada por diferentes agentes o procesos, llamados moduladores. Esta modulación puede ser ejercida por cambios en la concentración externa o interna de calcio, neurotransmisores, segundos mensajeros, citoesqueleto, fosforilación - desfosforilación del canal, entre otros (Kotsias, 2002).

2.2. Clasificación de los canales iónicos

Los canales iónicos se pueden clasificar según:

- El tipo de ión que pasa a través del canal con mayor facilidad y que permite agruparlos en canales de sodio, potasio, calcio, cloruro y canales no-selectivos.

- El estímulo que necesitan para la activación, dividiéndolos en: canales dependientes de voltaje, canales sensibles a la distorsión mecánica, canales dependientes de ligandos intracelulares o extracelulares.
- La región celular donde se localizan, ej. canal ENaC, receptor nicotínico de la placa terminal (nAChR).
- La sensibilidad a inhibidores, como los canales de sodio sensibles a tetrodotoxina o a amiloride. Los canales iónicos poseen sitios de unión para drogas y toxinas.
- Similitud en la secuencia de aminoácidos. Numerosos tipos de canales pueden ser agrupados por homología estructural, ej. proteínas de la familia ABC (*ATP binding cassette*), como CFTR.

Nos detendremos en las características de los canales iónicos en particular que están implicados en este trabajo:

2.3. El CFTR

El CFTR es un canal de Cl⁻ activado por AMPc y regulado por ATP, que pertenece a la superfamilia de proteínas ABC (*ATP - binding domain*).

Esta proteína de 150-170 kDa, presenta 1480 aminoácidos, y basado en el análisis hidropático de su secuencia aminoacídica, Collins y col (1990) propusieron un modelo esquemático de su estructura (Riordan y col, 1989) ilustrado en la figura 6. Comenzando por el extremo N-terminal, la proteína presenta seis dominios transmembrana (TMD1) con múltiples α -hélices, seguido por un primer dominio de unión a nucleótidos (NBD1), con secuencias consenso que unen ATP. Flanqueando este sitio, un dominio regulatorio (RD), rico en sitios de fosforilación por quinasas dependientes de AMPc (PKA) y por proteínas quinasa C (PKC), es seguido por un segundo set de seis dominios transmembrana (TMD2) y un segundo NDB (NMB2) que une ATP.

Varios grupos de trabajo, utilizando diferentes técnicas, encontraron que el CFTR es un canal de baja conductancia (6 a 15 pS), la cual es independiente del voltaje y el tiempo aplicados. La fosforilación del canal por PKA dependiente de AMPc ocurre únicamente en el RD, mientras que la unión de ATP y su hidrólisis ocurren en uno o ambos NBD (Morales y col., 1999; Gadsby y col., 1995; Sheppard y Welsh, 1999; Assef y col., 2003).

Es sabido que el TMD1 contribuye a la formación del poro del canal. La remoción de una gran porción de TMD1 reduce la conductancia unitaria del canal por un 30 %, sin afectar la selectividad iónica, demostrando que los sitios internos pueden funcionar como como codones de iniciación de la traducción.

Los dominios NBD hidrolizan ATP para regular el *gating* del canal y la fosforilación del dominio R controla la actividad de mismo. Una vez que el canal es activado por fosforilación, las aperturas y cierres son regulados por la hidrólisis de ATP. Finalmente, la desfosforilación mediada por fosfatasas lleva a la inactivación del canal (Berger y col., 1993; Winter y Welsh, 1997; Sheppard y Welsh, 1999, Ford y col, 2011).

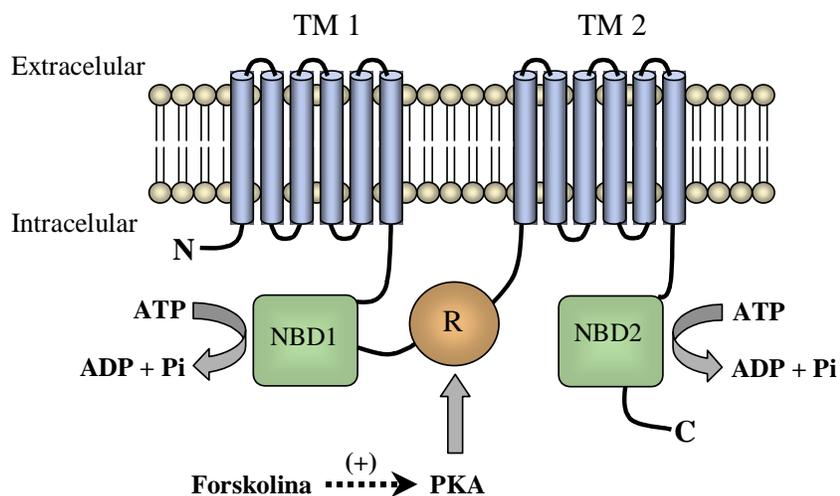


Figura 6. Modelo topológico propuesto para el CFTR que muestra los dominios citosólicos terminales NH₂ y COOH, dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) donde ocurre la hidrólisis del ATP, las 12 estructuras α -hélice que atraviesan la membrana, agrupadas en dos segmentos (TM1 y TM2) y el dominio regulatorio (R), sujeto a regulación por PKA. La forskolina es un activador de la adenilato ciclasa que promueve en última instancia la activación de PKA.

2.3.1. Características del CFTR

Estudios electrofisiológicos permitieron establecer que el CFTR es un canal aniónico, con una relación corriente-voltaje lineal y con la siguiente secuencia de permeabilidad a aniones: $Br^- \geq Cl^- > I^- > F^-$ (Anderson y col., 1991a). El comportamiento del canal es independiente del tiempo y del voltaje. La forskolina, un activador de la adenilato ciclasa, lo activa en forma reversible (ver Assef y col., 2003 y 2005 para referencias), y puede ser bloqueado por diferentes agentes incluyendo: diphenylamina-2-ácido carboxílico (DPC), ácido 4,4'-diisotiocianoestilbeno-2-2'-disulfónico (DIDS), 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) ácido benzoico (NPPB), y el hipoglucemiante oral glibenclamida. Recientemente se han desarrollado otros inhibidores que son específicos de este canal, como CFTR_{inh}-172 (Ma y col, 2002; Li y col, 2004; Hwang y Sheppard, 1999; Zhang y col., 2000).

El CFTR es una proteína multifuncional, es un canal de Cl^- pero también un regulador de la actividad de otros canales iónicos como el ENaC y el canal de cloruro con rectificación saliente (ORCC), entre otros (Kunzelmann y Schreiber, 1999; Schwiebert y col., 1995 y 1999, Rubenstein y col., 2011).

2.3.2. Alteraciones relacionadas con el CFTR

El nombre del CFTR deriva del hecho que el defecto en su función por mutaciones es la base de la fibrosis quística. Se han detectado más de 1700 mutaciones hasta el momento que señalan la complejidad de esta enfermedad genética letal de carácter recesivo, la más común entre los caucásicos afectando 1/2500 nacidos vivos (Cuthbert, 2011).

Muchas mutaciones alteran diferentes propiedades del canal, pero la mutación más común ($\Delta F508$) resulta en un mal ensamblaje y en una falla en la maduración de la proteína, que imposibilita su inserción en la membrana plasmática (Gelman y Kopito, 2002).

Este desorden se caracteriza por un defectuoso transporte de Cl^- y de otras iones que afectan las funciones exócrinas de diferentes órganos como el páncreas, intestino, pulmón, árbol biliar y glándulas sudoríparas (Quinton y col., 1999).

2.4. EI ORCC

El ORCC es un canal de cloruro de conductancia intermedia que presenta la propiedad de rectificación, siendo las corrientes con mayor amplitud a potenciales despolarizantes. Su actividad es inhibida por los bloqueantes típicos de los canales de Cl^- (Tilman y col., 1991), y presenta sensibilidad a la glibenclamida (Rabe y col., 1995; Julien y col., 1999).

Fue descrito en algunos sistemas, como las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano T84 (Halm y col., 1992) y HT29 (Tillman y col., 1991), en células pancreáticas fetales humanas (Gray y col., 1989), en células de epitelio aéreo (Egan y col., 1995), en la línea celular de leucemia eritromieloblastoide humana K562 (Assef y col., 2002), y en cardiomiocitos de atrio humano (Demion y col., 2006).

2.4.1 Regulación del ORCC

El ORCC es activado por el CFTR por un mecanismo autocrino de liberación de ATP (Schwiebert y col., 1995 y 1998). La figura 7 muestra uno de los modelos propuestos para dicha regulación en donde la acción del ATP estaría mediada por receptores purinérgicos. Algunos trabajos sostienen que el CFTR es en sí mismo un canal de ATP, mientras que otros sugieren que es un regulador de la liberación de ATP por canales alternativos (Reisin y col., 1994; Reddy y Quinton, 1996; Cantiello y col., 1998). Hryciw y Guggino (2000) proponen que la estimulación de CFTR regula en forma positiva la actividad de ORCC por medio de la liberación de ATP al espacio

extracelular, pero este esquema tiene como principal inconveniente la falta de datos experimentales que corroboren el transporte de ATP por el CFTR.

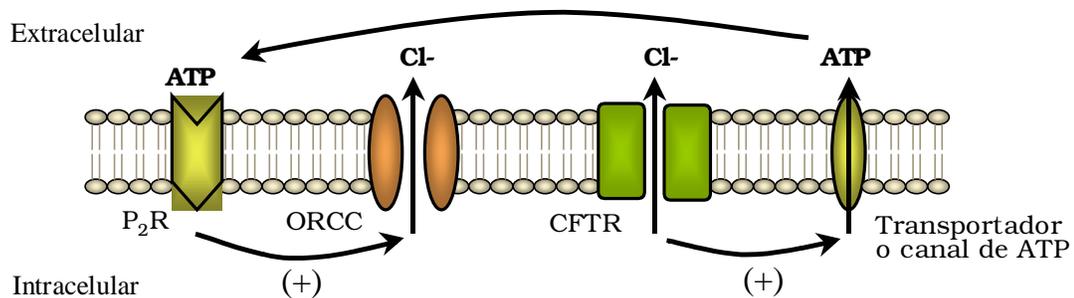


Figura 7. Modelo propuesto para la regulación autocrina entre CFTR y ORCC. La actividad de CFTR estimula la liberación de ATP, el cual promueve la activación del ORCC. La acción del ATP estaría mediada por receptores purinérgicos (P₂R).

En miocitos atriales y ventriculares humanos, la actividad de ORCC puede ser *up-regulada* por ATP intracelular e inhibida por nucleótidos extracelulares. La regulación de ORCC por ATP extracelular sugiere que este canal podría tener un importante rol en el mantenimiento de la actividad y el potencial de membrana bajo condiciones en las cuales los niveles de ATP extracelulares están elevados, que es relevante en condiciones patofisiológicas, como por ejemplo, durante la isquemia y reperfusión cuando el ATP es liberado en el espacio intersticial de células dañadas. El incremento de ATP extracelular podría producir una retroalimentación negativa de la corriente de Cl⁻ y estabilizar la actividad eléctrica (Liu y col., 2007).

2.5. El ENaC

El ENaC es un canal iónico selectivo al sodio, de ~5 pS de conductancia, no activado por voltaje, perteneciente a la superfamilia de las ENaC/Degenerinas (Pochynyuk y col., 2007). El canal es inhibido por el bloqueante amiloride y sus análogos (benzamil y triamterene), hecho que caracteriza a las corrientes que conduce (Garty y Palmer, 1997; Kellenberger y col., 2003; Kashlan y col., 2005)

Este canal, presente en la cara apical de los epitelios absortivos clásicos, como las células principales de los túbulos colectores corticales de mamíferos, es el regulador del

movimiento del catión desde el líquido tubular hacia el citoplasma (Garty y Palmer, 1997). En la superficie del epitelio de las vías aéreas mantiene el volumen de líquido ayudando a la eliminación de las partículas y patógenos inhalados (Donaldson y col., 2007).

El ENaC se expresa en otros tipos celulares, tales como el colon distal, los ductos de las glándulas secretorias (salivales y sudoríparas), en la vejiga y en la piel de los anfibios (Garty y Palmer, 1997; Alvarez de la Rosa y col., 2000). También se lo ha detectado en las papilas gustativas, en células de músculo liso vascular, en células epiteliales mamarias (Boyd y col., 2007), en el epitelio endometrial y tracto reproductor femenino (Yang y col., 2004; Chan y col., 2007), en células endoteliales (Kusche-Vihrog y col., 2007), en espermatozoides (Hernandez-Gonzales y col., 2006; Kong y col., 2008), linfocitos humanos (Bubien y col., 2001), glándula tiroides (Verrier y col., 1989), queratinocitos y folículos pilosos (Rossier y col., 2002), y como ya hemos mencionado, detectamos la presencia estructural y funcional de ENaC en las células BeWo y en placenta humana (del Mónaco y col., 2006 y 2008a).

El mal funcionamiento del ENaC es importante en enfermedades humanas como el pseudohipoaldosteronismo tipo I, síndrome de Liddle (Knight y col., 2006), la fibrosis quística (Prulière-Escabasse y col., 2010), y podría participar en la fisiopatogenia de la preeclampsia (Svenningsen y col., 2011; del Mónaco y col., 2008b). Conocer la regulación de este canal lleva a entender mejor los mecanismos fisiopatogénicos cuando el canal no se expresa, o su densidad en la membrana celular está alterada o falla su regulación.

2.5.1. Estructura del ENaC

Hasta hace pocos años la mayor cantidad de evidencias parecían indicar que el ENaC estaba compuesto por cuatro subunidades en la relación 2α , β , γ , formando un tetrámero, lo que ahora se considera erróneo. En el 2005, Staruschenko y col., con técnicas electrofisiológicas, demostraron que las subunidades formadoras del ENaC son tres, lo que fue también demostrado en el 2007 por Jasti y col. al publicar sus resultados

sobre la estructura cristalina del canal iónico ASIC. El ASIC, al igual que el ENaC, pertenece a las degenerinas, una superfamilia que codifica proteínas que intervienen en procesos biológicos como la nocicepción, sentido del gusto salado y táctil, homeostasis del Na^+ y mecanotransducción (Drummond y col, 2007).

Por lo tanto, el ENaC es un canal heteromérico, compuesto por tres subunidades homólogas (α , β , γ) (alrededor del poro por el cual se mueven los iones Na^+), que comparten una estructura terciaria común, y las mismas poseen los dominios carboxilo y amino terminales intracelulares cortos (~50-100 aminoácidos) separados por dos dominios transmembrana y un largo dominio extracelular (~450 aminoácidos) (Figura 8).

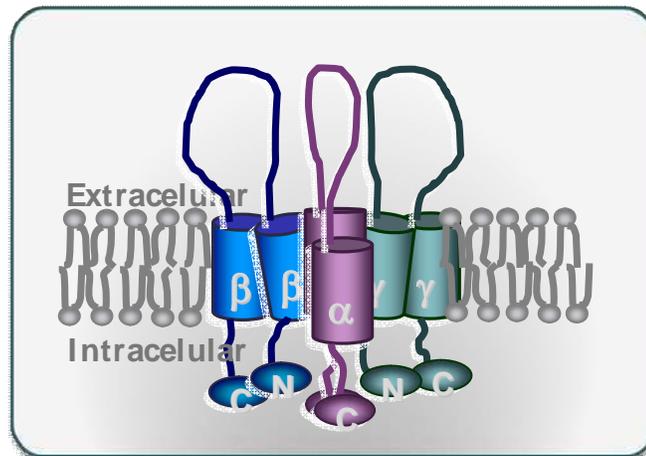


Figura 8: Estructura terciaria de las subunidades del ENaC. Esquema de una membrana celular en la que se observan las tres subunidades del canal de sodio y su distribución a través de la misma.

2.5.2 Regulación del ENaC

La regulación del ENaC es compleja, está modulado por una variedad de estímulos, como aldosterona, vasopresina, insulina (Butterworth y col., 2009), glucocorticoides (Quesnell y col., 2007), prostaglandinas (Wang y col., 2009), y por las hormonas sexuales estrógeno y progesterona (Laube y col., 2011). Uno de los principales reguladores del ENaC son las proteasas que escinden al ENaC y lo activan (Passero y col., 2008). Por otra parte, el mismo puede ser afectado por la concentración de sodio

intracelular (Anantharam y col., 2006; Bize y col., 2007) y extracelular (Sheng y col., 2007), por estímulos mecánicos (Carattino y col., 2004; Wei y col., 2007) y por la tensión de oxígeno sanguínea (Otulakowski y col., 2006). El canal es sensible a fosfatidilinosítidos (Ma y col., 2002; Pochynyuk y col., 2007), estrés hipotónico (Taruno y col., 2008) y a la coexpresión con canales de cloruro como CIC-5 (Bachhuber y col., 2005) o CFTR. El mecanismo por el cual el CFTR regula al ENaC no es conocido aunque sus efectos se deberían a cambios en la probabilidad de apertura del canal o en el tráfico de unidades sintetizadas desde el retículo endotelial hacia la membrana celular (Rubenstein y col., 2011).

La hormona mineralocorticoide aldosterona es uno de los principales efectores (y el más potente) para el aumento de la actividad del ENaC. La aldosterona entra a las células y se une al receptor de mineralocorticoides (MR) en el citoplasma. El MR se expresa en las células BeWo y es necesario para la generación de la respuesta al estímulo hormonal (del Mónaco y col., 2006, 2008a). El receptor activado ingresa al núcleo, donde estimula la transcripción de genes (proteínas estimuladas por aldosterona, AIPs) y reprime la transcripción de otros (proteínas reprimidas por aldosterona, ARPs). Los tiempos de acción de la hormona presentan dos fases. La respuesta temprana, entre los 30 minutos y las 3 horas, en la cual el aumento de los niveles del ARNm del ENaC es escaso, por lo que el aumento de la corriente de sodio está relacionado con el tráfico del canal a membrana y la inhibición de las vías de ubiquitinación, aumentando la presencia del mismo en la superficie celular.

La respuesta tardía, a partir de las 3 horas de estímulo y durando incluso hasta las 24 horas, se caracteriza por un aumento de la absorción de sodio de 10 veces más que la anterior. La aldosterona estimula la transcripción de las subunidades del canal, con patrones de respuesta heterogéneos y tejido específicos (Alvarez de la Rosa y col., 2000).

En etapas tardías la aldosterona estimula directamente la transcripción del ENaC, aumentando las copias del canal por célula y estimulando su presencia en la membrana plasmática. Una vez que el canal se encuentra en membrana, el mismo es modulado por

estímulos postraduccionales: 1) proteólisis de las subunidades del canal, mediante la cual las proteínas son clivadas por proteasas (mCAP-1, mCAP-2, tripsina, elastasa, prostasina, furina), aumentando la probabilidad de apertura (Narikiyo y col., 2002; Hughey y col., 2003; Caldwell y col., 2004; Rossier, 2004; Adebamiro y col., 2007; Harris y col., 2007) 2) metilación de la subunidad β del canal, aumentando la probabilidad de apertura (Rokaw y col., 1998; Zhou y Buben, 2001; Edinger y col., 2006) 3) unión a fosfatidilinosítidos, que regulan la probabilidad de apertura del canal (Pochynyuk y col., 2007). Por otro lado, las proteasas endógenas serían los efectores inmediatos en las respuestas que ocurren ante un estímulo en particular (Kleyman y col., 2009), formando parte de un sistema regulador muy ajustado a las necesidades.

En la preeclampsia se observan dos hechos en principio contradictorios en relación al ENaC. Primero una disminución en la aldosterona plasmática (Escher y col., 2007; Shojaati y col., 2004), hormona que penetra en la placenta (Bayard y col., 1970) y el otro es que en la orina se detecta plasmina, resultado de la conversión de plasminógeno por la urokinasa celular local (Chen y col., 1980; Svenningsen y col., 2011). La plasmina activa al canal por medio de la subunidad γ -ENaC en forma directa o por la prostasina de la membrana celular. La retención de Na^+ en la preeclampsia podría ser el resultado de un mayor efecto positivo de la plasmina sobre el ENaC. Controversialmente, la deficiencia en la migración trofoblástica podría correlacionarse con la disminución de la expresión y actividad de ENaC debido a la disminución en los niveles de aldosterona, en esta enfermedad.

2.6. Migración y proliferación celular. Actividad de canales iónicos

La migración celular es un proceso fundamental en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Controla la morfogénesis y la embriogénesis, la inmunidad e inflamación, la regeneración de tejidos y la angiogénesis. Su desregulación causa o es

parte de muchas enfermedades, incluyendo síndromes autoinmunes, inflamación crónica, retardo mental, y metástasis tumoral (Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011).

A pesar de las diferencias en su función, las células que tienen la capacidad de migrar comparten algunas características: poseen una polarización en el plano de avance (antero-posterior) y la capacidad de generar estructuras que generen movimiento, como los lamelipodios. Los ciclos repetidos de extensión del lamelipodio y retracción de la porción posterior de la célula resultan en un desplazamiento direccional de la misma. La polarización morfológica de la célula que migra es altamente dinámica y requiere de la integración de señales mecánicas y químicas que llevan a la represión en la expresión de moléculas de adhesión y a cambios en el citoesqueleto celular (Schwab, 2001).

Los mecanismos de locomoción están relacionados directamente con la reorganización del citoesqueleto. Los filamentos de actina tienen un papel importante, tanto en la generación de las estructuras de locomoción, como en la interacción con otras proteínas estructurales de señalización y motilidad, debajo de la membrana plasmática (Mitchison y Cramer, 1996). Los canales iónicos y los transportadores participan activamente en los procesos de migración, en relación directa con el citoesqueleto. Estos pueden hallarse regulados por el estado de los filamentos de actina y el volumen celular, requisitos indispensables para el desarrollo del desplazamiento celular y la migración celular (Mills y Mandel, 1994; Schwab, 2001).

En particular, se ha detectado la participación del ENaC en la migración celular. Algunos trabajos señalan que la generación de un daño en un epitelio sano produce entre otras señales, un estímulo para la actividad del canal, y una posterior despolarización de la membrana plasmática, necesaria para la reorganización del citoesqueleto (Chifflet y col., 2005). Otros trabajos sugieren que el canal participa como un mecanosensor, cuya expresión es requerida para la normal migración celular (Grifoni y col., 2006). Este hecho se basa en que el ENaC pertenece a la superfamilia de las degenerinas. Cambios en la presión hidrostática y estiramiento regulan el ENaC y por su relación con el citoesqueleto podría ser el nexo entre determinados estímulos mecánicos

y la migración celular (Awayda y Subramanyam, 1998; Satlin y col., 2001; Carattino y col., 2004; Drummond y col., 2007).

Los canales de cloruro también participan en el proceso de migración celular. Se encontró que en células epiteliales humanas de las vías respiratorias, al ser lesionadas e inhibir selectivamente ya sea la expresión o la actividad del transporte iónico del CFTR, se produce una disminución de la migración celular y por lo tanto un retardo en la reparación de la herida (Schiller y col., 2010). Otros autores demostraron en epitelio de tráquea que inhibiendo específicamente CFTR se reducen significativamente las corrientes salientes de Cl^- por este canal en la zona donde se produce una herida en el epitelio. Estos resultados sugieren que, la generación de corrientes eléctricas endógenas en el lugar de la injuria celular, podría dirigir la migración celular y restituir el daño (Sun y col., 2011). Existen otras evidencias de la participación de canales de cloruro en trabajos de reparación de la herida realizados en córnea de rata, donde se vio la influencia de estos canales promoviendo la entrada o inhibiendo la salida de Cl^- , indicando que la participación de canales de Cl^- durante la cicatrización, es posible (Reid y col., 2005). Fuchigami y col. (2011) observaron que el bloqueo con amiloride, inhibidor de ENaC, y el inhibidor de canales de Cl^- NPPB, muestran diferentes tasas de cierre de la herida en embriones de *Xenopus laevis*. Sugieren la participación de múltiples tipos de canales iónicos en la progresión del cierre de la herida.

La regulación aberrante del proceso de migración y proliferación celular permite el progreso de enfermedades como ocurre en la invasión de los tumores malignos. Se ha observado que células altamente proliferantes poseen una elevada concentración de sodio intracelular que podría constituir una señal mitogénica, tal y como se mencionaba para la migración de reparación de heridas. En este estudio, la aplicación de amiloride disminuye la proliferación de células normales o transformadas *in vivo* (Sparks y col., 1983). También se observó la presencia del ENaC en epitelio mamario, y cómo el crecimiento de adenomas mamaros podían inhibirse con la aplicación de amiloride, sugiriendo que la actividad del canal se correlaciona con la proliferación tumoral (Boyd y

col., 2007). Vila-Carriles y col. (2006) han demostrado que parte del mecanismo por el cual los gliomas invaden los tejidos normales es por una corriente de Na^+ mediada por un canal de la familia de las degenerinas.

En estudios con células de riñón canino (MDCK) se demostró que al inhibir el transporte Cl^- utilizando bloqueantes inespecíficos de canales de Cl^- y de CFTR en particular, se inhibe la proliferación de estas células. De esta manera, se observó un retardo en el crecimiento de los cistos epiteliales con acumulación de fluidos, característicos del riñón policístico (Li y col., 2004).

3. GENERALIDADES

3.1. Ley de Ohm

La materia está constituida por moléculas cargadas, donde un mol de Hidrógeno contiene el número de Avogadro de protones ($N = 6.02 \times 10^{23}$) y el mismo número de electrones. La carga de un protón (e), medida en Coulombs (C) es: $e = 1.6 \times 10^{-19}$ C. Por lo tanto, la carga de un mol de protones queda determinada por la ecuación de Faraday, conocida como constante de Faraday (F).

$$F = N \times e = \sim 10^5 \text{ C/mol}$$

Un flujo de cargas es denominado corriente. La corriente se mide en Amperios (A), donde 1 A corresponde al flujo de un Coulomb por segundo. Si se colocan en solución salina un electrodo positivo y otro negativo, los cationes migrarán al polo negativo (cátodo) y los aniones al positivo (ánodo). Por convención, la corriente fluye a través de la solución desde el ánodo al cátodo. Según la ley de Ohm, la corriente eléctrica (I) está determinada por dos factores: la diferencia de potencial (V) entre los electrodos (trabajo necesario para mover una carga de un punto a otro, medida en Volts) y la conductancia (G) de la solución entre ellos (facilidad con que las cargas se mueven entre dos puntos, medida en Siemens):

$$I = V \times G$$

La ley de Ohm también puede escribirse en términos de resistencia donde, la resistencia (R) es la inversa de la conductancia y se mide en Ohm (Ω). La ley de Ohm es central en la biofísica de membranas porque cada canal iónico constituye un conductor elemental que atraviesa la membrana lipídica. La conductancia total de la membrana es la suma de esas conductancias elementales en paralelo. De este modo, podemos estimar el número de canales abiertos y la facilidad con la que los iones pueden atravesar la membrana.

3.2. Relación corriente – voltaje

Usualmente se caracteriza a los canales iónicos con curvas corriente-voltaje (curvas I-V), obtenidas de relacionar la amplitud de la corriente con el potencial aplicado a la célula. A partir de estos gráficos se puede estimar la conductancia que se define como el cociente entre la amplitud de corriente y el voltaje. Cuando analizamos registros de canal único, se obtienen datos de conductancia unitaria (g) y si utilizamos datos de corrientes totales podemos calcular la conductancia macroscópica (G), (ver más adelante).

En muchos casos, la conductancia no cambia en forma lineal con el voltaje y a esta propiedad se la conoce como rectificación. La rectificación puede ser consecuencia de un cambio en la probabilidad de apertura del canal, de mecanismos de bloqueo por iones o moléculas presentes en el medio intracelular y de diferente composición iónica de las soluciones a ambos lados de la membrana. El término de rectificación entrante se utiliza cuando el canal conduce corriente en forma más efectiva hacia el interior celular, con respecto al exterior (Figura 9) cuando se encuentra en soluciones simétricas a ambos lados de la membrana. Lo opuesto corresponde a la rectificación saliente, y se denominan canales no rectificantes a aquellos que presentan una curva I-V lineal.

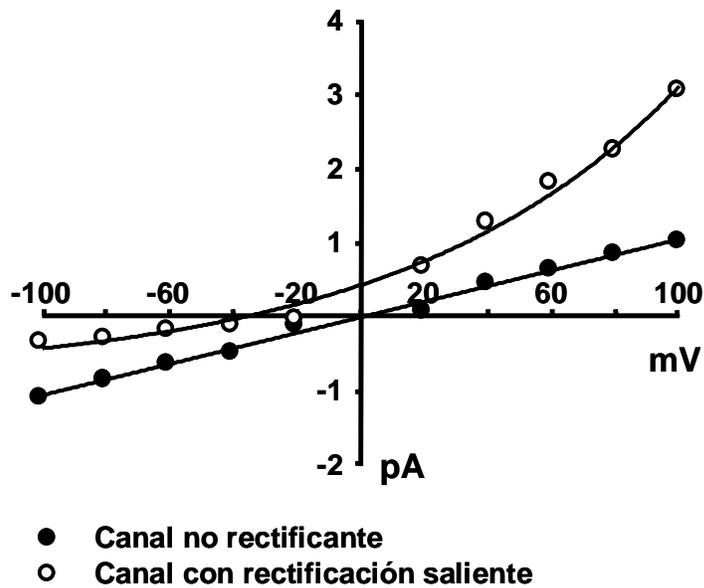


Figura 9. Relación corriente – voltaje de dos canales iónicos distintos. Los símbolos llenos (●) representan a un canal de conductancia unitaria 10 pS y no rectificante. Los círculos vacíos (○) representan a un canal con rectificación saliente.

3.3. Potencial de equilibrio y Ecuación de Nernst

Un canal puede conducir corriente hacia adentro o afuera de la célula, y la dirección en que el movimiento de iones ocurre es gobernada por la diferencia de potencial electroquímico. El punto donde el gradiente químico es exactamente igual al gradiente eléctrico es llamado potencial de equilibrio.

En las células, los iones se distribuyen en forma asimétrica a ambos lados de la membrana y la diferencia de potencial a través de la misma en el reposo es distinta de cero. El potencial de equilibrio para un determinado ion (E_{ion}) queda determinado por la Ecuación de Nernst:

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[S]_o}{[S]_i}$$

donde, z es la carga del ión, F es la constante de Faraday, R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin y $[S]_o$ y $[S]_i$, corresponden a las concentraciones del ión fuera y dentro de la célula, respectivamente. Conociendo las concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana se puede determinar a partir de la ecuación de Nernst, el potencial de equilibrio para cada ión. De este modo, si se fija la diferencia de potencial de la célula al potencial de equilibrio del K^+ (E_K) por ejemplo, la ecuación predice que en estas condiciones no habrá flujo neto de K^+ a través de la membrana.

3.4. Permeabilidad, conductancia y selectividad

La permeabilidad es una propiedad de las membranas biológicas que se relaciona con la facilidad que posee un ión para atravesar la bicapa lipídica. En la mayoría de los casos es independiente de la concentración del ión a ambos lados de la membrana. La conductancia es una medida del número de canales insertos en la membrana que se encuentran abiertos a un determinado potencial. En líneas generales, la conductancia cambia en paralelo con la permeabilidad, pero depende de las propiedades de la membrana y de las concentraciones de iones en las soluciones interna y externa. Si un canal permite el pasaje de más de una especie iónica, un valor análogo al potencial de equilibrio, llamado potencial de reversión (E_r) puede ser calculado a partir de una ecuación de campo constante modificada:

$$E_r = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_{Cl} [Cl]_i + P_X [X]_i}{P_{Cl} [Cl]_o + P_X [X]_o}$$

En este ejemplo se escribió la ecuación para el Cl^- , donde, $[Cl^-]$ y $[X]$, corresponden a las concentraciones de Cl^- y de otro ión permeable, respectivamente y las permeabilidades se simbolizan como P_{Cl} y P_X . E_r corresponde al valor de potencial donde la corriente es

cero y se puede obtener experimentalmente. De este modo, si las concentraciones iónicas en la solución intracelular y extracelular son conocidas, esta ecuación permite estimar el valor de permeabilidad relativa del ión X con respecto al Cl⁻, P_X/P_{Cl}.

Otra alternativa para obtener datos de permeabilidades relativas es mediante determinación del cambio en el E_r cuando un ión es reemplazado por otro en la solución extracelular. Por ejemplo se mide primero el E_r con Cl⁻ en la solución extracelular ([Cl⁻]_o) y luego con el anión X ([X]_o) y se calcula P_X/P_{Cl} utilizando la siguiente ecuación:

$$\Delta E_r = E_{r_X} - E_{r_{Cl}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_X [X]_o}{P_{Cl} [Cl]_o}$$

Si se obtiene un valor de P_X/P_{Cl} = 0.25, indica que el Cl⁻ es 4 veces más permeable que X.

La selectividad compara las permeabilidades de un canal abierto a diferentes especies iónicas. El fenómeno de selectividad tiene lugar en la región más angosta del poro conocida como filtro de selectividad, donde los aminoácidos conservados, localizados en esa zona determinan el tipo de ión que puede permear. La interacción de los iones con los grupos polares del filtro permite la deshidratación y entrada del ión por el poro del canal (Hille, 1992).

4. MEDICIÓN DE CORRIENTES CELULARES

4.1. Técnica de *Patch clamp*

4.1.1. Fundamentos del *Patch clamp*

La técnica de *patch clamp*, fue empleada por primera vez por Sakmann y Neher en 1976 y revolucionó el estudio de los canales iónicos, posibilitando el estudio en todos los tipos celulares. Es posible medir la corriente que pasa a través de un solo canal,

como así también las corrientes macroscópicas de una célula entera. La medición de corrientes del orden de los picoAmperios (pA) es posible debido al bajo ruido electrónico de la técnica.

La técnica de *patch clamp* consiste en acercar una micropipeta de vidrio a la membrana celular, de manera que ambas entren en íntimo contacto y se forme una unión. Después de aplicar una leve succión desde el interior de la pipeta, se obtiene un sello de alta resistencia entre la membrana y el vidrio. Así, la resistencia entre el interior de la pipeta y la solución que baña la célula es del orden de 10^9 Ohms ($10^9 \Omega = 1 \text{ G}\Omega$) y al sello formado se lo denomina "gigasello". La micropipeta, que constituye el electrodo de medida del sistema, está conectada a un amplificador y el electrodo de referencia se encuentra ubicado en la solución del baño. El electrodo de medida puede capturar todos los iones que fluyen bajo su área después de la aplicación de un estímulo y así la corriente transportada por canales iónicos, puede ser determinada. En muchos casos, es posible que en la región de membrana circunscripta por la punta de la pipeta ($\sim 1 \mu\text{m}$) exista un solo canal, haciendo posible la medición de la corriente unitaria. Esto se denomina configuración *cell attached* de la técnica de *patch clamp* y se utiliza para registrar la actividad de canales únicos manteniendo intacta la composición del medio intracelular. En adición, es el modo precursor del resto de las configuraciones (Figura 10). Las determinaciones en *inside out* se obtienen después de alejar la pipeta de la superficie celular donde, usualmente se mantiene la integridad del gigasello después de la escisión. La configuración de *inside out* ofrece la posibilidad de modificar durante el experimento, la solución que baña las células, que representa el medio citoplasmático o intracelular.

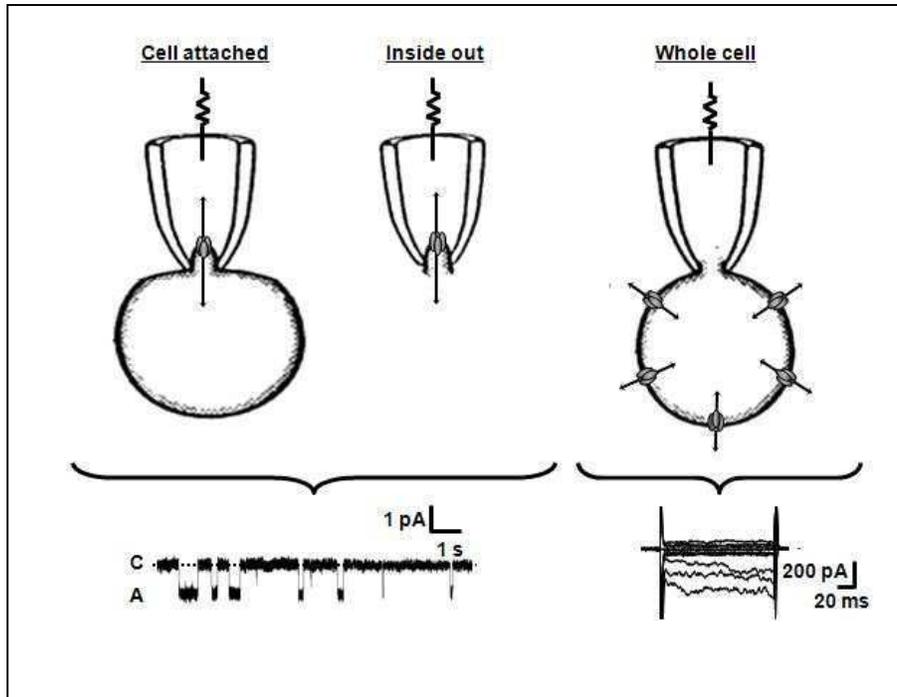


Figura 10. Esquema de las configuraciones utilizadas en *patch clamp*. En las configuraciones de *cell attached* e *inside out* el electrodo captura la corriente que pasa por un único canal, y se registra la actividad del mismo alternando entre los estados cerrado (C) y abierto (A). En el modo *whole cell* el electrodo registra corrientes macroscópicas, es decir, todos los canales presentes en la membrana de la célula estudiada.

Alternativamente, se puede aplicar succión sobre el gigasello (en *cell attached*) lo que provoca la ruptura de la membrana y permite que la pipeta acceda al interior celular. La configuración obtenida se denomina *whole cell* (célula entera) y permite medir las corrientes totales de una célula ya que la maniobra realizada no compromete el sello de alta resistencia entre la membrana y la pipeta. Esta configuración se caracteriza por una baja resistencia de acceso (R_a) al interior celular a través de la punta de la pipeta, permitiendo el control del potencial de toda la célula ($R_a = 6-10 \text{ M}\Omega$ para una punta de pipeta cercana a $1 \mu\text{M}$ de diámetro). Durante los registros de *whole cell* la solución de pipeta representa el medio intracelular ya que la célula es dializada por el contenido salino de la pipeta.

4.1.2. Equipo de *patch clamp*

La variedad de equipos de *patch clamp* es muy amplia y responden generalmente al tipo de experimento a realizar (Sakmann y Neher, 1995). En una forma simple, el equipo de *patch clamp* usado en nuestro laboratorio consiste en un microscopio invertido, que contiene la cámara donde se colocan las células, ubicado sobre una mesa antivibratoria dentro de una jaula de Faraday. Un amplificador de *patch clamp* está conectado al electrodo de medida (pipeta) y un micromanipulador hidráulico permite posicionar la pipeta sobre la célula. Se requiere de otros aparatos y programas de computación para la adquisición de datos (software PCLAMP v.8.2, conversor analógico digital, osciloscopio, computadora, etc.). Se utilizan instrumentos para la fabricación de las pipetas, como el estirador de pipetas y la microforja para el pulido de las puntas de los electrodos.

4.2. Análisis de registros de corrientes totales

La configuración de *whole cell* permite medir todas las corrientes generadas por la célula en respuesta al potencial aplicado. Durante los experimentos de *whole cell* la pipeta permite acceder eléctricamente al interior celular (Marty y Neher, 1995).

4.2.1. La membrana como un capacitor

Además de contener canales iónicos, las bicapas lipídicas son un material extremadamente aislante que separa dos soluciones conductoras, la interna y la externa. Esto es por definición un capacitor y la capacitancia de las membranas biológicas es muy alta, del orden de los microfaradios.

La capacitancia (C) es una medida de la cantidad de carga (Q) que se requiere transferir de un conductor a otro para establecer un potencial determinado (V), como indica la siguiente ecuación:

$$C = Q / V$$

La unidad de capacitancia es el Faradio (F). La capacitancia de la membrana (C_m) es directamente proporcional a la constante dieléctrica del medio lipídico y al área de la membrana, e inversamente proporcional al espesor de la misma. Por lo tanto, la gran C_m de las membranas biológicas es una consecuencia directa de sus dimensiones moleculares (Hille, 1992). La C_m se determina experimentalmente en *whole cell*, registrando la corriente generada por la célula en respuesta a un pulso cuadrado pequeño, de 10-20 mV, de manera de no producir la activación de canales. Se mide la corriente instantánea (I_{in}), y la constante de tiempo de la relajación de la corriente (τ), y luego la resistencia en serie (R_s) y la C_m se estiman a partir de las siguientes ecuaciones:

$$I_{in} = \Delta V / R_s$$

$$\tau = R_s \times C_m$$

La figura 11 muestra el circuito equivalente de la célula y el protocolo para la determinación de C_m . Como la capacitancia de membrana es proporcional al tamaño de la célula, todos los valores de corrientes totales se normalizan por la C_m .

Por otro lado, un componente capacitivo importante generado por la pipeta, el cabezal y la membrana, forma parte de un registro de corrientes totales. Entonces, durante los experimentos en *whole cell* es muy importante cancelar el componente capacitivo para evitar la saturación del amplificador durante los repentinos cambios en el valor de la corriente y también para eliminar señales erróneas provenientes de las corrientes capacitivas aportadas por el cabezal y la pipeta (Marty y Neher, 1995).

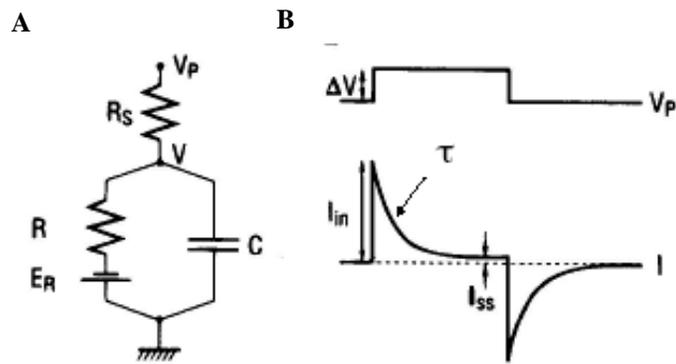


Figura 11. Propiedades eléctricas pasivas de una célula. **A.** Circuito eléctrico equivalente para una célula simple, donde E_R es el potencial de reposo, R_s es la resistencia de la pipeta, R la resistencia de la membrana y C la capacitancia. **B. Arriba:** Pulso de voltaje (ΔV) aplicado con la pipeta. **Abajo:** corriente medida en respuesta a dicho pulso, a partir de la cual se obtienen los datos que permiten calcular la C_m .

4.2.2. Resistencias en serie

La resistencia en serie R_s representa la resistencia de la pipeta durante un experimento de *whole cell* (Figura 11). La compensación de la R_s tiene por objetivo, limitar los errores en las curvas I-V, como así también mejorar la velocidad del control del potencial para poder registrar cambios rápidos de corriente. Por otro lado, la determinación y control de la R_s , permite evaluar una posible obstrucción de la pipeta durante el experimento (Marty y Neher, 1995).

4.2.3. Difusión entre pipeta y células

En la configuración de *whole cell* se establece entre la pipeta y el interior celular una continuidad química, además de la eléctrica (analizada en los puntos anteriores). Dado que el volumen de la pipeta ($\sim 10 \mu\text{l}$) prevalece sobre el de la célula ($\sim 1 \text{pl}$), con el paso del tiempo, la solución de la pipeta dictará la concentración de todas las sustancias difusibles. Sin embargo, el tiempo necesario para el equilibrio dependerá de la geometría de la célula y del tamaño de las sustancias difusibles (Marty y Neher, 1995).

4.2.4. Conductancia macroscópica

Si analizamos registros de corrientes totales (figura 12), la amplitud de corriente (I) es proporcional a la conductancia macroscópica (G) y al voltaje (V):

$$I = G \times V$$

Si la corriente total es generada por un único tipo de canal, entonces G será proporcional al número de canales abiertos (N), a la probabilidad de apertura del canal (P_o) y a la conductancia unitaria (g) del mismo, según las siguientes ecuaciones:

$$G = g \times N \times P_o$$

$$I = g \times N \times P_o \times V$$

La conductancia de corrientes totales que presentan curvas I-V rectificantes se estima de la pendiente de la curva I-V. Dependiendo de la magnitud de las corrientes, la G se puede expresar en unidades de pS, nS o μ S.

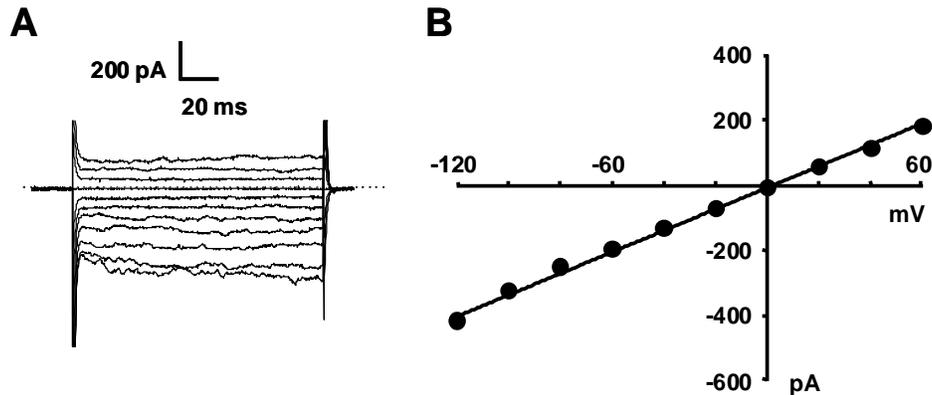


Figura 12. A. Corrientes totales de una célula BeWo medidas en *whole cell*. B. Curva I-V de registros obtenidos como se muestra en la figura A.

4.3. Análisis de registros de canal único

4.3.1. Amplitud de la corriente

La figura 13 muestra a modo de ejemplo, un registro de corriente unitaria adquirido a 100 mV en la configuración de *inside out*, donde se puede observar la naturaleza bifásica de los canales iónicos. Los canales alternan su estructura en al menos dos estados conformacionales, abierto (que permite el flujo de iones) y cerrado.

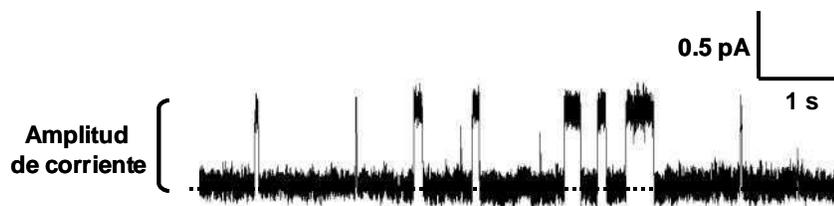


Figura 13. Trazos de corriente de canal único en la configuración de *inside out* registrados a 100 mV. La línea punteada indica el estado cerrado del canal.

Las aperturas y cierres del canal se observan como transiciones en el registro, donde la corriente fluctúa entre el nivel basal cercano a 0 pA (línea punteada) y un valor de ~ 0.6 pA. Se construyen histogramas del número de eventos en función de los valores de corriente. Estos histogramas tienen una distribución normal y permiten obtener el valor de amplitud de corriente promedio del canal. En el ejemplo de la figura 13 la amplitud promedio de la corriente a 100 mV fue de ~ 0.6 pA.

La información en un registro de canal único está contenida en la amplitud de la corriente, la conductancia, la duración de los periodos abiertos y cerrados, y el orden en que las aperturas y cierres ocurren. Las propiedades de cada estado del canal son relativamente constantes, por ejemplo la amplitud de la corriente cuando el canal está abierto es muy similar entre una apertura y otra del mismo canal. Sin embargo, el tiempo

en que un canal iónico permanece en un determinado estado es gobernado absolutamente por el azar, por lo tanto, su comportamiento debe describirse en términos probabilísticos. Los eventos futuros solo quedan determinados por el estado en que se encuentra el canal antes de la transición, sin importar los estados en que estuvo previamente. Los procesos en los que la historia pasada no condiciona los eventos futuros se conocen como procesos de Markov homogéneos (Colquhoun y Sigworth, 1995).

4.3.2. Conductancia unitaria

La conductancia unitaria (g) se obtiene como un cociente entre los valores de la amplitud de corriente del canal único (generalmente en pA) y el voltaje, y se expresa en picoSiemens (pS) (Figura 14).

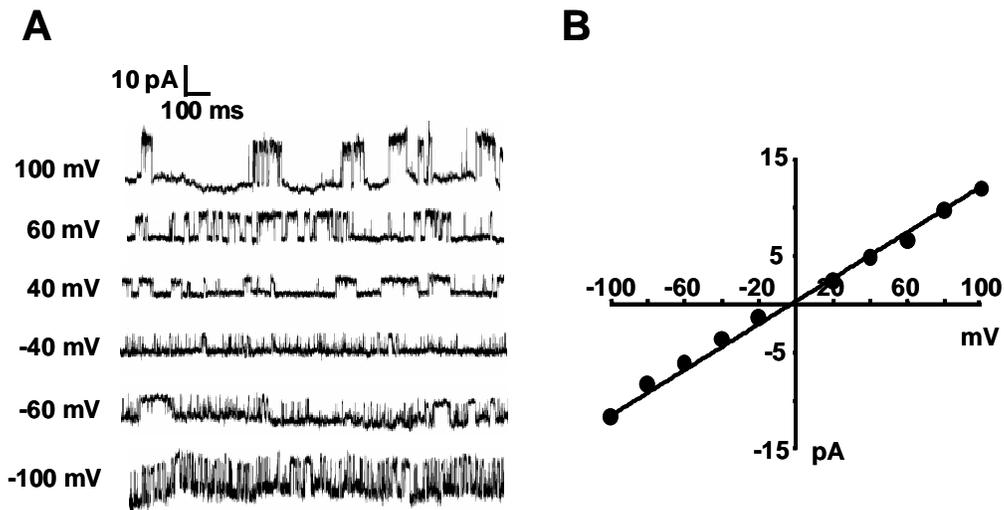


Figura 14. A. Corrientes de canal único registradas a diferentes voltajes en la configuración de *inside out*. B. Curva I-V del canal mostrado en la figura A, donde se pueden observar las propiedades no rectificantes del mismo y tiene una conductancia de 120 pS.

Cuando se analiza un canal que tiene una curva I-V lineal, la g es la pendiente de la recta, mientras que para los canales que presentan curvas I-V rectificantes se calculan las pendientes a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes, obteniéndose dos valores de conductancia unitaria. Existen otros métodos para estimar g en canales rectificantes, pero no utilizados en nuestro trabajo (Hille, 1992).

4.3.3. Probabilidad de apertura

En un registro de la actividad del canal en el estado estable, llamamos probabilidad de encontrar al canal abierto o probabilidad de apertura (P_o) a la fracción de tiempo promedio en que el canal se encuentra en el estado conductor en relación al tiempo total de registro. Del mismo modo, puede definirse a la P_o como $1-P_c$, donde P_c es la probabilidad de encontrar al canal cerrado. Entonces, una P_o de 0.5 indica que el canal permanece aproximadamente el 50% del tiempo total en el estado abierto o conductor. La determinación de la P_o es un índice de la actividad del canal. Sin embargo, los canales iónicos son proteínas muy complejas y muchas veces el sistema no se encuentra en el estado estable (por ej. canales activados por voltaje o por ligando). En estos casos la P_o puede ser función del tiempo, y no es posible definirla como la fracción de tiempo en que el canal está abierto. En estos casos, la $P_o(t)$ debe ser determinada repitiendo el estímulo de voltaje o ligando varias veces y midiendo la fracción de ocasiones en que el canal se abre a tiempo t (Colquhoun y Sigworth, 1995).

II. HIPÓTESIS

El Na^+ y el Cl^- son el principal catión y anión extracelular y juegan un papel central en la generación de la presión osmótica y determinación del volumen del líquido extracelular. En el caso particular de la placenta humana, existen distintos procesos de transporte a través del sinciotrofoblasto (SCT) que están acoplados al movimiento de Na^+ y Cl^- a través de las membranas celulares y por lo tanto debe mantenerse una concentración intracelular adecuada de estos iones que permita la correcta nutrición del feto (Johansson y col., 2000).

Se han caracterizado varios canales iónicos en la membrana apical del SCT de placenta humana (Clarson y col., 2001; Riquelme, 2006; Llanos y col., 2002; Faller, 1995; Mylona, 1996; Moreau y col., 2003; Bernucci y col., 2006; Gonzalez-Perret y col., 2002; Page y col., 2003; Driver y col., 2003; Kibble y col., 1996, del Mónaco y col., 2009), pero su papel en los procesos fisiopatológicos es poco conocida.

El SCT, por su irregular superficie y por ser un sincicio ofrece dificultades para el estudio de los canales con las técnicas de *patch clamp*, de manera que los estudios electrofisiológicos deben ser hechos en líneas celulares. Por otro lado no nos fue posible obtener placentas de manera regular, y además no contamos con un área de bioseguridad para el cultivo de tejido humano. Debido a estas dificultades decidimos utilizar la línea celular BeWo para realizar nuestros estudios.

La línea BeWo fue obtenida de un coriocarcinoma humano y establecida en cultivos continuos. Las células presentan propiedades morfológicas y bioquímicas similares a las descritas en placenta durante el último trimestre de embarazo. Expresan gonadotropina coriónica, progesterona, estrógenos y lactógeno placentario, y los sistemas de transporte que expresan se corresponden con los reportados en el trofoblasto humano normal. Por lo tanto constituyen un buen modelo para el estudio de los mecanismos de transporte placentario. Si bien la línea ha sido creada hace ya varias décadas, la reproducibilidad en los resultados y estabilidad de las mismas compensan la desventaja de no trabajar en células de cultivo primario de placenta (Patillo y Gey, 1968; Moreau y col., 2003).

Hemos demostrado, en la línea celular BeWo, la expresión del canal ENaC y la presencia de corrientes mediadas por este canal cuando se estimula con aldosterona (del Mónaco y col., 2006; del Mónaco y col., 2008). Estos resultados nos indican que en las células BeWo el ENaC es funcional y podría cumplir una importante función reguladora en la placenta, para el mantenimiento de la homeostasis de sodio entre la madre y el feto. El ENaC, al igual que el canal sensible al ácido (ASIC), pertenece a las degenerinas, una superfamilia que codifica proteínas que intervienen en procesos biológicos como la nocicepción, sentido del gusto salado y táctil, homeostasis del sodio, mecanotransducción y migración celular, este último punto es de particular interés para nosotros como se verá a continuación (Drummond y col., 2007). La actividad del ENaC es modificada por hormonas y proteasas que regulan su expresión y número y lo activan, con un sistema regulador muy ajustado a las necesidades fisiológicas (Kleyman y col, 2009; Carattino y col., 2008). En particular, la aldosterona modifica el número y la actividad del ENaC por diversos mecanismos que incluyen la metilación de la subunidad β del canal (Edinger y col., 2006) y esto nos brinda la oportunidad para su estudio en la migración (ver más adelante).

Como se comentó más arriba existen evidencias que el ENaC es un canal iónico que participa en la mecanotransducción y migración celular por su relación con el citoesqueleto. El ENaC se asocia a la actina y es regulado por la misma (Cantiello y col., 1995), siendo el extremo C-terminal de la subunidad α -ENaC la zona de unión a la F-actina (Mazzochi y col, 2006). Diversos grupos de investigación demostraron que el ENaC participa en la migración de células normales y tumorales (Chifflet y col., 2005; Grifoni y col., 2006, del Mónaco y col., 2009). La migración es iniciada por la protusión de la membrana celular en el frente de avance cuando se polimerizan los filamentos de actina del lamelipodio en respuesta a numerosos factores, entre ellos, la activación de canales iónicos y cambios en el volumen. Existe una dependencia mutua entre el citoesqueleto y el volumen celular porque la habilidad de la célula para controlar su volumen por cambios de tonicidad es regulada por los filamentos de actina y abolida

cuando no se permite su polimerización; a su vez los cambios en el volumen influyen en el estado de los filamentos de actina (Yamaguchi y col., 2007). El balance de los movimientos de cargas opuestas por el transporte iónico permite junto con los movimientos de agua el cambio de volumen y crea el medio óptimo para el estado de los filamentos de actina y el resto de las proteínas del citoesqueleto que intervienen en la migración celular (Kapoor y col., 2009). Cambios en el volumen celular, en la presión hidrostática y estiramiento celular regulan el ENaC, y por su relación con el citoesqueleto y las proteínas asociadas al mismo, podría ser el nexo entre estímulos mecánicos y la migración celular (Drummond y col., 2007).

En los epitelios, el canal ENaC se colocaliza con frecuencia con canales aniónicos y también es regulado por el canal de cloruro CFTR (Rubenstein y col., 2011). La relación entre ellos parece depender del tejido estudiado; así, en las vías aéreas, la presencia o activación del CFTR se asocia a una menor actividad del ENaC, mientras que en las glándulas sudoríparas el ENaC es activado. Por otro lado el CFTR, presente en la placenta humana (Mylona y col., 1996), también regula el canal de cloruro con rectificación saliente ORCC, probablemente por un mecanismo que facilita la liberación de ATP fuera de la célula, lo cual estimula al ORCC vía un receptor purinérgico (Schwiebert y col., 1998).

Ya hemos visto los puntos relacionados al Na^+ y ahora es el turno para el Cl^- . Se ha demostrado que cambios en el volumen celular mediados por canales de Cl^- están involucrados en la migración celular, como también existen cambios del volumen durante el proceso de proliferación celular. El CFTR, que también tiene una participación en la migración de células epiteliales (Schiller y col., 2010), y el ORCC, serían candidatos del efecto sobre el volumen celular. Estos datos indican que los iones extracelulares más abundantes participarían en la proliferación y migración celular (Habela y col., 2007).

En resumen, cambios en el volumen celular que modifican el citoesqueleto subyacen en la migración y la proliferación celular y estos cambios son debidos a

movimientos de iones mediados por canales iónicos como de cloruro y sodio, en particular el ENaC, siendo este último altamente regulado por la aldosterona entre otros factores. En los epitelios los canales de sodio se colocan con los de cloruro, en particular, CFTR y ORCC, existiendo una regulación compleja por parte del CFTR sobre los otros dos. A esta relación fisiológica entre los canales iónicos y la migración y proliferación celular se agregan: 1) el ENaC es un mecanotransductor y se asocia en forma física con proteínas del citoesqueleto; 2) en la preeclampsia (ver más adelante) se observa una defectuosa migración del trofoblasto; 3) las mujeres con preeclampsia tienen valores plasmáticos de aldosterona reducidos en relación a las mujeres sanas.

La posible regulación de las proteínas estudiadas en el SCT, encargadas del transporte de sodio y cloruro, avalaría nuestra idea del posible control del proceso de proliferación y migración celular en placenta humana y sugiere la posibilidad de que sufran modificaciones mediante acción hormonal.

En base a estas evidencias, nuestra hipótesis general de trabajo es que la aldosterona ejerce un efecto positivo sobre la migración de células trofoblásticas por medio de un aumento en la actividad del ENaC. Los canales ORCC y/o CFTR, se expresan y son funcionales en el tejido, presentando efectos sobre la proliferación celular, y junto con el ENaC, contribuyen al equilibrio entre los movimientos de cargas positivas y negativas requeridos para los mecanismos involucrados en la migración de estas células.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO

Dada la información presentada hasta el momento expuesta en el capítulo de introducción e hipótesis, el objetivo general de este trabajo consiste en estudiar la expresión y funcionalidad de los canales iónicos, en particular ORCC, ENaC y CFTR y su participación en los procesos de migración y proliferación de células BeWo. Se emplean técnicas de biología molecular, electrofisiológicas (*patch clamp*) y de reparación de la herida.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar la presencia de corrientes de cloruro en células BeWo por la técnica de *patch clamp*, evaluando las corrientes totales (célula entera), analizando curvas corriente-voltaje, y el comportamiento luego de la utilización del bloqueante de canales de cloruro DPC.
- Caracterizar la cinética de los canales de cloruro (canal único) e identificarlos en base a los siguientes datos: curvas I-V, perm-selectividad, conductancias, y probabilidad de apertura. Se utilizan bloqueantes de canales de cloruro, como DPC y glibenclamida.
- Analizar si algún canal de cloruro presente en las células BeWo es compatible con el CFTR, estudiando además el bloqueo específico de corrientes totales por CFTR_{inh}-172 y la activación por forskolina.
- Estudiar la expresión de CFTR en células BeWo con técnicas de biología molecular, para conocer si los patrones de expresión del canal se corresponden con los observados en placentas normales.

- Evaluar la participación de los canales de cloruro en la proliferación de las células BeWo, utilizando bloqueantes generales y específicos de los mismos, mediante ensayos de proliferación celular.
- Estudiar la participación del canal ENaC, en la migración de células trofoblásticas, e indagar en la regulación de este proceso por la aldosterona con inhibidores de la metilación y dadores de metilos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

La línea celular BeWo (American Type Culture Collection, EEUU) se mantuvo en medio de cultivo HAM'S F12 (Gibco BRL, Life Technologies, NY, EEUU) con el agregado de 10 % de suero fetal bovino (SFB; Natocor Biotechnology, Córdoba, Argentina), 2 mM de L-glutamina (Sigma, Missouri, USA), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina. Las células BeWo crecen en monocapa, siendo tripsinizadas una vez por semana con tripsina-EDTA 0.25 % (Gibco BRL, Life Technologies, NY, EEUU), e incubadas a 37°C en aire húmedo y una concentración de CO₂ de 5 %. El medio de cultivo se renovó cada tres días.

Se utilizó una línea celular de colon (T84) (American Type Culture Collection, EEUU) como control positivo de la expresión del canal CFTR (Prince y col., 1993). Las mismas fueron mantenidas en medio de cultivo HAM'S F12, suplementado con 10 % SFB, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Obtención de los registros eléctricos

Las células BeWo fueron crecidas en discos de vidrio. Inmediatamente antes de su uso fueron lavadas con abundante solución de baño y transferidas a una cámara de registro, montada en un microscopio binocular invertido Olympus en una mesa antivibratoria. Se determinó la actividad eléctrica de las células utilizando las diferentes configuraciones que ofrece la técnica del *patch clamp*. Se obtuvieron registros de corrientes totales y de canales aislados mediante las configuraciones de célula entera (*whole cell*) y de canal único (*single channel – inside out* y *cell attached*), respectivamente.

Corrientes totales. Se utilizó un amplificador List L/M-EPC7 (List Medical Electronics, Darmstadt, Alemania) con una resistencia de *feedback* de 1 GΩ. La señal eléctrica se digitalizó a 5 kHz y se filtró a 1 kHz utilizando el paquete computacional

PCLAMP v.8.2 (Molecular Devices, Union City, CA, EE.UU). La configuración de célula entera se estableció mediante microelectrodos de vidrio borosilicato (World Precision Instruments Inc., Florida, EE.UU), contruidos con un estirador de pipetas horizontal (P-97, Sutter Instruments Co., EE.UU) y con una resistencia final de 2-4 M Ω una vez llenados con la solución de pipeta. Las resistencias en serie (R_s) se compensaron utilizando el circuito analógico del amplificador.

Para la medición de *corrientes macroscópicas de cloruro* el protocolo utilizado aplicó pulsos desde -80 a 100 mV en pasos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de 0 mV (Anderson y col., 1991). *Soluciones:* solución de pipeta (intracelular) (mM): 125 CsCl, 2 MgCl₂, 10 Hepes-Na, 0.2 BAPTA, pH 7.4 (ajustado con NaOH). Solución de baño (extracelular) (mM): 150 NaCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 Hepes-Na, pH 7.4 (ajustado con NaOH). La osmolaridad de las soluciones se midió con un osmómetro de presión de vapor (Wescon 5100B, Inc., Utah) y fue de 260 \pm 5 mOsm/l para las solución de CsCl, 292 \pm 6 mOsm/l y para la solución de NaCl.

Para la medición de *corrientes de ENaC* se aplicó un protocolo que permitió prevenir la acumulación de Na⁺ intracelular. La célula acumula Na⁺ tan rápido como la Na⁺-K⁺-ATPasa no pueda reciclar efectivamente la carga de Na⁺. La acumulación de Na⁺ intracelular a su vez conduce a la autoinhibición de ENaC como se describió para una amplia variedad de tejidos, y/o rundown (agotamiento de los canales iónicos, relacionado con la disminución en la concentración de moléculas citoplasmáticas importantes para la modulación y mantenimiento de la actividad del canal). Para evitar la acumulación de Na⁺ intracelular es necesario reducir la fuerza electroquímica de entrada del catión fijando el voltaje de membrana a valores tales que minimicen las corrientes de Na⁺ a través de ENaC durante el tiempo que duran los experimentos. En este caso se aplicaron pulsos desde -140 a 40 mV en pasos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de 0 mV (Segal y col., 2002).

Soluciones: Solución de pipeta (intracelular) (mM): 102 K-Gluconato, 6 KCl, 4 MgCl₂, 3 EGTA, 10 Hepes, 5 Sucrosa (pH 7.4). Solución de baño (extracelular) (mM): 105

NaCl, 4 KCl, 3 CaCl₂, 3 MgCl₂, 10 Hepes y 40 Sucrosa 40 mM (pH 7.4). La osmolaridad de las soluciones fue 287 ± 9 mOsm/l para la solución de K-gluconato y 305 ± 2 mOsm/l para la solución de NaCl.

En ambos estudios se realizó un intervalo de 10 ms entre cada pulso. Los gráficos de corriente en función del voltaje aplicado se obtuvieron a partir de las corrientes en el estado estacionario y se expresaron como densidades de corriente (corriente por unidad de capacitancia celular). La capacitancia de membrana (C_m) se determinó aplicando un pulso despolarizante de 10 mV durante 100 ms, a partir del potencial de mantenimiento. Las corrientes obtenidas bajo estas condiciones se ajustaron a una función exponencial y se obtuvo la constante de tiempo (τ) y la resistencia en serie (R_s), calculándose la capacitancia según $C_m = \tau/R_s$. Las curvas corriente- voltaje (I-V) representan la relación entre la amplitud de la corriente respecto del potencial aplicado. La pendiente de los datos en un rango de potencial definido nos permite estimar la conductancia de corrientes totales (G). Corrientes y potenciales se expresan usando las convenciones fisiológicas, donde un potencial negativo indica una polaridad negativa en el interior celular y una corriente entrante (mostradas en los gráficos como deflexiones hacia abajo) corresponde a un flujo de aniones saliendo de la célula o a un flujo de cationes entrando.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-24°C).

Corrientes de canal único. La actividad de los canales iónicos de cloruro se registró en la configuración *inside-out* mediante un amplificador Warner PC-501A (Warner Instruments, Hamden, USA) y con una resistencia de *feedback* de 10 G Ω . En algunos casos se obtuvieron registros bajo condiciones de *cell-attached*. Los microelectrodos de vidrio borosilicato fueron estirados y pulidos con calor bajo una microforja, resultando en una resistencia de 5-10 M Ω una vez llenados con la solución de pipeta. Las señales eléctricas se digitalizaron a 5 KHz y se filtraron a 2 KHz utilizando el paquete computacional PCLAMP v.8.2 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). Los registros de canal único fueron filtrados adicionalmente a 750 KHz para una mejor

observación gráfica de los mismos, pero no para su análisis y obtención de datos. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-24°C).

En las curvas I-V, la pendiente de los datos en un rango de potencial definido nos permite estimar la conductancia de canal único (g) definida en pS. Las corrientes fueron medidas con pulsos entre 100 y -100 mV, retornando a 0 mV en cada aplicación (Anderson y col., 1991). Se incluyeron registros con amplitudes de corriente mayores a 0.5 pA, por el nivel de ruido electrónico de nuestro equipo.

Los datos fueron corregidos por el potencial de juntura en el electrodo del baño de referencia posteriormente a los reemplazos de la solución del baño, dada la diferente movilidad de los iones involucrados. Se utilizó un programa computacional diseñado por el Dr. Peter Barry (Universidad de Nueva Gales del Sur, Australia). El texto y las figuras de los experimentos de *inside-out* muestran los potenciales de membrana ($V = V_{\text{baño}} - V_{\text{pipeta}}$) corregidos como corresponde. Las relaciones de permeabilidad (P_X/PCl) se estimaron a partir del cambio del potencial de reversión (ΔE_r) inducido por el reemplazo del Cl^- externo por otro anión X (gluconato, fluoruro (F^-) o yoduro (I^-)), utilizando la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) modificada:

$$\Delta E_r = E_{r(X)} - E_{r(Cl)} = 58. \log \frac{P_X [X]_i + P_{Cl} [Cl]_i}{P_{Cl} [Cl]_o}$$

donde ΔE_r es el cambio en E_r inducido por el reemplazo de 140 mM del Cl^- interno (solución de baño) por el anión X (gluconato, F^- o I^-); $E_{r(Cl)}$ es el potencial de reversión en presencia de Cl^- .

Los histogramas de probabilidad de apertura (P_o) fueron construidos a partir de registros de más de 1 minuto de duración y en los cuales se observó la actividad de un solo canal. La P_o se estimó utilizando una rutina del software PCLAMP v.8.2 a partir de los niveles de apertura completa.

Solución de pipeta (intracelular) (mM): 140 NMDG-Cl, 5 KCl, 2.5 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 Hepes (pH 7.4). La *solución de baño (extracelular)* fue la misma que en la pipeta.

Para los experimentos de reemplazo, NMDG-Cl en el baño fue reemplazado por NaCl, Na-gluconato, Na-ioduro or Na-fluoruro 140 mM.

En el estudio del canal CFTR, la adición de forskolina a la solución de baño fue empleada para inducir la actividad de canales iónicos en la configuración de *cell attached*, en la que la pipeta se encuentra sellada a la membrana de la célula intacta. Luego de 10 minutos de exposición a la droga el parche fue escindido (configuración *inside out*). El DPC y la glibenclamida se agregaron a la solución de baño luego de escindido el parche (*inside-out*).

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (20 - 24 °C).

RT-PCR

Para la detección de la expresión del ARNm de CFTR en las células BeWo y T84 se aisló el ARN total de las mismas utilizando el kit comercial *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Wisconsin, EEUU). La transcripción reversa se llevó a cabo a partir de 5 µg del ARN total obtenido, utilizando la transcriptasa reversa proveniente del virus de la leucemia murina (MMLV), primers oligo (dT)₁₅ y 400 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), durante 60 minutos a 42°C, (Promega).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Promega) se realizó utilizando ciclos de 94°C por 60 segundos, 59°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los ciclos se repitieron 35 veces. Se utilizaron primers específicos para CFTR. A su vez se realizaron controles sin el

agregado de transcriptasa reversa para confirmar la ausencia de amplificación de ADN genómico y sin muestra templado para evaluar otras contaminaciones externas. Los controles de integridad del ADNc (ADN copia) se realizaron con oligonucleótidos que amplificaron un fragmento de la proteína β-actina.

Los productos de PCR se sembraron en geles de agarosa 1 % en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA), teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes de los mismos fueron

adquiridas con el equipo *Foto Analyst Investigator* (Fotodyne Inc., Hartland, Wisconsin, EE.UU).

Western blot

Las monocapas de células BeWo fueron lavadas abundantemente con buffer fosfato salino (PBS; Gibco BRL, Life Technologies, NY, EEUU) y las células se levantaron mecánicamente en buffer PBS (4°C) con inhibidores de proteasas (0.01 X *Protease Inhibitor Cocktail*), fenilmetanesulfonil fluoruro 0.2 mM y dithiothreitol (DTT) 0.2 mM (Sigma). La suspensión celular se centrifugó y resuspendió en buffer de lisis (NaCl 0.3 M, HEPES 25 mM, MgCl₂, 1.5 mM, EGTA 0.2 mM, Tritón X100 1 %; pH 7.4) con inhibidores de proteasas. El homogenato se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm (4°C) y se conservó finalmente el sobrenadante a -20°C. La concentración final de proteínas en los sobrenadantes se determinó utilizando el método de Bradford y realizando una curva de calibración con seroalbúmina bovina.

Para los estudios de SDS-PAGE se disolvieron 75µg de proteínas de células BeWo en buffer de corrida (SDS 4 %, Tris-ClH 0.125 M - pH 6.8, ditiotretitol 0.2 M, bromofenol 0.02 % y glicerol 20 %) y se calentaron por 10 minutos a 100°C. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida al 6 % (para detectar CFTR) y al 8 % (para detectar ENaC) y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Gran Bretaña). La eficiencia de la transferencia se controló mediante tinción de las proteínas con rojo Ponceau (Sigma).

Posteriormente las membranas se bloquearon por 60 minutos a temperatura ambiente, con 2 % p/v de leche en polvo descremada en buffer Tris Salino - 0.1 % Tween (T-TBS) e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios disueltos en T-TBS con 0.5 % p/v de seroalbúmina bovina.

CFTR. Para detectar CFTR se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra los aminoácidos 1-182 que mapean el extremo N- terminal del CFTR (H-182, Santa Cruz Biotechnology) por 2 h con una dilución 1/2500 del anticuerpo, y otro

anticuerpo de conejo contra un epítoto citoplasmático del CFTR en el extremo C-terminal (Alomone labs Ltd) en una dilución 1:2500 toda la noche. Se utilizó la línea celular T84 como control positivo de la expresión de CFTR, con este anticuerpo, en las mismas condiciones.

ENaC. Para detectar las subunidades del canal ENaC se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra los aminoácidos 131 al 225 de la subunidad α -ENaC humana, y los aminoácidos 411 al 520 de la subunidad γ -ENaC humana; y un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra los aminoácidos 271 al 460 de la subunidad β -ENaC humana (Santa Cruz Biotechnology Inc., California, EE.UU). Al otro día, las membranas fueron lavadas con T-TBS e incubadas 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo ó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, según corresponda, conjugados con peroxidasa, (dilución 1/5000; Vector Lab, California, EE.UU). Luego las membranas fueron lavadas y la inmunoreactividad se detectó por el método de quimioluminiscencia, utilizando el reactivo ECL (Amersham Biosciences, Argentina).

Los controles de carga en los experimentos de Western blot se realizaron exponiendo a las membranas a un anticuerpo primario de ratón dirigido contra la subunidad α de la tubulina o actina (Santa Cruz) y siguiendo el mismo protocolo de procesamiento descrito anteriormente. Cada experimento de Western blot fue repetido al menos 3 veces.

Estudios de migración celular (*wound healing*)

Para el estudio de la *participación de ENaC* en la migración celular, se sembraron 1×10^5 células/cm² en una placa de 24 pocillos y se cultivaron con medio HAM'S F12 suplementado con 10 % SFB hasta obtener una monocapa en confluencia. Luego, un grupo de pocillos se tratan con aldosterona 100 nM toda la noche. Al día siguiente se realiza una herida en la monocapa, con un tip de 200 μ l, logrando una herida de ~ 400 μ m. Se lavaron las células desprendidas con medio de cultivo sin SFB. A partir

de ese momento, considerado como tiempo 0, las células se cultivan en estufa a 37°C en medio HAM'S F12 - 1 % SFB para atenuar la proliferación celular con los distintos tratamientos cuando sea apropiado. El grupo control se realizó sin estímulo al que se les agregó el solvente utilizado para diluir las drogas. Se tomaron fotografías en los tiempos 0 y 6 horas después de realizada la herida. En cada imagen se calculó el ancho de la herida, utilizando el programa ImageJ 1.39 (Image Processing and Analysis in Java, NHI, Maryland, EEUU), y los resultados se expresan como porcentaje de reinvasión de la herida con respecto al tiempo 0 (media \pm desvío estándar). Se realiza una marca en cada pocillo para medir el mismo lugar en todo momento.

Ensayo de proliferación

La proliferación celular se determinó utilizando el ensayo de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma). Las células BeWo son sembradas en placas de 96 pocillos.

A) Para el estudio de los *canales de cloruro en la proliferación celular*, se deja crecer las células durante 24 horas con medio de cultivo HAM'S F12 suplementado con 10 % SFB. Se agregan los distintos inhibidores de canales de cloruro y a las 72 h se agregan 20 μ l de MTT (5 mg/ml en buffer PBS) a cada pocillo y se continúa la incubación a 37°C. El precipitado de MTT-formazan se disuelve posteriormente en 100 μ l de DMSO.

Se mide la densidad óptica de los pocillos a 570 nm (OD_{570nm}) en una lectora de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) y la proliferación celular de cada tratamiento se calcula como porcentaje del control: OD_{570nm} de cultivos tratados/ OD_{570nm} de cultivos control x 100, (expresados como media \pm DS).

B) Para evaluar la *contribución de la proliferación en los ensayos de migración celular*, las células se dejan crecer durante 24 horas con medio de cultivo HAM'S F12 suplementado con 1 % SFB. Se repiten los tratamientos mencionados en los estudios de migración celular y se observan los resultados a las 6 horas. 4 horas antes de cumplidos

los tiempos de incubación con las drogas correspondientes, se agregan 20 μ l de MTT (5 mg/ml en buffer PBS) a cada pocillo y se continúa la incubación a 37°C y se calcula la proliferación celular de cada tratamiento como porcentaje del control.

Viabilidad celular (ensayo de exclusión de azul tripano)

Se siembran las células en placas de 96 pocillos y se las deja crecer hasta confluencia. Se tripziniza la monocapa de células y se resuspende con 20 μ l de colorante azul tripano 0.5 % disuelto en agua destilada. El recuento de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer. La viabilidad celular se calculó a partir del número de células que excluyeron el colorante azul tripano (por tener la membrana intacta) respecto al número total de células.

Oligonucleótidos sentido y antisentido

En los ensayos de reparación de la herida y Western blot en el estudio de la participación de ENaC en el proceso de migración celular, y su expresión, las células se pretrataron con oligonucleótidos complementarios (antisentido) o idénticos (sentidos) a la secuencia de iniciación α -ENaC incluyendo el codón de iniciación ATG, sintetizados como oligonucleótidos fosforato. Las secuencias fueron las siguientes: α -sentido 5'-TACCAGGTCTCATGGA-3' y α -antisentido 5'-TTCCCCTCCATGAGA-3' (Ma y col, 2004). Las células fueron pretratadas con medio 1 % de SFB conteniendo 10 μ M de oligonucleótidos sentido y antisentido por 24 h y 100 nM de aldosterona por 12 h. Los tratamientos control fueron llevados a cabo sin la estimulación con aldosterona, y se realizó también un tratamiento con aldosterona pero sin oligonucleótidos. Los oligonucleótidos fueron agregados varias veces en el medio de cultivo cada 6 h para asegurar su presencia en la concentración adecuada. En los estudios de migración celular, cuando se realizó la herida en la monocapa, la dosis de oligonucleótidos se mezcló con la cantidad apropiada de reactivo LipofectAMINE™ (GIBCO BRL, Life

Technologies) para favorecer la entrada en las células. Utilizamos este abordaje debido a que Forbes y col. (2009) demostraron que los siRNAs tienen muy poco efecto en la disminución de la expresión de la proteína en las células BeWo.

Inmunocitoquímica

Se utilizó la técnica de inmunofluorescencia para confirmar la expresión de ENaC en el borde de la herida. Las células BeWo fueron crecidas en discos de vidrio y se cultivaron con medio HAM'S F12 hasta una concentración celular óptima. El medio de cultivo fue suplementado con 100 nM de aldosterona por 12 h, y se realizaron las heridas como en los ensayos de reparación de la herida. Luego del lavado en medio de cultivo, las células se fijaron con una solución de formaldehído 3.7 % y sucrosa 0.12 M en 0.05 M

de buffer PBS, durante 10 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% en PBS por 15 minutos; todo a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con 3 % de seroalbúmina bovina (BSA) en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron toda la

noche con los anticuerpos para las tres subunidades de ENaC mencionados previamente. Luego las células se lavaron con PBS y fueron incubadas 1 h con los anticuerpos secundarios anti-conejo o ratón conjugados con isotocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Tucker, GA). Después de lavar las muestras con PBS, se montaron en los portaobjetos en una solución PBS/glicerol 1:1. Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia, y las imágenes fueron tomadas con una cámara digital acoplada al microscopio. Las mismas se analizaron con el software Image 1.39. El control se llevó a cabo incubando las muestras sin anticuerpo primario.

Reactivos

La forskolina (20 μM), glibenclamida (1-1000 μM) (Alomone Labs, Israel) y el difenilamino-2-carboxilato (DPC, Sigma) (50-10000 μM), el diisotiocianatoestilbeno-2,2-ácido disulfónico (DIDS, Sigma) (50-10000 μM), el amiloride (10 μM , Sigma) y el CFTR_{inh}-172 (0.2 - 7.5 μM , Sigma) se disolvieron en DMSO. La concentración final de DMSO *per se* usada no afectó la actividad de los canales (pruebas realizadas en nuestro laboratorio sobre varias líneas celulares y con concentraciones de DMSO de hasta 0.2%, datos no mostrados).

La aldosterona (100 nM, 12 h) (Sigma) fue disuelta en etanol absoluto, y el 8Br-AMPC (100 μM , 30 min), 3-DZA (10-1000 μM , 2-5 h), y AdoMet (200 μM , 2-5 h) (Sigma) fueron disueltos en agua destilada.

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como valores medios \pm desvío estándar (DS) (n = número de determinaciones realizadas) según corresponda. Para evaluar si dos grupos de datos presentaban una diferencia significativa entre ellos se utilizó el test de Student (apareado o no apareado según correspondiera). Para comparaciones múltiples entre controles y distintos tratamientos, los datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA), seguido de un test *post hoc* (Test de Tukey o Test de Dunnet, según el caso). Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

1. CANALES DE CLORURO EN CÉLULAS BEWO DE TROFOBLASTO HUMANO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

En los epitelios, el canal de sodio ENaC se colocaliza con frecuencia con otros canales aniónicos, donde se ha demostrado una compleja regulación por el canal de cloruro CFTR (Bachhuber y col., 2005). El CFTR se localiza en placenta humana y en una línea tumoral en donde se emplearon técnicas de biología molecular (Mylona y col., 1996) y mediciones de flujo de Cl^- (Faller y col., 1995) para confirmar su expresión. Como se mencionó más arriba, el CFTR además de ser un canal aniónico es un regulador de otros canales iónicos como el ENaC y el ORCC por varios mecanismos (Kunzelman y col., 1999). Estas evidencias sugieren que CFTR y ORCC podrían estar presentes en las células BeWo. El hallazgo de ENaC en células BeWo y en explantos de placenta humana, demostrada por nuestro grupo (del Mónaco y col., 2006, 2008a, 2009), son los fundamentos para estudiar las corrientes aniónicas en estos tipos celulares. La actividad eléctrica espontánea de las células BeWo se evaluó mediante la técnica electrofisiológica de *patch clamp*. Los sistemas de transporte presentes en estas células son similares a los descritos para el trofoblasto humano normal y es por ello que han sido ampliamente utilizadas como modelo para la investigación de dichos mecanismos (Huang y col., 2001; Moreau y col., 2003; Keating y col., 2006; Ramos y col., 2008). En un primer paso, utilizamos la configuración de célula entera que ofrece el *patch clamp* que nos permite evaluar las corrientes iónicas de toda la célula.

1.1. Estudio de las corrientes basales de cloruro en células BeWo

1.1.1. Registro de corrientes totales

Se registraron corrientes totales en células BeWo cultivadas en condiciones control, en respuesta a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes. El protocolo utilizado aplicó pulsos desde -80 a 100 mV en pasos de 20 mV, desde un potencial de mantenimiento de 0 mV (figura 15.A). Este protocolo facilita el estudio de las corrientes

de cloruro entrantes de la célula (pulsos despolarizantes) en función de las soluciones empleadas en el experimento, siendo los principales componentes de la misma: CsCl 125 mM (solución intracelular) y NaCl 150 mM (solución extracelular). En este sentido, el Cl⁻ entraría a la célula, favorecido por su gradiente electroquímico, y el catión cesio, debido a su impermeabilidad a la membrana plasmática, no puede salir de la célula. A pulsos hiperpolarizantes, el Cl⁻ saldría de la célula, pero esto podría verse enmascarado por la entrada de Na⁺ a la misma, dadas las soluciones utilizadas.

Las corrientes se registraron en función del tiempo para cada pulso aplicado (Figura 15.B) y fueron normalizadas por la capacitancia de membrana (C_m), proporcional al tamaño celular. La C_m se calculó a partir de un pulso despolarizante de 10 mV desde el potencial de mantenimiento (ver materiales y métodos), siendo el valor de C_m promedio de las células BeWo de 41.0 ± 20.2 pF (n =16). Se construyó una curva de corriente-voltaje (I-V) con la densidad de corriente promedio (corriente promedio, en pA / capacitancia de membrana, en pF) obtenida en el estado estacionario (Figura 16). Las corrientes no mostraron dependencia con el tiempo y permanecieron constantes durante la aplicación de los pulsos. En la curva I-V se evidencia la falta de rectificación en las corrientes con el protocolo y soluciones utilizados.

En base a nuestras condiciones experimentales las corrientes serían transportadas por el Cl⁻ (aunque como se mencionó, no se puede descartar que el Na⁺ también podría estar entrando a la célula a pulsos hiperpolarizantes). Para asegurar esto, se realizaron experimentos con bloqueantes de canales de Cl⁻.

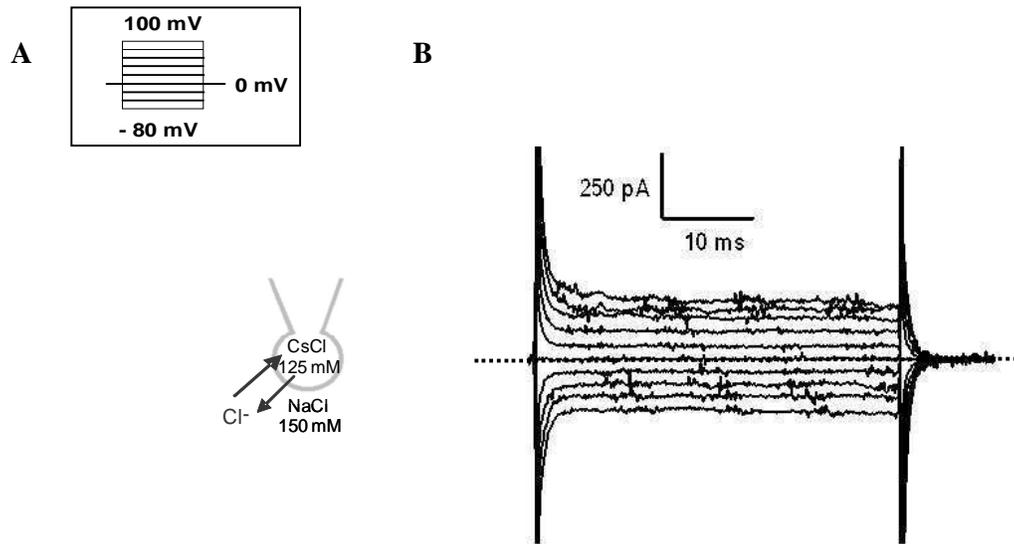


Figura 15. Corrientes totales de cloruro de células BeWo. **A.** El protocolo de estimulación consistió en una serie de pulsos desde -80 a 100 mV en pasos de 20 mV desde un potencial de mantenimiento de 0 mV. **B.** Corriente en función del tiempo, registrada en una célula, para cada pulso de voltaje aplicado. La línea punteada indica el valor 0 de corriente. A la izquierda se muestra un esquema del principal componente de las soluciones utilizadas.

El valor de conductancia macroscópica (G) en estas condiciones fue 24.5 ± 5.9 pS (n=4).

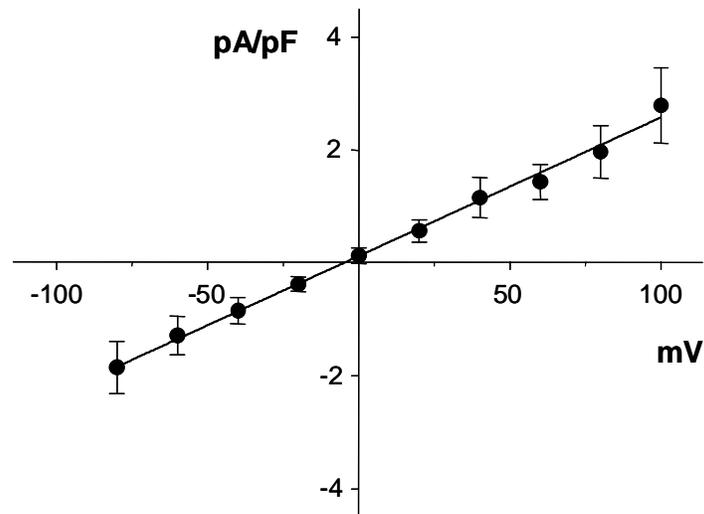


Figura 16. Relación entre la densidad de corriente (corriente por unidad de capacitancia de membrana, pA/pF, media \pm DS) y el voltaje aplicado (mV) en condiciones basales (n=4). Se observan corrientes no rectificantes entrantes de cloruro a pulsos positivos, y salientes a los pulsos negativos (también podría existir una entrada de Na⁺) debido al movimiento de estos iones por su gradiente electroquímico.

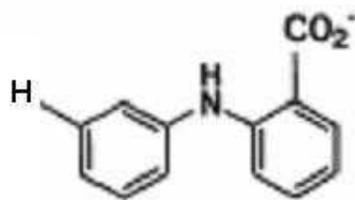
1.1.2. Inhibición de las corrientes basales por DPC

La difenilamina-2-carboxilato (DPC) (figura 17.A) es un inhibidor de canal abierto, de los canales de Cl⁻, como el CFTR y ORCC. Inhibe a CFTR de forma reversible desde el lado citoplasmático del canal. El mecanismo de bloqueo es complejo. El bloqueante aumenta el tiempo en que el canal se mantiene cerrado mayormente del lado citoplasmático y alcanza su sitio de unión en el poro del canal desde el lado intracelular y lo bloquea por oclusión del poro. ORCC es sensible al bloqueo por DPC por interacción directa o indirecta a través de CFTR (Zhang y col., 2000).

Para confirmar que las corrientes totales observadas se deben al movimiento de Cl⁻, utilizamos el inhibidor DPC en nuestro sistema. La figura 17.B muestra un curso temporal de corrientes luego de la aplicación de un pulso de 80 mV en una célula BeWo cuando se agregaron 500 μ M de DPC a la solución de baño. Encontramos que entre los

5-10 minutos de exposición con DPC se alcanzaba la inhibición máxima de las corrientes observadas. Estos datos nos permitieron estimar el tiempo de incubación de la droga para obtener el máximo efecto inhibitorio de la misma utilizado en los experimentos posteriores.

A



B

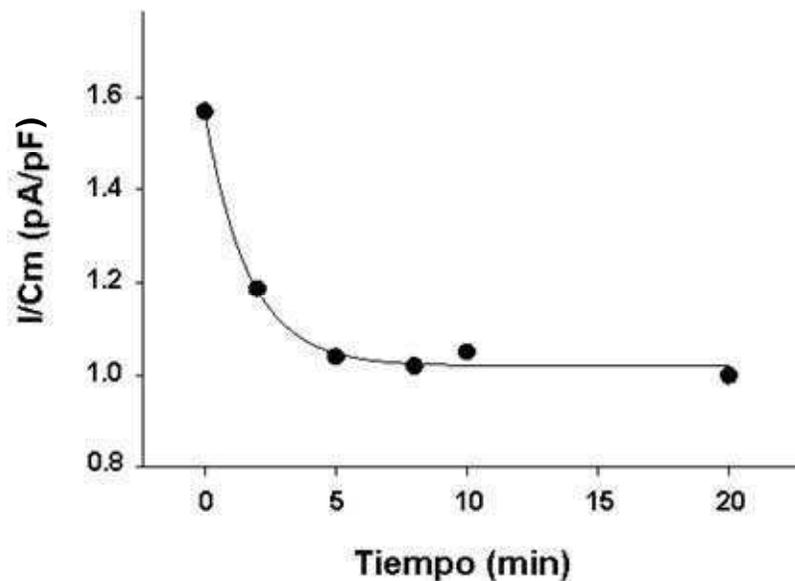


Figura 17. A. Estructura química del DPC. B. Curso temporal del tratamiento con DPC con un pulso de 80 mV normalizado a la capacitancia de membrana. El máximo de inhibición se alcanzó entre los 5 y 10 minutos de exposición al bloqueante.

En las células tratadas con DPC se observó una disminución significativa de las corrientes en todos los pulsos de voltaje aplicados. En la figura 18 se muestran registros de corrientes totales en función del tiempo, obtenidas al inicio del experimento y 10 minutos después de la aplicación de 500 μM de DPC. En estos experimentos como en todos los demás, la droga se aplicó una vez estabilizadas en su amplitud las corrientes basales. Es evidente que una fracción de las corrientes en las células BeWo fue inhibida por DPC (500 μM) confirmando la presencia de canales de Cl^- en estas células ($p < 0.05$, $n=3$). El máximo porcentaje de inhibición observado fue $\sim 70\%$ a -80 mV.

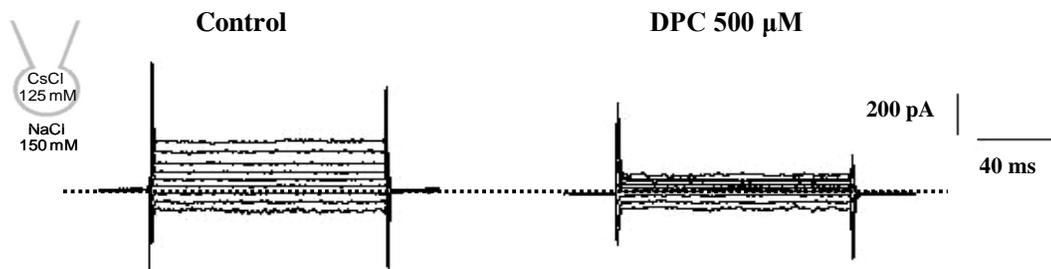


Figura 18. Trazos de corrientes totales en condiciones control y en presencia de DPC 500 μM . Se utilizó el mismo protocolo que en los registros previos. El esquema muestra el principal componente de las soluciones intra y extracelular. El experimento se repitió tres veces.

La curva I-V promedio correspondiente se muestra en la figura 19. Comprobamos una disminución en las corrientes con respecto al control para cada pulso aplicado. Con los pulsos -20 y 20 mV las corrientes son muy pequeñas y esto junto al ruido electrónico propio del sistema de registro no permiten medir con claridad la amplitud de corriente. Los valores de conductancia G en ausencia y presencia de DPC fueron: 25.2 ± 1.6 pS y 10.4 ± 1.1 pS, respectivamente ($p < 0.05$, $n=3$).

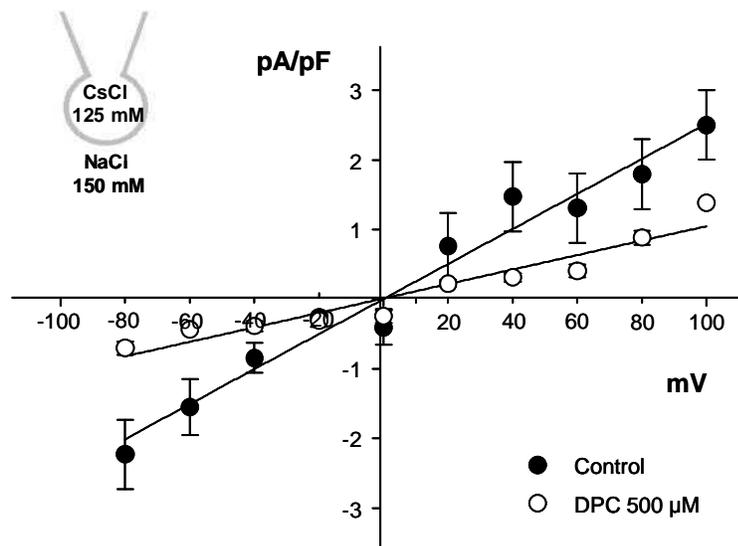


Figura 19. Tratamiento con DPC en células BeWo. Relación entre la densidad de corriente (pA/pF, media \pm DS) y el voltaje (mV) antes (●) y diez minutos después de la aplicación de DPC 500 μ M en la solución del baño (○). Se nota una disminución significativa de las corrientes con DPC respecto a los controles.

1.2. Canal de cloruro con rectificación saliente

1.2.1. Actividad eléctrica de las células BeWo

Para indagar el comportamiento individual de los canales de cloruro, utilizamos la técnica de *patch clamp* en la configuración de canal único.

Estudiamos la actividad iónica midiendo corrientes unitarias en respuesta a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes bajo condiciones de *patch clamp (inside-out)*. Como se observa en la figura 20, uno de los canales encontrados se caracteriza por una disparidad entre las amplitudes de las corrientes entrante y saliente en una solución simétrica libre de Na^+ , reemplazado por NMDG, un catión de gran tamaño que no

permea la célula. De esta manera nos aseguramos que las corrientes generadas se deban a las producidas por el movimiento de Cl^- .

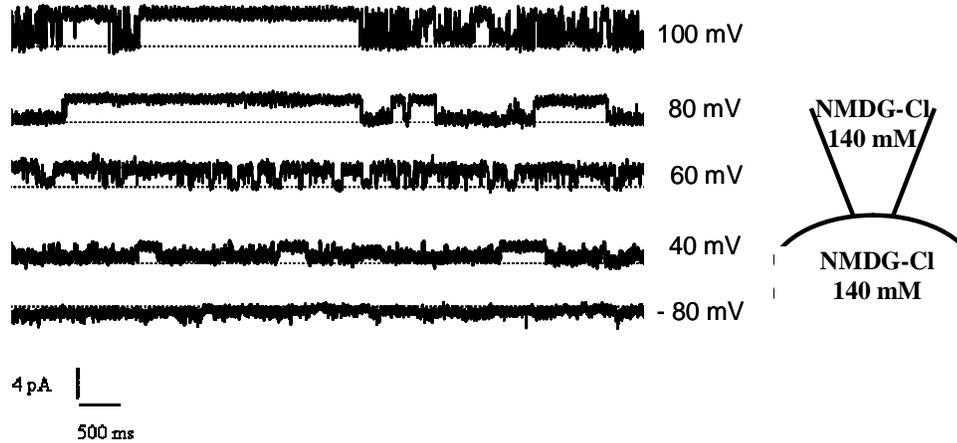


Figura 20. La actividad del canal en un parche de membrana en la configuración de *inside-out*. Se utilizó una solución simétrica de 140 mM de NMDG-Cl a ambos lados de la membrana. La línea punteada indica el estado cerrado del canal. Cada trazo contiene 5 seg de registro. El esquema a la derecha muestra el componente principal de las soluciones intra y extracelular.

La figura 21 muestra la curva I-V, en donde se evidencia una relación no lineal entre la corriente y el voltaje aplicado, con una conductancia unitaria promedio desde 15.1 ± 7.4 pS (n=10) con potenciales negativos (-20 a -100 mV), a 48.0 ± 11.9 pS (n=12) con potenciales positivos (20 a 100 mV), indicando una rectificación saliente.

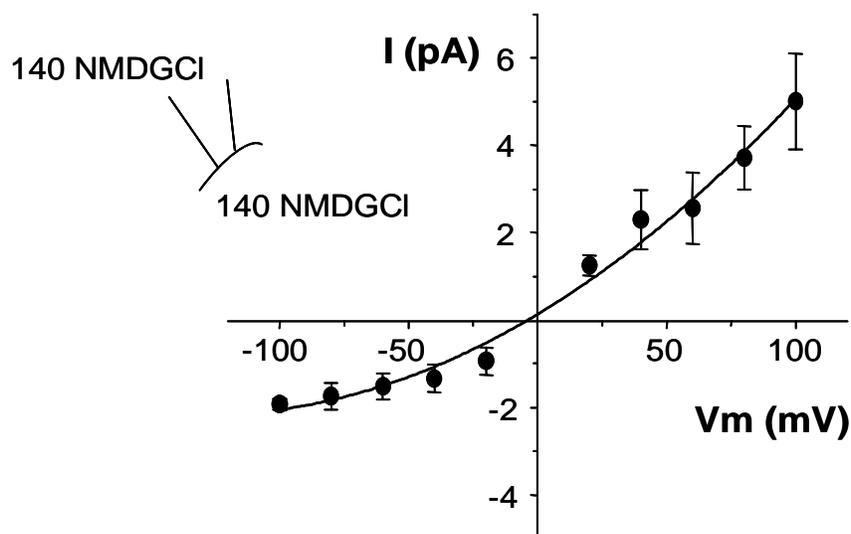


Figura 21. Relación promedio de corriente - voltaje (I-V) en soluciones libres de Na⁺. Los datos se obtuvieron a partir de registros adquiridos en la configuración de *inside out* y en una solución simétrica de 140 mM de NMDG-Cl a ambos lados de la membrana (n=12, media \pm DS). Las curvas muestran rectificación saliente.

El potencial de reversión (E_r) es el potencial aplicado en el cual no hay movimiento neto del ión a través del canal debido a que el potencial electroquímico es igual a ambos lados de la membrana. Es un valor específico para cada canal iónico y depende de las concentraciones del ión extra e intracelular. En nuestro caso el E_r obtenido de doce parches fue -2.3 ± 5.5 mV. Este valor es consistente con el potencial de equilibrio de Nernst teórico para una corriente selectiva de Cl⁻ en concentraciones de Cl⁻ simétricas usadas a ambos lados de la membrana.

En algunos parches, la actividad del canal pudo ser registrada en la configuración de *cell attached* antes de la escisión del parche. Esto nos permitió evaluar si el canal está activo al potencial de reposo de membrana (E_m). La figura 22 muestra una corriente con rectificación saliente con un E_r de 12.7 ± 0.6 mV (n=6). En esta configuración, el potencial de membrana se pudo estimar a partir de $V_m = E_m - (V_{\text{baño}} - V_{\text{pipeta}})$. La curva I-V hipotética fue superpuesta a la curva obtenida experimentalmente, corrigiendo el voltaje aplicado al potencial de reposo de membrana esperado de las células BeWo (E_m = -50 mV) (Greenwood y col., 1996).

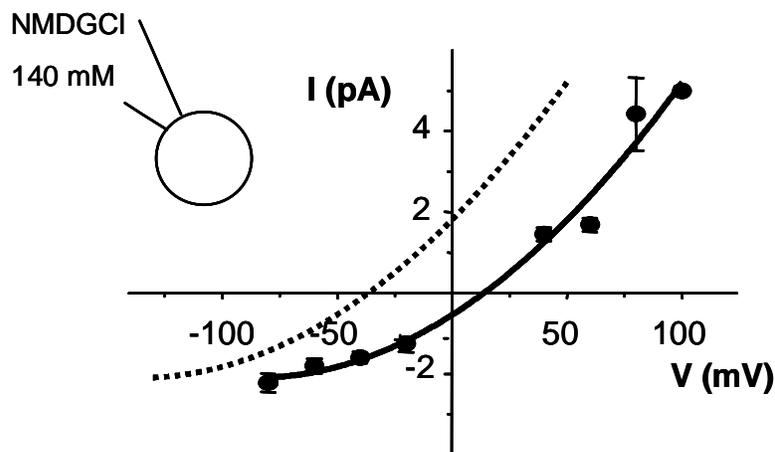


Figura 22. Relación I-V de corrientes promedio registradas en la configuración de *cell-attached* antes de la escisión del parche (n=6). La línea punteada representa la curva I-V hipotética corrigiendo el voltaje aplicado ($V_{\text{baño}} - V_{\text{pipeta}}$) al potencial de membrana esperado de las células BeWo ($E_m = \sim -50$ mV).

La técnica del *patch clamp* en la configuración de canal único nos permite estudiar una característica de los canales que es la probabilidad de apertura (P_o). La P_o representa la fracción de tiempo en que el canal está abierto con respecto al tiempo total de registro y se la define, para un modelo simple de dos estados, como:

$$P_o = (O/O+C)$$

donde, O y C corresponden a los tiempos totales en que el canal se encontró en el estado abierto o cerrado, respectivamente. El cálculo de la P_o del canal se realizó utilizando la rutina de cálculo de P_o del programa pCLAMP, en donde se analizaron los registros con un sólo nivel del canal abierto. Los valores de P_o , determinados a varios potenciales de membrana (figura 23), indicaron que la actividad del canal en condiciones control aumentó a potenciales positivos (n=6).

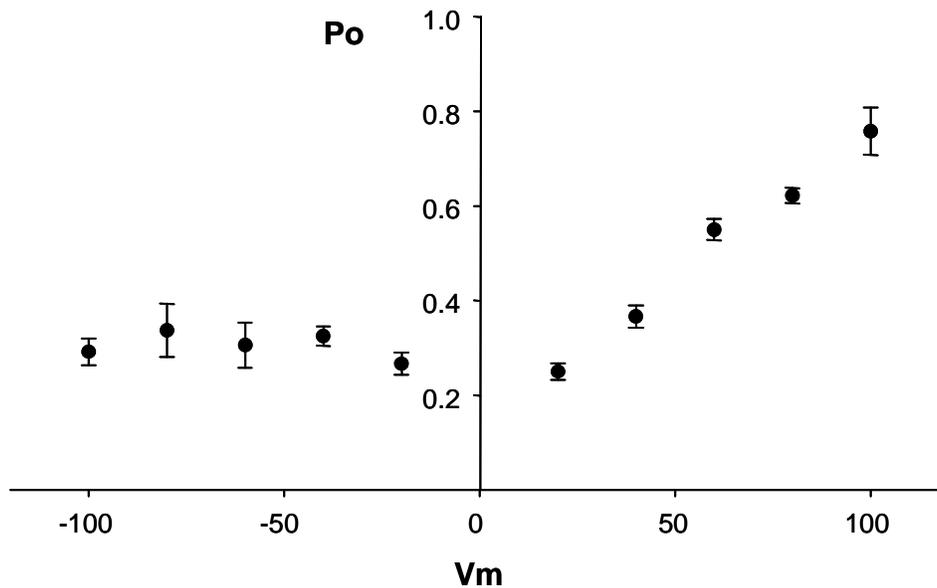


Figura 23. Relación entre la Po y el voltaje de membrana en condiciones control (NMDG-Cl/NMDG-Cl) en *inside-out*. Se observó una dependencia entre la Po y el voltaje aplicado a pulsos positivos. Media \pm DS, n=6.

1.2.2. Propiedades de permeación del canal

Reemplazando la NMDG del baño por concentraciones equimolares de Na⁺, encontramos que no cambió la conductancia, el Er, ni la Po (Figuras 24 y 25). Las conductancias entrantes y salientes y el Er en esta condición fueron: 21.7 ± 2.5 pS, 45.1 ± 9.0 pS, y -5.7 ± 1.6 mV, respectivamente. Como un ejemplo, la Po a 60 mV fue 0.53 ± 0.06 , siendo en condiciones control de 0.50 ± 0.08 . Todos estos valores en presencia de Na⁺ no fueron diferentes con respecto a los parches en ausencia de este ión ($p > 0.05$, n=6).

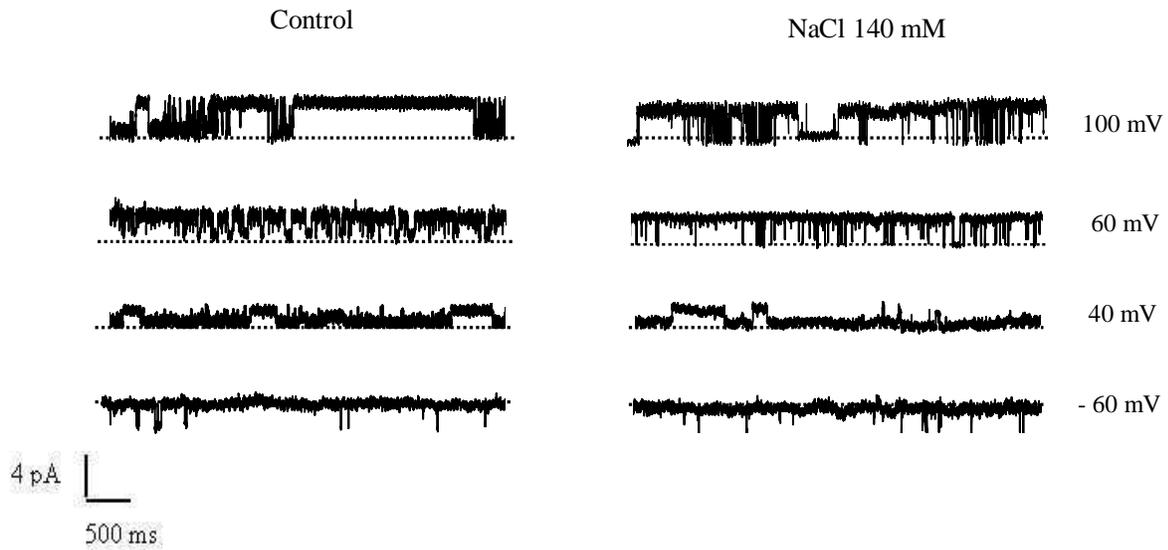


Figura 24. Trazos de corrientes obtenidas de un parche de *inside-out*. Las corrientes del lado izquierdo son con 140 mM de NMDG-Cl en el baño y en la pipeta, y en el lado derecho con 140 mM de NaCl en el baño (la pipeta contiene la solución estándar de NMDG-Cl). Cada trazo contiene 3 s de registro. Las líneas punteadas representan el estado cerrado del canal.

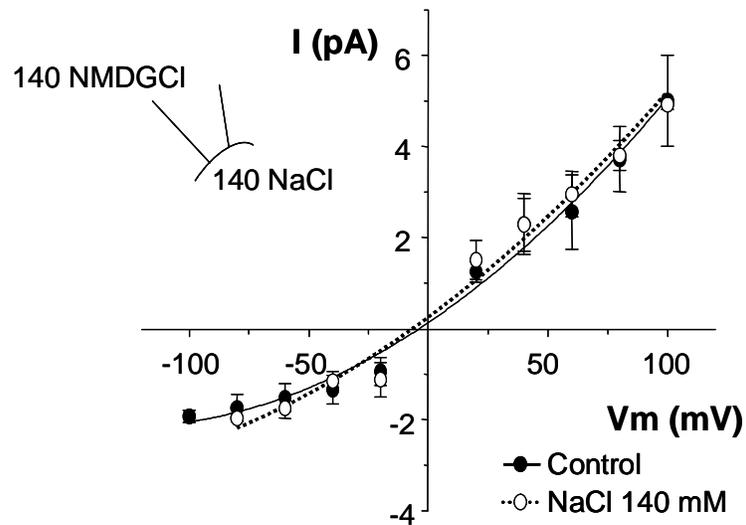


Figura 25. Relación I-V promedio correspondiente antes (línea sólida, $n=12$) y después (línea punteada, $n=7$, $p > 0.05$) del reemplazo de NMDG por Na^+ en la solución interna (baño). El potencial de reversión fue -5.7 ± 1.6 mV (media \pm DS).

La naturaleza sensible al Cl^- de esta corriente fue confirmada evaluando la dependencia del potencial de reversión con cambios en la concentración de Cl^- interno (solución de baño) en la configuración de *inside-out*. El E_r apareció siendo una función lineal del $\log ([\text{Cl}]_e/[\text{Cl}]_i)$, donde $[\text{Cl}]_e$ es la concentración de Cl^- extracelular, y $[\text{Cl}]_i$ es la concentración del Cl^- intracelular (figura 26).

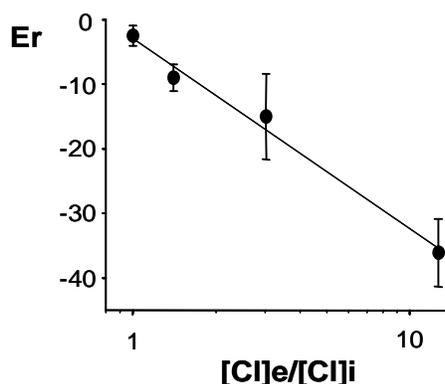


Figura 26. Relación entre el potencial de reversión promedio y el $\log ([\text{Cl}]_e/[\text{Cl}]_i)$ ajustado a una función lineal ($n=4$).

Estos resultados sugieren que las corrientes observadas son debidas al movimiento de Cl^- a través de un canal con rectificación saliente compatible con el canal ORCC.

Para evaluar la selectividad aniónica del canal, el Cl^- en la solución de baño (en contacto con la superficie de membrana intracelular) se reemplazó por diferentes aniones. Los valores de E_r (media \pm DS) para cada anión se obtuvieron de las curvas I-V individuales ajustadas a la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (G-H-K) corregidas por el potencial de juntura. Las relaciones de permeabilidad (P_x/P_{Cl}) fueron calculadas a partir de los cambios del E_r corregido usando la ecuación de G-H-K modificada:

$$\Delta E_r = E_{r(X)} - E_{r(Cl)} = 58. \log \frac{P_X [X]_i + P_{Cl} [Cl]_i}{P_{Cl} [Cl]_o}$$

donde ΔE_r es el cambio en E_r inducido por el reemplazo de 140 mM del Cl^- interno (solución de baño) por el anión X (gluconato, fluoruro (F^-) o ioduro (I^-)); $E_{r(Cl)}$ es el potencial de reversión en presencia de Cl^- . La tabla 1 muestra los valores promedio obtenidos con los diferentes aniones y la figura 27 muestra los registros de corriente a dos potenciales de membrana, -60 y 60 mV, y la relación I-V cuando la solución de baño se reemplazó por 140 mM de Na-gluconato.

Tabla 1

Anión	E_r (mV)	$P_{anión}/P_{Cl}$	$g_{saliente}$ (pS)	$g_{entrante}$ (pS)
Ioduro	$+17.4 \pm 3.2$	2.76	41.4 ± 2.7	17.0 ± 7.8
Cloruro	-5.7 ± 1.6	1.00	39.8 ± 7.7	21.1 ± 4.3
Fluoruro	-28.5 ± 4.9	0.34	28.7 ± 2.7	12.1 ± 1.0
Gluconato	-36.1 ± 9.1	0.23	31.2 ± 2.5	14.9 ± 2.0

Tabla 1. Las relaciones de corriente-voltaje fueron determinadas con las soluciones de baño conteniendo el anión en estudio como una sal de sodio (140 mM). La permeabilidad relativa ($P_{anión}/P_{Cl}$) fue estimada del potencial de reversión medio (E_r) después de la corrección del potencial de juntura, utilizando la ecuación de G-H-K modificada ($n=4$). Para cada reemplazo se estimaron las conductancias entrantes y salientes a partir de las curvas I-V para cada solución utilizada.

El desplazamiento del E_r hacia potenciales más negativos es indicativo de una menor permeabilidad para el gluconato o F^- comparado con Cl^- , y el cambio hacia potenciales menos negativos corresponde a una mayor permeabilidad para I^- con respecto al Cl^- después de la corrección del potencial de juntura en el electrodo de referencia del baño. Estos valores indican que la secuencia de permeabilidad aniónica de la corriente a través del canal fue $I^- > Cl^- > F^- > gluconato$. Ninguno de estos iones,

aplicados del lado interno de la membrana, modificó significativamente la conductancia del canal (tabla 1).

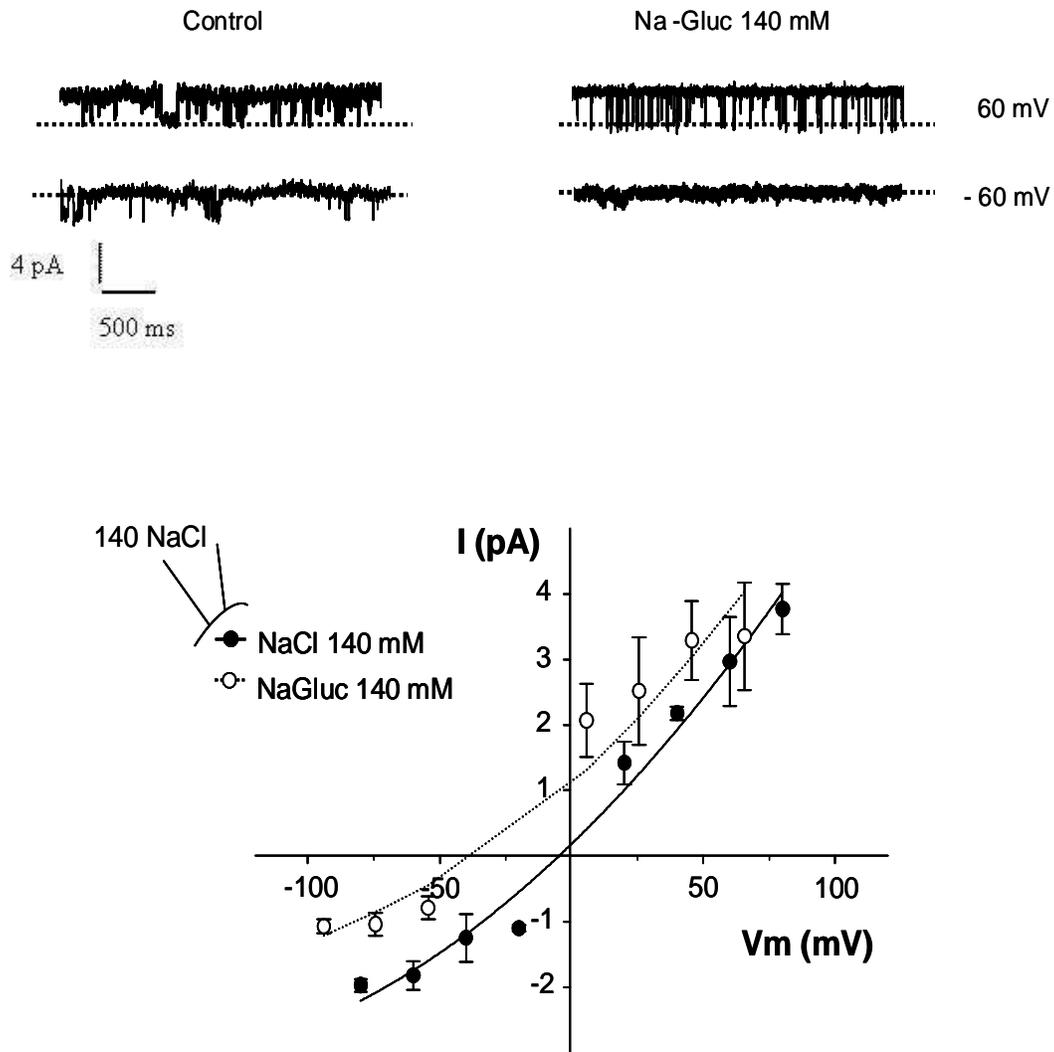


Figura 27. Selectividad aniónica de ORCC. Registros y relación corriente-voltaje obtenida de cuatro parches donde 140 mM de NaCl de la solución del baño (intracelular) fue reemplazado por 140 mM de Na-gluconato. Las curvas I-V muestran las corrientes y los potenciales después de la corrección del potencial de juntura en el electrodo de referencia del baño.

1.2.3. Efectos de bloqueantes sobre la actividad del ORCC

Se estudió el efecto bloqueante de canales de cloruro del DPC sobre la actividad del canal. La droga no modificó la amplitud de la corriente unitaria, ni la conductancia, ni el E_r , pero si aumentó el número de transiciones hacia el estado cerrado del canal que se evidencia como una disminución en la P_o . Esto se puede observar en los registros de corrientes y la relación I-V en presencia y ausencia de DPC, en la figura 28 (n=6).

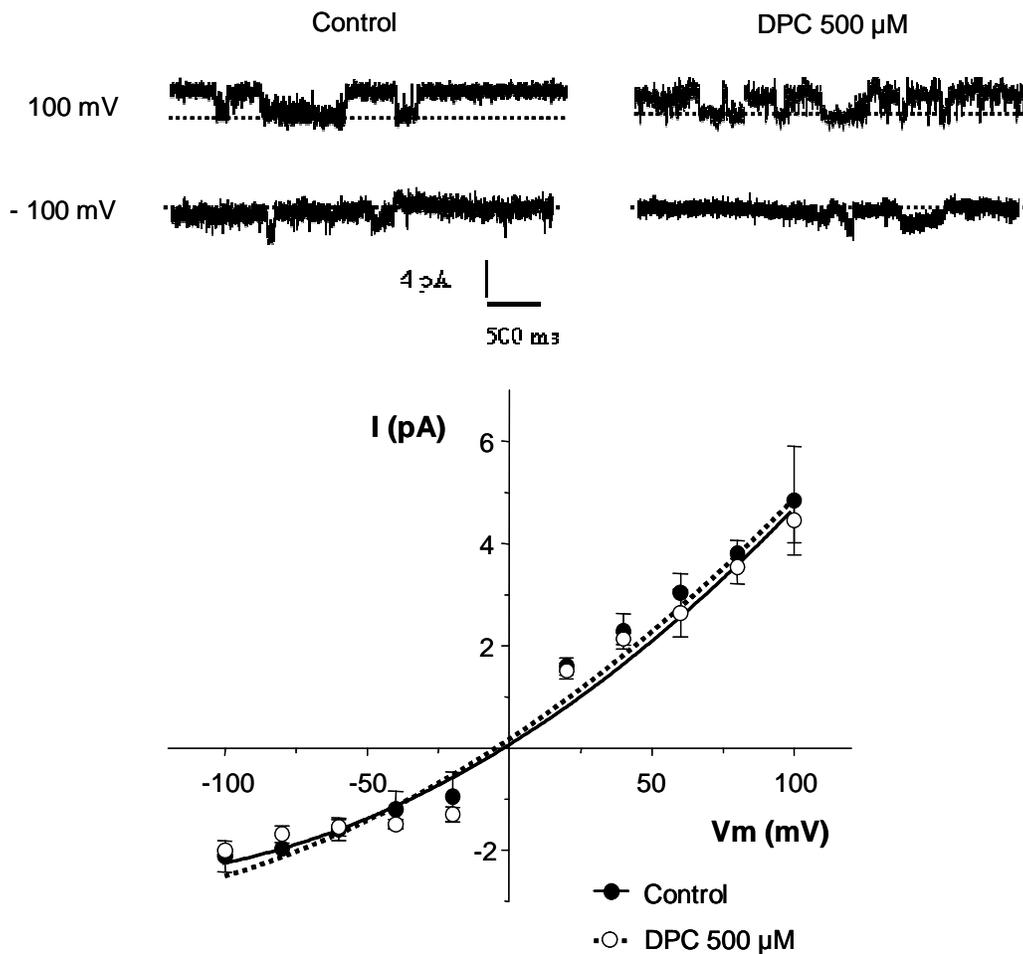


Figura 28. Efecto de DPC sobre la actividad del canal ORCC. *Arriba:* Corrientes de canal único en parches en *inside-out* mantenidos a 100 y -100 mV en ausencia o presencia de 500 μ M de DPC en una solución simétrica de 140 mM de NMDG-Cl. La línea punteada indica el estado cerrado del canal. *Abajo:* Relación I-V en ausencia o presencia de 500 μ M de DPC. Media \pm DS, n=6.

La adición de DPC al baño en contacto con la cara citoplasmática celular redujo la P_o por 30-50 % a todos los potenciales estudiados siguiendo la dependencia del potencial de membrana observado en las células control (figura 29) ($p < 0.05$; $n = 6$).

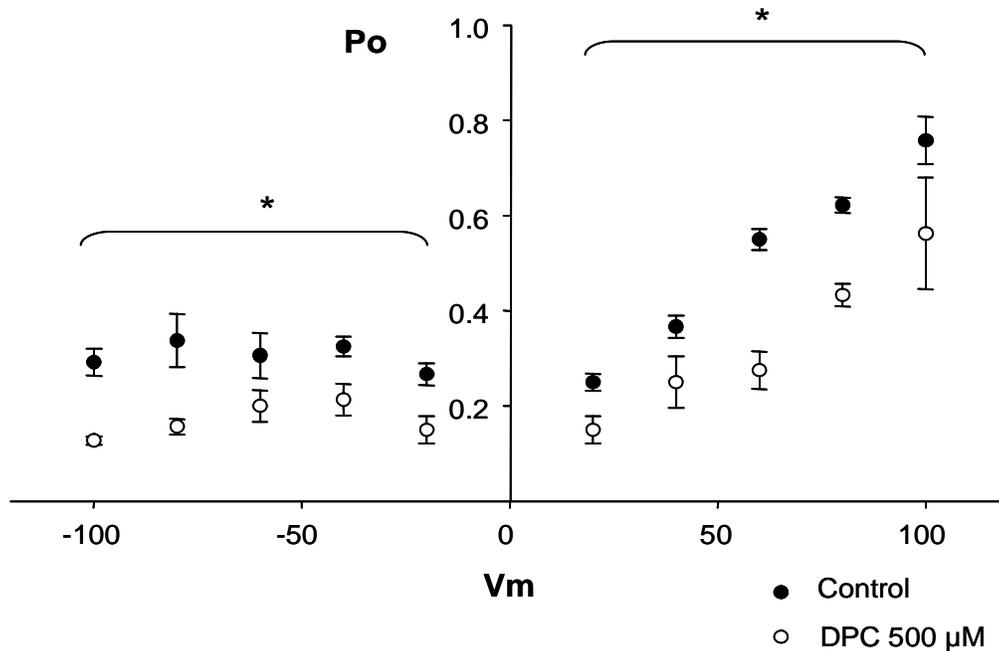


Figura 29. Relación entre la P_o y el voltaje en ausencia o presencia de 500 μM de DPC. Se observó una disminución del 30-50 % de la P_o para todos los voltajes utilizados cuando se agregó DPC a la solución de baño en condiciones de *inside-out*. Observamos que la inhibición siguió la misma dependencia del potencial de membrana observado en las células control (media \pm DS; $p < 0.05$; $n = 6$).

No se conoce la interacción entre el DPC y el ORCC, y el bloqueo podría estar mediado por CFTR. Algunos autores sugieren que la entrada del bloqueante DPC al poro de CFTR es facilitada por potenciales de membrana negativos (hiperpolarizantes) debido a que se favorece el movimiento de la droga en su forma aniónica hacia el poro a través de campo eléctrico y el bloqueante queda más tiempo retenido en el canal, por lo que hay una dependencia de la inhibición del canal con el voltaje aplicado (Lindsell y col., 2005, Zhang y col., 2000). En nuestro sistema, la inhibición de la P_o del canal ORCC por el DPC se produjo independientemente del voltaje. Pensamos que la diferencia encontrada

en nuestros resultados con respecto a otros estudios son debidos a que la respuesta de las drogas, en este caso DPC, depende del medio ambiente celular, y los datos reportados en la literatura son a través de sistemas de expresión heterólogos en ovocitos de *Xenopus laevis* diferentes a los nuestros, que son en células BeWo. Por lo tanto, al tratarse de células diferentes, los resultados pueden variar con respecto a estudios realizados en otros sistemas (Stahl y col., 2012).

La glibenclamida (figura 31.A) es una droga perteneciente a la familia de las sulfonilureas y utilizada como hipoglucemiante. Es un bloqueante de canal abierto e inhibe al CFTR por oclusión del poro de una manera dependiente de voltaje, con la droga ganando acceso a su sitio de unión que es parte del poro del canal. La carga negativa que presenta la glibenclamida produciría la interacción electrostática con la carga positiva en el poro del canal, y tendría importancia para su efecto con el potencial de membrana, quedándose la droga más retenida en el canal a pulsos hiperpolarizantes (Sheppard y col., 1997, Lindsell y col., 2005, Melin y col., 2007).

Evaluamos el efecto de distintas concentraciones de glibenclamida sobre la actividad del canal a 80 mV de manera de estimar la concentración de la droga que disminuye la P_o en un 50 % con respecto a su valor control. La figura 30 muestra que la P_o disminuye a medida que la concentración del bloqueante aumenta, siendo la concentración de glibenclamida necesaria para reducir la P_o aproximadamente a la mitad, de 50 μ M. Esta concentración intermedia fue la utilizada en los experimentos posteriores.

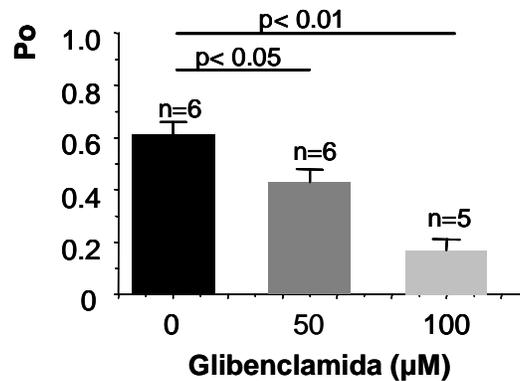
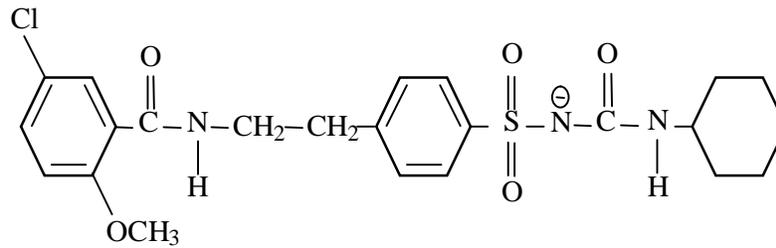


Figura 30. Efecto de diferentes concentraciones de glibenclamide sobre la Po medida con un potencial de 80 mV. La estadística significativa se observa para las dos concentraciones de glibenclamide, con respecto al control.

La droga fue agregada en la solución del baño, sobre el lado citoplasmático del parche en *inside out*, produciendo una disminución de la actividad a todos los potenciales medidos. La figura 31.B muestra un registro a 100 mV en condiciones control y luego del agregado de glibenclamide 50 μM (ver también el trazo expandido mostrado por debajo). La droga no tuvo efecto en la amplitud de corriente unitaria (figura 33.A) pero sí aumentó el número de transiciones entre los estados abierto y cerrado del canal que se evidenciaron como una disminución en la probabilidad de encontrar el canal en el estado abierto (Po). Para visualizar de una forma diferente este efecto, se construyeron histogramas de amplitud en ausencia o presencia de glibenclamide en parches mantenidos a 100 mV (figura 32) registrados por 5 seg, los cuales muestran como la adición del bloqueante desplaza la distribución desde el estado abierto (5 pA) hacia el estado cerrado (0 pA) del canal.

A



B

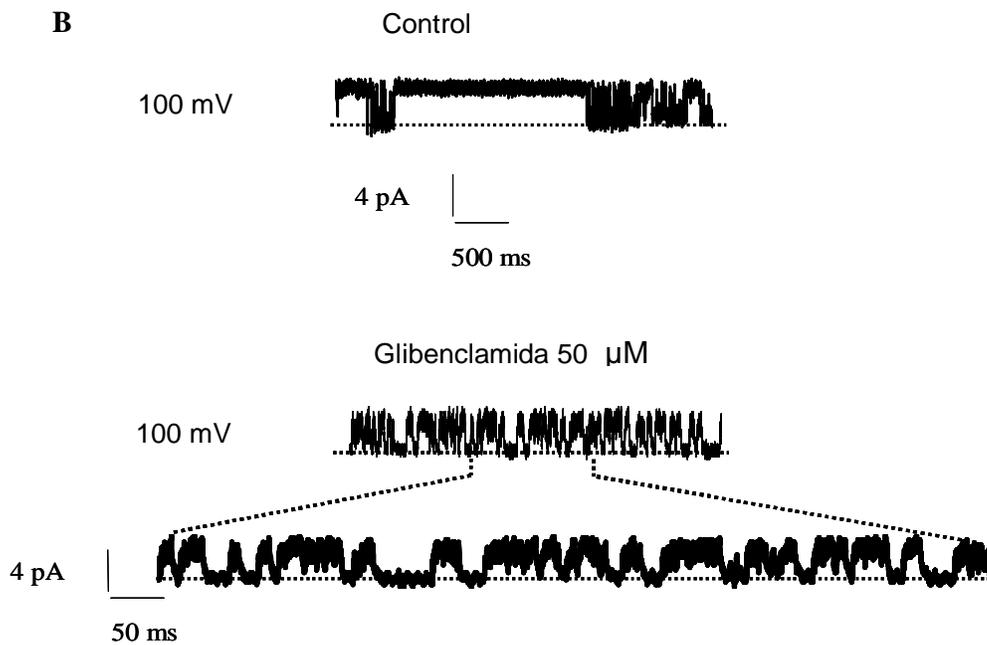


Figura 31. Efecto del inhibidor de canales de cloruro glibenclamide sobre el ORCC. A. Estructura molecular de la glibenclamide en su forma aniónica. **B.** Registros en la configuración de *inside-out* adquiridos a 100 mV en solución estándar (arriba) y en presencia de 50 μ M de glibenclamide agregada al lado citoplasmático del parche (abajo). La adición de la droga disminuyó la actividad del canal de Cl⁻. Las líneas punteadas indican el estado cerrado del canal. El efecto del bloqueante también se puede observar en el trazo expandido (registro inferior).

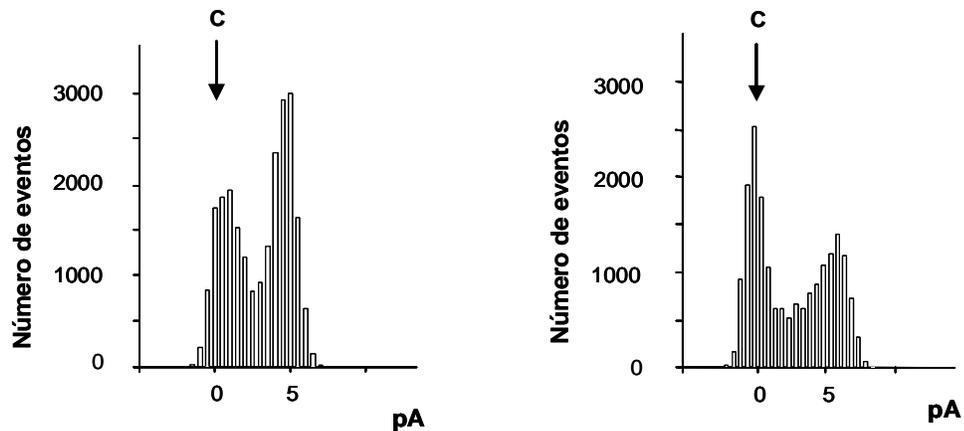


Figura 32. Análisis de la distribución de las amplitudes de corriente correspondientes a los registros mostrados en la figura 30. El parche fue mantenido a 100 mV en ausencia (izquierda) o 4 min después de la adición de 50 μ M de glibenclamida (derecha).

La aplicación citoplasmática de 50 μ M de glibenclamida redujo la P_o , independientemente del potencial de membrana aplicado. La reducción con glibenclamida fue del 40 % a todos los potenciales estudiados. A potenciales pequeños, como 20 y -20 mV, las corrientes no se pueden medir claramente debido a sus bajas amplitudes y el ruido del sistema de registro podría obstaculizar el cálculo de la P_o (figura 33.B, n=6). La inhibición de ORCC por glibenclamida, al igual que con DPC, pudo deberse a la interacción directa con el bloqueante o mediada por CFTR, como se observó en otros sistemas donde la glibenclamida produjo la reducción de la P_o del ORCC mediante la inhibición de CFTR (Julien y col., 1999). Al igual que en los estudios con DPC, los resultados pueden variar con respecto a los reportados por tratarse de sistemas diferentes (Stahl y col., 2012).

El bloqueo del DPC y la glibenclamida, y las propiedades de permeación, son características del canal compatibles con el ORCC.

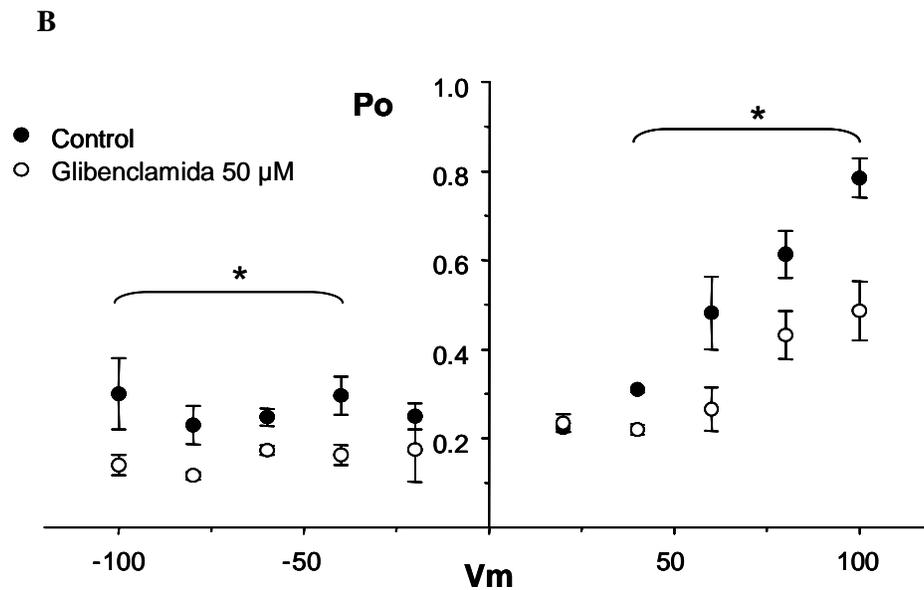
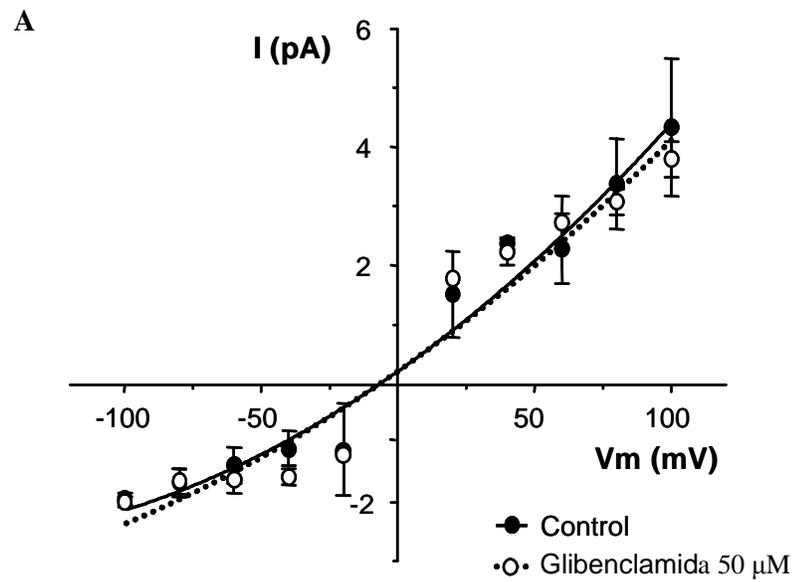


Figura 33. Efecto de la glibenclamida sobre la probabilidad de apertura (P_o) del canal.
A. Relación I-V en ausencia (línea sólida) o presencia (línea punteada) de 50 μM de glibenclamida obtenida en una solución simétrica de 140 mM de NMDG-Cl. **B.** Relación entre P_o y el voltaje aplicado en ausencia o presencia de 50 μM de glibenclamida cuando el parche fue expuesto a la misma solución simétrica. Media \pm DS, $n=6$.

1.2.4. Efectos del calcio intracelular sobre la actividad del canal

La solución del baño (en contacto con la cara intracelular del parche) usada en todos los experimentos previos contenía 2.5 mM de CaCl_2 , concentración idéntica a la presente en la solución de pipeta (extracelular).

Debido a la identificación en otros tipos celulares de canales de cloruro sensibles a Ca^{2+} y de canales ORCC regulados por Ca^{2+} (Stewart, 2001), investigamos el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad del canal ORCC presente en las células BeWo. Se removió el Ca^{2+} del baño (2.5 mM) dentro de los parches (0 Ca^{2+} más 0.2 mM de BAPTA) para evaluar la actividad del canal bajo esta condición. Las conductancias saliente y entrante y el Er fueron similares a las obtenidas en presencia de Ca^{2+} , siendo: 39.4 ± 13.5 pS, 14.6 ± 5.5 pS, y -6.1 ± 1.1 mV, respectivamente ($n=5$, $p>0.05$).

En cinco experimentos en los cuales los parches fueron mantenidos a -80 y 80 mV, los valores de Po en la solución libre de Ca^{2+} , fueron 0.23 ± 0.05 y 0.68 ± 0.10 ($n=5$, $p>0.05$), respectivamente (datos no mostrados), no mostrando cambios con respecto a la situación control (2,5 mM de Ca^{2+}).

La remoción del Ca^{2+} intracelular no afectó la Po, ni las conductancias, ni el Er. Estos resultados indican que la actividad del canal ORCC encontrado en las células BeWo no está modulada por el Ca^{2+} intracelular.

1.3. Canal de cloruro de baja conductancia compatible con CFTR

1.3.1. Actividad eléctrica

En nuestros estudios pudimos observar un canal de cloruro de ~ 12 pS de conductancia que podría ser el CFTR. Utilizamos forskolina (fsk) (20 μM), un activador de la adenilato ciclasa, agregado a la solución del baño, para inducir la activación del canal bajo condiciones de *cell attached*, ya que requiere de la maquinaria celular intacta para ejercer su mecanismo de acción. Luego de la activación del canal, se realizó la escisión del parche de membrana (*inside out*) y se registró la actividad iónica con pulsos

despolarizantes e hiperpolarizantes. La actividad del canal también pudo determinarse en sellos donde no se realizó el estímulo con forskolina, aunque en presencia de la misma el canal aparecía abierto con mayor frecuencia durante los experimentos. Esto indica que el canal se expresa y se activa espontáneamente en las células BeWo de forma nativa, sin ser estimulado, y el activador de la vía del AMPc incrementaría su función. La figura 34 (arriba) muestra registros de corrientes de este canal de baja conductancia a 100 mV obtenidos en la configuración de *inside out* con o sin estimulación previa con forskolina. Observamos que, en presencia de forskolina, aumentaron los estados abiertos del canal. En la figura (abajo) también se muestran histogramas de amplitud de corriente en ambas condiciones donde se observa que en presencia de forskolina, la distribución del estado cerrado (C) (0 pA) es desplazada hacia el estado abierto del canal (~1 pA). Las probabilidades de apertura medidas a dos voltajes diferentes fueron: a 100 mV: 0.40 ± 0.05 y 0.76 ± 0.11 en ausencia y presencia de forskolina; a -100 mV: 0.32 ± 0.13 y 0.62 ± 0.09 , en ausencia y presencia de forskolina, respectivamente.

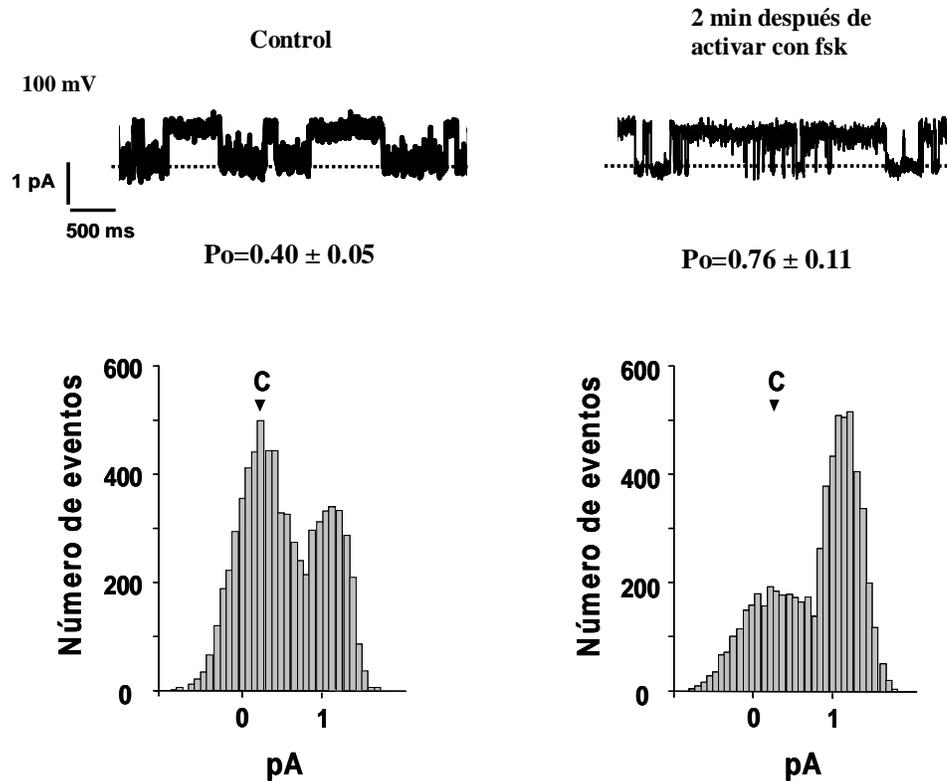


Figura 34. *Arriba:* registros representativos de corrientes de canal único en *inside out* a 80 mV en solución estándar (NMDG-Cl a ambos lados de la membrana) y en presencia de 20 μ M de forskolina agregada en la solución de baño antes de escindir el parche. La línea punteada indica el estado cerrado del canal. *Abajo:* análisis de distribución de amplitudes de corriente para los parches de arriba a 100 mV en ausencia y presencia de forskolina. El agregado de la misma aumentó la actividad del canal de cloruro de baja conductancia que se evidencia como un aumento en el estado abierto del canal. $n=3$.

La figura 35 muestra la actividad del canal inducido por forskolina, que presentó corrientes unitarias entrantes y salientes lineales en soluciones simétricas de cloruro (NMDG-Cl a ambos lados de la membrana). La relación corriente voltaje (I-V) nos permitió calcular la conductancia unitaria, que fue 11.8 ± 1.2 pS ($n=8$) y señala las propiedades no rectificantes del canal en el rango de voltaje analizado (-100 a 100 mV). El E_r promedio, obtenido a partir de la curva I-V de cada uno de los canales encontrados fue cercano a 0 mV.

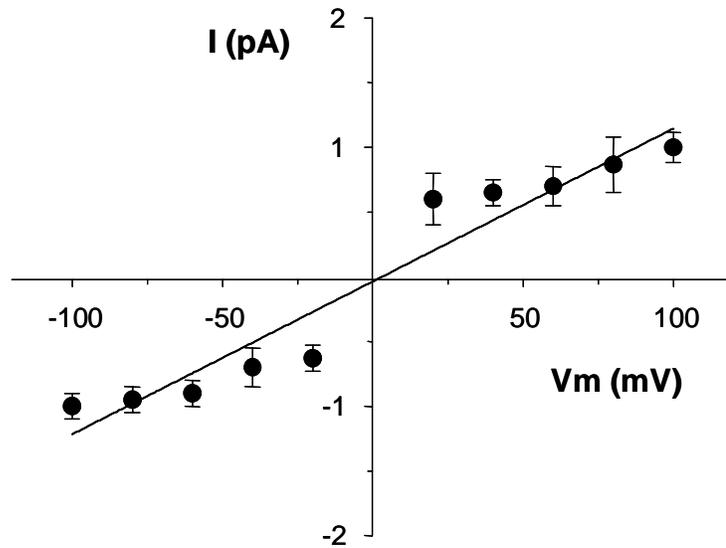


Figura 35. Relación corriente - voltaje del canal de baja conductancia compatible con CFTR. Los datos se obtuvieron a partir de registros adquiridos en la configuración de *inside out* y en una solución simétrica de NMDG-Cl 140 mM a ambos lados de la membrana, en presencia de 20 μ M de forskolina ($n=8$, media \pm DS). El canal tiene una curva I-V lineal y la conductancia estimada a partir de estos datos fue de 11.8 ± 1.2 pS, y el E_r cercano a 0 mV.

Teniendo en cuenta que estamos estudiando un canal que se expresa en forma nativa (sin sobre-expresión) cuya frecuencia de aparición en los parches es baja, que el canal presentaba corrientes de baja amplitud, lo cual es característico del CFTR, y el nivel de ruido de nuestro sistema (*canal único*) no nos permitía registrar con claridad la actividad del mismo en las células BeWo, recurrimos nuevamente a la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula entera para medir las corrientes totales de cloruro y lograr la caracterización del canal. Para corroborar que efectivamente el CFTR presenta actividad, se realizó una estimulación de las corrientes totales con forskolina y una inhibición específica posterior con CFTR_{inh}-172. Este compuesto (figura 37.A) es un potente inhibidor alostérico que bloquea de manera específica y reversible a CFTR interrumpiendo el *gating* del canal. Es permeable a las células, y no está descrito que inhiba otros canales de cloruro (Li y col., 2004; Ma y col., 2002, Stahl y col. 2012).

La figura 36 resume los datos de experimentos antes y después de la activación por forskolina en células BeWo. La corriente neta activada por forskolina (I_{fsk}) se obtuvo por la substracción de las corrientes basales a aquellas tratadas con forskolina y se graficaron las densidades de corriente promedio (corriente por unidad de capacitancia de la célula; $C_m = 20.6 \pm 2.0$ pF) en relación al voltaje aplicado. Claramente, la curva I-V muestra que en presencia de forskolina las corrientes basales aumentan significativamente. Los valores de conductancia (G) (-80 a 100 mV) en condiciones control y luego de exposición a forskolina fueron: 15.0 ± 1.2 pS/pF y 47.0 ± 2.0 pS/pF, respectivamente, $p < 0.05$, $n = 3$). La conductancia de la corriente neta activada por forskolina fue 32.0 ± 1.0 pS/pF.

La adición del inhibidor selectivo de CFTR ($CFTR_{inh-172}$) en presencia de forskolina redujo las corrientes activadas por forskolina en las células BeWo. Las corrientes sensibles al $CFTR_{inh-172}$ ($I_{CFTR_{inh-172}}$) se obtuvieron substrayendo las corrientes remanentes luego del bloqueo, de aquellas tratadas con forskolina (figura 37.B). Las curvas I-V demuestran la presencia de corrientes compatibles con aquellas mediadas por el CFTR ya que una fracción importante de las corrientes activadas por forskolina fue inhibida luego de la incubación por 2 min con $CFTR_{inh-172}$. La conductancia neta (-80 a 100 mV) en presencia de $CFTR_{inh-172}$ fue significativamente menor (21.0 ± 1.0 pS/pF) que en condiciones de exposición solamente a forskolina (47.0 ± 2.0 pS/pF) ($p < 0.05$, $n = 3$). La conductancia de la corriente neta $I_{CFTR_{inh-172}}$ fue de 26.0 ± 1.5 pS/pF.

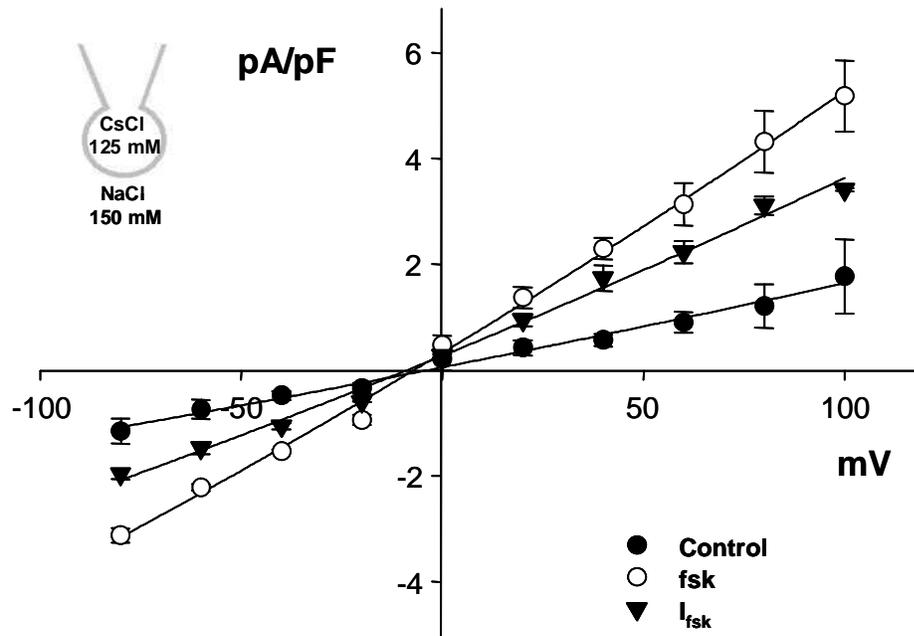
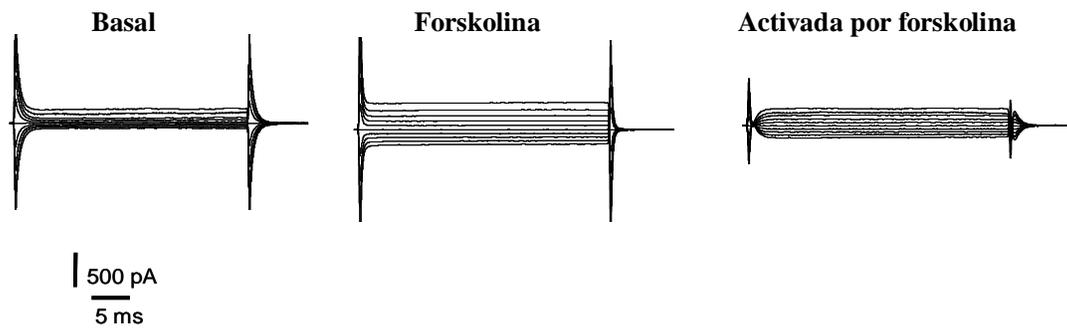


Figura 36. Arriba: corrientes en ausencia y presencia de 20 μ M de forskolina. La fracción de la corriente activada por forskolina (I_{fsk}) se obtuvo substrayendo las corrientes basales de aquellas tratadas con forskolina. **Abajo:** las curvas I-V muestran las densidades (corriente por unidad de capacitancia, pA/pF) obtenidas en las mismas condiciones descritas anteriormente versus el potencial. La diferencia entre las condiciones basales y con forskolina fue estadísticamente significativa a todos los potenciales estudiados ($p < 0.05$, $n = 3$).

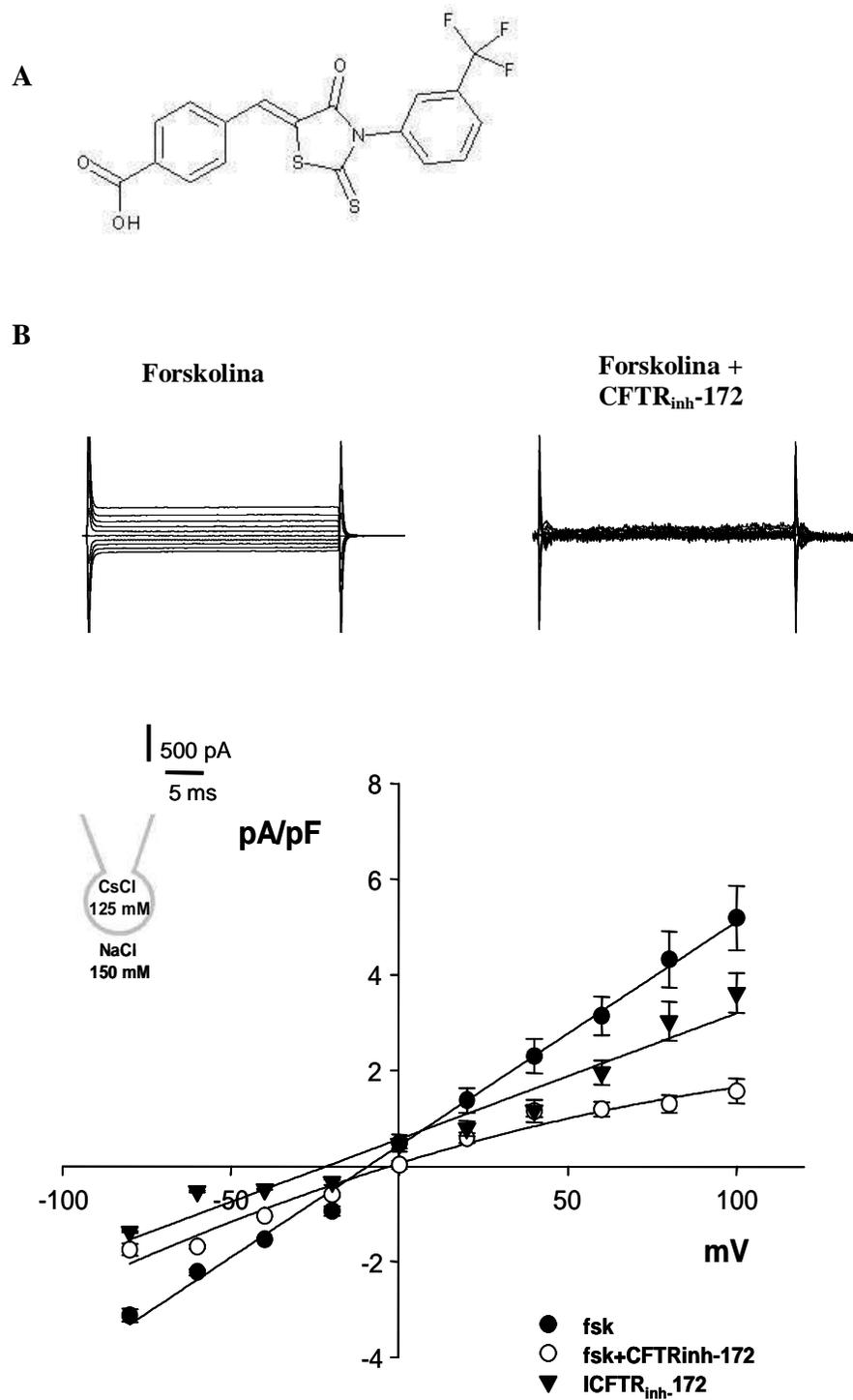


Figura 37. A. Estructura del inhibidor específico de CFTR (CFTR_{inh}-172). **B.** Trazos representativos de corrientes totales de CFTR (arriba) en células BeWo en condiciones basales (con forskolina) y en presencia de 2 μ M CFTR_{inh}-172. Abajo se muestran las curvas I-V correspondientes en las condiciones utilizadas. Se incorporó al gráfico la curva correspondiente a la corriente sensible al CFTR_{inh}-172 (I CFTR_{inh}-172). Se utilizó el mismo protocolo que en los registros previos.

Todos estos datos son compatibles con las características del canal de cloruro CFTR, que son: conductancia lineal baja (6-15 pS) (Gadsby y col., 1995; Assef y col., 2003; Sheppard y col., 1999), activación por forskolina, inhibición específica con CFTR_{inh}-172, entre otras.

1.3.2. Expresión de CFTR en células BeWo

El CFTR fue clonado en 1989 por Riordan y colaboradores y desde entonces es una proteína extensivamente estudiada y de la que disponemos *primers* y anticuerpos para su estudio. Para evaluar la expresión del ARNm se obtuvo el ARN total de células y se realizó una RT-PCR utilizando *primers* específicos para amplificar una porción del gen del CFTR (ver Métodos). La línea celular T84 originada de un adenocarcinoma de colon humano fue utilizada como control positivo, porque expresan constitutivamente el canal CFTR (Prince y col., 1993). Encontramos en las células BeWo y T84 la banda del número de pares de bases esperado correspondiente a CFTR (295 bp) (Figura 38).

La presencia del ARNm del CFTR en las células se completó con estudios de la expresión de la proteína del canal con experimentos de Western blot. Se observaron las bandas correspondientes al canal CFTR utilizando dos anticuerpos dirigidos contra regiones diferentes de la proteína: anti-CFTR (Alomone Labs Ltd.), que permitió detectar una única banda de ~160 KDa. La misma banda se observó en células T84 utilizadas como control positivo (figura 39.A) y anti-CFTR (H-182, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), con el cual se pudo evidenciar la presencia de dos bandas correspondientes al CFTR en su forma glicosilada de ~160 KDa (banda superior) y una banda de menor tamaño posiblemente correspondiente a su forma no glicosilada (banda inferior) (figura 39.B). El experimento se repitió tres veces en ambos casos.

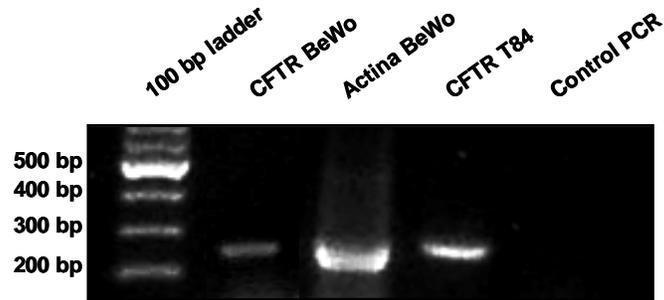


Figura 38. Detección del ARNm del CFTR en células BeWo por RT-PCR. Las calles corresponden a (izquierda a derecha): marcador de pesos moleculares (100 bp ladder); CFTR en células BeWo (295 bp); β -actina en células BeWo (289 bp), como control positivo de la integridad del ADNc; la línea celular T84, utilizada como control positivo de la presencia de CFTR; control negativo de PCR (reacción en ausencia de muestra templado). n=3.

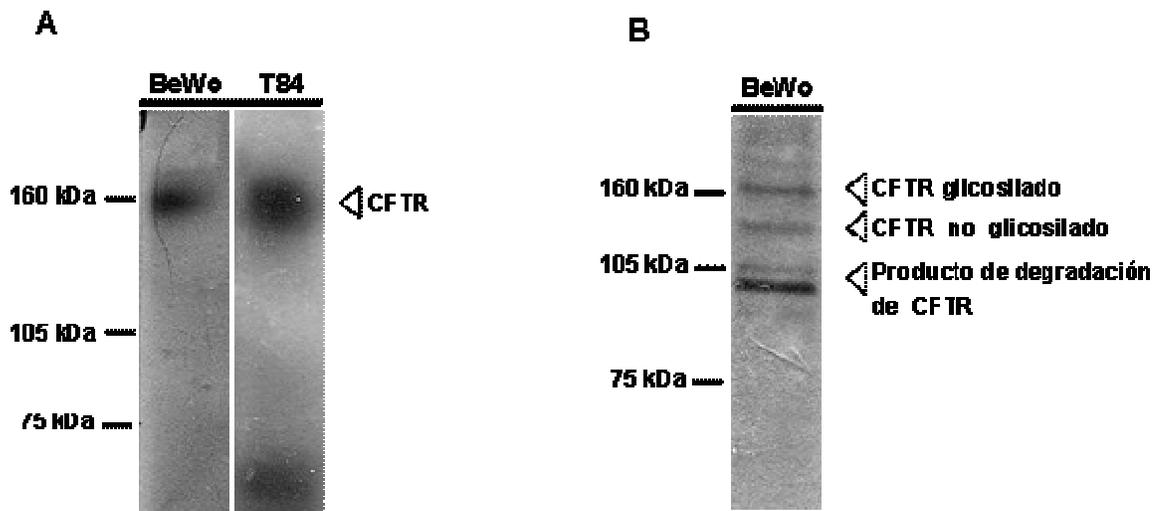


Figura 39. Expresión de CFTR en extracto de proteínas de células BeWo. Se observan las bandas correspondientes al canal CFTR utilizando dos anticuerpos que mapean regiones diferentes: **A.** anti-CFTR (Alomone Labs Ltd), que permitió detectar una única banda de ~160 kDa. La misma banda se observó en células T84 utilizadas como control positivo. **B.** anti-CFTR (Santa Cruz Biotechnology, Inc), con el cual se evidencian dos bandas correspondientes al CFTR en su forma glicosilada (banda superior) y su forma no glicosilada (banda inferior). n=3.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que el canal CFTR se expresa en la línea trofobástica BeWo y es funcional.

1.4. Los canales de cloruro participan en la proliferación de células BeWo de trofoblasto humano

Nuestros resultados mostraron que CFTR y ORCC son funcionales en las células BeWo. Para evaluar un posible rol de estos canales en estas células, estudiamos su participación en el crecimiento celular. Aunque no están claros los mecanismos detallados de la regulación de la proliferación celular por canales iónicos, un mecanismo sería que los canales por el movimiento iónico y cambios en el volumen celular regulan la proliferación modulando el potencial de membrana (Lang y col., 2005; He y col., 2011). Es interesante que CFTR se encontró en placenta humana y que en las células trofoblásticas estaría involucrado en la regulación de la expresión funcional y molecular de las proteínas acuaporinas (AQPs), que participan en la regulación del movimiento de agua, aumentando la permeabilidad de la membrana, lo cual produce cambios en el volumen celular (Damiano y col., 2011). Además, existen otras evidencias de la implicancia del transporte de cloruro en la fisiología placentaria, como el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación del volumen celular, el transporte de solutos, etc. (Riquelme, 2009), por lo que sería posible pensar que en células trofoblásticas los canales de Cl^- participen en estos procesos y en la proliferación celular.

Estas evidencias sugieren que en las células BeWo los canales de Cl^- podrían estar participando en el movimiento de Cl^- , y por ende en la proliferación de las mismas, por lo que utilizamos el ensayo de *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT, Sigma) con 10 % de SFB, con diferentes inhibidores de canales de Cl^- para evaluar una posible participación de estos canales en la proliferación trofoblástica.

Observamos que la incubación con concentraciones crecientes de DPC por 72 h reduce la proliferación de las células BeWo. La concentración a la cual el 50% de la

proliferación celular fue inhibida (IC_{50}) fue de $472.0 \pm 144.4 \mu\text{M}$ ($n=3$) (figura 40). Como mencionamos previamente, DPC inhibe además de CFTR y ORCC, otros canales de cloruro.

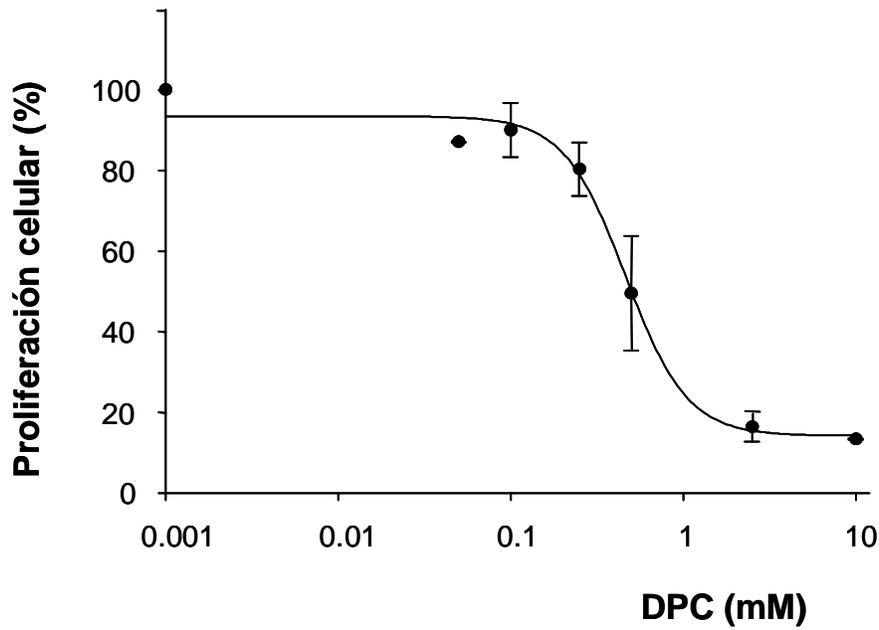


Figura 40. Efecto de la inhibición de canales de cloruro por DPC sobre la proliferación de células BeWo. La citotoxicidad fue evaluada por el ensayo de MTT con el objetivo de determinar si los canales de cloruro estarían involucrados en la proliferación de estas células. Se midió la proliferación celular relativa luego de la incubación con concentraciones crecientes del inhibidor por 72 h. La proliferación celular disminuye con las concentraciones del inhibidor utilizadas.

Evaluamos también el efecto de otros inhibidores no selectivos de canales de cloruro, como glibenclamida y DIDS. La glibenclamida (figura 30.A) se une reversiblemente al estado abierto del CFTR e interrumpe la conducción de cloruro por este canal, así como también inhibe al canal ORCC. El DIDS (figura 42.A) inhibe de forma covalente e irreversible al CFTR solamente del lado intracelular. Además bloquea otros canales de Cl^- , incluido el ORCC. La proliferación celular se reduce luego de 72 h de manera concentración-dependiente con una IC_{50} de $33.2 \pm 17.2 \mu\text{M}$ ($n=3$) en presencia de glibenclamida (figura 41) y $424.4 \pm 262.4 \mu\text{M}$ ($n=3$) con DIDS (figura 42.B).

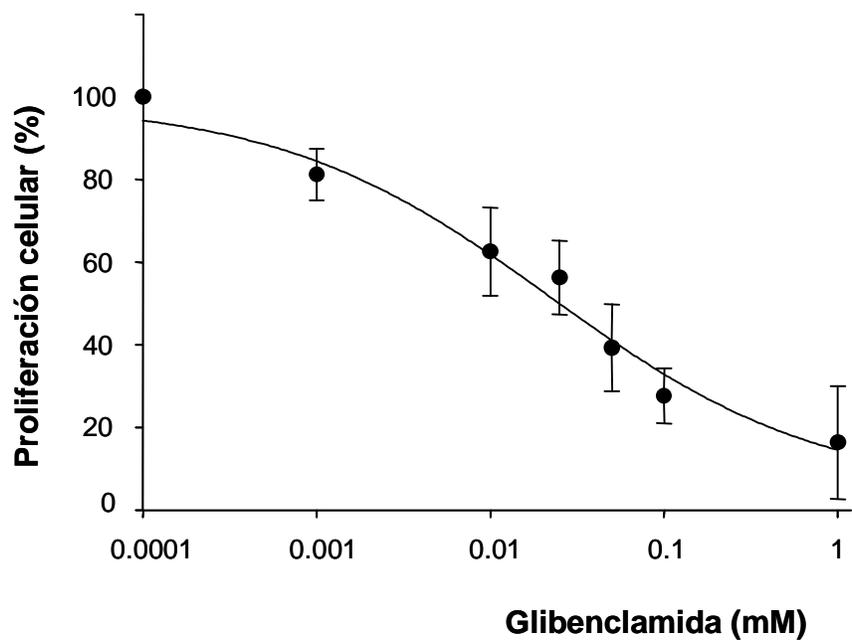
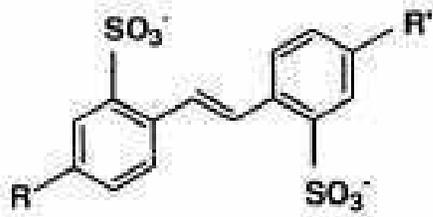


Figura 41. Efecto de la inhibición de canales de cloruro por glibenclamida sobre la proliferación de células BeWo mediante el ensayo de MTT por 72 h. La proliferación celular disminuye con las concentraciones utilizadas.

A



DIDS; R = R' = -NCS

B

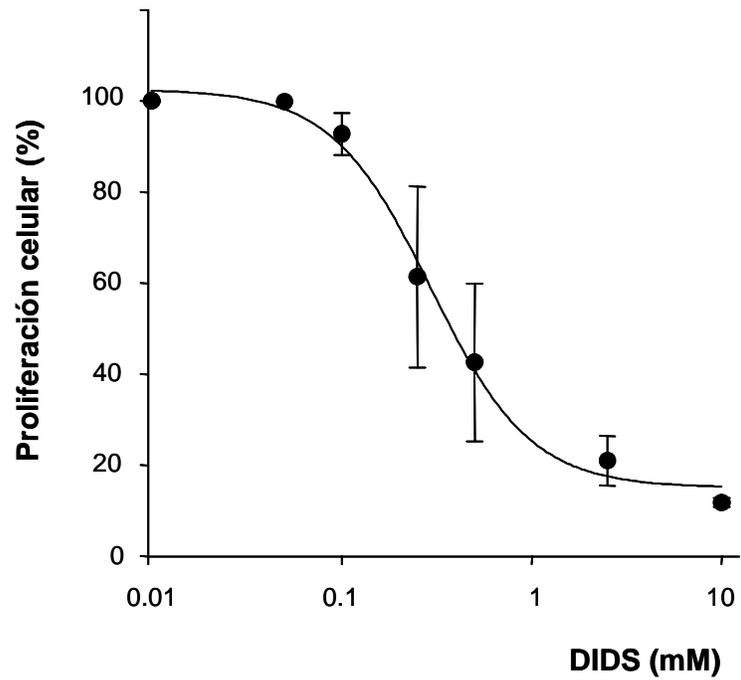


Figura 42. Efecto de la inhibición de canales por DIDS sobre la proliferación de células BeWo mediante el ensayo de MTT por 72 h. A. Estructura molecular de DIDS. B. La proliferación celular disminuye a concentraciones creciente de DIDS.

Para inhibir específicamente el canal de Cl⁻ CFTR, utilizamos CFTR_{inh}-172 a distintas concentraciones. La proliferación celular disminuyó en el rango de concentraciones utilizado con una IC₅₀ de 0.55 ± 0.21 μM (n=4) (figura 43).

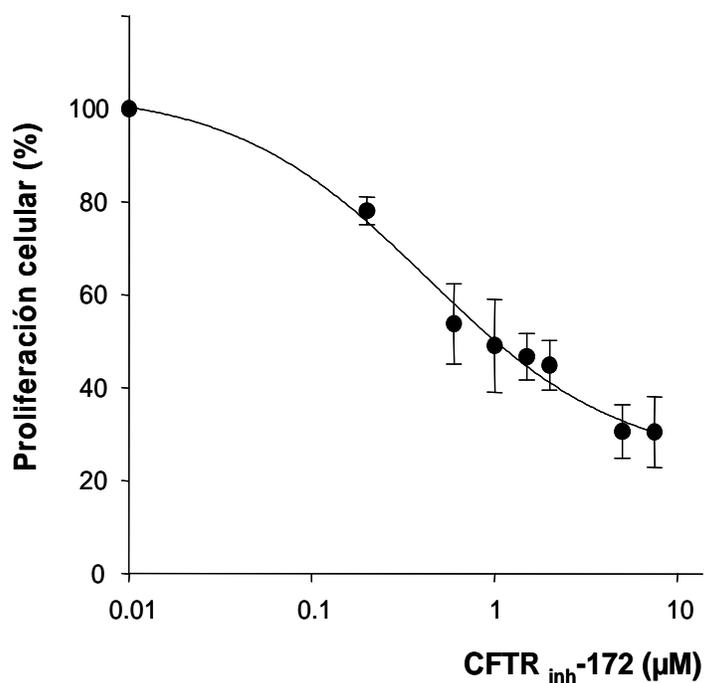


Figura 43. CFTR_{inh}-172 inhibe la proliferación de células BeWo. La proliferación fue determinada por el ensayo de MTT por 72 h. La misma disminuye con las concentraciones del inhibidor utilizadas.

Para investigar si la disminución observada en la proliferación celular en todos los casos se debía a un efecto en la viabilidad de las células, evaluamos la misma en las células BeWo, con cada uno de los inhibidores utilizados, mediante la técnica de exclusión de azul tripano. La tabla 2 muestra los % de viabilidad celular en dos concentraciones diferentes de cada inhibidor (n=3). Observamos que la viabilidad celular disminuyó al aumentar la dosis de cada uno de los inhibidores, indicando que la disminución en la proliferación celular se correlaciona con un incremento en la muerte celular.

Tabla 2

Inhibidor (concentración)		% de viabilidad celular
DPC (mM)	0.5	90
	10	38
Glibenclamida (mM)	0.05	41
	1	27
DIDS (mM)	0.5	56
	10	17
CFTR_{inh}-172 (μM)	0.2	63
	1	55
	2	42
	7.5	25

Tabla 2. % de viabilidad de células BeWo tratadas con inhibidores de canales de Cl⁻ mediante el ensayo de exclusión de azul tripano. La viabilidad celular se redujo al aumentar la concentración de cada inhibidor.

En resumen, mediante técnicas de biología molecular y de electrofisiología pudimos caracterizar canales aniónicos funcionales en las células BeWo:

- ▮ Las células cultivadas en condiciones control (sin estímulos) presentan corrientes totales de cloruro no rectificantes que no muestran dependencia de su intensidad de corriente con el tiempo, con las soluciones utilizadas. Las mismas son sensibles al bloqueante DPC, lo que indicaría la presencia de canales de cloruro en estas células.
- ▮ Se registró en más de la mitad de los parches exitosos, un canal de cloruro con rectificación saliente y una conductancia unitaria entrante de 15 pS, una conductancia saliente de 48 pS, y un E_r cercano a cero (-2.3 mV) en condiciones de Cl^- simétricas. Este canal no es sensible a concentraciones de Ca^{2+} intracelular.
- ▮ El reemplazo del sodio intracelular por NMDG no produjo cambios significativos en las corrientes para cada pulso de voltaje aplicado, ni en las conductancias entrante y saliente, ni en el E_r , ni en la P_o , con respecto a las condiciones control (solución simétrica de NMDG-Cl 140 mM), indicando la naturaleza aniónica del canal.
- ▮ La permeabilidad relativa a los distintos aniones estudiados asociada a la corriente observada, presentó un orden $I^- > Cl^- > F^- > gluconato$, sin presentar cambios significativos en las conductancias, ni en el E_r .
- ▮ La actividad del canal con rectificación saliente aumentó en condiciones control, a potenciales positivos, observándose una dependencia en este rango, de la P_o con el voltaje aplicado.

- ✚ La glibenclamida produjo una reducción de la P_o de manera dosis-dependiente del canal con rectificación saliente. La reducción (~40 %) con 50 μM de glibenclamida del lado citoplasmático se presentó de manera independiente del potencial de membrana aplicado, si bien acompañó la dependencia previamente observada en la situación control, para todos los potenciales estudiados.
- ✚ El DPC también produjo un bloqueo (30-50 %) del canal que se evidencia como una disminución de la P_o , sin afectar la amplitud de la corriente unitaria, siguiendo la dependencia del potencial de membrana observado previamente.
- ✚ Todas las características mencionadas concuerdan con las esperadas para el canal ORCC.
- ✚ Tanto el ARNm como la proteína de CFTR se expresan en la línea celular BeWo. Esto indicaría que el patrón de corriente activado por forskolina observado en los ensayos de canal único, compatible con las características de CFTR, podrían deberse a la actividad de este canal. Los datos arrojaron un canal con una conductancia unitaria baja de ~ 12 pS, y un E_r cercano a 0 mV, esperable para soluciones simétricas de Cl^- . La caracterización del ORCC por biología molecular no fue posible ya que este canal no se encuentra clonado hasta el momento.
- ✚ Utilizando un inhibidor específico para CFTR, se evidenció mediante la técnica de célula entera, que las corrientes de cloruro por CFTR sensibles a forskolina disminuyen en su presencia. Todas estas evidencias nos indican que el canal CFTR se expresa en la línea celular BeWo, y es funcional, similar a lo que ocurre en el tejido placentario descrito por otros autores.

➤ La proliferación y viabilidad de células BeWo disminuye a medida que se aumenta la concentración de inhibidores de canales de cloruro como glibenclamida, DPC, o DIDS, así como con el inhibidor específico CFTR_{inh}-172.

2. CANAL DE SODIO EPITELIAL ENAC Y SU PARTICIPACIÓN EN LA MIGRACIÓN CELULAR EN CÉLULAS DERIVADAS DE TROFOBLASTO HUMANO.

La correcta implantación de un embrión humano requiere de la puesta en marcha de una variedad de funciones celulares, entre ellas la invasión de las células del trofoblasto en el endometrio. La migración celular y el avance de estas células en el tejido materno debe ser un proceso controlado, dado que invasiones deficientes o excesivas pueden resultar en complicaciones gestacionales que disminuyen el éxito de la implantación (Rahnama y col., 2006). Nuestro interés radica en saber si en las células derivadas de trofoblasto humano (BeWo), que expresan ENaC (del Mónaco y col., 2008a), el canal también participaría en la migración celular o aportaría en el control del proceso invasivo de las mismas.

2.1. La aldosterona participa en la reparación de la herida en células BeWo

En este trabajo, aplicamos la técnica de reparación de la herida (*wound healing*) (Cory, 2011) en monocapas de células BeWo para estudiar los procesos de migración celular. Para ello sembramos monocapas de BeWo hasta lograr la confluencia y realizamos una herida en la monocapa con un tip de 200 μ l, (ancho de \sim 400 μ m). Esto dejó un espacio claro sobre la monocapa, para ser rellenado por las células y el borde de la herida sirvió como línea de comienzo de la migración. El espacio claro fue visualizado bajo el microscopio y fotografiado para estudiar la habilidad que tienen las células para llenar el área de la herida. A partir de ese momento, considerado como tiempo 0, las células se cultivaron con distintos tratamientos: aldosterona 100 nM, amiloride 10 μ M, aldosterona 100 nM + amiloride 10 μ M y un grupo control sin estímulo (incubado con los vehículos). Con el estímulo hormonal sabemos que aumenta la expresión y actividad del canal. El amiloride, bloqueante del ENaC, debe inhibir la actividad del canal y posiblemente revertir el efecto estimulador de la aldosterona.

Se tomaron fotografías en los tiempos 0 y 6 horas. En cada imagen se estimó el ancho de la herida, utilizando el programa ImageJ 1.39 (Image Processing and Analysis in Java, NHI, Maryland, EEUU), y los resultados se expresan como porcentaje de reinvasión de la herida con respecto al tiempo 0. El cierre de la herida puede deberse a dos procesos conjuntos: migración celular y proliferación celular, y esta última podría enmascarar la contribución del proceso de migración celular al cierre de la herida (Grifoni y col., 2006). Por lo tanto, decidimos tomar como referencia las seis horas posteriores a realizada la herida. En ese tiempo se espera poder medir migración celular independizándonos de la proliferación celular que podría influir también en los resultados, y que toma más tiempo en producirse. Ayudamos también a minimizar el proceso proliferativo manteniendo las células durante los experimentos con medio de cultivo suplementado con menor porcentaje de suero fetal bovino (SFB) (1%) que el medio de cultivo habitual (Grifoni y col., 2006). La figura 44 muestra fotografías representativas obtenidas durante los experimentos y bajo los distintos tratamientos analizados.

Los valores promedio obtenidos a las 6 h de 16 experimentos se muestran en la figura 45.A. Las células BeWo migraron cubriendo el 20.6 ± 7.0 %, 38.0 ± 5.4 %, 16.6 ± 4.8 % y 13.7 ± 3.6 % de la herida cuando fueron cultivadas bajo condiciones control, aldosterona, aldosterona más amiloride, y amiloride solo, respectivamente. Las células que fueron tratadas sólo con aldosterona presentaron un incremento significativo en la reparación de la herida ($p < 0.05$), y este efecto se revirtió cuando se agregó el bloqueante amiloride, sólo, o en combinación con aldosterona ($p < 0.05$, $n=16$). Las células tratadas con los dos estímulos, no presentaron diferencias significativas con respecto al control, indicando que el bloqueante estaría inhibiendo la actividad del ENaC estimulada por aldosterona.

Para confirmar que la proliferación celular no estaba influyendo en los resultados de reparación de la herida, medimos la proliferación celular por el ensayo de MTT, con los mismos tratamientos. La reducción del compuesto se lleva a cabo sólo cuando la enzima reductasa mitocondrial está activa, por lo tanto el monitoreo de la reducción

obtenida en cada tratamiento puede ser directamente relacionado al número de células viables. La proliferación se calculó como porcentaje del control (expresados como media \pm DS).

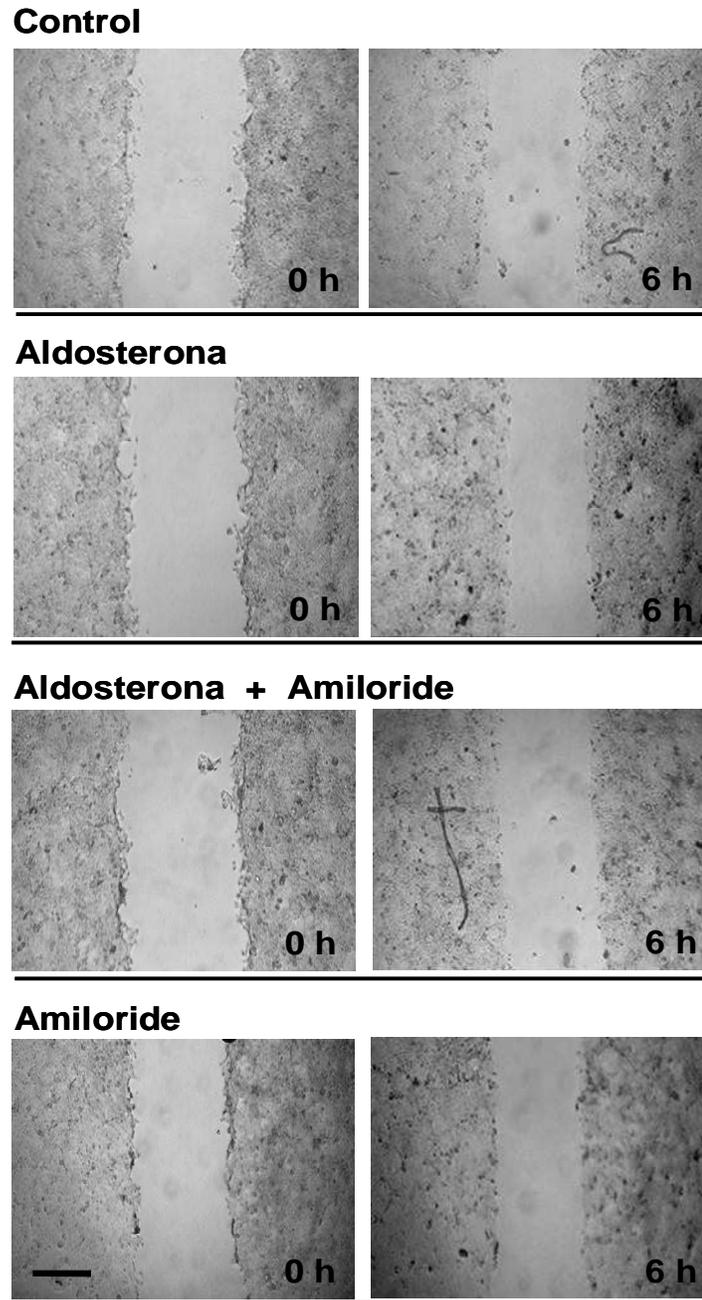
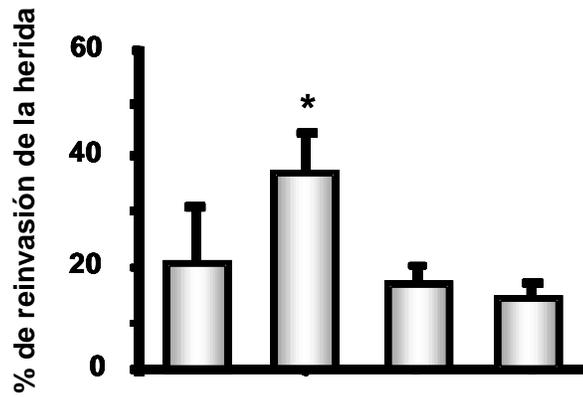


Figura 44. Ensayo de migración celular (*wound healing*). Imágenes de monocapas de células BeWo cultivadas en condiciones control, 100 nM de aldosterona, 100 nM de aldosterona y 10 μ M de amiloride, y cultivadas con 10 μ M de amiloride solamente, luego de realizada la herida. Las fotos se tomaron al comienzo del experimento (izquierda) y a las 6 horas (derecha). En cada imagen se estimó la distancia entre los bordes de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de reinvasión de la herida comparados con el tiempo 0, para evaluar la migración celular. La barra representa 200 μ m.

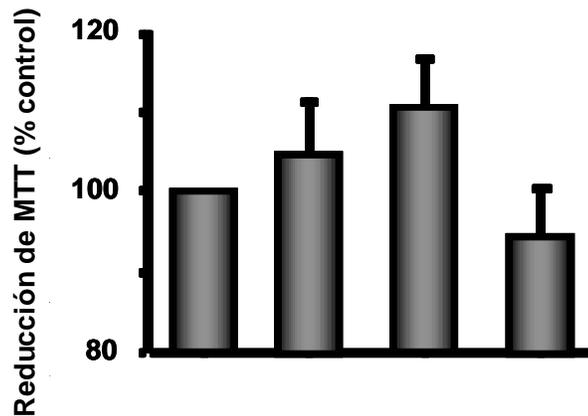
La figura 45.B muestra los resultados obtenidos a las 6 horas de experimento. Ninguno de los tratamientos estudiados presentó diferencias significativas en cuanto a la reducción de MTT con respecto a las células cultivadas sin suplementos, considerado como 100 % de reducción (105.2 ± 6.5 % para células cultivadas con aldosterona, 110.8 ± 9.0 % para células cultivadas con aldosterona y amiloride, y 94.4 ± 5.4 % para células cultivadas con amiloride; $p > 0.05$, $n = 21$). Es importante remarcar que, el tratamiento con aldosterona que generó una migración acelerada significativa en el experimento de *wound healing*, no presentó una proliferación aumentada con respecto al tratamiento control. Esto indicaría que son las células en proceso de migración las que aceleran el cierre de la herida bajo estas condiciones.

A



Aldosterona	-	+	+	-
Amiloride	-	-	+	+

B



Aldosterona	-	+	+	-
Amiloride	-	-	+	+

Figura 45. Migración y proliferación celular a las 6 h de realizada la herida. A. Porcentaje de reinvasión de la herida en los cuatro tratamientos realizados. Las células cultivadas con aldosterona cerraron un mayor porcentaje de la herida que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$, $n = 16$). **B.** Viabilidad celular por el ensayo de MTT para medir crecimiento celular. Los resultados se expresaron como porcentaje de la reducción de MTT (comparado con el tratamiento control). La reducción tiene lugar sólo cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas, y por lo tanto, la conversión puede ser relacionada directamente con el número de células viables (vivas). No se observaron diferencias en la reducción entre los tratamientos ($n=12$). El asterisco indica la diferencia significativa con respecto al control.

2.2. ENaC participa en la reparación de la herida en células BeWo

2.2.1. Oligonucleótidos antisentido contra α -ENaC

Para determinar si ENaC estaba participando en el efecto observado de reparación de la herida, las células BeWo fueron tratadas con oligonucleótidos sentido y antisentido contra la secuencia AUG de α -ENaC. Los experimentos se llevaron a cabo como se describió previamente, agregando los oligonucleótidos a los tratamientos. La figura 46.A muestra que las células tratadas con la secuencia antisentido evidenciaron una reducción en la migración comparadas con las células tratadas con oligonucleótidos sentido o células sin el tratamiento con oligonucleótidos que sólo recibieron el tratamiento hormonal ($30.2 \pm 3.7 \%$, $17.6 \pm 1.3 \%$, $27.5 \pm 1.5 \%$ y $20.2 \pm 1.5 \%$ de reinvasión de la herida con aldosterona, aldosterona más antisentido, aldosterona más sentido, y control, respectivamente, $p < 0.001$, $n=16$). Además, las células tratadas con el antisentido se comportaron de manera similar a las células cultivadas sin el estímulo con aldosterona ($p > 0.05$, $n=16$). Estos resultados sugieren que el canal podría estar participando en el proceso de reparación de la herida observado en las células tratadas con aldosterona.

Para confirmar que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido redujo la expresión de la subunidad α -ENaC en las células BeWo, obtuvimos extractos de proteínas totales de estas células para llevar a cabo estudios de Western blot. Observamos que el tratamiento con antisentido redujo la expresión del polipéptido de 30 KDa, en comparación con las células tratadas con aldosterona o aldosterona más oligonucleótidos sentido (figura 46.B) Este polipéptido corresponde al fragmento proteolítico N-terminal α -ENaC observado previamente por nuestro grupo y es el necesario para que el canal esté activo (del Mónaco y col., 2008a).

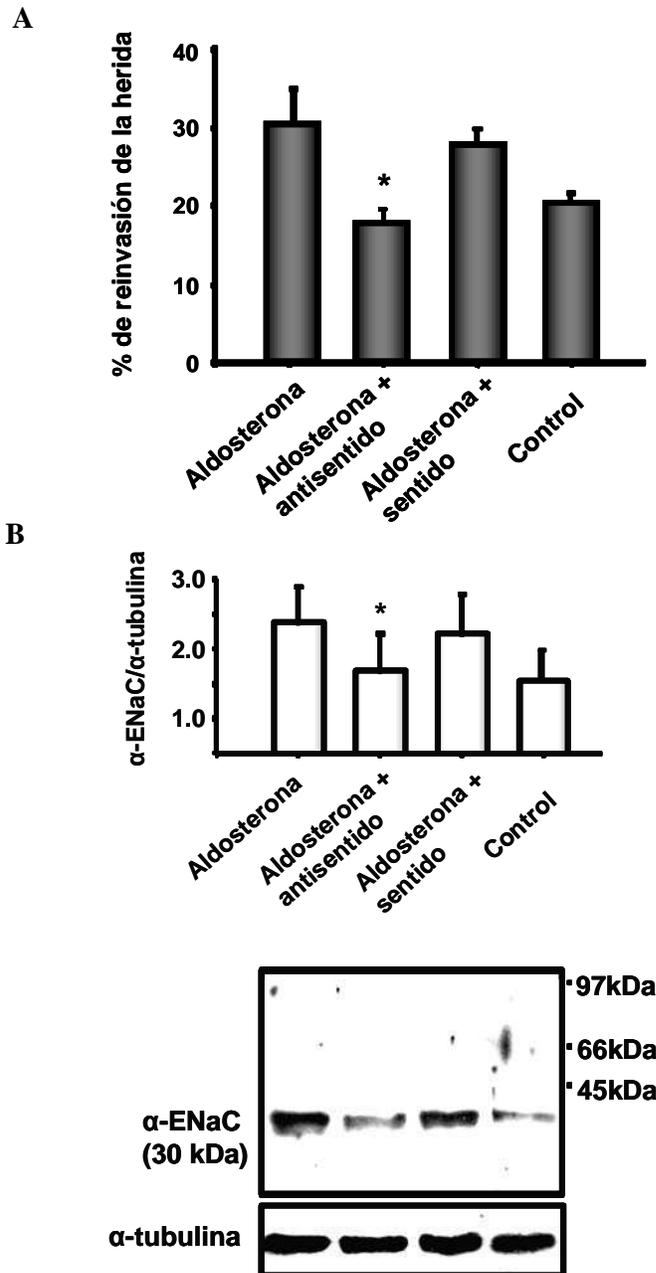


Figura 46. Los oligonucleótidos antisentido de α -ENaC inhiben la capacidad migratoria de células BeWo. A. Ensayo de reparación de la herida con células tratadas toda la noche con oligonucleótidos sentido y antisentido, dirigidos contra el sitio de iniciación de la traducción de α -ENaC. El tratamiento con antisentido produjo una reducción en la migración celular después de la lesión comparados con las células tratadas con oligonucleótidos sentido y las células sin tratar ($p < 0.001$, $n = 16$). **B.** Se analizó la expresión de la subunidad α -ENaC por Western blot de lisados totales de células BeWo después de cada tratamiento. Las células tratadas con antisentido evidenciaron una reducción en la expresión de α -ENaC comparable con el control. El nivel relativo de la proteína en cada tratamiento, utilizando α -tubulina como control interno, se representa en el gráfico de barras superior ($n = 3$). Se muestra un gel representativo en la parte inferior. El asterisco indica la diferencia significativa con respecto al tratamiento con aldosterona sola y con oligonucleótidos sentido.

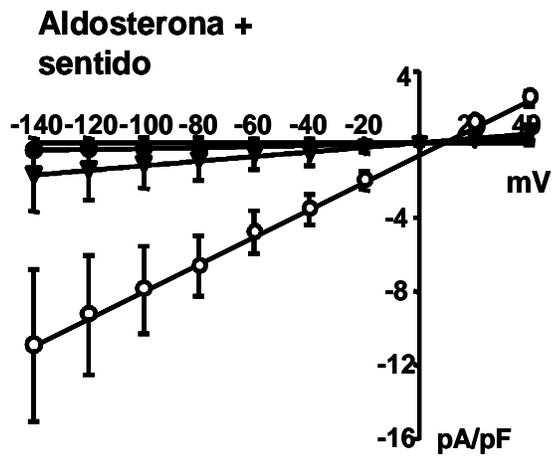
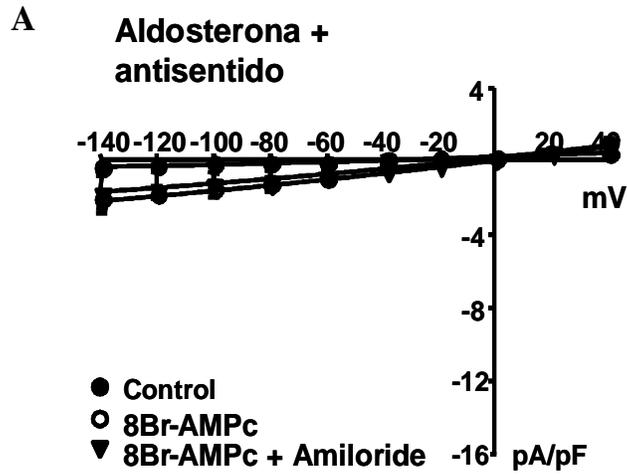
Realizamos experimentos control con IgG normal de conejo para confirmar la especificidad de la banda obtenida (datos no mostrados).

2.2.2. Estudios de corrientes de célula entera en células BeWo tratadas con oligonucleótidos contra α -ENaC.

Para determinar si el tratamiento con oligonucleótidos contra ENaC generaba un efecto fisiológico en las células BeWo, determinamos la actividad de corriente por *patch clamp* en células tratadas con oligonucleótidos midiendo las corrientes totales en respuesta a pulsos despolarizantes e hiperpolarizantes. Utilizamos 8Br-AMPC, un análogo de AMPc, permeable a la membrana, para inducir la exposición del canal a la superficie celular (Butterworth y col. 2005). La figura 47.A muestra las densidades de las corrientes promedio (corriente por unidad de la capacitancia de membrana, pA/pF) en función del voltaje en células cultivadas con oligonucleótidos antisentido (n=3) u oligonucleótidos sentido (n=4), ambos suplementados con aldosterona. Las densidades de corrientes fueron medidas antes y después de la estimulación con 100 μ M de 8Br-AMPC y después de agregar 10 μ M de amiloride a la solución del baño (con AMPc). No se observaron diferencias significativas en la corriente sensible al amiloride con el tratamiento con antisentido con respecto al control (células tratadas con aldosterona). Por otro lado, cuando las células fueron cultivadas con oligonucleótidos sentido, la activación por AMPc se observó como el componente de la corriente sensible al amiloride (figura 47.B).

2.2.3. Expresión de ENaC en la herida

Realizamos estudios de inmunocitoquímica, y observamos que las tres subunidades de ENaC se expresaban más abundantemente en el borde guía de la herida 3 horas después de realizado el daño (figura 48). Evaluamos la intensidad de fluorescencia usando un software de procesamiento de imágenes, midiendo la intensidad en escala de grises en una línea perpendicular a la línea de la herida. El pico de



B

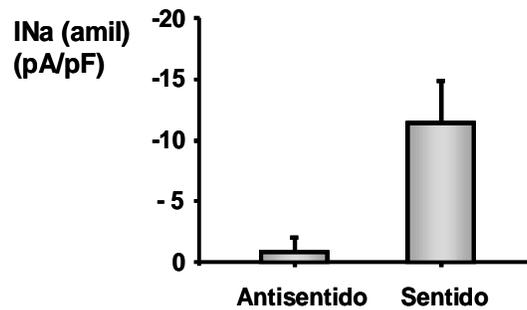


Figura 47. Corrientes de célula entera en células BeWo tratadas con oligonucleótidos. A. Relación entre la densidad de corriente y los voltajes aplicados en células tratadas con aldosterona, y oligonucleótidos antisentido (arriba) o sentido (abajo). Las células tratadas con sentido mostraron un incremento significativo de las corrientes en presencia de AMPC, y se bloqueó por amiloride. En cambio, en presencia de antisentido no se observa este incremento. **B.** Corriente sensible al amiloride ($I_{Na} \text{ (amil)}$) (corriente porpara el pulso -140 mV en las dos condiciones arriba mencionadas).

intensidad de fluorescencia fue registrado en pixeles entre los límites de la herida (tramas de abajo).

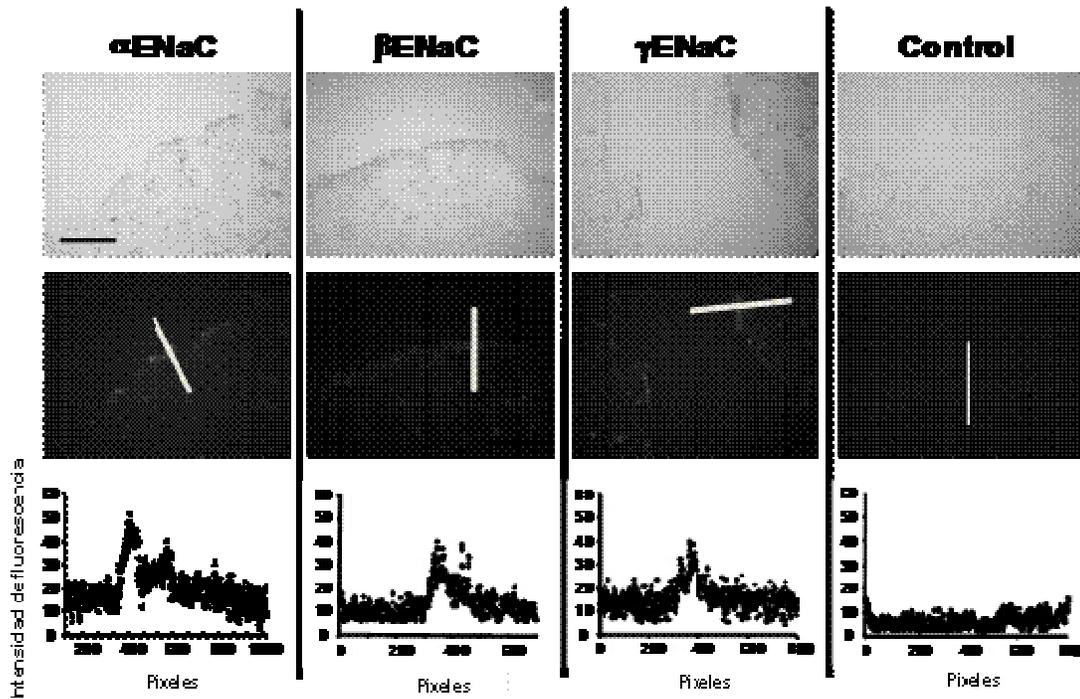


Figura 48. Expresión de ENaC en la herida. Imágenes de capas epiteliales de células BeWo cultivadas con 100 nM de aldosterona y con la lesión. Las monocapas fueron fijadas y teñidas 3 h después de realizada la herida. Cada columna muestra el resultado utilizando un anticuerpo diferente para las subunidades de ENaC y el control (sin anticuerpo primario). La imagen de arriba muestra una imagen de contraste de fase de la monocapa herida. Barra negra = 50 μ M. La imagen muestra la inmunofluorescencia para la misma región estudiada en la imagen de arriba. La barra blanca representa la longitud de trazado para la intensidad de fluorescencia, mostrado en la imagen de abajo. Los resultados indican un incremento en la fluorescencia de la subunidad observada a lo largo del borde de la herida.

En nuestros estudios empleamos 100 nM de aldosterona debido a que está dentro del rango utilizado por otros autores siendo la menor concentración utilizada alrededor de 10 nM, y 1.5 μ M la mayor (ejemplo, McEneaney y col., 2008; Helms y col., 2005).

Las concentraciones de aldosterona plasmática se incrementan en el embarazo desde un valor control (en posición supina) de 0.25 nM/l a 2.5 nM/l a las 30-37 semanas

de embarazo (Elsheikh y col., 2001, Pojoga y col., 1998). La concentración de aldosterona se reduce en un 50 % en la preeclampsia (Walker y col., 1995).

Evaluamos el efecto de aldosterona también a concentraciones más bajas, distintas a 100 nM. A concentraciones menores, la aldosterona, afectó la reparación de la herida sólo a las 12 h después de realizar el daño, en comparación con el tratamiento control (20.5 ± 0.9 % (10 nM), 22.5 ± 1.1 (50 nM) y 15.8 ± 0.3 % (control), $p < 0.05$, $n=10$) no viéndose afectada la proliferación celular (datos no mostrados).

2.3. La aldosterona y el AMPc incrementan la actividad de reparación de la herida

Se realizaron experimentos de reparación de la herida siguiendo el protocolo explicado previamente, y tratando a las células con 8Br-AMPc para evaluar un posible efecto sinérgico entre la aldosterona y el AMPc en este proceso. Como se explicó anteriormente, el 8Br-AMPc es un análogo de AMPc. Este incrementa el número de canales en la membrana apical, por reclutamiento de ENaC de los *pooles* de almacenamiento subapicales a la membrana plasmática (Butterworth y col., 2005).

La figura 49 muestra ejemplos de monocapas de células BeWo con la herida a los tiempos 0 y 6 h, para los diferentes tratamientos: células sin estimular, células estimuladas con 100 nM de aldosterona (12 h), células estimuladas con 100 μ M de AMPc (30 min) y células tratadas con aldosterona más 100 μ M de AMPc. Las células BeWo migraron cubriendo 12.4 ± 2.7 %, 25.3 ± 4.5 %, 10.6 ± 3.8 % y 45.1 ± 2.0 % de la herida cuando fueron cultivadas con los tratamientos control, aldosterona, AMPc, y aldosterona más AMPc, respectivamente. Cuando las células fueron tratadas con aldosterona, observamos un aumento significativo en la reparación de la herida con respecto al control ($p < 0.05$, $n=12$), como describimos previamente, y, las células tratadas con ambos estímulos (aldosterona más AMPc) mostraron un comportamiento mayor en la cicatrización de la herida, que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$, $n=12$) (figura 50).

Para ver si la proliferación estaba influyendo en los resultados de reparación de la herida, medimos proliferación celular por la técnica de MTT, con los mismos tratamientos

(figura 51). Cuando las células fueron mantenidas en 1 % de concentración de SFB, no se observaron cambios significativos en la proliferación celular a las 6 h de cultivo para ninguno de los tratamientos con respecto al control ($p > 0.05$). Las células sin tratar (control) se consideraron como el 100 % de reducción de MTT, y luego 145.4 ± 37.5 %, 149.4 ± 38.6 % y 126.2 ± 32.6 % de reducciones de MTT fueron observadas para los tratamientos con aldosterona 100 nM, 8Br-AMPC 100 μ M, aldosterona 100 nM más 8Br-AMPC 100 μ M, respectivamente, con respecto a las condiciones control ($p > 0.05$, $n=15$).

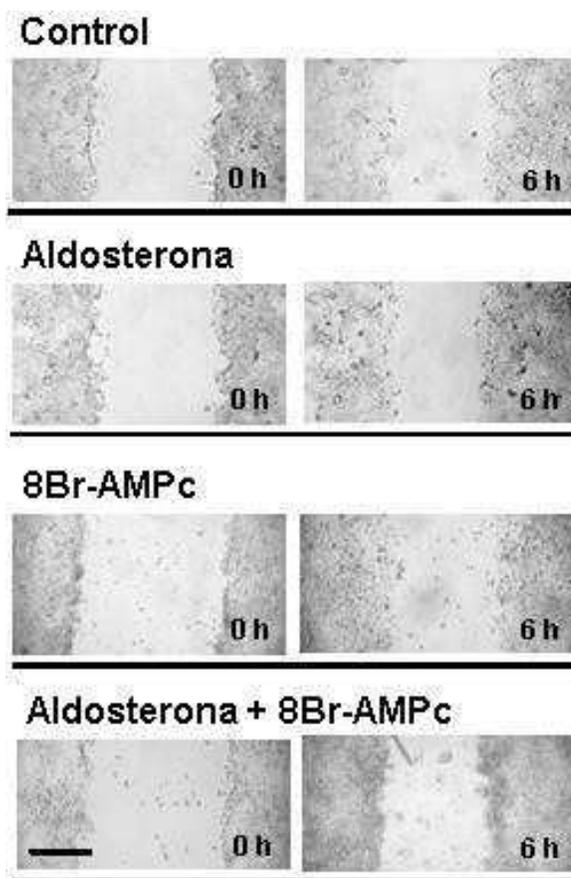


Figura 49. Migración celular después de la herida en células BeWo en presencia de aldosterona y AMPC. Imágenes representativas de monocapas de células BeWo cultivadas bajo diferentes tratamientos: condiciones control (vehículo), aldosterona 100 nM, 8Br-AMPC 100 μ M, y aldosterona 100 nM más 8 Br-AMPC 100 μ M. Las imágenes fueron tomadas en el momento de realizada la herida (tiempo 0) (izquierda) y 6 h más tarde (derecha).

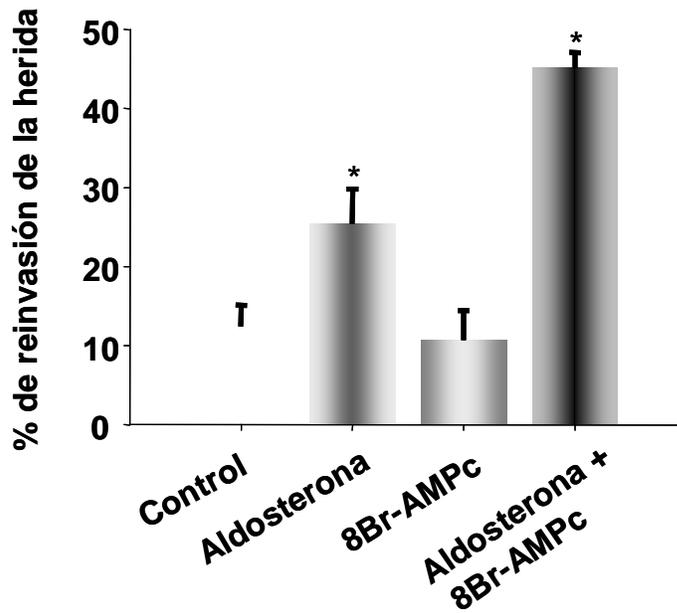


Figura 50. Porcentaje de reinvasión de la herida en células BeWo con aldosterona y AMPc. Las células tratadas con aldosterona más AMPc cerraron un mayor porcentaje de la herida que el resto de los tratamientos ($p < 0.05$, $n=12$). El asterisco indica la diferencia significativa con respecto al control.

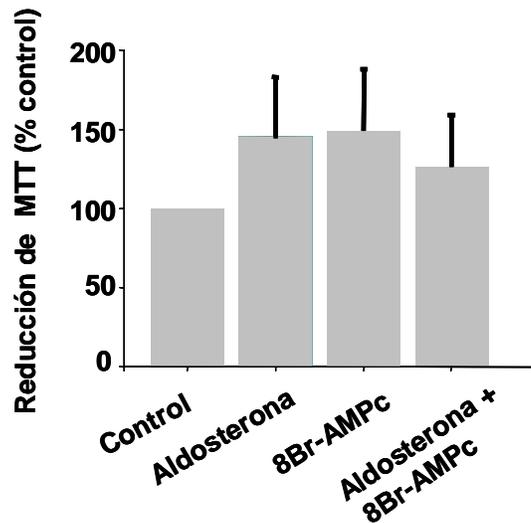


Figura 51. Viabilidad celular por el ensayo de MTT en células BeWo con aldosterona y AMPc. Los resultados se expresaron como porcentaje de la reducción de MTT (comparado con el tratamiento control). No se observaron diferencias en la reducción entre los tratamientos ($p > 0.05$, $n=15$).

2.4. La metilación afecta la capacidad migratoria a través del canal ENaC en células BeWo.

2.4.1. 3-DZA disminuye el porcentaje de reinvasión de la herida de manera dependiente de la concentración.

Debido a que la acción de la aldosterona parece implicar un mecanismo que lleva a la metilación en el proceso de regulación de ENaC, y el canal participa en la migración de células BeWo, realizamos experimentos para ver si la reacción de metilación podría estar involucrada en el proceso de reparación de la herida. Para esto, utilizamos un inhibidor de las reacciones de carboximetilación, 3-deazaadenosina (3-DZA), análogo carboxílico de la adenosina, que bloquea los efectos de la aldosterona en otros sistemas (Edinger y col., 2006; Beccetti y col., 2000). 3-DZA es una droga permeable a la membrana, que bloquea las reacciones de transmetilación inhibiendo específicamente la enzima S-adenosil-homocisteína hidrolasa (SAHH), y de esta manera promueve la acumulación de S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) y deaza-D-adenosilhomocisteína, lo cual produce la inhibición del producto final de las metiltransferasas dependientes del donante de metilos S-adenosilmetionina (AdoMet).

La figura 52 muestra fotografías representativas de monocapas (figura 52.A) y el porcentaje de reinvasión de la herida (figura 52.B) en células BeWo tratadas con aldosterona más AMPc, y expuestas a 200 μ M de 3-DZA. Claramente, la co-administración de 3-DZA (200 μ M) redujo el comportamiento de cicatrización de la herida observado en la incubación solamente con aldosterona más AMPc (12.4 ± 2.7 , 45.1 ± 2.0 , y 12.9 ± 1.5 % de reinvasión de la herida cuando las células fueron incubadas en condiciones control, con aldosterona más AMPc, y aldosterona más AMPc más 200 μ M de 3-DZA, respectivamente). El estímulo con 3-DZA no mostró diferencias significativas con las muestras control, indicando que el bloqueante revirtió el efecto de la hormona.

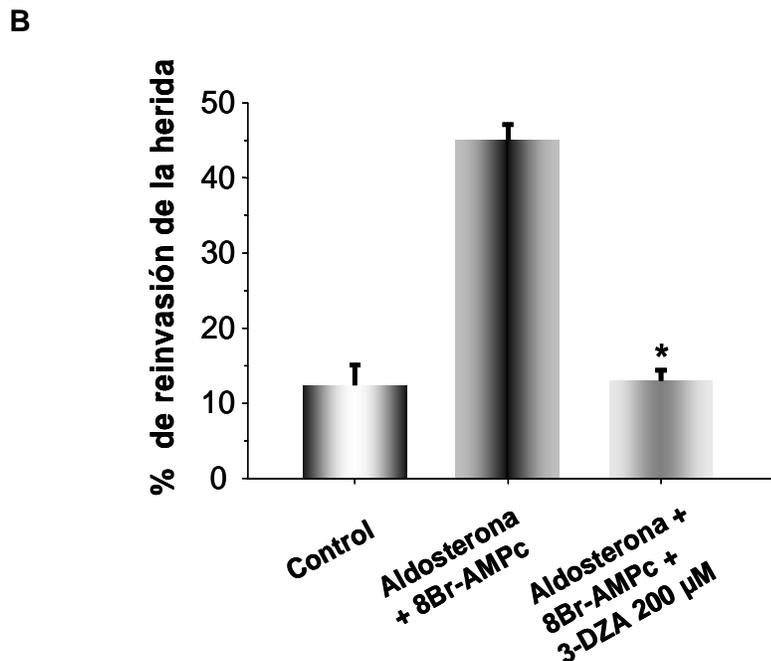
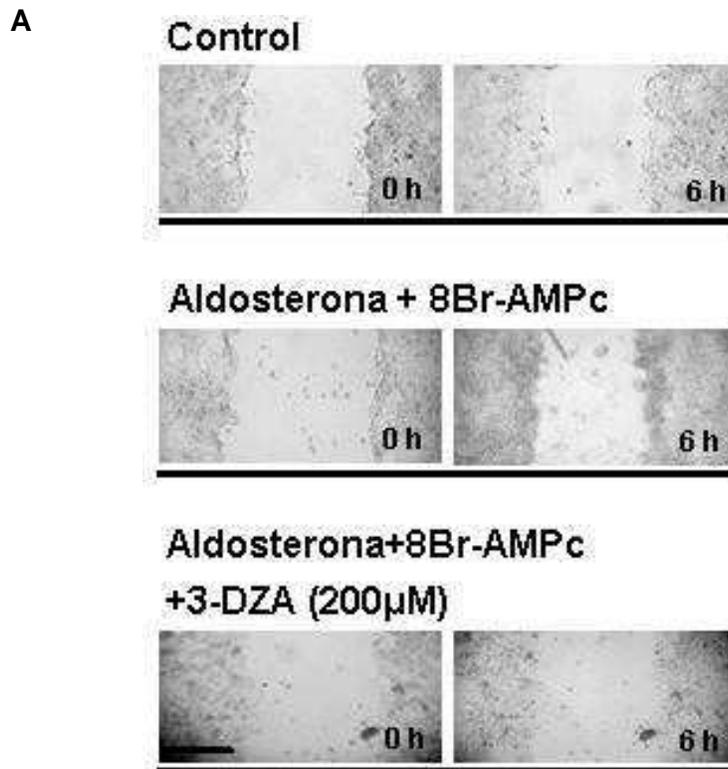


Figura 52. Ensayo de reparación de la herida en células tratadas con 3-DZA.
A. Imágenes de monocapas de células BeWo cultivadas bajo condiciones control (vehículo), aldosterona más 8Br-AMPC 100 µM, y aldosterona, 8Br-AMPC y 200 µM de 3-DZA. Las fotografías fueron tomadas en el momento de realizada la herida (tiempo 0) y 6 h más tarde. **B.** Porcentaje de reinvasión de la herida para los tratamientos estudiados. Las células tratadas con 3-DZA cerraron un menor porcentaje de la herida en comparación con el tratamiento con aldosterona y AMPc ($p < 0.05$, $n = 12$). El asterisco indica la diferencia significativa con respecto al tratamiento con aldosterona más AMPc.

La figura 53.A muestra que 3-DZA redujo la reinvasión de la herida de las células BeWo de una manera dependiente de la concentración del inhibidor, después de 6 h de tratamiento. La concentración de 3-DZA a la cual la reinvasión de la herida se reduce a la mitad (IC_{50}) fue de $47.5 \pm 6.0 \mu M$ ($n=12$). La proliferación celular no cambió para ninguna de las concentraciones testeadas de 3-DZA ($p > 0.05$, $n=11$) (figura 53.B).

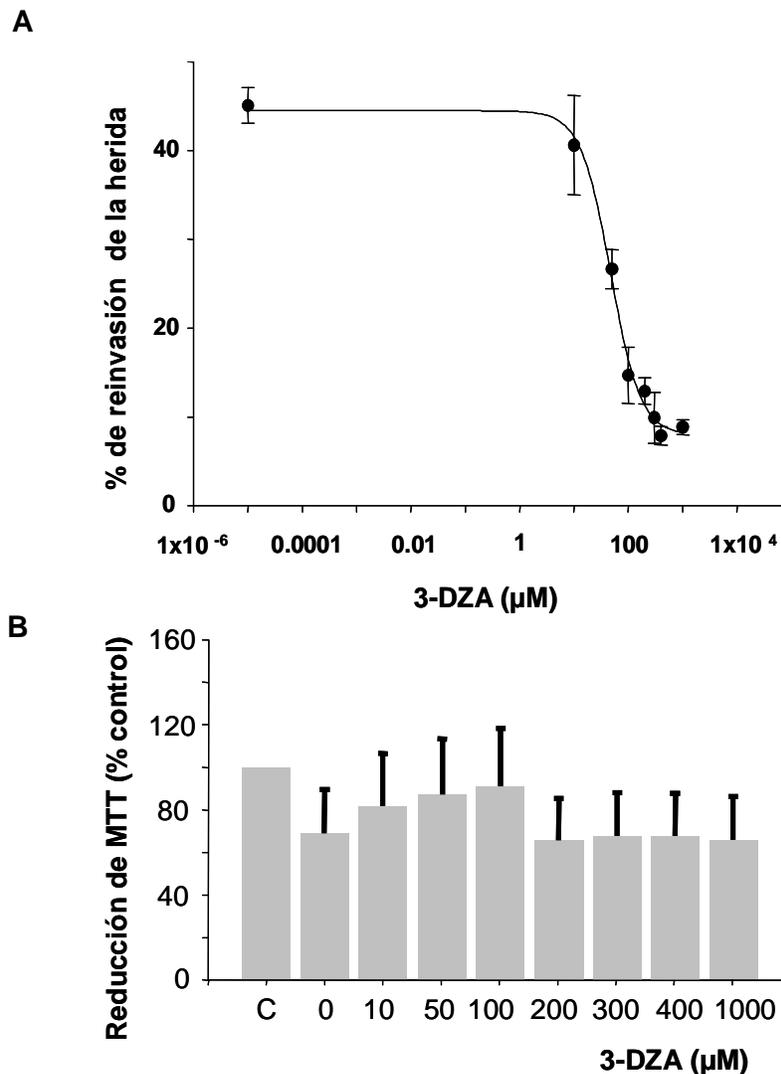


Figura 53. A. El efecto de 3-DZA sobre la migración celular fue evaluada por el ensayo de reparación de la herida en células BeWo tratadas con diferentes concentraciones de 3-DZA (10-1000 μM). Observamos una disminución en la migración celular a medida que se incrementaba la concentración de 3-DZA luego de las 6 h de incubación. La concentración de 3-DZA a la cual la migración celular se reduce a la mitad (IC_{50}) fue $47.5 \pm 6.0 \mu M$, con respecto al control. La curva de concentración es representativa de doce experimentos separados. **B.** La proliferación celular fue analizada después de las 6 h de incubación por el ensayo de MTT con las concentraciones crecientes de 3-DZA indicadas ($p > 0.05$, $n= 11$).

2.4.2. AdoMet incrementa el porcentaje de reinvasión de la herida

Los experimentos previos demostraron que la inhibición de las reacciones de metilación celulares reduce la actividad en las células BeWo en cuanto a la reparación de la herida. Para indagar sobre esto, las monocapas fueron expuestas al donante de metilos, AdoMet, proporcionando la activación de las metiltransferasas responsables de la reacción de metilación involucrada en el propio canal u otros componentes celulares no relacionados con la membrana apical, como la metilación de las histonas, que podría afectar la transcripción de proteínas involucradas en la migración celular. Observamos un aumento significativo en el comportamiento de reparación de la herida en las células tratadas con aldosterona, AMPc y 3-DZA, en presencia de 200 μ M de AdoMet, comparado con las células en ausencia del donante de metilos (27.3 ± 2.4 y 12.9 ± 1.5 % de reinvasión de la herida, respectivamente, $p < 0.05$) (figura 54).

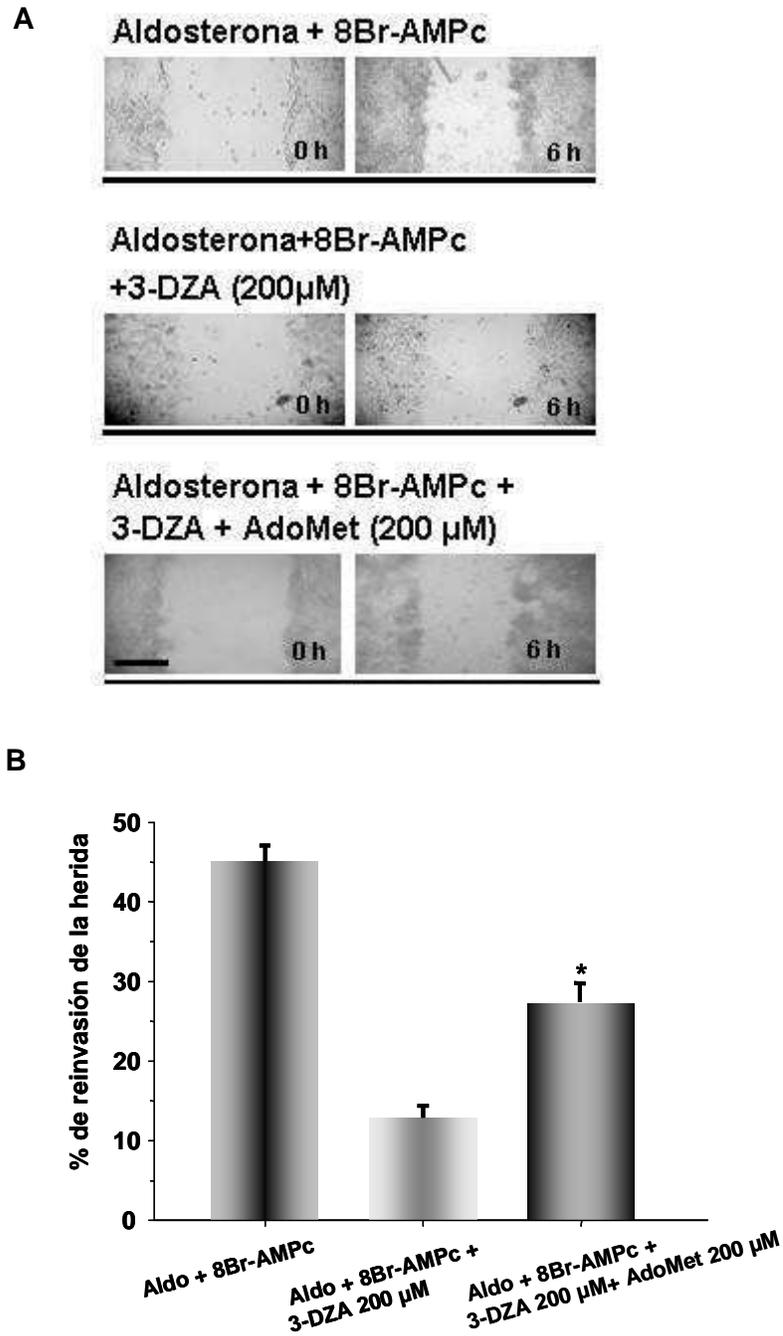
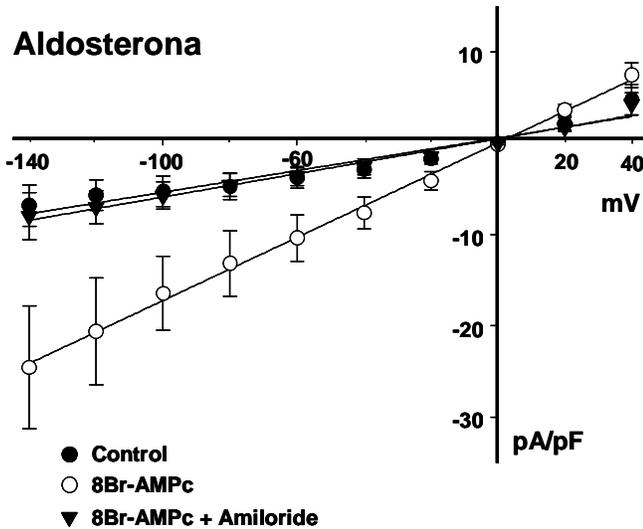
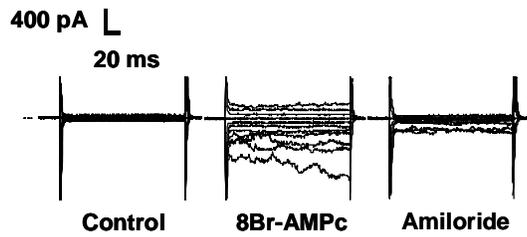


Figura 54. Ensayo de reparación de la herida en presencia de AdoMet. Arriba: Imágenes de monocapas de células BeWo cultivadas con aldosterona 100 nM y 8Br-AMPc 100 µM; aldosterona 100 nM y 8Br-AMPc 100 µM más 3-DZA 200 µM, y en estas mismas condiciones más AdoMet 200 µM. **Abajo:** Porcentaje de reinvasión de la herida para los tratamientos estudiados. La presencia de AdoMet provocó el cierre de un mayor porcentaje de la herida que el tratamiento con 3-DZA en ausencia del dador de metilos ($p < 0.05$, $n = 10$). El asterisco indica la diferencia significativa con respecto al tratamiento con 3-DZA.

2.4.3. 3-DZA reduce las corrientes sensibles al amiloride sin cambios en la expresión de ENaC

Para estudiar más sobre el efecto de la metilación, evaluamos la actividad de ENaC midiendo las corrientes iónicas con la técnica *de patch clamp* en la configuración de célula entera. Para estos experimentos, registramos corrientes basales totales en respuesta a pulsos depolarizantes e hiperpolarizantes en la configuración de célula entera en células BeWo tratadas con aldosterona en ausencia y presencia de 200 μM de 3-DZA. La figura 55 muestra las densidades de corriente (pA/pF) medidas antes y después de la estimulación con 100 μM de 8Br-AMPC y después del agregado de 10 μM de amiloride a la solución del baño (con AMPC) en ausencia (A) y presencia (B) de 3-DZA. Observamos una disminución en las corrientes en cada pulso aplicado después de agregar AMPC a la solución de baño cuando 3-DZA estaba presente comparado con la ausencia del inhibidor ($p < 0.05$). En ambos casos hubo una reducción significativa después de la adición de amiloride ($p < 0.05$).

A



B

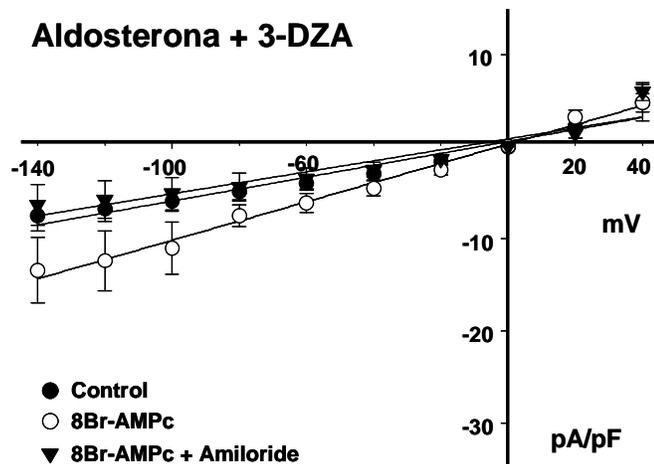


Figura 55. Corrientes de célula entera en células BeWo tratadas con 3-DZA. **A.** *Panel de arriba:* registros representativos de corrientes de célula entera en BeWo incubadas con aldosterona con los diferentes tratamientos: mantenidas bajo condiciones control, en presencia de 8Br-AMPC, y con 8Br-AMPC más amiloride. *Panel de abajo:* relación entre la densidad de corriente (corriente por unidad de de capacitancia de membrana, pA/pF, media \pm DS) y el voltaje en células cultivadas para cada condición (n=6). Las células mostraron un incremento en la corriente en cada pulso aplicado cuando fueron expuestas a 8Br-AMPC (p<0.05), y esta corriente fue bloqueada luego con amiloride (p<0.05). **B.** Curva I-V de células BeWo cultivadas con aldosterona y 200 μ M de 3-DZA mantenidas bajo condiciones control, en presencia de 8Br-AMPC, y con 8Br-AMPC más amiloride (n=5). Las células tratadas con 3-DZA mostraron una reducción en la activación de la corriente con respecto a las células sin tratar, en cada pulso aplicado cuando fueron expuestas a 8Br-AMPC.

Cuando las células fueron tratadas con 200 de μM AdoMet (más 3-DZA), observamos un incremento en las corrientes en comparación con las células tratadas sólo con 3-DZA (figura 56.A). Las corrientes de ENaC, estimadas como el componente sensible al amiloride ($\text{I}_{\text{Na}} (\text{ami})$), tuvieron un promedio de -15.0, -7.0, y -11.0 pA/pF para el pulso de -140 mV en condiciones control y en presencia de 3-DZA o AdoMet, respectivamente (figura 56.B).

Debido a que se produjo una inhibición de las corrientes sensibles al amiloride en presencia de 3-DZA, examinamos si este compuesto podría estar afectando la expresión total de las subunidades de ENaC durante el curso temporal de la acción de la aldosterona. Realizamos un análisis mediante el ensayo de Western blot en células cultivadas con y sin 3-DZA (200 μM) en presencia y ausencia de aldosterona y 8Br-AMPC. Observamos las bandas del peso esperado para las distintas subunidades de ENaC, incluyendo los dobletes para α - y γ -ENaC, que resultan del clivado proteolítico de la proteína (Hughey y col., 2003; Harris y col., 2007). La banda mayor no presentó cambios significativos para ninguno de los tratamientos (fragmentos de ~95 y ~93 kDa correspondientes a los pesos de las proteínas enteras de las subunidades α - y γ -ENaC respectivamente, datos no mostrados), como los dos productos de clivaje, ~30 y ~75 kDa respectivamente (figura 57.A y 57.C).

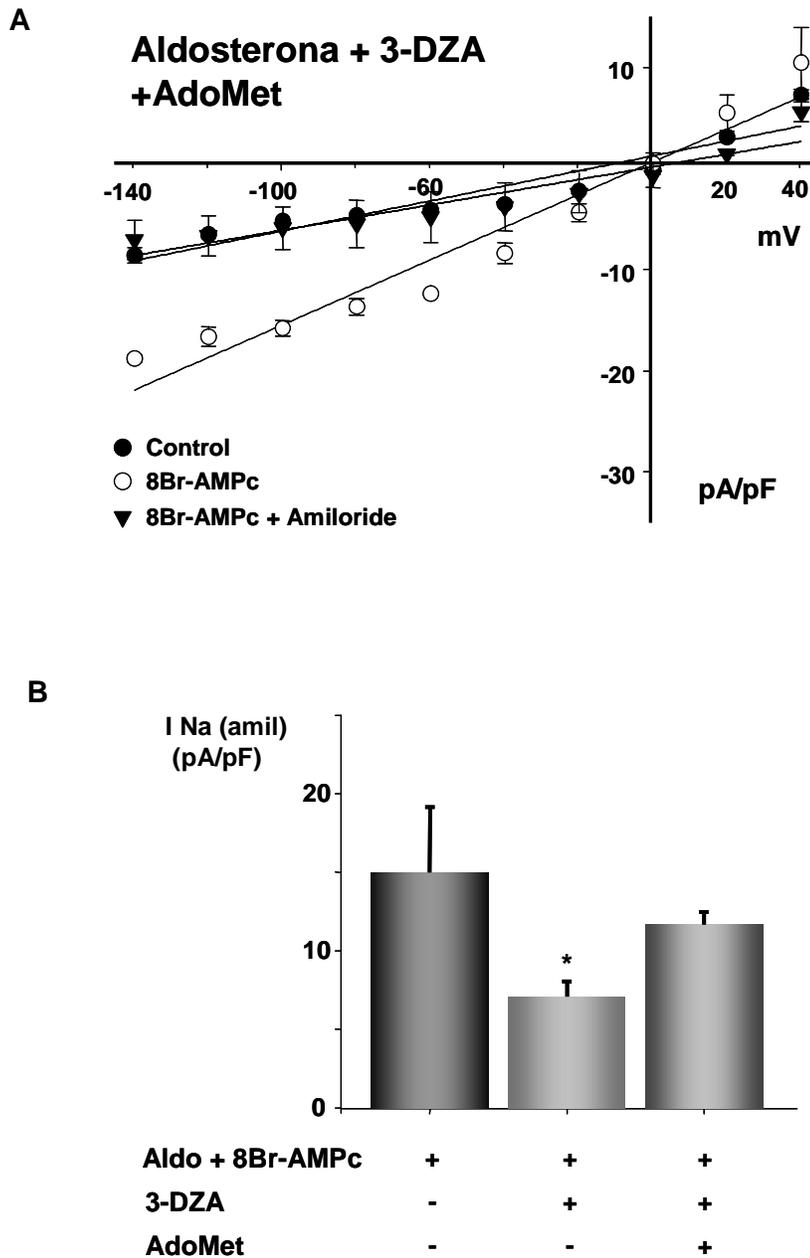


Figura 56. Corrientes de célula entera en células BeWo tratadas con 3-DZA y AdoMet. **A.** Curva I-V de células BeWo cultivadas con aldosterona y 200 μ M de 3-DZA en presencia de 200 μ M de AdoMet (n=3). **B.** Corriente sensible al amiloride ($I_{Na (amil)}$) (pA/pF, media \pm DS) para el pulso de -140 mV en células tratadas con aldosterona y 8Br-AMPC, en presencia de 3-DZA y/o AdoMet.

La banda de ~100 kDa de β -ENaC tampoco mostró cambios significativos para ninguno de los tratamientos aplicados (Figura 57.B).

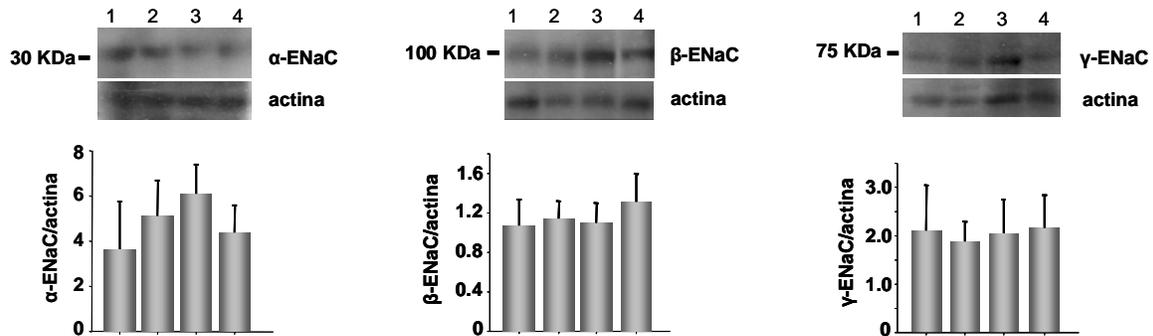


Figura 57. 3-DZA no afecta la expresión de la proteína. Las subunidades α (A), β (B) y γ -ENaC (C) fueron analizadas por Western blot de lisados totales de células BeWo después de cada tratamiento: condiciones control (calles 1); suplementadas con 100 nM de aldosterona por 12 h (calles 2); con aldosterona y AMPc 100 μ M (calles 3) y con aldosterona, AMPc y 3-DZA 200 μ M (calles 4). Las células tratadas con 3-DZA no evidenciaron cambios significativos en la expresión de ninguna de las tres subunidades. Los polipéptidos α y γ -ENaC corresponden a los fragmentos proteolíticos N-terminal y C-terminal, respectivamente, observados previamente por nuestro grupo (del Mónaco y col., 2008a). El nivel relativo de la proteína en cada tratamiento, utilizando actina como control interno, se representa en el gráfico de barras de abajo (n=4).

En resumen,

☛ Las monocapas de células BeWo estimuladas con aldosterona presentan un cierre de heridas más acelerado con respecto a las células cultivadas sin estímulo, o a las células expuestas al amiloride. El bloqueante podría inhibir la actividad del ENaC por la estimulación mediada por aldosterona.

☛ Las células tratadas con la secuencia antisentido para α -ENaC evidenciaron una reducción tanto en la migración de células BeWo, como en las corrientes de ENaC sensibles al amiloride comparadas con las tratadas con el oligonucleótido sentido, con un comportamiento similar a las células sin el estímulo. Además, el tratamiento con antisentido redujo la expresión de la subunidad α -ENaC en las células tratadas con aldosterona.

☛ Las tres subunidades de ENaC se expresan más abundantemente en el borde guía de la herida 3 horas después de realizado el daño.

☛ El tratamiento con aldosterona más AMPc mostró un comportamiento mayor en la cicatrización de la herida, que el resto de los tratamientos, posiblemente debido a un sinergismo entre ambos estímulos.

☛ La migración celular disminuye cuando las células (con aldosterona y AMPc) son expuestas al inhibidor de la metilación 3-DZA, en una manera dosis dependiente, siendo este efecto parcialmente revertido con la adición del donante de metilos AdoMet.

☛ Las corrientes de sodio sensibles al amiloride disminuyen en células tratadas con aldosterona y AMPc, en presencia de 3-DZA. Este efecto es parcialmente revertido después del tratamiento con AdoMet.

☛ El tratamiento con 3-DZA no produjo cambios en la expresión de las proteínas totales de ENaC, para ninguna de las tres subunidades.

☛ En todos los casos, los efectos sobre la cicatrización de la herida, dependen de la migración y no de la proliferación celular.

☛ Estos resultados sugieren que el canal podría estar participando en el proceso de reparación de la herida observado en las células tratadas con aldosterona, siendo este efecto revertido por amiloride, y sinergizado por AMPc. La metilación influye en el proceso de reparación de la herida por aldosterona y AMPc, así como en las corrientes mediadas por ENaC.

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis utilizamos técnicas de biología molecular y técnicas electrofisiológicas para estudiar el transporte iónico en células trofoblásticas. Caracterizamos dos canales encargados del transporte de cloruro, canal de cloruro con rectificación saliente (ORCC) y canal de regulación transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), y su papel en la proliferación de estas células. Además estudiamos la participación del canal epitelial de sodio (ENaC) en el proceso de migración celular, también presente en el sinciotrofoblasto (SCT) de placenta humana.

Para estudiar estas proteínas en el tejido placentario, necesitábamos un modelo de célula trofoblástica que resulte más adecuado. La utilización de una línea celular es indispensable para poder analizar la actividad de canales iónicos mediante la técnica electrofisiológica del *patch clamp* y para tal fin elegimos a la línea celular BeWo. Las células BeWo configuran una línea obtenida a partir de trofoblasto humano (Pattillo y Gey, 1968) y mantienen propiedades bioquímicas y morfológicas similares a las reportadas para el citotrofoblasto proliferativo *in utero* durante el último trimestre de embarazo. A su vez, pueden ser sincicializadas *in vitro* como ocurre con los cultivos primarios de citotrofoblasto, y presentan polarización celular apical/basolateral similar a los epitelios absortivos (Liu y col., 1997; Schmid y col., 2003).

Las células BeWo han sido utilizadas como modelo para la investigación de los mecanismos del transporte placentario (Campbell y col., 1997; Ellinger y col., 1999; Eaton y Sooranna, 2000; Huang y Swaan, 2001; Vardhana y Illsley, 2002; Schmid y col., 2003; Keating y col., 2006; Jones y col., 2006, del Mónaco y col., 2008a, Ramos y col., 2008) y en nuestro caso fueron utilizadas para estudiar las proteínas ORCC, ENaC y CFTR asociadas a sus membranas.

1. CORRIENTES DE CLORURO, CANALES ORCC Y CFTR EN LA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE TROFOBLASTO HUMANO (BEWO).

Cuando comenzamos nuestros estudios, nos interesó profundizar sobre la presencia de canales aniónicos en la línea celular BeWo. El único antecedente en el tema hasta el momento fue aportado por nuestro grupo sobre el estudio del canal de cloruro ORCC en estas células (Marino y col., 2010).

Demostramos que las células BeWo expresan de manera funcional el canal de sodio ENaC (del Mónaco y col., 2006 y 2008a). En los epitelios, el ENaC se colocaliza con frecuencia con canales aniónicos, y presenta una compleja regulación por el canal CFTR (Bachhuber y col., 2005; Rubenstein y col. 2011), el cual a su vez regula otros canales iónicos además del ENaC, como el ORCC por varios mecanismos (Kunzelman y col., 1999; Schwiebert y col., 1995).

En primera medida, y dado que los canales de Cl^- en las células BeWo no habían sido caracterizados con técnicas electrofisiológicas, evaluamos las corrientes Cl^- totales de las mismas en condiciones basales. Bajo la configuración de célula entera (*whole cell*) del *patch clamp* observamos corrientes totales espontáneas no rectificantes sin dependencia de su amplitud con el tiempo y con un potencial de reversión (E_r) cercano a 0 mV. La exposición de las células al bloqueante de canales de Cl^- difenilamina-2-carboxilato (DPC) produjo una disminución significativa de las corrientes basales (la máxima inhibición al pulso -80 mV fue de ~70 %). Esto indicaría la presencia de canales de Cl^- en estas células dadas las condiciones experimentales utilizadas.

En los experimentos de canal único encontramos en primer lugar un canal de Cl^- compatible con ORCC. El flujo de iones a través de este canal es rectificante, siendo la amplitud de las conductancias unitarias salientes tres veces mayor (~48 pS) que las entrantes (~15 pS). El E_r fue de ~-2 mV, valor consistente con el potencial de equilibrio de Nernst teórico para una corriente selectiva de Cl^- en concentraciones de Cl^- simétricas usadas a ambos lados de la membrana.

El canal es altamente selectivo al Cl^- con respecto al Na^+ . Esto lo evidenciamos reemplazando la NMDG del baño por concentraciones equimolares de Na^+ , y encontramos que no cambió la conductancia, el E_r , ni la probabilidad de apertura (P_o) del canal. Todos estos valores en presencia de Na^+ no fueron diferentes con respecto a los parches en ausencia de este ión. El canal presenta una baja permeabilidad a gluconato y F^- y una mayor permeabilidad a I^- , en comparación con Cl^- , y se inhibe por el hipoglucemiante glibenclamida y DPC. Estas características son consistentes con otros trabajos en células de epitelio aéreo (Solc y Wine, 1991), en las líneas celulares de colon humano T84 y HT29 (Frizzel y Halm, 1992; Tilmann y col., 1991), en células leucémicas K562 (Assef y col., 2002), así como en cardiomiocitos humanos (Demion y col., 2006; Liu y col., 2007).

Los estudios de las permeabilidades relativas a otros aniones con respecto al Cl^- , se realizaron con cambios en las soluciones intracelulares donde se reemplazó el Cl^- por gluconato, F^- o I^- . El reemplazo de Cl^- por gluconato o F^- desplazó el potencial de reversión E_r hacia valores más negativos y los valores de permeabilidad relativa observados para ambos casos fue de 0.23 y 0.34, es decir que en este canal el Cl^- es ~4 y 3 veces más permeable que el gluconato o el F^- , respectivamente. Al reemplazar el Cl^- intracelular por I^- la permeabilidad relativa fue de ~3 veces mayor que el Cl^- . Similares resultados fueron obtenidos por otros autores trabajando con ORCC en cardiomiocitos humanos (Demion y col., 2006). La selectividad encontrada en nuestros experimentos es comparable con la serie I de la teoría del equilibrio de intercambio de iones propuesta por Eisenman (1962), que dice que la selectividad de unión de un ión a un canal surge de la diferencia entre las energías de interacción del ión con el sitio del canal, y la energía de hidratación del ión. Cuando el ión hidratado se aproxima al canal, cuanto mayor es la interacción con el canal (mayor es la fuerza electrostática), más es la fuerza que se requiere para que el ión se deshidrate, por lo que el ión queda más retenido en el canal, y tiene menor permeabilidad. Cuanto menor es la energía de hidratación de un ión, más favorecido va a ser el pasaje de ese ión por el canal, es decir, va a tener mayor

permeabilidad (Hille, 1992). Por lo tanto, considerando nuestros resultados, el I^- tiene menor energía de hidratación (más fácil se deshidrata y permea más fácilmente) que el Cl^- , luego el F^- , y después el gluconato. Cuando el gluconato o el F^- se encontraban en la solución del baño (correspondiente al medio intracelular en la configuración de *inside out*) como aniones principales en reemplazo del Cl^- , la amplitud de la corriente fue menor a potenciales negativos con respecto al control (140 mM de NaCl). Al utilizar estas soluciones de reemplazo en el baño aumentó el gradiente químico del Cl^- favoreciendo así, su entrada a la célula. La corriente de un ión x (I_x) es igual a la conductancia de ese ión (g_x) por la fuerza impulsora del transporte de iones (*driving force*) ($E_m - E_x$), donde E_m es el potencial de membrana y E_x el potencial de equilibrio del ión x . La corriente generada por el ión de reemplazo es menor a la del control a potenciales negativos, ya que el anión de reemplazo (gluconato o F^-) a pesar de estar favorecido por el gradiente químico para salir, tiene una menor permeabilidad que dificulta su pasaje al medio extracelular. Esto es consistente ya que para detener el flujo entrante de Cl^- a la célula, se requiere un potencial interno más negativo. Lo contrario ocurrió en el reemplazo con I^- , en donde el potencial de reversión cambió a un valor positivo y las corrientes fueron mayores debido a la mayor permeabilidad con respecto al Cl^- .

Siguiendo con nuestros estudios de ORCC por canal único, encontramos que la remoción del Ca^{2+} intracelular no modificó la amplitud de corriente ni la P_o , con respecto al control, con propiedades biofísicas idénticas a las corrientes basales. Aunque un detallado estudio de la regulación del ORCC por Ca^{2+} escapa a los objetivos de esta tesis, los resultados sugieren que la actividad del canal no está regulada por Ca^{2+} interno, tal como se ha reportado previamente en otros tejidos (Assef y col., 2002; Demion y col., 2006). Un ejemplo de canal ORCC regulado por Ca^{2+} es que, en células renales de ratón se observó que un incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico provocan un aumento de la conductancia del Cl^- (Stewart y col., 2001).

Los canales ORCC se caracterizan por su sensibilidad a bloqueantes como el estilbena disulfónico (DIDS), DPC, NPPB y el hipoglucemiante oral glibenclamida (Tilmann y col., 1991; Gabriel y col., 1993; Schwiebert y col., 1994; Julien y col., 1999)

El mecanismo por el cual el DPC ejerce su acción sobre ORCC no está dilucidado, pero pensamos que la inhibición podría involucrar una acción directa sobre el canal o indirecta mediante la inhibición por CFTR, debido a que CFTR regula al ORCC, como mencionamos previamente. No tenemos datos de la interacción molecular entre el DPC y el ORCC pero sí hay abundante literatura sobre su acción sobre el CFTR.

El DPC inhibe al CFTR de forma reversible desde el lado citoplasmático de la membrana. Aunque el bloqueante puede ser agregado del lado extracelular, el DPC permea la membrana, y una vez que está del lado intracelular aumenta el tiempo en que el CFTR se mantiene cerrado. El mecanismo de bloqueo de DPC se produce cuando el bloqueante alcanza su sitio de unión al canal dentro del poro y produce oclusión del poro, bloqueando el estado abierto del canal (Zhang y col., 2000).

Nuestros resultados indican que la actividad de ORCC se inhibió por DPC por reducción de la P_o del canal en un 30-50 % a todos los voltajes aplicados. Esto fue consistente con estudios realizados en otras células (Assef y col., 2002). El DPC bloqueó al ORCC incrementando la frecuencia de estados no conductivos: los trazos de corriente muestran mayor "flickering" (con mayor número de cierres del canal en la unidad de tiempo) sin reducción en las conductancias unitarias ni en la amplitud de corriente con respecto a las condiciones basales. La disminución en la P_o del ORCC fue independiente del potencial de membrana cuando el DPC fue agregado del lado citoplasmático del parche. Sin embargo, otros autores sugieren que la entrada del bloqueante DPC al poro de CFTR es facilitada por potenciales de membrana negativos (hiperpolarizantes) debido a que se favorece el movimiento de la droga hacia el poro a través de campo eléctrico y el bloqueante queda más tiempo retenido en el canal, por lo que hay una dependencia de la inhibición del canal con el voltaje aplicado (Lindsell y col., 2005, Zhang y col., 2000). Con pulsos despolarizantes la P_o del canal en condiciones basales aumentó con el potencial

aplicado, mostrando una dependencia con el voltaje solamente en ese rango. Sin embargo, la inhibición de la actividad del canal ORCC por el DPC se produjo independientemente del voltaje. Pensamos que la diferencia encontrada en nuestros resultados con respecto a otros estudios son debidos a que el bloqueante no involucraría la forma cargada o la inhibición se estaría produciendo en un sitio diferente al poro, a diferencia del mecanismo de inhibición de canal abierto, si la inhibición de ORCC es a través de la inhibición de CFTR. Además, la respuesta de las drogas, en este caso DPC, depende del medio ambiente celular, y los datos reportados en la literatura son a través de sistemas de expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis* diferentes a los nuestros, que son en células BeWo. Por lo tanto, al tratarse de células diferentes, los resultados pueden variar con respecto a estudios realizados en otros sistemas (Stahl y col., 2012).

También observamos en el ORCC una reducción en la P_o con glibenclamida, la cual fue independiente del potencial de membrana. A potenciales pequeños, como -20 y -20 mV, las corrientes no se pueden medir claramente debido a sus bajas amplitudes, las cuales se solapan con el ruido del sistema de registro, y esto podría obstaculizar el cálculo de la P_o . La inhibición por glibenclamida es coincidente con datos de Rabe y col (1995) sugiriendo que la droga difunde a través del parche de membrana actuando desde la superficie intracelular en virtud de su lipoficidad. La inhibición de ORCC por glibenclamida, al igual que con DPC, pudo deberse a la interacción directa con el bloqueante o mediada por CFTR, como se observó en otros sistemas donde la glibenclamida produjo la reducción de la P_o del ORCC mediante la inhibición de CFTR (Julien y col., 1999). La glibenclamida, es un bloqueante de canal abierto e inhibe al CFTR por oclusión del poro de una manera dependiente de voltaje, con la droga ganando acceso a su sitio de unión que es parte del poro del canal. La carga negativa que presenta la glibenclamida tendría importancia en su interacción con el canal mostrando una dependencia de su efecto con el potencial de membrana, quedándose la droga más retenida en el canal a pulsos hiperpolarizantes (Sheppard y col., 1997). Algunos autores

sugieren la localización de un residuo (lisina 978) con carga positiva en el loop citoplasmático 3 (CL3) en el poro de CFTR, el cual está involucrado en el sitio de acción de la glibenclamida. La inhibición por glibenclamida se produciría por la atracción electrostática de la carga negativa de glibenclamida y la carga positiva del sitio CL3 en el CFTR, sugiriendo de manera novedosa un rol de este sitio en el CFTR (Melin y col., 2007).

El transporte aniónico en el SCT placentario se ha asociado con varias funciones como la regulación del volumen celular, transporte de nutrientes y mantenimiento del potencial de membrana, entre otros. Se ha propuesto que ORCC podría formar parte de la corriente aniónica regulada por volumen (VRAC) en miocitos ya que comparte muchas similitudes en las propiedades biofísicas con este canal (Demion y col., 2006; Duan y col., 1997). ORCC y otros canales de Cl^- participan en la homeostasis del volumen celular (Vallejos y col., 2007; Okada y col., 2009).

De nuestros experimentos bajo condiciones de *cell attached*, antes de la escisión del parche, sugerimos que el canal ORCC es activo al potencial de membrana de reposo E_m . Bajo esta condición observamos corrientes rectificantes con un E_r de 12.7 ± 0.6 mV en algunos parches, consistente con resultados en otros sistemas (Demion y col., 2006). No conocemos el E_m de las células BeWo; Greenwood y col. (1996) encontraron una caída progresiva en el E_m asociada con la diferenciación progresiva del trofoblasto. Los valores de E_m para las células Jar y citotrofoblasto mono y multinucleado fueron: -57, -48 y -40 mV, respectivamente. Considerando un valor promedio de -50 mV para las células BeWo, el potencial de reversión estimado en la configuración de *cell attached* es -37 mV. La corriente entrante pequeña observada a este voltaje, podría sugerir que la actividad de Cl^- intracelular está por encima del equilibrio electroquímico en células BeWo, ya que el E_r es menos negativo que el E_m .

Como se ha visto en las figuras de la sección 1.3 de los resultados, también caracterizamos un canal de Cl^- , compatible con el CFTR; este presentó una relación corriente-voltaje lineal y una conductancia unitaria cercana a 12 pS. Los valores de conductancia para el CFTR descritos están en el rango de 6 a 15 pS (Gadsby y col.,

1995; Sheppard, 1999; Assef y col., 2003), de modo que nuestros datos son consistentes con los ya publicados.

Aunque el CFTR presenta actividad espontánea, la misma aumenta con el agregado de forskolina. El agregado de forskolina en condiciones de *cell-attached* fue suficiente para mantener la actividad del canal después de la escisión del sello (*inside-out*). La forskolina es una droga derivada de la planta *Coleus forskohlii*, permeable a la célula. Tiene propiedades antihipertensivas, inotrópica positiva y también es un activador de la adenilato ciclasa. La mayor parte de sus efectos biológicos se deben a la activación de la adenilato ciclasa y al incremento de los niveles de AMPc resultante (Souza y col., 1983). La activación del CFTR implica la fosforilación dependiente de AMPc en múltiples sitios de la región reguladora R del canal por PKA. Se cree que la fosforilación provoca un cambio en la conformación de CFTR que permite la asociación de los dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y 2) que se dimerizan, y esta asociación permite la unión y la hidrólisis de ATP para impulsar la activación del canal (apertura y cierre). El transporte de iones a través de las α -hélices transmembrana que forman el poro del canal es controlado por la interacción con ATP a los dominios NB. El CFTR se activa por forskolina mediante los sitios de fosforilación dependientes de AMPc del canal, al activar esta droga la adenilato ciclasa y aumentar los niveles de AMPc (Liang y col., 2012; Stahl y col., 2012). El CFTR al igual que el ORCC son activados por AMPc por medio de una proteína dependiente de PKA en células de epitelio bronquial humano (Szkotak y col., 2003) y en mastocitos de peritoneo de rata (Seebeck y col., 2002).

En condiciones de *whole cell*, la forskolina aumentó las corrientes totales basales, indicando la presencia de canales de Cl^- activados por AMPc. De acuerdo a esto, el aumento observado en las corrientes totales podrían deberse a la presencia de CFTR y/o ORCC en las células BeWo. Para dilucidar esto, inhibimos este canal con un inhibidor más específico, la tiazolidona $\text{CFTR}_{\text{inh}}-172$ (Ma y col., 2002). Esta droga permea la membrana y actúa del lado citoplasmático. La localización y el número de sitios de unión al inhibidor en el CFTR todavía son desconocidos (Taddei y col., 2004). El

mecanismo de inhibición es más complicado que una simple oclusión del poro y el bloqueante se uniría al canal en el estado cerrado y abierto induciendo un cambio conformacional que lo inactiva (Kopeikin y col., 2010).

Nuestros experimentos de célula entera muestran que las corrientes netas activadas por forskolina se inhiben a todos los potenciales aplicados. Estas representan a la corriente transportada por el CFTR y presentaron un componente lineal frente al voltaje en una manera independiente del tiempo y el voltaje, como es esperado para este canal (Zhang y col., 2004).

Evaluamos también la expresión del ARNm de CFTR mediante la técnica de RT-PCR en células BeWo. Pudimos observar que este canal se transcribe constitutivamente, sin estímulos, y encontramos la banda esperada para CFTR de 295 bp, al igual que en la línea celular T84 donde está reportada la expresión constitutiva del canal (Prince y col., 1993). Esto es consistente con estudios de la expresión de CFTR en placenta humana. Mylona y col., encontraron que el ARNm de CFTR se expresa en extractos de placentas humanas obtenidas del primer, segundo y tercer trimestre de embarazo, y en cultivos primarios de citotrofoblasto con diferentes estadios de diferenciación, así como en la línea celular JAr de coriocarcinoma de placenta humana. En estos estudios, en las células JAr la expresión de CFTR fue menor que en los cultivos de citotrofoblasto, indicando que en las células indiferenciadas y no polarizadas, como las JAr, el canal se expresa muy poco o no se expresa (Mylona y col., 1996).

Nuestros ensayos de Western blot indican que las células BeWo expresan la proteína CFTR también de manera constitutiva. Utilizando dos anticuerpos específicos pudimos detectar la banda característica de ~160 KDa encontrada también en placentas normales por otros autores (Castro Parodi y col, 2009) que corresponde a la forma glicosilada del canal. En algunos casos, evidenciamos una banda de menor tamaño que indica su forma no glicosilada, ambas son productos del procesamiento de la biosíntesis de la proteína CFTR. La adquisición de los oligosacáridos por el extremo N-terminal del CFTR se produce en el retículo endoplasmático y el polipéptido glicosilado se exporta al

aparato de Golgi, y una vez completada allí la glicosilación por enzimas glicosiltransferasas, el transporte del CFTR progresa a la membrana plasmática. Las células epiteliales polarizadas, como es el caso de las células trofoblásticas, tienen como propiedad fundamental la distribución asimétrica de proteínas en distintos dominios de la membrana plasmática. La clasificación apical/basolateral de las proteínas está regulada por la secuencia de aminoácidos, glicosacáridos o lípidos. Se ha demostrado que la glicosilación es independiente para que CFTR se pueda transportar a la membrana apical, sin embargo cuando el CFTR no está glicosilado, el canal se desestabiliza en la membrana apical, se internaliza, y se transporta a la membrana basolateral y/o a vías de degradación, es decir que la no glicosilación del canal promueve el reciclado apical sin afectar la funcionalidad del mismo. Las células polarizadas presentan una menor tasa de reciclado de CFTR con respecto a las no polarizadas (Chang y col., 2008, Cholon y col., 2010).

Teniendo en cuenta todo esto, podemos decir que la línea celular BeWo derivada del citotrofoblasto exprese el gen y la proteína CFTR.

En síntesis, CFTR y ORCC se expresan funcionalmente en células BeWo y son proteínas diferentes con una relación regulatoria. Como se mencionó, se ha propuesto que el CFTR controla al ORCC por un mecanismo autócrino que involucra al CFTR, dependiente de la liberación de ATP (Gabriel y col., 1993, Schwiebert y col., 1995 Hryciw y Guggino, 2000).

El maxi Cl^- es el canal aniónico más frecuente descrito en el sinciotrofoblasto y trofoblasto humano (Vallejos y Riquelme, 2007). El canal maxi Cl^- se caracteriza por una alta conductancia unitaria (200-500 pS), una actividad dependiente de voltaje con forma de campana, y su sensibilidad al bloqueante DIDS, pero no al DPC (Riquelme y col., 2006). A pesar de que en nuestros experimentos de canal único no utilizamos un protocolo diseñado para estudiar este tipo de canal, detectamos en varios parches un canal con una alta conductancia consistente con el canal maxi Cl^- (datos no mostrados). Aunque su caracterización está más allá del alcance del objetivo de este trabajo, esta

evidencia sugiere que los canales de Cl⁻ expresados en células BeWo, no deben diferir de los del trofoblasto nativo.

Nuestros resultados mostrados hasta acá demostraron la funcionalidad de canales como CFTR y ORCC en las células BeWo, utilizando bloqueantes de su actividad. Por consiguiente, empleamos estos agentes farmacológicos para investigar si el crecimiento de estas células es afectada cuando se inhiben los canales de Cl⁻. Utilizamos el ensayo de *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) para estudiar la proliferación celular. La reducción del compuesto MTT a formazán tiene sólo lugar cuando la enzimas reductasas mitocondriales están activas en la célula, por lo tanto el monitoreo de la reducción de MTT obtenida en cada tratamiento puede ser directamente relacionado al número de células viables (vivas) y proliferativas. Encontramos que la proliferación de células BeWo, en condiciones de cultivo con 10 % de suero fetal bovino (SFB), fue inhibida por DPC (50-10000 µM), glibenclamida (1-1000 µM), DIDS (50-10000 µM) y CFTR_{inh}-172 (0.2- 7.5 µM) con 72 h de incubación en una manera concentración-dependiente.

DPC redujo la proliferación a la mitad (IC₅₀) con una concentración de 472 µM; DIDS con una concentración de 424 µM, glibenclamida con 33 µM y CFTR_{inh}-172 con 0.55 µM. Estos últimos datos son consistentes con el hecho de que en nuestros experimentos de *patch clamp* las concentraciones de estos bloqueantes que utilizamos fueron muy similares, o en algunos casos mayores, y fueron suficientes para inhibir la actividad de estos canales determinada electrofisiológicamente. De los resultados con el bloqueo específico con CFTR_{inh}-172 surge que CFTR está participando en la proliferación de las células BeWo.

El bloqueo máximo de los canales de Cl⁻ con todas las drogas utilizadas produjo una reducción de la proliferación celular del 70-90 %, sugiriendo que los canales de Cl⁻ participan en la regulación de este proceso. Aunque no están claros los mecanismos detallados de la regulación de la proliferación celular por canales iónicos, un mecanismo

sería que los canales iónicos por el movimiento iónico y cambios en el volumen celular regulan la proliferación modulando el potencial de membrana (Lang y col., 2005).

Cuando hay una señal mitogénica, se producen cambios en el potencial de membrana y en el volumen celular. En la fase G1 la célula se hiperpolariza y hay un aumento del volumen y existe en el ciclo un punto de chequeo del tamaño celular. Cambios en el potencial de membrana permiten la entrada de Ca^{2+} a la célula lo cual desencadena los mecanismos de señalización del ciclo celular (Pardo y col., 2004; Lang y col., 2007). Se ha detectado también que durante la proliferación los canales de Cl^- modifican su expresión durante los distintos estadios del ciclo celular. Por ejemplo, para los canales de Cl^- activados por voltaje se ha observado un incremento en su expresión en la fase G2 y del canal CIC-2 en la fase M. Estos cambios en la composición de canales iónicos activos en la membrana celular durante el ciclo celular se traduce en cambios en el potencial de la membrana de la célula durante las distintas fases del ciclo y por lo tanto podría implicar distintos comportamientos del flujo de Cl^- (Blackiston y col., 2009). El CFTR regula el volumen en distintos sistemas celulares, posiblemente debido a su papel sobre otros canales iónicos como el ENaC (Schreiber y col.; 2004) y el ORCC (Duan y col., 1997).

La regulación del volumen celular mantiene los niveles apropiados de factores críticos para la progresión del ciclo celular, como por ejemplo ciclinas y quinasas-dependientes de ciclinas, necesarias para el control de la progresión desde la fase G1 a S del ciclo (He y col., 2011). La limitación de nuestros estudios de proliferación celular es que no podemos conocer a que nivel estarían modulando los canales iónicos este proceso. Se requieren de futuros estudios como por ejemplo del efecto que tienen los bloqueantes de canales de Cl^- en la expresión de ciclinas y quinasas, o en la distribución de las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo, o se deberían realizar estudios para analizar cambios del volumen celular por canales de Cl^- en las células BeWo.

En nuestro trabajo evaluamos en forma paralela si el efecto observado en la proliferación celular se debía a una disminución en la viabilidad celular mediante la técnica de azul tripano, en base a que las células muertas incorporan este colorante y se tiñen. Encontramos que con todos los bloqueantes de canales de Cl^- utilizados, el % de viabilidad celular (células vivas con respecto al total de células contadas) disminuye de manera concentración dependiente en correlación con los efectos observados en los ensayos de MTT. A simple vista se podría descartar que la disminución observada en la proliferación se deba a un arresto del ciclo celular, ya que en este caso la membrana estaría intacta y no deberíamos haber observado células teñidas (no viables). Probablemente la proliferación se deba a una desregulación del ciclo y un aumento en la muerte celular por vías como la apoptosis, necrosis o autofagia, que también implican cambios en el volumen de la célula, pero se requerirá del estudio de estos procesos para poder conocer más en profundidad como participan los canales de Cl^- en la proliferación de las células BeWo.

Es interesante tener en cuenta que el CFTR se encontró en placenta humana y que en las células trofoblásticas estaría involucrado en la regulación de la expresión funcional y molecular de las acuaporinas (AQPs). Estas proteínas tienen un papel en la regulación del movimiento de agua, aumentando la permeabilidad de la membrana, produciendo cambios en el volumen celular (Damiano y col., 2011). Además, existen otras evidencias de la implicancia del transporte de cloruro en la fisiología placentaria, como el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación del volumen celular, el transporte de solutos, etc. (Riquelme, 2009), por lo que sería posible pensar que en células trofoblásticas los canales de Cl^- participen en estos procesos y en la proliferación celular. El CFTR se localiza también en el endometrio humano (Zheng y col., 2004).

La expresión de los canales CFTR y ORCC, junto con otros canales dependientes de AMPc en células trofoblásticas podría asociarse con la composición del fluido y electrolitos en el tejido placentario. El transporte de Cl^- podría conducir, mediante cambios en el potencial de membrana de la célula, al movimiento de iones con carga

positiva como Na^+ por canales de sodio como el ENaC, o podría haber una interacción entre CFTR y ENaC (Berdiev y col., 2009) y esto producir cambios en el nivel del fluido del trofoblasto y del medio para facilitar la proliferación y migración del trofoblasto e invadir el endometrio uterino.

La regulación del ENaC por el CFTR depende del tipo de epitelio estudiado. En los epitelios secretores (vías aéreas, páncreas), la activación del CFTR disminuye la actividad del ENaC mientras que el efecto opuesto se observa en los epitelios absorptivos (riñón, glándulas sudoríparas y colon) con aumento en la actividad del ENaC. El mecanismo de esta regulación es poco conocido, pero brinda una explicación sencilla para el hecho que la concentración de Na^+ en el sudor de los enfermos con fibrosis quística es elevada respecto a las personas sanas (figura 58). En las células con fibrosis quística se observa un potencial transpitelial más negativo que en condiciones normales. Una posibilidad sería que la célula está despolarizada por la entrada de Na^+ sin el acompañamiento del Cl^- . Eso produce una disminución de la fuerza impulsora para el Na^+ , su menor entrada y el consiguiente aumento en el líquido extracelular. Esto llevaría en el organismo enfermo a un aumento en la concentración de Na^+ del sudor.

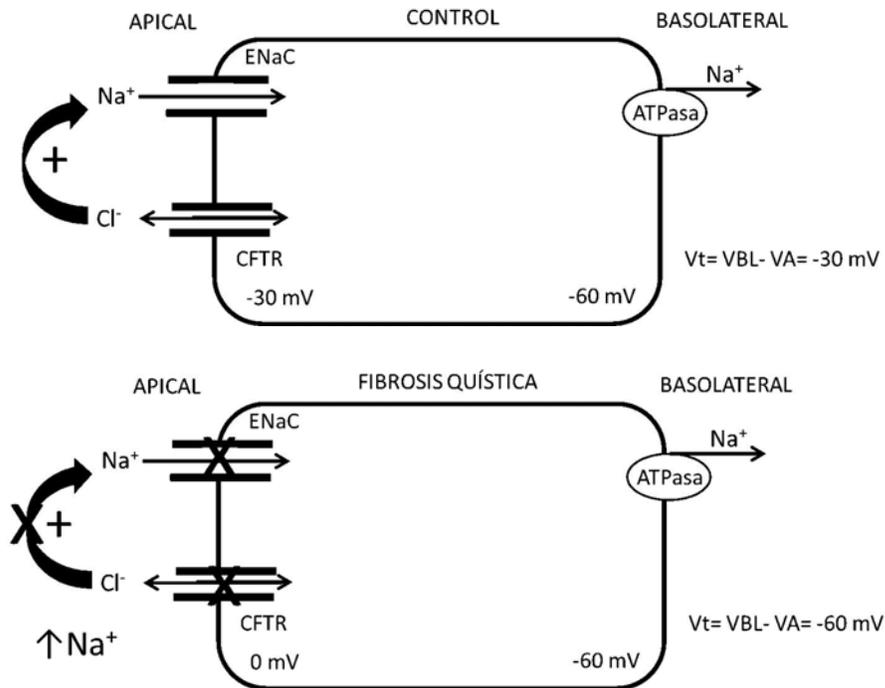


Figura 58. Esquema que relaciona la actividad del CFTR y ENaC en epitelio de glándula sudorípara. El potencial transepitelial (V_t) es potencial en cara basolateral, (V_{BL}) - potencial en cara apical (V_A). En las células de pacientes con fibrosis quística la actividad del CFTR está disminuida o ausente y esto se traduce en una menor activación del ENaC y un V_t más negativo que en las células sanas. Esto se traduce en un aumento de Na^+ en el sudor de los enfermos.

Hay otros mecanismos propuestos para la regulación del ENaC por parte del CFTR. Por ejemplo, en estudios en células de la vía aérea se ha demostrado que el CFTR altera el tráfico de ENaC desde su sitio de síntesis hacia la membrana celular y produce cambios en la probabilidad de apertura del canal (Rubenstein y col. 2011). En estudios de expresión heteróloga de ENaC y CFTR en ovocitos de *Xenopus laevis* se ha demostrado que el CFTR inhibe la actividad del ENaC por medio del incremento en la concentración intracelular de Cl^- (Bachhuber y col, 2005) mientras que Berdiev y col. (2009) sugieren que la reducción en la actividad del ENaC por activación del CFTR se debe a la interacción física entre las dos moléculas. Si bien se ha demostrado la colocalización muy estrecha entre estas dos moléculas, no se puede descartar que en esta regulación intervengan otra molécula o el movimiento iónico.

Estudios recientes propusieron que la entrada de Na^+ en sí es una señal mitogénica iniciando la progresión del ciclo celular en células de glioma e inhibidores del

transporte de Na^+ llevaron al arresto del ciclo, y que el ENaC está involucrado críticamente en la proliferación y migración de estas células (Rooj y col., 2011).

Por último, un hecho interesante es que la expresión de CFTR disminuye en placentas preeclámpticas, en donde se ha observado una inadecuada e incompleta invasión del trofoblasto (Huppertz, 2008; Castro Parodi y col., 2009).

2. ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR Y LA PARTICIPACIÓN DEL ENaC, EN CÉLULAS BEWO DE TROFOBLASTO HUMANO.

El Na^+ es el principal catión de los fluidos extracelulares y está relacionado con el balance del volumen del líquido extracelular. El canal de Na^+ ENaC contribuye al mantenimiento de la homeostasis de Na^+ a través de su expresión funcional en una variedad de células y tejidos epiteliales así como en la placenta humana. La actividad de ENaC está regulada por una serie de factores que en última instancia afectan tanto el número de canales expresados en la superficie de la célula (N) o la probabilidad de apertura (P_o) del canal. El N es controlado por hormonas y proteínas de señalización que afectan tanto la transcripción como el tráfico de las subunidades de ENaC. La P_o está regulada por muchos factores. El ENaC está formado por tres subunidades homólogas α , β , γ , y es miembro de la familia de ENaC/ degenerinas de los canales iónicos. Los canales de esta familia tienen una variedad de funciones celulares pero tienen en común que todos los miembros son selectivos al Na^+ y sensibles al bloqueante amiloride en diversos grados. ENaC responde a estímulos mecánicos y químicos, y es sensible a aldosterona y otras hormonas (Kleyman y col., 2011).

En este trabajo realizamos estudios de migración celular para evaluar la participación del canal ENaC en el desplazamiento e invasión de las células BeWo. En primera medida evaluamos los efectos de la aldosterona y el amiloride en la reparación de la herida y la migración celular. Pudimos observar que las células cultivadas en una concentración 1% de SFB, tratadas con aldosterona por 6 h presentaron un

comportamiento migratorio mayor (~38 % de reinvasión de la herida con respecto al valor inicial) que las células no estimuladas (~20 %), o que las células estimuladas pero inhibiendo las corrientes de Na^+ por amiloride (~20 %). Habiendo determinado anteriormente (del Mónaco y col, 2008a) que las células tratadas con la aldosterona aumentan las corrientes de Na^+ , inferimos que los efectos observados en la migración celular se deberían al aumento de la presencia y/o la funcionalidad de ENaC en las células estimuladas. Ya se había detectado la participación del ENaC en la migración celular en el endotelio de córnea bovino (Chifflet y col., 2005). Los investigadores sugerían que la despolarización producida por el canal cuando se generaba un daño en el tejido podía regular la reorganización del citoesqueleto, previo a la migración de las células y el cierre de la herida.

Dado que el canal pertenece a una superfamilia de proteínas entre las cuales se encuentran algunos mecanotransductores, se sugiere que el ENaC también posee la capacidad de traducir señales mecánicas además de su actividad conocida como canal iónico. Cambios en la presión hidrostática y estiramiento regulan el ENaC y por su relación con el citoesqueleto podría ser el nexo entre determinados estímulos mecánicos y la migración celular (Carattino y col., 2004; Drummond y col., 2007). De esta manera, el ENaC recibiría la señal de injuria y la transmitiría al interior celular, con posterior liberación de citoquinas y factores de crecimiento (Grifoni y col., 2006). De todas maneras, consideramos que no alcanza con la sola presencia del canal en la membrana plasmática para generar un efecto en la migración celular, sino que el canal debe transportar iones para inducir una respuesta de migración acelerada ya que el amiloride (bloqueante de oclusión del poro) revirtió la modulación positiva por aldosterona. Sin embargo, el tratamiento con amiloride sólo inhibió la reparación de la herida a niveles control. La inhibición con amiloride de los efectos provocados por la aldosterona pueden ser un indicio de la necesidad de transporte para la concreción del estímulo. Un ejemplo de este hecho se observa en los procesos de invasión de los tumores malignos, donde las células poseen una elevada concentración de Na^+ intracelular. La aplicación de

amiloride disminuye la proliferación de estas células (Sparks y col., 1983). Hay trabajos que demuestran el ENaC en epitelio mamario y que el crecimiento de adenomas mamarios podían inhibirse con la aplicación de amiloride, sugiriendo la participación del canal en la proliferación y migración tumoral (Boyd y col., 2007). Vila-Carriles y col. (2006) han demostrado que parte del mecanismo por el cual los gliomas invaden los tejidos normales es por una corriente de Na^+ mediada por un canal de la familia de degenerinas.

Nuestros resultados sugieren que la estimulación de ENaC mediada por aldosterona es necesaria para generar un efecto significativo en la reparación de la herida y esto no se observó en condiciones basales, ya que los cultivos expuestos a aldosterona tienen una velocidad de cierre de la herida mayor en todas las muestras registradas, con respecto a los demás tratamientos. En un trabajo previo de nuestro laboratorio observamos que las células BeWo sólo presentaban corrientes de célula entera sensibles a amiloride cuando se trataban con aldosterona (del Mónaco y col., 2008a).

El canal intercambiador Na^+/H^+ (NHE1) está presente en las células BeWo (Silva y col., 1997) y ha sido relacionado con la migración celular de la siguiente manera: 1) la actividad de este canal, que está restringido al borde del frente en el lamellipodio de células migratorias, contribuye a la migración actuando como transportador de solutos, y allí aumenta el volumen celular ; 2) el NHE1 tiene un gran efecto en la organización del citoesqueleto de actina y 3) NH31 funciona como anclaje para los filamentos de actina en la membrana plasmática (Schwab y col., 2005). Teniendo en cuenta estas evidencias, decidimos estudiar la participación de ENaC en el efecto observado en nuestro sistema en las células tratadas con aldosterona, utilizando oligonucleótidos antisentido dirigidos a la subunidad α del canal. Las células expuestas al antisentido cubrieron una superficie menor (~20 %) de la herida con respecto a las tratadas sólo con aldosterona (~30 %) o las células con el oligonucleótido sentido (~30 %), y observamos mediante los ensayos de Western blot que la expresión de la proteína ENaC redujo su

expresión en presencia del oligonucleótido antisentido. También comprobamos en los ensayos de inmunofluorescencia, que las subunidades de ENaC se expresan más abundantemente cerca del borde de la herida en las células, apoyando la idea de que esta proteína participa en una señal luego de realizada la lesión en la célula. Además, las células tratadas con los oligonucleótidos antisentido no evidenciaron corrientes sensibles al amiloride detectables, mientras que el tratamiento con el oligonucleótido sentido evidenció un componente sensible al amiloride ($I_{Na} (ami)} = \sim 12 \text{ pA/pF}$), indicando en este tratamiento la activación de las corrientes por AMPc. Estas corrientes fueron similares a aquellas observadas previamente en otros trabajos de nuestro grupo para células BeWo estimuladas con aldosterona y un análogo de AMPc (8Br-AMPc) (del Mónaco y col., 2008a).

La proliferación podría enmascarar la contribución de la migración en la reparación de la herida (Grifoni y col., 2006). Para evaluar esto, medimos la proliferación celular con el ensayo de MTT. En una muestra homogénea de células, como la línea celular BeWo, la reducción de MTT es proporcional al número de células metabólicamente activas y es usada como un indicador de la proliferación o viabilidad. Nuestros resultados muestran que ni la aldosterona ni el amiloride aumentan la proliferación de células BeWo cultivadas con 1 % de SFB a las 6 h.

Por lo tanto, nuestros resultados evidenciaron que la aldosterona aumenta la migración de células BeWo probablemente a través de sus efectos por el canal ENaC.

Además, nuestros resultados muestran que en presencia del análogo de AMPc, 8Br-AMPc, hay un mayor comportamiento de la reparación de la herida (~45 %) en células BeWo tratadas con aldosterona, con respecto a las células en presencia sólo de aldosterona. Pensamos que esto es debido posiblemente a un aumento del número de canales apicales por el reclutamiento de ENaC de los *pooles* de almacenamiento subapicales (Butterworth y col., 2010). Las células tratadas con aldosterona en ausencia de 8Br-AMPc migraron cubriendo el 25% de la herida, pero este efecto no fue acompañado de un efecto significativo de las corrientes sensibles al amiloride. La

incubación con aldosterona no alteró las corrientes basales de las células que pueden explicar el aumento en la migración celular (del Mónaco y col., 2008a). Sin embargo, los oligonucleótidos antisentido contra α -ENaC abolieron este efecto, lo que sugiere una participación de ENaC independiente de su papel como un canal iónico.

En nuestro trabajo utilizamos 100 nM de aldosterona debido a que está en el rango estudiado por otros autores que trabajan en el ENaC, siendo la menor concentración alrededor de los 10 nM y 1.5 μ M la más alta (McEneaney y col., 2008; Helms y col., 2005). Una menor concentración de aldosterona (10 y 50 nM) influyó la reparación de la herida solamente después de 12 h de realizada la herida en comparación con el tratamiento control (~21 %, 23 % y 16%, respectivamente).

Las investigaciones en ENaC son dificultosas debido a la baja abundancia de este canal en tejidos no estimulados con hormonas. En este sentido, es interesante tener en cuenta que el canal está muy regulado. En particular, la modulación por la aldosterona produce un aumento en el tráfico de ENaC y su expresión en la membrana apical (Asher y col., 1996; Stokes y col., 1998; Alvarez de la Rosa y col., 2002; Verrey y col., 2008; McEneaney y col., 2008; Butterworth y col., 2005), un aumento en la P_o del canal, debido a una activación de los canales por proteólisis (Kemendy y col., 1992; Kleyman y col., 2009; Galizia y col., 2011), y un aumento en un proceso de metilación de la proteína que ha sido relacionado a la activación genómica y no genómica de ENaC (Edinger y col., 2006; Zhang y col., 2006).

Dado que la acción de la aldosterona parece implicar un mecanismo que aumenta la P_o de ENaC, y este canal participa en la migración de las células BeWo, medimos los procesos de migración y proliferación celular asociados a la reparación de la herida en las células BeWo y los efectos que tenían la inhibición y estimulación de las reacciones de metilación.

Estudiamos si la metilación está implicada en el efecto de la aldosterona. Cuando las células tratadas con el inhibidor de las reacciones de metilación 3-deazaadenosina (3-DZA) a una concentración de SFB del 1 %, la reinvasión de la herida

medida a las 6 h después de la lesión fue del ~10% de su valor inicial, consistente a lo observado por otros autores en células BeWo (Rahnama y col., 2006), mientras que hubo una reinvasión del 45% cuando las células se cultivaron sólo con la aldosterona y AMPc. Este efecto de 3-DZA se revirtió cuando el donante de metilos S-adenosilmetionina (AdoMet) estaba presente en el cultivo.

Nuestros resultados también mostraron que el 3-DZA bloqueó la estimulación del transporte de Na^+ inducida por la aldosterona ($I_{\text{Na}} (\text{amil}) = \sim -7.0 \text{ pA/pF}$), sin afectar las cantidades de ninguna de las tres subunidades de ENaC, lo que sugiere que la estimulación por la metilación se produce como un proceso posterior a la traducción que dió lugar a cambios en la cinética de ENaC. Nuestros datos se correlacionan con los de Becchetti y col. (2000) y Edinger y col. (2006) que encontraron en células epiteliales que la aldosterona aumenta la P_o y las corrientes de Na^+ totales a través de ENaC sin cambios significativos en el número de canales y que el 3-DZA como otros inhibidores de la metilación, bloquean la acción de la hormona. Estos resultados son consistentes con la idea de que las reacciones de metilación se requieren para la actividad normal del ENaC. A diferencia con el tratamiento con 3-DZA 200 M, AdoMet aumenta las corrientes sensibles al amiloride ($I_{\text{Na}} (\text{amil}) = \sim -11.0 \text{ pA/pF}$) en células tratadas con 3-DZA, a pesar de que las corrientes no se restauran a los niveles basales ($I_{\text{Na}} (\text{amil}) = \sim -15 \text{ pA/pF}$). Probablemente esto se debe a que las membranas celulares tienen generalmente una baja permeabilidad a AdoMet y se requiere una mayor concentración para que permeabilice la célula (Dr. Sarah Sohraby, comunicación personal).

La proliferación celular podría enmascarar la contribución de la migración en la cicatrización de la herida (Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011; Grifoni y col., 2006). Para descartar este efecto, se midió la proliferación celular con el ensayo de MTT. En una muestra homogénea de células (como la línea celular BeWo) la reducción de MTT es proporcional al número de células metabólicamente activas y se utiliza como un indicador de la proliferación o la viabilidad. Nuestros resultados muestran que ninguno de los

tratamientos altera la proliferación de las células cultivadas en BeWo a una concentración de 1% de SFB.

Se ha demostrado que proteínas involucradas en la invasión de células trofoblásticas son modificadas epigenéticamente por metilación, y que la inhibición de las enzimas metiltransferasas encargadas de la modificación genera un fenotipo celular no migratorio. Los principales blancos para esta regulación son los promotores de proteínas de adhesión y de unión célula-célula (Rahnama y col., 2006). Sin embargo, la actividad de las metiltransferasas sobre el ENaC puede estimular su actividad y su participación en la migración celular. La aldosterona estimula una reacción de carboximetilación en la subunidad- β del ENaC, incrementando su P_o como un efecto estimulante agudo (Bechetti y col., 2000), que no requiere la expresión *de novo* de las subunidades de ENaC (Edinger y col., 2006).

No sabemos cómo ENaC está relacionado con la migración celular. Como se señaló en varias oportunidades, el ENaC puede funcionar como un mecanoreceptor y en nuestras condiciones experimentales, el Na^+ que entra a través del ENaC podría ser una señal intracelular antes que las células comiencen a migrar. Algunos autores sugieren que el transporte de Na^+ por ENaC, y el consecuente movimiento del agua, favorecen la hinchazón de células requerida para la expansión del lamelipodio (Kapoor y col., 2009), así como la idea de que la despolarización generada por ENaC estimula la reorganización del citoesqueleto (Chifflet y col., 2005). Pensamos que los canales de Cl^- encontrados en las células trofoblásticas, junto con ENaC también podrían contribuir al equilibrio entre los movimientos de cargas positivas y negativas requeridos para los mecanismos involucrados en la migración de estas células.

La migración celular es un proceso fundamental que controla la morfogénesis, la inmunidad y la inflamación, la regeneración del tejido y la angiogénesis. Su desregulación causa, o es parte de muchas enfermedades, incluyendo síndromes autoinmunes, la inflamación crónica, retraso mental, y la metástasis tumoral, entre otros (Vicente-Manzanares y Horwitz, 2011). Los canales iónicos y los transportadores participan

activamente en este proceso, siendo regulado por los componentes del citoesqueleto y el volumen celular (Lui y col., 2010; Schwab y col., 2005; Mills y Mandel, 1994; Marino y col., 2010; Riquelme y col., 2011).

Por otra parte, la interdependencia de los filamentos de actina y el volumen de las células desempeñan un papel importante en la migración celular donde los canales iónicos y transportadores crean el ambiente intracelular necesario para el óptimo funcionamiento de la maquinaria del citoesqueleto en la migración para el desplazamiento celular (Schwab y col., 2005).

Es sabido que la concentración de aldosterona en plasma durante el embarazo aumenta y se reduce en un 50% en las mujeres con preeclampsia (Langer y col., 1998; Shojaati y col., 2004). Las causas de la preeclampsia no se conocen (Huppertz, 2008; Knöfler y col., 2011; Orendi y col., 2011). Uno de los mecanismos propuestos es una disminución de la invasión del trofoblasto por lo que las células invaden a un ritmo menor los tejidos de la madre y hay defectos en el remodelamiento de la arterias espiraladas (Redline y Patterson, 1995; Nadeem y col., 2011) llevando a una disminución en el flujo sanguíneo y generando situaciones de hipoxia que puede tener efectos sobre el desarrollo del feto o en la fisiología del trofoblasto (Roberts y col., 2008; Huppertz, 2008). Aunque nuestros estudios se realizaron *in vitro* en una línea celular trofoblástica, los resultados presentados en esta investigación podrían estar relacionados con esta condición. La menor concentración plasmática de aldosterona -uno de los principales reguladores del ENaC- en mujeres preeclámpticas (Shojaati y col., 2004) podría provocar una defectuosa activación del ENaC aunque no hay datos sobre esto. Además, las placentas preeclámpticas presentan una alteración de la expresión de una variedad de genes, cuyos productos proteicos pueden participar en la generación de síntomas de la enfermedad (Sharkey y col., 2001), lo que podría tener consecuencias para la correcta actividad del SCT, tanto en su participación de transporte, como en la actividad migratoria de las células.

VII. CONCLUSIÓN

En la placenta humana, de tipo hemocorial, la sangre de la madre contacta en forma directa con el corion y está separada de la sangre del feto por las membranas del sincitiotrofoblasto (SCT) y el endotelio de los vasos sanguíneos fetales. Las células que forman el SCT están polarizadas en su función y contenido de canales iónicos y transportadores, equivalentes a las membranas apical y basal de los epitelios. El SCT que recubre las vellosidades coriónicas regula el pasaje transcelular de solutos y agua, mantiene el crecimiento fetal normal con numerosos sistemas de transporte controlados por mecanismos homeostáticos. El movimiento del Cl^- y Na^+ es de particular importancia, por ser los iones más abundantes en el medio extracelular y por su contribución a la osmolaridad plasmática. En este trabajo estudiamos tres proteínas involucradas en la homeostasis de Cl^- y Na^+ en células BeWo como modelo de trofoblasto humano.

En primer lugar confirmamos la presencia de corrientes de Cl^- en estas células y detectamos la expresión y actividad de dos canales aniónicos, el canal de cloruro con rectificación saliente (ORCC) y el canal regulador de la fibrosis quística (CFTR). El CFTR regula el ORCC, así como otros canales iónicos, incluido el canal de sodio epitelial (ENaC) por varios mecanismos (Kunzelman y col., 1999; Schwiebert y col., 1995, Bachhuber y col, 2005, Berdiev y col. 2009, Hryciw y Guggino, 2000). Se confirmó por técnicas de biología molecular que CFTR se expresa en esta línea.

Debido a las funciones asociadas a estas proteínas, evaluamos la participación de los canales aniónicos en la proliferación de células BeWo. Encontramos que los canales aniónicos, y en particular el CFTR está involucrados en el crecimiento y viabilidad celular. Los canales por el movimiento iónico y cambios en el volumen celular regulan la proliferación modulando el potencial de membrana (Lang y col., 2005). El CFTR regula el volumen en distintos sistemas celulares, posiblemente debido a su papel sobre otros canales iónicos como el ENaC (Schreiber y col; 2004) y el ORCC (Duan y col., 1997). Por lo tanto estos canales participarían en la proliferación de células trofoblásticas.

Por otra parte, analizamos el aporte que pudiera realizar la presencia del ENaC en células BeWo sobre sus aptitudes migratorias. El tratamiento de las células con

aldosterona indujo un aumento de la velocidad en el desplazamiento natural de células que intentan cerrar una herida (*wound healing*) involucrando la metilación de la subunidad β del ENaC por la aldosterona, así como de otras moléculas que participan en la migración. Por el contrario, el bloqueo del ENaC con amiloride resulta en una menor velocidad de la reparación de la herida. El ENaC participa en una señal luego de realizada la lesión en la célula. Esto indicaría que la estimulación generada por la hormona sobre las células, y por consiguiente sobre el canal ENaC influye también en la migración celular. Efectos similares del canal sobre la migración celular han sido observados en otros tejidos animales (Chifflet y col., 2005; Grifoni y col., 2006). El mecanismo propuesto por el cual el ENaC interviene en la reparación de las heridas sugiere que la despolarización generada por el influjo de iones Na^+ a través de canales ENaC conduce un estímulo para la reorganización del citoesqueleto, paso necesario previo a la migración celular. El efecto de aldosterona en la migración celular no fue acompañado de un efecto significativo de las corrientes sensibles al amiloride. La incubación con aldosterona no alteró las corrientes basales de las células que pueden explicar el aumento en la migración celular (del Mónaco y col., 2008a). La aldosterona en conjunto con AMPc producen un efecto mayor en la migración celular correlacionado con un aumento en las corrientes basales por ENaC, posiblemente porque aumentan el número de canales apicales por el reclutamiento de ENaC de los *pooles* de almacenamiento subapicales (Butterworth y col., 2010).

Los niveles plasmáticos de aldosterona son menores en las mujeres con cuadro de preeclampsia (Langer y col., 1998; Shojaati y col., 2004), lo que podría generar defectos en la expresión del ENaC de las células del trofoblasto humano enfermo. Esto generaría una inadecuada invasión del trofoblasto a las arterias espiraladas del útero materno que alteraría el desarrollo de la vasculatura materno fetal y produciría como consecuencia un defecto en la implantación embrionaria (Mushambi y col., 1996; Sibai y col., 2005; Huppertz, 2008). Además, defectos en los canales aniónicos también podrían participar en la enfermedad.

Estos resultados nos permiten concluir que las células de trofoblasto humano expresan canales de Cl^- y Na^+ funcionales con las características esperadas para el ORCC, CFTR y ENaC. El estudio y participación de estos canales en los procesos de proliferación y migración en células derivadas de placenta humana son originales de este trabajo de tesis, cuyos resultados aportan al escaso conocimiento previo de estos en membranas del SCT. Los datos obtenidos a partir de líneas celulares de coriocarcinoma pueden compararse con células de cultivo primario de trofoblasto. Esto se debe a la consistencia de resultados obtenida hasta el momento en los estudios placentarios que utilizaron estas líneas celulares como modelo (Sullivan, 2004; Al-Nasiry y col., 2006, del Mónaco y col., 2008). Se pueden observar diferencias entre ambos tejidos pero son generalmente más numerosas las similitudes que dichas diferencias. Además, la homogeneidad de las células, la reproducibilidad de los resultados y la practicidad de propagación de estas células *in vitro* se convierten en ventajas importantes (Al-Nasiry y col., 2006).

Podemos concluir que las proteínas ORCC, CFTR y ENaC se expresan en la línea celular BeWo, participando en la actividad de las células de trofoblasto. A pesar que el papel de las proteínas en el tejido están en estudio, la participación de las mismas en el transporte de iones transplacentario, la proliferación o migración, podría tener relevancia en el crecimiento fetal-placentario como así también para la migración de las células del SCT, llevando a defectos en la invasión trofoblástica que comprometan la implantación embrionaria. Estos sucesos representan factores de riesgo en la preeclampsia y futuros estudios sobre el tema permitirán completar los conocimientos hasta ahora obtenidos de la fisiopatología de la enfermedad.

VIII. REFERENCIAS

1. **Adebamiro A, Cheng Y, Rao US, Danahay H, Bridges RJ (2007).** A segment of γ ENaC mediates elastase activation of Na^+ transport. *J Gen Physiol* 130: 611-629.
2. **Alam A, Jiang Y (2011).** Structural studies of ion selectivity in tetrameric cation channels. *J Gen Physiol*; 137:397-403.
3. **Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2006).** Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum reprod* 21: 193-201.
4. **Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P (2000).** Structure and regulation of amiloride sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62: 573-594.
5. **Alvarez de la Rosa D, Li H, Canessa CM (2002).** Effects of aldosterone on biosynthesis, traffic, and functional expression of epithelial sodium channels in A6 cells. *J Gen Physiol*; 119:427-42.
6. **Anderson M, Gregory R, Thompson S, Souza D, Paul S, Mulligan R, Smith A, Welsh M (1991a).** Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253: 202-5.
7. **Anderson, M. P., D. P. Rich, R. J. Gregory, A. E. Smith, and M. J. Welsh (1991b).** Generation of cAMP-stimulated chloride currents by expression of CFTR. *Science*; 251:679--682.
8. **Anantharam A, Tian Y, Palmer LG (2006).** Open probability of the epithelial sodium channel is regulated by intracellular sodium. *J Physiol* 574: 333-347.
9. **Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H (1996).** Aldosterone-induced increase in the abundance of Na^+ channel subunits. *Am J Physiol* 271: C605-C611.

10. **Assef, Y.A., Kotsias, B.A. (2002).** An outwardly rectifying anion channel in human leukaemic K562 cells. *Pflugers Arch*; 444:816-820.
11. **Assef YA, Damiano AE, Zotta E, Ibarra C, Kotsias BA (2003).** CFTR in K562 human leukemic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*; 285: C480-C488.
12. **Assef, YA, Cavarra SM, Damiano AE, Ibarra C, Kotsias BA (2005).** Ionic currents in multidrug resistant K562 human leukemic cells. *Leuk Res* 2005; 29: 1039-1047.
13. **Awayda MS, Subramanyam M (1998).** Regulation of epithelial Na channel by membrane tension. *J Gen Physiol* 112: 97-111.
14. **Bachhuber T, König J, Voelcker T, Mürle B, Schreiber R, Kunzelmann K (2005).** Cl⁻ interference with the epithelial Na⁺ channel ENaC. *J Biol Chem* 280: 31587-1594.
15. **Bayard F, Ances IG, Tapper AJ, Weldon VV, Kowarski A, Migeon CJ. (1970).** Transplacental passage and fetal secretion of aldosterone. *J Clin Invest*; 49: 1389-93.
16. **Becchetti A, Kemendy AE, Stockand JD, Sariban-Sohraby S, Eaton DC (2000).** Methylation increases the open probability of the epithelial sodium channel in A6 epithelia. *J Biol Chem.*; 275:16550-9.
17. **Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ (2009).** Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst*; 5:123-7.
18. **Berger HA, Travis SM, Welsh MJ (1993).** Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* Jan 25; 268:2037-47.
19. **Bernucci L, Henriquez M, Díaz P, Riquelme G (2006).** Diverse calcium channel types are present in the human placental syncytiotrophoblast basal membrane. *Placenta* 27: 1082- 1095.

20. **Bize V, Horisberger JD (2007).** Sodium self-inhibition of human epithelial sodium channel selectivity and affinity of the extracellular sodium sensing site. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F1137-F1146.
21. **Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M (2009).** Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle*; 8:3519-28.
22. **Boyd C, Naray-Fejes-Toth A (2007).** Steroid-mediated regulation of the epithelial sodium channel subunits in mammary epithelial cells. *Endocrinology* 148: 3958-3967.
23. **Bubien J (2001).** CFTR may play a role in regulated secretion by lymphocytes: a new hypothesis for the pathophysiology of cystic fibrosis. *Pflügers Archiv* 443: S36-S39.
24. **Bubien J K, Watson B, Khan MA, Langloh A L, Fuller C M, Berdiev B, Tousson A, Benos DJ (2001).** Expression and regulation of normal and polymorphic epithelial sodium channel by human lymphocytes. *J Biol Chem* 276: 8557-66.
25. **Butterworth MB, Edinger RS, Johnson JP, and Frizzell RA (2005).** Acute ENaC stimulation by cAMP in a kidney cell line is mediated by exocytic insertion from a recycling channel pool. *J Gen Physiol.*; 125: 81-101.
26. **Butterworth MB, Edinger RS, Frizzell RA, Johnson JP (2009).** Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 296:F10-24.
27. **Butterworth MB (2010).** Regulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta.*; 1802:1166-77.
28. **Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ (2004).** Serine protease activation of near-silent epithelial Na⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C190-C194.
29. **Campbell FM, Clohessy AM, Gordon MJ, Paget KRm Dutta-Roy MK (1997).** Uptake of long chain fatty acids by human placental choriocarcinoma (BeWo) cells: role of plasma membrane fatty acid-binding protein. *J Lipid Res* 38: 2558-2568.

- 30. Campbell J, Sansom M, Ashcroft F (2003).** Potassium channel regulation. *EMBO Rep* 4: 1038-42.
- 31. Cantiello HF (1995).** Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na⁺ channel regulation. *Kidney Int* 48: 970-984.
- 32. Cantiello H, Jackson Jr G, Grosman C, Prat A, Borkan S, Wang Y, Reisin I, O'Riordan C, Ausiello D (1998).** Electrodifusional ATP movement through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Physiol* 274: C799-C809.
- 33. Carattino MD, Sheng S, Kleyman TR (2004).** Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J Biol Chem* 279: 4120-6.
- 34. Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR (2008).** Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation. *J Biol Chem*; 283:25290-5.
- 35. Carattino MD (2011).** Structural mechanisms underlying the function of epithelial sodium channel/acid-sensing ion channel. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*; 20:555-60.
- 36. Carlson B M (2000).** Embriología humana y biología del desarrollo. Segunda Edición. Ediciones Harcourt S. A. Madrid, España.
- 37. Castro-Parodi M, Levi L, Dietrich V, Zotta E, Damiano AE (2009).** CFTR may modulate AQP9 functionality in preeclamptic placentas. *Placenta*; 30:642-8.
- 38. Chan HC, He Q, Ajonuma LC, Wang XF (2007).** Epithelial ion channels in the regulation of the reproductive tract fluid microenvironment: implications in fertility and infertility. *Acta Physiologica Sinica* 59 495-504.
- 39. Chang XB, Mengos A, Hou YX, Cui L, Jensen TJ, Aleksandrov A, Riordan JR, Gentzsch M (2008).** Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci.*; 121:2814-23.

40. **Chen HF, Nakabayashi M, Satoh K, Sakamoto S. (1980).** Urinary fibrinolysis in toxemia of pregnancy. . *Acta Obstet Gynecol Scand.*; 59:499-504.

41. **Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S (2005).** A posible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1420-C1430.

42. **Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR, Gentsch M (2010).** Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010; 298:L304-14.

43. **Clarson LH, Greenwood SL, Mylona P, Sibley CP (2001).** Inwardly rectifying K⁺ current and differentiation of human placental cytotrophoblast cells in culture. *Placenta* 22: 328-336.

44. **Collins FS, Riordan JR and Tsui L-C (1990).** The cystic fibrosis gene: isolation and significance. *Hospital Practice*; 25: 47-57.

45. **Colquhoun D, Sigworth F (1995).** Fitting and statistical analysis of single channel records. Plenum Press, NY and London. 483-87, 2nd Edition.106.

46. **Cory G (2011).** Scratch - wound assay. *Methods Mol Biol.*; 769:25-30.

47. **Cuthbert AW. (2011).** New horizons in the treatment of cystic fibrosis. *Br J Pharmacol.*; 163:173-83.

48. **Damiano AE (2011).** Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. *Placenta*; 32 Suppl 2:S207-11.

49. **del Mónaco, S., Assef, Y., Damiano, A., Zotta, E., Ibarra, C. y Kotsias, B. (2006).** Characterization of the epithelial sodium channel in human pre-eclampsia syncytiotrophoblast. *Medicina*; 66 : 31-35.

50. **del Mónaco S, Assef Y, Kotsias BA (2008a).** Epithelial sodium channel in a human trophoblast cell line (BeWo). *J Membr Biol*; 223:127-39.

51. **del Mónaco SM, Marino G, Assef Y, Kotsias BA (2008b)**. Preeclampsia, cellular migration and ion channels. *Medicina*; 68:405-10.
52. **del Mónaco SM, Marino GI, Assef YA, Damiano AE, Kotsias BA (2009)**. Cell migration in BeWo cells and the role of ENaC channels. *J Membrane Biol*; 232:1-13.
53. **Demion M, Guinamard R, El Chemaly A, Rahmati M, Bois P (2006)**. An outwardly rectifying chloride channel in human atrial cardiomyocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 17:60-8.
54. **Donaldson SH, Boucher RC (2007)**. Sodium channels and cystic fibrosis. *Chest* 132: 1631- 1636.
55. **Driver PM, Rauz S, Walker EA, Hewison M, Kilby MD, Stewart PM (2003)**. Characterization of human trophoblast as a mineralocorticoid target tissue. *Mol Hum Rep* 9:793-798.
56. **Drummond HA, Grifoni SC, Jernigan NL (2007)**. A new trick for old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiology* 23: 23-31.
57. **Duan D, Hume J, Nattel S (1997)**. Evidence that outwardly rectifying Cl⁻ channels underlie volume-regulated Cl⁻ currents in heart. *Circ Res*; 80:103-13.
58. **Dubyak G (2004)**. Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ* 28: 143-54.
59. **Eaton BM, Sooranna SR (2000)**. Transport of large neutral amino acids into BeWo cells. *Placenta* 21: 558-564.
60. **Edinger RS, Yospin J, Perry C, Kleymann TR, Johnson JP (2006)**. Regulation of epithelial Na⁺ channels (ENaC) by methylation: a novel methyltransferase stimulates ENaC activity. *J Biol Chem* 281: 9110-7.

61. **Egan ME, Schwiebert EM, Guggino WB (1995).** Differential expression of ORCC and CFTR induced by low temperature in CF airway epithelial cells. *Am J Physiol.* ; 268:C243-51.

62. **Ellinger I, Schwab M, Stefanescu A, Hunziker W, Fuchs R (1999).** IgG transport across trophoblast-derived BeWo cells: a model system to study IgG transport in the placenta. *Eur J Immunol* 29: 733-744.

63. **Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S (2001).** The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*; 264:182-5.

64. **Escher G, Mohaupt M (2007).** Role of aldosterone availability in preeclampsia. *Mol Aspects Med*; 28:245-54.

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

66. **Forbes K, Desforges M, Garside R, Aplin JD, Westwood M (2009).** Methods for siRNA-mediated reduction of mRNA and protein expression in human placental explants, isolated primary cells and cell lines. *Placenta*; 30:124-9.

67. **Ford RC, Birtley J, Rosenberg MF, Zhang L (2011).** CFTR three-dimensional structure. *Methods Mol Biol.*; 741:329-46.

68. **Frizzell R y Halm D (1990).** Chloride channels in epithelial cells. *Curr Top Membr* 37: 247–82.

69. **Fuchigami T, Matsuzaki T, Ihara S (2011).** Possible Roles of ENaC and Cl(-) Channel in Wound Closure in *Xenopus laevis* Embryos. *Zoolog Sci.* ; 28:703-11.

70. **Gabriel S, Clarke L, Boucher R, Stutts M (1993).** CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature*; 363:263-8.

- 71. Gadsby D, Nagel G, Hwang T-C (1995).** The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Ann Rev Physiol* 57: 387-416.
- 72. Galizia L, Ojea A, Kotsias BA (2011).** Amiloride sensitive sodium channels (ENaC) and their regulation by proteases. *.Medicina*; 71:179-82.
- 73. Garty H, Palmer LG (1997).** Epithelial Sodium Channels: Function, Structure and Regulation. *Physiological Reviews* 77: 359-396.
- 74. Gelman M, Kopito R (2002).** Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 110:1591-7.
- 75. Gilbert, S. (2005).** Biología del desarrollo. Séptima edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- 76. Gonzalez-Perrett S, Batelli M, Kim K, Essafi M, Timpanaro G, Moltabetti N, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF (2002).** Voltage dependence and pH regulation of human polycystin-2-mediated cation channel activity. *J Biol Chem.*; 277:24959-66.
- 77. Gray MA, Harris A, Coleman L, Greenwell JR, Argent BE (1989).** Two types of chloride channel on duct cells cultured from human fetal pancreas. *Am J Physiol.*; 257: 240-51.
- 78. Greenwood SL, Clarson LH, Sides MK, Sibley CP (1996).** Membrane potential difference and intracellular cation concentrations in human placental trophoblast cells in culture. *J Physiol* ; 492:629-40.
- 79. Grifoni SC, Gannon KP, Stec DE, Drummond HA (2006).** ENaC proteins contribute to VSMC migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H3076-H3086.
- 80. Habela CW, Sontheimer H (2007).** Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis. *Cell Cycle.*; 6:1613-20.

- 81. Halm DR, Frizzel RA (1992).** Anion permeation in an apical membrane chloride channel of a secretory epithelial cell. *J Gen Physiol*; 99: 339-366.
- 82. Harris M, Firsov D, Vuagniaux G, Stutts MJ, Rossier BC (2007).** A novel neutrophil elastase inhibitor prevents elastase activation and surface cleavage of the epithelial sodium channel expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 282: 58-64.
- 83. Haskó G, Deitch EA, Németh ZH, Kuhel DG, Szabó C (2002).** Inhibitors of ATP-binding cassette transporters suppress interleukin-12 p40 production and major histocompatibility complex II up-regulation in macrophages. *J Pharmacol Exp Ther.*; 301:103-10.
- 84. He ML, Liu WJ, Sun HY, Wu W, Liu J, Tse HF, Lau CP, Li GR (2011).** Effects of ion channels on proliferation in cultured human cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.*; 51:198-206.
- 85. Heaton SJ, Eady JJ, Parker ML, Gotts KL, Dainty JR, Fairweather-Tait SJ, McArdle HJ, Srai KS, Elliott RM (2008).** The use of BeWo cells as an in vitro model for placental iron transport. *Am J Physiol Cell Physiol.*; 295:C1445-53.
- 86. Helms MN, Yu L, Malik B, Kleinhenz DJ, Hart CM, Eaton DC (2005).** Role of SGK1 in nitric oxide inhibition of ENaC in Na⁺-transporting epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*; 289:C717-26.
- 87. Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A, Visconti PE (2006).** Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem* 281: 5623-5633.
- 88. Hille B (1992).** Ionic channels of excitable membranes. Second edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts.
- 89. Hryciw DH, Guggino WB (2000).** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the outwardly rectifying chloride channel: a relationship between two chloride channels expressed in epithelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 27:892-5.

90. **Huang SS y Swaan P (2001)**. Riboflavin uptake in human trophoblast-derived BeWo cell monolayers: Cellular translocation and regulatory mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 298:264-271.
91. **Hübner C y Jentsch T (2002)**. Ion channel diseases. *Human Molecular Genetics* 11: 2435–45.
92. **Hughey RP, Mueller GM, Bruns JB, Kinlough CL, Pol PA, Harkleroad KL, Carattino MD, Kleyman TR (2003)**. Maturation of the epithelial Na⁺ channel involves proteolytic processing of the α - and γ -subunits. *J Biol Chem* 278: 37073-37082.
93. **Huppertz B (2008)**. Placental origins of preeclampsia. Challenging the current hypothesis. *Hypertension* 51: 970-975.
94. **Hwang T y Sheppard D (1999)**. Molecular pharmacology of the CFTR Cl⁻ channel. *TIPS* 20: 448-5.
95. **Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E (2007)**. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature*; 449:316-23.
96. **Johansson M, Jansson T, Powell TL (2000)**. Na(+)-K(+)-ATPase is distributed to microvillous and basal membrane of the syncytiotrophoblast in human placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R287-R294.
97. **Jones HN, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ (2006)**. Expression and adaptive regulation of amino acids transport system A in a placental cell line under amino acid restriction. *Reproduction* 131: 951-960.
98. **Julien M, Verrier B, Cerutti M, Chappe V, Gola M, De-vauchelle G, Becq F (1999)**. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells. *J Membr Biol* 168: 229–39.
99. **Kapoor N, Bartoszewski R, Qadri YJ, Bebok Z, Bubien JK, Fuller CM, Benos DJ (2009)**. Knockdown of ASIC1 and epithelial sodium channel subunits inhibits glioblastoma whole cell current and cell migration. *J Biol Chem.*; 284:24526-41.

100. **Kashlan OB, Sheng S, Kleyman TR (2005).** On the interaction between amiloride and its putative α -subunit epithelial Na channel binding site. *J Biol Chem* 280: 26206-26215.
101. **Kashlan OB, Kleyman TR (2011).** ENaC structure and function in the wake of a resolved structure of a family member. *Am J Physiol Renal Physiol.*; 301:F684-96.
102. **Keating E, Lemos C, Azevedo I, Martel F (2006).** Characteristics of thiamine uptake by the BeWo human trophoblast cell line. *J Biochem Mol Biol* 39: 383-393.
103. **Kellenberger S, Gautschi I, Schild L (2003).** Mutations in the epithelial Na channel ENaC outer pore disrupt amiloride block by increasing its dissociation rate. *Mol Pharmacol* 64: 848-856.
104. **Kemendy AE, Kleyman TR, Eaton DC (1992).** Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *Am J Physiol.*; 263:C825-37.
105. **Kibble JD, Greenwood SL, Clarson LH, Sibley CP (1996)** . A Ca²⁺-activated whole-cell Cl⁻ conductance in human placental cytotrophoblast cells activated via a G protein. *J Membr Biol.*; 151:131-138.
106. **Kleyman T, Carattino MD, Hughey RP (2009).** ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J Biol Chem*; 284: 20447-51.
107. **Knight KK, Olson DR, Zhou R, Snyder PM (2006).** Liddle's syndrome mutations increase Na⁺ transport through dual effects on epithelial Na⁺ channel surface expression and proteolytic cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21;103:2805-8.
108. **Knöfler M (2011).** Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*; 54:269-80.

109. **Kong XB, Ma HG, Li HG, Xiong CL (2008)**. Blockade of epithelial sodium channels improves sperm motility in asthenospermia patients. *Int J Androl* 31: 1-7.
110. **Kopeikin Z, Sohma Y, Li M, Hwang TC (2010)**. On the mechanism of CFTR inhibition by a thiazolidinone derivative. *Gen Physiol.* 2010; 136:659-71.
111. **Kotsias BA (2002)**. Basic mechanisms of ion channel function. *Advances in Clinical Neurophysiology* 54: 33-42.
112. **Kunzelmann K, Schreiber R (1999)**. CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol*; 168:1-8.
113. **Kusche-Vihrog K, Sobczak K, Bangel N, Wilhelmi M, Nechyporuk-Zloy V, Schwab A, Schillers H, Oberleithner H (2007)**. Aldosterone and amiloride alter ENaC abundance in vascular endothelium. *Pflugers Arch* 455: 849-857.
114. **Lang F, Föller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A, Huber SM (2005)**. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*; 205:147-57.
115. **Lang F, Föller M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, Szabo I, Huber SM, Gulbins E (2007)**. Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell death. *Methods Enzymol.*; 428:209-25.
116. **Langer B, Grima M, Coquard C, Bader AM, Schlaeder G, Imbs JL (1998)**. Plasma active renin, angiotensin I, and angiotensin II during pregnancy and in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 91: 196-202.
117. **Laube M, Küppers E, Thome UH (2011)**. Modulation of sodium transport in alveolar epithelial cells by estradiol and progesterone. *Pediatr Res.*; 69:200-5.
118. **Li Hongyu, Findlay IA, Sheppard DN (2004)**. The relationship between cell proliferation, Cl⁻ secretion, and renal cyst growth: a study using CFTR inhibitors. *Kidney Int.*; 66:1926-38.

- 119. Liang X, Da Paula AC, Bozoky Z, Zhang H, Bertrand CA, Peters KW, Forman-Kay JD, Frizzell RA (2012).** Phosphorylation-dependent 14-3-3 protein interactions regulate CFTR biogenesis. *Mol Biol Cell*. (en prensa).
- 120. Linsdell P (2005).** Location of a common inhibitor binding site in the cytoplasmic vestibule of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem*; 280:8945-50.
- 121. Liu GX, Vepa S, Artman M, Coetzee WA (2007).** Modulation of human cardiovascular outward rectifying chloride channel by intra- and extracellular ATP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. ; 293:H3471-9.
- 122. Llanos P, Henriquez M, Riquelme G (2002).** A low conductance, non-selective cation channel from human placenta. *Placenta* 23: 184-191.
- 123. Lui VC, Lung SS, Pu JK, Hung KN, Leung GK (2010).** Invasion of human glioma cells is regulated by multiple chloride channels including CIC-3. *Anticancer Res*; 30:4515-24.
- 124. Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galletta LJ, Verkman AS (2002).** Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest*. ; 110:1651-8.
- 125. Ma HP, Saxena S, Warnock DG (2002).** Anionic phosphoinositides regulate native and expressed epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem* 277: 7641–7644.
- 126. Magby JP, Neal AP, Atchison WD, Pessah IP, Shafer TJ (2011).** Channelopathies: Summary of the hot topic keynotes session. *Neurotoxicology* (en prensa).
- 127. Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC (2006).** Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol*.; 290:F1285-94.

- 128. Marino GI, Assef YA, Kotsias BA (2010).** An outwardly rectifying chloride channel in BeWo choriocarcinoma cell line. *Placenta*; 31:1093-100.
- 129. Marty A y Neher E (1995).** Tight-seal whole-cell recording, second edition. Plenum Press, NY and London. 31-52.
- 130. Mazzochi C, Bubien JK, Smith PR, Benos DJ (2006).** The carboxyl terminus of the alpha-subunit of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel binds to F-actin. *J Biol Chem* 281: 6528-6538.
- 131. McEneaney V, Harvey BJ, Thomas W (2008).** Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation. *Mol Endocrinol.*; 22:881-92.
- 132. Melin P, Hosy E, Vivaudou M, Becq F (2007).** CFTR inhibition by glibenclamide requires a positive charge in cytoplasmic loop three. *Biochim Biophys Acta*; 1768:2438-46.
- 133. Mills JW, Mandel LJ (1994).** Cytoskeletal regulation of membrane transport events. *FASEB J* 8: 1161-1165.
- 134. Mitchison TJ, Cramer LP (1996).** Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84:371-379.
- 135. Moe AJ, Furesz TC, Smith CH (1994).** Functional characterization of L-alanine transport in a placental choriocarcinoma cell line (BeWo). *Placenta* 15: 797-802.
- 136. Morales MM, Capella MA, Lopes AG (1999).** Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Braz J Med Biol Res.*; 32:1021-8.
- 137. Moreau R, Simoneau L, Lafond J (2003).** Calcium fluxes in human trophoblast (BeWo) cells: Calcium channels, calcium-ATPase, and sodium-calcium exchanger expression. *Mol Reprod Dev* 64: 189–198.

138. **Mushambi MC, Halligan WA, Williamson K (1996).** Recent developments in the pathophysiology and management of pre-eclampsia. *Br J Anaesth* 76: 133-148.
139. **Mylona P, Glazier JD, Greenwood SL, Sides MK, Sibley CP (1996).** Expression of the cystic fibrosis (CF) and multidrug resistance (MDR1) genes during development and differentiation in the human placenta. *Mol Hum Reprod.*; 2:693-698.
140. **Nadeem L, Munir S, Fu G, Dunk C, Baczyk D, Caniggia I, Lye S, Peng C (2011).** Nodal signals through activin receptor-like kinase 7 to inhibit trophoblast migration and invasion: implication in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Pathol.*; 178:1177-89.
141. **Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyosi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nogoguchi H, Chen L, Chai KX, Chao J, Tomita K (2002).** Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 109: 401-408.
142. **Okada Y, Sato K, Numata T (2009).** Pathophysiology and puzzles of the volume sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol*; 587:2141-9.
143. **Orendi K, Kivity V, Sammar M, Grimpel Y, Gonen R, Meiri H, Lubzens E, Huppertz B (2011).** Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*; 32 Suppl:S49-54.
144. **Otulakowski G, Rafii B, Harris M, O'Brodovich H (2006).** Oxygen and glucocorticoids modulate α ENaC mRNA translation in fetal distal lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 204-212.
145. **Page KR, Ashworth CJ, McArdle HJ, Finch AM, Nwagwu MO (2003).** Sodium transport across the chorioallantoic membrane of porcine placenta involves the epithelial sodium channel (ENaC). *J Physiol* 547: 849-857.
146. **Passero CJ, Mueller GM, Rondon-Berrios H, Tofovic SP, Hughey RP, Kleyman TR (2008).** Plasmin activates epithelial Na⁺ channels by cleaving the gamma subunit. *J Biol Chem*; 283:36586-91.
147. **Pattillo RA, Gey GO (1968).** The establishment of a cell line of human hormone synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res*; 28: 1231-1236.

148. **Pardo LA (2004).** Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)*; 19:285-92.
149. **Pochynyuk O, Tong O, Staruschenko A, Stockand JD (2007).** Binding and direct activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by phosphatidylinositides. *J Physiol*; 580: 365-372.
150. **Pojoga L, Gautier S, Blanc H, Guyene TT, Poirier O, Cambien F, Benetos A (1998).** Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *Am J Hypertens* ;11:856-60.
151. **Prince LS, Tousson A, Marchase RB (1993).** Cell surface labeling of CFTR in T84 cells. *Am J Physiol*; 264:C491-8.
152. **Prulière-Escabasse V, Clerici C, Vuagniaux G, Coste A, Escudier E, Planès C (2010).** Effect of neutrophil elastase and its inhibitor EPI-hNE4 on transepithelial sodium transport across normal and cystic fibrosis human nasal epithelial cells. *Respir Res.*; 11:141.
153. **Quesnell RR, Han X, Schultz BD (2007).** Glucocorticoids stimulate ENaC upregulation in bovine mammary epithelium. *Am J Physiol* 292:C1739-C1745.
154. **Quinton P (1999).** Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev* 79: S23-45.
155. **Rabe A, Disser J, Frömter E (1995).** Cl⁻ channel inhibition by glibenclamide is not specific for the CFTR-type Cl⁻ channel. *Pflugers Arch*; 429:659-62.
156. **Rahnama F, Shafiei F, Gluckman PD, Mitchell MD, Lobie PE (2006).** Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology* 147: 5275-5283.
157. **Ramos AJ, Cantero MR, Zhang P, Raychowdhury MK, Green A, MacPhee D, Cantiello HF (2008).** Morphological and electrical properties of human trophoblast choriocarcinoma, BeWo cells. *Placenta.*; 29:492-502.

- 158. Reddy M y Quinton P (2002).** Effect of anion transport blockers on CFTR in the human sweat duct. *J Membr Biol* 189: 15-25.
- 159. Redline RW, Patterson P (1995).** Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol.*; 26:594-600.
- 160. Reid B, Song B, McCaig CD, Zhao M. (2005).** Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. *FASEB J.*; 19:379-86.
- 161. Reisin I, Prat A, Abraham E, Amara J, Gregory R, Ausiello D, Cantiello HF (1994).** The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem* 269: 20584-91.
- 162. Riordan J, Rommens J, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al (1989).** Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-73.
- 163. Riquelme G (2006).** Apical maxi-chloride channel from human placenta: 12 years after the first electrophysiological recordings. *Biol Res* 39: 437-445.
- 164. Riquelme G (2009).** Placental chloride channels: a review. *Placenta*; 30:659-69
- 165. Riquelme G (2011).** Review: Placental syncytiotrophoblast membranes--domains, subdomains and microdomains. *Placenta*; 32 Suppl 2:S196-202.
- 166. Roberts JM (2008).** Preeclampsia: new approaches but the same old problems. *Am J Obstet Gynecol.*; 199:443-4.
- 167. Rokaw MD, Wang JM, Edinger RS, Weiz OA, Hiu D, Middleton P, Shlyonsky V, Berdiev BK, Ismailov I, Eaton DC, Benos DJ, Johnson JP (1998).** Carboxymethylation of the β subunit of xENaC regulates channel activity. *J Biol Chem* 44: 28746-28751.

- 168. Rosenberg M, Kamis A, Aleksandrov L, Ford R, Riordan J (2004).** Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR). *Biol Chem* 279:39051-7.
- 169. Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E (2002).** Epithelial Sodium Channel and the control of sodium balance: Interaction Between Genetic and Environmental Factors. *Annu Rev Physiol* 64: 877–897.
- 170. Rossier BC (2004).** The epithelial sodium channel. Activation by membrane-bound serine proteases. *Proc Am Thorac Soc* 1: 4-9.
- 171. Rubenstein RC, Lockwood SR, Lide E, Bauer R, Suaud L, Grumbach Y (2011).** Regulation of endogenous ENaC functional expression by CFTR and $\Delta F508$ -CFTR in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 300:L88-L101.
- 172. Sakmann B y Neher E (1976).** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- 173. Sakmann B y Neher E (1995).** Single-channel recording, second edition. Plenum Press, NY and London.
- 174. Satlin LM, Sheng S, Woda CB, Kleyman TR (2001).** Epithelial Na channels are regulated by flow. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F1010-F1018.
- 175. Schiller KR, Maniak PJ, O'Grady SM (2010).** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in airway epithelial wound repair. *Am J Physiol Cell Physiol*.; 299:C912-21.
- 176. Schmid KE, Davidson WS, Myatt L, Woollett LA (2003).** Transport of cholesterol across a BeWo cell monolayer: implications for net transport of sterol from maternal to fetal circulation. *J Lipid Res* 44: 1909-1918.
- 177. Schreiber R, Boucherot A, Mürle B, Sun J, Kunzelmann K (2004).** Control of epithelial ion transport by Cl⁻ and PDZ proteins. *J Membr Biol*.; 199:85-98.

- 178. Schwab A (2001).** Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F739-F747.
- 179. Schwab A, Rossmann H, Klein M, Dieterich P, Gassner B, Neff C, Stock C, Seidler U (2005).** Functional role of Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in migration of transformed renal epithelial cells. *J Physiol.*; 568:445-58
- 180. Schwiebert E, Egan M, Hwang T, Fulmer S, Allen S, Cutting G, Guggino W (1995).** CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell* 81: 1063–73.
- 181. Schwiebert E, Morales M, Devidas S and Egan M (1998).** Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci* 95: 2674-79.
- 182. Schwiebert E, Benos D, Egan M, Stutts J, Guggino W (1999).** CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79: S145–S166.
- 183. Seebeck J, Tritschler S, Roloff T, Kruse ML, Schmidt WE, Ziegler A (2002).** The outwardly rectifying chloride channel in rat peritoneal mast cells is regulated by serine/threonine kinases and phosphatases. *Pflugers Arch.*; 443:558-64.
- 184. Sharkey LC, McCune SA, Yuan O, Lange C, Fray J (2001).** Spontaneous pregnancy-induced hypertension and intrauterine growth restriction in rats. *Am J Hypertens*; 14:1058-66.
- 185. Sheppard D y Robinson K (1997).** Mechanism of glibenclamide inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels expressed in a murine cell line. *J Physiol* 503: 333-46.
- 186. Sheppard D y Welsh M (1999).** Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 79: S23-45.
- 187. Sheng S, Maarout AB, Bruns JB, Hughey RP, Kleyman TR (2007).** Functional role of extracellular loop cysteine residues of epithelial Na channel in Na self-inhibition. *J Biol Chem* 282: 20180-20190.

188. **Shennan DB, Boyd CAR (1987).** Ion transport by the placenta: a review of membrane transport systems. *Biochim biophys acta* 906: 437-457.
189. **Shojaati K, Causevic M, Kadereit B, et al. (2004).** Evidence for compromised aldosterone synthase enzyme activity in preeclampsia. *Kidney Int*; 66: 2322-8.
190. **Sibai B, Dekker G, Kupfermanc M (2005).** Pre-eclampsia. *Lancet* 365: 785–799.
191. **Silva NL, Wang H, Harris CV, Singh D, Fliegel L (1997).** Characterization of the Na⁺/H⁺ exchanger in human choriocarcinoma (BeWo) cells. *Pflügers Arch* 433: 792-802.
192. **Solc C, Wine J (1991).** Swelling-induced and depolarization-induced Cl⁻ channels in normal and cystic fibrosis epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*; 261:658-74.
193. **Souza N, Dohadwalla A, Reden J (1983).** Forskolin: A labdane diterpenoid with antihypertensive, positive inotropic, platelet aggregation inhibitory, and adenylate cyclase activating properties. *Med Res Rev*; 3: 201-219.
194. **Sparks RL, Pool TB, Smith NKR, Cameron IL (1983).** Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells *in vivo*. *Cancer Res* 43: 73-77.
195. **Stahl M, Stahl K, Brubacher MB, Forrest JN Jr (2012).** Divergent CFTR orthologs respond differently to the channel inhibitors CFTR_{inh}-172, glibenclamide, and GlyH-101. *Am J Physiol Cell Physiol*; 302:C67-76.
196. **Staruschenko A, Adams E, Booth RE, Stockand JD (2005).** Epithelial Na⁺ Channel subunit stoichiometry. *Biophys J* 88: 3966-3975.
197. **Sterling KM Jr, Shah S, Kim RJ, Johnston NI, Salikhova AY, Abraham EH (2004).** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human and mouse red blood cell membranes and its interaction with ecto-apyrase. *J Cell Biochem.*; 91:1174-82.

198. **Stewart G, Glanville M, Aziz O, Simmons N, Gray M (2001).** Regulation of an outwardly rectifying chloride conductance in renal epithelial cells by external and internal calcium. *J Membr Biol* 180: 49–64.
199. **Stokes JB, Sigmund RD (1998).** Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am J Physiol* 274: C1699-C1707.
200. **Stulc J (1997).** Placental Transfer of Inorganic Ions and Water. *Phys Rev* 77: 805-836.
201. **Sullivan MHF (2004).** Endocrine cell lines from the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 228: 103-119.
202. **Sun YH, Reid B, Fontaine JH, Miller LA, Hyde DM, Mogilner A, Zhao M (2011).** Airway Epithelial Wounds in Rhesus Monkey Generate Ionic Currents That Guide Cell Migration to Promote Healing. *J Appl Physiol*. (en prensa).
203. **Svenningsen P, Skøtt O, Jensen BL (2011).** Proteinuric diseases with sodium retention: Is plasmin the link? *Clin Exp Pharmacol Physiol* (versión online).
204. **Szkotak AJ, Man SF, Duszyk M (2003).** The role of the basolateral outwardly rectifying chloride channel in human airway epithelial anion secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*.; 29:710-20.
205. **Taddei A, Folli C, Zegarra-Moran O, Fanen P, Verkman AS, Galiotta LJ (2004).** Altered channel gating mechanism for CFTR inhibition by a high-affinity thiazolidinone blocker. *FEBS Lett.*; 558:52-6.
206. **Takahashi T, Utoguchi N, Takara A, Yamamoto N, Nakanishi T, Tanaka K, Audus KL (2001).** Carrier-mediated transport of folic acid in BeWo cell monolayers as a model of the human trophoblast. *Placenta* 22: 836-839.
207. **Taruno A, Niisato N, Marunaka Y (2008).** Intracellular calcium plays a role as the second messenger of hypotonic stress in gene regulation of SGK1 and ENaC in renal epithelial A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F177-F186.

208. **Tilman M, Kunzelmann K, Frabe U, Cabantchik I, Lang HJ, Englert HC, Greger R (1991).** Different types of blockers of the intermediate-conductance outwardly rectifying chloride channel in epithelia. *Pflugers Arch* 418: 556–63.
209. **Vallejos C, Riquelme G (2007).** The maxi-chloride channel in human syncytiotrophoblast: a pathway for taurine efflux in placental volume regulation? *Placenta*; 28:1182-91.
210. **Vardhana PA, Illsley NP (2002).** Transepithelial glucose transport and metabolism in BeWo choriocarcinoma cells. *Placenta* 23: 653-660.
211. **Verrey F, Fakitsas P, Adam G, Staub O (2008).** Early transcriptional control of ENaC (de)ubiquitylation by aldosterone. *Kidney Int.*; 73:691-6.
212. **Verrier B, Champigny G, Barhry P, Gerard C, Mauchamp J, Lazdunski M (1989).** Identification and properties of a novel type of Na-permeable amiloride-sensitive channel in thyroid cells. *Eur J Biochem* 183: 499-505.
213. **Vicente-Manzanares M, Horwitz AR (2011).** Cell Migration: An Overview. *Methods Mol Biol.*; 769:1-2
214. **Vila-Carriles WH, Kovacs GG, Jovov B (2006).** Surface expression of ASIC2 inhibits the amiloride-sensitive current and migration of glioma cells. *J Biol Chem* 281: 19220-19232.
215. **Walker BR, Williamson PM, Brown MA, Honour JW, Edwards CR, Whitworth JA (1995).** 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and its inhibitors in hypertensive pregnancy. *Hypertension*; 25:626-630
216. **Wang S, Meng F, Xu J, Gu Y (2009).** Effects of lipids on ENaC activity in cultured mouse cortical collecting duct cells. *Membr Biol.* ; 227:77-85.
217. **Wangemann P., M. Wittner, A. DiStefano, H. C. Englert, H. J. Lang, E. Schlatter, and R. Greger (1986).** Cl⁻-channel blockers in the thick ascending limb of the loop of Henle: structure activity relationship. *Pflügers Archiv*; 407:S128-S141.

218. **Wareing M, Greenwood SL (2011).** Review: Potassium channels in the human fetoplacental vasculature. *Placenta*; 32 Suppl 2:S203-6.
219. **Wei SP, Li XQ, Chou CF, Liang YY, Peng JB, Warnock DG, Ma HP (2007).** Membrane tension modulates the effects of apical cholesterol on the renal epithelial sodium channel. *J Membr Biol* 220:21-31.
220. **Winter M y Welsh M (1997).** Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature* 389: 294-6.
221. **Yamaguchi H, Condeelis J (2007).** Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 642-52.
222. **Yang JZ, Ajonuma LC, Tsang LL, Lam SY, Rowlands DK, Ho LS, Zhou CX, Chung YW, Chan HC (2004).** Differential expression and localization of CFTR and ENaC in mouse endometrium during pre-implantation. *Cell Biol Int* 28: 433-439.
223. **Zhang Z, Zeltwanger S, McCarty N (2000).** Direct comparison of NPPB and DPC as probes of CFTR expressed in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 175: 35-52.
224. **Zhang W, Xia X, Reisenauer MR, Hemenway CS, Kone BC (2006).** Dot1a-AF9 complex mediates histone H3 Lys-79 hypermethylation and repression of ENaC α in an aldosterone-sensitive manner. *J Biol Chem*; 28:18059-68.
225. **Zhao H, Hundal HS (2000).** Identification and biochemical localization of a Na-K-Cl cotransporter in the human placental cell line BeWo. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 43-48.
226. **Zheng XY, Chen GA, Wang HY (2004).** Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human endometrium. *Hum Reprod.*; 19:2933-41.
227. **Zhou Z-H, Bubien JK (2001).** Nongenomic regulation of ENaC by aldosterone. *Am J Physiol* 281: C1118-C1130.