

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**



**COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LAS UNIONES ESTRECHAS
DEL ENDOTELIO PLACENTARIO HUMANO
DURANTE LA PREECLAMPSIA.**

T E S I S

Que para obtener el doctorado en Ciencias
presenta:

SAMUEL ALEJANDRO LIÉVANO TORRES

TUTOR: DRA. LORENZA GONZALEZ-MARISCAL Y MURIEL

MEXICO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento,
madre de toda certidumbre.

Leonardo da Vinci.

La investigación se funda en tomar una porción del caos de lo desconocido, estudiarlo e
incorporarlo al orden del conocimiento*.

La ciencia moderna no es más que el último modelo de la manera humana de interpretar
el mundo en que vivimos.

Marcelino Cerejido Mattioli.

*Cerejido, M. Ciencia Sin Sesos Locura Doble. Siglo XXI Editores, Mexico, 1994 y Por Que No
Tenemos Ciencia. Siglo XXI Editores, Mexico, 1997.

CONTENIDO

Resumen	2
Capítulo I: La Preeclampsia.	
1.1. Hipertensión en el embarazo.	4
1.2. Etiología de la preeclampsia.	5
1.2.1 Predisposición genética	6
1.2.2. Mala adaptación inmune.	6
1.3. Disfunción endotelial y factores vasculares mediadores.	8
1.4. Patogenia.	10
1.5. Diagnóstico de preeclampsia, eclampsia y HELLP.	12
1.6. Tratamiento de la preeclampsia.	14
1.7. Prevención de la preeclampsia.	16
Capítulo II Implantación y desarrollo placentario	18
2.1 Estadios del proceso de implantación.	18
A) Aposición.	18
B) Adhesión estable.	19
C) Desarrollo de la circulación uteroplacentaria.	21
2.2. La decidua y el corión frondoso humano	24
2.3. El sincitiotrofoblasto humano.	26
2.4. Irrigación uterina	29
2.5. Placentación humana anormal en la preeclampsia.	30
2.6. Proliferación y diferenciación in vitro del citotrofoblasto humano.	32
2.7. Modulación del repertorio de moléculas de adhesión de los citotrofoblastos invasores para simular el de las células vasculares.	33
Capítulo III: Las uniones estrechas	35
3.1. Los epitelios.	35
3.2. Morfología y función de la UE.	36
3.3. Composición molecular de la UE	38
3.3.1. Proteínas transmembranales de la UE.	38
A. Occludina.	39
A.1. Estructura	39
A.2. Función.	40
B. Claudinas	43
B.1. Estructura	44
B.2. Las claudinas y su relación con los filamentos de la UE.	46
B.3. Las claudinas y su relación con la función de Compuerta de la UE.	48

B.3.1. Estudios en líneas celulares.	49
B.3.2. Estudios en humanos.	50
B.3.3. Estudios en animales.	51
C. JAM.	54
3.3.2. Proteínas submembranales.	55
3.3.2.1. ZO-1.	57
3.3.2.1. ZO-2.	60
3.4. La unión estrecha en la placenta humana.	61
Capítulo IV: Hipótesis.	63
Capítulo V: Objetivos.	64
5.1. Objetivo general.	
5.2. Objetivos experimentales específicos.	
Capítulo VI: Material y Métodos.	65
6.1. Selección del tejido.	65
6.2. Procesamiento del tejido.	65
6.3. Inmunofluorescencia.	67
6.4. Western blot.	68
Capítulo VII: Resultados.	70
7.1. ZO-1.	71
7.2. Occludina.	71
7.3. Claudina-5.	72
7.4. Claudina-3.	73
7.5. Otras claudinas.	73
7.5.1. Claudina-1.	
7.5.2. Claudina-4.	
7.5.3. Claudina-16.	75
7.6. Estudios por microscopia electrónica.	76
Capítulo VIII: Discusión	77
REFERENCIAS	85

RESUMEN

Este estudio explora la composición molecular de la unión estrecha (UE) en la placenta humana a término de mujeres sanas y con preeclampsia. La preeclampsia es una enfermedad que se caracteriza por el aumento de la presión arterial durante el embarazo. La disfunción del endotelio materno es una característica de la preeclampsia, por lo que he analizado su impacto en el endotelio placentario. Este estudio se concentra en la UE porque esta estructura regula el sellado de la ruta paracelular. En este trabajo he encontrado que en el endotelio de la placenta los componentes de la UE incluyen a la proteína submembranal ZO-1 y a las proteínas integrales: ocludina y claudinas 1, 3 y 5. Durante la preeclampsia la expresión de ocludina y ZO-1 no varía significativamente, en cambio, la expresión de las claudinas 1, 3 y 5 disminuye, lo que nos sugiere la presencia de UEs permeables en los endotelios de placentas preeclámpticas, posiblemente en respuesta a la disminución de la perfusión de este órgano durante la enfermedad. También observé que en la placenta normal, la claudina-4 se encuentra localizada en la superficie basal de la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto y la claudina-16 a lo largo tanto de la membrana apical como de la membrana basolateral. Por microscopía electrónica de transmisión y por co-inmunolocalización de claudina-16 con las proteínas marcadoras de membrana plasmática Na^+K^+ -ATPasa y GP135 se demostró la presencia de canales que cruzan el sincitiotrofoblasto y constituyen la ruta paracelular. Ya que la claudina-16 funciona como un canal paracelular para Mg^{2+} , su patrón difuso de distribución en las placentas de mujeres con preeclampsia sugiere que en esta condición patológica se encuentra alterado el transporte paracelular de Mg^{2+} entre la sangre materna y el tejido placentario.

CAPITULO I: LA PREECLAMPSIA.

Todo conocimiento comienza por los sentimientos.
Leonardo da Vinci

1.1. Hipertensión en el embarazo.

La hipertensión en el embarazo constituye un factor de riesgo para la morbi-mortalidad materna y fetal en el mundo (Cunningham and Lindheimer 1992;Ceron-Mireles et al. 2001;MacKay et al. 2001). La enfermedad hipertensiva ocurre en un 12 a 22% de los embarazos (Walker 2000;Koonin et al. 1997;Roberts and Redman 1993) y genera al menos el 17.6% de la mortalidad materna (Walker 2000;Koonin et al. 1997;2000). Esto es especialmente cierto en países en vías de desarrollo.

La hipertensión en la mujer embarazada se define como la elevación de la presión sistólica a 140 mm Hg o más, acompañada de un incremento en la presión diastólica a 90 mm Hg o más, después de las 20 semanas de gestación, en una mujer que previamente registraba presiones normales (2000).

Los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y el grupo de trabajo sobre presión sanguínea alta en el embarazo, distinguen las 4 siguientes categorías de desordenes hipertensivos en el embarazo:

- I. Hipertensión crónica.- Incluye hipertensión preexistente, hipertensión esencial y secundaria (enfermedades renales preexistentes), diagnosticada previamente al embarazo o antes de la semana 20.
- II. Preeclampsia-eclampsia.- Hipertensión única en el embarazo, diagnosticada después de la semana 20 de gestación y asociada con proteinuria. La proteinuria se define como la presencia de 0.3g o mas de proteína en orina de 24hrs. o su correlación con 1+ en tira reactiva de una muestra de orina

(2002). Si ocurren convulsiones desde antes del alumbramiento hasta los 7 días del puerperio (Pritchard et al. 1984; Sibai 1990) se denomina eclampsia.

III. Preeclampsia asociada a hipertensión crónica.- Aparición o empeoramiento de proteinuria, incremento de la presión arterial, trombocitopenia, o elevación de enzimas hepáticas después de la semana 20 de gestación en una mujer hipertensa.

IV. Hipertensión Gestacional.- Hipertensión diagnosticada después de la semana 20 de gestación, no acompañada de proteinuria y que retorna a la normalidad en el postparto. Incluye dos subgrupos:

a) Hipertensión transitoria.- Resuelta antes de la semana 12 del puerperio, usualmente leve y que ocurre frecuentemente al final del embarazo, sin perjuicio del mismo o del estado metabólico de la madre.

b) Hipertensión crónica.- Permanece al término del puerperio.

La preeclampsia es un síndrome exclusivo del embarazo humano que no ha sido descrito o reproducido experimentalmente en ningún animal (Ramsay et al. 1997; Seidl et al. 1979; Gille et al. 1977).

La preeclampsia se asocia además con otros signos y síntomas tales como edema, hiperreflexia, alteraciones visuales, cefalea, dolor epigástrico y alteraciones de laboratorio que incluyen hemólisis, elevación de enzimas hepáticas (liver) y baja cuenta de plaquetas (**LP**), de allí el nombre del síndrome **HELLP**.

La preeclampsia puede aparecer repentinamente y progresar rápidamente. Con frecuencia se acompaña de manifestaciones sistémicas en múltiples órganos, incluyendo cerebro, riñón, hígado y placenta (Gant et al. 1974).

2.2 Etiología de la preeclampsia.

La etiología de la preeclampsia se desconoce (Pridjian and Puschett 2002a;Dekker et al. 1998;Dekker 1999), aunque se sabe que la preeclampsia solo ocurre cuando hay tejido placentario y con mayor frecuencia cuando hay un exceso de este. Así, las mujeres con múltiples gestaciones desarrollan más fácilmente preeclampsia (Mastrobattista et al. 1997). Sin embargo es importante destacar que la enfermedad se puede presentar en ausencia de feto como ocurre cuando se tiene un embarazo molar (SCOTT 1958;CHUN et al. 1964). Por ello se piensa que la placenta es el órgano que induce la preeclampsia (Redman 1991). Los estudios histológicos sugieren que la parte de la placenta que esta mayormente afectada por la enfermedad es la porción que se adhiere a la pared uterina (Brosens et al. 1972;Gerretsen et al. 1981;Khong et al. 1986).

A continuación realizaré una somera descripción de los principales factores etiológicos implicados en la preeclampsia y sus interrelaciones.

1.2.1. Predisposición genética.

La relación familiar de incidencia de preeclampsia en madres e hijas hasta 3 generaciones ha sido descrita como Mendeliana autosomica dominante con una penetración incompleta en un 30% (Thornton and Onwude 1991).

Sin embargo, los estudios de gemelas contradicen al modelo genético Mendeliano simple pues demuestran la aparición de preeclampsia en una gemela y nunca en las dos (Thornton and Onwude 1991).

1.2.2 Mala adaptacion inmune.

Esta propuesta se basa en la observación epidemiológica que demuestra como el riesgo de desarrollo de preeclampsia se reduce con los embarazos (Feeney and Scott 1980;Campbell et al. 1985).

Se hipotetiza que la preeclampsia es un desorden inmunológico que surge como respuesta materna a los antígenos paternos presentes en la placenta. De hecho se ha

observado que la exposición materna al esperma provee una protección parcial contra el desarrollo de preeclampsia (Marti and Herrmann 1977) y que las mujeres que usan el condón como método anticonceptivo, tienen mayor riesgo de desarrollar preeclampsia que las que utilizan hormonales orales o DIU (Klonoff-Cohen et al. 1989).

Así mismo se ha demostrado que la incidencia de preeclampsia en mujeres multíparas es mas bajo que en las primigestas, pero es mayor si tienen diferentes parejas.(Li and Wi 2000). También se ha demostrado que los intervalos cortos de cohabitación sexual antes del embarazo se asocian con el incremento del riesgo de preeclampsia. (Robillard et al. 1994). Otro estudio en cambio demostró que el riesgo de preeclampsia en embarazos subsecuentes esta relacionado con el tiempo íntergenésico, así cuando el intervalo entre los nacimientos fue mayor a 10 años el riesgo de la multípara fue similar al de la primigesta. En resumen, se cree que la mujer con mayor tiempo de cohabitación sexual antes del embarazo ha estado más expuesta a los antígenos paternos y en consecuencia es más tolerante a ellos y por ello disminuye su riesgo de preeclampsia.

Una de las funciones de la placenta es la regulación de la respuesta inmune materna. El trofoblasto es esencial en esta función ya que se encuentra en la interfase materno-fetal, y esta en contacto directo con las células del sistema inmune materno.

La mala adaptación inmune en la preeclampsia puede causar la característica invasión trofoblastica endovascular poco profunda y la consecuente isquemia placentaria con la disfunción celular endotelial, teoría que compagina con la hipótesis de la isquemia placentaria (Smarason et al. 1993). Alternativamente la mala adaptación inmune puede causar la liberación de citocinas toxicas, y enzimas proteolíticas de la decidua, las cuales pueden dañar y/o alterar la función normal del sincitiotrofoblasto y del endotelio materno (Zeeman and Dekker 1992;Dekker and van Geijn 1996a;Dekker

and van Geijn 1996b). La isquemia placentaria y la activación de neutrofilos polinucleares parece ser la consecuencia mas severa de esta anomalía en la respuesta inmune materna, con el disparo de una cadena de eventos con el único fin del daño/difunción del sistema endotelial asociado a la sintomatología de la preeclampsia.

La mala adaptación inmune no contradice los estudios que involucran a factores genéticos en la etiología de la preeclampsia. Desde 1985 se ha sugerido que la mujer que tiene genéticamente una pobre respuesta inmune unida a un hombre quien tiene un diseño bajo estimulador de respuesta podría definitivamente encabezar una inadecuada respuesta inmunológica materna.

El embarazo humano normal consiste en una implantación exitosa de un tejido vivo de una persona a otra, sin embargo la homeostasis inmunológica entre la madre y el feto no siempre es perfecta (Scott and Beer 1976). Se ha mantenido la idea que la preeclampsia es una enfermedad del primer embarazo (Dekker and Sibai 1999), por lo que el cambio de pareja reduce la inmunidad a la preeclampsia. Las células T del tracto genital pueden reconocer antígenos sin la necesidad de unirse a los de clase HLA-I o células presentadoras de antígeno, lo que permite al trofoblasto sin tener HLA clásico ser reconocido (Clark 1994). Se ha reportado un estado de linfocitos T hiporeactivos al HLA-I paterno los cuales impactan en esta reacción inmune (Robertson et al. 1997). Un nivel mas bajo el RNAm para HLA-G se ha identificado en trofoblastos de mujeres preeclámpicas más que en mujeres normales (Colbern et al. 1994) pero esto puede ser el resultado de algunas células trofoblasticas en mujeres preeclámpicas (Hara et al. 1996; Lim et al. 1997). Candidatos para mediadores de adaptación inmune en preeclampsia incluye citocinas, especialmente TNF- α e interleucina- 2 y -6 (Dekker and Sibai 1999). Adicionalmente las enzimas liberadas por neutrofilos activados, como la elastasa y radicales libres de oxígeno, incluyendo lípidos peroxidados han sido

sugeridos como potencialmente implicados (Dekker and Sibai 1999). La concentración de bufadienoides en preeclampsia, pueden estar elevados, estas sustancias tienen propiedades inmunoregulatorias por inhibir la función de la célula T (Terness et al. 2001).

1.3. Disfunción endotelial y factores vasculares mediadores

Varias enfermedades clínicas o subclínicas con interferencia de la función endotelial se conocen como riesgos de preeclampsia. Estas condiciones actúan en tres niveles de la cascada de la preeclampsia: placentación deficiente, isquemia placentaria y disfunción de la célula endotelial (Figura II.2). La diabetes y la hipertensión crónica son factores de riesgo muy bien conocidos. Se ha demostrado que más del 50% de pacientes con preeclampsia tenían historia de alteraciones del metabolismo y/o hemostasis, consistentes en deficiencia de proteína S, activación de proteína C reactiva, presencia de anticuerpos anticardiolipina en sangre e hiperhomocisteinemia. La identificación previa al embarazo de estas sustancias en pacientes con historia de preeclampsia posibilita el anticipar un riesgo de recurrencia.

Se sospecha que en la preeclampsia existe un factor que interfiere con la función endotelial originando vasoconstricción, aumento de la permeabilidad capilar y activación de la cascada de coagulación. De hecho se ha visto (Rodgers et al. 1988) que el suero de mujeres con preeclampsia daña la célula endotelial in vivo y que productos del sincitiotrofoblasto interfieren específicamente con el crecimiento in vitro, de células endoteliales (Smarason et al. 1993).

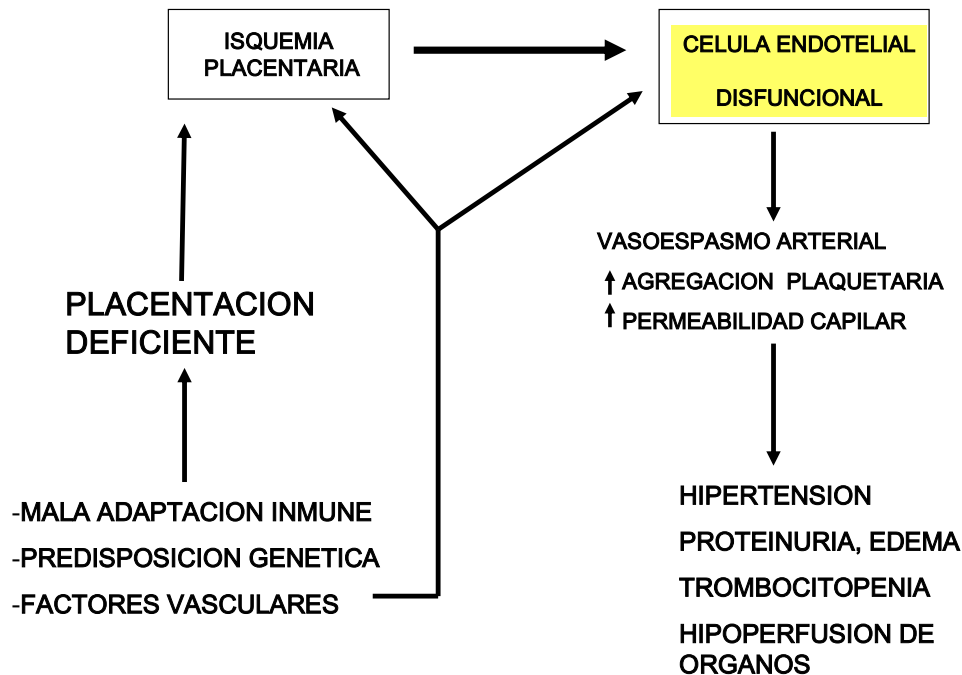


Figura II.2. Esquema representativo de las condiciones que actúan en los tres niveles de la cascada de la preeclampsia. Tomado de Van Beek E 1998.

En pacientes con preeclampsia se ha observado endoteliosis glomerular en placenta y vasos uterinos adyacentes (Shanklin and Sibai 1989), y la anemia hemolítica microangiopática y Trombocitopenia.

Así mismo, se detecta un incremento en la circulación de factor von Willebrand (Redman et al. 1977; Inglis et al. 1982), endotelina (Kraayenbrink et al. 1993; Florijn et al. 1991) y el epitope celular de Fibronectina (Lazarchick et al. 1986; Ballegeer et al. 1989; Lockwood and Peters 1990). También se encuentran alteraciones del Activador del Plasminogeno total (tPA) y desbalance del plasminogeno activador/inhibidor y de la prostaciclina (PGI₂) / tromboxano (TXA₂).

Estos cambios morfológicos y funcionales de la célula endotelial pueden ser directamente responsables del síndrome clínico de vasoespasmo arterial, incremento de la agregación de plaquetas e incremento de la permeabilidad capilar permitiendo la

hipertensión, proteinuria, edema y algunas veces trombocitopenia e hipoperfusión de órganos (Figura II.2.)

1.4 Patogenia.

La preeclampsia tiene efectos en casi todos los órganos y sistemas de la madre, pero principalmente en el sistema vascular, el hígado, el riñón y el cerebro, así como en la cascada de la coagulación. El volumen intravascular de una mujer con preeclampsia no se expande como en el embarazo normal, sino que al contrario se contrae. La severidad de la contracción de volumen vascular correlaciona con la severidad de la enfermedad. El fluido intersticial en la preeclampsia aumenta notablemente por lo tanto, la mayoría de las mujeres tienen edema más allá del que se desarrolla en el embarazo normal. El aumento de fluido intersticial se debe principalmente al daño endotelial que permite la fuga capilar de fluido y proteína al intersticio. Este efecto es exacerbado por la hipertensión, y por la baja presión de coloides oncóticos del plasma. Durante la cesárea de pacientes con preeclampsia, es común encontrar acumulaciones relativamente grandes de fluido ascítico en la cavidad peritoneal.

El edema de hígado ocurre en la mayoría de las mujeres con preeclampsia. El daño hepático puede provocar desde sangrado subcapsular y hemorragia intrahepática que puede ser reversible (Muchnok et al. 1998; Zissin et al. 1999), hasta la ruptura de la cápsula de Glisson, hemorragia intraabdominal aguda y muerte materna. La necrosis hepatocelular debido a una hemorragia periportal y subcapsular incrementa las aminotransferasas y la deshidrogenasa láctica en la sangre. De hecho aproximadamente 20% de la mortalidad materna en preeclampsia se debe a complicaciones hepáticas (Knox and Olans 1996) y los estudios postmortem del hígado revelan edema, hematomas subcapsulares y periportales, infartos y cambios en el contenido graso intracelular indistinguible del hígado graso agudo del embarazo.

La lesión clásica de la preeclampsia en los riñones es la endoteliosis glomerular. Bajo microscopía simple de luz puede observarse una hipertrofia glomerular moderada no proliferativa, con disminución del espacio capilar glomerular secundario a edema del endotelio glomerular. La fibrosis glomerular focal, similar a la glomeruloesclerosis segmental no es rara en preeclampsia, sin embargo cuando se termina el embarazo se pasa la progresión del daño renal (Schwartz and Korbet 1993), lo que sugiere hipoperfusión renal durante la preeclampsia. La excreción de ácido úrico se encuentra disminuida y su elevación en sangre (superior de 6.7 mg/dl) correlaciona con la severidad de la enfermedad (POLLAK and NETTLES 1960).

La alteración cerebral más frecuente en la preeclampsia es el edema, secundario a la disfunción de la autorregulación vascular (Port and Beauchamp, Jr. 1998). Las necropsias de pacientes que murieron por preeclampsia revelan lesiones que incluyen desde petequias, necrosis fibrinoide y microinfartos hasta la hemorragia cerebral (GOVAN 1961). Las mujeres con preeclampsia presentan alteraciones visuales como fosfenos y escotomas que pueden ocurrir por daño retinal o por lesiones en el lóbulo occipital (Cunningham et al. 1995).

Las alteraciones en la coagulación incluyen a las plaquetas, al sistema fibrinolítico y a diversos factores de la cascada de coagulación activados en consecuencia del daño endotelial.

En el parto las complicaciones se incrementan en las pacientes con preeclampsia e incluyen hemorragias, desprendimiento de placenta normalmente insertada (DPPNI), coagulación intravascular diseminada (CID), edema pulmonar y dehiscencia de herida quirúrgica. Las complicaciones son mayores si la preeclampsia evoluciona a eclampsia.

Se han reportado en la eclampsia incrementos en el riesgo de DPPNI incrementa un 10%, el síndrome de HELLP un 11 %, y el CID un 6%. En los recién nacidos de madres con eclampsia aumenta el déficit neurológico en 6%, la neumonía por aspiración en 7%, el edema pulmonar en 5%, falla cardiopulmonar en 4%, la falla renal en 4% y la muerte en 1% (Mattar and Sibai 2000). Estas complicaciones son generalmente el resultado de DPPNI, de una inadecuada perfusión placentaria o de un parto prematuro.

1.5. Diagnostico de preeclampsia, eclampsia y HELLP.

A) Preeclampsia leve

Se diagnostica cuando hay presencia de hipertensión y proteinuria, pero no hay evidencias de otras disfunciones orgánicas.

B) Preeclampsia severa.

Los criterios para considerar a la preeclampsia como severa son (2002;Many et al. 1999):

- 1.- Presión arterial mayor a 160/100 en reposo en cama.
- 2.- Proteinuria mayor a 5 gm/24 Hrs.
- 3.- Oliguria menor a 400 ml durante 24 Horas.
- 4.- Edema Pulmonar.
- 5.- Manifestaciones en el sistema nervioso central tales como cefalea, escotomas, visión borrosa y alteraciones de conciencia.
- 6.- Dolor en hipocondrio derecho indicativo de hemorragia hepática potencial.
- 7.- Trombocitopenia menor a 100,000
- 8.- Cualquier signo de síndrome de HELLP
- 9.- Retraso en el crecimiento intrauterino.
- 10.- DPPNI y CID

C) Eclampsia

La preeclampsia pasa a ser clasificada como eclampsia cuando se presentan convulsiones durante el embarazo, durante la labor de parto e inclusive 7 días después del parto y que no tienen nada que ver con la epilepsia u otro desorden convulsivo. Generalmente se presenta un caso de eclampsia por cada 2000 o 3000 embarazos (Mahmoudi et al. 1999) y en el 22% de las mujeres con preeclampsia (Sibai et al. 1984).

D) Síndrome de hellp

El síndrome HELLP, es una variante de la preeclampsia severa, caracterizada por la hemolisis intravascular que induce anemia hemolítica microangiopática, diagnosticada por la anomalía periférica de los eritrocitos y plaquetas de menos de 100,000 u/L. Adicionalmente en este síndrome se eleva la lactato deshidrogenasa a valores superiores a las 600 U/L, la bilirrubina excede los 1.2 mg/ dl; y la aspartato amino transferasa es mayor a 70 U/L (Sibai et al. 1993).

El síndrome HELLP se observa en el 15 % de las mujeres que padecen preeclampsia y da lugar a un riesgo de 21% de CID, de 16% de DPPNI, de 7.7% de falla renal y de 6% de edema pulmonar (Sibai et al. 1993; Crosby 1991).

1.6. Tratamiento de la preeclampsia severa.

La preeclampsia en cualquier modalidad de diagnóstico se debe de tratar con cuidado y seriedad, y aun en el posparto la madre no está exenta de presentar complicaciones en su salud.

En la actualidad el tratamiento tiene como meta evitar las convulsiones, estabilizar la presión sanguínea y estimular el parto. Si bien, el nacimiento del producto es hasta ahora el mejor tratamiento cuando ya ha ocurrido la enfermedad, un manejo agresivo con interrupción inmediata del embarazo, sobre todo antes del término trae consigo una alta morbilidad y mortalidad neonatal (Redman and Roberts 1993) por las complicaciones asociadas a la prematuridad. Por otro lado la permanencia del embarazo

incrementa la gravedad de la preeclampsia e incrementa la morbilidad y mortalidad materna. Por ello se considera que el manejo optimo es aquel que sin comprometer a la madre (Many et al. 1999) mejore la supervivencia del feto.

El manejo clínico de la preeclampsia se puede dividir en dos aspectos:

1) Medidas generales. Utilizado principalmente para el tratamiento de preeclampsia leve y consiste en : Estrecha vigilancia prenatal, monitoreo fetal frecuente, dieta hiperproteica, monitoreo de la proteinuria, determinación semanal de la depuración de creatinina en orina de 24 Hrs y evaluación cuidadosa de la presión sanguínea para intervenir en caso de progresión a un estado severo.

2) Tratamiento farmacológico. Se encamina al control de la preeclampsia severa, sus objetivos principales son: evitar las convulsiones, evitar o disminuir el número y gravedad de complicaciones, disminuir el vasoespasmo, estabilizar a la madre y facilitar la madurez del feto. (Sibai et al. 1990). Se recomienda el tratamiento hospitalario, bajo una estricta vigilancia y el sulfato de magnesio como medicamento imprescindible para evitar las convulsiones (Sibai 1990).

El Sulfato de Magnesio administrado antes del parto reduce los niveles plasmáticos de endotelina-1 (Mastrogiannis et al. 1992), así como su síntesis y liberación local, además de favorecer la producción endotelial del factor relajante derivado del endotelio y de prostaglandinas vasodilatadores (Mitchell et al. 1990). Por otro lado también reduce la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (Fuentes and Goldkrand 1987).

Durante la labor y el parto, la mayoría de las mujeres con preeclampsia reciben sulfato de magnesio vía intravenosa como profiláctico. Se han usado varios protocolos para el tratamiento (1995;Coetzee et al. 1998;Roberts 1995). Pero el más común (Pridjian and Puschett 2002b) consiste de una dosis de 4 a 6 gramos de sulfato de magnesio administrada vía intravenosa durante 15 o 20 minutos, seguida de una infusión

intravenosa continua de 2 gramos de sulfato de magnesio por hora. Debido a que el magnesio se elimina en la orina, los niveles de este catión en sangre también dependen de la producción de ésta. Los niveles de magnesio en la sangre deben monitorearse al menos al principio. Los niveles ideales de magnesio en el suero varían de 4 a 6 mEq/litro (4.8-9.6 mg/dl). En el periodo postparto, el sulfato de magnesio se sigue administrando durante 24 horas. La diuresis después del parto provoca la reversión de las anormalidades fisiopatológicas en esta enfermedad, y se ha utilizado como un punto final clínico para discontinuar la dosis profiláctica con terapia de sulfato de magnesio (Lang et al. 1991). En los Estados Unidos, el sulfato de magnesio se usa como profiláctico, en todas las mujeres sin importar la severidad de la preeclampsia (Roberts 1995), en cambio en otros países se administra sólo a las mujeres con preeclampsia severa o eclampsia (Walker 2000). Se ha demostrado la superioridad del sulfato de magnesio sobre la fenitoína para evitar las convulsiones (Lucas et al. 1995).

Cuando la preeclampsia severa con o sin el síndrome de HELLP se presenta en una mujer con un feto prematuro, es decir de menos de 32 semanas de gestación, se intenta retrasar el parto, manteniendo a la paciente en una clínica con especialistas capacitados. La eclampsia en cambio obliga a la interrupción inmediata del embarazo sin importar la etapa de gestación.

El parto es más seguro que la cesárea en mujeres con preeclampsia (Pridjian and Puschett 2002b) y debe intentarse a menos que haya otras indicaciones obstétricas para la cesárea. Los agentes coadyuvantes de la dilatación cervical, como prostaglandinas y misoprostol, un análogo sintético de la prostaglandina, se han usado con éxito. Si el parto vaginal no es inminente en 24 horas en mujeres con preeclampsia o eclampsia, se debe tener en consideración el nacimiento por cesárea.

La analgesia y anestesia durante la labor de parto y la cesárea en la preeclampsia ha cambiado al paso de los años. Mientras que en el pasado se recomendaba anestesia general para la cesárea, actualmente, la anestesia regional como el bloqueo epidural se ha usado con éxito, siendo el método de anestesia más utilizado (2000).

La trombocitopenia materna constituye una contraindicación para la colocación del catéter epidural. Por ello solo se emplea cuando la cantidad de plaquetas es de al menos 70,000 (Hogg et al. 1999;Beilin et al. 1997).

1.7. Prevención de la preeclampsia.

La prevención de una enfermedad como la preeclampsia que no tiene una etiología clara o que tiene múltiples etiologías constituye un reto. Debido a las anomalías endoteliales y de las plaquetas que se presentan en la preeclampsia se estudio el efecto de una dosis baja diaria de aspirina (50 -150 mg) como terapia preventiva. Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios que no pueden relacionarse con diferencias en el tamaño y composición de las poblaciones en estudio.

Asi mismo se ha visto que la administración de al menos 1 gm diario de calcio elemental, a mujeres con riesgo de preeclampsia y que viven en comunidades donde se consume en bajas cantidades de calcio en la dieta (Lopez-Jaramillo et al. 1997;Lopez-Jaramillo and de 1991) ayudan a prevenir la preeclampsia.

CAPITULO II: IMPLANTACIÓN Y DESARROLLO PLACENTARIO

El movimiento es el origen de toda vida.
Leonardo Da Vinci

La fertilización en la mujer ocurre en el tercio distal de las trompas de Falopio, 24 a 48 horas después de la ovulación. El cigoto y posteriormente la masa de 12 a 16 células denominada mórula, viaja a través de la trompa de Falopio encapsulada en una capa protectora no adherente conocida como zona pelúcida, 2 a 3 días después de la fecundación la mórula entra en la cavidad uterina. En esta etapa comienza a aparecer líquido en su interior con lo que la mórula se transforma en blástula. Dicha blástula tiene orientada hacia la pared de la cavidad uterina una masa celular interna que dará origen al embrión. La superficie celular de la blástula se denomina trofoblasto y originará a la placenta.

2.1. Estadios del proceso de implantación

El proceso de implantación en humanos ocurre en tres estadios:

A) Aposición. Es la adhesión inicial e inestable del blastocito en la superficie del epitelio endometrial de la pared uterina ahora denominada decidua. Las microvellosidades de la superficie del sincitiotrofoblasto conocidas como pinopodios se introducen en la superficie apical del epitelio uterino (Ver figura III.1). La aposición y consecuentemente la implantación de la blástula ocurren generalmente en la pared posterior y superior de la pared del útero.

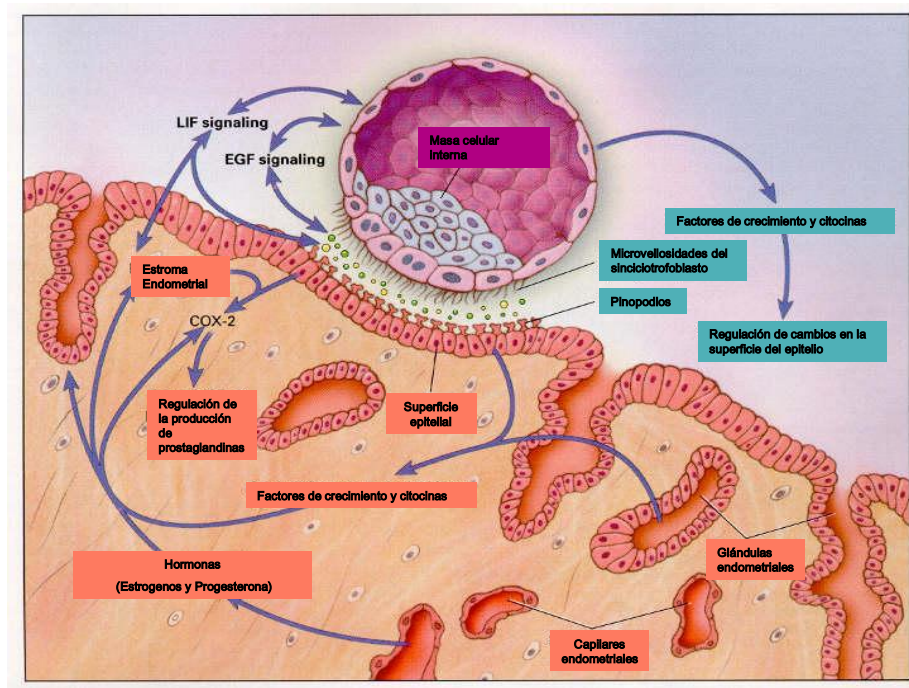


Figura III.1. Aposición y adhesión del blastocisto. Se muestra un blastocisto en el proceso de adhesión a la pared uterina. Tomado de Norwitz 2001.

B) Adhesión estable. Esta fase se caracteriza por el incremento de interacción física entre el blastocito y la decidua. En corto tiempo comienza la invasión y el sincitiotrofoblasto penetra la decidua. En esta proceso el blastocito orienta su polo embrionario hacia la decidua (HERTIG et al. 1959).

Siete días y medio después de la fecundación, la pared del blastocisto continúa aún formada por una sola capa de células aplanadas; y los tejidos maternos en contacto con el trofoblasto muestran signos definidos de lesión. La masa celular interna ahora denominada disco embrionario presenta una placa de ectodermo primitivo y una capa de endodermo, es decir se ha pasado del estadio de blástula al de gástrula (Figura III.2).

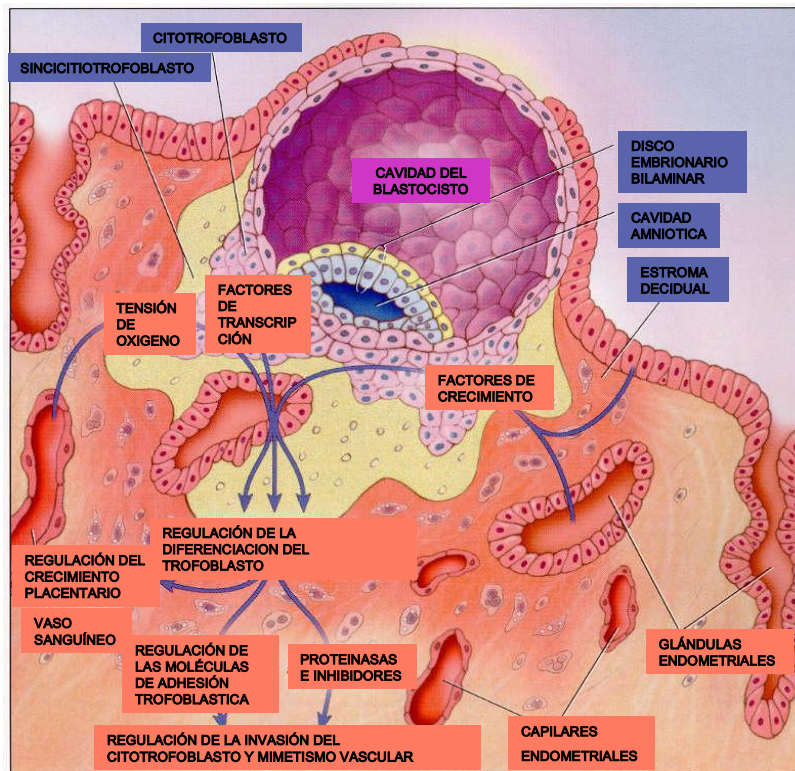


Figura III.2. Implantación del blastocisto. Se muestra la invasión del útero por el blastocisto 9 o 10 días después de la fertilización. Tomado de Norwitz 2001.

Diez días después de la concepción el blastocito implantado se encuentra completamente cubierto por el tejido estromal uterino y el epitelio uterino se engrosa cubriendo el sitio de la implantación (Pijnenborg et al. 1981).

Once días después de la fecundación, las células madres del trofoblasto denominadas células citotrofooblásticas o de Langhans se diferencian uniéndose para formar en la superficie el denominado sincitiotrofoblasto. Este tiene como función principal el transporte y por microscopía electrónica se distingue con facilidad por la enorme cantidad de vacuolas que contiene (Figura III.3).

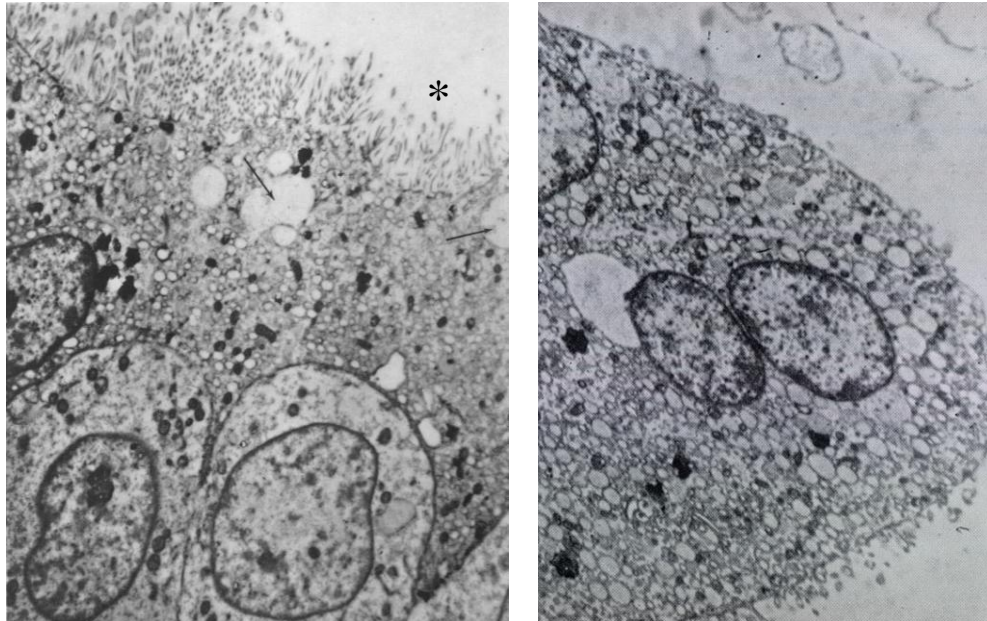


FIGURA III.3. Microscopía electrónica de corte fino del sincitiotrofoblasto en la placenta humana a las 9 semanas de gestación. El genuino carácter sincitial se aprecia en el panel izquierdo, En la porción superior de la imagen se observa el sincitio caracterizado por la presencia de microvellosidades orientadas hacia el espacio intervelloso (asterisco) y por la abundancia de vesículas y vacuolas (flechas) en el citoplasma. En la parte inferior se distinguen tres células de Langhans del citotrofoblasto. En la microfotografía electrónica derecha se aprecian dos núcleos y abundante retículo endoplásmico, así como numerosas gotas y gránulos lipídicos. (Tomada de WISLOCKI, 1955).

C) Desarrollo de la circulación uteroplacentaria.

Esta circulación se establece cuando el trofoblasto entra en contacto con la sangre materna.

Aunque los senos venosos maternos se perforan precozmente, no es sino hasta el decimocuarto o decimoquinto día, que la sangre materna arterial entra en el espacio intervelloso (Figura III.4).

El trofoblasto humano genera dos tipos de vellosidades: las primarias denominadas libres que se caracterizan por flotar en la sangre materna y las secundarias denominadas de anclaje porque sirven para fijar la placenta a la pared uterina. En estas últimas las células del citotrofoblasto también se funden en la superficie para formar un sincitio, pero a diferencia de lo que ocurre en las vellosidades libres, en las de anclaje se conservan muchas células del citotrofoblasto que se agregan y forman columnas. En los extremos distales de las columnas de anclaje las células del citotrofoblasto se unen al

útero e invaden las arteriolas maternas en un proceso conocido como invasión endovascular. A consecuencia de esta invasión las células del citotrofoblasto sustituyen al revestimiento endotelial y muscular de las arteriolas uterinas aumentando significativamente su diámetro e iniciando el flujo de sangre materna hacia el espacio intervelloso (Figura III.5 y 5A).

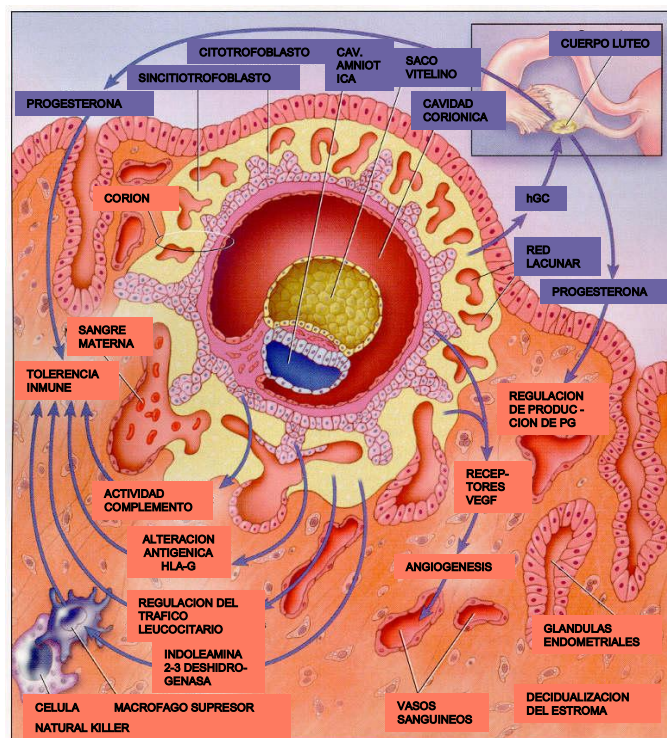


Figura III. 4. Mantenimiento del embarazo temprano. Se muestra la implantación del embrión (aproximadamente 14 días después de la fertilización) y el proceso necesario para el mantenimiento del embarazo temprano. VEGF denota Factor de crecimiento endotelial vascular, y hCG hormona gonadotropina coriónica humana. Tomado de Norwitz 2001.

A medida que el embrión crece se destruye más tejido endometrial y se erosionan las paredes de más capilares maternos. Así, se van formando las lagunas de sangre materna que al fusionarse forman un complicado laberinto dividido por las columnas de anclaje (Figura III. 4). La sangre materna presente en las lagunas entra en contacto directo

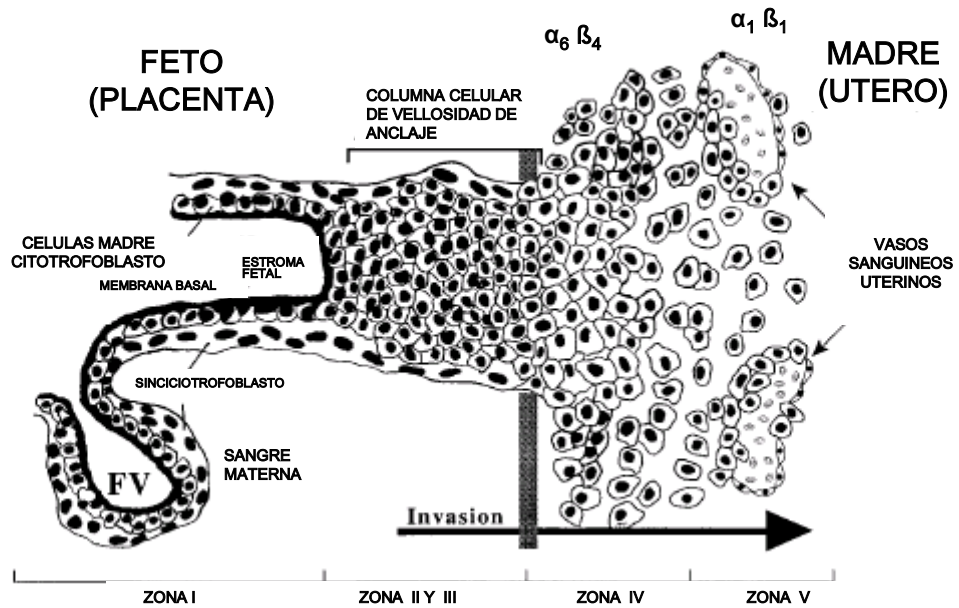


Figura III.5. Diagrama de una vellosidad de anclaje en la interfase feto-materna a las 10 semanas de gestación . Zona I, Vellosidades de anclaje y flotante (FV); Z II y III, células en columna; Z IV, trofoblasto invade la decidua y primer tercio de miometrio; Z V, vasculatura materna. Observe el cambio en la expresión de integrinas de $\alpha_6 \beta_4$ a $\alpha_1 \beta_1$. Tomado y modificado de Zhou, 1997.

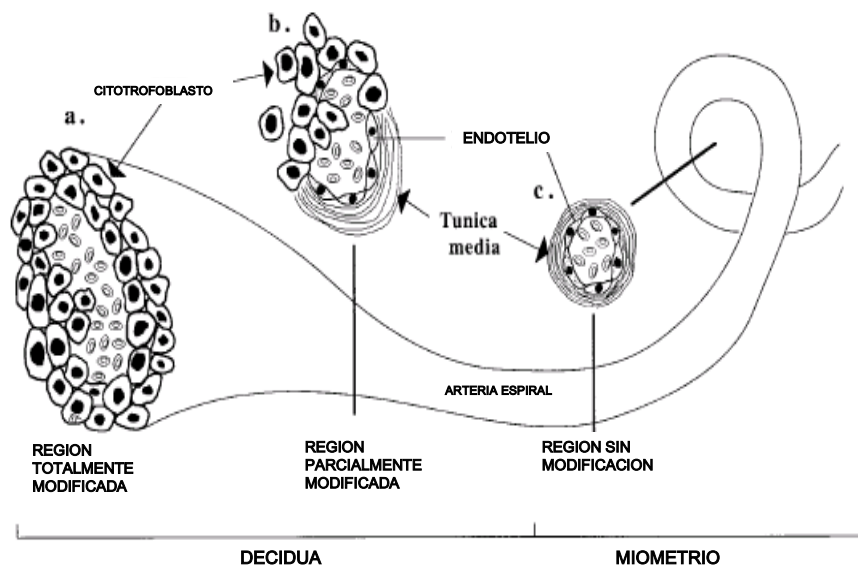


Figura III. 5A. Diagrama de una arteria espiral con invasión endovascular en progreso entre la semana 10 a 18 de gestación. Observe la modificación progresiva de los diferentes segmentos de la arteria. a, región totalmente modificada en la región de mayor diámetro del vaso; b, segmento parcialmente modificado con túnica media poco definida; c, segmento sin modificar en el tercio superficial del miometrio (semana 22). Tomado y modificado de Zhou, 1997.

con las vellosidades libres derivadas del trofoblasto ramificado. Cada vellosidad libre y primaria consiste de un centro de citotrofoblasto cubierto por una capa irregular de sincitio.

2.2. La decidua y el corión frondoso humano.

La porción de decidua por debajo del sitio de implantación se conoce como decidua basal. Por encima del huevo en desarrollo y separándolo del resto de la cavidad uterina se halla la decidua capsular, Mientras que el resto del útero esta revestido por la decidua parietal.

La decidua basal comprende tres capas: una superficial o zona compacta; una porción media o zona esponjosa, con glándulas y numerosos vasos sanguíneos pequeños; y una zona profunda o zona basal. La compacta y la esponjosa juntas forman la zona funcional.

Las vellosidades del trofoblasto en contacto con la decidua basal, proliferan para formar el denominado corión frondoso, mientras que las que están en contacto con la decidua capsular dejan de crecer y degeneran formando el denominado corión liso.

A partir del decimoquinto día después de la fecundación hay cordones de trofoblasto que crecen centrífugamente desde la superficie del corión y forman las vellosidades coriales primarias. Éstas pronto son invadidas en su base por el mesénquima corial que avanza hasta los extremos de las vellosidades en crecimiento convirtiendo las vellosidades primarias en vellosidades secundarias. Así, estas vellosidades secundarias que se bañan en la sangre materna del espacio intervelloso están constituidas por una capa externa de trofoblasto sincitial, una capa interna de citotrofoblasto y un eje central de mesénquima (Figura III.6).

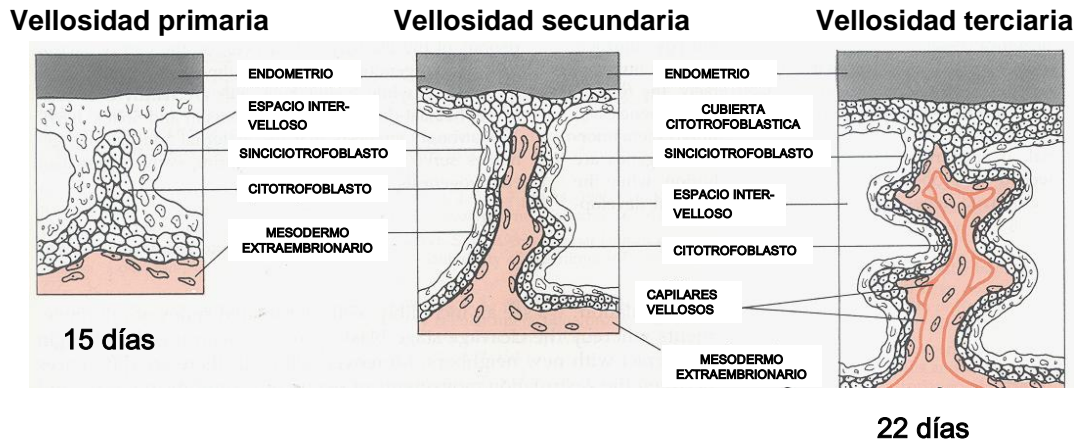


Figura III. 6. Desarrollo de las vellosidades coriónicas. Se representa el desarrollo de las vellosidades de los 15 a los 22 días de la fecundación. Observe la invaginación del mesodermo extraembrionario panel central y derecho, así como la formación de capilares vellosos.

Los vasos sanguíneos fetales se forman en los ejes mesénquimatosos de las vellosidades secundarias en forma de espacios discontinuos revestidos por endotelio. Más tarde estos espacios se fusionan para formar canales vasculares continuos que conectarán con el corazón embrionario por medio de vasos diferenciados en la superficie interna del corión y en el cordón umbilical. Hacia el día 22, la sangre fetal comienza a circular por los capilares de las vellosidades. Una vez vascularizadas las vellosidades secundarias se llaman vellosidades definitivas o terciarias (Figura III.6).

A medida que la placenta madura, las vellosidades primarias o libres se ramifican. Así, cada vellosidad troncal o primaria puede mostrar hasta 15 ramificaciones terciarias. Las ramificaciones más delgadas o dístales presentan una gran superficie para el intercambio de sustancias nutritivas. De hecho se calcula que en un embarazo normal la superficie de intercambio se aproxima a los 90 metros cuadrados. (Figura III. 8). Cada una de estas vellosidades troncales principales y sus ramificaciones constituyen un cotiledón fetal.

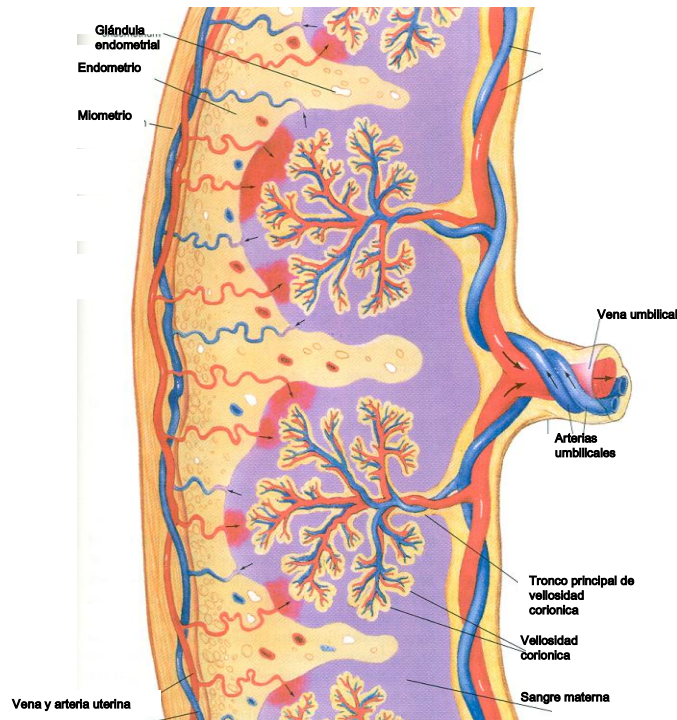


Figura III. 7. Esquema de la interrelación sanguínea entre la madre y el feto, en una placenta normal a término. Se representa la circulación placentaria, detalla las vellosidades coriónicas y la sangra materna en el espacio intervilloso. Tomado de Vander A., 1998.

2.3. El sincitiotrofoblasto humano.

El sincitiotrofoblasto humano posee abundante retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias, núcleos densos y numerosas gotas y gránulos lipídicos (Figura III.3).

El sincitiotrofoblasto humano a pesar ser un sincitio, contiene en ciertas áreas desmosomas y UE, lo que sugiere que no es un sincitio completo (Wang and Schneider 1987). De hecho por microscopia electrónica de criofractura se ha observado en él, la presencia de filamentos de UE.(de Virgiliis et al. 1982) (Figura III. 8).

Conforme avanza el embarazo la composición de la placenta varía. Así, hacia el principio del cuarto mes comienzan a desaparecer las células citotrofoblásticas de las vellosidades placentarias, así como, algunas células de tejido conectivo. De esta manera las únicas capas que separan a la sangre materna presente en el espacio intervilloso y a la fetal presente en el endotelio de las vellosidades son el sincitio y la pared endotelial de los vasos sanguíneos. Esta reducción de capas celulares se traduce en un tránsito

transplacentario más rápido de sustancias. La desaparición de las células citotrofoblásticas, es más notoria en las vellosidades menores. (Figura III.9).

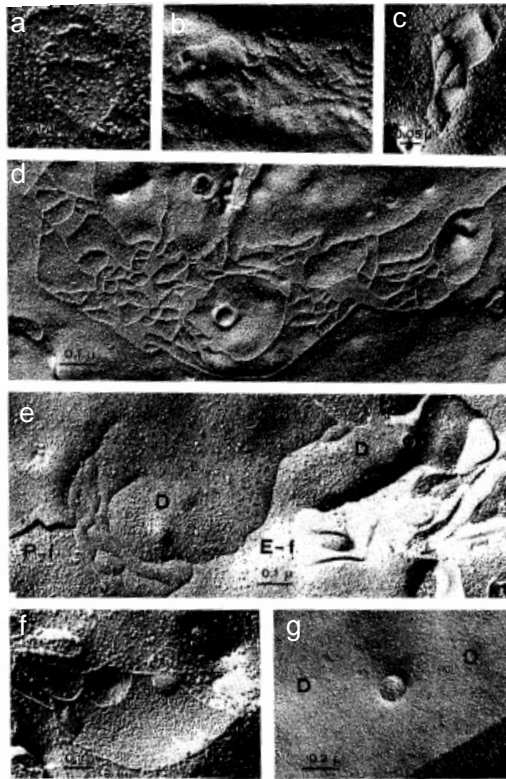


Figura III. 8. Unión intertrofoblástica en placenta de embarazo temprano y de término. a-d embarazo temprano y e-g embarazo de término. En d observe los filamentos de Unión Estrecha en la cara P y en e surcos en la cara E; e y f, visualice partículas de uniones GAP y desmosomas (D) en la cara E y en el panel g en la cara P.

Tomado de: de Virgiliis 1982.

El sincitiotrofoblasto a medida que progresa el embarazo, muestra grandes variaciones en su grosor. De manera que se observan tanto áreas gruesas con grupos de núcleos, como zonas más finas que carecen de ellos. Los capilares en la porción central de las vellosidades se suelen encontrar localizados en las zonas mas delgadas del sincitiotrofoblasto, de tal forma que el grosor de la barrera entre la sangre presente en los lechos maternos y la fetal ubicada en los capilares de las vellosidades placentarias, es un poco mayor de dos mm, distancia semejante a la presente entre los capilares pulmonares y el lumen alveolar.

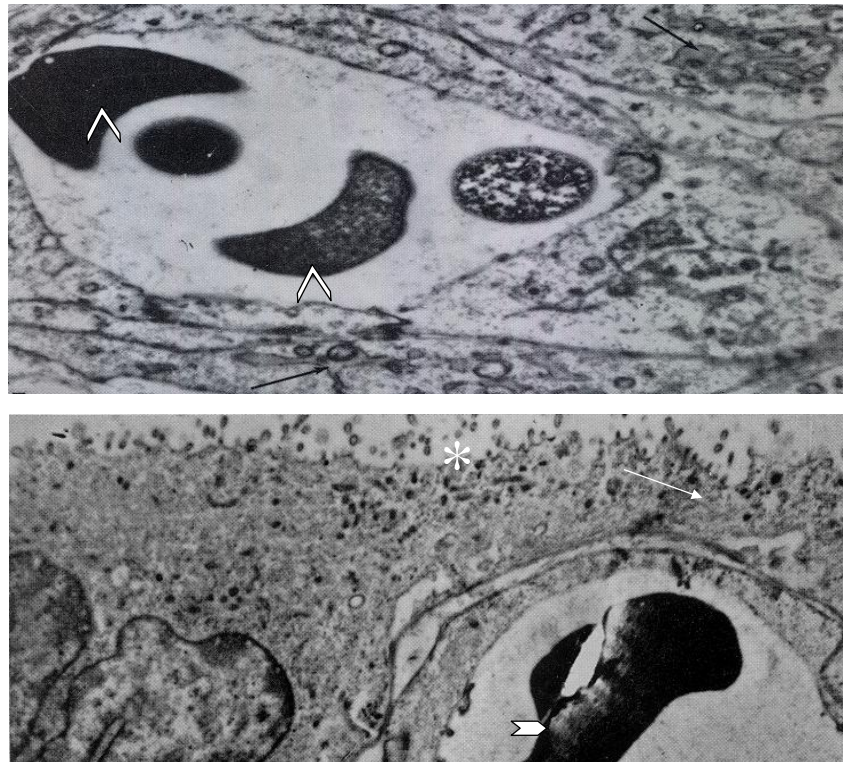


FIGURA III.9. Microscopía electrónica de corte fino de un capilar presente en la placenta humana. En el panel superior a las 9 semanas de gestación se observan 2 eritrocitos dentro del capilar (cabeza de flecha), así como células del mesenquima por arriba y abajo del capilar (flechas). En el panel inferior en la placenta humana a término se aprecia como el capilar fetal que contiene un eritrocito (cabeza de flecha), se ubica a muy corta distancia del espacio intervilloso (asterisco), en la región donde el sincitiotrofoblasto es más delgado (flecha). Tomada de WISLOCKI, 1955.

Todas las sustancias que entran o salen de la sangre fetal deben de atravesar el sincitiotrofoblasto. Para ello existen dos rutas. La primera consiste en cruzar por la vía transcelular lo que requiere que la sustancia en cuestión sea liposoluble y por lo tanto sea apta para atravesar las membranas plasmáticas del sincitiotrofoblasto, o bien, que cuente con un mecanismo de difusión de la membrana, tal como, canales, acarreadores, bombas, etc. La segunda ruta radica en el tránsito de la sustancia o ion a través de la vía paracelular, es decir por el espacio intercelular localizado entre una célula sincitial y su vecina.

En las células epiteliales y endoteliales el tránsito por la ruta paracelular es controlado por la unión estrecha (UE). En el caso del sincitio placentario humano se desconocía hasta antes de realizar este trabajo, el grado de sellado de sus UE y se ignoraba la composición molecular de las mismas.

2.4. Irrigación uterina

El endometrio y miometrio reciben su principal aportación de sangre de las arterias uterinas, las cuales emiten ramificaciones que penetran al miometrio donde forman una arcada, las arterias arcuatas, de esta unión se forman las arterias radiales que se ramifican en las arterias basales y espirales (Brosens et al. 1972).

Durante el primer trimestre del embarazo, los vasos invadidos por trofoblasto sufren distensión, convirtiéndose en vasos dilatados y tortuosos que se abren al espacio intervelloso. Estas arterias útero-placentarias, pierden la capacidad de respuesta a las influencias vasomotoras porque pierden tejido muscular elástico e inervación, lo que ocasiona una menor resistencia y un incremento en el flujo sanguíneo, así como una presión menor de pulso dentro del espacio intervelloso y a través de este. La placenta recibe sangre de más de 100 arterias útero-placentarias.

Durante el desarrollo de la placenta y del espacio intervelloso, ocurre una invasión de los vasos deciduales y miometriales por el trofoblasto. La migración del trofoblasto dentro de las arterias espirales ocurre en dos etapas:

Primera. Se presenta cuando las arterias espirales se comunican con el espacio intervelloso. Esto sucede cerca de la semana 6 de gestación y continúa hasta la semana 12. En esta etapa durante este tiempo el segmento decidual de las arterias espirales son gradualmente convertidas en arterias placentarias.

Segunda. Inicia alrededor de la semana 16 de gestación, cuando el segmento miometrial de las arterias espirales es colonizado por el trofoblasto. La función de la invasión trofoblástica es realizar cambios en las paredes de las arterias invadidas para convertirlas en arterias útero-placentarias. El trofoblasto penetra a las paredes de los vasos a través del endotelio y capa íntima hasta la capa media muscular donde se deposita material fibrinoide (Khong et al. 1986).

En la preeclampsia el citotrofoblasto no se diferencia de manera normal. Así, su membrana basal aparece irregularmente delgada con inclusiones de fibrina, en consecuencia falla la invasión normal del útero. Anormalidades semejantes en el citotrofoblasto se pueden generar cultivando a estas células en ambientes hipoxicos (Genbacev et al. 1996). Por ello se cree que los cambios en el sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto observadas en la preeclampsia son secundarios a la pobre perfusión placentaria que se presenta en este padecimiento (Genbacev et al. 1996).

Estos cambios inducidos por hipoxia indican que el daño endometrial en una primera etapa está confinado a la vasculatura placentaria y que posteriormente se transforma en un daño endotelial generalizado.

2.5. Placentación humana anormal en la preeclampsia.

En la preeclampsia, la invasión del útero por el citotrofoblasto es poco profunda y la endovascular no avanza más allá de las porciones terminales de las arterias espirales (Robertson et al. 1967). Cuando se estudia en detalle las interacciones entre las células del citotrofoblasto y los vasos uterinos, se observa que aún cuando las células del citotrofoblasto llegan a la luz del vaso no forman agregados densos entre ellas ni se extienden hacia la pared vascular, como se observa en muestras de testigos de edad gestacional comparables. En su lugar, tienden a mantenerse como células individuales redondeadas, lo que sugiere que están poco ancladas a la pared vascular. Así, las células del citotrofoblasto en la preeclampsia no sólo tienen una capacidad limitada de invasión endovascular, sino que también muestran una morfología alterada en sus interacciones con las arteriolas maternas (Figura III.10 y 11).

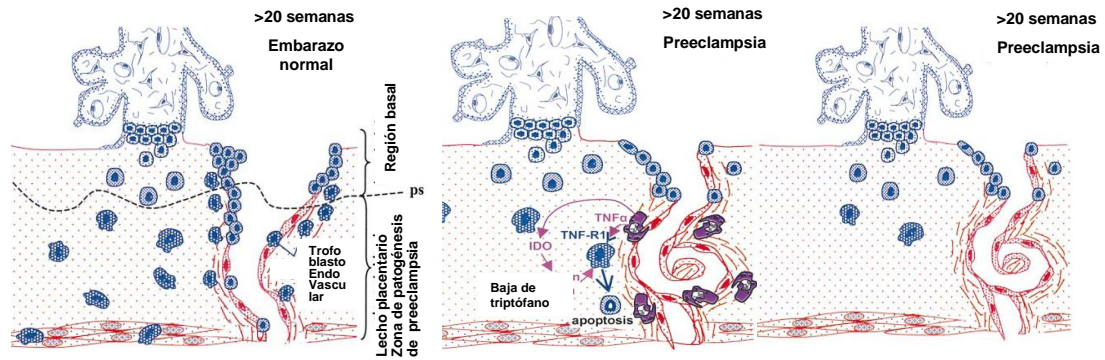


Figura III.10. Esquema de invasión intersticial y endovascular en el embarazo humano después de las 20 semanas de gestación. A) Embarazo normal, note la dilatación del vaso, B) Observe como en la preeclampsia se activan los macrófagos que liberan $TNF\alpha$ e Indolamina (IDO) que cataboliza el triptófano local e induce la apoptosis, C) La invasión trofoblástica endovascular en la preeclampsia se limita a la superficie y el diámetro del vaso se reduce. Tomado de Kauffman, 2003.

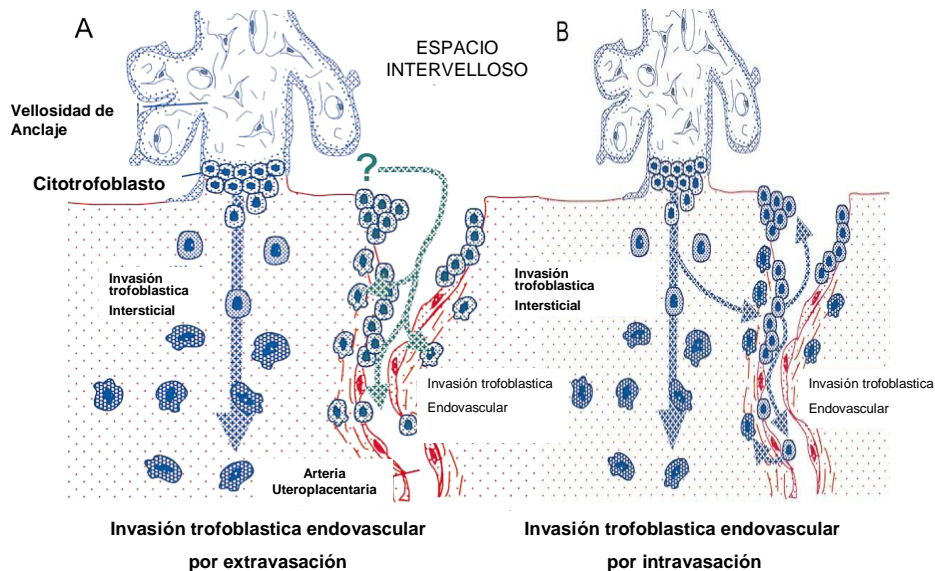


Figura III.11 Ruta hipotética de la invasión trofoblástica endovascular. A, la invasión trofoblástica se realiza por vía de la luz vascular; B, la invasión vascular se realiza a través de las células de la columna por vía intersticial. Tomado de Kauffman, 2003.

Debido a estas alteraciones en la invasión endovascular, los vasos maternos en la preeclampsia no presentan la variedad completa de cambios fisiológicos normales como la pérdida del revestimiento endotelial y del tejido músculoelástico. El diámetro externo promedio de los vasos miometriales de pacientes con preeclampsia es menor de la mitad del de vasos similares de embarazos sin complicación (Brosens et al. 1972; Gerretsen et al. 1981; Moodley and Ramsaroop 1989). Además, no tantos vasos muestran invasión citotrofoblástica (Khong et al. 1986). Así, la arquitectura de los vasos impide una

respuesta adecuada a las demandas fetales de un mayor riego sanguíneo vinculadas con la gestación.

2.6. Proliferación y diferenciación in vitro del citotrofoblasto humano

En el embarazo normal las células del citotrofoblasto invaden arteriolas de gran calibre, donde entran en contacto con sangre materna bien oxigenada. En cambio, en la preeclampsia, las células invasoras del citotrofoblasto están relativamente hipóxicas. Otra consideración importante es que el riego sanguíneo placentario cambia mucho en las etapas tempranas del embarazo. Así, en el primer trimestre hay poca invasión endovascular, por lo que el riego sanguíneo de la placenta es mínimo. Las presiones de oxígeno en el espacio intervelloso y dentro del endometrio, son de 18 y 40 mm Hg respectivamente entre las 8 y 10 semanas de gestación (Rodesch et al. 1992). Más tarde, la invasión endovascular avanza rápidamente y entonces las células del citotrofoblasto entran en contacto directo con la sangre de las arteriolas espirales maternas, que pueden tener una presión promedio de oxígeno de hasta 90 a 100 mmHg. Así, conforme las células del citotrofoblasto invaden el útero en la primera mitad del embarazo, encuentran un gradiente cada vez mayor de presión positiva. Estas observaciones, junto con los resultados obtenidos con células del citotrofoblasto aisladas, sugieren que la presión de oxígeno puede regular la proliferación del citotrofoblasto y su diferenciación en la vía invasora (Genbacev et al. 1997).

2.7. Modulación del repertorio de moléculas de adhesión de los citotrofoblastos invasores, para simular el de células vasculares, en el embarazo normal.

Conforme se diferencian las células del citotrofoblasto se produce una disminución de los receptores de adhesión característicos de las células epiteliales como la integrina $\alpha 6\beta 4$ y la E-cadherina. Así mismo, se incrementan los receptores que se expresan en las células endoteliales como integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ y VE-cadherina.

Estas observaciones sugieren que las células normales del citotrofoblasto sufren un cambio en el fenotipo para simular a las células endoteliales a las que sustituyen durante la invasión endovascular (Damsky et al. 1992)

La invasión de las células del citotrofoblasto es tan extensa que las arteriolas espirales se convierten en estructuras híbridas en las que las células del citotrofoblasto sustituyen al endotelio materno y gran parte de la túnica media muscular. En consecuencia, el diámetro de las arteriolas espirales aumenta en forma notoria y permite que el flujo sanguíneo a la placenta corresponda al crecimiento fetal. Las moléculas de adhesión parecen tener una función importante en la formación de las nuevas interacciones vasculares. En el ratón, por ejemplo, la mutación puntual de la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM-1) o la expresión de la subunidad $\alpha 4$ de la integrina bloquea la fusión corioalantoidea. Además es importante destacar que las células del citotrofoblasto son las únicas, además del endotelio, en expresar VE-cadherina. Dicha cadherina y la molécula de adhesión de células endoteliales PECAM-1, son los primeros receptores de adhesión que se expresan en las células endoteliales diferenciadas durante el desarrollo temprano y la expresión de $\alpha V\beta 3$ aumenta en células endoteliales durante la angiogénesis. Así, se concluye que las moléculas de adhesión que tienen participación vital en la diferenciación y expansión de la vasculatura se expresan conforme las células normales del citotrofoblasto se diferencian e invaden (Zhou et al. 1997).

En la preeclampsia se altera la capacidad de las células del citotrofoblasto de expresar moléculas de adhesión presentes durante el embarazo normal en la transformación del epitelio vascular (Zhou et al. 1997). Por ejemplo en la preeclampsia persiste una fuerte tinción de E-cadherina y en cambio esta ausente la marca de VE-cadherina en las células del citotrofoblasto de las columnas y la decidua superficial.

Estos resultados sugieren que la incapacidad de las células del citotrofoblasto de expresar moléculas de adhesión de tipo vascular en la preeclámpsia, altera su capacidad de formar conexiones con los vasos uterinos. Este fracaso limita el aporte de sangre materna a la placenta y al feto.

CAPITULO III: LAS UNIONES ESTRECHAS.

La sabiduría es la hija de la experiencia.
Leonardo Da Vinci.

3.1. Los epitelios

En los organismos multicelulares los epitelios constituyen la frontera entre el individuo y el medio ambiente. Los epitelios y endotelios constituyen tejidos en los que las células se encuentran estrechamente unidas entre sí y a su sustrato mediante las uniones intercelulares. Estas uniones, permiten que los epitelios que cubren todas las cavidades y superficies libres del cuerpo, formen barreras que limitan el movimiento de agua, solutos y iones de un compartimiento del cuerpo a otro (Tsukita et al. 2001a).

Uno de los eventos más tempranos durante el desarrollo embrionario es la formación de células epiteliales polarizadas. Estas células juegan un papel fundamental en coordinar la arquitectura estructural del embrión y de los órganos individuales.

Las células epiteliales se caracterizan por: Tener uniones estrechas y estar polarizadas.

La polarización establece en la célula epitelial dos dominios, estructural, fisiológica y bioquímicamente diferentes (Cereijido et al. 1989). El dominio apical o luminal, orientado hacia el medio externo y el basolateral dirigido hacia el compartimiento intersticial. Estos dos dominios están separados por las Uniones Estrechas (UEs) en vertebrados o uniones septadas en los invertebrados. La polarización es de suma importancia ya que permite el tránsito vectorial de iones y moléculas a través de los epitelios. Así por ejemplo el Na^+ entra a la célula por medio de un canal de sodio sensible a amilorida ubicado en la cara apical, y del citoplasma pasa al espacio intercelular por medio de la acción de la $\text{ATPasa Na}^+-\text{K}^+$, ubicada en la membrana basolateral, que saca al Na^+ del interior celular e introduce K^+ a la célula. La distribución polarizada de proteínas entre las membranas apical y basolateral es el

resultado de las señales de direccionamiento presentes en las proteínas. Sin embargo, el mantenimiento de la polaridad se debe a la presencia de las UEs (Cereijido et al. 1993).

3.2. Morfología y Función de la UE

La UE rodea a la célula a manera de cinturón y se localiza justo en el límite entre las membranas apical y basolateral. Allí actúa como una barrera de difusión que regula el paso de iones y moléculas por el espacio intercelular, también llamada ruta paracelular, esta función se denomina de compuerta. La UE también participa en el mantenimiento de la polaridad celular ya que esta función se denomina de cerca.

La UE mediante microscopía electrónica de corte fino se observa como una serie de contactos puntuales de la membrana plasmática, donde las caras externas de las membranas adyacentes de células vecinas convergen y parecen fundirse (“puntos de fusión” o “kissing points”), obliterando el espacio intercelular (Tsukita et al. 2001b). (Figura IV.1).

Cuando se observa por criofractura, la UE (Figura IV.2) aparece como una serie de filamentos que circundan a la célula por debajo de las microvellosidades apicales en la cara protoplasmática (P) y de surcos complementarios en la cara exoplasmática (E) que se entrecruzan formando una red (Gonzalez-Mariscal et al. 2001), (Chalcroft and Bullivant 1970), (Tsukita and Furuse 1999). Se sabe que existe una correlación cuantitativa entre el número de filamentos y la resistencia eléctrica transepitelial (RET), ya que esta aumenta de manera exponencial con el número de filamentos (Claude 1978).

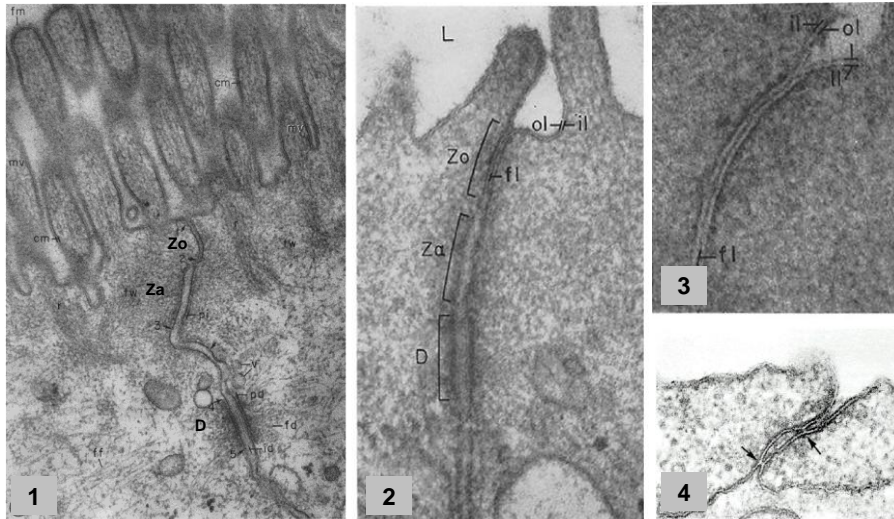


Figura IV. 1. Complejo de Unión de células epiteliales. Microscopía electrónica de corte fino 1, célula intestinal; 2, célula vesical; 3 y 4, detalle de la unión estrecha donde se aprecia la aparente fusión de membranas; 4, se detallan los puntos de fusión (flechas). Zo, Zonula ocluyente –unión estrecha-; Za, Zonula adherente; D, desmosoma. Tomado de Farquhar y Palade, 1963.

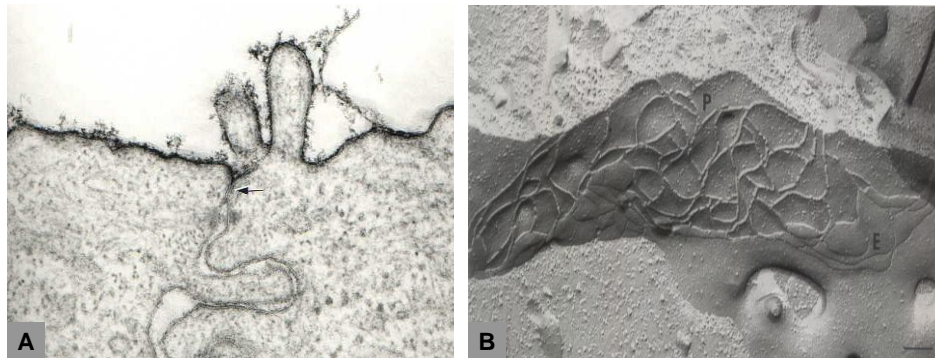


Figura IV. 2. Microscopía electrónica de la UE en células epiteliales MDCK. A, corte fino de una monocapa tratada con rojo de rutenio. La flecha indica la localización de la UE. Observe como esta estructura bloquea el paso del material electrodenso a través de la ruta paracelular. Tomado de González-Mariscal, 1985. En B, imagen de una réplica de criofractura de la UE, donde se aprecia la red de filamentos en la cara protoplasmática (P) y los surcos complementarios en la cara exoplasmática (E). Escala = 100 nm. Tomado de González-Mariscal, 2003.

El transporte a través de la UE es pasivo, guiado por gradientes electro-osmóticos y muestra una discriminación de carga iónica y tamaño. La conductividad es variable entre las UEs, así existen uniones permeables y bien selladas con diferencias de hasta por tres órdenes de magnitud, dependiendo del tejido epitelial en que se encuentren.

3.3. Composición Molecular de la Unión Estrecha.

A nivel molecular, la UE esta integrada por un conjunto complejo de proteínas. Algunas de ellas son transmembranales y a través de sus segmentos extracelulares establecen el contacto célula-célula. Estas proteínas al carecer de actividad enzimática, no pueden enviar mensajes de la membrana al interior celular, por lo que esta función se suple con la presencia de múltiples proteínas adaptadoras que se localizan en la región citosólica de la UE. Estas proteínas unen a las proteínas integrales de la UE entre si ó al citoesqueleto de actina. En la región submembranal de la UE han sido identificadas más de 16 proteínas diferentes, que ha su vez se asocian a supresores tumorales, factores de transcripción y proteínas implicadas en el transporte vesicular (Gonzalez-Mariscal et al. 2003) (Figura IV. 3).

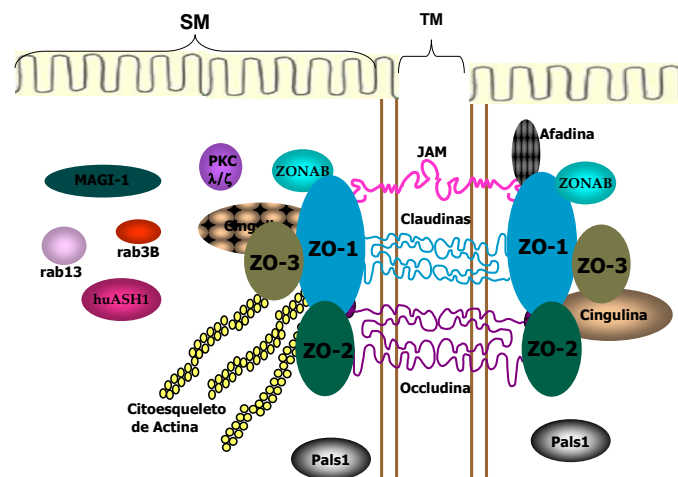


Figura IV. 3. Representación esquemática de la organización molecular de la unión estrecha. Observe las principales proteínas que constituyen los dominios estructurales transmembranal TM y submembranal SM.

3.3.1. Proteínas transmembranales de la UE.

Se han identificado tres grupos de proteínas integrales en la UE: la occludina, las claudinas y las JAMs. Las dos primeras constituyen los filamentos de la UE, (Furuse et al. 1998b; Morita et al. 1999a) (Figura IV. 4) mientras que las JAMs, son importantes para la diapédesis que efectúan los linfocitos, neutrófilos y células dendríticas de los vasos linfoides y sanguíneos hacia los tejidos.

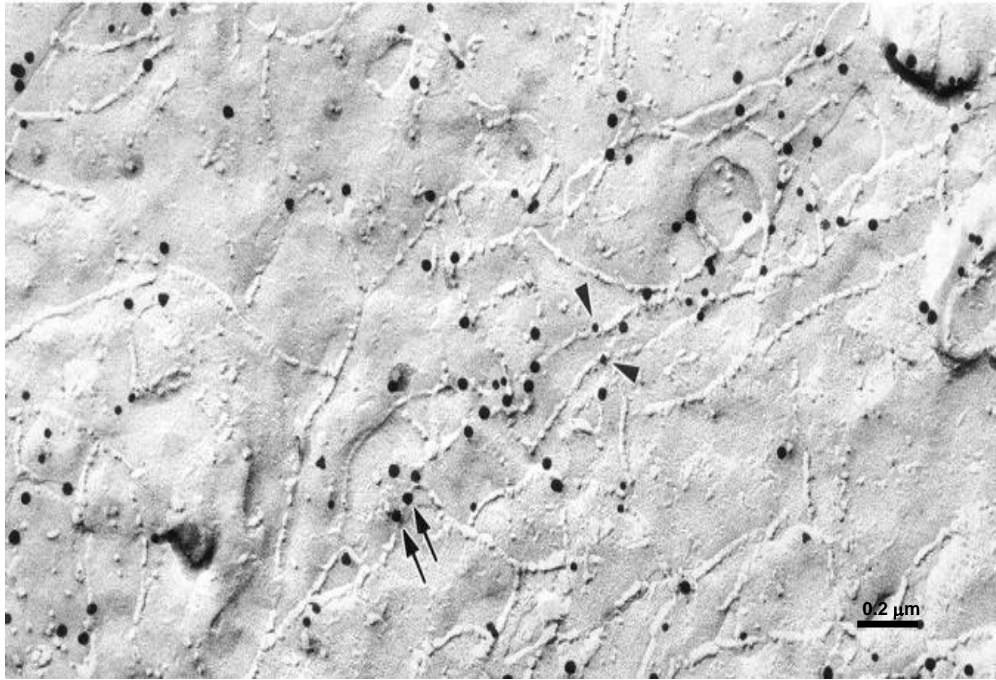


Figura IV. 4. Componentes de los filamentos de la unión estrecha. Imagen de una réplica de criofractura donde se observa en un fibroblasto cotransfectado con una marca de partículas de oro a occludina (flechas) y Claudina-1 (Cabeza de flechas) que copolimerizan en los filamentos de la UE. Tomado de Furuse, 1998.

A. Occludina. El nombre de la proteína deriva de la palabra en latín “occludere” que significa ocluir (Furuse et al. 1993). Fue la primera proteína transmembranal e integral de la UE en ser identificada. Es una fosfoproteína de 65 kDa, constituyente de los filamentos de la UE, y que se expresa tanto en células epiteliales como endoteliales.

A.1. Estructura: La occludina es una tetrasparina ya que atraviesa 4 veces la membrana plasmática (Balda and Matter 2000b). Tiene cuatro dominios transmembranales y dos asas extracelulares. Sus extremos amino y carboxilo están dirigidos hacia el citoplasma. Sus dos asas extracelulares poseen 44 y 45 residuos de aminoácidos respectivamente. La primer asa es rica en glicina y la segunda rica en tirosina (Figura IV.5) y su fosforilación se incrementa significativamente durante la formación de las uniones estrechas (Sakakibara et al. 1997).

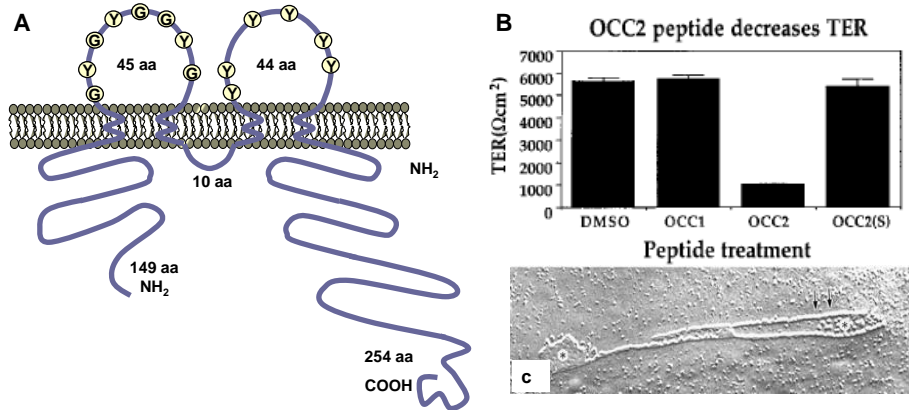


FIGURA IV. 5. Representación esquemática de Occludina. A, observe el dominio extracelular con la primera asa rica en glicina y la segunda rica en tirosina, el extremo carboxilo es mas largo que el amonio ambos dirigidos al citosol. B, al incubar con péptidos sintéticos de la segunda asa, observe como cae la resistencia transepitelial. Tomado de Wong 1997. En C, imagen de una réplica de criofractura donde se observa un filamento de occludina (flechas) en la cara P de un fibroblasto transfectado. Tomado de Furuse, 1998.

La occludina establece interacciones homotípicas a través de sus asas extracelulares (Van Itallie and Anderson 1997) (Wong and Gumbiner 1997). También interactúa con la claudina-1 a través de la región central de su segunda asa. A través de los últimos 150 aminoácidos de su extremo carboxilo terminal orientado hacia el citoplasma la occludina interactúa con las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 así como con el citoesqueleto de actina (Wittchen et al. 1999; Haskins et al. 1998; Itoh M 1999).

A.2. Función: La interacción occludina-occludina (Nusrat A 2000) en el espacio intercelular es crucial para mantener la barrera de difusión paracelular de los epitelios. Por ejemplo, se ha encontrado cuando se incuban células epiteliales con péptidos sintéticos que corresponden a los dominios extracelulares de la occludina, disminuye la RET y aumenta el flujo paracelular de moléculas no cargadas (Tsukita et al. 2001c) (Lacaz-Vieira et al. 1999) (Wong and Gumbiner 1997)(Figura IV.5).

La expresión de occludina está relacionada con el nivel de resistencia transepitelial (RET) que desarrolla un tejido. Por ejemplo, las células endoteliales de cerebro que tienen una elevada RET, expresan altos niveles de occludina, en cambio, las

células endoteliales de aorta, que forman UEs con muy baja resistencia, apenas y presentan occludina (Hirase et al. 1997).

Así mismo, en la nefrona del mamífero la expresión de occludina aumenta conforme se incrementa la RET y la complejidad de la UE de los diferentes segmentos tubulares (Gonzalez-Mariscal et al. 2000b), así la expresión de occludina es menor en los túbulos proximales que en los túbulos colectores. En el caso del árbol vascular placentario se ha observado que la expresión de occludina es intensa en los vasos gruesos y es un cambio indetectable en los capilares terminales (Leach et al. 2000).

Otras evidencias que ponen de manifiesto la importancia de la occludina en la estructura y función de las UEs son las siguientes:

A) En células no epiteliales como los fibroblastos que no expresan occludina y carecen de UEs (Saitou et al. 1997), su transfección genera la aparición de filamentos de la UE que pueden observarse por crío-fractura (Furuse et al. 1998b).

B) Cuando las células epiteliales se transfectan con una occludina mutante que carece del dominio N-terminal, disminuye la RET y aumenta el flujo paracelular de moléculas no cargadas (McCarthy et al. 1996). Así mismo, cuando se sobreexpresa una occludina mutante que carece del dominio C-terminal, aumenta la RET y paradójicamente también el flujo paracelular (Balda et al. 1996b).

A pesar de estos resultados que evidencian la importancia de la occludina en la estructura y función de las UEs, se encontró que los ratones Knock-out (KO) de occludina sí tienen UEs y que estas son funcionales. Estos ratones KO, sin embargo, desarrollaron calcificaciones en el cerebro y alrededor de los vasos cerebrales, retraso del crecimiento postnatal, atrofia testicular, anormalidades en la conducta sexual, así como, inflamación crónica e hiperplasia del epitelio gástrico. (Ver Figura IV. 6 y 6A) (Saitou et al. 2000). Lo anterior pone de manifiesto que el papel de la occludina es más

complejo de lo que se había supuesto y que probablemente también esta involucrada en el control de la proliferación celular. A este respecto es pertinente comentar que la administración en forma continua a cultivos celulares del péptido de occludina correspondiente a la segunda asa genera un crecimiento celular descontrolado que da lugar a cultivos multiestratificados constituidos por células despolarizadas (Vietor et al. 2001).

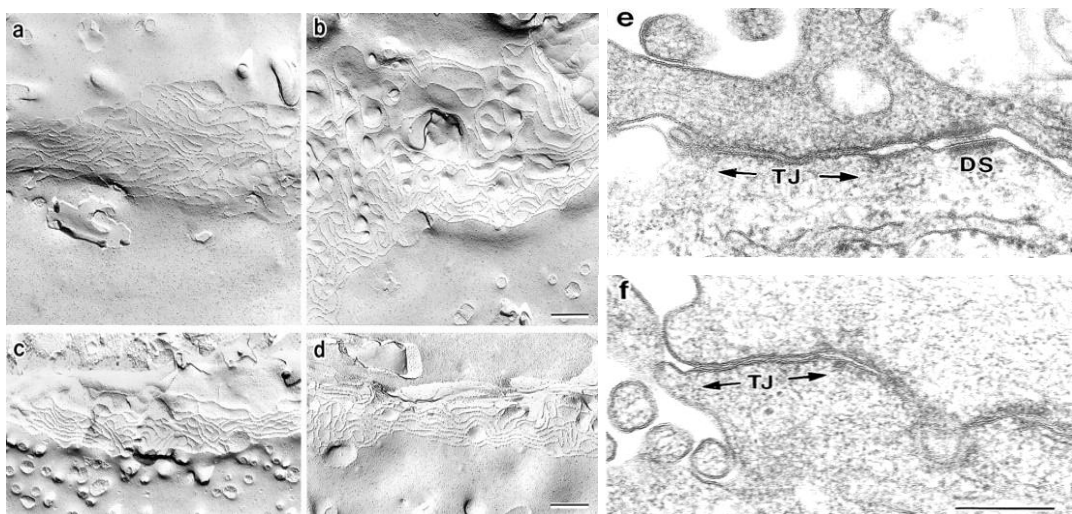


Figura IV. 6. Células STEM Knock-out de occludina tienen UE funcional. Imagen de una réplica de criofractura (a-d) donde se observan filamentos de UE; Microscopia electrónica de corte fino (e, f) donde se aprecia la UE (TJ). Tomado de Saitou 2000.

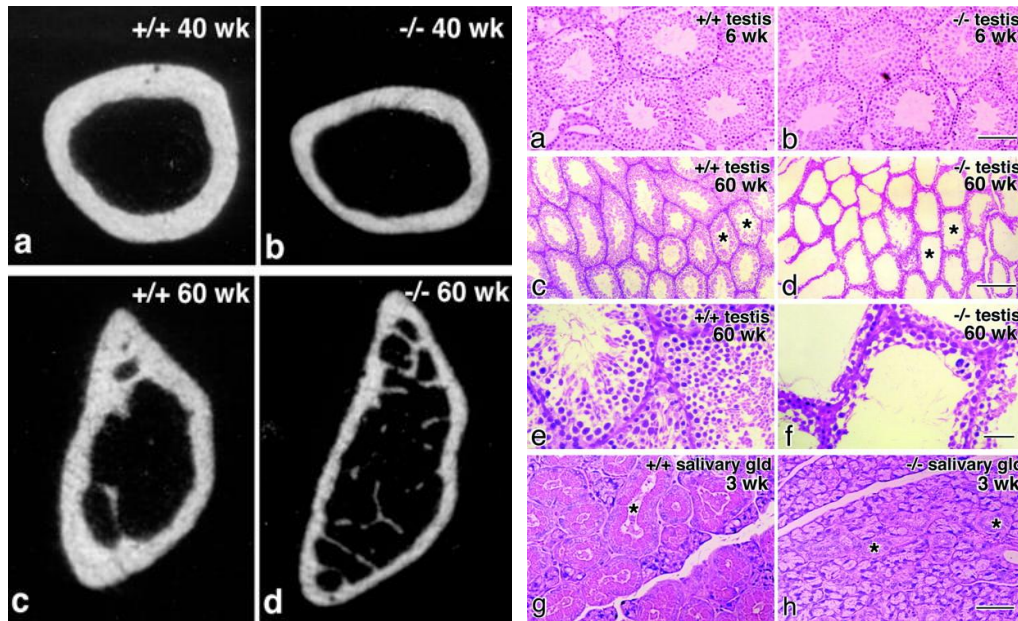


Figura IV. 6A Resultado histopatológicos del Knock-out de occludina en ratón. En el panel izquierdo corte óseo normal (a, c) y sin occludina (b, d), observe disminución del espesor del tejido. En el panel derecho cortes teñidos con hematoxilina de testículo (a-f) normal (a, c, e) y sin occludina (b, d, f); corte de glándula salival normal (g) y sin occludina (h), observe el edema de tejidos. Tomado de Saitou 2000.

B. Claudinas.

Su nombre proviene del latín “*claudere*”, que significa cerrar, en referencia a la función de la UE de bloquear el paso de moléculas por la ruta paracelular. Constituyen una familia de proteínas tetraspan integrada por más de 20 miembros. Pesa entre 20 a 27 kDa y presentan el motivo conservado WGLWCC en la primera asa. Las claudinas junto con la occludina forman los filamentos de la UE (Furuse et al. 1998b; Morita et al. 1999a).

Las primeras claudinas fueron identificadas en preparaciones de hígado de pollo enriquecidas en UEs y se denominaron claudina-1 y 2 (Furuse et al. 1998a)

Posteriormente, se buscaron moléculas homologas en bases de datos de ADN complementario y genómico. Así se lograron identificar a los restantes 22 miembros la familia de las claudinas (Tsukita et al. 2001d).

La expresión de las claudinas varía en los diferentes tejidos y etapas de desarrollo. Así por ejemplo la claudina 1 se expresada conspicuamente en diferentes tejidos, mientras que la claudina 16 es exclusiva de la porción ascendente gruesa del asa de Henle. Por otro lado, mientras que algunos tejidos y líneas celulares expresan varias claudinas, otras las células de Sertoli expresan únicamente a la claudina 11.

En la tabla IV.1 se resumen las características distintivas de diferentes claudinas.

B.1. Estructura:

Las claudinas poseen 4 dominios transmembranales y dos asas extracelulares. Su estructura general se diferencia de la de occludina en que en las claudinas la primera asa extracelular es más larga que la segunda (41-55 aa Vs 10-21 aa) y en que ambas asas contienen residuos cargados. Esta última característica es sumamente importante pues la carga de los aminoácidos (aa) presentes en la primera asa determina la selectividad iónica de la ruta paracelular (Rahner et al. 2001b).

La cola citoplásmica de las claudinas es de 21-44 aa notoriamente más pequeña que la de occludina. Los últimos aa del extremo carboxilo están muy conservados entre los diferentes miembros de esta familia y constituyen sitios de reconocimiento (motifs) para dominios PDZ's. Estos son dominios de interacción proteína-proteína presentes en múltiples proteínas incluidas la mayoría de componentes periféricos de la UE (Figura IV.7).

CLAUDINA	CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS
1	Se presenta en epitelios de alta RET (p. ej. segmento colector del riñón) y está ausente en epitelios de baja RET (p. ej. túbulo proximal renal) y en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de seno. Responsable de la barrera epidermal de los mamíferos.
2	Se presenta en epitelios de baja RET y está ausente en epitelios de alta RET. Su sobre-expresión disminuye la RET y aumenta la permeabilidad a los cationes (Amasheh, 2002; Van Itallie, 2003). Presente en el epitelio del plexo coroideo.
3	También se conoce como RVP1, pues su expresión se eleva en la regresión ventral de la próstata y en los adenocarcinomas prostáticos. Se presenta en los segmentos con mayor RET de la nefrona. Se une a la toxina de <i>Clostridium perfringens</i> (CPE).
4	También se conoce como receptor para la CPE. Se presenta en los segmentos con mayor RET de la nefrona. Su expresión incrementa la RET y disminuye selectivamente la permeabilidad paracelular de Na ⁺ (Van Itallie, 2001; Colegio, 2002; Van Itallie, 2003) Se sobre-expresa en tumores pancreáticos y gastrointestinales.
5	También se conoce como TMVCF, ya que está deletada en pacientes con el síndrome velo-cardio-facial. Constituyente esencial de las UE de las células endoteliales. Se expresa transientemente durante el desarrollo del epitelio pigmentario de la retina. Su ausencia genera un incremento en la permeabilidad paracelular (Nitta, 2003).
6	Se expresa en el epitelio embrionario. Su sobre-expresión en ratones transgénicos hace que la epidermis pierda su hermeticidad y el animal muera a las pocas horas del nacimiento.
7	Su expresión se encuentra disminuida en células escamosas de carcinomas de cabeza y cuello.
8	Se presenta en los segmentos con mayor RET de la nefrona.
11	Se conoce alternativamente como OSP, pues está presente en los oligodentrocitos. También se expresa intensamente en las células de Sertoli. Su expresión disminuye selectivamente la permeabilidad paracelular de Na ⁺ (Van Itallie, 2003) Su ausencia genera en los ratones, machos estériles y con parálisis de las patas traseras.
14	Se expresa en el epitelio sensorial del órgano de Corti. Mutaciones en este gen alteran la permeabilidad iónica en las células pilosas de la cóclea, lo que causa sordera autosómica recesiva (Ben Yosef, 2003).
15	Se presenta en células endoteliales. Su expresión incrementa selectivamente la permeabilidad paracelular de Na ⁺ (Colegio, 2002; Van Itallie, 2003).
16	También se conoce como Paracelina-1. Constituye un canal selectivo para Mg ²⁺ y Ca ²⁺ . En humanos, las mutaciones en este gen causan hipomagnesemia con hipercalcinuria y nefrocalcinosis; y en el ganado originan nefritis intersticial crónica (Hirano, 2000; Hirano, 2002).
18	Se expresa en pulmón y estómago
19	Sella los contactos en las células de Schwann de axones aislados

TABLA IV.1 CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CLAUDINAS.

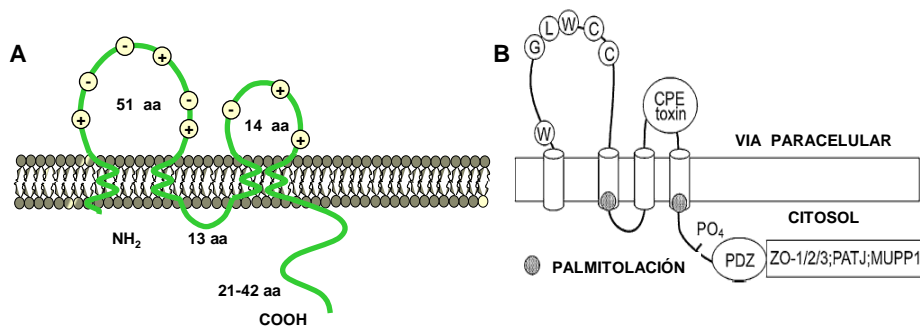


FIGURA IV. 7. Representación esquemática de las Claudinas. A, observe el dominio extracelular con la primera asa mas grande que la segunda y ambas asas con carga. B, modelo estructural y funcional donde se aprecian en la primera asa los residuos altamente conservados W-GLW-CC, así como el sitio de fosforilación y unión a PDZ en su cola C-terminal.

Así, a través de estos motivos las claudinas se unen a los dominios PDZs de ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Itoh et al. 1997;Itoh et al. 1999) , MUPP1 (Hamazaki et al. 2002) y PATJ (Roh et al. 2002a).

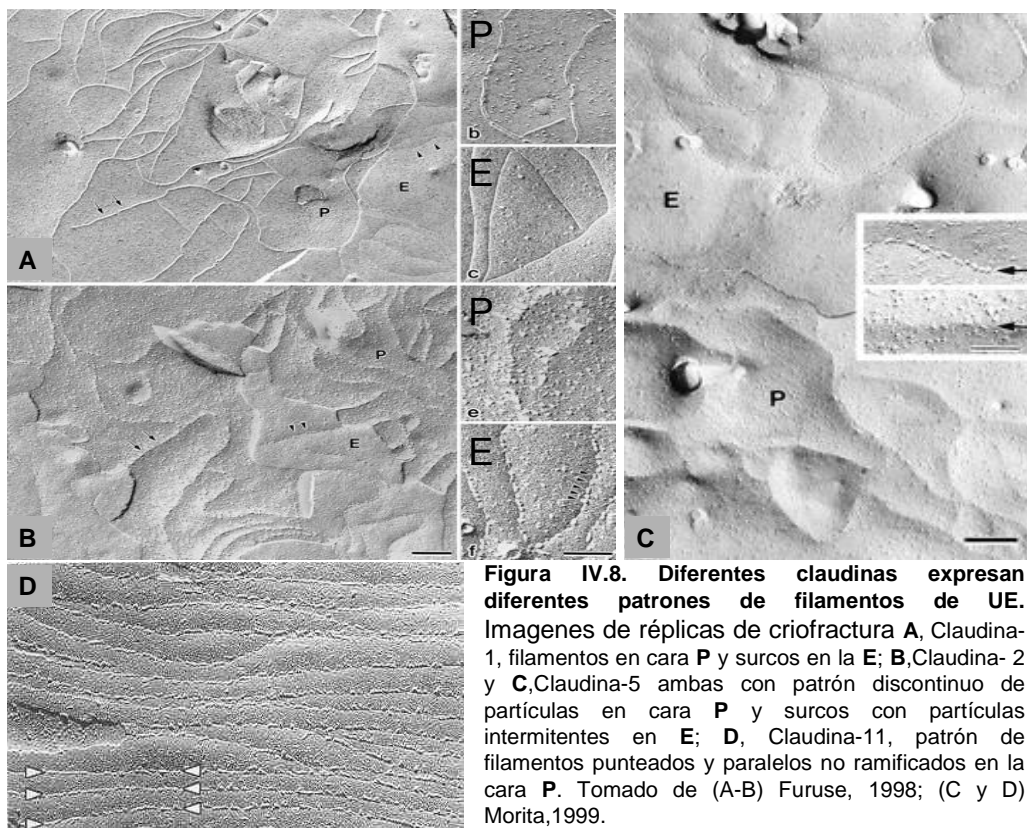
La mayoría de las claudinas contienen en su extremo carboxilo terminal sitios potenciales de fosforilacion en serina/treonina (Yamauchi K 2004). En células cancerosas de ovario se observa un incremento en la fosforilación de las claudinas 3 y 4 (D'Souza T 2005).

B.2. Las claudinas y su relación con los filamentos de la UE.

Las claudinas son los constituyentes principales de los filamentos de la UE ya que cuando se transfectan a celulas carentes de UE como los fibroblastos, forman redes de filamentos entrecruzados, morfológicamente semejantes a los vistos por criofractura en la UE de los epitelios nativos (Furuse et al. 1998b;Furuse et al. 1998a). Así mismo, cuando las criofracturas se analizan por inmunodeteccion con anticuerpos anti-claudinas acoplados a particulas de oro, se observa que éstos marcan a los filamentos de la UE (Morita et al. 1999a). La transfección de claudinas a fibroblastos, les confiere a estas celulas adhesión celular.

Los filamentos de la UE vistos por crío-fractura revelan patrones distintos dependiendo de las claudinas que se expresan en cada tejido (Furuse et al. 1998b;Furuse

et al. 1999). Por ejemplo, las claudinas 1 y 3 generan filamentos y surcos continuos en las caras P y E respectivamente. Mientras que las claudinas 2 y 5 forman un patrón discontinuo de particulas en lugar de filamentos en la cara P, y en la cara E generan surcos con hileras intermitentes de partículas (Furuse et al. 1999; Morita et al. 1999a), lo que sugiere una UE más permeable que la integrada por la de claudina 1. Por otro lado, la claudina-11 genera en la cara P un patrón de filamentos punteados, en paralelo y que no se ramifican (Morita et al. 1999b) (Figura IV.8).



Las claudinas pueden interactuar en el espacio intercelular entre ellas mismas, en una interacción homotópica, como es el caso de la interacción claudina 1 con claudina 1, o con otras claudinas, en una interacción heterotópica (Figura IV.9), como se da entre la claudina 1 con la claudina 3 (Furuse et al. 1999). Las claudinas polimerizan en el plano de la membrana tanto con claudinas de diferente tipo como con la ocludina. Esto

se observó en réplicas de criofractura, tratadas con anticuerpos anti-occludina y anti-claudinas acoplados a partículas de oro de diferentes tamaños (Furuse et al. 1998b) (Figura IV.4).

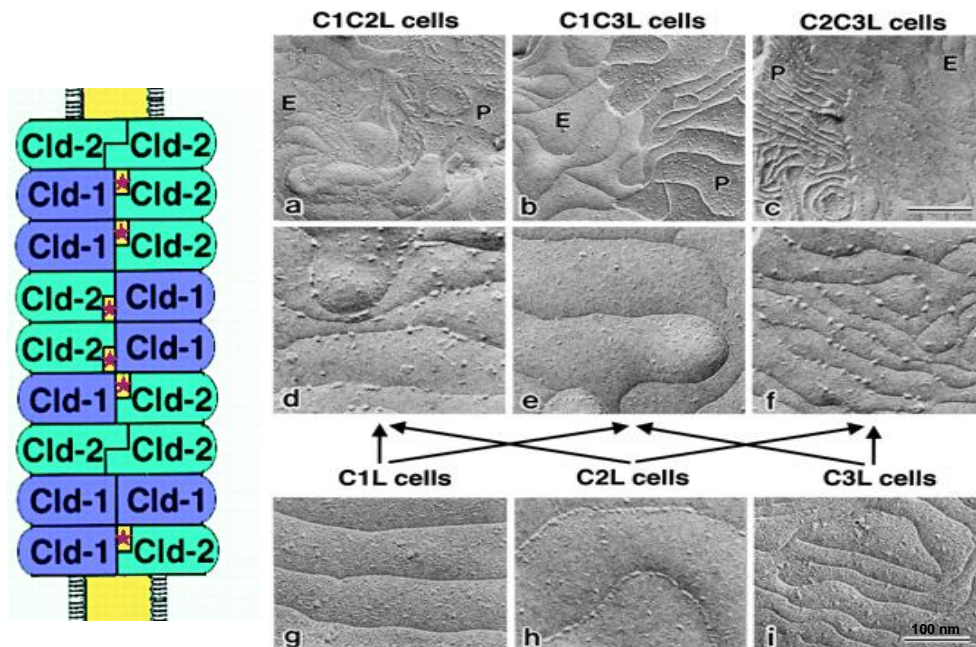


Figura IV.9 Diferentes claudinas pueden interactuar homotípica o heterotípicamente. Imágenes de réplicas de criofractura de fibroblastos cotransfectados. Compare los patrones de filamentos del panel derecho superior, con el inferior no cotransfectado. En la figura de la izquierda se representa esquemáticamente las interacciones heterotípicas entre claudina 1 y 2. Tomado de Tsukita 2000 (izq); Furuse 1999 (der).

Por otro lado, se ha demostrado que al transfectar fibroblastos con claudinas quiméricas construidas con las asas extracelulares de otras claudinas no se modifica el patrón de filamentos de la UE. Lo que indica que, el tipo de asociación de la claudina a las caras P y E de la membrana y su polimerización para formar redes, depende de la porción intracelular y transmembranal de la molécula (Colegio et al. 2003).

B.3. Las claudinas y su relación con la función de compuerta de la UE.

Una de las funciones fundamentales de la UE es la de compuerta que consiste en regular el paso de iones por la ruta paracelular. Las claudinas constituyen los canales iónicos que determinan la selectividad iónica de la UE (Wong and Goodenough 1999).

Las evidencias que llevan a este descubrimiento son las siguientes:

B.3.1. Estudios en líneas celulares.

A) En las células MDCK tipo II o de baja resistencia, la sobre-expresión de la claudina-1 aumenta la RET y reduce el flujo paracelular de moléculas (Inai et al. 1999). En contraste, la sobre-expresión de la claudina-2 en las células MDCK tipo I o de alta resistencia, disminuye la RET. Concluyendo que la claudina-2 forma canales permeables a iones. Posteriormente se demostró que la claudina 2 es selectiva a cationes (Amasheh et al. 2002; Furuse et al. 2001).

B) Cuando se sobre-expresan las claudinas 4 y 8 en las células MDCK II, se produce un aumento en la RET debido a una disminución en la permeabilidad paracelular de Na^+ (Van et al. 2001b) (Yu et al. 2003) (Van Itallie et al. 2003).

C) En la neurona de los mamíferos la claudina-2 solo se expresa en el tubulo proximal. Esta es una zona de baja RET y de un intenso transporte paracelular de cationes.

D) La transfección de diferentes claudinas a líneas celulares han revelado que las claudinas 2, 15 y 16 son selectivas a los cationes (Amasheh et al. 2002; Van Itallie et al. 2003; Simon et al. 1999), mientras que la sobre-expresión de las claudinas 4 y 11 disminuyen la selectividad al Na^+ (Van Itallie et al. 2003) (Van et al. 2001a) (Colegio et al. 2002).

E) Tanto la selectividad iónica como la RET parecen estar determinadas por la primer asa extracelular de las claudinas. Así cuando se transfectan claudinas quiméricas, se observó que si esta tiene la primer asa de la claudina-2 y el resto de la claudina-4 su selectividad y RET es como la de la claudina-2. Si al contrario tiene la primer asa de la claudina-4 y el resto de la molécula corresponde a la claudina 2, su selectividad y RET corresponde a la claudina 4 (Colegio et al. 2003).

Recientemente se ha observado que enfermedades humanas son resultados de mutaciones en los genes que codifican a varias claudinas (sobre todo 1,14 y 16), es decir, enfermedades por defectos de canales. Por ejemplo, la mutación del gen de claudina 1 ha sido reportada en niños con escaras de la piel y fibrosis progresiva y obstrucción de los ductos biliares también llamada colangitis esclerosante neonatal con ictiosis (Hadj-Rabia S 2004).

B.3.2. Estudios en humanos.

A) Mutaciones en la primera asa de la claudina-16 generó un cuadro clínico de hipomagnesemia con hipercalciuria y nefrocalcinosis (Simon et al. 1999), esta observación indicó que la claudina 16 es un canal que regula la selectividad al Mg^{++} y al Ca^{++} . Posteriormente se demostró que la claudina 16 se expresa selectivamente en la porción ascendente del asa de Henle. En este segmento se produce la reabsorción por vía paracelular del mismo porcentaje de Mg^{++} en el riñón. Así mismo, una mutación en el gen de claudina 16 presente en pacientes con una enfermedad conocida como hipercalciuria idiopática, impide la unión de la claudina 16 con el dominio PDZ de ZO1. Esta situación envía a la claudina 16 a degradación a los lisosomas (Muller et al. 2003).

B) Las mutaciones en la claudina 14 causan sordera. Se ha visto que la claudina-14 constituye la barrera paracelular que mantiene altos los niveles extracelulares de K^+ en las células pilosas del epitelio sensorial del órgano de Corti. Por ello se cree que al sufrir una mutación autosómica recesiva se altera la permeabilidad iónica en el oído, y se produce la sordera (Ben-Yosef et al. 2003a).

En la siguiente tabla IV.2, se presentan las características de los diferentes tipos de claudinas en relación con su permeabilidad iónica paracelular.

Claudina	Epitelio	Permeabilidad ionica paracelular	RET	Referencias
1	MDCK		↑	Inai T, et al. <i>Eur J Cell Biol</i> 78:849-55, 1999.
2	MDCK I	$K^+=Na^+ \gg Cl^- = Br^-$	↓	Amasheh, et al. <i>J Cell Sci</i> 115:4969-4976, 2002.
	LLC-PK	↑ Na ⁺		Van Itallie, et al. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i> 285:F1078-F1084, 2003.
4	MDCK II	↓ Na ⁺	↑	Van Itallie, et al. <i>J Clin Invest</i> 107:1319-1327, 2001.
5	MDCK II	↓ Na ⁺	↑	Wen, et al. <i>Mol Cell Biol</i> 24:8408-17, 2004.
7	LLC-PK	↑ Na ⁺	↑	Alexandre, et al. <i>J Cell Sci</i> 118:2683-93, 2005.
8 *	MDCK II	$Na^+=Li^+=K^+ > Rb^+ \gg Cs^+$	↑	Yu, et al. <i>Biol Chem</i> 278: 17350-17359, 2003.
11	MDCK II	↓ Na ⁺	↑	Van Itallie, et al. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i> 285:F1078-F1084, 2003.
14	MDCK	↓ Na ⁺	↑	Ben Yosef, et al. <i>Hum Mol Genet</i> 12:2049-61, 2003
15	LLC-PK	↑ Na ⁺	↓	Van Itallie, et al. <i>Am J Physiol Renal Physiol</i> 285:F1078-F1084, 2003.
16	Human	↑ Mg ²⁺ ↑ Ca ²⁺		Simon, et al. <i>Science</i> 285:103-106, 1999. Weber, et al. <i>J Am Soc Nephrol</i> 12:1872-1881, 2001

* ↓ Expresion de Claudina 2

Tabla IV.2. Diferentes tipos de claudinas y su relación con su permeabilidad iónica

B.3.3. Estudios en animales.

A) Los ratones Knock-out de claudina-1 y los transgénicos que sobre-expresan a la claudina-6 mueren a las 24 Hrs del nacimiento por deshidratación ocasionada por pérdida de agua a través de la piel. Esto indica que la claudina-1 es importante para la formación de la barrera epidermal mientras que la sobre-expresión de la claudina-6 impide el sellado correcto de la UE (Saitou et al. 2000;Turksen and Troy 2002) (Figura IV.10).

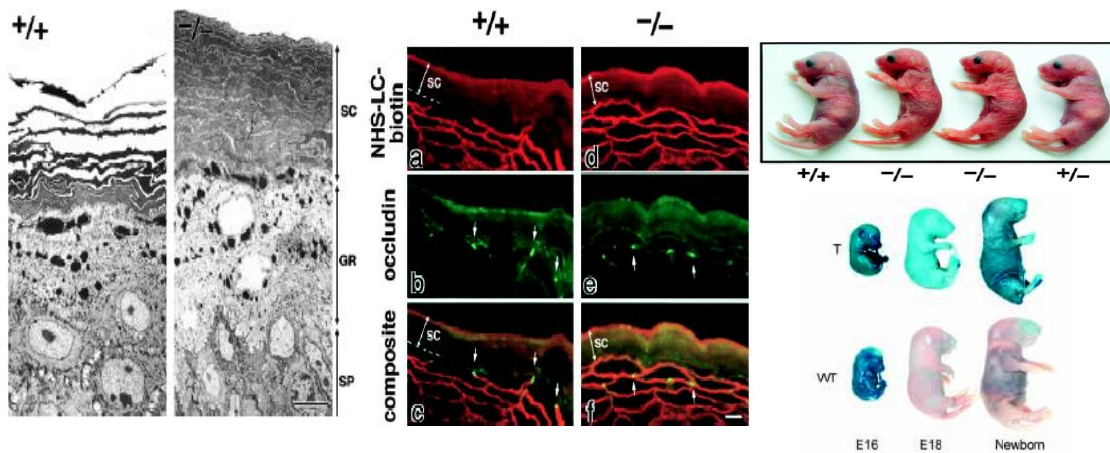


Figura IV.10. El Knock-out de Claudina 1 y la sobreexpresión de claudina 6 causa la muerte de ratones recién nacidos por deshidratación. En panel izquierdo se muestra un corte histológico de piel normal (+/+) y Knock-out de claudina-1 (-/-), observe el espesor del estrato corneo (SC), y la similitud del estrato granuloso (GR) y espinoso (SP). En el panel central observe como el marcador de vía paracelular (biotina) se detiene entre GR y SC a la altura de la UE, identificada con occludina en el ratón normal (+/+) y el paso del marcador hasta la capa externa de SC en el ratón -/-. En el panel derecho, observe en la parte superior el fenotipo de ratones Knock-out de claudina-1 (-/-) y sus controles (+/+); en la parte inferior ratones con sobreexpresión de claudina-6 (T) que muestran material de contraste en su piel durante su desarrollo y nacimiento, en sus controles (WT) únicamente se aprecia este en las primeras etapas del desarrollo (E16), no así en estadios posteriores (E18) y nacimiento. Tomado de Furuse, 2002 y Turksen, 2002.

B) En los ratones KO de claudina-11 se presenta un retraso en la velocidad de conducción eléctrica y debilidad en las patas traseras. Es probable que esto se deba a la ausencia de filamentos de UE en las vainas de mielina de los oligodendrocitos (primera evidencia del papel de claudinas como barrera en células no epiteliales). Estos ratones también presentan esterilidad debido a la falta de UEs en las células de Sertoli de los testículos (Gow et al. 1999).

C) Los ratones Knock-out de Claudina 14 tienen un fenotipo de sordera semejante al humano y en consecuencia proveen un modelo para estudiar esta patología (Ben-Yosef et al. 2003b) (Figura IV.11).

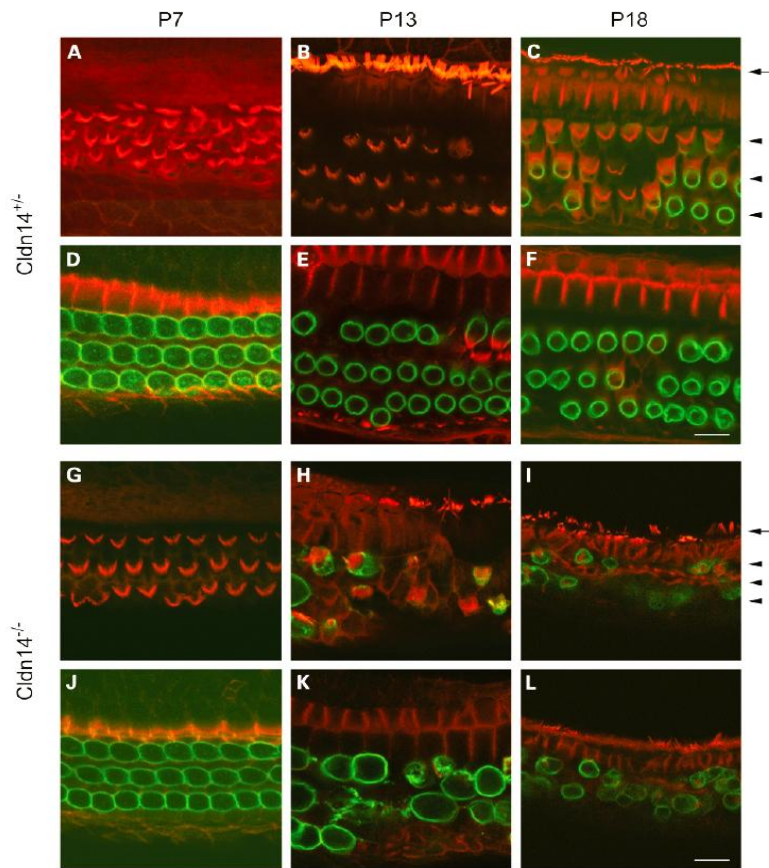


Figura IV.11. El Knock-out de Claudina 14 causa sordera. La claudina 14 constituye la barrera para mantener niveles extracelulares altos de potasio en las células pilosas en la cóclea. Observe la rápida degeneración celular en los ratones knock-out (-/- ; G-L) en diferentes periodos de tiempo (P7,P13,P18), en comparación de ratones deletados (+/-; A-F). La sordera es el resultado de la degeneración celular. Las flechas marcan los diferentes estratos celulares. Tomado de Ben-Yosef, 2003.

D) Los ratones KO de claudina 5 presentan UE aparentemente normales (Nitta et al. 2003) (Figura IV.12). Sin embargo mueren después de nacer, por un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Cuando el espacio vascular se perfunde con marcadores paracelulares de diferentes tamaños se observa que el endotelio de ratones KO es permeable para el marcador de 1.9 RDa, pero impide el paso del marcador 10 RDa. Este resultado sugiere que claudina-5 regula el tamaño del poro de la UE en la barrera hematoencefálica (Petty and Lo 2002).

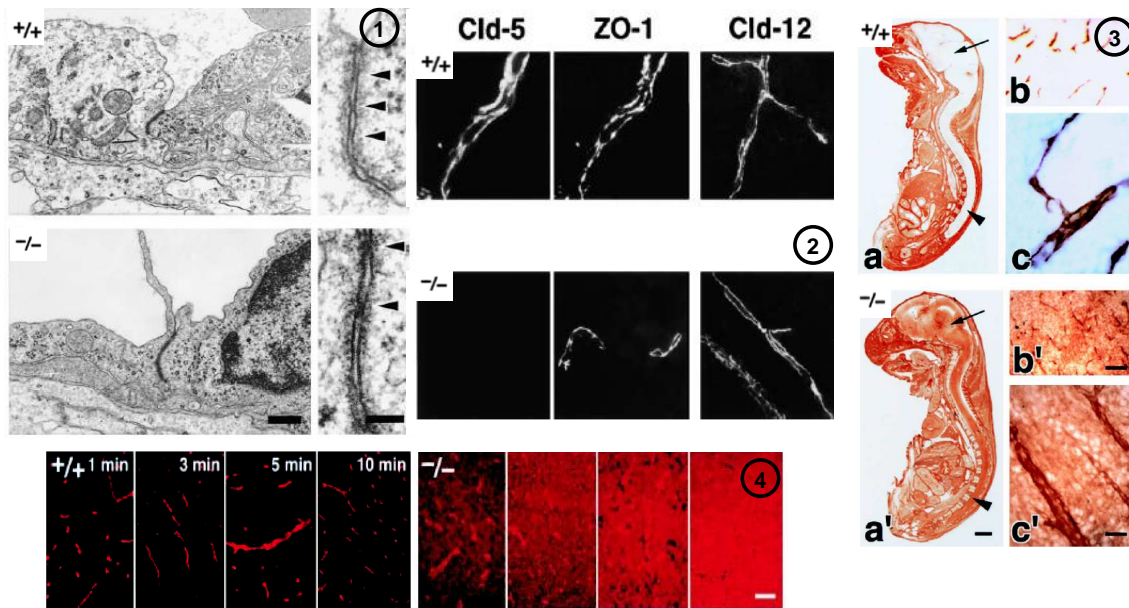


Figura IV.12. El Knock-out de Claudina 5 forma UE en el endotelio cerebral, pero estas son permeables alterando la función de la barrera hematoencefálica. En 1 observe la formación de UE en el endotelio cerebral tanto en ratón normal (+/+) como en el Knock-out de Claudina 5 (-/-), en 2 observe la inmunodetección de claudina 5,12 y ZO-1 en vasos cerebrales (+/+) y la ausencia de claudina 5 en KO (-/-), en 3 y 4, al transfundir marcador intravascular observe como en el ratón KO difunde al parénquima cerebral. Tomado de Nitta, 2003.

C. JAM (Junctional Adhesión Molecule).- Las proteínas de la familia JAM atraviesan una vez la membrana. En su porción extracelular contiene dos dominios semejante a las inmunoglobulinas (Martin-Padura et al. 1998). Cuando se tranfecta disminuye la permeabilidad paracelular de moléculas. JAM media adhesiones célula-célula y también facilita la extravasación y tránsito por diapedesis a través de los epitelios, de linfocitos T, neutrófilos, monocitos y células dendríticas (Martin-Padura et al. 1998;Palmeri et al. 2000). Así, los anticuerpos contra JAM inhibe la migración transendotelial de los monocitos *in vitro* e *in vivo*.

Se han identificado varias moléculas que integran a la familia JAM: JAM-A, JAM-B, JAM-C, CAR (receptor de adenovirus y del virus ckosakie), ESAM (molécula de adhesión celular selectiva endotelial), JAM-4, BT-IgSF superfamilia de inmunoglobulina específica de cerebro y testículo) y CLMP (Proteína de membrana semejante al receptor de ckosakie y adenovirus).

3.3.2. Proteínas submembranales

Las proteínas submembranales de la UE interactúan con proteínas citoplásmicas, que sirven como puente para que las primeras se asocien al citoesqueleto de actina. Además las proteínas submembranales también conocidas como adaptadoras, sirven para reunir a diversas proteínas tales como factores de transcripción, cinasas, fosfatasa y proteína G, en la reunión de la UE.

La proteína ZO-1 fue la primera molécula de la UE en ser identificada. ZO-1, (Stevenson et al. 1986). Posteriormente se identificaron otras moléculas semejantes a la ZO-1 que se denominaron ZO-2 (Jesaitis and Goodenough 1994) y ZO-3 (Haskins et al. 1998) de acuerdo al orden en que fueron descubiertas. El análisis secuencial reveló que estas proteínas eran miembros de una familia, denominada MAGUK o proteínas asociadas a la membrana con homología a la guanilato cinasa (*membrane associated guanylate kinase homologues*) (Anderson 1996).

Las proteínas MAGUK contienen 3 regiones distintas: los dominios PDZ, SH3 y GK (FIGURA IV.13). Estos tres dominios median interacciones proteína-proteína (Gonzalez-Mariscal et al. 2000a). Los dominios PDZ están constituidos por regiones de 80-90 aminoácidos que se unen al extremo carboxilo terminal de proteínas donde se localizan los motivos S/TXV ó $\Phi X \Phi$ (Songyang et al. 1997;Bezprozvanny and Maximov 2001;Fan and Zhang 2002). Los dominios PDZ también se unen de manera homotípica a repetidos PDZ de otras proteínas (Shieh and Zhu 1996), así por ejemplo ZO-1 se une a través de su segundo PDZ al segundo PDZ de ZO-2 y ZO-3.

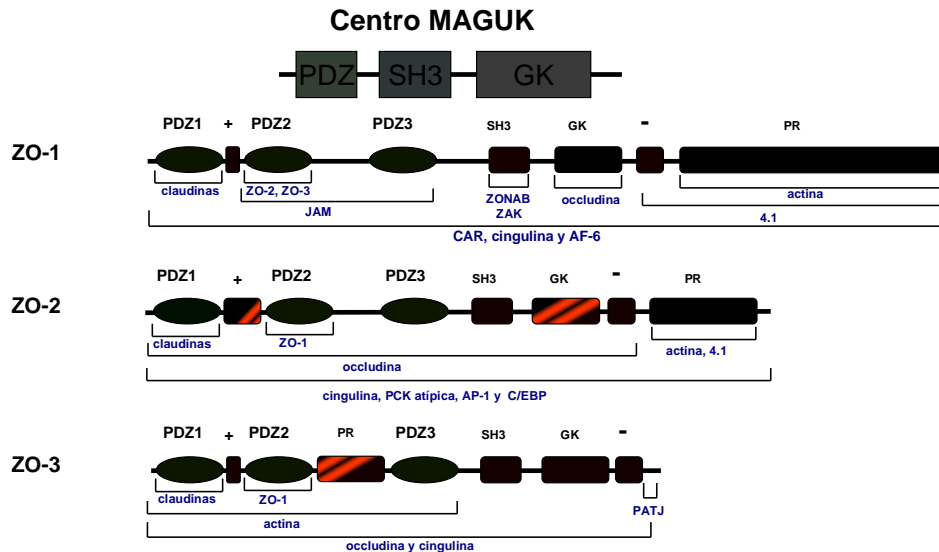


Figura IV.13. Proteínas ZO de la UE. Representación esquemática del centro MAGUK (*Membrane Associated Guanilate Kinases homologues*) con sus módulos PDZ, SH3 y GK, y de las 3 proteínas MAGUK de la familia de las Zos presentes en la UE. PR región rica en prolina, + dominio básico; - dominio ácido; con corchetes se representan las asociaciones intermoleculares con otras proteínas de la UE. Tomado y modificado de Gonzalez-Mariscal, 2003.

El dominio SH3 es homólogo al tercer módulo SH de la tirosin-cinasa Src. Este dominio está formado por 50-70 aminoácidos y se puede unir a regiones GK y a otros dominios ricos en prolina que tengan el motivo PXXP (McGee and Bredt 1999; Dalgarno et al. 1997).

El dominio GK es homólogo a la enzima guanilato cinasa aunque en las proteínas MAGUK de la UE es enzimáticamente inactivo ya que no posee los sitios de unión a ATP y GMP (Haskins et al. 1998; Roh et al. 2002b). Este dominio se une a diversas proteínas (Kim et al. 1997) y también interacciona con el dominio SH3 de la misma proteína MAGUK, es decir establece una asociación intramolecular, o de otras proteínas.

A continuación describiré las características principales de las proteínas ZO de la UE que se analizan en esta tesis.

3.3.2.1. ZO-1 (210-225 kDa) (Stevenson et al. 1986). Se localiza en la UE de epitelios y endotelios, aunque también se encuentra en el citoplasma y en los contactos puntuales

de células no epiteliales como astrocitos, células de Schwann, fibroblastos, glioma, sarcoma y líneas celulares de mieloma (Howarth et al. 1992).

ZO-1 interacciona con diversas proteínas de la UE. Así, se asocia con su primer dominio PDZ al extremo C-terminal de las claudinas (Itoh et al. 1999), por su segundo y tercer PDZ se une a JAM (Ebnet et al. 2000) y por su dominio GK a occludina (Fanning and Anderson 1998). ZO-1 también interacciona a través de su extremo carboxilo terminal al citoesqueleto de actina (Fanning et al. 1998; Wittchen et al. 1999). ZO-1 se une también a proteínas corticales de la UE como AF-6 (Yamamoto et al. 1997), cingulina, ZO-2 y ZO-3 (Cordenonsi et al. 1999) y a la proteína de unión a actina, 4.1 (Fanning et al. 1998; Itoh et al. 1997; Wittchen et al. 1999; Mattagajasingh et al. 2000). ZO-1 también, se asocia a la molécula de la UA, α -catenina y a las proteínas de la unión comunicante, conexina 43 y 45 (Itoh et al. 1997; Gonzalez-Mariscal et al. 2000a; Gonzalez-Mariscal et al. 2003) (Toyofuku et al. 1998).

El extremo carboxilo terminal de ZO-1, tiene tres dominios de procesamiento alternativo: α , β y γ . El dominio α es una región de 80 aa. La isoforma α^+ es más abundante en los epitelios mas que en los endotelios, por lo que se sospecha que es una isoforma necesaria para desarrollar UE herméticas. En las primeras etapas del desarrollo embrionario, antes de la compactación del blastocisto, y cuando la UE aún no se ha establecido la isoforma $ZO-1\alpha^-$ está presente en la región de los contactos célula-célula asociada a la UA. Las isoformas β_1 , β_2 y γ tienen 7, 20 y 45 aa, respectivamente. Estas isoformas se expresan en muy diversos tejidos, pero su función aún se desconoce {Gonzalez-Mariscal, 2000 204 /id}(Gonzalez-Mariscal et al. 1999).

En las monocapas epiteliales subconfluentes, algunos estudios reportan localización de ZO-1 en el núcleo (Gottardi et al. 1996; Gonzalez-Mariscal et al.

1999;Islas et al. 2002), sin embargo esta observación es controversial pero no ha podido ser reproducido por otros (Balda and Matter 2000a).

ZO-1 es una fosfoproteína que se asocia y es sustrato de las cinasas: ZAK, PKC y la activada por mitógenos (Balda et al. 1996a;Chen et al. 2000;vila-Flores et al. 2001). Sin embargo el efecto que ejerce la fosforilación sobre su función, aún es muy controversial. Por una parte, se ha observado que en células de baja resistencia, ZO-1 está más fosforilada que en monocapas de alta resistencia; pero por otro lado también se ha visto que ZO-1 está poco fosforilada, en células que carecen de UE o en las UE se encuentran desensambladas (Howarth et al. 1994).

La expresión de ZO-1 juega un papel fundamental en la fisiología de la UE. Se observa más en los segmentos de alta resistencia del riñón como son los túbulos colectores, que en los de alta permeabilidad como los segmentos proximales (Gonzalez-Mariscal et al. 2000b) Diversos agentes al modular la expresión de ZO-1 alteran la funcionalidad de la UE. Por ejemplo los glucocorticoides incrementan en el ojo humano la resistencia al flujo transendotelial a través de un aumento en la expresión de ZO-1 (Underwood et al. 1999); y el INF- γ aumenta la permeabilidad epitelial de células T84 al disminuir los niveles de ZO-1 (Youakim and Ahdieh 1999).

La secuencia del cDNA de ZO-1 es homologa a la proteína supresora tumoral “*disc large*” (Dlg) de *Drosophila*, y se ha observado que ZO-1 actúa también como un supresor tumoral. Así la disminución de su expresión se relaciona con la progresión tumoral en el cáncer de mama (Hoover et al. 1998); mientras que la sobre-expresión de una construcción de ZO-1 que carece de la cola carboxilo terminal, genera una transformación de epitelio a mesénquima (Ryeom et al. 2000). ZO-1 se une al factor de transcripción ZONAB (ZO-1-Associated Nuclei Acid Binding protein). Este es un factor que se pega a la caja Y invertida de diversos promotores. ZONAB interacciona

con el dominio SH3 de ZO-1 y se localiza en el núcleo y en los bordes celulares de células MDCK subconfluentes. En el núcleo, ZONAB funciona como un represor de la transcripción del gen ErbB-2, el cual es importante para la diferenciación celular. ZONAB se expresa intensamente en las células en proliferación y muy poco en monocapas confluentes, mientras que la expresión de ZO-1 aumenta conforme se incrementa la densidad celular. ZO-1 secuestra en la UE al factor de transcripción ZONAB y a la proteína reguladora del ciclo celular, la cinasa CDK4. Este mecanismo podrá explicar el efecto anti-proliferativo de ZO-1 (Balda and Matter 2000a; Balda et al. 2003).

Durante la formación de los complejos de unión de las células epiteliales, ZO-1 está inicialmente localizada en la Unión Adherente (UA) (Yonemura et al. 1995; Adams et al. 1996; Asakura et al. 1999). En cambio, cuando las UEs están ya formadas y las células epiteliales están bien polarizadas, ZO-1 desaparece de las UAs y se concentra específicamente en las UEs (Stevenson et al. 1986) (Itoh et al. 1993).

3.3.2.2. ZO-2, es una fosfoproteína de 160 kDa que pertenece a la familia MAGUK. Se identificó porque coimmunoprecipita con ZO-1 en células epiteliales (Gumbiner et al. 1991). Además de contener el centro MAGUK con tres regiones PDZ, un dominio SH3 y un repetido GK, ZO-2 contiene en el extremo carboxilo terminal, una región de aminoácidos ácidos y, un sitio de procesamiento alternativo, y una región rica en prolina (Beatch et al. 1996; Collins and Rizzolo 1998; Gonzalez-Mariscal et al. 1999). ZO-2 tiene además una región básica entre el primer y segundo PDZ.

ZO-2 interacciona mediante su primer dominio PDZ interacciona con el carboxilo terminal de las claudinas (Itoh et al. 1999) y mediante su segundo repetido PDZ con el segundo PDZ de ZO-1 (Wittchen et al. 1999). Su dominio rico en prolina se asocia a dos proteínas del citoesqueleto: actina (Wittchen et al. 1999) y la proteína 4.1

(Mattagajasingh et al. 2000). ZO-2 se une también al carboxilo terminal de occludina. Diversas evidencias así como la observación de lo que ocurre con ZO-1, sugieren al dominio GK como blanco de unión a occludina (Fanning et al. 1998). ZO-2 también interacciona con la PKC (en sus isoformas λ y ζ), y con los factores de transcripción Jun, Fos y C/EBP (Betanzos et al. 2004). ZO-2 disminuye la actividad de genes reporteros controlados por sitios AP-1. A estos sitios se unen los factores de transcripción Jun y Fos (Betanzos et al. 2004).

ZO-2 se localiza en la membrana de las células epiteliales confluentes y en el núcleo y la membrana de las células subconfluentes. En el núcleo da un patrón de moteado nuclear en los que co-localiza con el factor de procesamiento alternativo SC35. La presencia de ZO-2 en el núcleo obedece a señales de localización nuclear (NLS) ubicadas en el primer dominio PDZ, mientras que su desplazamiento del núcleo a la membrana en las monocapas confluentes, responde a cuatro señales de exportación nuclear (NES) presentes dos de ellas en el dominio PDZ-2 y las restantes en la región GK (Islas et al. 2002; Jaramillo et al. 2004).

ZO-2 funciona como una proteína supresora tumoral. Así su expresión, disminuye en la mayoría de líneas celulares de cáncer de mama y adenocarcinomas pancreáticos (Chlenski et al. 2000). Así mismo, la sobre-expresión de ZO-2 neutraliza el efecto tumoral de oncogenes virales.

3.4. La unión estrecha en la placenta humana.

Los vasos presentes en las vellosidades terminales de la placenta humana poseen numerosas uniones estrechas. Estas se diferencian de las epiteliales y de las de la barrera hematocerebral en que no muestran una posición preferente luminal, es decir en el límite de las capas apical y lateral. En cambio se localizan a largo de la ruta paracelular entremezcladas con las uniones adherentes (Leach and Firth 1992).

La frecuencia y complejidad de la UE en los vasos placentarios humanos depende de su posición anatómica en el árbol vascular (Simionescu et al. 1976). Así, las vénulas postcapilares carecen de UE, por ser el sitio preferencial para la extravasación de proteínas del plasma y leucocitos circulantes, mientras que los grandes vasos contienen conspicuas UE.

Recientemente se encontró que la occludina, se localiza en los grandes vasos placentarios. Así mismo, su presencia se reduce al disminuir el calibre de la vasculatura, hasta que desaparece por completo en la zona de intercambio capilar. ZO-1 en cambio, esta presente a lo largo de todo el árbol vascular independientemente del calibre del vaso en cuestión (Figura IV.14).

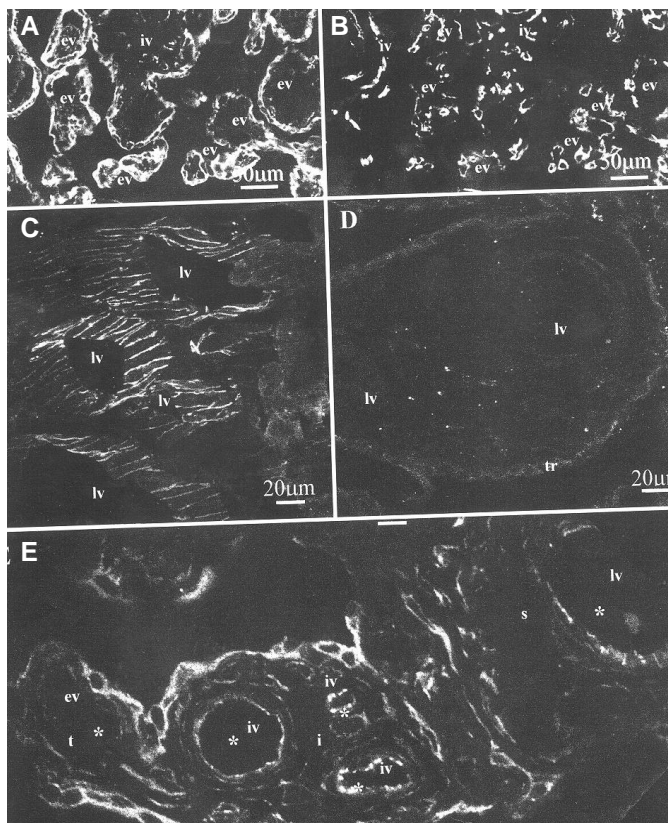


Figura IV. 14. Inmunolocalización y observación con microscopia confocal de occludina en la placenta humana. A, Visualice a occludina en algunos vasos, los cuales son identificados con PECAM-1 (B); C, la occludina se presenta con una imagen de empalizada en grandes vasos y no se observa en el trofoblasto (D); E, en una vellosidad se aprecia marca de occludina en grandes y medianos vasos pero no en capilares donde se realiza el intercambio.

Hasta antes de realizar el presente trabajo se desconocía el patrón de distribución de las claudinas tanto en el endotelio placentario como en el trofoblasto humano.

También se desconocía en la preeclampsia si existían alteraciones en el patrón de distribución de estas proteínas.

IV. Hipótesis.

Nada nos engaña tanto como nuestro propio juicio.
Leonardo Da Vinci.

4.1. Hipótesis:

Ya que la preeclampsia es una enfermedad que genera daño endotelial en la madre, pensamos que afectara también al endotelio placentario. Concretamente creemos que en la preeclampsia se alterará la expresión de las proteínas de la UE, que integran la barrera hemato-placentaria.

V. Objetivos

5.1. Objetivo general

Caracterizar en el sincitiotrofoblasto y el árbol vascular veloso de la placenta humana a término la expresión de diferentes proteínas de la unión estrecha.

Así mismo, analizar si durante la preeclampsia se detectan cambios en la localización y el nivel de expresión de estas proteínas.

5.2. Objetivos específicos

1.- Analizar por microscopía electrónica de corte fino, si en el sincitiotrofoblasto humano de placenta a término se detectan UE funcionales.

2.- Analizar por inmunofluorescencia si en el sincitiotrofoblasto y en el endotelio de placentas a término obtenidas de mujeres embarazadas sanas y con preeclampsia, se localiza las proteínas de la UE, claudinas 1, 3, 4, 5, 7, 15 y 16, así como occludina y ZO-1.

3.- Analizar por Western blot la expresión de las proteínas de la UE descritas en el punto anterior.

VI. Materiales y métodos

Los que se enamoran de la práctica
sin la teoría son como los pilotos
sin timón ni brújula, que nunca podrán
saber a dónde van.

Leonardo da Vinci.

6.1. Selección del tejido

Este estudio fue realizado en placentas de pacientes con preeclampsia y embarazo único del que se obtuvo un solo producto vivo a las 38 semanas de gestación. Como controles, se emplearon placentas a término sin complicaciones en el embarazo. Todas las placentas fueron obtenidas por operación cesárea realizada en la Unidad Medica de Alta Especialidad, Hospital de Gineco-Obstetricia No.3 del Centro Médico Nacional “La Raza”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en la ciudad de México. Las placentas se obtuvieron con el consentimiento informado de las pacientes bajo aprobación del comité local de ética e investigación.

6.2. Procesamiento del tejido

La placenta se separó del tejido decidual inmediatamente después del parto. Se hicieron biopsia de 1 cm³, se enjuagaron en solución salina fría y se colocó en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría. Inmediatamente después se transfirió al laboratorio.

Para la microscopía electrónica, las muestras del tejido se fijaron con 2.5 % de glutaraldeído en 0.1 M de amortiguador de cacodilato de sodio a pH 7.2 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron y post-fijaron con tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio conteniendo 5 µg/ml de rojo de rutenio. Posteriormente las biopsias se deshidrataron, embebieron en Epon y se seccionaron siguiendo los procedimientos estándar. Los cortes finos se observaron en el microscopio de transmisión electrónica Philips Morgagni 268D.

Las demás muestras de placenta se incubaron durante 2 minutos en 2-metilbutano, previamente congelado en nitrógeno líquido. Las muestras se transfirieron posteriormente a nitrógeno líquido por 10 minutos. En seguida se cortaron secciones de 6 μm con el criostato Leica (Leica CM 1900-3-1). Algunos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina siguiendo los protocolos estándar, mientras que el resto de los cortes fueron procesados para inmunofluorescencia.

Ya que la placenta humana contiene una gran cantidad de material fibroso, se diseñó un protocolo que incrementa la eficiencia de la extracción de proteínas para el análisis por Western blot. Este protocolo se basa en métodos previamente descritos por otros autores para lisar muestras de tejido (Sambrook J 2001) y por nuestro grupo de trabajo para la determinación de claudinas en los túbulos renales (Reyes et al. 2002), a continuación describo el procedimiento. Las biopsias de placenta se lavaron seis veces con PBS frío que contenía además el inhibidor de proteasas, fenilmetano sulfonil-fluoruro (PMSF) 1 mM. Las muestras posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero esmerilado pre-enfriado. El tejido pulverizado se incubó con la solución amortiguadora de lisis RIPA (TRIS-HCl pH 7.6 40 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.2% y PMSF 1 mM) y el coctel comercial de inhibidores de proteasas, Complete^R. Los lisados se sonicaron 3 veces por 1 minuto en un procesador ultrasonico de alta densidad (Vibra cell, Sonios and Materials, Danburym Conn.). Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C (centrífuga Sorvall Biofuga Fresco). El sobrenadante se usó para el Western blot. Para la generación de las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100, el tejido lisado se incubó con una solución amortiguadora que contiene: TRIS-HCl 20 mM pH 7.6, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tritón X-100 1%, fluoruro de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y PMSF

2 mM. Esta solución amortiguadora también contiene el cocktail de inhibidores de proteasas, Complete^R. Después de la incubación por 30 minutos a 4°C bajo continua agitación, las muestras se sonicaron y centrifugaron como se describió anteriormente. El sobrenadante se designó fracción soluble en tritón X-100. La pastilla se resuspendió en la solución amortiguadora RIPA, se sonicó tres veces y se centrifugó como se describió anteriormente. La pastilla resultante se descartó y el sobrenadante se designó fracción insoluble en tritón X-100.

6.3. Inmunofluorescencia.

Para la inmunofluorescencia, los cortes se procesaron como previamente fue descrito (Gonzalez-Mariscal et al. 2000b), con la modificación de ahora fijar las muestras por 5 minutos en acetona fría y en seguida hacer 5 minutos de lavados con PBS frío y posteriormente proceder a una incubación de 10 minutos en tritón X-100 al 0.25%. Los cortes se incubaron con anticuerpos policlonales generados en conejo contra ZO-1 (Zymed 61-7300, San Francisco, Calif., USA) a una dilución de 1:100, claudina-1 (Zymed 51-9000) dilución 1:25, claudina-3 (Zymed 34-1700) dilución 1:13, claudina-5 (Zymed 34-1600) dilución 1:125, claudina-7 (Zymed 34-9100) dilución 1:32, claudina-16 (Zymed 34-5400) dilución 1:85, ocludina (Zymed 71-1500) dilución 1:100, y contra el péptido KETYY presente en el COOH-terminal de todas las isoformas de la Na⁺K⁺ATPasa (Bayer 1990), Este último anticuerpo aportado amablemente por la Dra. Liora Shoshani (CINVESTAV, México), quién lo recibió del Dr. Nikolai Modyanov del Colegio Médico de Ohio) se empleo a una dilución 1:50. También utilizamos anticuerpos monoclonales generados en ratón contra la claudina-4 (Zymed 32-9400) dilución 1:167, claudina-15 (Zymed 32-9800) dilución 1:25, la glicoproteína GP135 (amablemente donada por el Dr. George Ojakian, New York State University) dilución 1:50, PECAM-1 (R&D Systems BBA7) dilución 1:1000, y la subunidad β de la

Na⁺K⁺ATPasa (generosamente donada por el Dr. Marcelino Cerejido, CINVESTAV, México) dilución 1:50. Utilizamos anticuerpos secundarios policlonales de cabra IgG anticonejo conjugados a isocianato de fluoresceína (Zymed 62-6111) dilución 1:100 y monoclonales de cabra IgG antiratón (Zymed 62-6511) dilución 1:100. También se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados a tetrametil-rodaminados-isocianato de cabra IgG anti ratón (Zymed 62-6514) dilución 1:50, y anticuerpos monoclonales conjugados de cabra IgG anti ratón CY5 (Zymed 81-6516) dilución 1:50.

Antes de montar las muestras, algunos cortes, se incubaron por 15 minutos con yoduro de propidio (0.7 µg/ml; No Cat. 4170, Sigma) para teñir el DNA. Posteriormente estos cortes se lavaron tres veces con PBS. La fluorescencia se observó en un microscopio confocal Leica SP2 con los lasers de argón y helio-neón. Se empleó el software del confocal Leica. Todas las imágenes son representativas de al menos cuatro experimentos independientes con placentas derivadas de diferentes pacientes.

6.4. Western blot

La cantidad de proteínas se cuantificó en los extractos totales de placenta, así como en las fracciones: soluble e insoluble en tritón X-100. Las muestras se diluyeron 1:1 en solución amortiguadora de muestra y se corrieron en geles de acrilamida al 12%. Posteriormente las muestras de los geles se transfirieron a membranas de polivinil fluoruro (PVDF). La inmunodetección en la membranas de PVDF se hizo como previamente fue descrito por Jaramillo (Jaramillo et al. 2004). Se utilizaron los anticuerpos en contra de las proteínas de la UE descritas previamente y como control de carga se utilizó al anticuerpo monoclonal contra actina (amablemente donado por el Dr José Manuel Hernández, CINVESTAV, México). Como secundarios se utilizaron anticuerpos policlonales de cabra anticonejo acoplados a peroxidasa (Zymed 81-6120) dilución 1:2000 y anticuerpos monoclonales antiraton; Zymed 62-6520) dilución

1:2000. La detección de las bandas se hizo utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotechnology).

VII. Resultados

El diagnóstico de preeclampsia fue determinado por: 1) la presencia de una presión sanguínea por arriba de 140/90 mm Hg o el incremento de 30 mm Hg en la presión sistólica o 15 mm Hg en la presión diastólica sobre los valores detectados en el control prenatal; 2) la existencia de una “+” o más en el análisis de orina, y 3) la presencia de edema en las pacientes (Tabla V.1).

Características	Embarazo Normal n =10	Preeclampsia n =10
Edad Materna (años)	27.3 ± 5.85	29 ± 7.73
Edad Gestacional (semanas)	38.1 ± 1	37.5 ± 0.7
Peso de Recién Nacido (grs)	2970 ± 320	2440 ± 370
Talla del Recién Nacido (cm)	49 ± 2.36	46.3 ± 2.63
Presión Sistólica (mm Hg)	110 ± 8.8	149 ± 9.95 *
Presión Diastólica (mm Hg)	69 ± 7.4	106 ± 5.1*
Proteinuria	Negativo	++ a +++

*p< 0.001

Tabla V.1. Características de las pacientes incluidas.

Para facilitar la interpretación de las imágenes de inmunofluorescencia, en la figura V.1. presento un corte histológico teñido con hematoxilina y eosina de una placenta a término derivada de un embarazo normal. Observese en la vellosidad coriónica la presencia de numerosos vasos sanguíneos y la capa del sincitiotrofoblasto rodeada por el espacio intervilloso. Al término del embarazo el endotelio de las vellosidades terminales, responsable del intercambio de nutrientes entre la sangre fetal y la placenta, está estrechamente adherido a la superficie basal del sincitiotrofoblasto. De esta manera se forman áreas de menor resistencia a la difusión transplacentaria.

Observese en la vellosidad coriónica la presencia de numerosos vasos sanguíneos y la capa del sincitiotrofoblasto rodeada por el espacio intervelloso.

7.1. ZO-1

En la placenta de mujeres sanas y con preeclampsia, la proteína ZO-1 se detecto en todos los vasos sin importar su calibre (Figura V.2).

Una cantidad similar de ZO-1 se detecto por Western blot, en las placentas normales y en aquellas derivadas de pacientes con preeclampsia. Estos resultados así como los de las siguientes imágenes se resumen en la tabla V.2.

7.2. Occludina.

La tinción contra occludina en mujeres sanas es conspicua en las células endoteliales de mayor calibre la vellosidad coriónica, mientras que los vasos de diámetro pequeño son inmunonegativos. Estos últimos pueden ser identificado por su inmunoreactividad positiva a PECAM-1 (Figura V. 3A, segunda columna, flechas). Esta molécula de adhesión célula-célula se expresa en todas las células endoteliales del arbol vascular (Bazzoni and Dejana 2004;Newman 1997). En la placenta con preeclampsia, los vasos de gran calibre también son inmunoreactivos a occludina (Figura V. 3 A).

Proteína	INMUNOFLORESCENCIA						WESTERN BLOT				
	VASOS				SINCITIOTROFOBLASTO		TOTAL	FRACCIONES TRITON X-100			
	GRANDES		PEQUEÑOS		LATERAL	BASAL		N vs P	N		P
	N	P	N	P			S vs I		S vs I	SN vs SP	IN vs IP
ZO-1	+	+	+	+			=				
OCCLUDINA	+	+	-	-				>	>	=	=
Claudina-1	+	+	-	-				>	>	=	>
Claudina-3	+	+	-	-				>	>	>	=
Claudina-4	-	-	-	-	-	+		>	>	=	=
Claudina-5	+	+	+	+				>	>	=	>
Claudina-16	-	-	-	-	+	+		>	>	=	=

Tabla V. 2. Expresión de la proteínas de la Unión Estrecha en placentas de término derivadas de mujeres con embarazo normal y preeclampsia.

N, Placenta Normal; P, Placenta con preeclampsia; S, Fracción soluble en Triton X-100; I, Fracción insoluble en Triton X-100; SN, Fracción soluble en Triton X-100 de placenta normal; SP, Fracción soluble en Triton X-100 de placenta con preeclampsia; IN, Fracción insoluble en Triton X-100 de placenta normal; IP, Fracción insoluble en Triton X-100 de placenta con preeclampsia.

El análisis por Western blot revela dos bandas de occludina de 65 y 83 kDa, ambas en las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100. El análisis densitométrico mostró que, en las placentas normales y con preeclampsia, una gran cantidad de occludina está presente en la fracción soluble. No se detectó diferencia en la cantidad de occludina entre las placentas normales y con preeclampsia. (Figura V. 3B).

7.3. Claudina 5

A continuación, se estudió la cantidad y el patrón de distribución de diferentes claudinas. Empezamos por explorar a la claudina 5, ya que esta proteína, se concentra en las células endoteliales (Morita et al. 1999c), aunque también está presente en ciertos epitelios (Rahner et al. 2001a). En placentas normales la expresión de claudina-5 es clara en varios vasos sanguíneos, mientras que está ausente en otros aún de un diámetro similar (Figura V. 4 A, flecha). Una situación análoga se presenta en las placentas de mujeres con preeclampsia (Figura V. 4A, panel inferior).

Por Western blot, detectamos claudina-5 en las fracciones solubles e insolubles en Tritón X-100, aunque la cantidad presente en esta última fracción fue

significativamente menor (Figura V. 4B). La cantidad de claudina-5 presente en la fracción insoluble fue significativamente mayor en las placentas de las pacientes sanas que en las placentas de las mujeres con preeclampsia.

7.4. Claudina-3

También analizamos la distribución de las claudinas 3 y 15, las cuales previamente habían sido localizadas en la barrera hemato-encefálica (Wolburg et al. 2003) y en los vasos renales (Kiuchi-Saishin et al. 2002) respectivamente. La claudina-15 no se detectó en los vasos placentarios tanto de placentas normales como de placentas de mujeres con preeclampsia (dato no mostrado). Sin embargo, la claudina-3 se observó claramente ideal a lo largo de los vasos de gran calibre presentes en las placentas normales y con preeclampsia (Figura V. 5A). En contraste los vasos pequeños presentaron una señal apenas detectable de claudina-3 (Figura V. 5B). El ensayo de Western blot reveló una mayor cantidad de claudina-3 en la fracción soluble que en la insoluble, tanto en placentas normales como en placentas con preeclampsia. Así mismo se detectó una menor cantidad de claudina-3 en la fracción soluble de Tritón X-100 proveniente de placentas con preeclampsia comparadas con aquellas de mujeres sanas (Figura V. 5C).

7.5. Otras claudinas

Posteriormente se analizó la inmunoreactividad del tejido placentario a las claudinas 1, 4, 7 y 16. Mientras que la claudina 7 fue apenas perceptible, las otras tres claudinas mostraron una presencia conspicua en el tejido placentario.

7.5.1 Claudina-1

En la placenta humana a término, la claudina-1 fué previamente localizada en los vasos de gran calibre correspondientes a las arterias y venas del tallo veloso, mientras que los capilares de la terminal vellosa resultaron inmunonegativos (Leach et al. 2002).

Mis resultados de inmunofluorescencias con placentas sanas y preeclámpicas están de acuerdo con estas observaciones (Figura V. 6A y B).

El análisis de Western blot indica que en los dos grupos de mujeres estudiadas hay una menor cantidad de claudina-1 en la fracción insoluble de Tritón X-100 que en la fracción soluble. En las muestras insolubles derivadas de pacientes con preeclampsia, la cantidad de claudina-1 es significativamente menor (Figura V. 6C).

7.5.2. Claudina-4

La claudina-4 apenas se detecta en el endotelio placentario. Sin embargo, tanto en placentas normales como en aquellas derivadas de mujeres con preeclampsia, la claudina-4 da una fuerte señal en la membrana basal del sincitiotrofoblasto en contacto con el endotelio fetal, el estroma, y algunos remanentes de células del citotrofoblasto que permanecen aún en la placenta a término. Las muestras de tejido se trataron con anticuerpos anti claudina-4 y con yoduro de propidio (Figura V. 7), para distinguir el núcleo de las células endoteliales (flechas) de las células del sincitiotrofoblasto (cabeza de flecha llena) y del citotrofoblasto o las células del estroma (cabezas de flecha vacía). Nuestras observaciones indican que la claudina-4 es una proteína presente en la membrana basal de la capa del sincitiotrofoblasto y no una proteína de los vasos de la placenta. El análisis de Western blot reveló una mayor cantidad de claudina-4 en la fracción soluble de Tritón X-100 que en la fracción insoluble tanto en las placentas de mujeres sanas como en las provenientes de mujeres con preeclampsia. La cantidad de claudina-4 encontrada en cada fracción no varía con la preeclampsia.

7.5.3. Claudina- 16

En la placenta humana, la claudina-16 no se detecta en el endotelio, mientras que se expresa conspicuamente en la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto (Figura V. 8). En la placenta derivada de mujeres con preeclampsia, se detecta un patrón de

claudina-16 menos definido. El análisis por Western blot revela una cantidad similar de claudina-16 en las mujeres sanas y con preeclampsia tanto en la fracción soluble como en la insoluble en Tritón X-100 (Figura V. 8B).

Para confirmar la presencia de claudina-16 en la membrana plasmática, el tejido placentario se incubó con anticuerpos contra claudina-16 y un marcador de la membrana apical, la glicoproteína GP135, o un marcador de la membrana basolateral, la proteína Na^+K^+ -ATPasa. En ambos casos los núcleos se marcaron con yoduro de propidio. La claudina-16 colocalizó con GP135 (Figura V. 9) y con la proteína ATPasa Na^+K^+ (Figura V. 10) en la membrana plasmática.

En las células epiteliales, la distribución de estas proteínas es polarizada. Así la GP 135 marca la cara apical mientras que la ATPasa Na^+K^+ se concentra en la membrana basolateral.

En el sincitiotrofoblasto, estas proteínas dan un patrón de polarización menos definido. Esto se confirmó al tratar el tejido placentario con los anticuerpos contra GP135 y Na^+K^+ -ATPasa (Figura V.11 A y B). Así los cortes *xz* obtenidos en el microscopio confocal del tejido normal (Figura V. 11B), muestra como aunque la Na^+K^+ -ATPasa se concentra en la membrana basolateral del sincitiotrofoblasto, hay inmunoreactividad en la membrana apical.

De manera similar, GP135 aparece predominantemente en la superficie apical de la membrana del sincitiotrofoblasto (cabeza de flecha), aunque también esta presente en algunos puntos de la superficie lateral (flechas). Los cortes *xz* de las muestras con preeclampsia mostraron un patrón de tinción difuso (dato no mostrado).

7.6 Estudios por microscopía electrónica

La microscopía electrónica reveló que en placentas normales como en aquellas derivadas de mujeres con preeclampsia, el marcador extracelular rojo de rutenio tiñe las

microvellosidades de la superficie apical de la capa del sincitiotrofoblasto pero no el espacio paracelular (Figura V. 12, flechas). La penetración de este marcador a la membrana lateral se encuentra bloqueada en el límite de las membranas apical y lateral por la unión estrecha (cabeza de flecha).

La vía paracelular del sincitiotrofoblasto conecta al espacio intervelloso bañado por la sangre materna (Figura V. 12, asterisco) con el compartimiento fetal localizado por debajo del sincitiotrofoblasto (Figura V. 12, doble asterisco). En el sincitiotrofoblasto la vía paracelular exhibe dos patrones, uno tortuoso (Figura V.12 A) y otro lineal (Figura V.12 B). Sin embargo, la forma mas frecuentemente encontrada en las placentas normales y con preeclampsia fue la tortuosa.

VIII. Discusión

La preeclampsia es una enfermedad hipertensiva del embarazo que amenaza tanto la vida del feto como la de la madre. La patogénesis central de la preeclampsia es un defecto inicial de la placentación que conduce a una disfunción del endotelio materno. En esta tesis se exploró la composición molecular de la UE de placentas humanas a término provenientes de mujeres sanas y de mujeres con preeclampsia. Se encontró que en la condición patológica, la expresión de las claudinas 1, 3 y 5 disminuye mientras que la expresión de las proteínas ZO-1 y ocludina permanece sin cambio.

Se analizó también la expresión de ZO-1, ya que ésta es una proteína submembranal que marca las UE tanto de epitelios como de endotelios independientemente del grado de sellado de las uniones. Así, ZO-1 ha sido encontrada en epitelios de alta y baja permeabilidad tales como los túbulos proximales y colectores del riñón (Gonzalez-Mariscal et al. 2000b) y en endotelios neurales y no neurales tales como los de la placenta humana (Nitta et al. 2003; Leach et al. 2000; Leach et al. 2002). Aquí observamos que en la placenta de mujeres sanas y con preeclampsia, ZO-1 inmunoreacciona en el endotelio a lo largo de todo el árbol vascular.

De las proteínas integrales de la UE, solamente ocludina y claudina-1 había sido previamente detectadas en los vasos placentarios. Su expresión había sido reportada (Leach et al. 2000; Leach et al. 2002) exclusivamente en los vasos de mayor calibre. En este estudio confirmamos esta observación y descubrimos un patrón similar en el tejido con preeclampsia. Con respecto a la expresión de las claudinas 3, 5 y 15 aquí encontramos que la claudina 15 no está presente en el tejido placentario. En cambio las claudinas 3 y 5 se detectan claramente en las placentas sanas y con preeclampsia.

El análisis de Western blot, reveló una disminución significativa en la cantidad de claudinas 1, 3 y 5 en las placentas de mujeres con preeclampsia. En principio esta disminución de la expresión de claudinas podría generar UEs más permeables. Esta condición podría hipotéticamente surgir en la placenta como respuesta a la hipertensión de la madre con preeclampsia y ocasionaría un incremento de fluido intersticial atribuido a fuga de fluidos y proteínas de los capilares. La evidencia que la presión sanguínea de la placenta es afectada durante la preeclampsia viene de la observación que, en esta enfermedad, no solo el suero materno, sino también el derivado del cordón umbilical exhiben bajos niveles de vasodilatadores potentes, gene-relacionados con la calcitonina y con péptidos relacionados con la hormona paratiroidea en comparación con mujeres normotensas embarazadas (Halhali et al. 2001).

En este estudio, sorpresivamente encontré que las claudinas 4 y 16 están presentes en la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto. Este es el primer reporte de claudinas localizadas en un sinsitio en los mamíferos. El hallazgo de que estas claudinas no se concentran en el límite de las membranas apical y lateral, no es tan sorprendente, ya que se ha descubierto que varias claudinas no restringen su distribución a la UE. Por ejemplo, en el epitelio de la vejiga del conejo, la claudina-4 se encuentra a todo lo largo de la membrana basolateral (Acharya et al. 2004), y en el útero de rata, las claudina 1, 3 y 5 cambia su expresión de la región más apical de la membrana lateral hacia los dominios laterales y basales durante el estro, mientras que la claudina-7 siempre se detecta en la membrana basolateral (Mendoza-Rodriguez et al. 2005).

En las células epiteliales, la claudina-4 disminuye la conductancia paracelular al reducir la permeabilidad al Na^+ (Van et al. 2001c). Este efecto se revierte sustituyendo su primer asa extracelular a una carga negativa por otra positiva (Colegio et al. 2003).

Sin embargo, en la placenta humana no encontramos a la claudina-4 localizada en la membrana lateral donde funcionaría como disminuyendo la permeabilidad paracelular del Na^+ . La razón de la presencia de la claudina-4 en la membrana basal del sincitiotrofoblasto no es clara. Sin embargo, especulativamente se puede plantear que su presencia puede deberse a que las claudinas funcionan como moléculas de adhesión a la matriz extracelular.

La claudina-16 se expresa en la porción gruesa ascendente del asa de Henle (TALH) (Simon et al. 1999). El potencial eléctrico intraluminal positivo de esta parte de la nefrona conduce a los cationes de regreso a la sangre a través de la UE (Monnens et al. 2000). De hecho en varias especies estudiadas hasta la fecha, se ha encontrado que el 60% del Mg^{2+} filtrado por el riñón se reabsorbe en el asa ascendente gruesa de Henle por difusión pasiva a través de la ruta paracelular (Quamme and de 2000). Esta observación ahunada al descubrimiento de que las mutaciones en el gen de la claudina-16 son responsables de una enfermedad en la que se pierde el Mg^{2+} del cuerpo (Simon et al. 1999) indica que la claudina 16 constituye un canal paracelular de Mg^{2+} .

La razón por la que la claudina 16 se localiza en la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto se desconoce. Se sabe que el Mg^{2+} reduce la presión sanguínea (Jee et al. 2002), y por ello ha sido empleado en el embarazo humano. Se ha encontrado una hipomagnesemia en las mujeres con preeclampsia más pronunciada que en mujeres con embarazos normales (Standley et al. 1997;Kisters et al. 1998). Esto sugiere que esta situación podría contribuir al desarrollo de la hipertensión de los pacientes con preeclampsia (Kisters et al. 2000;Adam et al. 2001). Sin embargo, mientras que unos estudios reportan que el suplemento de Mg^{2+} durante el embarazo reduce la frecuencia de retardo en el crecimiento intrauterino del feto y la preeclampsia (Conradt 1984;Conradt et al. 1985) o la morbilidad materna y fetal (Spatling and Spatling 1988),

otros autores han observado que el suplemento de magnesio no mejora el resultado del embarazo (Sibai et al. 1989; Morris et al. 2001). Esto, por su puesto, no está relacionado con la eficacia del $MgSO_4$ como anticonvulsivo que se suministra a las mujeres con preeclampsia para reducir el riesgo de convulsiones (1995; Belfort et al. 2003; Altman et al. 2002). La manera por la cual el $MgSO_4$ controla las convulsiones en la eclampsia no es clara. Su efecto puede ser en parte como bloqueador de los receptores excitatorios de aminoácidos, tales como NMDA, cainato y AMPA en el cerebro (Hallak et al. 2000; Cotton et al. 1993) y/o atribuible a su acción de vasodilatación. El Mg^{2+} puede tener un efecto generalizado en el músculo liso, incluyendo la vasculatura periférica y el útero y por lo tanto tener efectos antihipertensivos y tocolíticos.

La presencia de la claudina-16 en la membrana plasmática lateral de la capa del sincitiotrofoblasto es la primera evidencia que sugiere que ocurre un transporte paracelular de Mg^{2+} entre la sangre materna y el espacio intercelular de la placenta humana. Es importante destacar que la sangre fetal tiene niveles altos de Mg^{2+} ionizado en comparación con la sangre materna (Standley and Standley 2002). La ausencia de claudina-16 en los vasos placentarios sugiere que una vez que el Mg^{2+} entra al lumen de los vasos placentarios, por un mecanismo hasta ahora desconocido, el catión no puede salir de allí a través de la UE. Con respecto al transporte de Mg^{2+} en la placenta humana, hasta ahora solamente se ha descrito la presencia de un intercambiador Na^+/Mg^{2+} que mantiene bajas las concentraciones intercelulares de Mg^{2+} en los cultivos de células decario carcinoma JEG-3 (Standley and Standley 2002).

Desde un punto de vista especulativo, la expresión de la claudina-16 en la membrana plasmática lateral del sincitiotrofoblasto sugiere el flujo pasivo paracelular de Mg^{2+} desde la sangre materna hacia el tejido placentario. Esto podría ejercer un efecto de vasodilatación en los vasos placentarios. En la preeclampsia, el patrón difuso

de claudina-16 en el sincitiotrofoblasto podría sugerir un influjo menor de Mg^{2+} al tejido placentario, con la consecuente minimización del efecto de vasodilatación.

La presencia de una red paracelular en el sincitio de la placenta hemocorial fue postulada hace varios años (Stulc et al. 1969;Stulc 1989a). Los experimentos de transporte demostraron flujo transplacentario de pequeñas moléculas hidrofílicas, proporcional a sus coeficientes de difusión en agua (Stulc 1989b;Thornburg and Faber 1977;Hedley and Bradbury 1980;Stulc and Stulcova 1986;Robinson et al. 1988). Por ello se sugirió desde hace varios años la existencia de un transporte transplacentario através de canales acuosos.

Sin embargo, la evidencia morfológica de la existencia de esta ruta fue materia de debate debido a la naturaleza sincicial del sincitiotrofoblasto. La existencia de canales conformados por membranas que atraviesan el sincitiotrofoblasto se propuso después de observar la perfusión de marcadores electrodensos a través de la placenta de rata y de humano, ante la presencia de presiones hidrostáticas elevadas (Kertschanska et al. 1997;Kertschanska et al. 2000). A esta ruta se le denominó sistema de canales transtrofoblasticos. Se propone que dichos canales se originan de las invaginaciones abundantes del plasmalema basal y se piensan que proveen una ruta paracelular abierta que conecta el intersticio del feto con el espacio sanguíneo materno. Las fotografías de microscopía electrónica de transmisión presentadas aquí, ilustran la existencia de esta ruta paracelular en el sincitiotrofoblasto que conecta al espacio intervelloso con el compartimiento extracelular fetal que se localiza por debajo de la capa del sincitiotrofoblasto. La co-inmunolocalización de la claudina -16, con la $Na^{+}K^{+}$ -ATPasa, y la proteína GP135 nos permite comenzar a caracterizar esta red paracelular presente en la placenta humana.

En síntesis, en este trabajo encontramos que durante la preeclampsia, disminuye la expresión en el sincitiotrofoblasto de una proteína, la claudina 16, que regula el transporte paracelular de Mg^{2+} y que el endotelio placentario expresaron menor intensidad a las claudinas 1, 3 y 5, lo que sugiere que este endotelio es más permeable que lo normal. Los resultados obtenidos en este trabajo nos ayudan a entender mejor los cambios patológicos que ocurren en la placenta humana durante la preeclampsia. Esto es relevante porque aunque la mortalidad materna en nuestro país, se ha ido reduciendo apreciablemente, (tabla 2, 3a, 3b), se ha incrementado como causa de muerte la enfermedad hipertensiva del embarazo, hecho también observado a nivel mundial (Leitch et al. 1997).

TABLA 2. EVOLUCION DE LA MORTALIDAD MATERNA.

Año	Defunciones	Tasas (Por mil nacidos vivos)
1935	5.106	6,7
1940	4.693	5,4
1945	3.936	3,9
1950	3.231	2,8
1955	2.866	2,1
1960	3.104	1,9
1965	3.109	1,6
1970	3.050	1,4
1975	2.558	1,1
1980	2.296	0,9
1985	1.702	0,6
1990	1.620	0,5

Fuente: SPP, Anuario Estadístico de los Estados Unidos Mexicanos, 1981, México. La Salud de la Mujer en México, Programa Nacional Mujer, Salud y Desarrollo Sistema Nacional de Salud, México 1990.

TABLA 3a. MUERTES MATERNAS SEGUN GRUPOS DE CAUSAS EN PORCENTAJES. 1970-1991

	1970	1980	1991
Otras complicaciones del embarazo, parto y puerperio	52,0	44,7	39,9
Hemorragias del embarazo y del parto	22,5	17,8	23,1
Sepsis del parto y del puerperio	7,3	7,5	4,6
Otros, abortos y los no especificados	5,4	6,8	7,9
Trastornos hipertensivos del embarazo y del puerperio	12,9	23,2	24,5
Total	100,0	100,0	100,0

Fuentes: Salinas de Gortari, Carlos, Quinto Informe de Gobierno 1993, Anexo, Poder Ejecutivo Federal, en base a información de la Secretaría de Salud, SSA y el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI.

TABLA 3b. MUERTES MATERNAS SEGUN GRUPOS DE CAUSAS EN PORCENTAJES. 2000-2001

Causa de muerte materna	Año 2000	Año 2001
Aborto	6.80	5.40
Causa Obstétrica directa	17.80	19.40
Hemorragia del embarazo y parto	19.50	20.80
Trastornos Hipertensivos del Embarazo, parto y puerperio	35.60	37.30
Infecciones del Aparato Genitourinario	0.80	0.80
Parto Obstruido	0.50	0.60
Complicaciones del puerperio	8.20	7.20
Causas Obstétricas indirectas	10.80	8.50

Fuente: Secretaría de Salud, Dirección General de Estadística - Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Mortalidad, 2000 y 2001.

De hecho la Unidad Medica de Alta Especialidad Hospital de Ginecología y Obstetricia No 3 (UMAE HGO No. 3) del Instituto Mexicano del Seguro Social, cuya área de atención incluye al estado de México, zona norte del Distrito Federal y Estado

de Hidalgo, se ha observado en los últimos 15 años la prevalencia de la preeclampsia como la primera causa de muerte materna (Tabla 4; Figura 2 y 3).

**Tabla 4. TOTAL DE CAUSAS DE MUERTE MATERNA POR AÑO
UMAE HGO No 3 CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"
IMSS 1991-2005**

CAUSA	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	TOTAL	%
Preeclamsi	18	21	36	49	59	615	71	81	99	04	15	24	37	46	50	130	53.
Hemorragi	7	3	7	4	2	2	1	3	2	1	3	0	0	0	1	36	14.
Infección		7	6	0	5	0	2		1	0	0	1	2	1	1	34	13.
Cardiopatía	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	2	1	2	1	0	11	4.
Otras	5	2	8	1	0	1	2	2	6	1	4	0	0	0	1	33	13.
Causas Total de muerte	24	23	27	14	17	18	24	30	18	7	14	6	11	8	3	244	100

FUENTE: Registros del mortalidad materna servicio de Perinatología y Medicina Fetal. Unidad Medica de Alta Especialidad Hospital de Ginecoobstetricia No. 3 Centro Medico Nacional La Raza IMSS. Comunicación personal Dra. Guadalupe Veloz Martínez.

Por ello creemos que es conveniente que en los laboratorios de investigación básica como el nuestro, también se desarrollen proyectos de investigación en modelos patológicos tales como la preeclampsia, que permiten unir esfuerzos de investigación básica con la clínica y así lograr abrir la puerta para encontrar nuevas estrategias de tratamiento para enfermedades de tan alto impacto en la salud de la población mexicana.

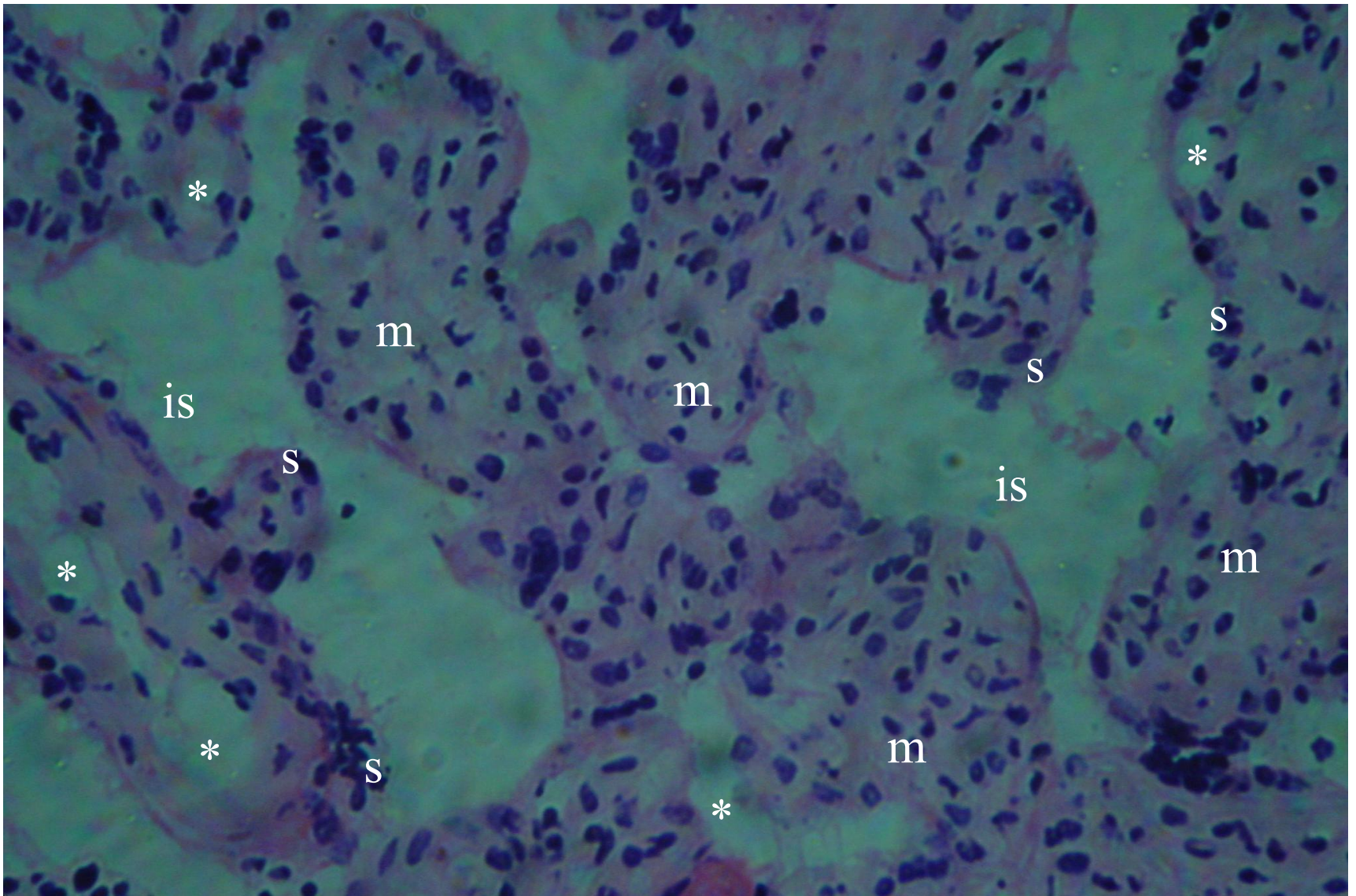


Figura V.1. Corte histológico de vellosidades coriónicas en una placenta a término derivada de un embarazo normal. El tejido de la placenta está teñido con hematoxilina y eosina (las abreviaturas de esta figura y de las siguientes son: * vasos sanguíneos; s sincitiotrofoblasto; m mesénquima y is espacio intervilloso).

ZO 1

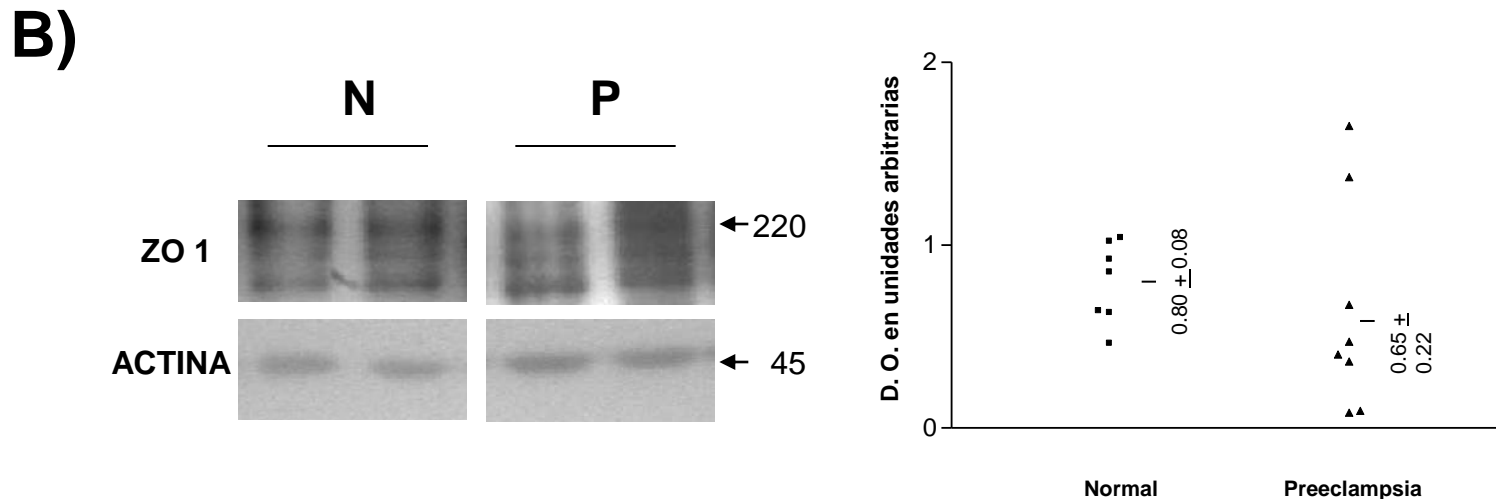
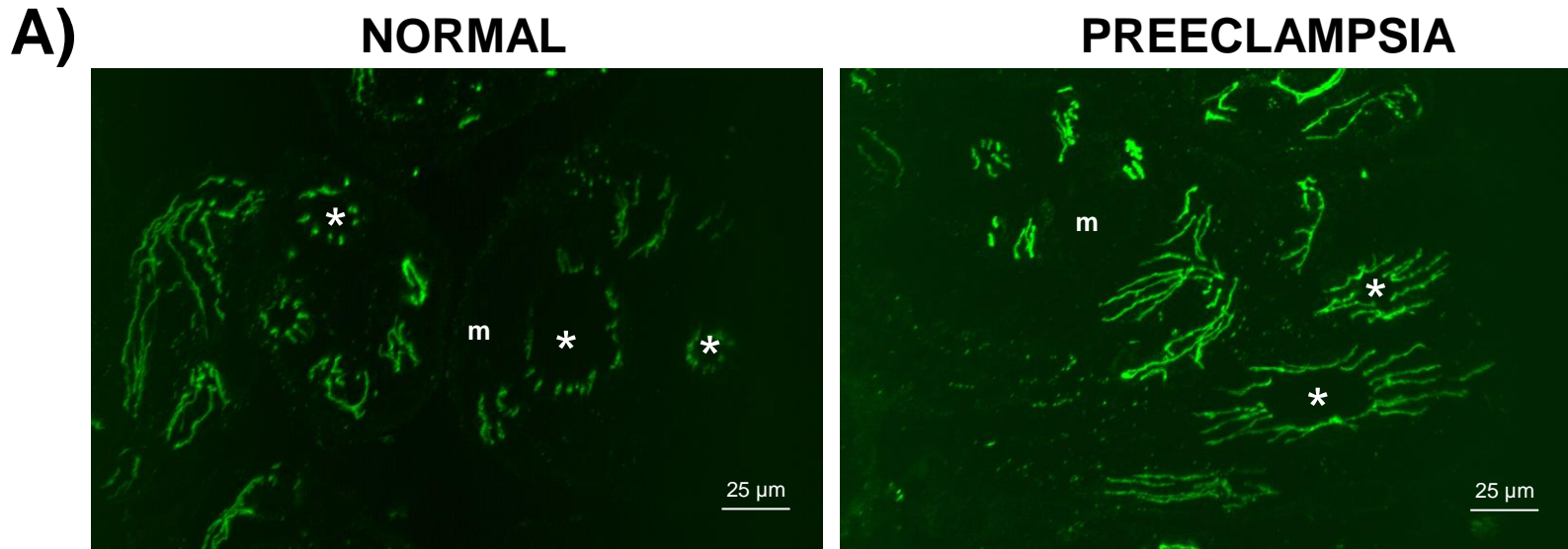


Figura V. 2. ZO-1 se encuentra conspicuamente en las células endoteliales de la placenta normal y con preeclampsia. A. Imágenes de inmunofluorescencia, la placenta se incubó con anticuerpos específicos anti ZO-1. **B.** Análisis de Western blot. Gel representativo con muestras de dos pacientes sanas (N) y con preeclampsia (P), el peso de la banda se expresa en kDa. La gráfica de la derecha muestra el análisis densitométrico de todas las muestras analizadas, cada punto en la gráfica representa un caso individual (valor promedio \pm error standar)

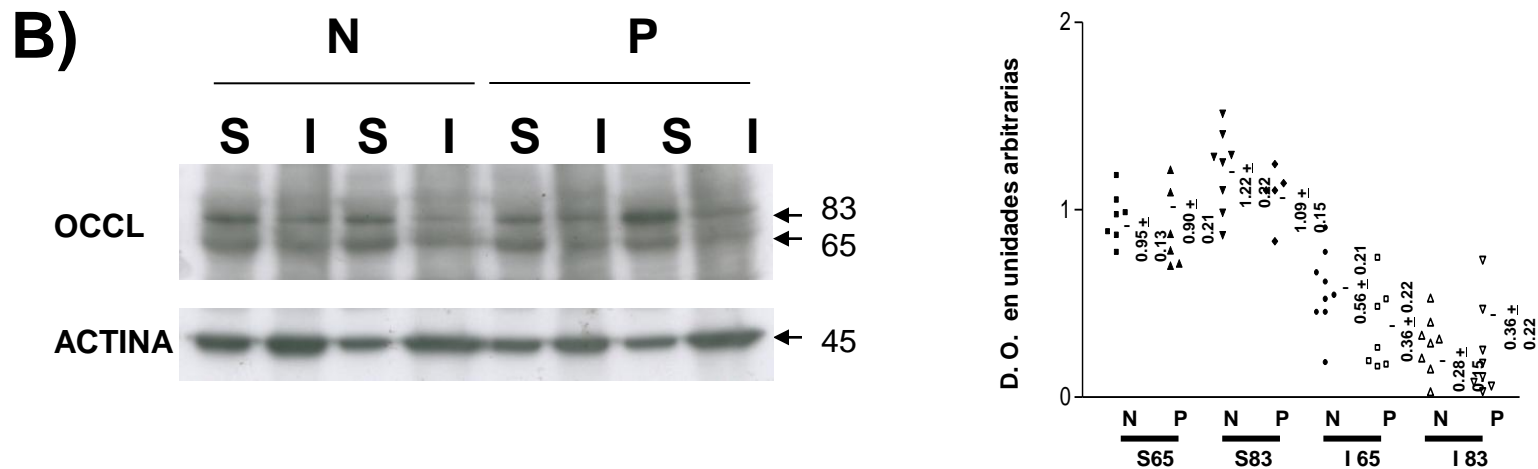
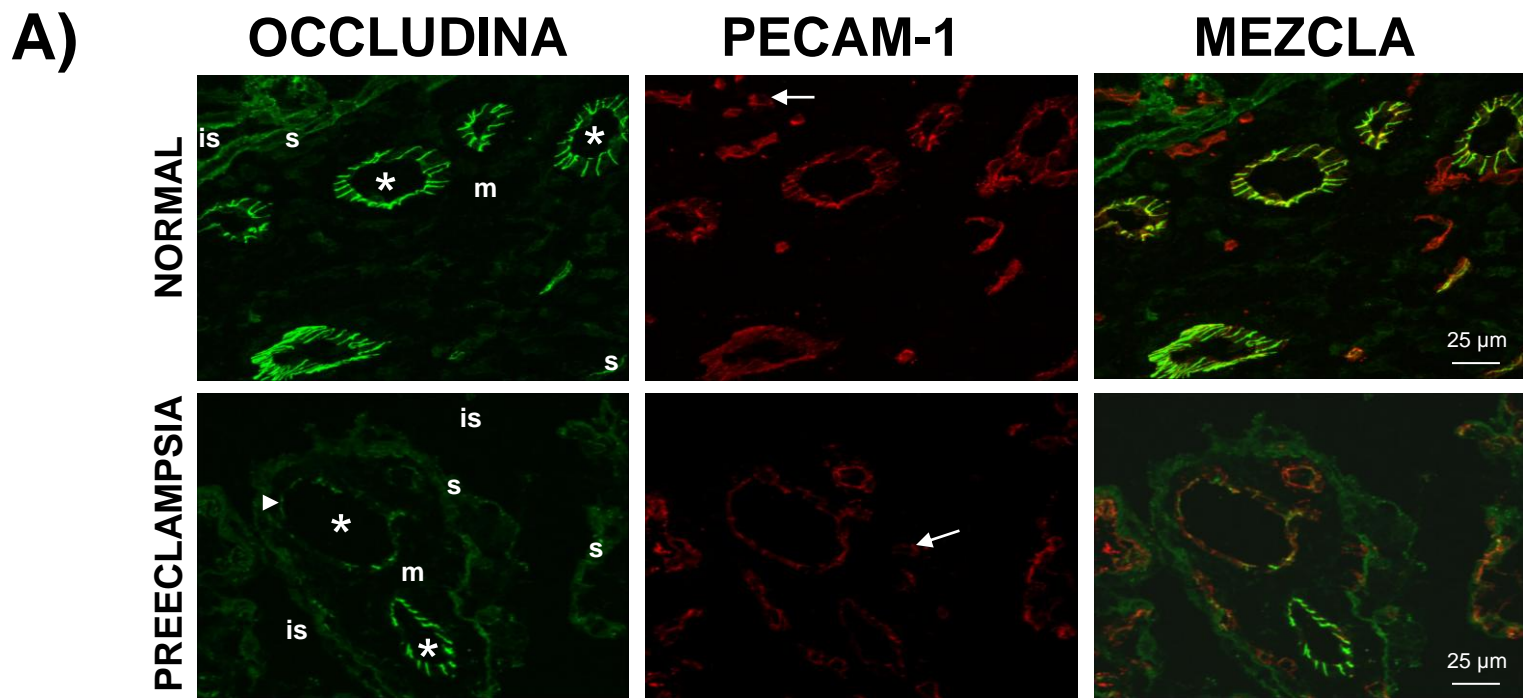


Figura V. 3. Las placentas derivadas de mujeres sanas y con preeclampsia muestran un patrón similar de occludina. A. Imágenes de inmunofluorescencia. Las placentas se trataron con anticuerpos específicos contra occludina y PECAM-1. Las flechas indican a los vasos sanguíneos de menor tamaño positivos para PECAM-1 y negativos para occludina. **B** Análisis de Western blot. Al lado izquierdo se presenta un gel representativo de pacientes sanas (N) y con preeclampsia (P). S, fracción soluble en Tritón X-100; I, fracción insoluble en Tritón X-100. Se detectaron dos bandas de 65 y 83 kDa en las fracciones S e I. La gráfica de la derecha muestra el análisis densitométrico de todas las muestras analizadas. Cada punto de la gráfica corresponde a un individuo (valor promedio ± error estándar)

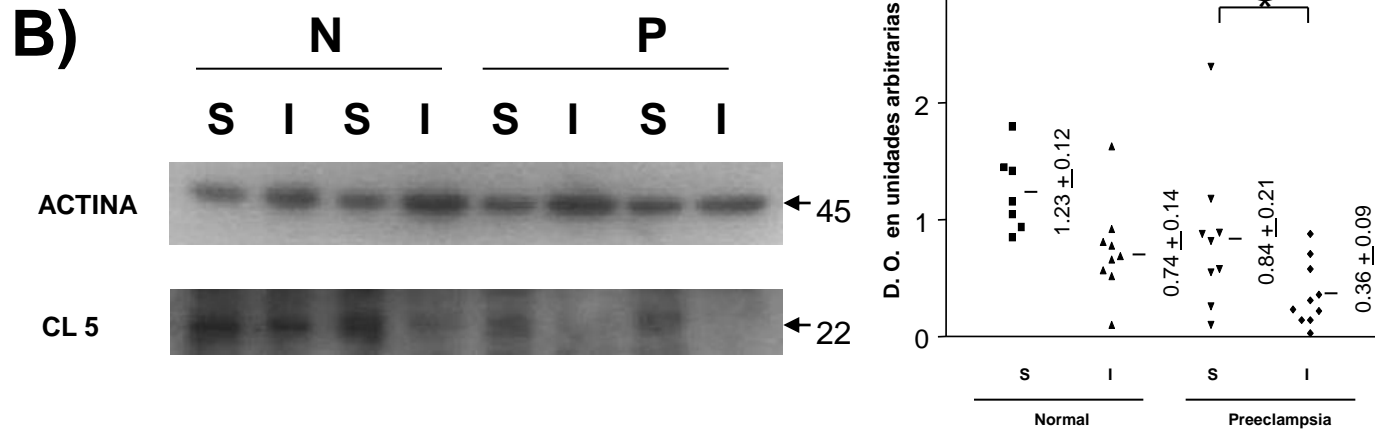
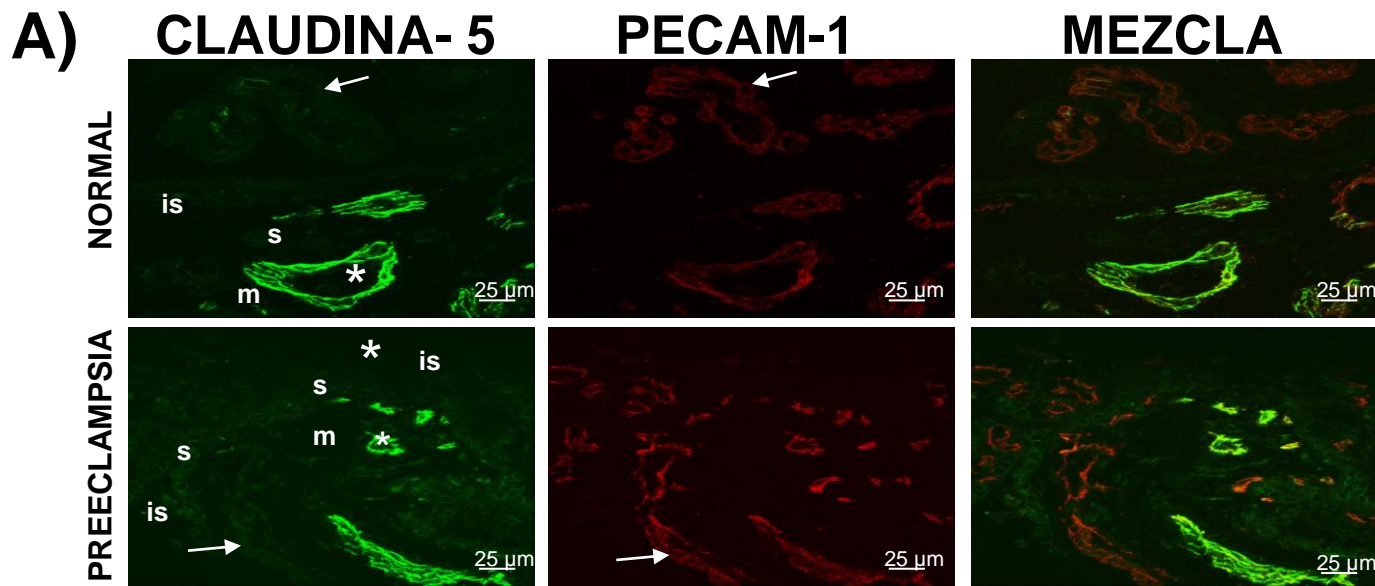


Figura V. 4. La claudina 5 se localiza en los endotelios de las placentas normales y con preeclampsia, pero en las últimas, es menor la cantidad de claudina 5 presente en la fracción insoluble en Tritón X-100. A. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran un patrón conspicuo y en forma de palizada de claudina 5 en los vasos de la placenta derivadas tanto de las pacientes sanas como de aquellas con preeclampsia. Sin embargo, en ambas condiciones varios vasos identificados con PECAM-1 no son reactivos al anticuerpo de claudina 5 (flechas). **B.** Análisis de Western blot, a la izquierda se muestra un gel representativo de las pacientes con embarazos normales (N) y aquellas con preeclampsia (P). Hay que hacer notar la pequeña cantidad de la claudina 5 presente en la fracción insoluble (I) a Tritón X-100 comparada con la fracción soluble (S) y la disminución significativa en la cantidad de claudina 5 en la fracción insoluble de las muestras de placentas con preeclampsia. En el panel derecho se muestra la gráfica correspondiente al análisis densitométrico de todas las muestras analizadas. Cada punto de la gráfica corresponde a un individuo (valor promedio ± error estándar) * $p < 0.05$; test-t Student's.1

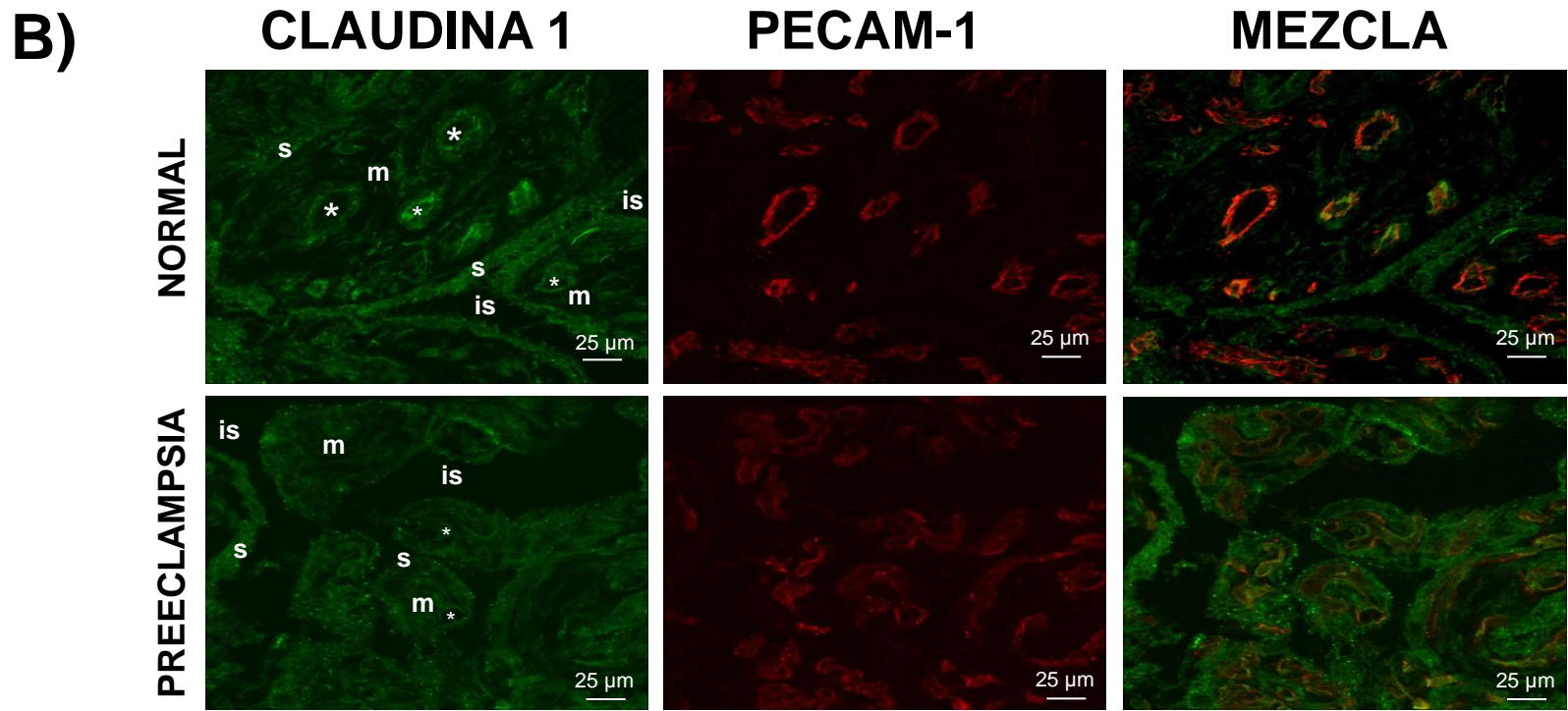
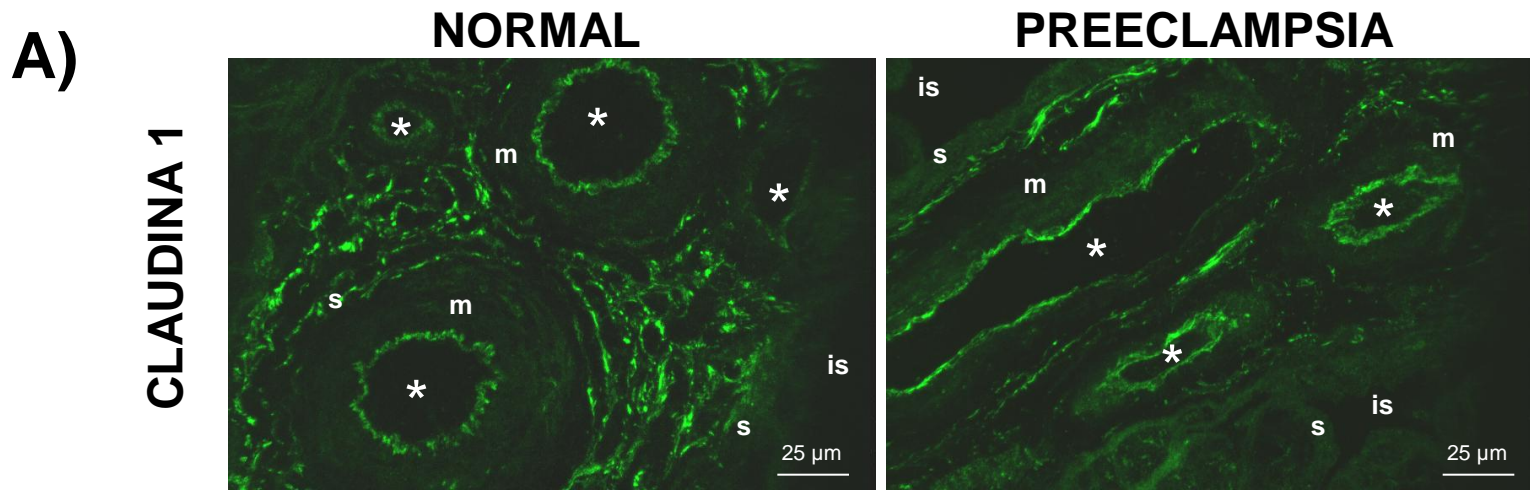


Figura 6

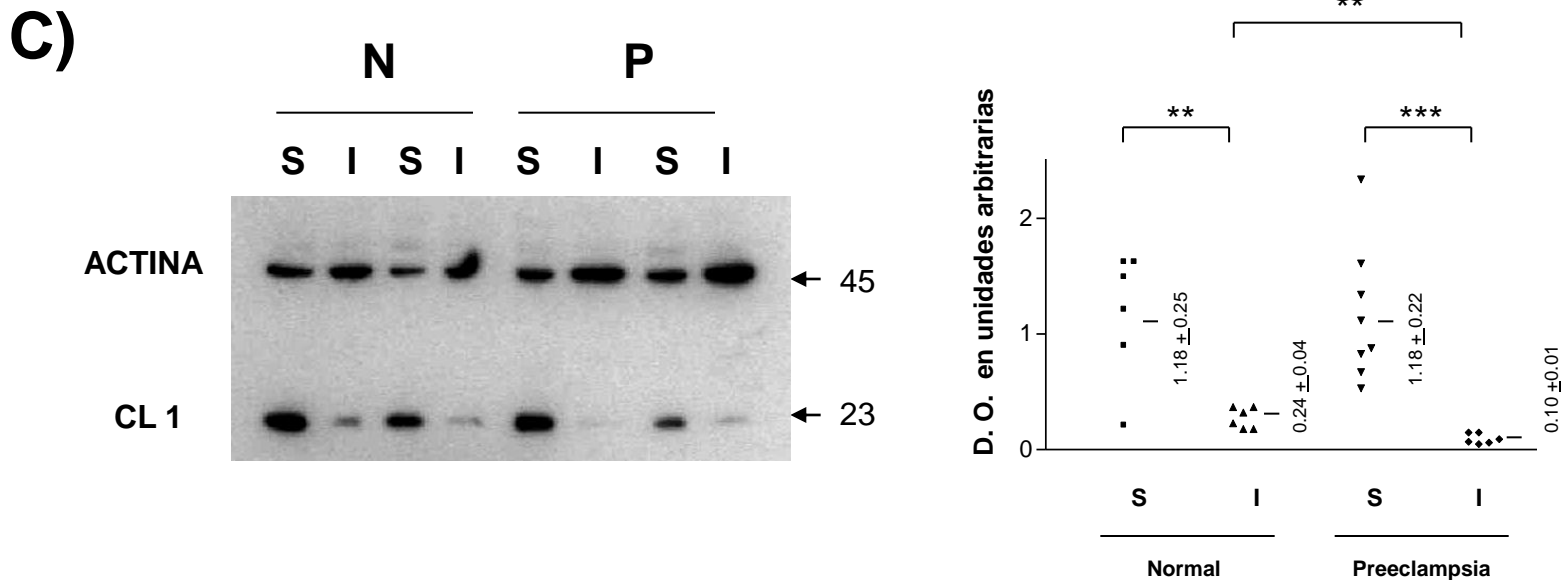


Figura V. 6. En las placentas derivadas de pacientes sanas y con preeclampsia la claudina 1 tiene una fuerte inmunoreactividad en los vasos de gran calibre, pero su señal es apenas perceptible en los capilares terminales vellosos. A La marca de claudina 1 se observa a lo largo de los vasos sanguíneos en la vellosidad coriónica de placentas normales y con preeclampsia. **B** en vasos sanguíneos de menor diámetro detectados por su inmunoreactividad por PECAM-1 la señal de claudina 1 es muy baja. **C** El análisis por Western blot muestra una cantidad menor de claudina 1 en la fracción insoluble que en la fracción soluble, así mismo, la cantidad de claudina 1 disminuye en la fracción insoluble de las placentas con preeclampsia. En el panel izquierdo se representa un gel con muestras de varias pacientes con embarazos normales (N) y con preeclampsia (P). En el panel de la derecha observamos una gráfica con el análisis densitométrico de todas las muestras analizadas. Cada punto representa a una paciente. (valor promedio \pm error estándar) ****** $p \leq 0.001$; test-t Student's.

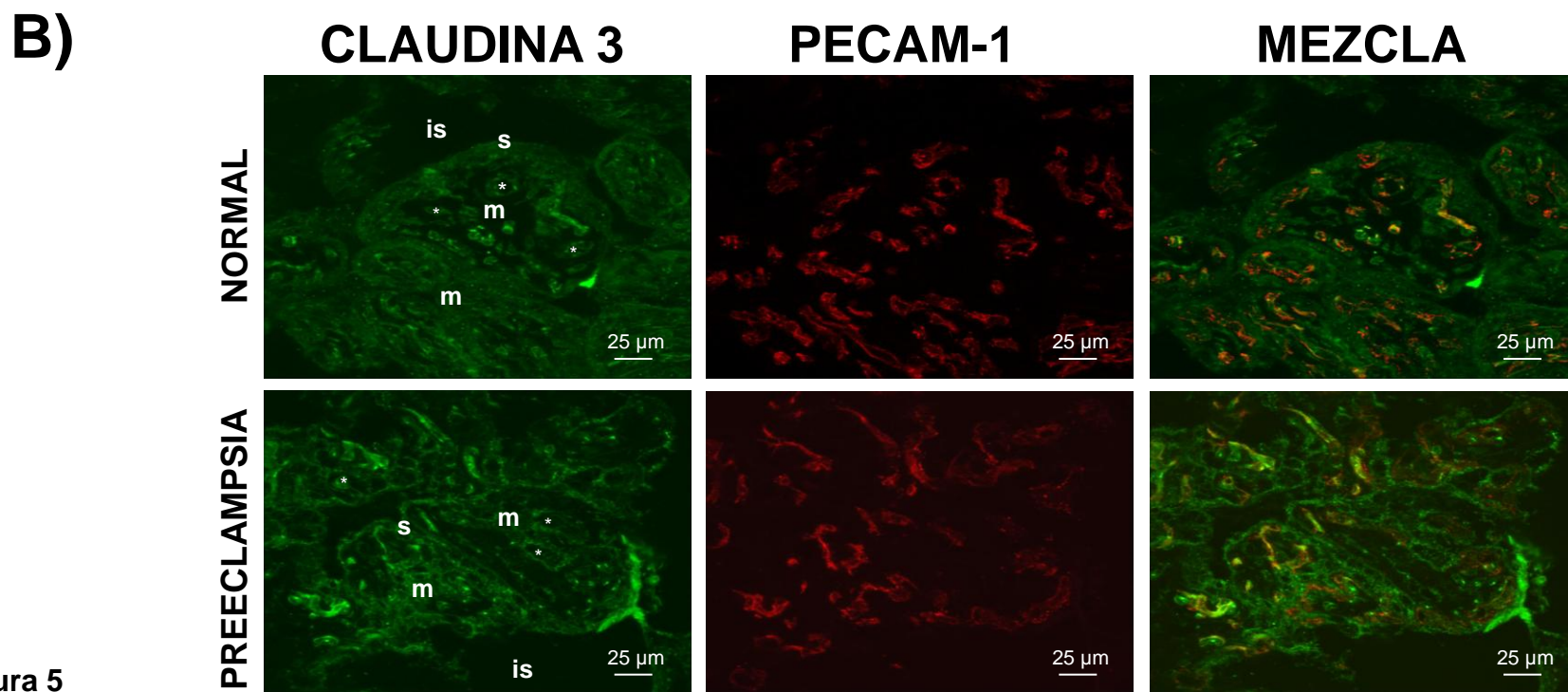
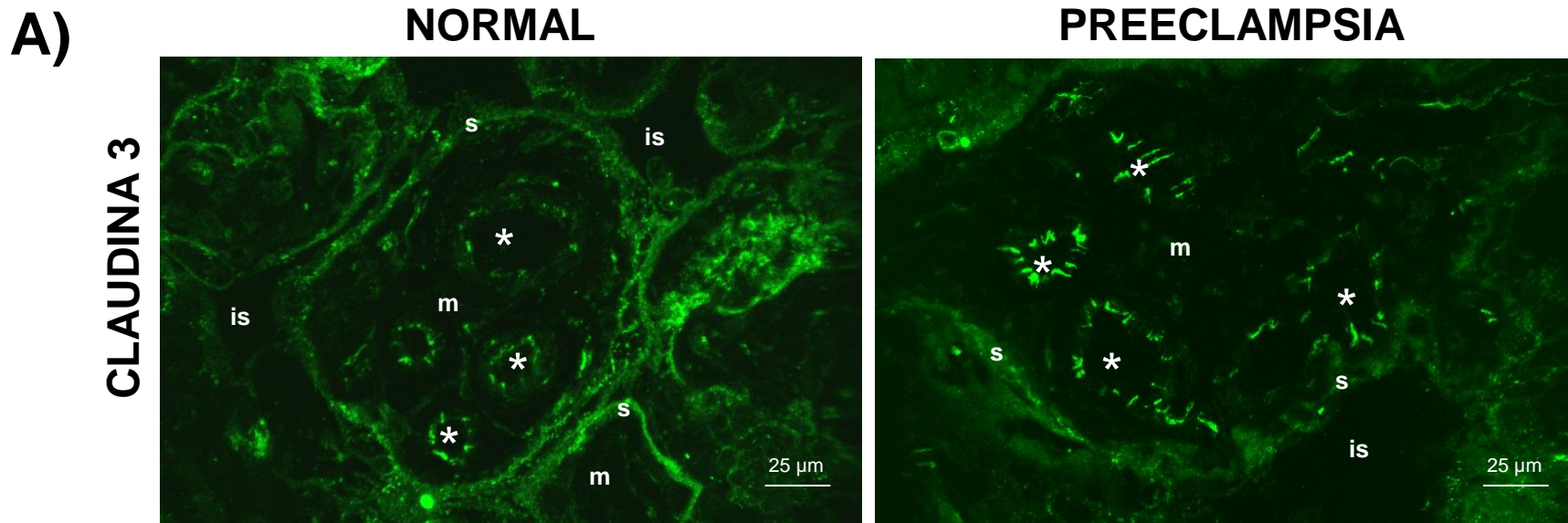


Figura 5

C)

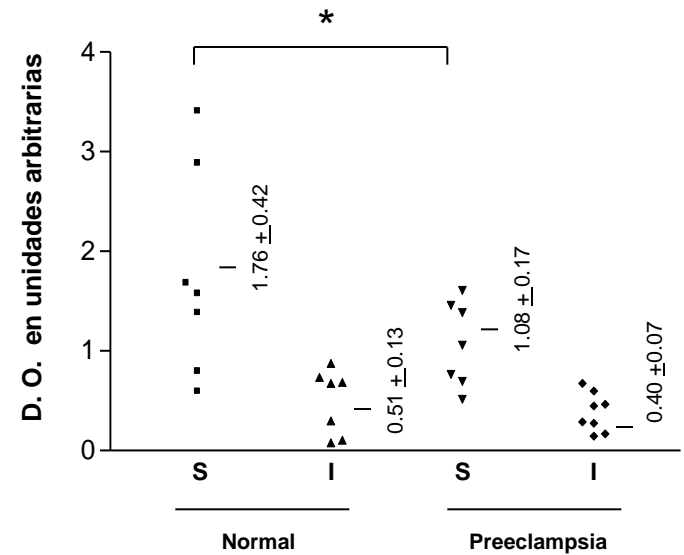
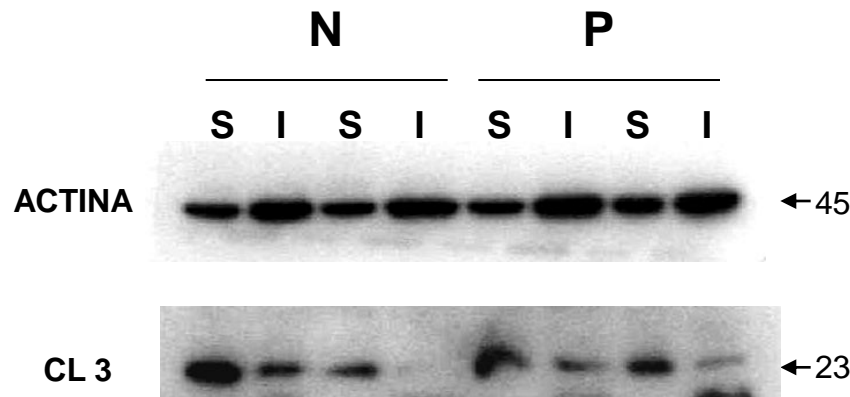


Figura V. 5. La claudina 3 se localiza a todo lo largo de los vasos sanguíneos de la placenta normal y con preeclampsia, aunque es menor la cantidad de la claudina 3 presente en la fracción soluble en Tritón X-100 en las pacientes con preeclampsia. A y B. Por inmunofluorescencia la claudina 3 presenta un patrón en forma de palizada en los vasos sanguíneos de la placenta. En los capilares terminales identificados por PECAM-1 es poco visible la claudina 3 tanto en la placenta de mujeres sanas como en las placentas con preeclampsia. **C.** El análisis de Western blot presenta una ligera disminución en la cantidad de claudina 3 presente en la fracción soluble en las placentas con preeclampsia. En el panel izquierdo se presenta un gel representativo de muestras derivadas de varias pacientes sanas (N) y con preeclampsia (P). A la derecha se muestra una gráfica con el análisis densitométrico de todas las muestras. Cada punto en la gráfica corresponde a un individuo (valor promedio \pm error estándar) * $p \leq 0.05$; test-t Student's

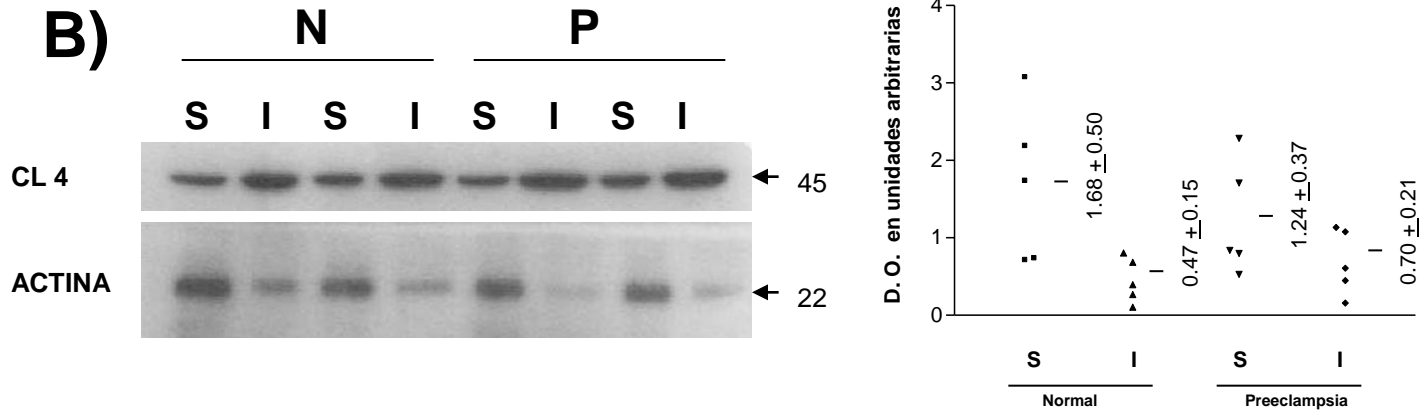
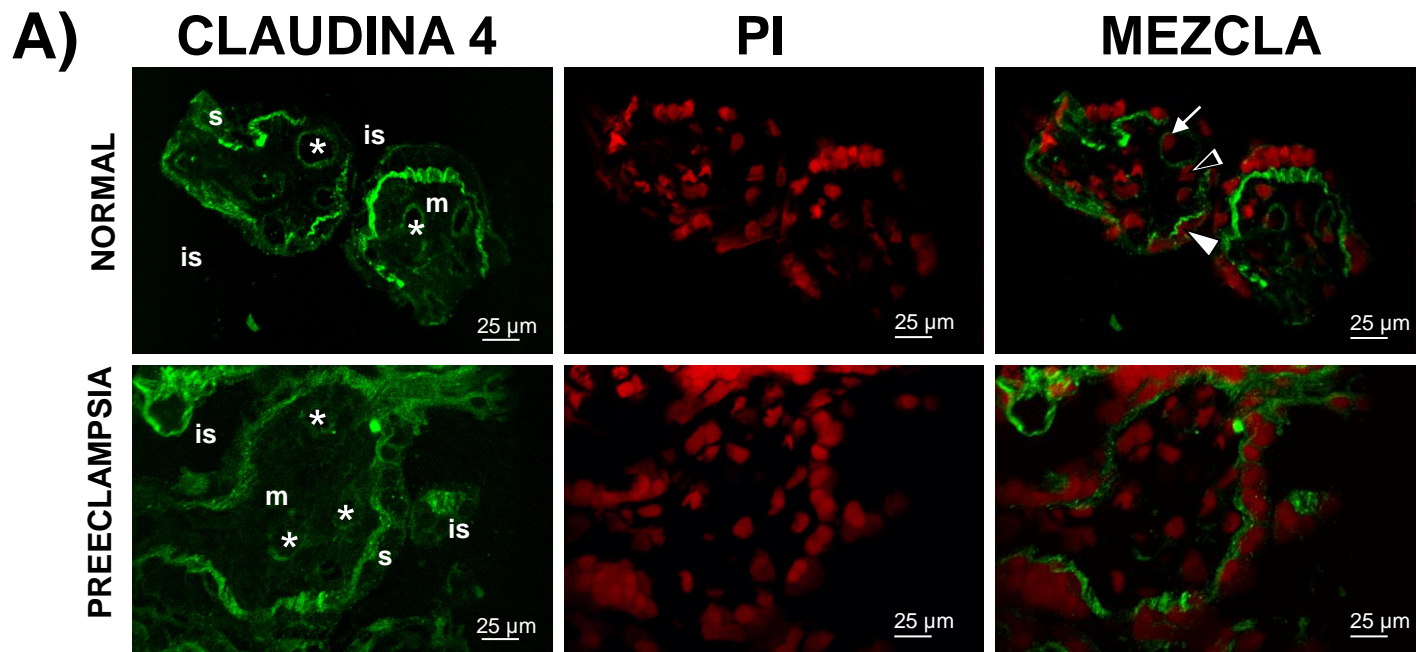


Figura V. 7. En las placentas derivadas de mujeres sanas y con preeclampsia la claudina 4 no se detecta en los vasos sanguíneos, sin embargo esta presente en el borde entre el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto. A. En las muestras co-teñidas con anticuerpos anti-claudina-4 y con yoduro de propidio para la identificación de los núcleos, se observa claudina 4 en el límite entre la capa del sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto. Solamente hay una pequeña inmunodetección de claudina 4 en los vasos sanguíneos (flechas, núcleo de las células endoteliales; cabeza de flecha llena, núcleo del sincitiotrofoblasto; cabezas de flechas vacías, núcleo de las células del citotrofoblasto). **B.** El análisis de Western blot no muestra diferencia significativa en la cantidad de claudina 4 tanto en la placenta normal como en la preeclampsia. El panel izquierdo ilustra un gel representativo con muestras de varias pacientes sanas (N) y con preeclampsia (P). A la derecha vemos el análisis densitométrico de todas las muestras analizadas. Cada punto en la gráfica corresponde a una paciente (valor promedio ± error estándar)

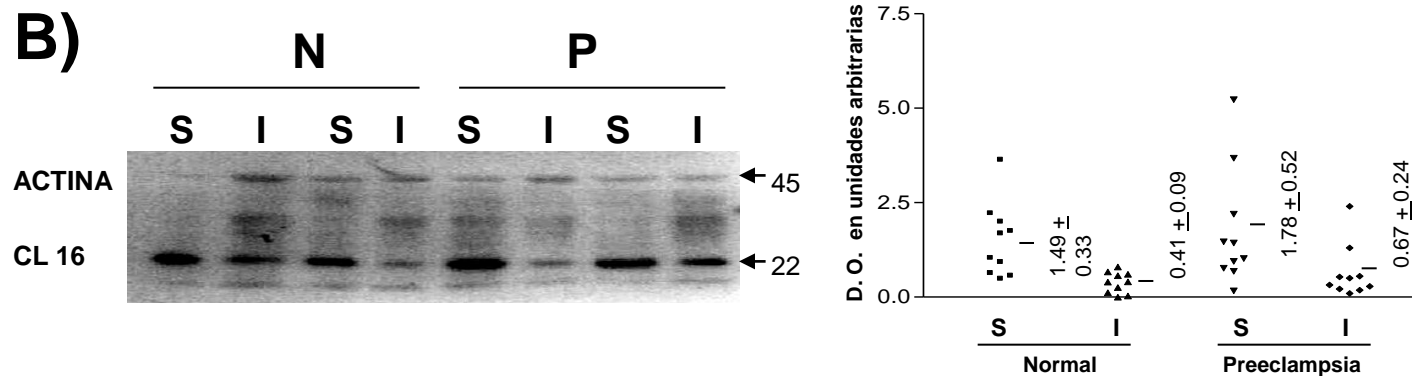
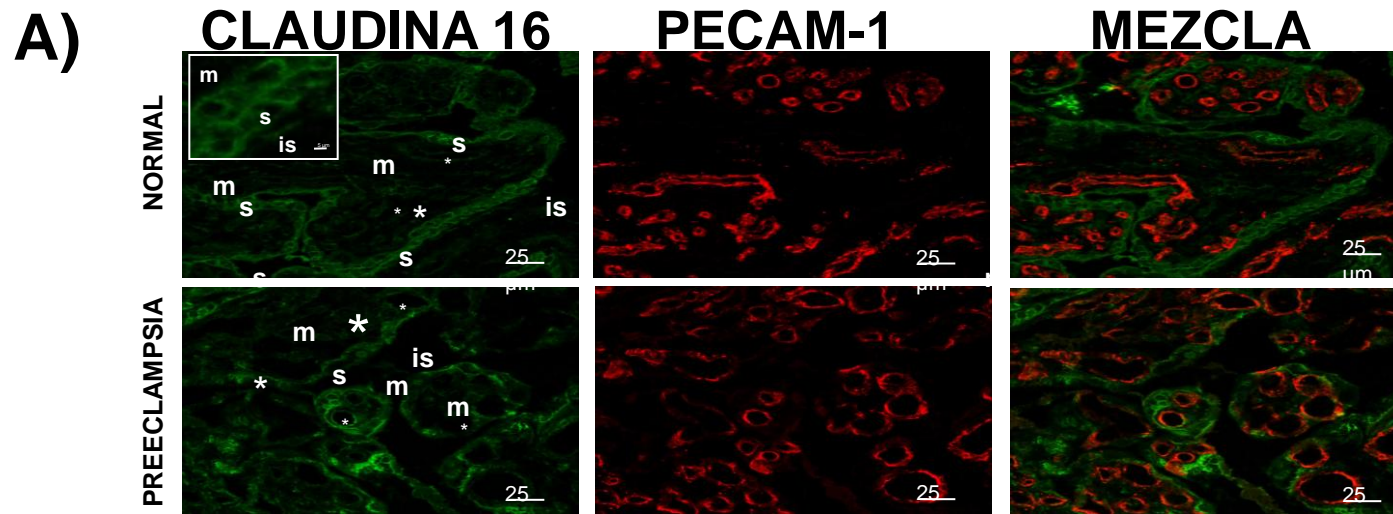


Figura V. 8. La claudina 16 está ausente de los vasos sanguíneos de la placenta, mientras que tienen una inmunoreacción muy pronunciada con la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto. A. La claudina-16 no se detecta en el endotelio placentario, el cual es identificado por PECAM-1. Sin embargo, la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto de la placenta de los embarazos normales es positiva para claudina 16. *Inserto:* Imagen ampliada del sincitiotrofoblasto. En placentas con preeclampsia el patrón de la claudina 16 es menos definido en la membrana del sincitiotrofoblasto. **B.** El análisis por Western blot no muestra diferencia en la cantidad de claudina-16 entre las placentas normales y las de preeclampsia. A la izquierda observamos un gel representativo con las muestras de placentas de pacientes sanas (N) y pacientes con preeclampsia (P). En el panel de la derecha tenemos el análisis densitométrico de todas las muestras. Cada punto en la gráfica corresponde a una paciente (valor promedio ± error estándar).

B)

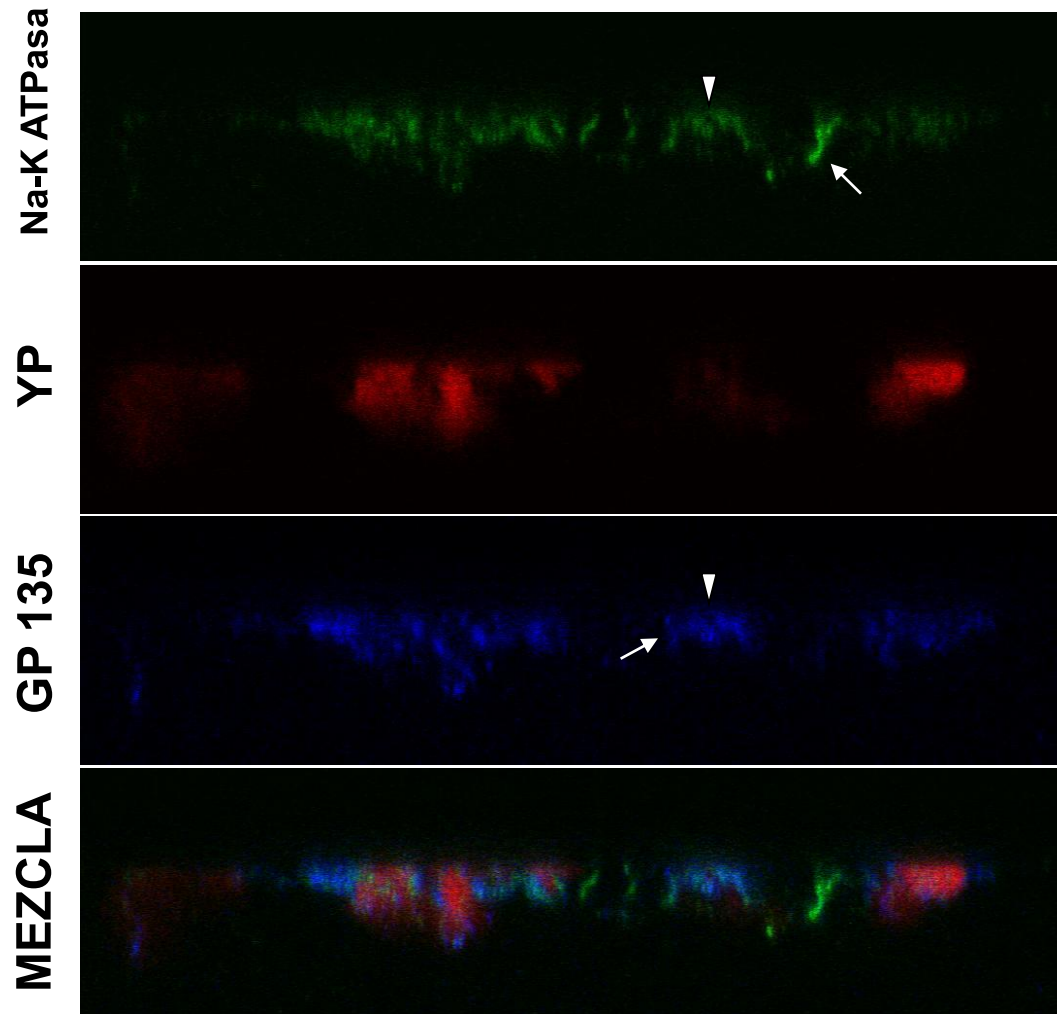


Figura V. 11. B. Secciones de microscopía confocal en el plano xz. GP135 se concentra en la superficie apical (cabeza de flecha) aunque también se detecta cierta marca en la superficie lateral (flecha).

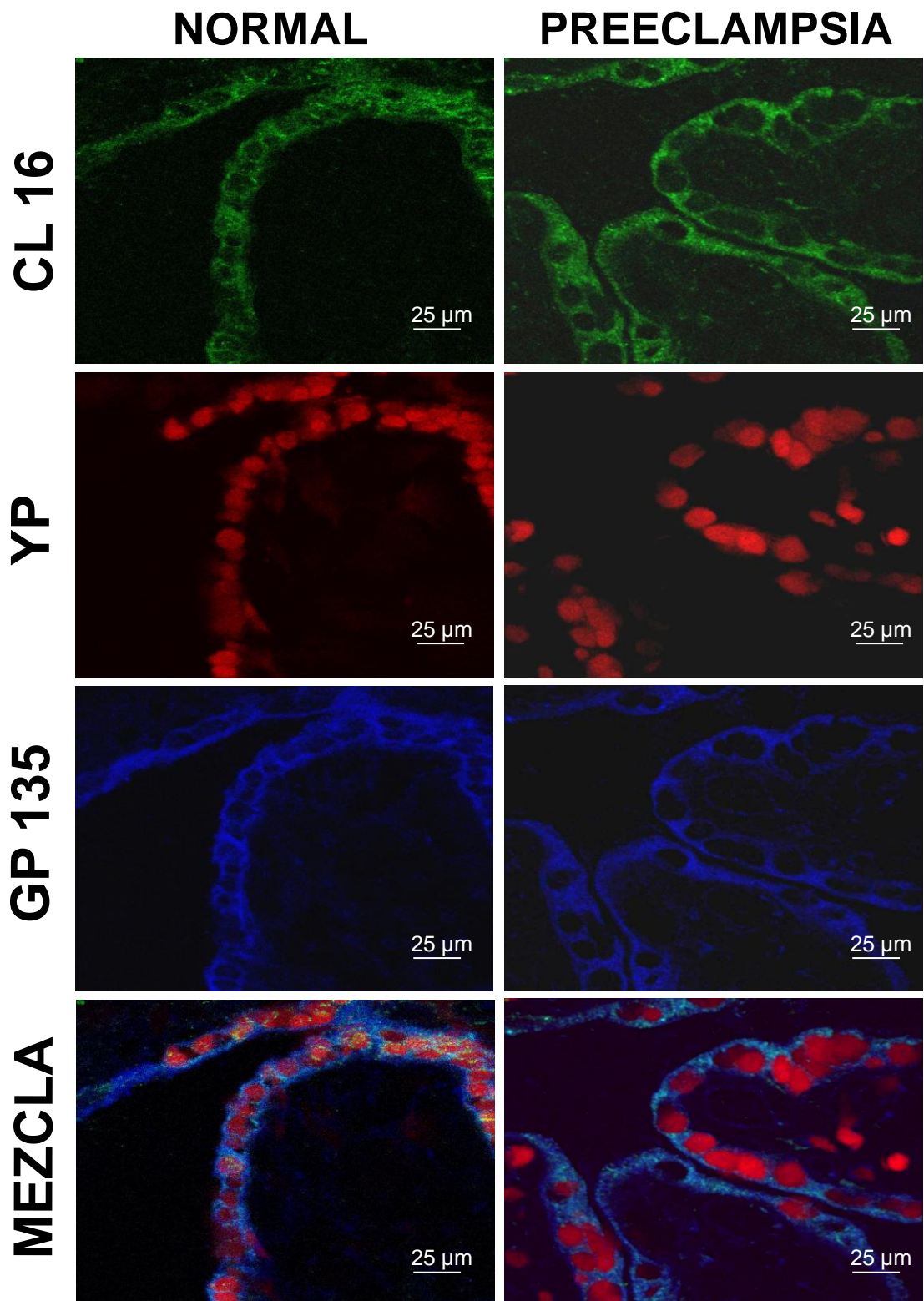


Figura V. 9. La claudina-16 colocaliza con la proteína de membrana GP135 en el sincitiotrofoblasto de las placentas de las pacientes sanas y con preeclampsia. El tejido placentario fue tratado con yoduro de propidio (YP) para la identificación de los núcleos y con los anticuerpos contra claudina-16 y GP135

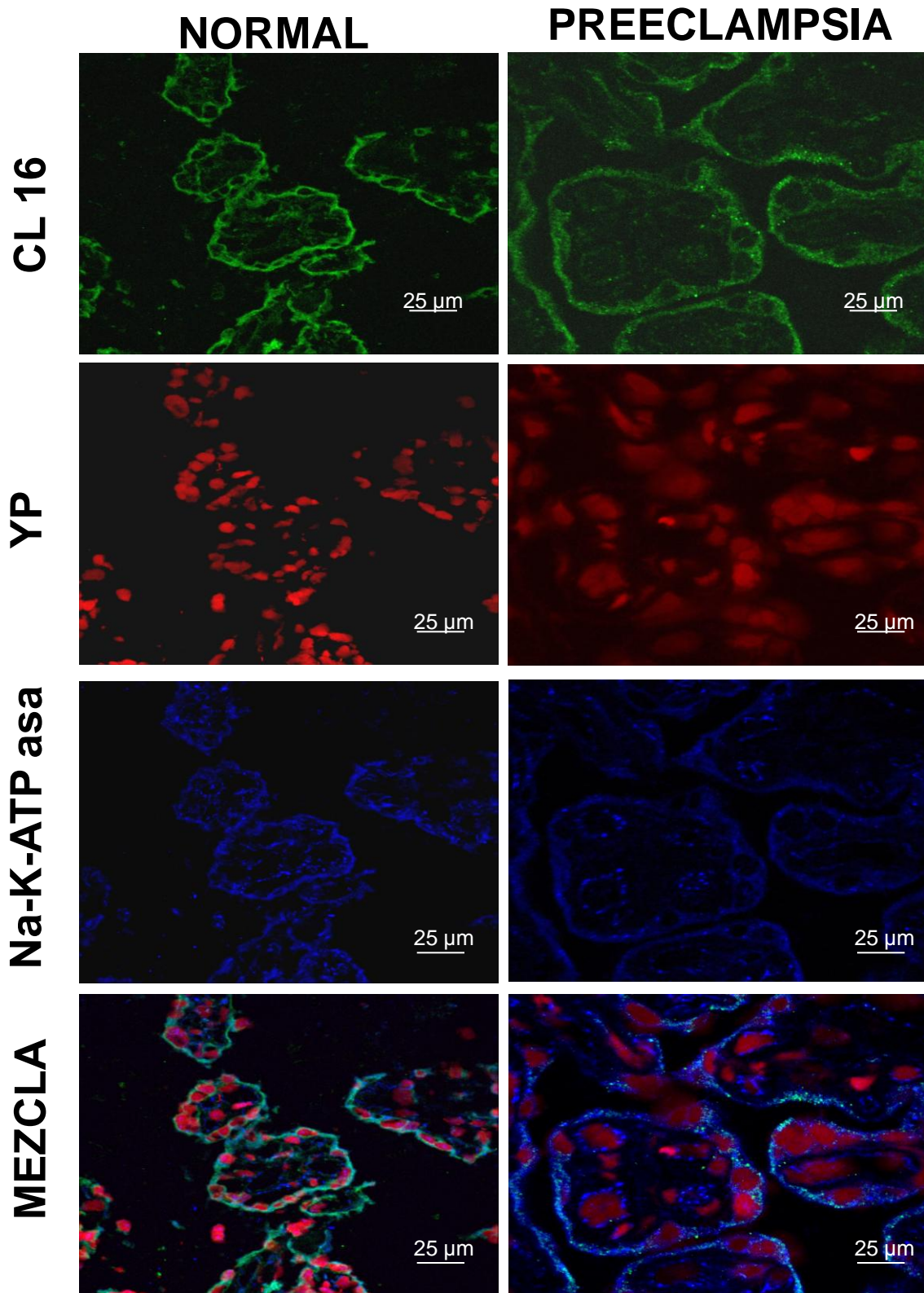


Figura V. 10. La claudina 16 colocaliza con la proteína de la membrana plasmática Na⁺K⁺ATPasa en el sincitiotrofoblasto de las placentas de mujeres sanas y con preeclampsia. La placenta fue tratada con yoduro de propidio (YP) para la identificación de los núcleos y con los anticuerpos contra claudina-16 y Na⁺K⁺ATPasa,

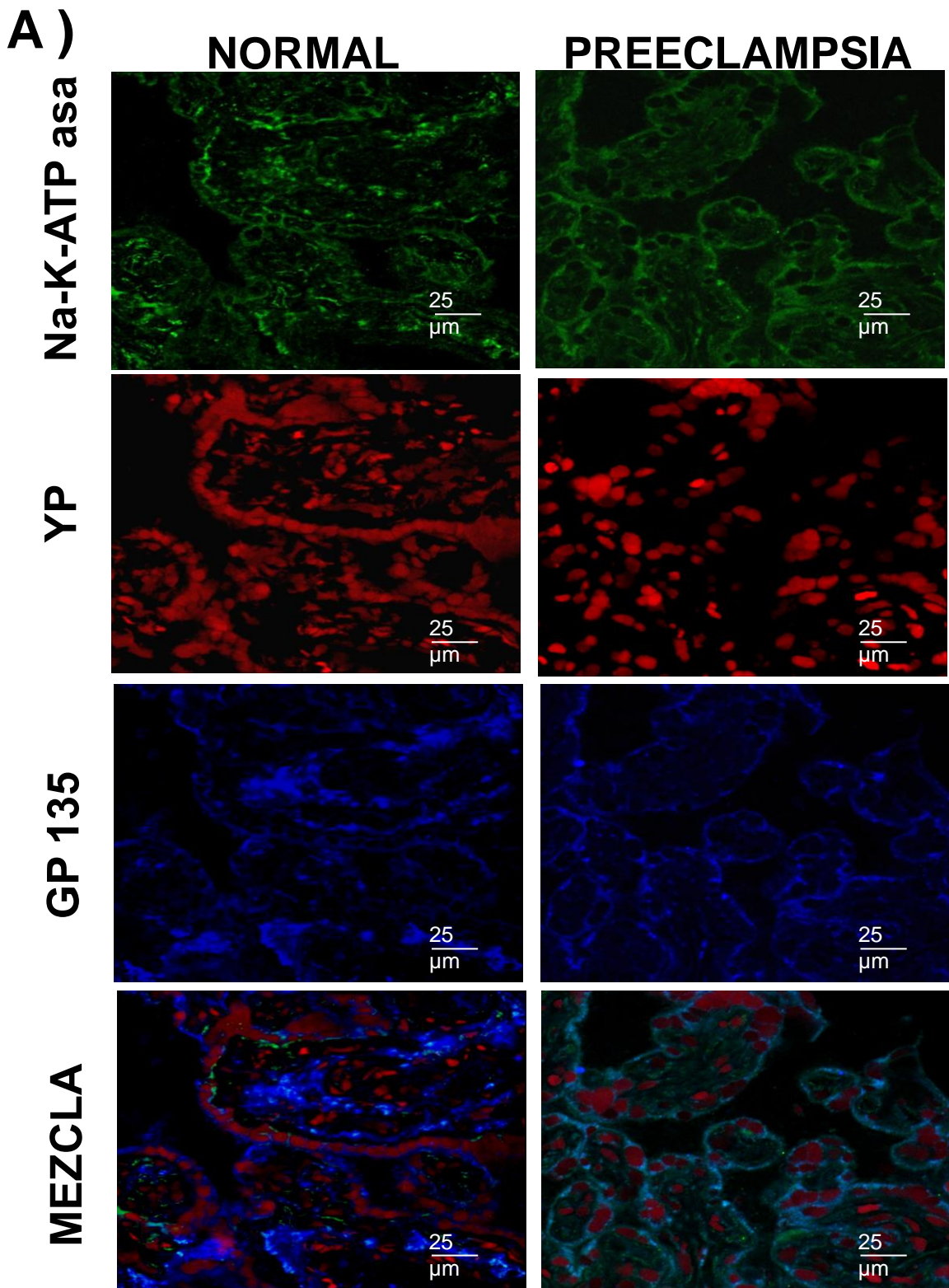


Figura V. 11. Na⁺K⁺ATPasa y GP 135 muestran un patrón de distribución polarizado en la membrana plasmática del sincitiotrofoblasto. El tejido placentario se trató con yoduro de propidio (YP) para la identificación de los núcleos y con anticuerpos contra Na⁺K⁺ATPasa y GP135. A Secciones de microscopía confocal.

NORMAL

PREECLAMPSIA

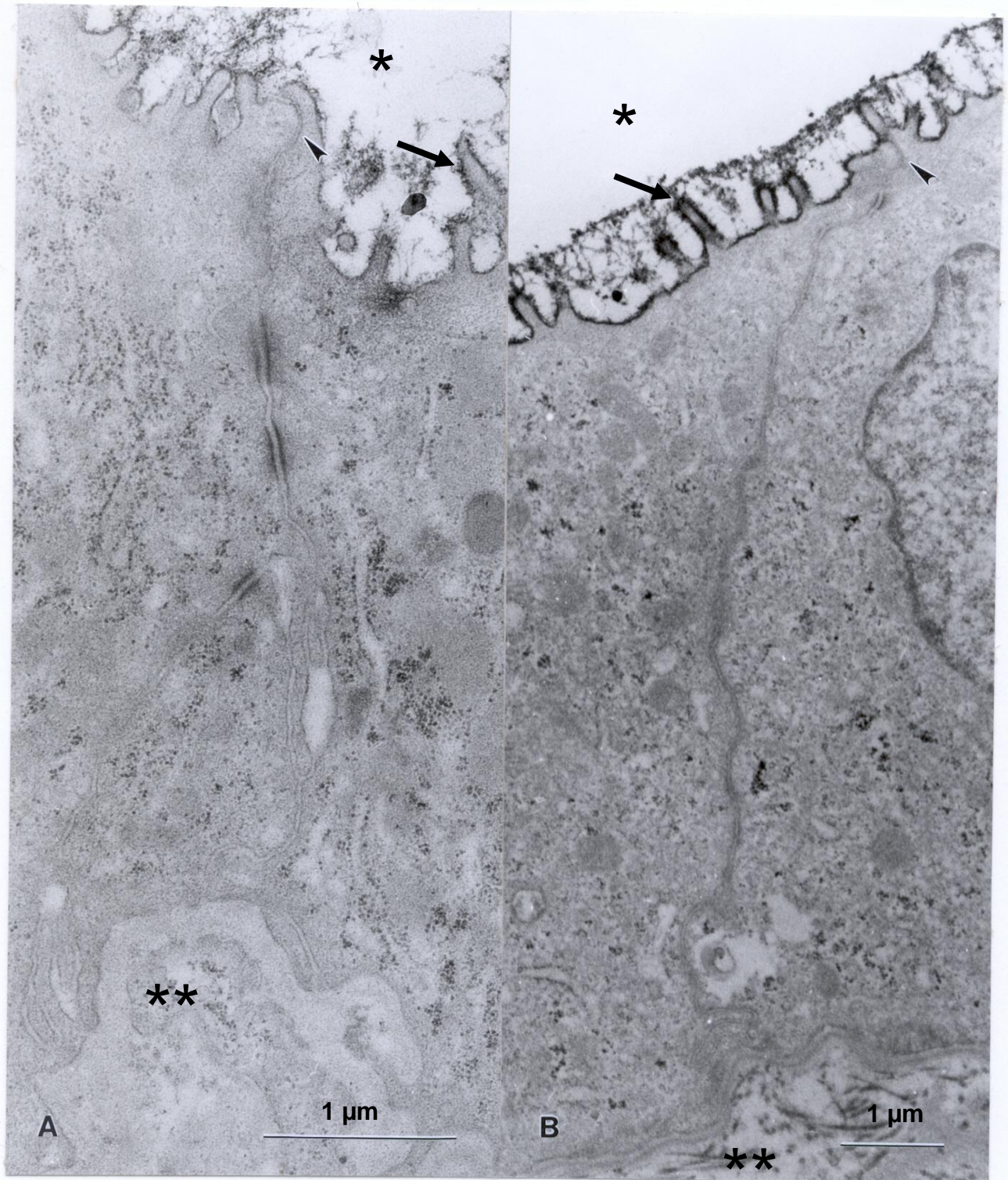


Figura V. 12. La ruta paracelular del sincitiotrofoblasto regulada por las uniones estrechas conecta al intersticio fetal con la sangre materna. Las placentas de mujeres sanas (A) y con preeclampsia (B) fueron tratadas con rojo de rutenio y procesadas por microscopía electrónica. El marcador electrodenso se detecta en las microvellosidades del sincitiotrofoblasto (flechas) pero su paso por la ruta paracelular fue bloqueado por la UE. (* sangre materna; ** compartimento extracelular fetal localizado por debajo del sincitiotrofoblasto).

REFERENCIAS

- (1995) Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. *Lancet* 345:1455-1463
- (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 99:159-167
- (2000) Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 183:S1-S22
- Proyecciones de la población de Mexico 1996-2050. Consejo Nacional de Población, México . 1998.
Ref Type: Electronic Citation
- AbouZahr C (1998a) Antepartum and postpartum haemorrhage. In: Murray CJL LA (ed) Health dimensions of sex and reproduction: The global burden of sexually transmitted diseases, HIV, maternal conditions, perinatal disorders and congenital anomalies. vol III. Harvard School of Public Health, Cambridge, MA, pp. 165-189
- AbouZahr C (2003) Global burden of maternal death and disability. In: Rodeck C. (ed) Reducing maternal death and disability in pregnancy. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 1-11
- AbouZahr C AEGR (1998b) Puerperal sepsis and other puerperal infections. Health dimensions of sex and reproduction: The global burden of sexually transmitted diseases, HIV, maternal conditions, perinatal disorders and congenital anomalies. Harvard School of Public Health, Cambridge, MA, pp. 191-217
- AbouZahr C GR (1998c) Hypertensive disorders of pregnancy. In: Murray CJL LA (ed) Health dimensions of sex and reproduction: the global burden of sexually transmitted diseases, HIV, maternal conditions, perinatal disorders and congenital anomalies. vol III. Harvard School of Public Health, Cambridge, MA., pp. 219-241
- Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, Wang E, Rojas R, Birder L, Apodaca G (2004) Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F305-F318
- Adam B, Malatyalioglu E, Alvur M, Talu C (2001) Magnesium, zinc and iron levels in pre-eclampsia. *J Matern Fetal Med* 10:246-250
- Adams CL, Nelson WJ, Smith SJ (1996) Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135:1899-1911
- Adriaanse AH, Pel M, Bleker OP (2000) Semmelweis: the combat against puerperal fever. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 90:153-158
- Altman D, Carroli G, Duley L, Farrell B, Moodley J, Neilson J, Smith D (2002) Do women with pre-eclampsia, and their babies, benefit from magnesium sulphate? The Magpie Trial: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 359:1877-1890
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969-4976
- Anderson JM (1996) Cell signalling: MAGUK magic. *Curr Biol* 6:382-384

- Asakura T, Nakanishi H, Sakisaka T, Takahashi K, Mandai K, Nishimura M, Sasaki T, Takai Y (1999) Similar and differential behaviour between the nectin-afadin-ponsin and cadherin-catenin systems during the formation and disruption of the polarized junctional alignment in epithelial cells. *Genes Cells* 4:573-581
- Balda MS, Anderson JM, Matter K (1996a) The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett* 399:326-332
- Balda MS, Garrett MD, Matter K (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol* 160:423-432
- Balda MS, Matter K (2000b) Transmembrane proteins of tight junctions. *Semin Cell Dev Biol* 11:281-289
- Balda MS, Matter K (2000a) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J* 19:2024-2033
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K (1996b) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134:1031-1049
- Ballegeer V, Spitz B, Kieckens L, Moreau H, Van AA, Collen D (1989) Predictive value of increased plasma levels of fibronectin in gestational hypertension. *Am J Obstet Gynecol* 161:432-436
- Bazzoni G, Dejana E (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869-901
- Beatch M, Jesaitis LA, Gallin WJ, Goodenough DA, Stevenson BR (1996) The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region. *J Biol Chem* 271:25723-25726
- Beilin Y, Zahn J, Comerford M (1997) Safe epidural analgesia in thirty parturients with platelet counts between 69,000 and 98,000 mm⁻³. *Anesth Analg* 85:385-388
- Belfort MA, Anthony J, Saade GR, Allen JC, Jr. (2003) A comparison of magnesium sulfate and nimodipine for the prevention of eclampsia. *N Engl J Med* 348:304-311
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB (2003a) Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12:2049-2061
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB (2003b) Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12:2049-2061
- Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, Gonzalez-Mariscal L (2004) The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292:51-66
- Bezprozvanny I, Maximov A (2001) Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* 509:457-462
- Bobadilla JL, Reyes FS, Karchmer S (1996) [Magnitude and causes of maternal mortality in the Federal District (1988-1989)]. *Gac Med Mex* 132:5-16

- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG (1972) The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu* 1:177-191
- Campbell DM, MacGillivray I, Carr-Hill R (1985) Pre-eclampsia in second pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 92:131-140
- Cerejido M, Contreras RG, Gonzalez-Mariscal L (1989) Development and alteration of polarity. *Annu Rev Physiol* 51:785-795
- Cerejido M, Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Gallardo JM, Garcia-Villegas R, Valdes J (1993) The making of a tight junction. *J Cell Sci Suppl* 17:127-132
- Ceron-Mireles P, Harlow SD, Sanchez-Carrillo CI, Nunez RM (2001) Risk factors for pre-eclampsia/eclampsia among working women in Mexico City. *Paediatr Perinat Epidemiol* 15:40-46
- Chalcroft JP, Bullivant S (1970) An interpretation of liver cell membrane and junction structure based on observation of freeze-fracture replicas of both sides of the fracture. *J Cell Biol* 47:49-60
- Chapman AB, Abraham WT, Zamudio S, Coffin C, Merouani A, Young D, Johnson A, Osorio F, Goldberg C, Moore LG, Dahms T, Schrier RW (1998) Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney Int* 54:2056-2063
- Chen G, Wilson R, Wang SH, Zheng HZ, Walker JJ, McKillop JH (1996) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene polymorphism and expression in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol* 104:154-159
- Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA (2000) Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11:849-862
- CHESLEY LC, TALLEDO E, BOHLER CS, ZUSPAN FP (1965) VASCULAR REACTIVITY TO ANGIOTENSIN II AND NOREPINEPHRINE IN PREGNANT WOMEN. *Am J Obstet Gynecol* 91:837-842
- Chlenski A, Ketels KV, Korovaitseva GI, Talamonti MS, Oyasu R, Scarpelli DG (2000) Organization and expression of the human zo-2 gene (tjp-2) in normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta* 1493:319-324
- CHUN D, BRAGA C, CHOW C, LOK L (1964) CLINICAL OBSERVATIONS ON SOME ASPECTS OF HYDATIDIFORM MOLES. *J Obstet Gynaecol Br Commonw* 71:180-184
- Clapp JF, III, Capeless E (1997) Cardiovascular function before, during, and after the first and subsequent pregnancies. *Am J Cardiol* 80:1469-1473
- Clark DA (1994) Does immunological intercourse prevent pre-eclampsia? *Lancet* 344:969-970
- Claude P (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39:219-232
- Coetzee EJ, Dommissie J, Anthony J (1998) A randomised controlled trial of intravenous magnesium sulphate versus placebo in the management of women with severe pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 105:300-303
- Colbern GT, Chiang MH, Main EK (1994) Expression of the nonclassical histocompatibility antigen HLA-G by preeclamptic placenta. *Am J Obstet Gynecol* 170:1244-1250

Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson JM (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C142-C147

Colegio OR, Van IC, Rahner C, Anderson JM (2003) Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1346-C1354

Collins JR, Rizzolo LJ (1998) Protein-binding domains of the tight junction protein, ZO-2, are highly conserved between avian and mammalian species. *Biochem Biophys Res Commun* 252:617-622

Conradt A (1984) [Current concepts in the pathogenesis of gestosis with special reference to magnesium deficiency]. *Z Geburtshilfe Perinatol* 188:49-58

Conradt A, Weidinger H, Algayer H (1985) Magnesium therapy decreased the rate of intrauterine fetal retardation, premature rupture of membranes and premature delivery in risk pregnancies treated with betamimetics. *Magnesium* 4:20-28

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* 147:1569-1582

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

Crosby ET (1991) Obstetrical anaesthesia for patients with the syndrome of haemolysis, elevated liver enzymes and low platelets. *Can J Anaesth* 38:227-233

Cunningham FG, Fernandez CO, Hernandez C (1995) Blindness associated with preeclampsia and eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 172:1291-1298

Cunningham FG, Lindheimer MD (1992) Hypertension in pregnancy. *N Engl J Med* 326:927-932

Dalgarno DC, Botfield MC, Rickles RJ (1997) SH3 domains and drug design: ligands, structure, and biological function. *Biopolymers* 43:383-400

Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ (1992) Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 89:210-222

de Virgiliis G, Sideri M, Fumagalli G, Remotti G (1982) The junctional pattern of the human villous trophoblast. A freeze-fracture study. *Gynecol Obstet Invest* 14:263-272

Dekker GA (1999) Risk factors for preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 42:422-435

Dekker GA, Robillard PY, Hulsey TC (1998) Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. *Obstet Gynecol Surv* 53:377-382

Dekker GA, Sibai BM (1999) The immunology of preeclampsia. *Semin Perinatol* 23:24-33

Dekker GA, van Geijn HP (1996a) Endothelial dysfunction in preeclampsia. Part I: Primary prevention. Therapeutic perspectives. *J Perinat Med* 24:99-117

Dekker GA, van Geijn HP (1996b) Endothelial dysfunction in preeclampsia. Part II: Reducing the adverse consequences of endothelial cell dysfunction in preeclampsia; therapeutic perspectives. *J Perinat Med* 24:119-139

- Durr JA LM (1999) Control of volume and body tonicity. In: Lindheimer MD CFRJ (ed) Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy. **Appleton and Lange**, Stamford, pp. 103-168
- D'Souza T ARMP (2005) Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by PKA regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 280:26233-26240
- Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem* 275:27979-27988
- Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ (1986) Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology* 59:595-601
- Espinoza Durán Gisela (2000) Doscientas trece voces contra la muerte. "Mortalidad en zonas indigenas". In: Foro Nacional de Mujeres y Politicas de Población (ed) "La mortalidad materna en México". México, pp. 56
- Fan JS, Zhang M (2002) Signaling complex organization by PDZ domain proteins. *Neurosignals* 11:315-321
- Fanning AS, Anderson JM (1998) PDZ domains and the formation of protein networks at the plasma membrane. *Curr Top Microbiol Immunol* 228:209-233
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753
- Feeney JG, Scott JS (1980) Pre-eclampsia and changed paternity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 11:35-38
- Florijn KW, Derkx FH, Visser W, Hofman HJ, Rosmalen FM, Wallenburg HC, Schalekamp MA (1991) Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. *J Hypertens Suppl* 9:S166-S167
- Fuentes A, Goldkrand JW (1987) Angiotensin-converting enzyme activity in hypertensive subjects after magnesium sulfate therapy. *Am J Obstet Gynecol* 156:1375-1379
- Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998a) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153:263-272
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788
- Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998b) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143:391-401
- Furuse M, Sasaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147:891-903
- Gant NF, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC (1974) The nature of pressor responsiveness to angiotensin II in human pregnancy. *Obstet Gynecol* 43:854

- Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ (1996) Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest* 97:540-550
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277:1669-1672
- Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD (1981) Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88:876-881
- Gille JH, Moore DG, Sedgwick CJ (1977) Placental infarction: a sign of pre-eclampsia in a patas monkey (*Erythrocebus patas*). *Lab Anim Sci* 27:119-121
- Gonzalez-Mariscal L, Ávila A, Betanzos A (2001) The relationship between structure and function of tight junctions. In: Cerejido M, Anderson JM (eds) *Tight junctions*. CRC Press, Boca Ratón, USA, pp. 89-119
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A (2000a) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315-324
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1-44
- Gonzalez-Mariscal L, Islas S, Contreras RG, Garcia-Villegas MR, Betanzos A, Vega J, az-Quinonez A, Martin-Orozco N, Ortiz-Navarrete V, Cerejido M, Valdes J (1999) Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells. *Exp Cell Res* 248:97-109
- Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL (2000b) Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57:2386-2402
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10779-10784
- GOVAN AD (1961) The pathogenesis of eclamptic lesions. *Pathol Microbiol (Basel)* 24:561-575
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA (1999) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99:649-659
- Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3460-3464
- Hadj-Rabia S BLVPH-TDJE (2004) Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junctions disease. *Gastroenterology* 127:1386-1390
- Halhali A, Wimalawansa SJ, Berentsen V, Avila E, Thota CS, Larrea F (2001) Calcitonin gene- and parathyroid hormone-related peptides in preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol* 97:893-897
- Hallak M, Hotra JW, Custodio D, Kruger ML (2000) Magnesium prevents seizure-induced reduction in excitatory amino acid receptor (kainate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) binding in pregnant rat brain. *Am J Obstet Gynecol* 183:793-798

- Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277:455-461
- Hara N, Fujii T, Yamashita T, Kozuma S, Okai T, Taketani Y (1996) Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratin antibody "CAM5.2". *Am J Reprod Immunol* 36:349-358
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141:199-208
- Hedley R, Bradbury MW (1980) Transport of polar non-electrolytes across the intact and perfused guinea-pig placenta. *Placenta* 1:277-285
- HERTIG AT, ROCK J, DAMS EC, MENKIN MC (1959) Thirty-four fertilized human ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility; a study of biologic wastage in early human pregnancy. *Pediatrics* 23:202-211
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ito-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 14):1603-1613
- Hogg B, Hauth JC, Caritis SN, Sibai BM, Lindheimer M, Van Dorsten JP, Klebanoff M, MacPherson C, Landon M, Paul R, Miodovnik M, Meis PJ, Thurnau GR, Dombrowski MP, McNellis D, Roberts JM (1999) Safety of labor epidural anesthesia for women with severe hypertensive disease. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol* 181:1096-1101
- Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ (1998) Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 153:1767-1773
- Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR (1992) Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol* 262:C461-C469
- Howarth AG, Singer KL, Stevenson BR (1994) Analysis of the distribution and phosphorylation state of ZO-1 in MDCK and nonepithelial cells. *J Membr Biol* 137:261-270
- Inai T, Kobayashi J, Shibata Y (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78:849-855
- Inglis TC, Stuart J, George AJ, Davies AJ (1982) Haemostatic and rheological changes in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Br J Haematol* 50:461-465
- Islas S, Vega J, Ponce L, Gonzalez-Mariscal L (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* 274:138-148
- Itoh M, MKTS (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem* 274:5981-5986
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147:1351-1363

- Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol* 138:181-192
- Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S (1993) The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 121:491-502
- Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L (2004) Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res* 297:247-258
- Jee SH, Miller ER, III, Guallar E, Singh VK, Appel LJ, Klag MJ (2002) The effect of magnesium supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Hypertens* 15:691-696
- Jesaitis LA, Goodenough DA (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* 124:949-961
- Kamimura S, Eguchi K, Yonezawa M, Sekiba K (1991) Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama* 45:135-139
- Kertschanska S, Kosanke G, Kaufmann P (1997) Pressure dependence of so-called transtrophoblastic channels during fetal perfusion of human placental villi. *Microsc Res Tech* 38:52-62
- Kertschanska S, Stulcova B, Kaufmann P, Stulc J (2000) Distensible transtrophoblastic channels in the rat placenta. *Placenta* 21:670-677
- Khong TY, De WF, Robertson WB, Brosens I (1986) Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol* 93:1049-1059
- Kim E, Naisbitt S, Hsueh YP, Rao A, Rothschild A, Craig AM, Sheng M (1997) GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J Cell Biol* 136:669-678
- Kisters K, Barenbrock M, Louwen F, Hausberg M, Rahn KH, Kosch M (2000) Membrane, intracellular, and plasma magnesium and calcium concentrations in preeclampsia. *Am J Hypertens* 13:765-769
- Kisters K, Korner J, Louwen F, Witteler R, Jackisch C, Zidek W, Ott S, Westermann G, Barenbrock M, Rahn KH (1998) Plasma and membrane Ca²⁺ and Mg²⁺ concentrations in normal pregnancy and in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 46:158-163
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002) Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13:875-886
- Klonoff-Cohen HS, Savitz DA, Cefalo RC, McCann MF (1989) An epidemiologic study of contraception and preeclampsia. *JAMA* 262:3143-3147
- Knox TA, Olans LB (1996) Liver disease in pregnancy. *N Engl J Med* 335:569-576
- Koonin LM, MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK, Smith JC (1997) Pregnancy-related mortality surveillance--United States, 1987-1990. *MMWR CDC Surveill Summ* 46:17-36

- Kraayenbrink AA, Dekker GA, van Kamp GJ, van Geijn HP (1993) Endothelial vasoactive mediators in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169:160-165
- Lacaz-Vieira F, Jaeger MM, Farshori P, Kachar B (1999) Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. *J Membr Biol* 168:289-297
- Lang RM, Pridjian G, Feldman T, Neumann A, Lindheimer M, Borow KM (1991) Left ventricular mechanics in preeclampsia. *Am Heart J* 121:1768-1775
- Lazarchick J, Stubbs TM, Romein L, Van Dorsten JP, Loadholt CB (1986) Predictive value of fibronectin levels in normotensive gravid women destined to become preeclamptic. *Am J Obstet Gynecol* 154:1050-1052
- Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M (2002) Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res* 39:246-259
- Leach L, Firth JA (1992) Fine structure of the paracellular junctions of terminal villous capillaries in the perfused human placenta. *Cell Tissue Res* 268:447-452
- Leach L, Lammiman MJ, Babawale MO, Hobson SA, Bromilou B, Lovat S, Simmonds MJ (2000) Molecular organization of tight and adherens junctions in the human placental vascular tree. *Placenta* 21:547-557
- Leitch CR, Cameron AD, Walker JJ (1997) The changing pattern of eclampsia over a 60-year period. *Br J Obstet Gynaecol* 104:917-922
- Li DK, Wi S (2000) Changing paternity and the risk of preeclampsia/eclampsia in the subsequent pregnancy. *Am J Epidemiol* 151:57-62
- Li XF, Fortney JA, Kotelchuck M, Glover LH (1996b) The postpartum period: the key to maternal mortality. *Int J Gynaecol Obstet* 54:1-10
- Li XF, Fortney JA, Kotelchuck M, Glover LH (1996a) The postpartum period: the key to maternal mortality. *Int J Gynaecol Obstet* 54:1-10
- Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ (1997) Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol* 151:1809-1818
- Lockwood CJ, Peters JH (1990) Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 162:358-362
- Longo LD (1983) Maternal blood volume and cardiac output during pregnancy: a hypothesis of endocrinologic control. *Am J Physiol* 245:R720-R729
- López-García RB A-GJ. Mortalidad materna en México Distrito Federal con base en el estudio de los certificados de defunción 1998-1999. Gobierno del Distrito Federal. 44-49. 2002. Mexico D. F.
Ref Type: Report
- Lopez-Jaramillo P, de FM (1991) [Use of calcium for the prevention of pregnancy-induced hypertension]. *Bol Oficina Sanit Panam* 110:126-135
- Lopez-Jaramillo P, Delgado F, Jacome P, Teran E, Ruano C, Rivera J (1997) Calcium supplementation and the risk of preeclampsia in Ecuadorian pregnant teenagers. *Obstet Gynecol* 90:162-167

- Lucas MJ, Leveno KJ, Cunningham FG (1995) A comparison of magnesium sulfate with phenytoin for the prevention of eclampsia. *N Engl J Med* 333:201-205
- Mabie WC, DiSessa TG, Crocker LG, Sibai BM, Arheart KL (1994) A longitudinal study of cardiac output in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 170:849-856
- MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK (2001) Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol* 97:533-538
- MacLeod J, Rhode R (1998) Retrospective follow-up of maternal deaths and their associated risk factors in a rural district of Tanzania. *Trop Med Int Health* 3:130-137
- Mahmoudi N, Graves SW, Solomon CG, Repke JT, Seely EW (1999) Eclampsia: a 13-year experience at a United States tertiary care center. *J Womens Health Gend Based Med* 8:495-500
- Many A, Kuperminc MJ, Pausner D, Lessing JB (1999) Treatment of severe preeclampsia remote from term: a clinical dilemma. *Obstet Gynecol Surv* 54:723-727
- Marti JJ, Herrmann U (1977) Immunogestosis: a new etiologic concept of "essential" EPH gestosis, with special consideration of the primigravid patient; preliminary report of a clinical study. *Am J Obstet Gynecol* 128:489-493
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Rucio L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127
- Mastrobattista JM, Skupski DW, Monga M, Blanco JD, August P (1997) The rate of severe preeclampsia is increased in triplet as compared to twin gestations. *Am J Perinatol* 14:263-265
- Mastrogiannis DS, Kalter CS, O'Brien WF, Carlan SJ, Reece EA (1992) Effect of magnesium sulfate on plasma endothelin-1 levels in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 167:1554-1559
- Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ, Jr. (2000) Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 275:30573-30585
- Mattar F, Sibai BM (2000) Eclampsia. VIII. Risk factors for maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 182:307-312
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2287-2298
- McGee AW, Brecht DS (1999) Identification of an intramolecular interaction between the SH3 and guanylate kinase domains of PSD-95. *J Biol Chem* 274:17431-17436
- Mendoza-Rodriguez CA, Gonzalez-Mariscal L, Cerbon M (2005) Changes in the distribution of ZO-1, occludin, and claudins in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Cell Tissue Res* 319:315-330
- Mitchell MD, Romero RJ, Lepera R, Rittenhouse L, Edwin SS (1990) Actions of endothelin-1 on prostaglandin production by gestational tissues. *Prostaglandins* 40:627-635
- Monnens L, Starremans P, Bindels R (2000) Great strides in the understanding of renal magnesium and calcium reabsorption. *Nephrol Dial Transplant* 15:568-571

- Moodley J, Ramsaroop R (1989) Placental bed morphology in black women with eclampsia. *S Afr Med J* 75:376-378
- Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999a) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:511-516
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999b) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145:579-588
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999c) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185-194
- Morris CD, Jacobson SL, Anand R, Ewell MG, Hauth JC, Curet LB, Catalano PM, Sibai BM, Levine RJ (2001) Nutrient intake and hypertensive disorders of pregnancy: Evidence from a large prospective cohort. *Am J Obstet Gynecol* 184:643-651
- Muchnok C, Hogg JP, Granke DS (1998) CT demonstration of resolution of hepatic lesions in HELLP syndrome: a case report. *W V Med J* 94:18-21
- Muller D, Kausalya PJ, Claverie-Martin F, Meij IC, Eggert P, Garcia-Nieto V, Hunziker W (2003) A novel claudin 16 mutation associated with childhood hypercalciuria abolishes binding to ZO-1 and results in lysosomal mistargeting. *Am J Hum Genet* 73:1293-1301
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-1193
- Newman PJ (1997) The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 99:3-8
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653-660
- Nusrat A, CJFCLTTJCMQCMR (2000) The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem* 275:29816-29822
- Organización Mundial de la Salud. Reduction of maternal mortality: a joint WHO/UNFPA/UNICEF/World Bank Statyment. 1999. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
Ref Type: Report
- Organización Mundial de la Salud. Maternal Mortality in 2000: Estimates developed by WHO, UNICEF and UNFPA. Organizacion Mundial de la Salud. 2004. Ginebra.
Ref Type: Report
- Palmeri D, van ZA, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275:19139-19145
- Petty MA, Lo EH (2002) Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol* 68:311-323
- Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, Dixon G (1981) Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta* 2:71-91
- POLLAK VE, NETTLES JB (1960) The kidney in toxemia of pregnancy: a clinical and pathologic study based on renal biopsies. *Medicine (Baltimore)* 39:469-526

- Poppas A, Shroff SG, Korcarz CE, Hibbard JU, Berger DS, Lindheimer MD, Lang RM (1997) Serial assessment of the cardiovascular system in normal pregnancy. Role of arterial compliance and pulsatile arterial load. *Circulation* 95:2407-2415
- Port JD, Beauchamp NJ, Jr. (1998) Reversible intracerebral pathologic entities mediated by vascular autoregulatory dysfunction. *Radiographics* 18:353-367
- Pridjian G (1999) Placental transfer, fetomaternal interaction. Placental physiology and its role as go between. In: Avery G FMMM (ed) *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. JB Lippincott Co, Philadelphia, pp. 125-131
- Pridjian G, Puschett JB (2002a) Preeclampsia. Part 2: experimental and genetic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 57:619-640
- Pridjian G, Puschett JB (2002c) Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 57:598-618
- Pridjian G, Puschett JB (2002b) Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 57:598-618
- Pritchard JA, Cunningham FG, Pritchard SA (1984) The Parkland Memorial Hospital protocol for treatment of eclampsia: evaluation of 245 cases. *Am J Obstet Gynecol* 148:951-963
- Quamme GA, de RC (2000) Epithelial magnesium transport and regulation by the kidney. *Front Biosci* 5:D694-D711
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001a) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120:411-422
- Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001b) Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120:411-422
- Ramsay MM, Tame JD, Winter JA, Carbone LG, Schlafer DH, Nathanielsz PW (1997) Proteinuric hypertension in a pregnant baboon: was this pre-eclampsia? *J Med Primatol* 26:207-212
- Redman CW (1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12:301-308
- Redman CW, Denson KW, Beilin LJ, Bolton FG, Stirrat GM (1977) Factor-VIII consumption in pre-eclampsia. *Lancet* 2:1249-1252
- Redman CW, Roberts JM (1993) Management of pre-eclampsia. *Lancet* 341:1451-1454
- Reyes JL, Lamas M, Martin D, del Carmen NM, Islas S, Luna J, Tauc M, Gonzalez-Mariscal L (2002) The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 62:476-487
- Roberts JM (1995) Magnesium for preeclampsia and eclampsia. *N Engl J Med* 333:250-251
- Roberts JM, Redman CW (1993) Pre-eclampsia: more than pregnancy-induced hypertension. *Lancet* 341:1447-1451
- Robertson SA, Mau VJ, Hudson SN, Tremellen KP (1997) Cytokine-leukocyte networks and the establishment of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 37:438-442
- Robertson WB, Brosens I, Dixon HG (1967) The pathological response of the vessels of the placental bed to hypertensive pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 93:581-592

- Robillard PY, Hulseley TC, Perianin J, Janky E, Miri EH, Papiernik E (1994) Association of pregnancy-induced hypertension with duration of sexual cohabitation before conception. *Lancet* 344:973-975
- Robinson NR, Atkinson DE, Jones CJ, Sibley CP (1988) Permeability of the near-term rat placenta to hydrophilic solutes. *Placenta* 9:361-372
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E (1992) Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80:283-285
- Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM (1988) Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol* 159:908-914
- Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B (2002a) The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 277:27501-27509
- Roh MH, Makarova O, Liu CJ, Shin K, Lee S, Laurinec S, Goyal M, Wiggins R, Margolis B (2002b) The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol* 157:161-172
- Rovinsky J, JAFFIN H (1965) Cardiovascular hemodynamics in pregnancy. I blood and plasma volumes in multiple pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 93:1-15
- Ryeom SW, Paul D, Goodenough DA (2000) Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. *Mol Biol Cell* 11:1687-1696
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11:4131-4142
- Saitou M, ndo-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S (1997) Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 73:222-231
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, ndo-Akatsuka Y, Tsukita S (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* 137:1393-1401
- Sambrook J RD (2001) Preparation and analysis of eukaryotic genomic DNA. In: Sambrook J RD (ed) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 6.1-6.64
- Schmidt CM, Orr HT (1993) Maternal/fetal interactions: the role of the MHC class I molecule HLA-G. *Crit Rev Immunol* 13:207-224
- Schwartz MM, Korbet SM (1993) Primary focal segmental glomerulosclerosis: pathology, histological variants, and pathogenesis. *Am J Kidney Dis* 22:874-883
- Scott JR, Beer AA (1976) Immunologic aspects of pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 125:418-427
- SCOTT JS (1958) Pregnancy toxemia associated with hydrops foetalis, hydatidiform mole and hydramnios. *J Obstet Gynaecol Br Emp* 65:689-701
- Secretaria de Salud México. Razón de mortalidad materna por 100 000 nacidos vivos estimados. www.salud.gob.mx Información para la rendición de cuentas, 201. 2004.
Ref Type: Electronic Citation
- Seidl DC, Hughes HC, Bertolet R, Lang CM (1979) True pregnancy toxemia (preeclampsia) in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Lab Anim Sci* 29:472-478

- Shanklin DR, Sibai BM (1989) Ultrastructural aspects of preeclampsia. I. Placental bed and uterine boundary vessels. *Am J Obstet Gynecol* 161:735-741
- Shieh BH, Zhu MY (1996) Regulation of the TRP Ca²⁺ channel by INAD in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 16:991-998
- Sibai BM (1990) Eclampsia. VI. Maternal-perinatal outcome in 254 consecutive cases. *Am J Obstet Gynecol* 163:1049-1054
- Sibai BM (1991) Immunologic aspects of preeclampsia. *Clin Obstet Gynecol* 34:27-34
- Sibai BM, Akl S, Fairlie F, Moretti M (1990) A protocol for managing severe preeclampsia in the second trimester. *Am J Obstet Gynecol* 163:733-738
- Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA (1993) Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets (HELLP syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 169:1000-1006
- Sibai BM, Spinnato JA, Watson DL, Hill GA, Anderson GD (1984) Pregnancy outcome in 303 cases with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 64:319-325
- Sibai BM, Villar MA, Bray E (1989) Magnesium supplementation during pregnancy: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Am J Obstet Gynecol* 161:115-119
- Simionescu M, Simionescu N, Palade GE (1976) Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. Arteries and veins. *J Cell Biol* 68:705-723
- Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285:103-106
- Smarason AK, Sargent IL, Starkey PM, Redman CW (1993) The effect of placental syncytiotrophoblast microvillous membranes from normal and pre-eclamptic women on the growth of endothelial cells in vitro. *Br J Obstet Gynaecol* 100:943-949
- Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73-77
- Spatling L, Spatling G (1988) Magnesium supplementation in pregnancy. A double-blind study. *Br J Obstet Gynaecol* 95:120-125
- Standley CA, Whitty JE, Mason BA, Cotton DB (1997) Serum ionized magnesium levels in normal and preeclamptic gestation. *Obstet Gynecol* 89:24-27
- Standley PR, Standley CA (2002) Identification of a functional Na⁺/Mg²⁺ exchanger in human trophoblast cells. *Am J Hypertens* 15:565-570
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766
- Stulc J (1989a) Extracellular transport pathways in the haemochorial placenta. *Placenta* 10:113-119

- Stulc J (1989b) Study of the permeability of the intact guinea pig placenta to hydrophilic molecules. *Placenta* 10:427-428
- Stulc J, Friedrich R, Jiricka Z (1969) Estimation of the equivalent pore dimensions in the rabbit placenta. *Life Sci* 8:167-180
- Stulc J, Stulcova B (1986) Transport of calcium by the placenta of the rat. *J Physiol* 371:1-16
- Terness P, Navolan D, Dufter C, Kopp B, Opelz G (2001) The T-cell suppressive effect of bufadienolides: structural requirements for their immunoregulatory activity. *Int Immunopharmacol* 1:119-134
- Thornburg KL, Faber JJ (1977) Transfer of hydrophilic molecules by placenta and yolk sac of the guinea pig. *Am J Physiol* 233:C111-C124
- Thornton JG, Onwude JL (1991) Pre-eclampsia: discordance among identical twins. *BMJ* 303:1241-1242
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M, Tada M (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273:12725-12731
- Tsukita S, Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9:268-273
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001d) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001c) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001b) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001a) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293
- Turksen K, Troy TC (2002) Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development* 129:1775-1784
- Underwood JL, Murphy CG, Chen J, Franse-Carman L, Wood I, Epstein DL, Alvarado JA (1999) Glucocorticoids regulate transendothelial fluid flow resistance and formation of intercellular junctions. *Am J Physiol* 277:C330-C342
- Van Itallie CM, Anderson JM (1997) Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J Cell Sci* 110 (Pt 9):1113-1121
- Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM (2003) Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1078-F1084
- Van IC, Rahner C, Anderson JM (2001a) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327
- Van IC, Rahner C, Anderson JM (2001b) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327
- Van IC, Rahner C, Anderson JM (2001c) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327

- Vietor I, Bader T, Paiha K, Huber LA (2001) Perturbation of the tight junction permeability barrier by occludin loop peptides activates beta-catenin/TCF/LEF-mediated transcription. *EMBO Rep* 2:306-312
- vila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, Gonzalez-Mariscal L (2001) Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J* 360:295-304
- Walker JJ (2000) Pre-eclampsia. *Lancet* 356:1260-1265
- Wang T, Schneider J (1987) Cellular junctions on the free surface of human placental syncytium. *Arch Gynecol* 240:211-216
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999) Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem* 274:35179-35185
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 105:586-592
- Wong V, Goodenough DA (1999) Paracellular channels! *Science* 285:62
- Wong V, Gumbiner BM (1997) A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136:399-409
- Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, Mizoguchi A, Ide C, Kaibuchi K (1997) The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 139:785-795
- Yamauchi K RTKKSEST (2004) Disease-causing mutant WNK4 increased paracellular chloride permeability and phosphorylates claudins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4690-4694
- Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S (1995) Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 1):127-142
- Youakim A, Ahdieh M (1999) Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 276:G1279-G1288
- Yu W, Sanders BG, Kline K (2003) RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria. *Cancer Res* 63:2483-2491
- Zeeman GG, Dekker GA (1992) Pathogenesis of preeclampsia: a hypothesis. *Clin Obstet Gynecol* 35:317-337
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest* 99:2139-2151
- Zissin R, Yaffe D, Fejgin M, Olsfanger D, Shapiro-Feinberg M (1999) Hepatic infarction in preeclampsia as part of the HELLP syndrome: CT appearance. *Abdom Imaging* 24:594-596