

11202
201/415



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
HOSPITAL GENERAL "1o. DE OCTUBRE"

EFFECTO INHIBITORIO DE DIFERENTES OPIACEOS SOBRE EL
TRANSPORTE DE AMINOACIDOS EN PLACENTA HUMANA.

TESIS DE POSGRADO

QUE PRESENTA EL:

DR. RAFAEL OSCAR MADERA JIMENEZ

PARA OBTENER EL GRADO EN LA
ESPECIALIDAD DE ANESTESIOLOGIA



TEMAS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F., Febrero 1984.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Páginas
1.0 INTRODUCCION.....	1
2.0 ESTRUCTURA DE LA PLACENTA.....	4
2.1 Desarrollo.....	4
2.2 Morfología.....	5
2.3 Tipos de placenta.....	10
2.4 Maduración placentaria.....	12
2.5 Circulación placentaria.....	13
3.0 FUNCIONES DE LA PLACENTA.....	16
3.1 Transferencia de nutrientes al feto.....	16
3.2 Biotransformación de sustancias endógenas y exógenas.....	16
3.3 Papel endócrino.....	17
3.4 Papel inmunológico.....	19
3.5 Transferencia de drogas. Barrera placentaria.....	19
4.0 TRANSPORTE DE AMINOACIDOS POR LA PLACENTA.....	25
5.0 SISTEMA COLINERGICO PLACENTARIO.....	38
6.0 ACOPLAMIENTO ENTRE EL SISTEMA COLINERGICO PLACENTARIO Y EL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.....	40
6.1 Agonistas y antagonistas de la acetilcolina.....	40
6.2 Inhibidores de la colinesterasa.....	41
6.3 Inhibidores de la acetiltransferasa de la colina.....	42

7.0 PEPTIDOS OPIOIDES Y RECEPTORES A OPIACEOS EN LA PLACENTA....	45
8.0 MODIFICACION DE LA SINTESIS Y LIBERACION DE ACETILCOLINA POR OPIACEOS.....	51
9.0 OBJETIVO.....	55
10.0 MATERIAL Y METODO.....	56
10.1 Determinación del contenido de agua.....	56
10.2 Captación del ácido alfa- ¹⁴ C-aminoisobutírico.....	58
10.3 Captación del ¹⁴ C-AIB en presencia de diversos opiáceos...	60
11.0 RESULTADOS.....	62
11.1 Espacios de distribución del agua.....	62
11.2 Efecto de la temperatura y el tiempo de preincubación del ácido alfa- ¹⁴ C-aminoisobutírico.....	62
11.3 Efecto de la glicina del 2,4-dinitrofenol, del ácido aminoisobutírico no radioactivo y de la cicloheximida en la captación del ¹⁴ C-AIB.....	70
11.4 Efecto de los opiáceos en la captación del ¹⁴ C-AIB.....	70
12.0 DISCUSION.....	86
13.0 CONCLUSIONES.....	91
14.0 BIBLIOGRAFIA.....	92

1.0 INTRODUCCION.

La placenta es el órgano mediante el cual el feto se comunica con el ambiente materno. Está constituida tanto por tejido materno como fetal y debido a su papel nutricional y homeostático es imprescindible para la supervivencia del feto.

Ahora bien, a este órgano no podemos verlo como a una entidad aislada, sino en estrecha relación anatómica y funcional con el resto de las estructuras vecinas. De ahí que en muchas circunstancias se emplee el término de "Unidad Utero-Placentaria", que comprende al miometrio, al endometrio, los cotiledones y membranas coriónicas, para referirnos por ejemplo a la utilización de sustratos a partir de las diferencias de concentración entre la arteria uterina y la umbilical, o al consumo de oxígeno y de otros sustratos. Por otro lado, al analizar el metabolismo de los esteroides o el papel de determinada hormona placentaria resulta necesario referirnos a la llamada "Unidad Feto Placentaria."

La placenta es un órgano altamente especializado y con una gran diversidad tanto desde el punto de vista morfológico como funcional.

Estructuralmente la placenta varía no sólo de una especie a otra (23, 112, 113), sino aún dentro de una misma especie según el período de gestación (4, 36, 113). Así podemos ver diferentes tipos de placenta de acuerdo al tipo de desarrollo, al número de capas que separan a la sangre fetal de la materna, al número de capas del trofoblasto o a la disposición arquitectónica del mismo (23), diferencias que muchas

veces corresponden con diferencias de tipo funcional.

Por estas razones hay que ser cautelosos al extrapolar los resultados obtenidos en placenta de alguna especie animal a la humana, como lo demuestra el caso de la tristemente célebre talidomida. Esta droga empleada como sedante y tranquilizante fue causante de severas malformaciones congénitas (anexia y focomelia), las cuales no fueron observadas en animales de laboratorio (101, 103, 111).

La placenta es un órgano con múltiples funciones tales como la de transferencia de nutrientes al feto, biotransformación de sustratos endógenos y exógenos, producción y liberación hormonal y transferencia de drogas. Es pues, un órgano muy heterogéneo el cual posee sistemas de transporte similares a los del intestino o al riñón, un sistema metabólico y detoxificante parecido en muchos aspectos al hígado; es un órgano endócrino que guarda similitud con la glándula pituitaria e incluso desempeña cierto papel en la transferencia de defensas inmunológicas y de protección al feto.

Es importante señalar el hecho de que al analizar la transferencia de nutrientes a través de la placenta se presta mucha atención a la nutrición fetal y prácticamente se ignora a la nutrición de la propia placenta. Se le ve como a un órgano cuyas necesidades metabólicas son mínimas en comparación con las del feto. Sin embargo se ha demostrado, principalmente por estudios en ovejas crónicamente cateterizadas que a todo lo largo del embarazo los requerimientos nutricionales de la placenta per se son considerables. Así por ejemplo la unidad utero-placentaria consume alrededor del 55% del total de oxígeno transferido

desde la madre (9, 63), y del total de glucosa perfundida sólo una tercera parte llega al feto (63).

Llama la atención que aunque se han estudiado bastante desde el punto de vista morfológico las diferentes patologías de la placenta humana (25), en situaciones tales como la diabetes, hipertensión arterial, toxemia, fenilcetonuria, etc., poco o casi nada se sabe de las repercusiones en las funciones de síntesis, de transporte y del metabolismo placentario. En muy pocas situaciones se conoce qué alteración específica de la función placentaria está ocasionando un desarrollo fetal normal e incluso la muerte del feto. Lo mismo puede decirse de la lista interminable de agentes teratogénicos que se han descrito y de los cuales sólo se conocen las repercusiones en el feto pero se ignoran los mecanismos placentarios envueltos en estas anomalías (19).

Existen pues, muchos aspectos que necesitan esclarecerse en cuanto a los mecanismos del funcionamiento placentario, lo cual unido al hecho de que éste es un órgano relativamente fácil de conseguir y de trabajar experimentalmente (pues no se requieren técnicas invasivas y en el caso de la placenta humana se evitan los inconvenientes de la extrapolación de una especie a otra), hacen de la placenta un modelo experimental muy útil que nos brinda mucha información aunque paradójicamente se emplea muy poco.

2.0 ESTRUCTURA DE LA PLACENTA.

2.1 Desarrollo.

Una vez que ocurre la fecundación, el óvulo se convierte en huevo o cigoto, el cual de inmediato inicia una serie de sucesivas y continuas divisiones celulares que dan como resultado la formación de los denominados blastómeros. En las primeras 72 horas de la fecundación estas divisiones celulares (del tipo mitótico) son lentas, de tal manera que para esta época es un conglomerado de unas 12 células o blastómeras. Conforme continúa esta división celular se forma la mórula que se caracteriza por una estructura todavía compacta y uniforme (4, 36).

Gradualmente va apareciendo líquido en el interior de la mórula y entonces al huevo se le llama blastocito. En esta etapa del blastocito es cuando ocurre la implantación o nidación en la cavidad uterina (36).

Ya en el blastocito se observan dos tipos diferentes de células:

- a) una capa interna que forma el embrión y posteriormente el feto y
- b) una capa externa o trofoblasto, destinada a alimentar al huevo y a establecer la circulación placentaria y por tanto representa el inicio de la futura placenta.

Aproximadamente a los 5 días de la fecundación, Herting y Rock (40) han obtenido de la cavidad uterina humana blastocitos con 120 células, de las cuales 8 aparentemente correspondían al embrión y las restantes al trofoblasto.

De 7 a 8 días de la fecundación (aproximadamente 4 días después de la nidación) se puede observar un notable crecimiento del trofoblasto. En esta época se empieza a observar la subdivisión del trofoblasto en dos capas: a) citotrofoblasto o capa de Langhans que es la más interna y se caracteriza por tener células con citoplasma pálido e individuales y b) el sinciotrofoblasto, con núcleos oscuros, citoplasma basófilo y localización periférica.

A los 9 o 10 días después del embarazo se puede observar un aumento en el tamaño del huevo principalmente a expensas del sinciotrofoblasto, la aparición de lagunas y confluencias sanguíneas, además de la cavidad amniótica (4, 36).

Conforme avanza el embarazo el huevo continúa invadiendo y destruyendo tejidos uterinos, de tal manera que a los 14 ó 15 días la erosión de los capilares maternos hace que la sangre se extravase y se formen lacunas o confluentes que a su vez penetran en los espacios intervellosos, quedando de esta manera establecida la circulación fetal alrededor del décimo séptimo día (4, 36, 112).

Por otro lado, la penetración y ramificaciones del trofoblasto (debido al fenómeno invasivo) van conformando las vellosidades. En humanos ya a los 21 días de la fecundación se puede apreciar la relación corion-desidua-trofoblasto (36).

2.2 Morfología.

Al término del embarazo la placenta humana normal tiene una forma discoidal con unos 20 cm de diámetro y unos 2 cm de espesor, pesando de

500 a 600 gramos. Su tamaño varía de acuerdo a diferentes situaciones y condiciones tales como duración del embarazo, peso y talla de la madre y de las alteraciones patológicas de la madre (diabetes, toxemia o desnutrición).

En una placenta a término se pueden apreciar dos superficies: a) externa o materna, la cual está adherida a la cavidad uterina y a través de la cual pasan los vasos maternos. Esta superficie está dividida en 15 a 20 lóbulos llamados cotiledones por unos surcos denominados intercotiledoneos; b) interna o fetal, la cual está en relación con la cavidad amniótica y a su vez está cubierta por dos membranas que son una interna o amnios y otra externa o corion. Es en la cara interna de la placenta por donde penetra el cordón umbilical.

Si hacemos un corte desde la cara externa a la interna de la placenta, podemos diferenciar las siguientes capas:

a) Desidua basal, la cual no es más que la capa endometrial del útero embarazado que está inmediatamente por debajo del sitio de implantación. Se le asigna el nombre de desidua capsular a la restante parte del endometrio.

b) Vellosidades placentarias. Constituyen el componente funcional más importante de la placenta. Es aquí donde se localiza el trofoblasto, el cual juega un papel decisivo en la nutrición del embrión y del feto y en la síntesis de las diferentes hormonas y enzimas de la placenta.

Además del trofoblasto (citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto) en las vellosidades placentarias encontramos tejidos conectivo y endotelial. De ahí que al microscopio de luz podemos apreciar en un corte a

este nivel lo siguiente: capa trofoblástica, estroma, capilares fetales y espacios sanguíneos maternos (Figura No. 1).

Las vellosidades tienen la forma de columnas arborizadas, las cuales parten de la superficie del saco coriónico y se ramifican en el interior de los espacios intervillosos que son especies de cavidades divididas por proyecciones de la decidua basal (tabiques) que en la superficie materna de la placenta se corresponden con los surcos intercotiloideos.

El trofoblasto se encuentra recubriendo a las vellosidades de tal manera que el sincitiotrofoblasto es el más externo y el citotrofoblasto o capa de Langhans está orientado hacia dentro. En la superficie del sincitiotrofoblasto se encuentran abundantes microvellosidades que corresponden al llamado borde en cepillo de la placenta (Ver Figura No. 1).

En el interior de las vellosidades se encuentran vasos fetales que forman redes anastomóticas y están contenidos en el estroma de estas vellosidades, el cual a su vez está formado por tejido conectivo, fibrocitos e histiocitos o células de Hofbauer (4, 36, 112). (Figuras Nos. 1 y 2).

c) La placa coriónica. Forma el "techo" de los espacios intervillosos y está formada por dos membranas: la coriónica (corion frondoso) que es la más externa y la amniótica la más interna. Entre estas dos membranas discurren los vasos sanguíneos que salen del cordón umbilical o entran a él, para luego perforar al corion y entrar a las vellosidades (4, 36, 40, 113) (Figura No. 3).

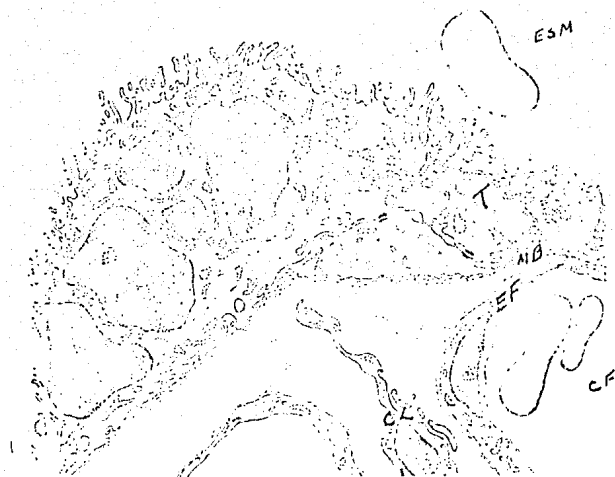


Figura No. 1.-- Representación esquemática de la distribución del trofoblasto en placenta hemomonocorial (humana). CF= capilar fetal, ESM = espacios sanguíneos maternos, MB= membrana basal, T = trofoblasto, EF =endotelio fetal, CL = célula de Langhans.

Ref. Enders y cols. Am J Anat. 116: 29 - 68. 1965 .-

2.3 Tipos de placenta.

De acuerdo a su desarrollo embriológico existen diferencias estructurales en las placentas de las diversas especies. Una de las características principales que hace la diferencia entre dos grandes grupos de placentas es la vascularización del corión que es un componente fetal básico. Cuando el corión está vascularizado por los vasos vitelinos se forma una placenta coriovitelina como sucede en la mayoría de los marsupiales. Por otro lado, siempre que el corión esté vascularizado por el alantoide o los vasos umbilicales se produce una placentación corioalantoidea, que es la que se tiene en la mayoría de los mamíferos superiores.

En el humano no se establece una placentación coriovitelina debido a que la formación precoz del celoma extraembrionario impide el contacto del saco vitelino con el trofoblasto, por lo que la placenta humana es corioalantoidea. En algunos animales tales como el conejo y la rata coexisten tanto la placentación coriovitelina como la corioalantoidea (112).

Las placentas se han clasificado de acuerdo al número de capas que separan la sangre fetal de la materna, de la siguiente manera (23, 40, 112):

Hemocorial: El trofoblasto está directamente en contacto con la sangre materna y sólo encontramos tres capas: trofoblasto, tejido conectivo y endotelio fetal. A este grupo pertenece la humana.

Endoteliochorial: Además de los tres elementos anteriores posee un endotelio materno. Ejemplo en los gatos.

CUADRO NO. 1

TIPOS DE PLACENTA:

- 1.- Por su desarrollo: .
 - A) Coriovitelina
 - B) Corioalantoidea
 - C) Mixta

- 2.- Según el número de capas que separan a la sangre fetal de la materna:
 - A) Hemocorial
 - B) Endoteliocorial
 - C) Sindesmocorial
 - D) Eiteliocorial

- 3.- Según el número de capas que presenta el trofoblasto:
 - A) Hemotricorial
 - B) Hemodicorial
 - C) Hemomonocorial

- 4.- Según el arreglo del trofoblasto:
 - A) Laberíntica
 - B) Pseudolaberíntica
 - C) Semivellosa
 - D) Vellosa (la humana).

Sindesmocorial: Posee una quinta capa que consiste en tejido conectivo endometrial.

Epiteliocorial: Este tipo de placenta posee 6 capas, pues además de todas las anteriores posee un epitelio endometrial, tal como sucede en las ovejas (Figura No. 2).

Enders (23) ha propuesto una clasificación para las placentas hemocoriales de acuerdo al número de capas del trofoblasto de la siguiente manera:

a) Hemotricorial: En ésta el trofoblasto presenta tres capas (externa, media e interna) separando los espacios venosos maternos de los vasos sanguíneos fetales. Ejemplo en ratones, ratas y hamsters.

b) Hemodicorial: Aquí el trofoblasto sólo tiene dos capas (externa e interna) y un ejemplo lo representa la placenta de conejos.

c) Hemomonocorial: Sólo posee una capa de trofoblasto, el cual de acuerdo a su arreglo puede a su vez ser laberíntico (cobayo) o vellosa (la humana) (Figura No. 1).

2.4 Maduración placentaria.

A lo largo de la gestación la placenta va sufriendo notables cambios morfológicos y funcionales los cuales incrementan la superficie de intercambio materno-fetal y permiten una mayor transferencia de nutrientes y otras sustancias.

Si bien, ya al final del primer trimestre la placenta ha alcanzado una arquitectura más o menos madura, no es sino hasta el final del embarazo cuando podemos hablar de una madurez funcional.

Entre los cambios que sufre la placenta al conseguir una madurez funcional tenemos (26, 36, 71, 90, 113):

a) Proliferación de las vellosidades, de tal manera que de una área de superficie a las 28 semanas de 5 m^2 aumenta en la placenta a término de 11 a 14 m^2 .

b) Reducción progresiva del grosor de las membranas placentarias. De esta manera el grosor del sincitiotrofoblasto de 10 micras al inicio del embarazo se reduce a 1.7 micras al final del mismo.

c) Reducción de la proporción de tejido conectivo, de tal manera que el tejido estromal se hace más compacto.

d) Incremento en el número de capilares fetales y acercamiento de los mismos a la superficie de las vellosidades.

e) Reducción en el número de histiocitos o células de Hofbauer.

2.5 Circulación placentaria.

La circulación de la placenta tiene dos componentes, uno fetal y el otro materno (4, 36).

Componente fetal: La sangre procedente del feto le llega a la placenta por las arterias umbilicales. Estas dos arterias dejan al cordón umbilical y se ramifican debajo del amnio, luego perforan al corión y se dirigen a las vellosidades primarias donde forman las arterias cotiloideas, las cuales a su vez se ramifican por las vellosidades secundarias y terciarias para finalmente terminar en redes capilares superficiales. De la misma manera, pero en sentido contrario, de los capilares superficiales venosos se forma la red venosa que va

confluyendo en venas mayores hasta terminar en la vena umbilical que es la que lleva los nutrientes de la placenta al feto.

Componente materno: La sangre materna que viene por las arterias uterinas penetra a los senos placentarios. Las arterias espirales (ramas de las uterinas) atraviesan la placa basal y vierten su contenido en forma de chorro en los espacios intervelllosos (sin mediar en este punto ningún sistema capilar) (Figura No. 3).

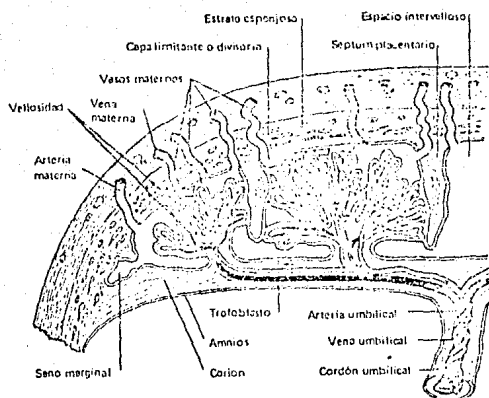


Figura no. 3. Representación esquemática de la circulación placentaria y otras estructuras.

Ref. Gray, H. Anatomy of the Human Body. 28 Ed. Lea and Fibcger. Phyladelphia. 1966. pag. 40 .-

3.0 FUNCIONES DE LA PLACENTA.

En cuanto a su funcionamiento la placenta interviene en los siguientes eventos:

3.1 Transferencia de nutrientes al feto.

Aunque algunas de las sustancias que pasan de la circulación materna a la circulación fetal lo hacen a través del amnios, el alantoide o el saco vitelino, es indudable el hecho de que al menos cerca del término del embarazo, la mayor parte de los nutrientes, fármacos y toxónes son transferidos a través de la placenta (43).

La mayoría de los nutrientes y metabolitos destinados al feto atraviesan a la placenta por algunos de los mecanismos ya conocidos: a) Difusión pasiva. De esta manera deja pasar gases como el oxígeno (59) y sustancias tales como el agua (14, 62) y lípidos (17, 81). b) Transporte facilitado, tal como sucede con los azúcares (6, 8, 48). c) Transporte activo. Tal es el caso de los aminoácidos (16, 24, 31, 35, 39, 41, 58, 66, 69, 89, 91, 92, 94, 97, 98, 99, 102, 106, 108, 109, 114).

3.2 Biotransformación de sustancias endógenas y exógenas.

La placenta no sólo puede metabolizar a los diferentes xenobióticos provenientes de la madre sino también a diferentes sustratos endógenos, tal como sucede con el metabolismo de los esteroides.

Estas biotransformaciones se realizan en la placenta a través de las reacciones metabólicas clásicamente conocidas: oxidación,

reducción, hidrólisis y conjugación (45, 46, 47, 77, 78, 79).

Mediante el proceso de oxido-reducción (al igual como sucede en el hígado y en otros órganos con capacidad metabólica), se incorpora un átomo de oxígeno al sustrato orgánico y el segundo átomo de la molécula de oxígeno en cuestión contribuye a formar una molécula de agua. Estos procesos de oxido-reducción están catalizados por un conjunto de enzimas que reciben el nombre de sistemas de microoxigenasa. En la placenta se han descrito aromatasas, un sistema de aril hidrocarbano hidroxilasa y un grupo de enzimas para romper al colesterol (45, 46, 77).

También se ha descrito en la placenta una glutatión S-transferasa que promueve la formación de ácido mercaptopúrico, catalizando la conjugación del GSH con varias sustancias electrofílicas (79).

3.3 Papel endócrino.

La placenta actúa como un órgano endócrino que modifica el metabolismo materno y fetal en las diferentes etapas del embarazo. Entre las principales hormonas sintetizadas y secretadas por la placenta humana tenemos: la gonadotropina coriónica (HCG), el lactógeno placentario o somatomamotrofina coriónica (HCT), la hormona folículo estimulante coriónica (hCFSH) y la hormona tirotrófina coriónica (hCT) (10, 70, 95, 104). También en la placenta se sintetizan adrenocorticotrofina (ACTH), B-lipotrofina y B-endorfina (29, 30, 55). Además hay evidencias de la existencia de la hormona estimulante de los melanocitos, oxitocina, relaxina, insulina, factores presores (vasopresina, renina, norepinefri-

na, epinefrina y serotonina), acetilcolina, hormona uterotrónica placentaria y hormona juvenil (10).

La gonadotrofina coriónica humana es una glucoproteína que se produce en etapas tempranas del embarazo (puede medirse en orina a los 26 días de la gestación) y es muy parecida a la hormona luteinizante de la pituitaria. Esta hormona juega un papel muy importante en el metabolismo de los esteroides debido a que estimula la producción de progesterona por el cuerpo lúteo durante las primeras 10 semanas del embarazo y posteriormente promueve dicha síntesis por la propia placenta. Se ha visto además que la gonadotrofina coriónica promueve la esteroideogénesis de diferentes maneras: primero, estimulando la conversión del colesterol a pregnenolona y progesterona; segundo, estimulando la síntesis de dehidroepiandrosterona por las adrenales del feto y tercero, estimulando la aromatización del anillo A de los esteroides o sea la hidroxilación del carbono 19 del andrógeno precursor. Otras funciones de esta hormona son la de estimular la adenilatociclase y por ende aumentar las concentraciones de fosforilcinasa y la de un probable agente inmunosupresor que no está bien dilucidado (10, 70, 95, 104).

El lactógeno placentario humano es un polipéptido hormonal parecido a la hormona del crecimiento de la glándula pituitaria. Puede ser detectada aproximadamente a la sexta semana de la gestación en la sangre materna. Esta hormona tiene tres efectos principales durante el embarazo: primero, un efecto luteotrófico evidenciado por la estimulación de la secreción de estrógenos y progesterona por el cuerpo lúteo

de ratas hipofisectomizadas; segundo, estimula la producción de leche por las glándulas mamarias al igual que la prolactina hipofisaria, y tercero, tiene una acción sobre el metabolismo materno análoga a la actividad de la hormona del crecimiento de la pituitaria. Produce un efecto diabético o sea que disminuye la respuesta a la insulina por la madre, estimula la lipólisis materna y por tanto incrementa sus niveles de ácidos grasos libres y hace que el metabolismo materno se ajuste a los requerimientos crecientes del feto de aminoácidos, minerales y glucosa (10, 36).

3.4 Papel inmunológico.

Mediante esta función la placenta primero provee al feto de defensas inmunológicas transferidas en forma de inmunoglobulinas desde la madre y segundo sirve de barrera de protección al feto para que sea histoincompatible contra los ataques inmunológicos de la madre (51).

3.5 Transferencia de drogas. Barrera placentaria.

Es importante revalorar constantemente el concepto de barrera placentaria y no verla sólo como a un conjunto de membranas semi-permeables que en un momento dado dejan o no pasar determinadas sustancias, sino como al elemento principal de la transferencia madre-feto y viceversa, que tiene diferencias anatómicas y funcionales no sólo de una especie a otra, sino también dentro de una misma especie en las diferentes etapas del embarazo. Esta característica de la placenta nos obliga a ser precavidos al extrapolar los resultados de animales experimentales a seres humanos.

Son muchos los factores que intervienen en esta transferencia madre-feto a través de la placenta y entre los cuales podemos señalar los siguientes:

a) Grosor y permeabilidad de la "barrera placentaria". Aunque se ha demostrado que las placentas de oveja y de otras especies son permeables a sustancias no electrolíticas y no metabolizables tales como la urea, manitol, eritritol y a la 3-0 metil glucosa (7), lo cual podría hacer pensar en la existencia de poros o canales en la barrera placentaria, hasta la fecha no hay evidencias de estas vías.

Aún en las placentas de estructuras menos complejas como sucede con la placenta humana y la del cobayo que son del tipo hemomonocorial, o sea en la que el sinciotrofoblasto está directamente en contacto con la sangre materna, un supuesto poro o vía paracelular debería estar situado entre las uniones de los endotelios fetales y continuarse luego a través de un sincicio completo y continuo.

En el caso de la placenta epiteliocorial como es la de ovejas, que es un ejemplo de las más complejas, la ruta paracelular sería más larga y sinuosa, pues además del endotelio capilar fetal y el trofoblasto debe pasar a través de un endotelio capilar materno no fenestrado y luego por un sincicio materno (Ver Figura No. 3).

b) Lipo e hidrosolubilidad de las sustancias y nutrientes. Las sustancias que son muy solubles en los lípidos como sucede con los anestésicos generales y con los barbitúricos, difunden rápidamente a través de esta barrera.

c) Diferencias de concentraciones (o de presiones parciales) a ambos lados de la barrera placentaria. Esta diferencia es la limitante principal en la velocidad de transferencia de nutrientes y otras sustancias tales como el agua, el oxígeno, ácidos grasos libres, electrolitos, drogas liposolubles, etc., aunque en el caso de azúcares y aminoácidos esta transferencia va a depender más bien de un sistema de transporte facilitado y activo respectivamente.

d) Tamaño, peso y forma molecular. Moléculas liposolubles con un peso menor de 1000 cruzan fácilmente las membranas placentarias, en cambio moléculas hidrosolubles pueden cruzarla por difusión si no están ionizadas y tienen un peso molecular muy pequeño. Sustancias de elevado peso molecular como son las proteínas parecen cruzar a estas membranas por pinocitosis. Los glóbulos rojos que en pequeña proporción parecen cruzar a la placenta probablemente lo hacen por ruptura de las membranas de esta barrera.

e) Gradiente de pH entre la sangre materna y fetal. El pH de la sangre fetal es ligeramente más ácido (7.3) que el de la sangre materna (7.4), lo cual determina un gradiente normal de pH a través de la placenta. Debido a esta diferencia de pH en ambas circulaciones, una base débil estará más ionizada en el lado fetal, en tanto que una droga ácida estará más ionizada en la sangre materna. Ahora bien, como la forma no ionizada es la que se equilibra, la concentración de la base tiende a ser más elevada en el feto y la de un ácido más elevada en la madre (86) (Figura No. 4).

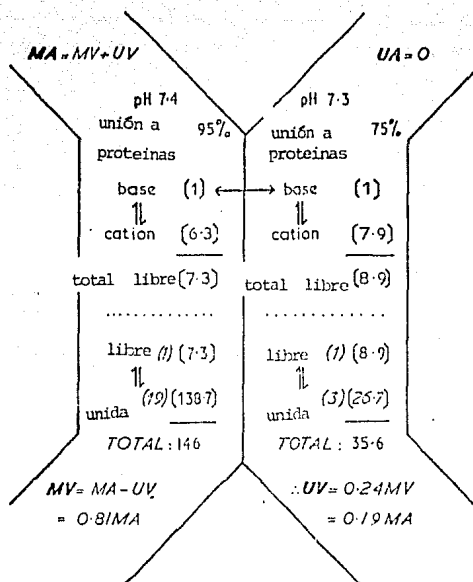


Figura no. 4. Esquema que representa el equilibrio que alcanza la Bupivacaina (droga altamente liposoluble) al través de la placenta, tomando en cuenta la diferencia de pH y de unión a proteínas - que hay en el lado materno y el fetal. MA = arteria materna, UA = arteria umbilical, MV = vena materna, UV = vena umbilical.

Ref. Chamberlain and Wilkinson (Ed). Placental Transfer. Pitman - Press. Great Britain. 1979. Pág. 174 .-

f) Unión a proteínas. Aquí es necesario tomar en cuenta varios aspectos; primero, que sólo la parte libre de un fármaco o toxón es la que puede pasar por la barrera placentaria, por lo que la velocidad de paso de una sustancia muy unida a proteínas plasmáticas estará considerablemente disminuida; segundo, esta fracción libre que logra cruzar a la placenta estará también sujeta a unirse a las proteínas plasmáticas fetales lo que modifica la distribución de la sustancia en cuestión en los diferentes compartimientos fetales y tercero, también hay que tomar en cuenta las evidencias de que para ciertas drogas tales como el fenobarbital y la fenitoina, la afinidad es mayor hacia las proteínas plasmáticas maternas que para las fetales (86).

g) Alteraciones en el flujo sanguíneo uterino. Una reducción en el suministro sanguíneo también puede alterar esta transferencia de drogas y nutrientes, no sólo por la disminución en los gradientes sino porque puede alterarse la integridad misma de dicha barrera.

Las principales funciones de la placenta se enumeran en el Cuadro 2.

FUNCIÓNES DE LA PLACENTA

- 1.- Transferencia de nutrientes
- 2.- Excreción de productos de desechos para el feto
- 3.- Biotransformación de sustancias endógenas
 - Biosíntesis de esteroides
- 4.- Biotransformación de sustancias exógenas
 - Oxidorreducción
 - Deshidrogenación
 - Conjugación
- 5.- Producción de hormonas
 - Gonadotropina coriónica
 - Lactógeno placentario
 - Tirotrófina coriónica
 - Hormona folículo estimulante coriónica
 - Hormona estimulante de los melanocitos
 - Hormona adrenocorticotrófica coriónica
 - Oxitocina
 - Insulina
 - Acetil colina
 - Factores presores (vasopresina, penina, epinefrina..)
 - Hormona uterotrófica placentaria
 - Relaxina
- 6.- Función inmunológica
- 7.- Función de transferencia de drogas.

4.0 TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS POR LA PLACENTA.

Los aminoácidos no sólo son necesarios para la síntesis de proteínas fetales y por ende para el crecimiento fetal, sino que también constituyen una fuente metabólica importante. Esto último se ha demostrado por una excesiva producción de urea en fetos de ovejas y de humanos (18) que es muy superior a la explicada únicamente por la utilización de estos aminoácidos para el crecimiento fetal.

Se pueden clasificar los aminoácidos transferidos a través de la placenta desde la madre al feto de acuerdo a su elusión en cromatografía de columna, a su estructura, a su polaridad y al tipo de transporte que emplean, en los siguientes grupos (52, 115) (Cuadro No. 3).

a) Aminoácidos, ácidos los cuales son muy lábiles metabólicamente y no esenciales y se forman por transaminación de los productos del ácido cítrico. Entre estos tenemos al ácido glutámico y al aspártico.

b) Aminoácidos neutros de cadena recta. Son potencialmente glucogénicos debido a la liberación de piruvato por la desaminación del catabolismo muscular. Aquí podemos ubicar a la alanina y a la glicina.

c) Aminoácidos neutros de cadena ramificada. Son esenciales y potencialmente cetogénicos. En este grupo encontramos a la valina, leucina e isoleucina.

d) Aminoácidos básicos. Son esenciales y contribuyen principalmente a formar estructuras protéicas. Ejemplos la lisina y la histidina.

La mayoría de los aminoácidos son transferidos desde la sangre materna a la fetal a través de la placenta en contra de un gradiente de

CUADRO NO. 3

CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LOS AMINOACIDOS

Grupo	Aminoácido	Ejemplo	Metabolismo	Transporte
Ácidos	$ \begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \end{array} $	ácido aspártico ácido glutámico	síntesis de purina y piri - dina	?
Neutros le cadena recta	$ \begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{R} \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \end{array} $	glicina alanina serina	glucogénicos	gradiente de Na dependiente de O ₂
Neutros le cadena rami ficada	$ \begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{R} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{R} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{R} \end{array} $	valina leucina isoleucina	cetogénicos	Intercambio
Básicos	$ \begin{array}{c} \text{HOOC} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \end{array} $	lisina arginina histidina	estructuras proteicas	gradiente de Na dependiente de O ₂

concentración, por lo que requieren de un transporte activo dependiente de un aporte energético (16, 24, 31, 35, 39, 41, 58, 66, 69, 89, 91, 92, 94, 97, 98, 99, 102, 106, 108, 114), diferenciándose del transporte facilitado de la glucosa que es a favor de un gradiente de concentración e independencia de un consumo de energía (6, 8, 43).

A continuación se describen algunas de las principales características que definen a este transporte de aminoácidos por la placenta:

1.- Concentraciones fetales de aminoácidos mayores que las maternas:

Mediante el empleo de placentas de cobayo perfundidas artificialmente (41); por perfusión de cotiledones aislados (97, 98) y determinando las concentraciones de aminoácidos en la sangre materna y del cordón umbilical de humanos o de ovejas cateterizadas crónicamente (69, 114), se ha encontrado que las concentraciones de la mayoría de estos nutrientes son mayores en la sangre fetal que en la materna. La relación de concentración feto-madre en perfusión *in situ* de placentas de cobayo (4) corresponde a los aminoácidos del grupo neutro de cadena recta

En contraste con la generalidad de los aminoácidos se ha encontrado que el ácido glutámico y el ácido aspártico, son pobremente transferidos a través de la placenta humana y de ovejas (69) y en forma similar en cotiledones perfundidos de cobayo (97), donde los niveles de estos aminoácidos cayeron por debajo de los niveles maternos.

2.- Acumulación de aminoácidos en rebanadas y en vesículas de microvellosidades de placenta en concentraciones superiores al medio de incubación:

La habilidad que tiene la placenta de acumular aminoácidos

en contra de un gradiente de concentración se ha evidenciado tanto en rebanadas de tejido veloso completo (16, 24, 31, 39, 58, 66, 99, 102) como en vesículas de microvellosidades placentarias (94, 100).

Esta técnica de rebanadas placentarias ha sido muy útil en el estudio de este órgano ya que permite controlar rigurosamente los diferentes factores medioambientales sin exponer a la madre o al producto, amén de que los resultados pueden ser extrapolados sin el riesgo de las diferencias de especie.

Aunque ya desde 1948 Foster y cols. estudiaron el transporte de aminoácidos en riñones con esta técnica y ha sido muy útil y frecuente su empleo para analizar el transporte de nutrientes en intestino y cerebro (67), no es sino a partir de la década de los 60 con los trabajos de Litonjua y cols. en 1967 (58) y de Dancis y cols. en 1968 (16) que analizaron el transporte del ácido alfa aminoisobutírico en placenta de cobayo y de Sybulski y cols. en 1967 (102) quienes vieron la incorporación de glicina a proteínas de placentas humanas a término, cuando se generalizó esta técnica de rebanadas para el estudio del comportamiento de las membranas placentarias.

3.- Estereoespecificidad y fenómenos de competencia:

Los L aminoácidos son transferidos más rápidamente que sus isómeros D (64, 115). Por otro lado se ha observado que en rebanadas de placenta tanto la glicina como la L alanina disminuyen la captación del ácido alfa aminoisobutírico, en tanto que la D alanina, la lisina y el ácido glutámico no modifican dicha captación (66, 67) (Figura No. 5).

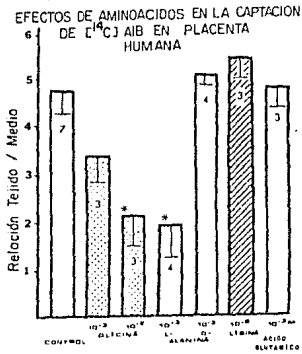


Figura No. 5 .

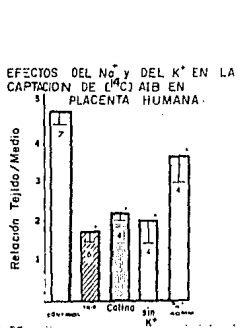


Figura No. 6 .

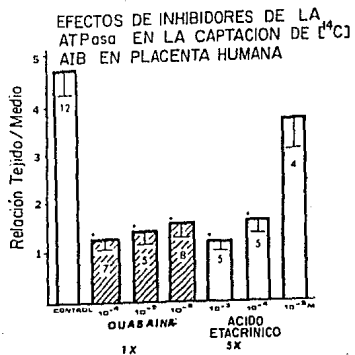


Figura No. 7 .

Además, analizando la incorporación de la glicina a las proteínas placentarias (102) se observó que dicha captación fue inhibida por la serina y la alanina, en tanto que la fenilalanina, la histidina, la lisina y el ácido glutámico no manifestaron inhibición. Todos estos datos van en favor de la existencia de un sistema de transporte específico para los L aminoácidos neutros.

Mediante el uso de técnicas de inhibición competitiva en rebanadas de tejido veloso de placenta humana a término (24) se han caracterizado tres sistemas de transporte para los aminoácidos neutros, los cuales se denominan A, L y ASC y que son bastante parecidos a los descritos para otros órganos (11) (Cuadro No. 4).

4.- Dependencia de un gradiente de sodio y de una adenosin trifosfatasa dependiente de Na y K:

Se ha demostrado que el sistema de transporte de aminoácidos placentarios es dependiente de un gradiente de Na^+ , de un gradiente de K^+ y de una ATP asa magnésica activada por Na^+ y por K^+ (58, 66, 94, 102). En rebanadas de placenta humana a término (66) la captación del ácido alfa aminoisobutírico disminuyó significativamente cuando el Na^+ del medio de incubación fue sustituido por Tris (hidroximetilaminometano) o por colina. Lo mismo sucedió cuando el K^+ fue removido del medio (Ver Figura No. 6).

En vesículas preparadas de microvellosidades placentarias humanas (94) la captación del ácido alfa aminoisobutírico fue estimulada específicamente por un gradiente de Na^+ en dirección al interior de las vesículas. En este mismo trabajo un gradiente de K^+ del interior de

CUADRO NO. 4

SISTEMA DE TRANSPORTE PARA AMINO ACIDOS NEUTROSI.- Sistema A:Acido alfa aminoisobutirico

Glicina

Prolina

N metilalanina

Alanina

Serina

Treonina

Glutamina

II.- Sistema L:

Isoleucina

Valina

Fenilalanina

DL b 2 aminobicyclo(2,2,1)Heptano-2acido carboxilico (BCH)III.- Sistema ACH:

Alanina

Serina

Treonina

Glutamina

Ref. Enders y Cols. Am. J. Physiol., 230: 706-710, 1976

la vesícula hacia afuera no mostró ningún efecto sobre la captación del aminoácido. Es decir que estos estudios sugieren que el sodio es un co-sustrato en el sistema de transporte A y probablemente contribuya a suministrar la energía requerida para el referido transporte de aminoácidos en contra de un gradiente de concentración.

Desde los trabajos de Sybulski y cols. en 1967 (102) donde la ouabaina inhibía importantemente la captación de glicina en rebanadas de placenta humana, se tenía la evidencia indirecta de la presencia de una ATP asa transportadora en la placenta. Luego se caracterizó en placenta humana a término una ATP asa dependiente de Mg^{++} la cual era parcialmente inhibida por la ausencia de Na^+ o de K^+ del medio de incubación o por la presencia en éste de ouabaina (5 mM) con un pH óptimo de 7.4 a 7.5 (65). También se evidenció en este mismo trabajo otra ATP asa dependiente de Ca^{++} que no era inhibida por la ausencia de Na o de K en el medio ni por la presencia de ouabaina, pero que sin embargo era inhibida por el ácido etacrínico y que tenía un pH óptimo de 8.

La captación del ácido alfa aminoisobutírico en rebanadas de placenta humana a término disminuyó considerablemente en presencia de ouabaina (66, 110) y en presencia del ácido etacrínico (66) (Figura No. 7).

La ouabaina tritiada se une con una alta afinidad a la ATP asa Na^+ y K^+ placentaria (humana) y se asocia principalmente a la parte de la membrana placentaria opuesta al borde en cepillo o sea al lado fetal (110). Este mismo estudio sugiere que el uso de digitálicos car-

díacos durante el embarazo podría "digitalizar" a la placenta, alterando su función.

5.- Inhibición metabólica:

Unos de los aspectos que define a un transporte activo es su dependencia de una fuente energética, de ahí que la captación de aminoácidos por la placenta es inhibida por los diferentes venenos metabólicos (60, 66, 67, 102).

El 2,4-dinitrofenol (10^{-3} a 10^{-4} Molar) es un desacoplador de la fosforilación oxidativa en la placenta. Se ha visto que este compuesto inhibe la captación de lisina y valina en placenta de cobayo (67); la incorporación de glicina a las proteínas placentarias (102) y la captación del ácido alfa aminoisobutírico en placenta humana (66). De la misma manera cuando las rebanadas de placenta humana a término fueron incubadas en una atmósfera de nitrógeno al 100% (que también inhibe los procesos oxidativos) o en presencia de iodoacetamida o de fluoruro de Na (inhibidores de la glucólisis), la captación de glicina (102) y la del ácido alfa aminoisobutírico (66) también se vieron considerablemente disminuidas (Figura No. 8).

Ahora bien, la inhibición de la captación del ácido alfa aminoisobutírico por el dinitrofenol o por la atmósfera de nitrógeno al 100% también fue estudiada en presencia o en ausencia de sustratos metabólicos como la glucosa y el acetato. En estas condiciones se observó que cuando la glucosa estaba presente (sin el acetato) el efecto de los inhibidores de los procesos oxidativos se atenuaba importantemente, en tanto que el acetato sólo no modificaba dicha inhibición. Esto

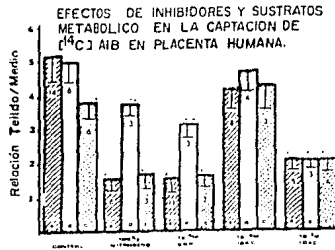


Figura No. 8 .

AV = DIFERENCIA ENTRE LA CAPTACION DE ^{14}C AIB CONTROL Y EN PRESENCIA DE QUABAINA.

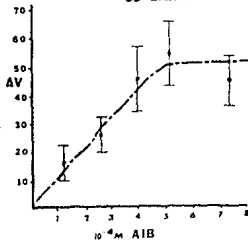


Figura No. 9 .

sugiere la existencia de un componente anaeróbico como parte del proceso de captación de aminoácidos por la placenta (66).

Estos resultados proponen pues, que los aminoácidos neutros son transportados por la placenta humana a término utilizando una fuente energética aeróbica y otra anaeróbica, las cuales alimentan a un activador común del transporte como lo sería la ATP así dependiente del Mg^{++} y activada por el Na^+ y por el K^+ (66).

6.- Efectos de la temperatura:

En rebanadas de placenta humana a término la captación de la glicina disminuyó en un 74% cuando la temperatura del medio de incubación fue disminuída de 37°C a 4°C (102) y la acumulación del ácido alfa aminoisobutírico aumentó alrededor de 267% cuando la temperatura de incubación se elevó de 25°C a 37°C (66).

7.- Fenómenos de saturación:

Estudios in vitro de todo el tejido vellosa (66, 99) o de vesículas de membranas de microvellosidades (94), han demostrado que el proceso de transporte de aminoácidos por la placenta tiene dos componentes: uno que implica un proceso activo y otro de difusión.

Como hemos visto anteriormente, el 2,4-dinitrofenol (66, 67, 102), la ouabaina (66, 110) o un medio sin Na^+ (66) inhiben el transporte activo de aminoácidos por la placenta (todos estos de manera más o menos similar). En base a esto podemos decir que la diferencia entre las velocidades de captación (V) de un aminoácido control y de este mismo en presencia de dinitrofenol, ouabaina o medio sin Na, representa una media del componente activo que interviene en la acumulación en el

interior del tejido veloso o de las vesículas de membrana.

De esta manera graficando el componente activo o sea el V contra diferentes concentraciones del aminoácido, se obtiene una curva de saturación que sigue una cinética de Michaelis Menten. Así en rebanadas de placenta humana a término, y empleando ácido alfa aminoisobutírico y ouabaina se calculó una K_m de 0.48 mM y una V_{max} de 60 M/mg de placenta por 30 min (66) (Figura No. 9).

Akedo y Christensen (2) analizando la acción de la insulina sobre la captación de aminoácidos en diafragma aislados de ratones, elevaron un método matemático para diferenciar los procesos de difusión de los de transporte activo mediante el cual se pueden obtener diferentes parámetros cinéticos (K_m , V_{max} , constante de difusión). Estos autores llegaron a la siguiente ecuación:

$$R = \frac{C_{int}}{C_{ext}} = (1 - e^{-KDt}) + \frac{Y}{KD} (1 - e^{-KDt}) \frac{1}{C_{ext}}$$

Donde: C_i y C son las concentraciones en el interior de las rebanadas o vesículas y la del medio respectivamente.

R = a la relación tejido medio.

Y = Velocidad del transporte (componente saturable).

La constante de difusión (KD) puede calcularse por el intercepto en la ordenada de la gráfica R contra $1/C_{ext}$ (si se considera a Y igual a una constante durante la saturación). De esta manera la velocidad del transporte (Y) se puede calcular a partir de la ecuación de Akedo y Christensen despejando.

Finalmente graficando Y contra Y/C ext (gráfica de Eadie-Hoffstee) se puede calcular la K_m de la pendiente y la velocidad máxima del intercepto en la ordenada.

B.- Efectos del pH del medio:

La acumulación del ácido alfa aminoisobutírico marcado con carbono 14 no fue modificada significativamente dentro de un rango de pH de 7.2 a 8.2. Fuera de estos límites la captación disminuyó sensiblemente (66).

5.0 SISTEMA COLINERGICO PLACENTARIO.

A pesar de que la placenta no posee elementos nerviosos, se ha evidenciado de múltiples maneras la existencia de un sistema colinérgico en este órgano. Entre estas evidencias tenemos:

1.- Identificación de acetilcolina. En la placenta humana a término se ha informado sobre un contenido de acetilcolina que varía entre 112 y 167 nanomolas por gramo de placenta y que está localizada casi exclusivamente en el tejido veloso (75, 83, 84). Este contenido de acetilcolina varía con la edad gestacional alcanzando un valor máximo de 723 nanomolas por gramo de tejido placentario alrededor de las 21 a 24 semanas del embarazo (83).

2.- Presencia de acetiltransferasa de la colina. Esta enzima ha sido caracterizada tanto en placentas inmaduras (68) como en placentas a término (82). Diferentes inhibidores de esta enzima tales como el 2-benzoiletíl trimetilamonio o la 4-(naftilvinil)piridina inhiben la síntesis y la liberación de acetilcolina por la placenta (12, 38, 53).

3.- Presencia de una colinesterasa placentaria. Esta enzima ha sido identificada en placenta humana y de ratón (34, 49, 84) y se ha visto además que su actividad varía con la edad gestacional (84).

4.- Presencia de probables receptores placentarios a la acetilcolina. Estos receptores parecen ser de tipo muscarínico (84, 91, 108, 109).

A este sistema colinérgico que hay en la placenta se le ha asociado con las siguientes funciones:

a) Transporte de aminoácidos y regulación del crecimiento y

desarrollo fetal.

b) Metabolismo de fosfolípidos placentarios.

c) Regulación de la liberación de las hormonas sintetizadas en la placenta.

d) Regulación de la circulación placentaria.

6.0 ACOPLAMIENTO ENTRE EL SISTEMA COLINERGICO PLACENTARIO Y EL TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.

La liberación de acetilcolina por la placenta y la subsiguiente estimulación de probables receptores colinérgicos en el sincitiotrofolasto parecen estar acoplados al sistema de transporte de aminoácidos por este órgano y a la regulación del desarrollo y crecimiento fetal (33, 34, 69, 84, 91, 92, 93, 108, 109, 114).

Diferentes drogas y toxones que actúan en diversos sitios de este sistema colinérgico modifican los procesos de transporte de los aminoácidos a través de la placenta.

6.1 Agonistas y antagonistas de la acetilcolina.

Desde hace tiempo se sabe que la administración crónica de nicotina inhibe el crecimiento fetal y que en madres fumadoras hay también retardo en el crecimiento intrauterino (32, 33, 44, 61, 84, 96, 116).

En estudios sobre la captación del ácido alfa aminoisobutírico se observó que la acetilcolina ($2 \times 10^{-3}M$) disminuyó esta captación en un 34%; la nicotina ($2.5 \times 10^{-3}M$) en un 41%. Con la atropina esta captación fue inhibida en un 29% con $1 \times 10^{-4}M$ y en un 61% con $5 \times 10^{-4}M$ (91).

En otros trabajos parecidos se observó que la atropina ($1 \times 10^{-3}M$) pero no la d-tubocurarina inhibió la captación de ácido alfa aminoisobutírico (108, 109). Todo esto hace pensar en la existencia de

receptores colinérgicos muscarínicos en la placenta humana que median en el transporte de aminoácidos por este órgano, sin embargo no se pudo demostrar la existencia de sitios de alta afinidad con agonistas colinérgicos marcados (^3H -acetilcolina, ^3H -nicotina, ^3H -muscarona), ni tampoco con antagonistas muscarínicos (^3H -benzilato de quinuclidina) o del tipo nicotínico (I-125 alfa bungarotoxina) (108). Se sugiere pues que la placenta podría tener receptores muscarínicos del tipo M_2 diferentes a los clásicos M_1 .

6.2 Inhibidores de la colinesterasa.

Cuando la fosolina que es un inhibidor irreversible de la colinesterasa se empleó a baja dosis ($7 \times 10^{-6}\text{M}$) se observó que incrementaba la captación de ácido alfa aminoisobutírico por el tejido veloso de placenta humana a término, sin embargo cuando fue empleada a grandes dosis en presencia o en ausencia de acetilcolina exógena disminuyó dicha captación. En este mismo trabajo se observó que ni la mecamilamina (10^{-4}M) ni la d-tubocurarina (10^{-4}M) afectaron esta captación de aminoácidos (84).

En otros estudios el paraoxón (10^{-5}M) redujo significativamente la acumulación de ^{14}C -ácido alfa aminoisobutírico, pero aquí tampoco la d-tubocurarina tuvo efecto. Se piensa que este efecto del paraoxón no tiene relación con la inhibición de la acetilcolinesterasa pues se ha visto que este toxón tiene además otros efectos tales como inhibición de la captación del Ca^{++} por el retículo sarcoplásmico (5), altera la incorporación de aminoácidos a las proteínas que están

sintetizándose y tiene además una acción directa sobre receptores colinérgicos (108).

6.3 Inhibidores de la acetil transferasa de la colina.

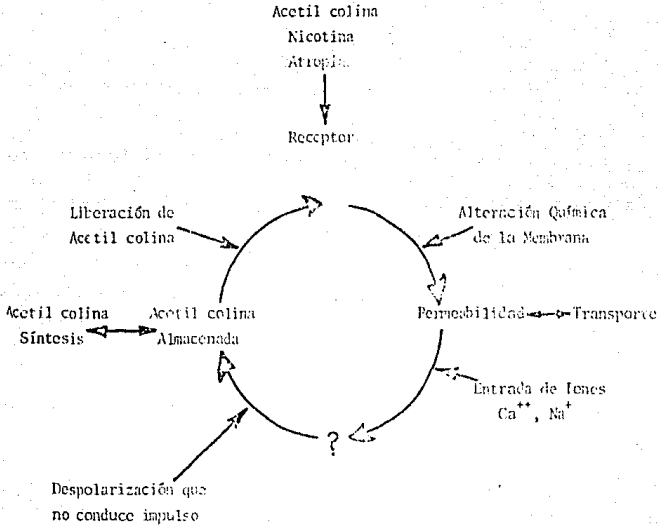
El cloruro de (2 benzoetil) trimetilamonio, la bromoacetilcolina y las 4 naftil-piridina que son potentes inhibidores de esta enzima son también fuertes inhibidores de la captación de aminoisobutírico en vellosidades de placenta humana a término. Esto indica que de alguna manera la síntesis de acetilcolina está unida a la captación de aminoácidos por la placenta (12, 92).

Todos estos hallazgos van en favor de atribuirle al sistema colinérgico placentario un papel modulador en las funciones de transporte de este órgano. Al parecer la acetilcolina localizada en las vellosidades coriónicas y que es liberada por el epitelio del trofoblasto (75) estimula a los receptores colinérgicos localizados en este mismo epitelio, ocasionando cambios en su permeabilidad que facilitan el transporte de las moléculas nutrientes (o eventualmente también de los fármacos) del lado materno al fetal.

Hasta la fecha no ha sido completamente dilucidada esta unión existente entre la estimulación colinérgica de receptores trofoblásticos y el transporte de sustancias (Figura No. 10 y Cuadro No. 5).

FIGURA NO. 10

MODELO DE ACOPLAMIENTO ESTIMULO SECRECION DEBIDO A LA LIBERACION DE ACETIL COLINA PLACENTARIA:



Ref. Olubadewo y Rama Sastry, J. Pharmacol. Exp. Ther. 204-433, 1978.

CUADRO NO. 5

SISTEMA COLINERGICO PLACENTARIO Y TRANSPORTE DE AMINOACIDOS.

Droga	Concentración	Captación ¹⁴ C-AIB	Referencia
Acetilcolina Exógena	$2 \times 10^{-3}M$	↓ 34%	Rowell & Sastry (1977)
Nicotina	$2.5 \times 10^{-3}M$	↓ 41%	" "
Nicotina*	(Uso crónico a 100 mg/ml en agua diaria)	↓ 24%	Rowell & Clark (1982)
Atropina	$1 \times 10^{-4}M$	↓ 29%	Rowell & Sastry (1978)
Atropina	$5 \times 10^{-4}M$	↓ 61%	" "
Folina	$7 \times 10^{-6}M$	↑ 20%	Sastry & Olubadewo (1977)
Cloruro de 2 Benzoiletilamonio	$3 \times 10^{-5}M$	↓ 75%	Rowell & Sastry (1980)
d-Tubocurarina	$1 \times 10^{-4}M$	No efecto	Welsch y cols. (1978)

↓ = % Inhibición con respecto al contro.

↑ = % Incremento " "

* Experimento crónico en ratas.

7.0 PEPTIDOS OPIOIDES Y RECEPTORES A OPIACEOS EN LA PLACENTA.

La producción de ACTH por la placenta está ampliamente documentada (29, 30, 55). También se ha encontrado en este órgano la presencia de β -lipotropina y de β -endorfinas inmunorreactivas (72), así como de alfa melanotropina (13).

La presencia de estos péptidos en la placenta y la demostración tanto en pituitaria normal como en clones tumorales de pituitaria de ratón de que la ACTH, la β -lipotropina y la β -endorfina proceden de una glucoproteína precursora común (22, 87), hizo pensar en la posibilidad de que en la placenta dichos péptidos también tuviesen un precursor común.

En 1979 Odagiri y cols. (74) mediante técnicas de inmovilización, de cromatografía por exclusión de gel, electroforesis y radioinmunoensayo encontraron en extractos de placenta, corticotrofina, lipotropina (β y α) además de β -endorfinas y sugieren que estos péptidos eran sintetizados a partir de una molécula precursora común. En 1979 Pedigo y cols. (76) por técnicas de radioinmunoensayo y de radiorreceptores encontraron actividad de β -endorfinas en dos fracciones de extracto de placenta humana. De estas dos fracciones, la de mayor peso molecular (4500-5000) parece representar a un precursor de la β -endorfina, en tanto que la fracción de menor peso molecular (2000 a 2500) sugieren que podría estar asociada a una β -endorfina o a algún metabolito desconocido de la β -endorfinas.

Liotta y cols. en 1980 (56) demostraron que la placenta humana al igual que las células pituitarias humanas, es capaz de sintetizar β -endorfinas in vitro. En este mismo año, Rama Sastry y cols. (85) mediante técnicas de radioinmunoensayo midieron en tejido veloso de placenta humana concentraciones de β -endorfinas de 0.73 ± 0.19 ng/mg de proteína y de metionina-enkefalina de 0.60 ± 0.12 ng/mg de proteínas.

En 1982, Liotta y cols. (57) sintetizaron en cultivos de células de placenta humana, un péptido que es similar estructuralmente a la β -endorfina humana.

Todos estas evidencias no sólo demuestran que la placenta contiene péptidos opioides sino también que similarmente a la pituitaria, la β -endorfina placentaria es un fragmento que está contenido dentro de una molécula mayor, de la cual se desprende por ruptura proteolítica (Cuadro No. 6).

Otro hecho sobresaliente es que también se han descrito en la placenta sitios de alta afinidad y estereoespecíficos para diferentes drogas opiáceas (80, 105).

Al observarse el desplazamiento de la etorfina tritiada en fracciones crudas de membranas placentarias humanas se encontró que diferentes opiáceos empleados tenían potencias similares en la placenta que en el cerebro. Sin embargo, la morfina resultó ostensiblemente menos potente en la placenta humana que en cerebro de rata con IC-50 de 350 y 63 nM respectivamente (Cuadro No. 7). Este mismo estudio reveló que los sitios de unión a la etorfina tritiada (en placenta human) se incrementaron unas 10 veces entre los 2 y 5 meses de la

CUADRO NO. 6

OP10IDES PLACENTARIOS.

<u>Método</u>	<u>Péptido</u>	<u>Niveles</u>	<u>Referencia</u>
Inmunorreacción	B-endorfina		Nakai y cols. 1978
R.I.A. Cromatografía Electroforesis	B-endorfina		Odagi y cols. 1979
R.I.A.	Leu-encefalina	67 µg/gr	Sastry y cols. 1979
R.I.A.	B-endorfinas		Pedigo y cols. 1979
Síntesis in vitro	B-endorfina		Liotta y cols. 1980
R.I.A.	Met-encefalina	0.60 ± 0.12 ng/mg	Sastry y cols. 1980
R.I.A.	B-endorfina	0.73 ± 0.19 ng/mg	" " "
Cultivo en células placentarias	B-endorfina		Liotta y cols. 1982

CUADRO NO. 7

UNION ESPECIFICA PARA DROGAS OPIACEAS EN LA PLACENTA.

	IC ₅₀ (nM)		
	Placenta (N=4)	Cerebro (N=2-3)	
Ciclazocina	2 ± 0.5	4	
Levorfanol	2.4 ± 0.3	12.5	
Diprenorfina	3.9 ± 0.5	3.3	
Naloxona	8.8 ± 2.8	14	
Morfina	350.0 ± 140	63	
β-Endorfina	309.0 ± 65	24	
D-Ala ₂ -Leu-encefalinamida	866.0 ± 88	11	
D-Ala ₂ -Met-encefalinamida	1000.0 ± 260	14	
Haloperidol	7500.0 ± 2400		
Codeína	25000.0 ± 500		
Dextrorfan	> 25000		

Potencia relativa de las drogas para reducir la unión de la ³H-etorfina a membranas de placenta humana a término y a receptores opiáceos en cerebro. Se empleó 1 nM de ³H-etorfina. La incubación se realizó a 4°C por 2 h. Los valores de la IC₅₀ de los experimentos se determinaron mediante regresión de la gráfica log-probit.

Referencia: Valente and cols. Biochem. Pharmac. 2657-2661, 1980.

CUADRO NO. 8

INHIBICION DE LA UNION DE LA ^3H -ETORFINA POR VARIAS DROGAS
OPIACEAS EN FRACCIONES DE MEMBRANA DE MICROVELLOSIDADES
PLACENTARIAS.

Drogas	IC ₅₀ (nM)
Ciclazocina	2.76 \pm 0.25
Cetociclazocina	3.50 \pm 0.31
Morfina	483 \pm 26
(DA1a) ² -(DLeu) ⁵ encefalina	25040 \pm 790

Los experimentos de unión se llevaron a cabo a 37°C por 30 minutos en presencia de la ^3H -etorfina (1 nM). La IC₅₀ se calculó mediante regresión lineal de la gráfica lo-probit. Cada droga fue revisada en 5 concentraciones en tres experimentos por separados. Los resultados se expresaron como la media \pm e.t.a.

Referencia: Porthé and cols. Life Sci. 31: 2647-2654, 1982.

gestación, después de lo cual se mantuvieron constantes hasta el término del embarazo. Además, estos sitios de alta afinidad a opiáceos sólo se encontraron en las placentas humanas y de rata, pero no en placentas de ratones, conejos, hamsters ni ovejas (105).

Estos sitios de alta afinidad a opiáceos en placenta humana están localizados fundamentalmente en el borde en cepillo del sinciciotrofo-
blasto (80) y muestran una gran afinidad por los opiáceos del tipo kappa (ciclazocina y cetociclazocina) y muy poca afinidad por los agonistas μ como la morfina y delta agonistas como la (D ala)²-(D Leu)⁵ encefalina (Cuadro No. 8).

8.0 MODIFICACION DE LA SINTESIS Y LIBERACION DE ACETILCOLINA POR OPIACEOS.

Los mecanismos exactos por el cual el sistema colinérgico placentario está vinculado al transporte de aminoácidos hasta el momento no están aclarados, sin embargo hemos visto como sí se inhibe la síntesis de acetilcolina (12 y 92) si se inhibe también la captación de aminoácidos por la placenta.

Tampoco hay documentación de si en la placenta los opiáceos modifican o no la síntesis y/o la liberación de acetilcolina u otros transmisores en la placenta.

Ahora bien, aunque la placenta carece de elementos nerviosos su liberación de acetilcolina y su interrelación con diversos eventos fisiológicos (liberación de hormonas, captación de aminoácidos, etc.) parecen tener cierta similitud con el comportamiento de estructuras nerviosas en cuanto a la liberación de transmisores.

Múltiples trabajos evidencian que los analgésicos narcóticos y las encefalinas inhiben la síntesis y liberación de neurotransmisores (15, 27, 28, 50, 73, 107).

Desde los trabajos de Lande y Bantley y de Schauman y cols. en 1955; de Poliken y cols. en 1960; Morris y cols. en 1961 y Beteslin y cols. en 1965, se ha visto cómo en diferentes preparaciones y condiciones la morfina inhibe la síntesis o la liberación de la acetilcolina (107).

Cox y Weinstock en 1966 encontraron una gran correlación entre la potencia analgésica de diferentes drogas narcóticas y su capacidad para inhibir la liberación de acetilcolina (15).

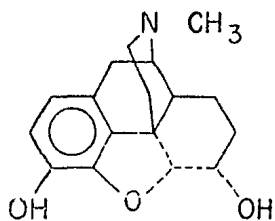
North y Henderson en 1975 haciendo registros intracelulares en plexo gástrico de íleo de cobayo y en vas deferens de ratón reportaron una acción depresora de la morfina, debida a una inhibición presináptica de la liberación del transmisor en la unión neuroefectora, siendo esta inhibición dependiente de la dosis, estereoespecífica y antagonizable con naloxona (73) (Cuadro No. 9).

CUADRO NO. 9

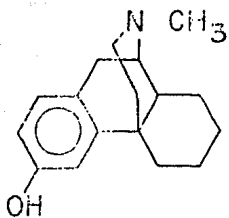
EFFECTO DE LA MORFINA SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE ACETILCOLINA

<u>Efecto</u>	<u>Preparación</u>	<u>Referencias</u>
Inhibición de la síntesis	Tejido cerebral	Lande & Bantley 1955
Disminución en su liberación	Ileo de cobayo	Schaumann & Cols. 1955
" " "	Ganglio cervical sup. de gato	Poliken & Cols. 1960
Depresión acetilación de la colina	Tejido cerebral	Morris & Cols. 1961
Inhibición de la síntesis	Esp. subaracnoideo de gato	Beteslin & Cols. 1965
Inhibición de su liberación	Nódulo senoauricular de conejo	Kennedy & West 1967
Inhibición de la liberación de acetilcolina, dependiente de la dosis, estereoespecífica y reversible con naloxona	<u>Vas deferens</u> de ratón y Plexo Mientérico	North & Henderson 1975

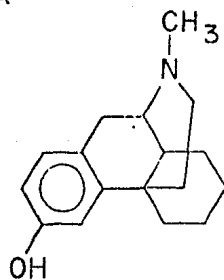
ESTRUCTURA QUIMICA OPIACEOS EMPLEADOS



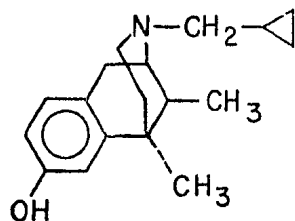
MORFINA



LEVORFANOL



DEXTRORFAN



CICLAZOCINA

9.0 OBJETIVO.

Determinar si existe relación entre la captación de aminoácidos por el tejido vellosa placentario (la cual es dependiente de acetilcolina) y la presencia de diferentes opiáceos, los cuales parecen modular la liberación de acetilcolina.

10.0 MATERIAL Y METODO.

Las placentas humanas procedentes de embarazos normales, de término obtenidas inmediatamente después del alumbramiento de partos o cesáreas no complicadas, fueron colocadas en una solución Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB) en 4 grados centígrados y transportadas al laboratorio, con un intervalo de tiempo entre el alumbramiento y el inicio del proceso experimental que varió de 20 a 45 minutos.

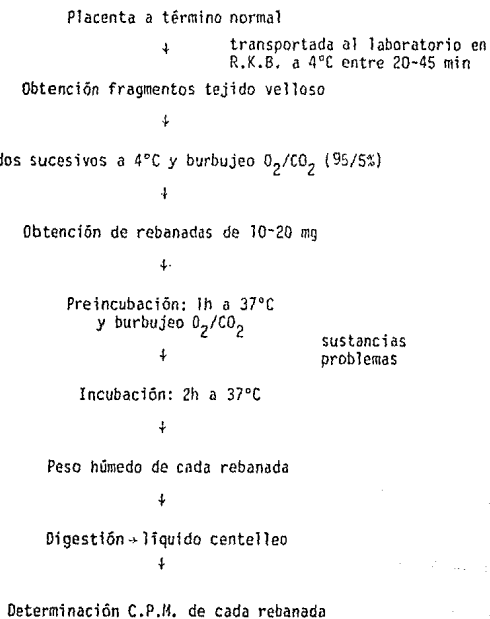
La composición del Ringer fue la siguiente (mM): NaCl = 121; KCl = 4.6; CaCl = 2; KH_2PO_4 = 1.2; MgSO_4 = 1.2; NaHCO_3 = 24 y dextrosa 10, con un pH ajustado a 7.4 y una osmolaridad de $290 \pm 10 \text{ mOsm.kg}^{-1}$.

Mediante la remoción de la desidua basal y de la placa coriónica se obtuvieron fragmentos de tejido vellosa, los cuales fueron colocados para su lavado en la solución RKB con un burbujeo de O_2 95% y de CO_2 5%. Posteriormente de estos fragmentos de tejido vellosa se cortaron rebanadas que pesaron de 10 a 20 mg, las cuales fueron preincubadas y posteriormente colocadas en los medios de incubación respectivos (Cuadro No. 10).

10.1 Determinación del contenido de agua.

El espacio extracelular se determinó con ^3H -inulina a una concentración final de $0.2 \mu\text{Ci.ml}^{-1}$. Después de incubar por dos horas a 37 grados centígrados en presencia del radionúclido, se redujo el exceso de agua mediante papel filtro (Whatman 41) y cada rebanada se colocó en un vial y fueron pesadas en una microbalanza (Mettler M-5), y

CUADRO NO. 10

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

de esa manera se obtuvo su peso húmedo. Después de 18 a 24 horas a 80 grados centígrados se pesaron de nuevo para obtener su peso seco. Por diferencia entre su peso húmedo y seco se obtuvo la cantidad total de agua de cada rebanada (Cuadro No. 11).

Cada rebanada se colocó de nuevo en un vial donde se le agregaron 50 microlitros de una solución 0.5 M de hidróxido de amonio cuaternario en tolueno (solueno-100 de Packard) para solubilizar al tejido. Después de digerido éste, se le agregaron 9 ml de líquido de centelleo (Instagel de Packard) y se determinó la radioactividad de cada rebanada (dpm) en un contador de centelleo para emisores beta (Packard Tricarb Mod. 3255). Se calcularon el contenido de agua total, el espacio extracelular y el intracelular, según el procedimiento de Smith y col. (1973).

10.2 Captación del ácido alfa ^{14}C aminoisobutírico (AIB).

Las rebanadas fueron preincubadas en 10 ml de RKB a 37 grados centígrados, durante 1 hora, con un burbujeo de O_2 95% y CO_2 5%. Inmediatamente después se incubó al tejido en condiciones similares a las anteriores, durante dos horas y en presencia del aminoácido marcado (ácido ^{14}C alfa aminoisobutírico, $(53.2 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1})$) a una concentración final de $5 \times 10^{-7}\text{M}$. Posterior a la incubación cada rebanada fue pesada para determinar su peso húmedo, solubilizada y se determinó su radioactividad de la misma manera que se hizo con la inulina.

La captación inespecífica se determinó incubando las rebanadas con

CUADRO NO. 11

DETERMINACION DE LOS ESPACIOS DE DISTRIBUCION DE AGUA EN LA PLACENTA HUMANA SEGUN EL PROCEDIMIENTO DE SMITH Y COLS. 1973.

1.- Contenido de agua en las rebanadas placentarias:

$$\% H_2O_t = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} \times 100$$

2.- Determinación espacio extracelular:

$$\% E E C = \frac{\text{DPM } ^3\text{H-inulina muestra} - \text{DPM fondo}}{\text{Peso húmedo (mg) X DPM } ^3\text{H/ml medio}^*}$$

$$*\text{Solución standard} = \frac{\text{DPM } ^3\text{H}}{\mu\text{l medio}}$$

3.- Espacio intracelular:

$$E I C = \% H_2O \text{ total} - E E C$$

el aminoácido marcado, en presencia de $1 \times 10^{-3}M$ de ácido aminoisobutírico no radioactivo y de $1 \times 10^{-5}M$ de cicloheximida. Esta última se utilizó para inhibir la incorporación del aminoácido marcado a la síntesis protéica del trofoblasto.

10.3 Captación del alfa ^{14}C -AIB en presencia de diversos opiáceos.

El opiáceo de prueba (a la concentración deseada) fue colocado desde la preincubación y la captación del ácido alfa ^{14}C aminoisobutírico, se expresó en base a la relación de concentración tejido/medio mediante la fórmula del Cuadro No. 12.

Los cálculos del contenido de agua y de la captación de AIB de cada rebanada se realizaron en programas adaptados a una calculadora Hewlett Packard Modelo 9810A, y fueron expresados como la media del total de rebanadas de las placentas empleadas \pm error tipo de la media.

La IC_{50} se determinó a partir de la gráfica logit del porciento de inhibición de la captación del aminoácido marcado versus el logaritmo de la concentración del opiáceo de cada placenta.

Para el análisis estadístico se aplicó una prueba t de Student no pareada de una sola cola.

La 3H -inulina y el alfa ^{14}C -AIB se obtuvieron de New England Nuclear y el ácido aminoisobutírico no marcado y la cicloheximida de Sigma Chemical Company.

CUADRO NO. 12

DETERMINACION DE LA CAPTACION DEL [^{14}C]-AIB

Concentración intracelular:

$$\frac{\text{DPM}^{14}\text{C}}{\mu\text{T EIC}} = \frac{\{(\text{DPM}^{14}\text{C} - \text{DPM fondo})/\text{mg peso húmedo}\} - \{(\% \text{ EEC})(\text{DPM}^{14}\text{C}/\mu\text{l medio})\}}{\% \text{ EEC}}$$

Concentración del medio de incubación:

$$C_{\text{externa}} = \text{DPM}^{14}\text{C}/\mu\text{l medio}$$

Relación de concentración tejido/medio (R)

$$R = \frac{C_{\text{interna}}}{C_{\text{externa}}} = \frac{\text{DPM}^{14}\text{C}/\mu\text{T EIC}}{\text{DPM}^{14}\text{C}/\mu\text{l medio}}$$

DPM = Desintegraciones por minuto.

EEC = Espacio extracelular.

EIC = Espacio intracelular.

C_{externa} = Solución estándar.

Referencia: Smith y Cols. Am. J. Physiol. 224(3): 558-564, 1973.

11.0 RESULTADOS.

11.1 Espacios de distribución del agua.

El contenido total de agua se determinó en 21 placentas encontrándose un porcentaje de agua total de 84.32 ± 1.7 ($x \pm$ desviación estandar). Al incubar las rebanadas en presencia de ^3H -inulina para calcular el porcentaje del espacio extracelular (%EEC) se observó que la captación del radionúclido no se incrementó significativamente después de las dos horas de incubación (Figura No. 11, Cuadro No. 13).

El %EEC después de dos horas de incubación con ^3H -inulina determinado en 14 placentas resultó de $49.52 \pm 3.8\%$ y el espacio intracelular (%EIC) fue de 35.01 ± 4.8 (Cuadro No. 14).

11.2 Efecto de la temperatura y el tiempo de preincubación en la captación del ácido alfa ^{14}C aminoisobutírico.

La preincubación realizada a 37°C durante una y dos horas no mostró diferencias significativas para un mismo tiempo de incubación. Al comparar la captación del ácido alfa ^{14}C -AIB de los preincubados a 4°C con los preincubados a 37°C se observa que es menor que los experimentos a 37°C en la primera y segunda hora de incubación, sin embargo, después de las 3 h de incubación dicha diferencia comienza a ser menos significativa (Figura No. 12 y Cuadro No. 15).

Como se puede observar, la captación del ^{14}C -AIB después de una preincubación a 37°C y durante 1 hora, se incrementó linealmente con el tiempo (hasta por lo menos 4 h) (Figura No. 13 y Cuadro No. 16).

CUADRO NO. 13

CURSO TEMPORAL DE LA CAPTACION DE [^3H]-INULINA EN EL ESPACIO EXTRACELULAR EN PLACENTA HUMANA.

Porcentaje de Espacio Extracelular								
Tiempo (min)	5	15	30	60	90	120	180	240
Captación Promedio	26.50	31.40	28.72	39.26	40.67	45.21	46.71	46.32
Error tipo de la media	0.43	0.54	0.52	2.10	2.08	2.26	3.00	1.56

El porcentaje de agua del espacio extracelular se determinó por medio de [^3H]-inulina, en rebanadas de 5 placentas humanas, procedentes de embarazos a término y partos normales.

Fig. 11

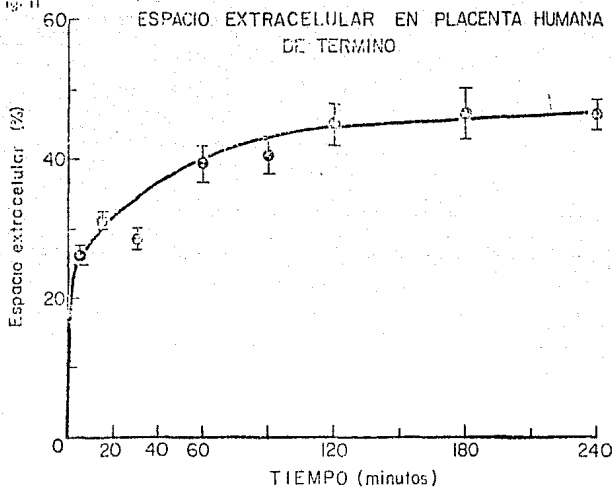


Fig. No. 11.- Curso temporal de la captación de (^3H) -inulina para medir el espacio extracelular en placenta humana. Se realizó la incubación a 37°C , con burbujeo constante de CO_2 y O_2 (5 y 95%). Se expresan la media \pm e.t.m. de 5 placentas.

CUADRO NO. 14

CONTENIDO Y DISTRIBUCION DE AGUA EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO

H ₂ O Total (% peso húmedo)	Espacio extracelular (% peso húmedo)	Espacio intracelular (% peso húmedo)	Referencias
86.0 ± 1.0 ^(a)	51.9 ± 4.6 ^(h)	-	Smith y Cols. 1973
83.0 ± 3.0	40.0 ± 4.0	43.0	Miller y Cols. 1974
84.3 ± 1.7 n = 21	49.5 ± 3.8 n = 14	35.0 ± 4.8 n = 14	Madera y Reyes 1983

(a) media ± desviación tipo.

(b) espacios de agua medidos con [³H] -inulina.

n = número de placentas.

CUADRO NO. 15

EFFECTO DE LA DURACION Y DE LA TEMPERATURA DE PREINCUBACION EN LA CAPTACION DEL ACIDO
 $[^{14}\text{C}]$ ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO

PREINCUBACION		I N C U B A C I O N ^a			
Temperatura	Duración	1a. hora	2a. hora	3a. hora	4a. hora
37°C	1 h	3.60 ± 0.48	6.23 ± 0.36	8.53 ± 0.58	9.91 ± 0.68
	2 h	2.74 ± 0.25	6.58 ± 0.61	8.70 ± 0.75	10.18 ± 0.64
4°C	1 h	2.55 ± 0.25	4.27 ± 0.59	5.94 ± 0.77	8.69 ± 1.00
	2 h	2.92 ± 0.39	4.12 ± 0.50	5.53 ± 0.60	8.11 ± 0.53

a = Relación de concentración tejido/medio.

Se expresan \bar{x} ± error tipo de la media.

n = 5 placentas.

Fig. 12 CAPTACION ACIDO [14 C]-AMINO ISOBUTIRICO EN PLACENTA HUMANA EFECTO DE LA DURACION Y LA TEMPERATURA

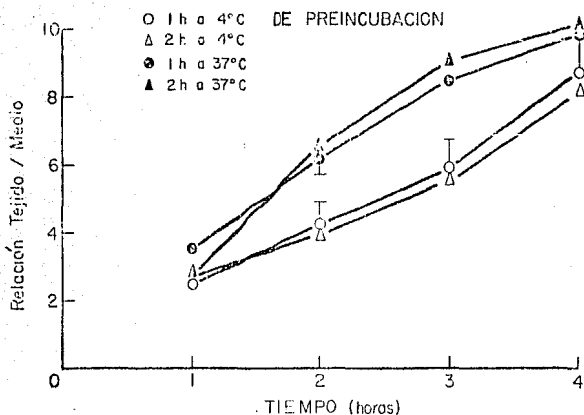


Fig. No. 12.- Curso temporal de la captación del ácido amino-isobutírico (AIB) por rebanadas de placenta humana de término. Se probó el efecto de la duración de la preincubación (una o dos horas) y de la temperatura, 4°C ó 37°C. La captación se expresa como la relación de concentración tejido/medio.

CUADRO NO. 16

CURSO TEMPORAL DE LA CAPTACION DEL ACIDO |¹⁴C| ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO. PREINCUBACION DE 1H A 37°C.

	Tiempo de Incubación (min)					
	15	30	60	120	180	240
R Promedio ^a	0.38	0.86	3.60	6.23	8.53	9.91
Error tipo de la media	0.10	0.23	0.48	0.36	0.58	0.68
Número de Placentas	4	4	5	5	5	5

a = Relación de concentraciones tejido/medio.

Fig. 13 CAPTACION ACIDO [14 C]-AMINO ISOBUTIRICO EN PLACENTA HUMANA A TERMINO

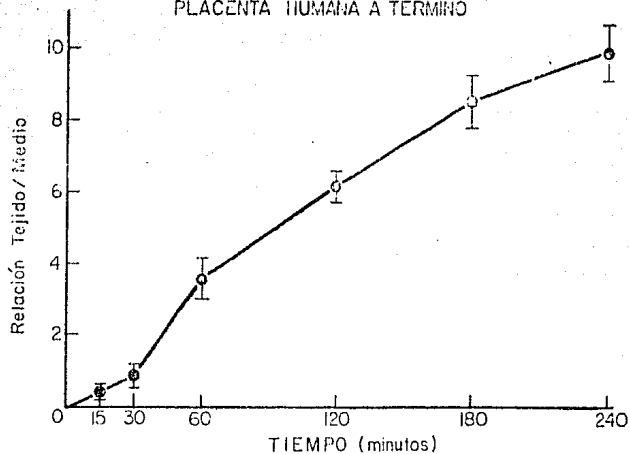


Fig. No. 13.- Curso temporal de la captación del ácido alfa (14 C)-amino-isobutírico marcado con carbono 14, en la placenta humana a término. La preincubación se realizó a 37°C por una hora y la incubación se realizó durante periodos variables de tiempo hasta 240 min., ambos procedimientos con burbujeo constante de O_2 y CO_2 . La captación se expresó como la media \pm e.t.m., de la relación de concentración tejido/medio para 5 placentas.

11.3 Efecto de la glicina, del 2,4-dinitrofenol, del ácido aminoisobutírico no radioactivo y de la cicloheximida en la captación del ^{14}C -AIB.

La captación de ^{14}C -AIB ($5 \times 10^{-7}\text{M}$), se vio reducida en un 35.6% con glicina; en un 54.4% con 2,4-dinitrofenol y en un 75.1% con el ácido aminoisobutírico no radioactivo (todos a una concentración final en el medio de incubación de 10^{-3}M) (Figura No. 14, Cuadro No. 17).

La cicloheximida disminuyó la captación, con un efecto máximo a partir de una concentración de $1 \times 10^{-6}\text{M}$ (Figura No. 15, Cuadro No. 18), sin cambios adicionales significativos en las concentraciones superiores que se estudiaron. La relación de concentración tejido/medio control determinado en 34 placentas preincubadas durante 1 h a 37°C y después de restarle lo inespecífico (10^{-3}M de AIB frío más 10^{-5}M de cicloheximida) resultó de 7.28 ± 0.3 ($x \pm \text{etm}$) (Cuadro No. 19).

11.4 Efecto de los opiáceos en la captación del ^{14}C -AIB.

La ciclazocina inhibió esta acumulación de manera significativa a partir de una concentración de $1 \times 10^{-5}\text{M}$ ($p < 0.01$), incrementándose esta inhibición a medida que aumentaba la concentración del opiáceo. Las concentraciones de 10^{-5}M , de 10^{-4}M y de $5 \times 10^{-4}\text{M}$ inhibieron dicha captación en 19.1; 47.6 y en 86.8% respectivamente. La IC_{50} resultó de $1.14 \pm 0.3 \times 10^{-4}\text{M}$ (Figura No. 16, Cuadro No. 20).

El levorfanol inhibió la captación del ^{14}C -AIB significativamente a partir de 10^{-4}M ($p < 0.01$), siendo la inhibición del 26.2% a esta concentración. Con una concentración de levorfanol de 2×10^{-4} la inhibición resultó de 47.4%. La IC_{50} calculada fue de 1.93 ± 0.45

CUADRO NO. 17

EFFECTOS DE DIVERSOS INHIBIDORES SOBRE LA CAPTACION DEL ACIDO [¹⁴C] ALFA
AMINOISOBUTIRICO EN LA PLACENTA HUMANA

	CONTROL (R)*	GLICINA 10 ⁻³ M	DENITROFENOL 10 ⁻³ M	AIB FRIO 10 ⁻³ M
Promedio	7.39	4.76	3.37	1.84
Error tipo de la media	0.21	0.42	0.12	0.12
Por ciento de Inhibición	0	35.6	54.4	75.1
P	-	<0.01	<0.01	<0.01

Se probaron los efectos de la glicina y del ácido aminoisobutírico no radioactivo, como inhibidores competitivos y del 2,4-dinitrofenol como inhibidor metabólico, sobre el sistema de transporte del ácido [¹⁴C] - aminoisobutírico en la placenta humana a término, con un período de preincubación de 1h a 37°C, n = 3. R = relación de concentraciones tejido/medio.

Fig.14

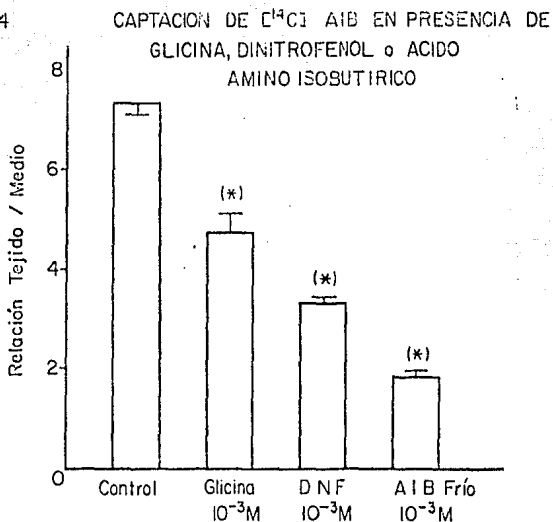


Fig. No. 14.- Efecto inhibitorio de la glicina (que es transportada por el mismo sistema que el AIB), de un inhibidor metabólico (2,4-dinitrofenol, DNF) y de AIB no radioactivo, sobre la relación de concentración tejido/medio del ^{14}C -AIB. El inhibidor más efectivo resultó ser el ácido amino-isobutírico (AIB) no radioactivo, aun cuando la inhibición fue estadísticamente significativa para todos los compuestos probados. *($p < 0.01$). $n=3$ placentas.

CUADRO NO. 18

EFEECTO DE LA CICLOHEXIMIDA SOBRE LA CAPTACION DEL ACIDO [^{14}C] ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO. PREINCUBACION 1H A 37°C (n = 3 PLACENTAS).

Relación	C I C L O H E X I M I D A					
	Control	10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M	10^{-4}M
Tejido/Medio						
Promedio	8.00	6.29	7.07	4.80	4.49	4.28
Error tipo de la media	0.47	0.50	0.65	0.46	0.34	0.36
Por ciento de Inhibición	0	21.4	11.6	40.0	43.9	46.5

Fig. 15 EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN LA CAPTACION DEL ACIDO [14 C]-AMINOISOBUTIRICO EN PLACENTA HUMANA

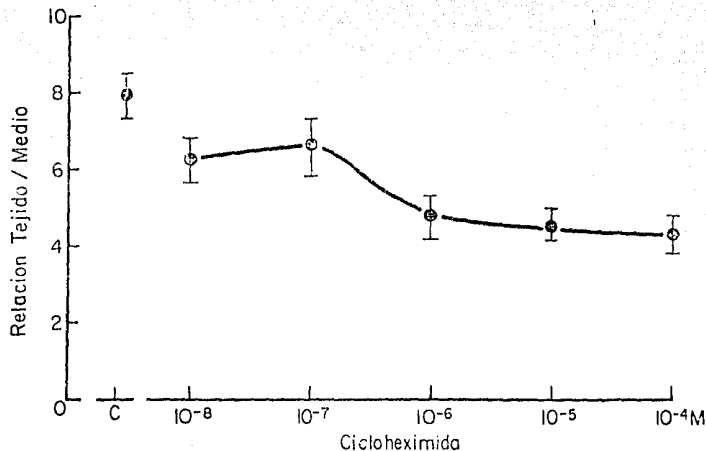


Fig. No. 15.- Inhibición de la captación del alfa (14 C)-AIB en la placenta humana por la cicloheximida (inhibidor de síntesis protéica). Las condiciones de preincubación fueron de 1 h a 37°C y de incubación de 2 h a 37°C. La cicloheximida mostró su efecto máximo a 10^{-6} M; concentraciones superiores no mostraron efecto adicional significativo. Se expresan $\bar{x} \pm$ e.t.m., n=3 placentas.

CUADRO NO. 19

CAPTACION ACIDO ¹⁴C ALFA AMINOISOBUTIRICO EN PLACENTA

Especie	Incuabación ^a (min)	R ^b	Referencia
Humana	120	5.2 ± 0.93	Miller y cols. (1974)
Humana	90	7.0	Rowell y cols. (1981)
Rata	60	2.97	Rowell y cols. (1982)
Humana	120	7.28 ± 0.3	Madera y Reyes (1983)
		(n=34)	

a) Incubación a 37°C.

b) Relación de concentración tejido/medio (\bar{x} ± e.t.m.).

n = Número de placentas.

$\times 10^{-4}M$ (Cuadro No. 21, Figura No. 17).

El dextrorfan tuvo una inhibición significativa a partir de $2 \times 10^{-4}M$, siendo de un 27.8%. Con $5 \times 10^{-4}M$ resultó de 63.3%. La IC_{50} fue de $3.8 \pm 0.85 \times 10^{-4}M$ (Cuadro No. 22 y Figura No. 18).

La morfina resultó ser la menos potente en esta inhibición, siendo significativo su efecto a partir de $5 \times 10^{-4}M$ ($p < 0.05$) donde inhibió en un 18.2%. Las concentraciones de $1 \times 10^{-3}M$ y de $5 \times 10^{-3}M$ inhibieron la referida captación en 37.8 y 52.9% respectivamente. La IC_{50} calculada resultó de $50.2 \pm 2.3 \times 10^{-4}M$.

La inhibición de la captación del ^{14}C -AIB en presencia de diversos opioides se resume en el Cuadro No. 24.

CUADRO NO. 20

EFFECTO DE LA CICLAZOCINA EN LA CAPTACION DEL ACIDO [14 C] ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO (n = 5 PLACENTAS).

Relación	C I C L A Z O C I N A				
	Control Inicial	10^{-5} M	10^{-4} M	5×10^{-4} M	Control Final
Promedio	8.19	6.76	4.38	1.15	8.53
Error tipo de la media	0.43	0.39	0.25	0.10	0.56
Por ciento de Inhibición	0.0	19.1	47.6	86.8	-
Significancia estadística		p<0.01	p<0.01	p<0.01	

Fig.16 CAPTACION DE [14 C]-AIB EN PRESENCIA DE CICLAZOCINA

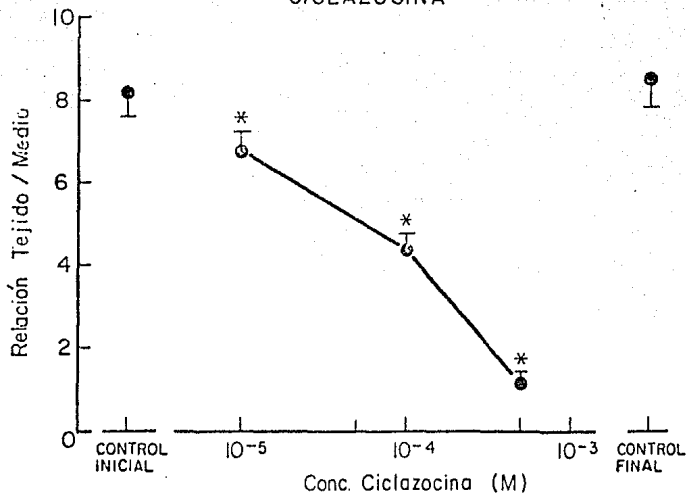


Fig. No. 16.- La incubación de las rebanadas de placenta humana en presencia de ciclazocina disminuyó la captación de alfa (14 C)-AIB en forma significativa ($p < 0.01$) desde la concentración de 10^{-5} M y esta inhibición fue máxima a la concentración de 5×10^{-4} M. La captación se expresó como la relación de concentración del (14 C)-AIB en el tejido y en el medio de incubación. $\bar{x} \pm$ e.t.m., de 5 placentas; * $p < 0.01$.

CUADRO NO. 21

EFFECTO DEL LEVORFANOL EN LA CAPTACION DEL ACIDO [^{14}C] ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO (n = 4 PLACENTAS).

Relación Tejido/Medio	L E V O R F A N O L				Control Final
	Control Inicial	$2 \times 10^{-5}M$	$10^{-4}M$	$2 \times 10^{-4}M$	
Promedio	9.58	8.60	6.96	4.96	9.28
Error tipo de la media	0.56	0.60	0.50	0.42	0.53
Por ciento de Inhibición	0.0	8.8	26.2	47.4	-
Significancia Estadfstica	-	N.S.	p<0.01	p<0.01	-

ESTE TEXTO NO DEBE
 SER USADO PARA
 CUALQUIER FINE
 COMERCIAL

Fig. 17 EFECTO DE LEVORFANOL SOBRE LA CAPTACION DE ^{14}C -AIB EN PLACENTA HUMANA

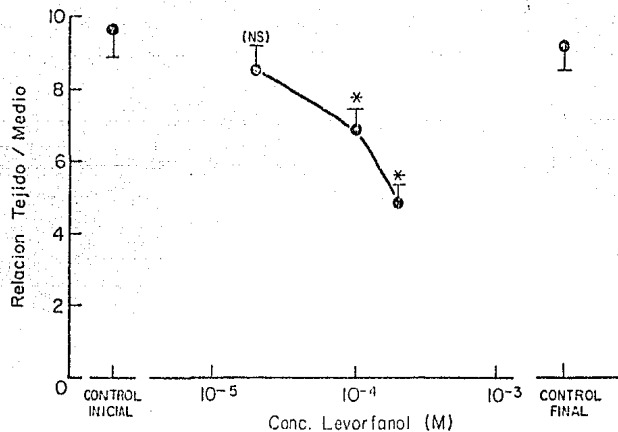


Fig. No. 17.- El levorfanol mostró efecto inhibitorio sobre la captación del alfa (^{14}C)-AIB en rebanadas de placenta humana, la cual fue estadísticamente significativa a la concentración de 10^{-4}M . Las condiciones de pre-incubación y de incubación fueron similares a las de la serie experimental con ciclazocina. n=4 placentas, se expresan \bar{x} e.t.m. de la relación tejido/medio.

CUADRO NO. 22

EFFECTO DEL DEXTRORFAN EN LA CAPTACION DEL ACIDO [^{14}C] ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO (n = 4 PLACENTAS).

Relación	D E X T R O R F A N				
	Control	$5 \times 10^{-5}\text{M}$	10^{-4}M	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	$5 \times 10^{-4}\text{M}$
Tejido/Medio	Control	$5 \times 10^{-5}\text{M}$	10^{-4}M	$2 \times 10^{-4}\text{M}$	$5 \times 10^{-4}\text{M}$
Promedio	7.77	6.98	6.96	6.00	2.85
Error tipo de la media	0.42	0.39	0.40	0.59	0.19
Porcentaje de Inhibición	0.0	10.2	10.4	22.8	63.3
Significancia estadística	-	N.S.	N.S.	$p < 0.05$	$p < 0.01$

Fig.18 EFECTO DEL DEXTRORFAN SOBRE LA CAPTACION DEL $[^{14}\text{C}]\text{-AIB}$ EN LA PLACENTA HUMANA

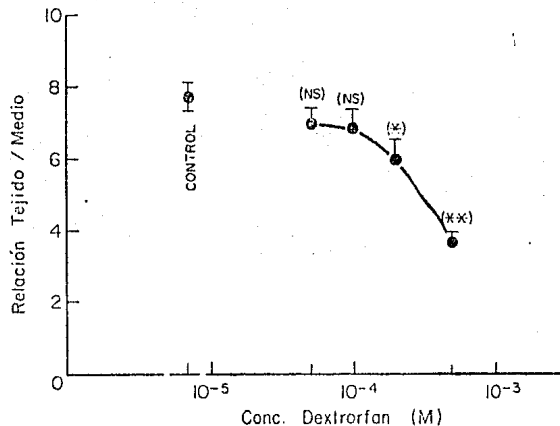


Fig. No. 18.- El isómero D del levorfanol, el dextrorfan mostró efecto inhibitorio sobre la captación del alfa $[^{14}\text{C}]\text{-AIB}$ en rebanadas de placenta humana, el cual fue estadísticamente significativo a la concentración de $2 \times 10^{-4}\text{M}$. Las condiciones experimentales fueron similares a las series anteriores. NS=diferencia no significativa; *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$, $n=4$ placentas. Se expresan \bar{x} e.t.m. de la relación de concentración tejido/medio.

CUADRO NO. 23

EFFECTO DE LA MORFINA EN LA CAPTACION DEL ACIDO [^{14}C] ALFA AMINOISOBUTIRICO EN REBANADAS DE PLACENTA HUMANA A TERMINO (n = 3 PLACENTAS).

Relación	M O R F I N A					
	Control	$5 \times 10^{-5}\text{M}$	10^{-4}M	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	$5 \times 10^{-3}\text{M}$
Tejido/Medio	Control	$5 \times 10^{-5}\text{M}$	10^{-4}M	$5 \times 10^{-4}\text{M}$	$1 \times 10^{-3}\text{M}$	$5 \times 10^{-3}\text{M}$
Promedio	6.41	6.64	6.22	5.24	3.99	3.02
Error tipo de la media	0.37	0.37	0.37	0.34	0.21	0.75
Porcentaje de Inhibición	0	0	2.9	18.2	37.8	52.9
Significancia Estadística	-	N.S.	N.S.	p<0.05	p<0.01	p<0.01

FIG.19

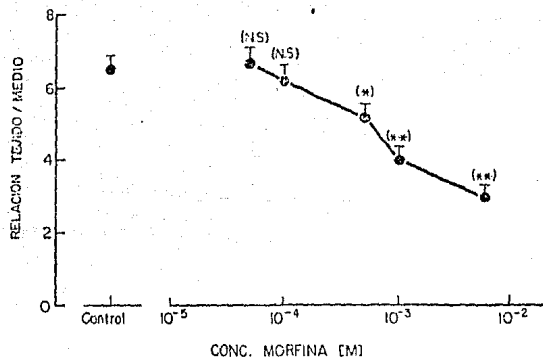
CAPTACION DE [14 C]-AIB EN PRESENCIA DE MORFINA

Fig. No. 19.- La presencia de morfina en el medio de incubación disminuyó el valor de la relación de concentración tejido/medio del alfa- (14 C)-AIB. La diferencia con el valor control fue estadísticamente significativa a partir de la concentración de 5×10^{-4} M. NS=diferencia no significativa; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; n=3; se expresan \bar{x} e.t.m.

CUADRO NO. 24

EFFECTOS DE LOS OPIACEOS SOBRE EL TRANSPORTE DE [14 C]ACIDO AMINOISOBUTIRICO EN PLACENTA HUMANA A TERMINO.

Opiáceo	Por ciento de Inhibición ^a	IC ₅₀ (x 10 ⁻⁴ M)
Ciclazocina	47.61	1.14 ± 0.27
Levorfanol	26.19	1.93 ± 0.45
Dextrorfan	10.42	3.8 ± 0.85
Morfina	2.93	50.2 ± 2.30

a) Efecto inhibitorio de una concentración final de 10⁻⁴M de los compuestos en estudio.

IC₅₀ = Concentración requerida para inhibir en un 50% la captación de [14 C]-AIB.

Se expresan \bar{x} ± e.t.m.

12.0 DISCUSSION.

La determinación de la distribución de agua en los espacios celulares de la placenta, cuya estimación es imprescindible para calcular la captación del aminoácido, mostró valores similares a los informados por otros autores (66, 99) (Cuadro No. 14).

Smith y cols. en 1973 y Miller y cols. en 1974 demostraron que la preincubación incrementaba la captación del ^{14}C -AIB. En nuestras condiciones la captación fue mayor cuando la referida preincubación se hizo a 37°C , siendo prácticamente iguales si se realizaban durante una o dos horas (Gráfica No. 12). Debido a esto todos nuestros experimentos de incubación del ácido alfa ^{14}C aminoisobutírico tuvieron una preincubación de 1 hora a 37°C .

El hecho de que la glicina el cual es un aminoácido neutro que comparte el mismo transportador que el AIB y de que el dinitrofenol que es un desacoplador de la fosforilación oxidativa, nos inhibieran la captación del aminoácido marcado en forma similar a lo reportado por otros autores (60, 66, 67, 98) nos habla no sólo de la presencia de un transporte activo y de la reproducibilidad del procedimiento experimental, sino también de la viabilidad del tejido, en el período de tiempo transcurrido entre la obtención de la placenta y el final de la incubación (aproximadamente de 4 a 5 horas) (Figura No. 14).

De la misma manera, la máxima inhibición de la captación del ^{14}C -AIB al competir con su homólogo no radioactivo se observó a una concentración de 10^{-3}M y esto fue considerado como la captación

inespecífica y se restó a los otros grupos, al calcular la captación específica.

Debido a que nuestro objetivo fue medir el transporte y no solamente la acumulación del aminoácido en la rebanada placentaria, empleamos la cicloheximida con la finalidad de restar el componente de incorporación del aminoácido a la síntesis protéica del trofoblasto (Figura No. 15).

En nuestras condiciones de 1 hora de preincubación a 37°C y una incubación de 2 horas a la misma temperatura, obtuvimos una captación específica en un total de 34 placentas de 7.28 ± 0.3 (media \pm e.t.m.), la cual resultó ligeramente superior a lo obtenido por Miller y cols. (66) quienes informaron una captación de 5.2 ± 0.93 , en placentas humanas. Esta diferencia podría ser atribuida a que este autor empleó 30 min de preincubación.

En cuanto al efecto de los opiáceos, en nuestros experimentos obtuvimos una importante inhibición del ^{14}C -AIB con la ciclazocina, el cual es un agonista del tipo Kappa con una IC_{50} de $1.14 \pm 0.3 \times 10^{-4}\text{M}$.

El levorfanol que es un agonista opiáceo preferentemente (resultó menos potente en esta inhibición, con una IC_{50} de $1.93 \pm 0.45 \times 10^{-4}\text{M}$. A concentraciones iguales ($1 \times 10^{-4}\text{M}$) la ciclazocina inhibió aproximadamente dos veces más que el levorfanol.

El dextrorfan que es el isómero del levorfanol inhibió también dicha captación, pero a su vez resultó menos potente que su respectivo isómero (IC_{50} de $3.8 \pm 0.85 \times 10^{-4}\text{M}$). A concentraciones similares su

efecto resultó la mitad del isómero correspondiente y la cuarta parte del efecto de la ciclazocina.

La morfina resultó ser el menos potente de los opiáceos empleados en cuanto a la inhibición del ^{14}C -AIB. Dicha inhibición comenzó a ser significativa a concentraciones de $5 \times 10^{-4}\text{M}$ y su IC_{50} resultó aproximadamente 50 veces menor que la ciclazocina.

Aunque estos son resultados preliminares, parece haber correlación entre la potencia de la ciclazocina (agonista Kappa) en desplazar a la etorfina trititada de la placenta humana (80, 105) y la potencia que tuvo para inhibir el transporte del ^{14}C -AIB. Por otro lado el hecho de que el dextrorfán resultó menos potente que su respectivo isómero, el levorfanol, podría hablar de cierto reconocimiento por parte de los receptores opiáceos placentarios tanto en fracciones crudas de membranas como en microvellosidades de placenta humana. La morfina resultó ser poco potente para desplazar a la etorfina trititada (unas 170-190 veces menos potente que la ciclazocina). Esta observación es opuesta a lo que sucede en homogenados de cerebro de rata donde muestra una mayor afinidad; en nuestro trabajo la morfina mostró tener una potencia muy débil respecto a la inhibición del transporte del aminoácido en cuestión, cuando se le comparó con otros opioides.

El transporte de aminoácidos por la placenta está acoplado a la liberación de acetilcolina por este órgano (33, 34, 91, 92, 108), aunque no se conocen los mecanismos precisos. Esto unido al hecho de que en otros órganos tales como el ileo de cobayo, el vas deferens de ratón y el ganglio cervical de gato, la morfina y otros opiáceos

modifican la síntesis y liberación de acetilcolina (21, 27, 73, 107) hace pensar en la posibilidad de que los opiáceos a través de la estimulación de receptores específicos localizados fundamentalmente en el borde en cepillo del trofoblasto, podrían estar modificando la liberación de acetilcolina placentaria y por ende inhibiendo su captación de aminoácidos.

También se ha observado que en un medio ausente de Ca^{++} (o en presencia de sustancias quelantes de este catión), no hay o está disminuida la liberación de acetilcolina por la placenta (140). Aunque no hay evidencias de la presencia de gránulos de almacenamiento de acetilcolina en la placenta, Rama Sastry y cols. (83) y Olubadewo y cols. (75) sugieren que la fuerte carga de la cabeza cuaternaria de la acetilcolina probablemente está unida a las proteínas placentarias cargadas negativamente y que la entrada de calcio neutralizaría la negatividad de las cargas de las proteínas y por ende se liberaría acetilcolina.

Se conoce que al menos en membranas celulares excitables hay competencia entre los diferentes opiáceos y el calcio (88), e incluso se ha sugerido también que la morfina forma complejos con los iones de calcio (54). Este podría también ser otro mecanismo que explicaría el por qué los opiáceos podrían impedir la liberación de acetilcolina y por consiguiente disminuir la captación de aminoácidos placentarios.

Sin embargo no se podría descartar un efecto parecido al de los anestésicos locales en el que esté disminuida la entrada de Na^+ al interior del sincitiotrofoblasto y con consiguiente disminución en

La entrada de aminoácidos que está acoplado a un gradiente de este catión como hemos visto.

Cabe señalar que si bien en estructuras nerviosas la liberación y/o síntesis de acetilcolina puede modificarse en presencia de diversos opiáceos (21, 27, 73, 107) que son fundamentalmente del tipo μ (principalmente morfina), los sitios de alta afinidad hasta ahora descritos en la placenta tienen características del tipo kappa (80). Esto unido a la poca correlación encontrada con respecto al dextrorfán (que sí bien inhibió el transporte del ^{14}C -AIB con la mitad de la potencia de su isómero el levorfanol), no mostró un efecto netamente estereoespecífico como lo reportaron por North y Henderson en 1975 en feto de cobayo (respecto a la liberación de acetilcolina) (73); plantea la posibilidad de que este efecto inhibitorio que mostraron los opiáceos empleados sobre el transporte del aminoácido en cuestión, podría ser un efecto directo e independiente de la modificación en la liberación de acetilcolina placentaria y del acople del sistema colinérgico placentario y el transporte de aminoácidos.

13.0 CONCLUSIONES.

- 1.- Los opiáceos empleados inhibieron el transporte del ácido alfa ^{14}C aminoisobutírico en rebanadas de tejido veloso de placenta humana a término.
- 2.- Esta inhibición resultó dependiente de las concentraciones de ciclazocina, levorfanol, dextrorfan y morfina que se emplearon.
- 3.- Fue selectiva para los diferentes opiáceos empleados.
- 4.- Esta capacidad de inhibición del transporte del ^{14}C -AIB parece seguir la misma tendencia que el desplazamiento de la ^3H -etorfina en placenta humana.

14.0 BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Aherne, W. and Dunnill, M.S. (1966).
Qualitative aspects of placental structure.
J. Pathol. Bacteriol. 91: 123-139.
- 2.- Akedo, H. and Christensen, H.N. (1962).
Nature of insulin action on aminoacid uptake by the isolated diaphragm.
J. Biol. Chem. 237: 118-122.
- 3.- Barnavie, E.B. and Minni, A. (1963).
Possible role of placental lipid fraction in the transport of (¹⁴C)glycine from maternal to fetal blood.
Biochem. Biophys. Acta. 70: 586-588.
- 4.- Barrios, P.L. y Enriquez, A.G. (1979).
Fecundación, nidación, desarrollo del huevo y la placenta.
En Ginecología y Obstetricia, Méndez, O.F. (Ed.), 2da. Edición,
Inst. Mex. S. S. México, p. 25-53.
- 5.- Binder, N., Lnadén, E.J., Weker, L. and Dettbarn, W.D. (1976).
Effect of parathion and its metabolites on calcium uptake activity of rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in vitro.
Biochem. Pharmacol. 25: 835-839.
- 6.- Bissonnete, J.M., Hohimer, A.R., Cronan, Z.J. and Budy, K. (1979).
Specificity of hexosa transport in guinea pig placenta.
Fedn. Proc. 38: 1242.
- 7.- Boyd, R.D.H., Haworth, C., Stacey, T.D. and Ward, R.H.T. (1976).
Permeability of the sheep placenta to unmetabolized polar non electrolytes.
J. Physiol. London 256: 617-634.
- 8.- Carstensen, M., Leichtweiss, H.P., Molsen, G. and Schoroeder (1977).
Evidence for a specific transport of D-hexosa across the human term placenta in vitro.
Arch. Gynaekol. 222: 187-196.
- 9.- Challier, J.C., Schneider, H. and Dancis, J. (1976).
In vitro perfusion of human placenta. V. Oxygen consumption.
Am. J. Obstet. Gynecol. 126(2): 261-265.
- 10.- Chatterjee, M. and Munro, H.N. (1977).
Structure and biosynthesis of human placental peptides hormones.
Vitamins and Hormones 35: 149-208.

- 11.- Christensen, H.N. (1973).
On the development of aminoacids transport system.
Fedn. Proc. 32: 19-28.
- 12.- Chaturvedi, A.K., Rowel, P.P., Rama Sastry, B.V. and Landon, E.J. (1977).
Relationships between chemical structure and inhibition of human choline acetyl transferase by 2-(benzylethyl)trimethyl ammonium chloride and related compounds.
Fedn. Proc. 36: 980.
- 13.- Clark, D., Thody, A.J., Shuster, S. and Bowers, H. (1978).
Immunoreactive -MSH in human plasma in pregnancy.
Nature 273: 163-169.
- 14.- Conrad, E.D. and Faber, J. (1977).
Water and electrolyte acquisition across the placenta of the sheep.
Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.) 2(4): H475-H487.
- 15.- Cox, B.M. and Weinstock, K.W. (1966).
The effect of analgesic drugs on the release of acetylcholine from electrically stimulated guinea pig ileum.
Br. J. Pharmac. Chemother. 27: 81-92.
- 16.- Dancis, J., Money, W.L., Sringer, D. and Levitz, M. (1968).
Transport of aminoacid by placenta.
Am. J. Obstet. Gynec. 101: 820-829.
- 17.- Dancis, J., Jansen, V., Kayden, H.J., Bornson, L. and Levitz, (1974).
Transport across perfused human placenta: III. Effect of chain length on transfer of free acids.
Pediatr. Res. 8: 796-799.
- 18.- Diczfalusy, E. (1964).
Endocrine functions of the human fetoplacental unit.
Fedn. Proc. 23: 791-797.
- 19.- Dixon, R.L. (1982).
Effects of environmental pollutants on fetus and trophoblast.
In: Placenta. The Largest Human Biopsy. Beaconsfield, R. and Birdwood, G. (Eds.), Pergamon Press, Oxford, p. 9-29.
- 20.- Durell, J., Gerland, J.T. and Friedel, R.O. (1969).
Acetylcholine action: biochemical aspects.
Science 165: 862-866.

- 21.- Durham, H.D. and Frank, G.B. (1981).
Dual action of meperidine on the frog neuromuscular junction: A prejunctional, opiate receptor-mediated depression of transmitter release and a postjunctional, nonopiate receptor effect on the end plate.
Arch. Int. Pharmacodyn. 251: 150-165.
- 22.- Eipper, B.A. and Mains, R.E. (1978).
Analysis of the common precursor to corticotropin and endorphin.
J. Biol. Chem. 253: 5732-5737.
- 23.- Enders, A.C. (1965).
A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas.
Am. J. Anat. 116: 29-68.
- 24.- Enders, R.H., Judd, R.M., Donohue, T.M. and Smith, C.H. (1976).
Placental aminoacid uptake. III. Transport system for neutral aminoacids.
Am. J. Physiol. 230(3): 706-710.
- 25.- Fox, H. (1975).
Morphological pathology of the placenta.
In: The placenta. Gruenwald (Ed.), University Park Press, Baltimore, p. 197-220.
- 26.- Fox, H. (1979).
Correlation between placental structure and transfer function.
In: Placental Transfer. Chamberlain, G.V.P. and Wildinson (Eds.), Pitman Press, Great Britain, p. 15-30.
- 27.- Gaddis, R.R. and Dixon, W.R. (1982).
Modulation of peripheral adrenergic neurotransmission by methionine-enkephalin.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 221: 282-288.
- 28.- Gaddis, R.R. and Dixon, W.R. (1982).
Presynaptic opiate receptor mediated inhibition of endogenous norepinephrine and dopamine B-hydroxylase release in the cat spleen, independent of the presynaptic alpha adrenoceptors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 233(1): 77-83.
- 29.- Genazzani, A.R., Hurliman, J., Fioretti, P. and Felber, J.P. (1969).
In vitro synthesis of an ACTH-like hormone and human chorionic somatomatrophin by placental and amniotic cells.
Experientia 30: 430-431.

- 30.- Genazzani, A.R., Fraioli, F., Hurliman, J., Fioretti, P. and Felber, J.P. (1975).
Immunoreactive ACTH and cortisol plasma levels during pregnancy. Detection and partial purification of corticotrophin-like placental hormone: the human chorionic corticotrophin (HCC).
Clin. Endocrinol. (Oxf.) 4: 1-14.
- 31.- Gusseck, D.J., Yuen, P. and Longo, L.-D. (1975).
Aminoacid transport in placental slices. Mechanism of increased accumulation by prolonged incubation.
Biochem. Biophys. Acta 401: 278-284.
- 32.- Hammer, R.E. and Mitchell, J.A. (1979).
Nicotine reduces embryo growth, delays implantation, and retard parturition in rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 162: 333-336.
- 33.- Harbison, R.D., Olubadewo, J., Dwiverdi, C. and Rama Sastry, B.V. (1975).
Proposed role of the placental cholinergic system in the regulation of fetal growth and development.
In: *Basic and Therapeutic Aspects of Perinatal Pharmacology*, Morselli, P.L., Garattini, S. and Sereni, F. (Eds.), Raven Press, New York, p. 107-120.
- 34.- Harbison, R.D., Stevens, M.W., Dwiyedi, C. and Fant, M. (1976).
Regulation of fetal growth by a placental cholinergic system.
Fedn. Proc. 35: 611.
- 35.- Hayter, C.J., Hurchinson, E.A., Karvonen, H.J. and Young, M. (1964).
Placental transport of alpha-aminoisobutyric acid in the unanesthetized guinea pig.
J. Physiol. London 175: 11.
- 36.- Hellman, L.M. and Prichard, J.A. (1973).
Williams Obstetricia. Salvat, México, p. 110-171.
- 37.- Henderson, G.Z. and Hughes, J. (1976).
The effects of morphine on the release of noradrenaline from the mouse vas deferens.
Br. J. Pharmacol. 57: 551-557.
- 38.- Henderson, G.I. and Rama Sastry, B.V. (1978).
Human placental choline acetyltransferase. Nature and molecular aspects of inhibition by iodo and bromo acetylcholine.
Biochem. Pharmacol. 27: 1131-1140.

- 39.- Henderson, G.I., Turner, D., Patwardhan, R.V., Lumeng, L., Hoyumpa, A.M. and Schenker, S. (1981).
Inhibition of placental valine uptake after acute and chronic maternal ethanol consumption.
J. Pharmac. Exp. Ther. 216: 465-472.
- 40.- Herting, A.T. and Rock, J. (1945).
Two human ova in the previllous stage having a development age about 7 and 9 day respectively.
Contrib. Embriol. 31: 65-70.
- 41.- Hill, P.M.M. and Young, M. (1973).
Net placental transfer of free aminoacids against varying concentrations.
J. Physiol. London 235: 409-422.
- 42.- Hill, P.M. and Young, M. (1975).
Net placental transfer of free aminoacids against varying concentrations.
Life Sci. 16: 7-30.
- 43.- Hill, E.P. and Longo, L.D. (1980).
Dynamics of maternal-fetal nutrient transfer.
Fedn. Proc. 39: 239-244.
- 44.- Hudson, D.E. and Temiras, P.S. (1972).
Nicotine injection during gestation: Impairment of reproduction fetal viability, and development.
Biol. Reprod. 7: 247-253.
- 45.- Jachau, M.R., Lee, Q.H., Louviaux, G.L., Symms, K.G., Krasner, J. and Yaffe, S.J. (1973).
Oxidation and reduction of foreign compounds in tissue of the human placenta and fetus.
In: Fetal Pharmacology, Boreus, L. (Ed.), Raven Press, New York.
- 46.- Jachau, M.R. (1976).
Mixed-function oxidation in the human placenta.
In: Basic and Therapeutic Aspects of Perinatal Pharmacology, Morseelli, P.L., Garattini, S. and Sereni, S. (Eds.), Raven Press, New York, p. 29-38.
- 47.- Jachau, M.R. (1980).
Drug biotransformation in the placenta.
Pharmacol. Therap. 8: 501-520.

- 48.- Johnson, L.W. and Schmith, C.H. (1980).
Monosaccharide transport across microvillous membrane of human placenta.
Am. J. Physiol. 238 (Cell Physiol. 7): C160-C168.
- 49.- Koshakji, R.P., Rama Sastry, B.V. and Harbison, R. (1974).
Levels and nature of cholinesterase in human and mouse placenta.
Res. Commun. Chem. Paht. Pharmacol. 9: 181-183.
- 50.- Kromer, W. and Schmidt, H. (1982).
Opioids modulate intestinal peristalsis at a site of action additional to that modulating acetylcholine release.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 223(1): 271-274.
- 51.- Lanman, J.T. (1975).
Immunological functions of the placenta.
In: *The Placenta*, Gruenwald, P. (Ed.), University Press, Baltimore, p. 145-157.
- 52.- Lehninger, A.L. (1980).
Bioquímica, Segunda Edición, Omega, Barcelona, p. 73-96, 705, 728.
- 53.- Leventers, S.M., Rowell, P.P. and Clark, H.J. (1982).
The effect of choline acetyltransferase inhibition on acetylcholine synthesis and release in term human placenta.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 222(2): 301-305.
- 54.- Lin, S.C., Sutherland, V.C. and Way, E.L. (1975).
Studies on the formation of morphine calcium and magnesium complexes.
Proc. West Pharmacol. Soc. 18: 181-187.
- 55.- Liotta, A.S., Osathanondh, R., Ryan, K.J. and Krieger, D.T. (1977).
Presence of ACTH in human placenta: demonstration in vitro synthesis.
Endocrinology 101: 1552-1558.
- 56.- Liotta, A.S. and Krieger, D.T. (1980).
In vitro biosynthesis and comparative posttranslational processing of immunoreactive precursor corticotrophin B-endorphin by human placental and pituitary cells.
Endocrinology 106(5): 1504-1511.
- 57.- Liotta, A.S., Houghten, R. and Krieger, D. (1982).
Identification of a B-endorphin-like peptide in cultured human placental cells.
Nature Lond. 295: 593-595.

- 58.- Litonjua, A.D., Canlas, M., Soliman, J. and Paulino, D.Q. (1967).
Uptake of alpha-aminoisobutyric acid in placental slices a term.
Am. J. Obstet. Gynec. 99: 242-246.
- 59.- Longo, L.D., Power, G.G. and Foster II, R.E. (1967).
Respiratory function of the placenta as determined with carbon
monoxide in sheeps and dogs.
J. Clin. Invest. 48(5): 812-828.
- 60.- Longo, L.D., Yuen, P. and Gusseck, D.J. (1973).
Anaerobic, glycogen dependent transport of aminoacids by placenta.
Nature Lond. 243: 531-533.
- 61.- Louis, T.M., Muse, P.D., Burden, H.W., Becker, R.F. and Laurence,
I.C. (1981).
Effect of nicotine administration throughout pregnancy on fetal
size, placental weight and fetal and maternal endocrine parameters
at term.
IRCS Med. Sci. Biochem. 9: 726-727.
- 62.- Meschia, G., Battaglia, F.C. and Bruns, P.D. (1967).
Theoretical and experimental study of transplacental diffusion.
J. Appl. Physiol. 22(6): 1171-1178.
- 63.- Meschia, G., Battaglia, F.C., Hay, M.N. and Sparks, J.W. (1980).
Utilization of substrates by the ovine placental in vivo.
Fedn. Proc. 39: 245-249.
- 64.- Michael, W. (1963).
Diaplacental transfer of stereoisomeric acids.
Arch. Gynaek. 175: 95-101.
- 65.- Miller, R.K. and Berndt, W.O. (1973).
Evidence for Mg^{++} -ATP ase in human term placenta.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143: 118-122.
- 66.- Miller, R.K. and Berndt, W.O. (1974).
Characterization of neutral aminoacid accumulation by human
placental slices.
Am. J. Physiol. 227(6): 1236-1242.
- 67.- Miller, R.K. and Berndt, W.O. (1975).
Mechanisms of transport across the placenta. An in vitro approach.
Life Sci. 16: 7-30.
- 68.- Morris, D. (1966).
The acetyltransferase of human placenta.
Biochem. J. 98: 754-762.

- 69.- Morris, F.H., Adcock II, E.W., Paxson, C.L. and Greeley, W.J. (1979).
Uterine uptake of aminoacids throughout gestation in the unstressed ewe.
Am. J. Obstet. Gynec. 135: 601-608.
- 70.- Mulay, S., Brown, C.A., Rama, D.R. and Solozón, S. (1980).
Placental hormones, nutrition and fetal development.
Fedn. Proc. 39: 261-265.
- 71.- Munro, H.N. (1980).
Placental in relation to nutrition.
Fedn. Proc. 39: 236-238.
- 72.- Nakai, Y., Nakao, K., Oki, S. and Imura, H. (1978).
Presence of immunoreactive B-lipotrophin and B-endorphin in human placenta.
Life Sci. 23: 2013-2018.
- 73.- North, R.A. and Henderson, G. (1975).
Action of morphine on guinea-pig myenteric plexus and mouse vas deferens studied by intracellular recording.
Life Sci. 17: 63-66.
- 74.- Odagiri, E., Sherrell, B.J., Mount, C.D., Nicholson, W.E. and Orth, D.N. (1979).
Human placental immunoreactive corticotrophin, lipotrophin, and B-endorphin: Evidence for a common precursor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(4): 2027-2031.
- 75.- Olubadewo, J.O. and Rama Sastry, B.V. (1978).
Human placental cholinergic system: stimulation-secretion coupling for release acetylcholine from isolated placental villus.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 204: 433-455.
- 76.- Pedigo, N.W., Houck, J.C., Chang, C., Kimball, C.A. and Yamamura, H.I. (1980).
Demonstration of placental endorphins by radioimmunoassay and radioreceptor techniques.
In: *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*, Way, E.L., Pergamon Press USA, p. 321-324.
- 77.- Pelkonen, O. and Moilanen, M.L. (1979).
The specificity and multiplicity of human placental xenobiotic metabolizing monooxygenase system studied by potential substrates. Inhibitors and gel electrophoresis.
Med. Biol. 57: 306-312.

- 78.- Pelkonen, O. (1980).
Environmental influences on human fetal and placental xenobiotic metabolism.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 18: 17-23.
- 79.- Polidoro, G., Di Ilio, C., del Boccio, G., Julli, P. and Federeci, G. (1980).
Glutathione S-transferase activity in human placenta.
Biochem. Pharmacol. 29: 1677-1680.
- 80.- Porthe, G. Valette, A. Moisan, M., Tafani, M. and Cross, J. (1982).
Localization of human placental opiate binding sites on the syncytial border membrane.
Life Sci. 31: 2647-2654.
- 81.- Portman, O.W., Berhn, R.E. and Soltly, S.P. (1969).
Transfer of free fatty acids across the primate placenta.
Am. J. Physiol. 216(1): 143-147.
- 82.- Rama Sastry, B.V. and Henderson, G.V. (1972).
Kinetic mechanisms of human placental choline acetyltransferase.
Biochem. Pharmacol. 21: 797-802.
- 83.- Rama Sastry, B.V., Olubadewo, J., Harbison, R.D. and Schmidt, D.E. (1976).
Human placental cholinergic system. Occurrence, distribution and variation with gestational age of acetylcholine in human placenta.
Biochem. Pharmacol. 25: 425-431.
- 84.- Rama Sastry, B.V. and Sadavongvidad, E. (1978).
Cholinergic systems in non-nervous tissues.
Pharmacol. Rev. 30(1): 65-132.
- 85.- Rama Sastry, B.V., Barnwell, S.L., Tayeb, O.S., Janson, V.E. and Owans, L.K. (1980).
Occurrence of methionine enkephalin in human placental villus.
Biochem. Pharmacol. 29: 475-478.
- 86.- Reynolds, F. (1979).
Transfer of drugs.
In: Placental Transfer, Chamberlain, G.V.P. and Wilkinson (Eds.), Pitman Press, Great Britain, p. 166-181.
- 87.- Roberts, J.L. and Herbet, E. (1977).
Characterization of a common precursor to corticotrophin and -lipotrophin: identification of -lipotrophin peptides and their arrangement relative to corticotrophin in the precursor synthesized in a cell-free system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5300-5305.

- 88.- Rohani, F. and Frank, G.B. (1983).
Calcium antagonism of an opiate drug effect on a excitable cell membrane.
J. Pharmac. Exp. Ther. 224(2): 459-465.
- 89.- Rosso, P. (1974).
Maternal malnutrition and placental transfer of alpha aminoisobutyric acid in rat.
Science 187: 648-651.
- 90.- Rosso, P. (1980).
Placental growth, development and function in relation to maternal nutrition.
Fedn. Proc. 39: 250-254.
- 91.- Rowel, P.P. and Rama Sastry, B.V. (1977).
Human placental cholinergic system: effects of cholinergic blockade on aminoacid uptake in isolated placental villi.
Fedn. Proc. 36: 981.
- 92.- Rowell, P.P. and Rama Sastry, B.V. (1981).
Human placental cholinergic system: depression of the uptake of alpha-aminoisobutyric acid in isolated human placental villi by choline acetyltransferase inhibitors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 216: 232-238.
- 93.- Rowell, P.P. and Clark, M.J. (1982).
The effect of chronic oral nicotine administration on fetal weight and placental aminoacid accumulation in mice.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 66: 30-38.
- 94.- Ruzycski, S.M. Kelley, L.K. and Smith, C.H. (1978).
Placental aminoacid uptake. IV. Transport by microvillous membrane vesicles.
Am. J. Physiol. 234(1): C27-C35.
- 95.- Saexena, B.N. (1971).
Protein-polypeptide-hormones of human placenta.
Vitamins and Hormones 29: 95-151.
- 96.- Sei, K. and Matsumoto, N. (1978).
Effect of orally administered nicotine on intrauterine growth in mice.
Teratology 18: 147.
- 97.- Schneider, H., Möhlen, K.H., Challier, J.C. and Dancis, J. (1979).
Transfer of glutamic acid across the human placenta perfused in vitro.
Brit. J. Obst. and Gynecol. 86: 299-306.

- 98.- Schneider, H., Mölen, K.H. and Dancis, J. (1979).
Transfer of aminoacids across the in vitro perfused human placenta.
Pediatr. res. 13: 236-240.
- 99.- Smith, C.H. Adcock III, E.W., Teasdale, F., Meschis, G. and Battaglia, F.C. (1973).
Placental aminoacid uptake: tissue preparation, kinetics and preincubation effects.
Am. J. Physiol. 224(3): 558-564.
- 100.- Steel, R.B., Smith, C.H. and Kelley, L.K. (1982).
Placental aminoacid uptake. VI. Regulation by intracellular substrate.
Am. J. Physiol. 243(Cell Physiol. 12): C46-C51.
- 101.- Stern, L. (1975).
Drug therapy in the perinatal period.
In: Basic and Therapeutic Aspects of Perinatal Pharmacology, Morsellim, P.L., Garatini, S. and Sereni, F. (Eds.), Raven Press, New York, p. 7-12.
- 102.- Sybulski, S. and Tremblay, P.C. (1967).
Uptake and incorporation into protein of radioactive glycine by human placental in vitro.
Am. J. Obstet. Gynecol. 97: 1111-1118.
- 103.- Taussing, H.B. (1962).
A study of the german outbreak of foconmelia.
Jama. 180: 106.
- 104.- Thau, R.B. and Lanman, J.T. (1975).
Endocrinological aspects of placental function.
In: The placenta, Gruenwald, P. (Ed.), University Press, Baltimore, p. 125-144.
- 105.- Valente, A., Reme, J.M., Pontonnier, G. and Cros, J. (1980).
Specific binding for opiate-like drugs in the placenta.
Biochem. Pharmacol. 29: 2657-2661.
- 106.- Van Kijk, J.P. and Van Kreel, B.K. (1978).
Transport and accumulation of alpha aminoisobutyric acid (AIB) in guinea pig placenta.
Pflügers, *Arch.* 337(3): 217-224.

- 107.- Weinstock, M. (1972).
Acetylcholine and cholinesterase.
In: Narcotic Drugs, Clouet, D.H. (Ed.), Plenum Press, USA, p. 254-261.
- 108.- Welsch, F. and Wennerberg, P.A. (1978).
Effects of cholinergic drugs on uptake of ^{14}C -alpha aminoisobutyric acid into fragments of human term placenta.
Biochem. Pharmacol. 27: 285-292.
- 109.- Wennerberg, P.A. and Welsch, F. (1977).
Effect of cholinergic drugs on uptake of ^{14}C aminoisobutyric acid by human term placenta fragments: implication for acetylcholine recognition sites and observations on the binding of radioactive cholinergic ligands.
Fed. Proc. 36: 980.
- 110.- Whitsett, J.A. and Wallick, E.T. (1980).
 ^3H -ouabain binding and $\text{Na}^+ \text{K}^+$ activated ATP-ase activity in human placenta.
Am. J. Physiol. 238 (Endocrin. Metab.): E38-E45.
- 111.- Williams, R.T. (1963).
Teratogenic effects of thalidomide and related substances.
Lancet 1: 723-724.
- 112.- Wynn, R.M. (1975).
Principles of placentation and early human placental development.
In: The Placenta, Gruenwald, P. (Ed.), University Park Press, Baltimore, p. 18-34.
- 113.- Wynn, R.M. (1975).
Fine structure of the placenta.
In: The Placenta, Gruenwald, P. (Ed.), University Park Press, Baltimore, p. 56-79.
- 114.- Young, M. and Prenton, M.A. (1969).
Maternal and fetal aminoacid concentration during gestations and retarded fetal grow.
J. Obstet. Gynecol. Br. Commonw. 76: 333-344.
- 115.- Young, M. (1979).
Transfer of aminoacids.
In: Placental transfer, Chamberlain, G.V.P. and Wilkinson (Eds.), Pitman Press, Great Britain, p. 142-158.
- 116.- Younoszai, M.K., Peloso, J. and Haworth, J.C. (1969).
Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette smoke during pregnancy.
Am. J. Obstet. Gynecol. 104: 1207-1213.