



Universidad de Concepción

Facultad de Farmacia

**ESTUDIO DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE CANALES DE
POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO DE ALTA
CONDUCTANCIA (BKCA)
Y LA VARIACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN
HUVECS DE PACIENTES CON DIABESIDAD
GESTACIONAL
POR JAVIER EDUARDO TORRES FARÍAS**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Patrocinante y Guía:

Dr. Marcelo Andrés González Ortiz
Departamento: Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción

Abril, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2023, Javier Eduardo Torres Farías

Dedicado principalmente a mis padres Jorge y Mariluz por el apoyo incondicional durante todo el proceso académico, muchas gracias por darme la oportunidad de seguir con estudios universitarios.

A mi familia, con especial mención a Pablo – Nicolás – Christian, por todo el cariño y apoyo que me mantuvieron a flote en tiempos donde no estaba firme.

A mis abuelos, abuela y tío que confiaban plenamente en mí y nunca dudaron de mis habilidades, gracias por ayudarme incluso cuando no los podía abrazar.

A todos mis amigos/as que no dudaron de lo que podía lograr y que me tendieron una mano cuando más lo necesité.

A Daniela, Viviana, Carlos, Ana, Karen, Noelia, Isidora, Gloria, Katherine, Luciano, Michelle, Bárbara, Eduardo, Yuri, Ángelo, Romina, Carolina, Rafael, Javiera, Mauricio, Martín, muchas gracias por todo el apoyo y por brindarme lo más valioso en la vida, **su tiempo**.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, **Marcelo González Ortiz**, quien me orientó a lo largo de la tesis y me entregó las herramientas fundamentales para el desarrollo humano/científico.

A **Noelia Benavente González**, quien me ayudó a desarrollar el trabajo en el laboratorio y aconsejó en momentos de duda.

A la comisión evaluadora, **Enrique Guzmán Gutiérrez y Magdalena Cuevas Troncoso**, por brindar enriquecedores conocimientos para mejorar el estudio y por la buena disposición para resolver cualquier duda.

A los profesionales del CMA, **Germán Osorio – Joanna Tereszczuk – Luciano Ferrada**, por el buen trato profesional y las enseñanzas científicas que permitieron profundizar en el estudio.

Y a todo profesional que brindo ideas o críticas constructivas que permitieron dar un paso adelante a la investigación.

Muchas gracias a todos por su apoyo.

Esta tesis fue financiada por:

- VRID-Multidisciplinario 2020000157MUL (2021-2022). Caracterización de alteraciones mecánicas y viscoelásticas de membrana plasmática y su asociación con mecanismos de síntesis de óxido nítrico e hiperpolarización de membrana en células vasculares fetales humanas expuestas a diabetes gestacional.

TABLA DE CONTENIDO

Índice de tablas.....	VII
Índice de Ilustraciones.....	VIII
Resumen.....	X
1. Introducción.....	1
1.1 Enfermedades cardiovasculares y diabetes gestacional.....	1
1.2 Endotelio y función vascular.....	5
1.3 Canales de potasio activados por Ca^{2+} (KCa).....	8
1.4 Diabetes gestacional, disfunción endotelial y canales BKCa.....	12
1.5 Hipótesis.....	13
1.6 Objetivo general.....	13
1.7 Objetivos específicos	13
2. Materiales y métodos.....	14
2.1 Criterios de clasificación de pacientes.....	14
2.2 Tipo de estudios y consideraciones éticas.....	14
2.3 Cultivo de células de vena umbilical humana (HUVECs)...	15
2.4 Inmunofluorescencia.....	16
2.5 Extracción de RNA total y reacción de transcripción reversa (RT).....	17
2.6 Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	17

2.7 Cambios en el potencial de membrana.....	18
2.8 Análisis estadístico.....	19
3. Resultados.....	20
3.1 Expresión BKCa en HUVECs.....	20
3.2 Análisis de potencial de membrana en HUVECs.....	30
4. Discusión.....	41
4.1 Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa) en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs).....	41
4.2 Rol funcional de los canales BKCa en HUVECs.....	45
4.3 Efecto de la Insulina.....	49
5. Conclusiones y proyecciones.....	51
6. Glosario.....	53
7. Bibliografía.....	55
8. Anexos.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Partidores para RT-PCR.....	18
Tabla II: Historial Clínico.....	76

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1: Diabetesidad. Relación entre obesidad y diabetes mellitus gestacional.....	3
Figura 2: Regulación del tono vascular.....	6
Figura 3: Estructura de canales BKCa.....	11
Figura 4: Nivel de mRNA de BKCa en HUVECs normales (N) o DG.....	21
Figura 5: Inmunofluorescencia para subunidades α y $\beta 1$ de BKCa en HUVECs normales (N) y diabetesidad gestacional (DG).....	22
Figura 6: Cuantificación de Inmunofluorescencia BKCa.....	23
Figura 7: Cuantificación de la relación $\beta 1$ y α de BKCa.....	24
Figura 8: Expresión de BKCa α en HUVECs expuestas a insulina.....	26
Figura 9: Expresión de BKCa $\beta 1$ en HUVECs expuestas a insulina.....	27
Figura 10: Aumento de expresión de BKCa α en DG.....	28
Figura 11: Relación de expresión de subunidades $\beta 1$ y α de BKCa en HUVECs DG.....	29
Figura 12: Prueba de sonda DIBAC ₄ (3).....	31
Figura 13: Disminución de fluorescencia DIBAC ₄ (3) en HUVECs DG....	32

Figura 14: Cuantificación del efecto de DG sobre el potencial de membrana.....	33
Figura 15: Fluorescencia DIBAC ₄ (3) en HUVECs normales y DG.....	34
Figura 16: Cuantificación del efecto de inhibidores sobre la fluorescencia de DIBAC ₄ (3).....	35
Figura 17: Efecto total de inhibidores sobre el potencial de membrana..	36
Figura 18: Efecto de insulina sobre la fluorescencia DIBAC ₄ (3) en HUVECs normales y DG.....	38
Figura 19: Cuantificación del efecto de insulina sobre la fluorescencia de DIBAC ₄ (3) en HUVECs normales y DG.....	39
Figura 20: Efecto total de insulina sobre la fluorescencia de DIBAC ₄ (3) en HUVECs normales y DG.....	40
Figura 21: Cambio en distribución de $\beta 1$ en DG.....	43

RESUMEN

La diabetes gestacional (DG) es una enfermedad producida por la convergencia de patologías ampliamente conocidas como la diabetes mellitus gestacional (DMG) y obesidad materna. Por lo tanto, se considera un factor de riesgo aún más relevante para la generación de enfermedades cardiovasculares (ECV).

Los índices de obesidad materna en Chile se han visto aumentados en un 12.34% entre el año 2008-2017, lo cual lleva a ser un factor de riesgo predeterminante para generar diabetes mellitus gestacional (DMG), desencadenando en diabetes gestacional (DG). Esta patología cursa con un proceso fisiopatológico de disfunción endotelial, en donde se ve afectado el equilibrio de los procesos de vasoconstricción y vasodilatación. En la mantención de este equilibrio están involucrados los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BK), ya que su función principal está relacionada con la regulación del mecanismo de hiperpolarización derivada de endotelio (EDH), fundamental para la vasodilatación.

En la actual investigación, se estudiaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) obtenidas desde embarazos sanos o diagnosticados con diabetes gestacional. Se evaluó la expresión de RNA y proteínas de las subunidades α y $\beta 1$ de BKCa mediante técnicas de RT-PCR e Inmunofluorescencia, respectivamente. Además, se analizó la función de canales BKCa al evaluar el efecto de la inhibición de canales de potasio activados por calcio sobre el potencial de membrana, determinado mediante la sonda DIBAC₄(3). También se determinó el efecto de concentraciones crecientes de insulina (0,1-100 nM) sobre este parámetro. Los resultados muestran un aumento en la expresión de subunidades α y $\beta 1$, junto con un estado de hiperpolarización basal en HUVECs DG. Mientras que en células normales se produce una respuesta hiperpolarizante con insulina, este efecto se pierde en células DG. En conclusión, se propone que en diabetes gestacional existe un estado de hiperpolarización compensatorio y un aumento en la expresión de los canales BKCa en HUVECs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedades Cardiovasculares y Diabetes Gestacional (DG)

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) corresponden a la principal causa de muerte a nivel mundial, en donde se estima que alrededor de un 31% de la población (17,9 millones de personas) fallece a causa de esta problemática en salud (*World Health Organization, 2017*). En Chile, las ECVs son la segunda causa de muerte, abarcando alrededor de un 27,1% del total de defunciones anuales. Además, según datos de la última encuesta nacional de salud 2016-2017 (ENS 2016-2017), los factores de riesgo asociados a las ECVs presentan una alta prevalencia en la población chilena, relacionados con problemáticas de desigualdad social debido a los distintos estilos de vida de las personas asociados a ingresos económicos que impactan en la dieta diaria de la población. Las personas en mayor vulnerabilidad económica tienen mayor probabilidad de adquirir algún factor de riesgo que pueda desencadenar en una enfermedad cardiovascular.

En las ECVs existen distintos factores de riesgo que acentúan la progresión de la enfermedad, así como el tabaco, obesidad, sedentarismo, colesterol (HDL y LDL) elevado, diabetes mellitus, entre otras (*National Health Service, 2017*). De esta manera, para pacientes de sexo femenino en etapas de gestación, se ha observado una tendencia a presentar diabetes mellitus gestacional (DMG) y obesidad materna que en su conjunto se definen como Diabesidad Gestacional (Fig.1), concepto patológico que fue denominado por *Paul Zimmet et al. el año 2001*.

La Diabesidad Gestacional (DG) plantea la relación o interconexión que podrían tener la DMG y obesidad en la gestación, esto podría llevar a un aumento en el riesgo cardiovascular (*Despaigne, O.L.P., 2012*) y, en consecuencia, aumentar el riesgo fetal de padecer enfermedades futuras. La DMG se describe como una enfermedad crónica no transmisible de alta prevalencia a nivel mundial, en donde se destaca que un 16% de los nacimientos poseen una forma de hiperglicemia durante el embarazo, y un 84% de ello se debe a DMG (*International Diabetes Federation, 2020*). A nivel nacional, según datos de la ENS del año 2003, se estimó una prevalencia de un 1,2% de DMG en pacientes con rango de edad entre 25-44 años, mientras que la Guía Perinatal (MINSAL, 2015) indicó que el 5,1% del total de mujeres que ingresaron a control prenatal el 2012 tenía diabetes.



Figura 1. Diabetes. Relación entre obesidad y DMG (*Basado en Pardo F., et al., 2019*)

Además, el aumento de la prevalencia de obesidad con la edad, junto con una fecundidad más tardía, permiten pronosticar que la diabetes en el embarazo seguirá aumentando en los próximos años (Guía Perinatal, 2015).

La DMG se define como "cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se manifiesta o detecta durante el embarazo" (*Ministerio de Salud, 2014; World Health Organization, 2006*). Este tipo de diabetes se podría deber a que durante el proceso de gestación se genera un aumento de la resistencia a la insulina materna, para inducir niveles de glucosa sanguínea materna que se mantienen elevados, lo que lleva a producir un aumento de la glucosa en el feto generando un aumento de tamaño o macrosomía (*Ghassibe-Sabbagh, M., et al., 2019*). Por otro lado, la DMG aumenta el riesgo de generar otras complicaciones como preeclampsia, hipoglicemia en el feto al momento de nacer, mayor riesgo de padecer Diabetes Mellitus Tipo 2 en edad posterior, parto prematuro, entre otros (*Li Y., Ren X., 2020*). De igual manera, y no menos importante, se ha observado que al padecer obesidad materna se produce una mayor probabilidad de desarrollar DMG (*Simmons D., 2011*) y así generar un aumento en el riesgo cardiovascular asociado a estas dos limitantes vitales.

Al día de hoy, se sabe que la DMG y la obesidad materna son capaces de generar alteraciones fisiológicas que afectan tanto a la madre como al feto, de esta manera, la DG se ha asociado fuertemente a la generación de daño endotelial, llevando a una disfunción endotelial (*Leiva A., et al., 2011*).

1.2 Endotelio y Función Vascular

El endotelio corresponde a una monocapa de células endoteliales que da lugar a la superficie interna en arterias, venas y capilares (*Carvajal Carvajal C., 2017*). Actualmente, se sabe que corresponde a un sistema complejo que permite mantener un equilibrio en la fisiología vascular, pero, por otro lado, correspondería a uno de los sistemas que se vería alterado en su función por el desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus u otras (*Gauster. M., et al., 2012*). Una de las características más relevantes del endotelio corresponde a su capacidad de regular el tono vascular (Fig.2), el cual se ve accionado por estímulos como el estrés por presión o flujo, hormonas, entre otros (*González. M. & Rivas. J. C., 2020*).

En el año 1987 se originaron los primeros reportes que evaluaban el rol primordial del óxido nítrico (NO) en la vasodilatación muscular (*Butler, A. R., & Williams, D. L. H., 1993*). Al día de hoy el NO es conocido como una molécula de

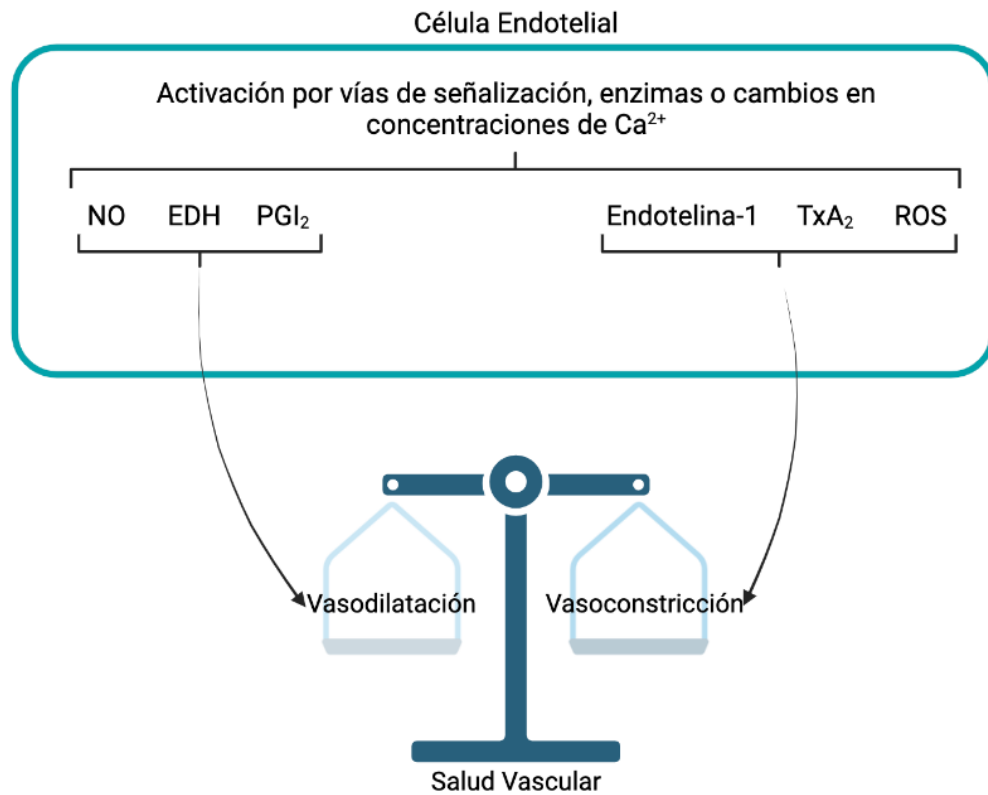


Figura 2. Regulación del tono vascular. La acción de vasoconstrictores y vasodilatadores permiten mantener un funcionamiento fisiológico del tono vascular. *(Basado en González. M.& Rivas. J. C., 2020).*

gran relevancia en procesos de vasodilatación, por otro lado, bajo la misma perspectiva de la vasodilatación se ha descrito el mecanismo de hiperpolarización derivada de endotelio (EDH), el que juega un rol importante en la vasodilatación (*Féletou & Vanhoutte, 2006*).

Por otro lado, así como el endotelio es capaz de generar moléculas vasodilatadoras, también puede generar moléculas vasoconstrictoras como la angiotensina 2, especies reactivas del oxígeno y endotelina-1 (*Avogaro. A., et al., 2011*). Estas moléculas son capaces de regular procesos como podría ser la inflamación, tono vascular, adhesión celular, entre otros, logrando mantener un equilibrio en el funcionamiento vascular (*Deanfield, J. E., et al., 2007*).

El NO es una de las moléculas de mayor importancia en varios procesos vasculares tanto fisiológicos como patológicos. Una de las hormonas que sería relevante en la biodisponibilidad del NO es la insulina, esto debido a que la insulina es capaz de inducir a un aumento en el transporte de L-arginina que posteriormente, mediante la vía de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), es capaz de generar el aumento de NO (*Rojas. S., et al., 2020*). Este mecanismo constituye la vasodilatación inducido por insulina, cuya función se vería alterada en condiciones patológicas como en DMG o DG.

Se ha descrito que la vasodilatación inducida por insulina se relaciona con el aumento en la liberación del NO en células endoteliales y, además, con la

activación de canales de potasio activados por calcio (KCa) (Wiecha J., et al., 1998). La relación entre NO y KCa se puede establecer porque tanto la actividad de la eNOs como KCa dependen de las concentraciones de Ca^{2+} endotelial. En la circulación fetoplacentaria se ha descrito la participación de eNOS como de KCa para la regulación fisiológica del tono vascular (Lorigo M., et al., 2020).

La función principal de KCa es promover el paso de iones K^+ del medio intracelular al medio extracelular, por lo tanto, participar en el proceso de hiperpolarización. Considerando lo anterior, se ha descrito que el efecto provocado por la insulina en condiciones fisiológicas estaría relacionado por una co-acción de un tipo de canal KCa relevante para la producción de NO (Rojas. S., et al., 2020), lo cual se podría ver alterado en diabetes gestacional.

1.3 Canales de potasio activados por Calcio (KCa)

El potencial de membrana corresponde a un gradiente iónico entre el medio intracelular y extracelular, sin embargo, en procesos de hiperpolarización se genera un flujo de iones de K^+ que disminuyen las cargas positivas en el medio intracelular. Esto último ocurre gracias a la participación de canales de potasio que promueven la hiperpolarización al generar un potencial más negativo (Hille B., et al., 2011), lo cual finalmente desencadena en la vasodilatación. Moléculas como el NO, prostaglandina, ácido araquidónico u otros son capaces de activar

el eflujo de iones potasio, mientras que en caso de procesos de vasoconstricción donde se ven involucradas moléculas como la angiotensina, tromboxano u otros permiten la inhibición de estas corrientes (Aiello E.A., 2016).

Los canales de potasio activados por calcio o KCa corresponden a una familia de canales de potasio que se pueden encontrar principalmente en el sistema vascular (*Dong. D. L., et al., 2016*), aunque también se han descrito en el sistema neuronal (*Kshatri AS., et al., 2018*). Esta familia se divide principalmente en 3 tipos de canales, los canales BKCa (Alta conductancia), IKCa (Conductancia Intermedia) y SKCa (Baja conductancia) (*Guéguinou, M., et al., 2014*). Cada uno de ellos presentan características estructurales diferenciales, ya que, por ejemplo, los canales SKCa poseen un sitio constitutivo de unión a calmodulina mientras que los canales BKCa no lo poseen (*Tian. C., et al., 2014*).

Los canales BKCa, o también denominados canales Slo o MaxiK (*Lorigo. M., et al., 2020*), se encuentran principalmente a nivel vascular y su importancia recae en que se asocian a procesos de hiperpolarización (*Neylon. C. B., et al., 1999*), lo que indica que son capaces de regular el potencial de membrana en situación de vasodilatación (*Zhu, Y. R., et al., 2018*).

Estructuralmente estos canales están formados por subunidades alfa y subunidades beta (Fig.3) cuyas características funcionales se basan en conducción iónica y regulación, respectivamente (Cox. D. H., 2017).

Se ha descrito que la expresión de estos canales se ve disminuida en células musculares lisas de placa coriónica placentaria humana con preeclampsia (PE) (He, M., et al., 2017). Por otro lado, estudios sugieren que ocurre una disminución con respecto a la expresión de la subunidad $\beta 1$ de estos canales en patologías cardiovasculares derivadas de la diabetes mellitus (Qian L., et al., 2014); además, otro estudio determinó que en células musculares lisas humanas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, habría una disrupción en la interacción de las subunidades α y β del canal BKCa (Nieves M., et al., 2017). Sin embargo, aún no se conoce cómo se comportan estas proteínas en la asociación patológica entre la obesidad y la DMG o DG.

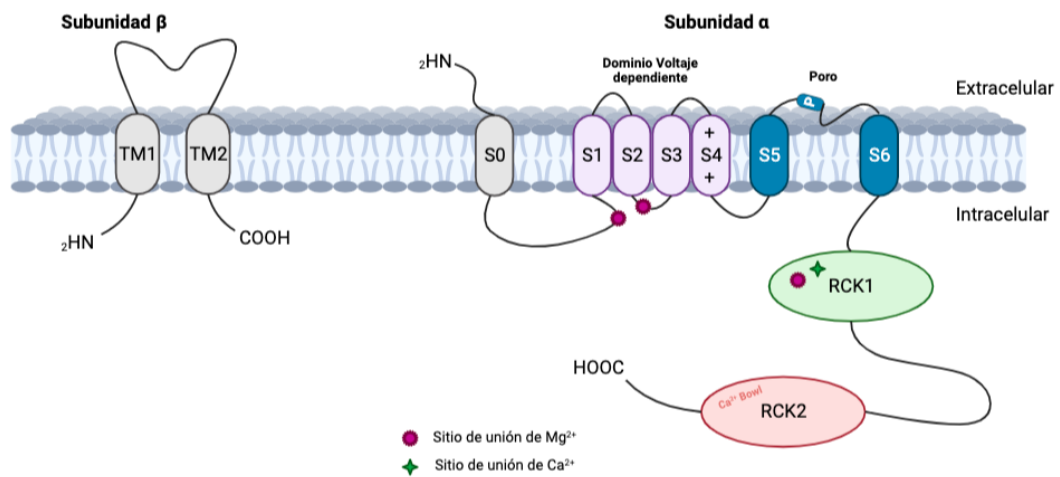


Figura 3. Estructura de canales BKCa. Descripción gráfica de la estructura molecular de la subunidad α y β , además de sus dominios voltaje dependientes y dominios sensibles a Ca^{2+} .

1.4 Diabetes Gestacional, Disfunción endotelial y Canales BKCa.

En la fisiopatología de la DMG y preeclampsia se ha descrito la participación de los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa) (*Li H., et al., 2022; He M., et al., 2018*). Específicamente en DMG, se ha descrito que las corrientes de salida de K⁺ están disminuidas en células de músculo liso de arteria umbilical humana, así como el efecto relajante de una molécula activadora de BKCa (NS-1619). La expresión tanto de subunidades α como β de BKCa está disminuida en arteria umbilical de DMG, lo que se ha asociado con una mayor tendencia a un estado de despolarización. Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de BKCa en vena umbilical, ni en condición de DG propiamente tal.

En resumen, se ha reportado que la expresión de BKCa estaría disminuida en vasos umbilicales o de placenta de patologías gestacional como DMG o preeclampsia, pero no se han realizado estudios específicamente en DG ni en células endoteliales de pacientes DMG.

1.5. Hipótesis

En pacientes que cursan con Diabetes Gestacional (DG) hay una disminución de la expresión de los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa) y del potencial de membrana de células endoteliales de vena umbilical.

1.6. Objetivo General

Determinar los niveles de expresión de BKCa y los cambios de potencial de membrana en células endoteliales de vena umbilical de pacientes con Diabetes Gestacional.

1.7. Objetivos Específicos

1. Determinar niveles de expresión de canales BKCa en HUVECs de pacientes con Diabetes Gestacional.
2. Evaluar variaciones en el potencial de membrana en HUVECs de pacientes con Diabetes Gestacional.
3. Determinar cambios en el potencial de membrana en HUVECs de pacientes con Diabetes Gestacional utilizando inhibidores de la actividad de canales de potasio activados por Ca^{2+} (IbTX; TRAM-34; TEA).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Criterios de clasificación de pacientes.

A partir del diagnóstico; embarazadas se clasificarán como normales (N) o Diabetes gestacional (DG). Según antecedentes de IMC (desde ficha clínica), se sub- clasificaron en pacientes con obesidad ($> 30 \text{ kg/m}^2$) y sin obesidad ($< 29,9 \text{ kg/m}^2$) de acuerdo a peso de primer trimestre (antes de semana gestacional 14). Grupo de pacientes DG contiene pacientes con obesidad materna más diabetes mellitus gestacional.

2.2. Tipo de estudio y consideraciones éticas

Se realizó un estudio prospectivo de corte transversal, de tipo caso y control. Se reclutaron pacientes de forma consecutiva no – aleatoria, hasta completar un mínimo de 3 muestras para cada condición analizada en cada experimento. La

investigación se circunscribió a los principios de declaración de Helsinki, realizándose en el marco del proyecto VRID – Multidisciplinario 2020000157MUL, el cual obtuvo aprobación del comité de ética científica del Servicio de Salud Concepción (Código CEC SSC: 21-04-24). Las pacientes fueron informadas sobre el estudio previo a la obtención del consentimiento para la obtención del cordón umbilical y la placenta posterior al parto.

2.3. Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs).

Las células endoteliales fueron aisladas desde la vena umbilical de los cordones obtenidos empleando una modificación del método descrito por *Jaffe et al. 1973* (*González et al., 2004*). Los cordones fueron canulados y lavados con PBS 1X estéril (Phosphate – Buffered Saline) para remover el exceso de sangre, luego el lumen venoso fue expuesto a colagenasa (0,25 mg/mL) tipo II de *Clostridium histolyticum* disuelta en medio 199 (M199) y, posteriormente, se dejó incubando por 15 minutos a 37°C. Tras la incubación con colagenasa, la suspensión de células fue llevada a un tubo falcon de 15 mL, para luego ser centrifugada por 10 minutos a 1400 rpm. El precipitado de células que se obtuvo fue re suspendido en medio de cultivo primario (PCM) que está compuesto de medio 199 suplementado con 5 mM de D – glucosa, 10% de suero bovino de

recién nacido (NBCS) y 10% de suero bovino fetal (FCS). Finalmente, las células fueron depositadas en tubos de cultivo T-25, previamente cubiertas con gelatina estéril al 1%, y cultivadas a 37°C con 5% de CO₂ hasta pasaje 2.

2.4. Inmunofluorescencia.

HUVECs fueron cultivadas en cubreobjetos (10⁶ células/portaobjetos) (Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Baden – Württemberg, Germany) y la Inmunofluorescencia será determinada como describe L. Cabrera, et al., 2016. Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (15 min) y luego lavadas (3x) con HBS (Hanks Buffer Solution). Posteriormente, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 0.1% (10 min), y luego se realizó el bloqueo con BSA 1% (1h). Los anticuerpos anti BKCa α y β 1 (Anti-KCNMA1 antibody; Anti-Slo β 1 KCNMB1 Antibody by Alomone Labs) se prepararon en relación 1:100 con BSA 5%, por otro lado, la incubación se realizó por toda la noche. Los anticuerpos secundarios Anti Rabbit fueron incubados por 1h a temperatura ambiente. La cuantificación de fluorescencia se realizó a partir de una imagen con la sumatoria de fluorescencia proveniente de un stack, se seleccionó un área de interés (ROI) y se cuantificó a través de ImageJ.

2.5. Extracción de RNA total y Reacción de transcripción reversa (RT).

El RNA total se aisló utilizando un kit de extracción “Total RNA Mini Kit” por Geneaid. En la reacción de transcripción reversa (RT) se utilizaron alícuotas de 9 µL de RNA total, usando Oligo dT, partidores aleatorios (random primers) y la enzima M – MuLV (Moloney Murina Leukemia Virus Reverse Transcriptase).

2.6. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

En la reacción se utilizó 1 µL de cDNA (100 µM), dNTPs, partidores sentido y anti – sentido (28s y BKCa α) (Tabla 1), Sapphire Master Mix. En todos los ensayos se realizó un ciclo de incubación por 1 minuto a 94°C, 35 – 40 ciclos que incluye un paso de denaturación por 5 segundos a 95°C, con una temperatura de hibridación de 55°C para BKCa alfa y 28s, una temperatura de extensión a 72°C por 40 segundos, y una temperatura de extensión final de 72°C por 15 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en solución tampón de Tris – borato – EDTA, conteniendo 2,0 µL de Red – Gel. Los productos de amplificación se observaron por medio de la exposición del gel a la luz UV en un transiluminador y la imagen se capturó con cámara digital. Finalmente, las imágenes fueron analizadas por el software ImageJ.

Tabla I: Partidores para RT – PCR

Primers	Secuencia	Tm (°C)	Ciclos	Tamaños (pb)
28s Forward	5'-TTG AAA ATC CGG GGG AGA G-3'	55	37	100
28s Reverse	5'-ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG-3'			
BKCa α Forward	5'-CAG TAT CAC AAC AAG GCC CAT CTG-3'	55	40	119
BKCa α Reverse	5'-AAG GAC AGA CCC ACG AAG GCA-3'			

2.7. Cambios en el potencial de membrana.

Para el análisis de potencial de membrana se utilizó la sonda fluorescente bis – (ácido – 1,3 – dibutilbarbiturico) trimetinoxonol (DiBAC₄(3); 0,1 µmol/L), la cual es sensible a cambios de potencial y es capaz de entrar a las células despolarizadas uniéndose a proteínas intracelulares o de membrana. Las células endoteliales (HUVECs) fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Se empleó endotelina-1 10 nM como control de hiperpolarización (*Chen y Wagonor, 1991*) y KCl 90 mM como control de despolarización. Las células fueron incubadas por 30 minutos con 25 µL de sonda DiBAC₄(3) para concentración final de 250 nM, luego se realizó la incubación con distintas condiciones: Iberiotoxina (IbTX; 100 nM), TRAM-34 (0,2 µM), Tetraetilamonio (TEA; 1 mM), Insulina (0,1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM), posteriormente, se evaluó el cambio de potencial con respecto al tiempo al evaluar la fluorescencia en el equipo INCUCYTE por 1h en intervalos de 15min. Es importante destacar que IbTX y TRAM-34 corresponden a inhibidores de BKCa e IKCa, respectivamente, mientras que TEA es un inhibidor general de KCa.

2.8. Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, California). La variación estadística fue estimada usando una distribución normal y representada por el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas serán determinadas usando la prueba de Mann – Whitney, el nivel de probabilidad (p) menor a 0.05 ($p < 0,05$) fue considerado como estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Expresión BKCa en HUVECs.

En el análisis de nivel de ARNm de la subunidad α de BKCa (119 pb) para células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs), se observó que hay un aumento significativo al comparar la expresión de la subunidad α en HUVECs DG vs HUVECs Normales (N) (Fig.4).

En ensayos de Inmunofluorescencia, se observaron diferencias al comparar los niveles de expresión de subunidades α y $\beta 1$ en HUVECs DG versus HUVECs normales (Fig. 5). Particularmente, se observó un aumento significativo de 2,3 veces y de 1,7 veces en la expresión de las subunidades α y $\beta 1$, respectivamente, en HUVECs DG versus HUVECs normales (Fig.6). Además, al evaluar el comportamiento de las subunidades asociado a su relación estequiométrica $\beta 1:\alpha$, se observó que hay una tendencia a la disminución en la relación $\beta 1:\alpha$ en HUVECs DG versus HUVECs normales (Fig.7).

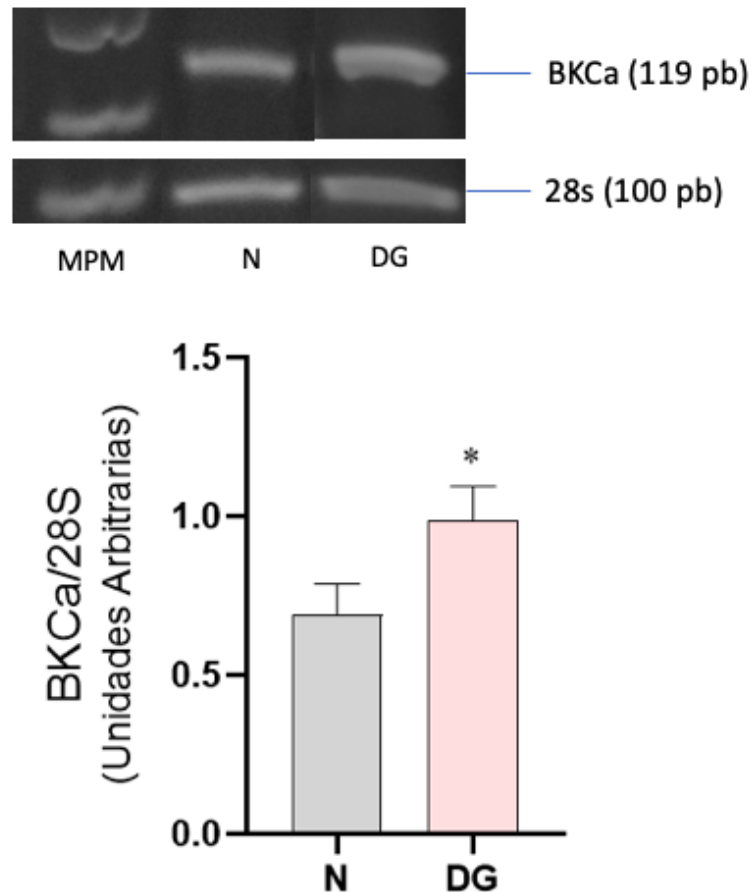


Figura 4. Nivel de mRNA de BKCa en HUVECs normales y en diabetes gestacional. A partir del RNA total se realizó transcripción reversa y PCR para BKCa (119 pb) y 28S (100 pb). Se cuantificaron las bandas desde geles de agarosa mediante programa ImageJ y se expresó la relación BKCa/28s por cada muestra analizada. Valores son promedio $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ vs normal. $n=14$ en normales (N); $n=6$ en diabetes gestacional (DG).

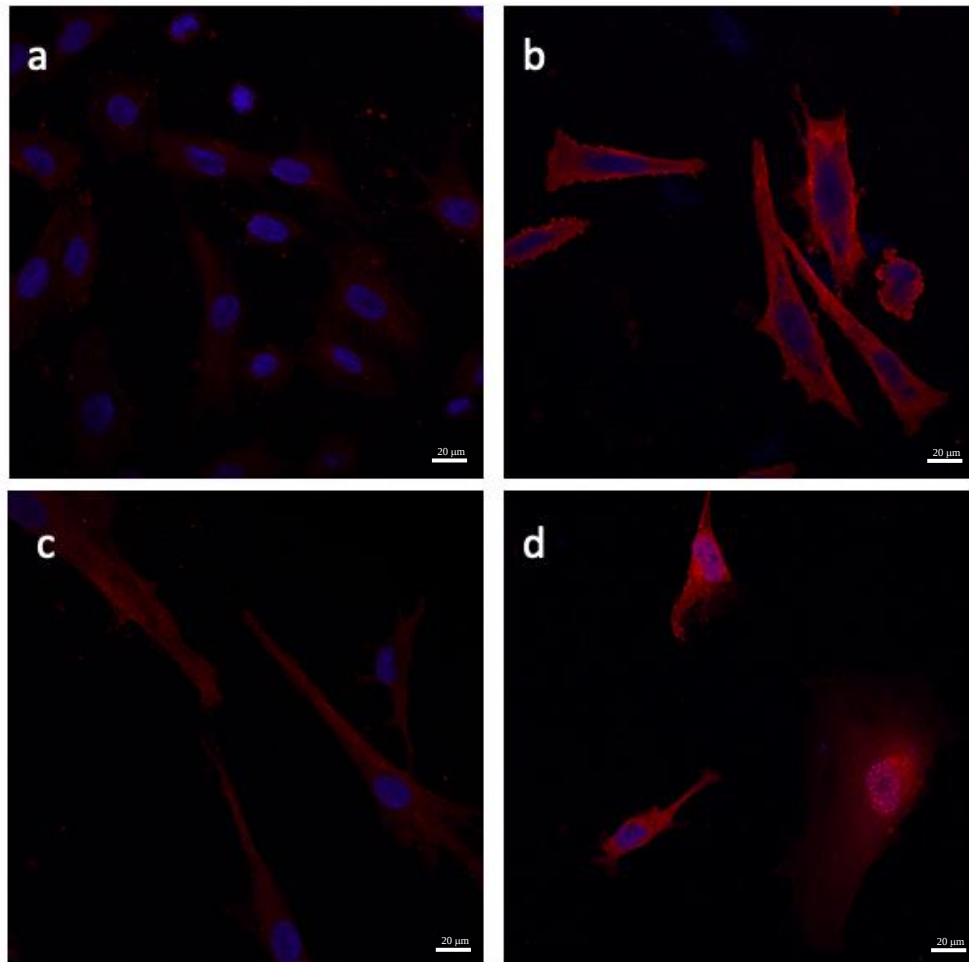


Figura 5. Inmunofluorescencia para subunidades α y $\beta 1$ de BKCa en HUVECs normales y diabetes gestacional. HUVECs fueron obtenidas mediante digestión con colagenasa y posteriormente sembradas en vidrios de 60 mm. Se determinó la expresión de subunidad α (**a, c**) y $\beta 1$ (**b, d**) en HUVECs provenientes de embarazos normales (**a, b**) y de diabetes gestacional (**c, d**). Imágenes son representativas (40x) del plano medio del procesamiento confocal.

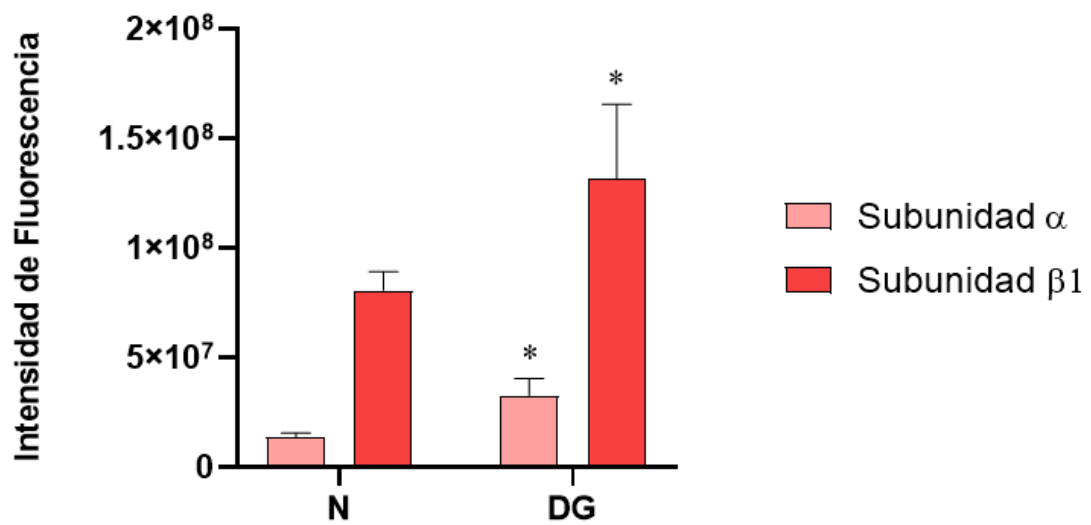


Figura 6. Cuantificación de Inmunofluorescencia BKCa en HUVECs normales y en diabetes gestacional. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada mediante programa ImageJ a partir de regiones de interés (ROI). Las barras representan valores promedio de intensidad de fluorescencia $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ vs normal (N). (n=7)

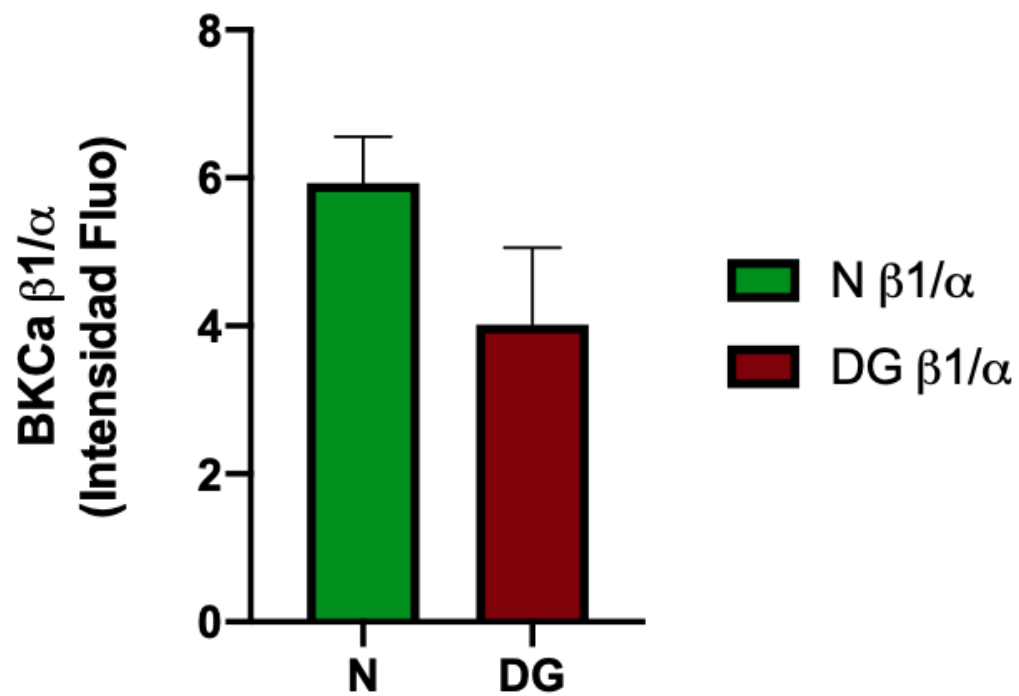


Figura 7. Cuantificación de la relación $\beta 1$ y α de BKCa. La intensidad de fluorescencia de $\beta 1$ se divide por la intensidad de fluorescencia de α para obtener la relación BKCa $\beta 1$: α . Valores son promedio $\pm$ error estándar. $n=3$.

Por otro lado, al evaluar el comportamiento de las subunidades α y $\beta 1$ en HUVECs normales (N) incubadas con insulina (1 nM; 10 nM) (Fig.8, 9), no se observó un cambio en la expresión de las subunidades (Fig. 10a, 10b). En cambio, en HUVECs DG incubadas con insulina se observó un aumento de la expresión de la subunidad α de 1,6 veces (Ins. 1 nM) y de 4,5 veces (Ins. 10 nM) con respecto a su control (Fig. 10a), sin cambios significativos en subunidad $\beta 1$ (Fig. 10b).

Finalmente, al evaluar la relación de expresión $\beta 1:\alpha$ podemos observar que no hay ningún cambio al comparar entre HUVECs normales, mientras que en células DG la insulina 1 nM y 10 nM disminuye un 50% y 89%, respectivamente, esta relación en comparación con las células normales incubadas con insulina (Fig. 11). En DG, la incubación con insulina 10 nM disminuye 82% la relación $\beta 1:\alpha$ en comparación con su propio control sin insulina (Fig. 11).

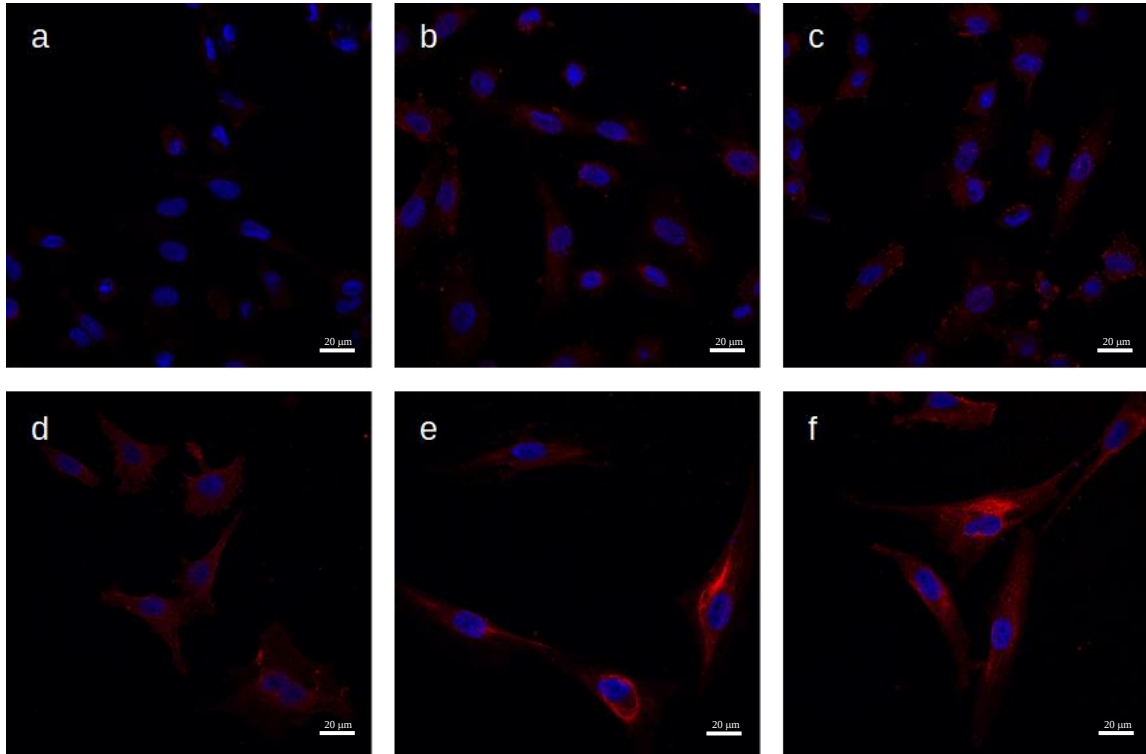


Figura 8. Expresión de BKCa α en HUVECs expuestas a Insulina. HUVECs sembradas en vidrios de 60 mm fueron incubadas con insulina (1, 10 nM) por 30 min previo a ser fijadas, permeabilizadas, bloqueadas e incubadas con anticuerpo 1° anti BKCa - α (toda la noche, 4°C) y anticuerpo secundario (1 hr, T° ambiente) acoplado a fluorescencia. Se muestran imágenes representativas del (40x) plano medio del procesamiento confocal de HUVECs normales (a, b, c) o DG (d, e, f), en condición control (a, d) o expuestas a insulina 1 nM (b, e) o a insulina 10 nM (c, f).

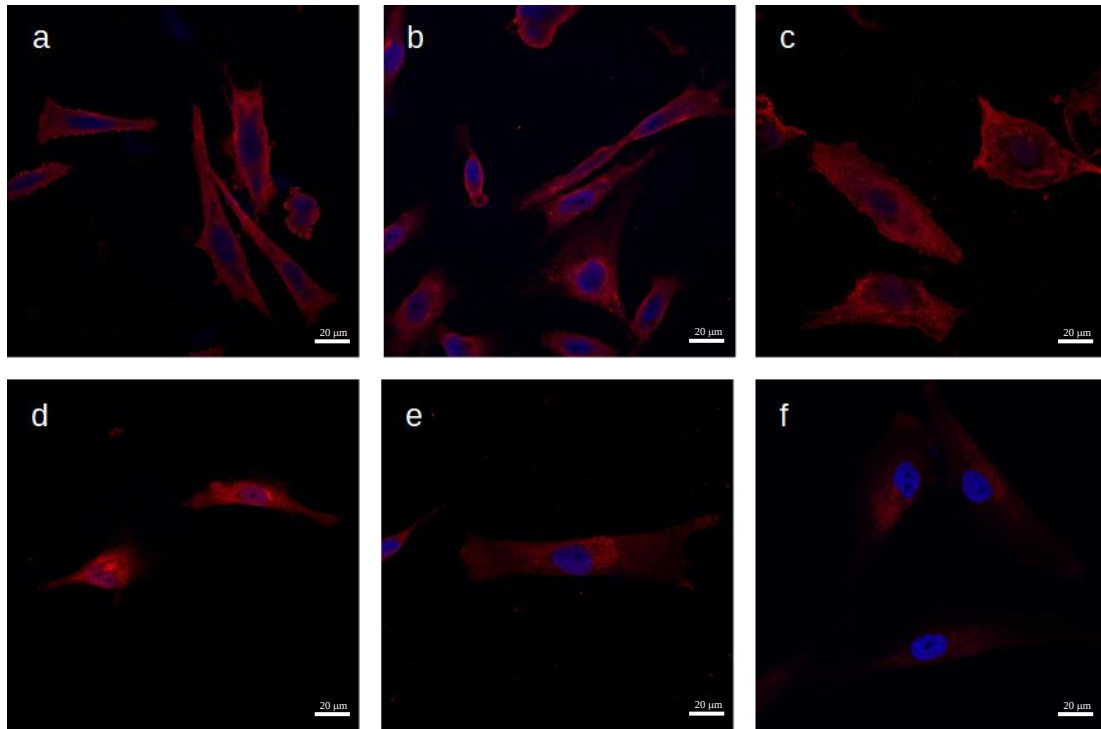


Figura 9. Expresión de BKCa β 1 en HUVECs expuestas a Insulina. HUVECs sembradas en vidrios de 60 mm fueron incubadas con insulina (1, 10 nM) por 30 min previo a ser fijadas, permeabilizadas, bloqueadas e incubadas con anticuerpo 1° anti BKCa - β 1 (toda la noche, 4°C) y anticuerpo secundario (1 hr, T° ambiente) acoplado a fluorescencia. Se muestran imágenes representativas (40x) del plano medio de procesamiento confocal de HUVECs normales (a, b ,c) o DG (d, e, f), en condición control (a, d) o expuestas a insulina 1 nM (b, e) o a insulina 10 nM (c, f).

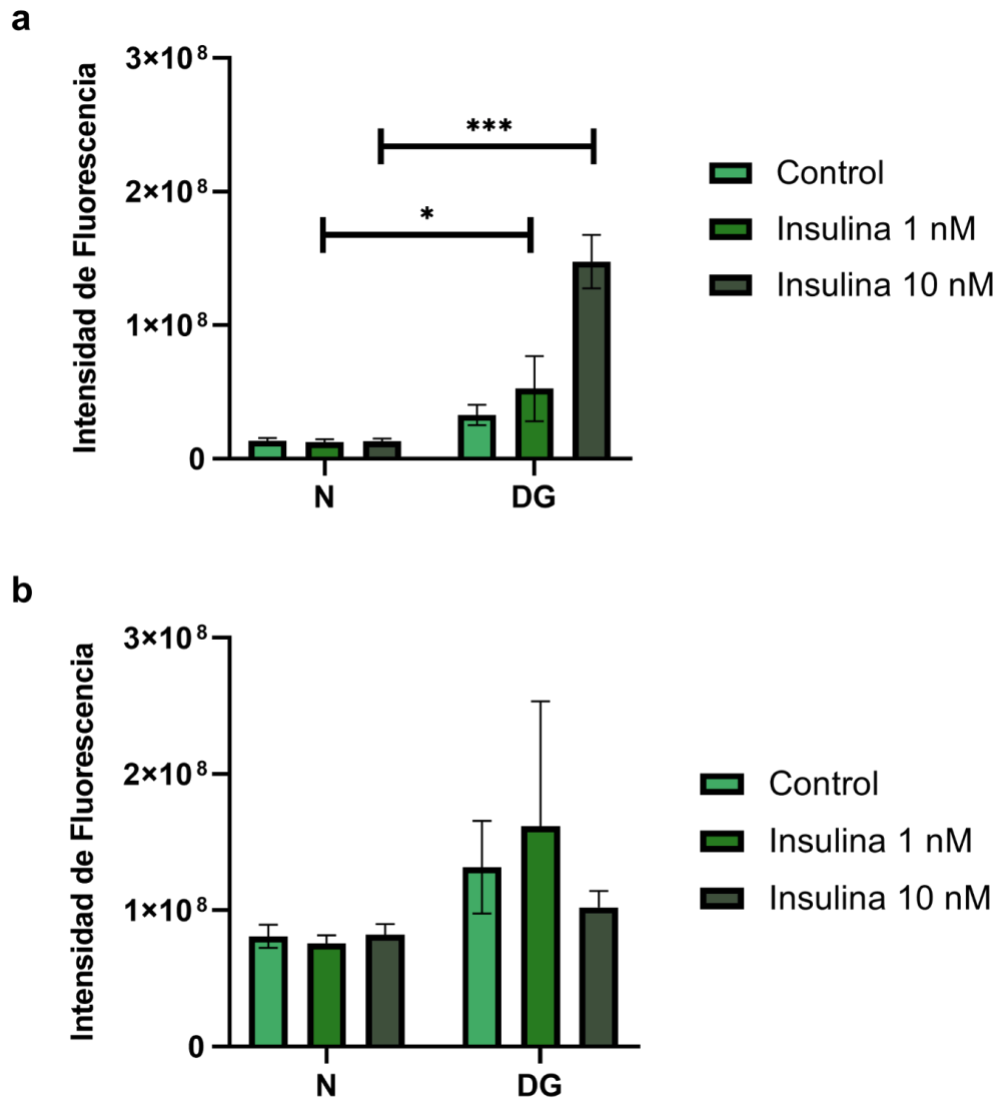


Figura 10. Aumento de expresión de BKCa α en DG. La intensidad de fluorescencia fue cuantificada mediante programa ImageJ a partir de regiones de interés (ROI) con expresión de subunidades α (a) y $\beta 1$ (b). Las barras representan valores promedio $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ vs normal (N); *** $p < 0,001$ vs normal (N). $n = 5$.

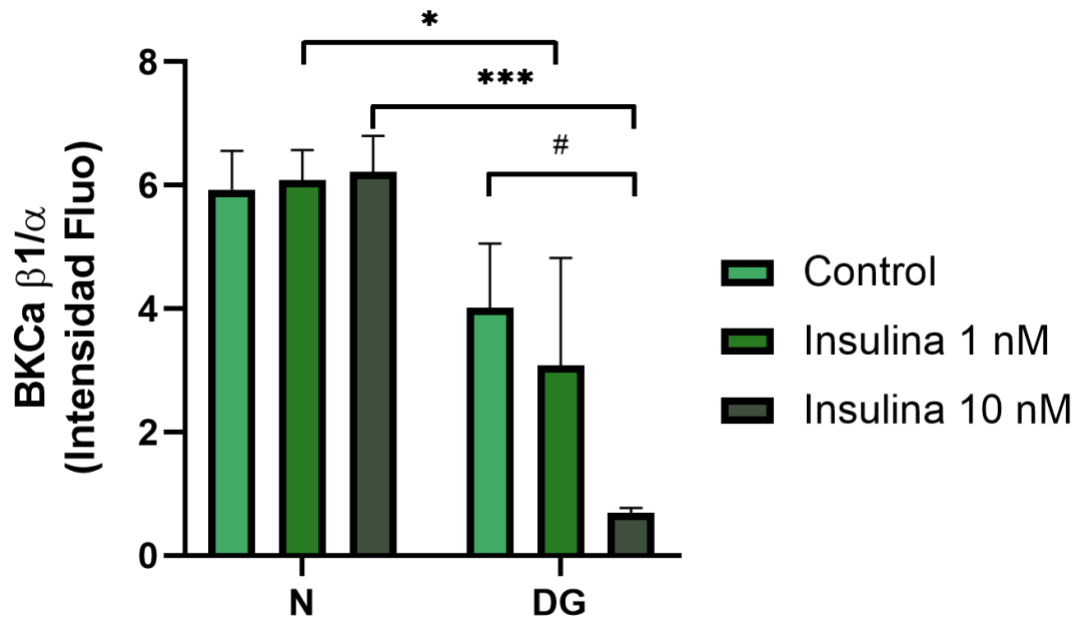


Figura 11. Relación de expresión de subunidades $\beta 1$ y α de BKCa en HUVECs DG. La intensidad de fluorescencia de $\beta 1$ se divide por la intensidad de fluorescencia de α para obtener la relación BKCa $\beta 1:\alpha$. Valores son promedios $\pm$ error estándar. *p<0,05 vs normal (N); **p<0,005 vs normal (N); #p<0,05 vs control DG. n=5.

3.2. Análisis de potencial de membrana en HUVECs.

Se evaluó el funcionamiento adecuado de la sonda utilizando un control positivo o control de despolarización como KCl (90 mM) y un control negativo o control de hiperpolarización como endotelina – 1 (10 nM) (Fig.15). KCl induce aumento de fluorescencia, mientras que endotelina – 1 disminuye la fluorescencia en relación al control, lo que confirma la viabilidad del método.

Se observó una disminución de la fluorescencia al comparar células endoteliales de DG vs N (Fig.16), lo cual se confirmó al cuantificar la fluorescencia (Fig.17-18). Esto indicaría la existencia de un estado de hiperpolarización en células endoteliales con diabetes gestacional (DG).

En los ensayos con inhibidores de canales KCa, se observó que TEA (Inhibidor general de KCa), TRAM – 34 (Inhibidor de IKCa) e Iberitoxina (Inhibidor de BKCa) genera disminución de la fluorescencia en HUVECs normales, siendo mayor esta disminución en el caso de la Iberitoxina (Fig.18, 19, 20). Al evaluar los mismos inhibidores en HUVECs DG, se observó que tanto Iberitoxina como TEA no generan cambio con respecto a su control (Fig.19, 20), mientras que TRAM – 34 indujo una aparente disminución de la fluorescencia en relación al control (Fig. 20). Cada condición con inhibidores cuenta con un n de 2, por lo que no se pudo realizar test estadístico.

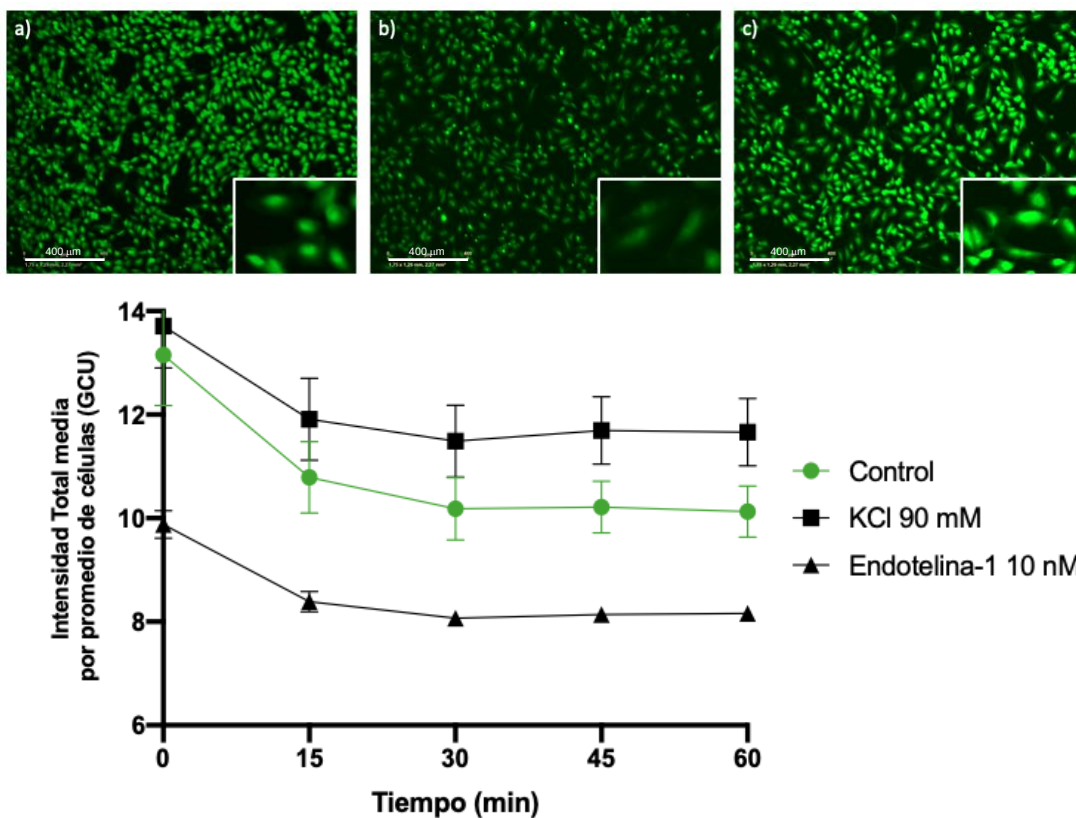


Figura 12. Prueba de sonda DIBAC₄(3). HUVECs fueron expuestas (2-3 min) a KCl (90 mM) y endotelina – 1 (10 nM) previo a la determinación de fluorescencia de sonda DIBAC₄(3). KCl se considera control de despolarización, mientras que endotelina – 1 de hiperpolarización. En panel superior se muestran imágenes representativas con aumento 10x de células a los 30 min de lectura de fluorescencia, insertos muestras ampliación de imagen. Valores son promedio $\pm$ error estándar. (a) Control; (b) Endotelina -1 (10 nM); (c) KCl (90 nM).

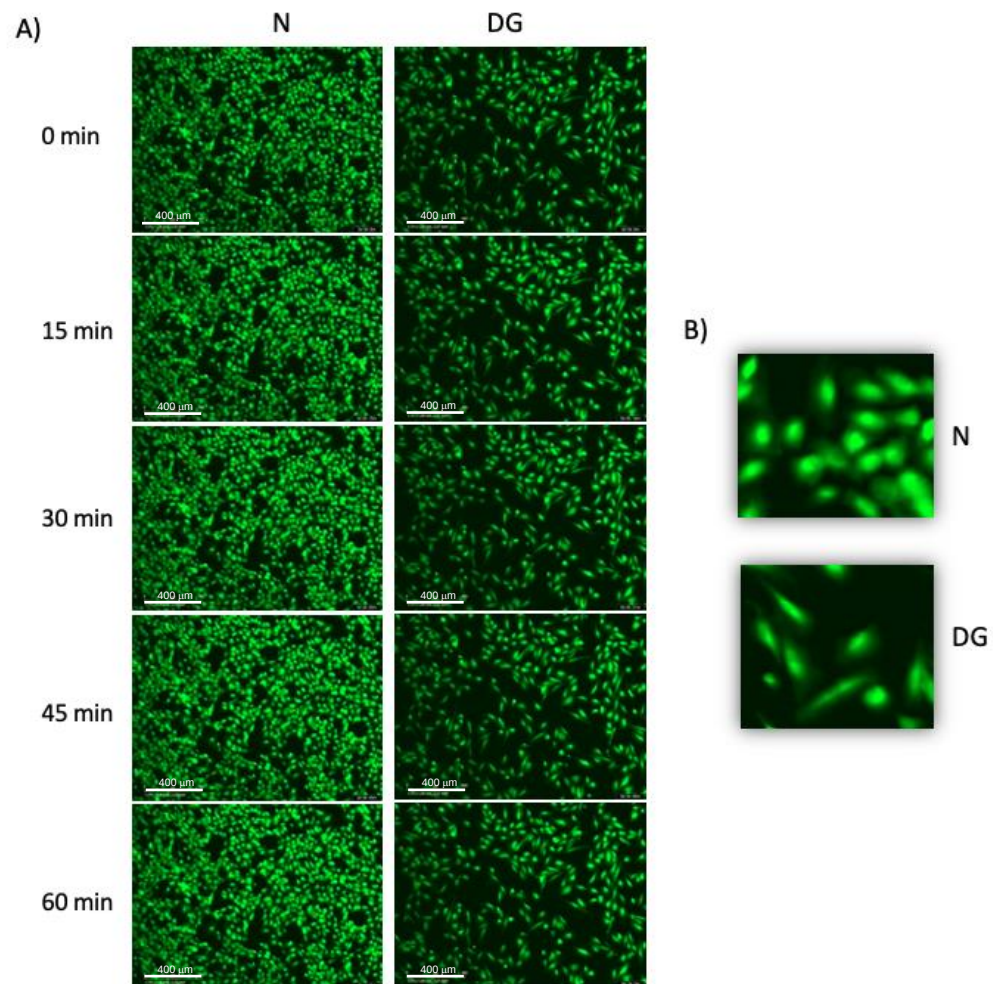


Figura 13. Disminución de fluorescencia DIBAC₄(3) en HUVECs DG. HUVECs provenientes de embarazos normales (N) o con diabetes gestacional (DG) fueron incubadas (30 min, 37°C) con sonda DIBAC₄(3). Imágenes son representativas de captura con aumento 10x realizada por equipo Incucyte, el cual también entrega la cuantificación promedio por células.

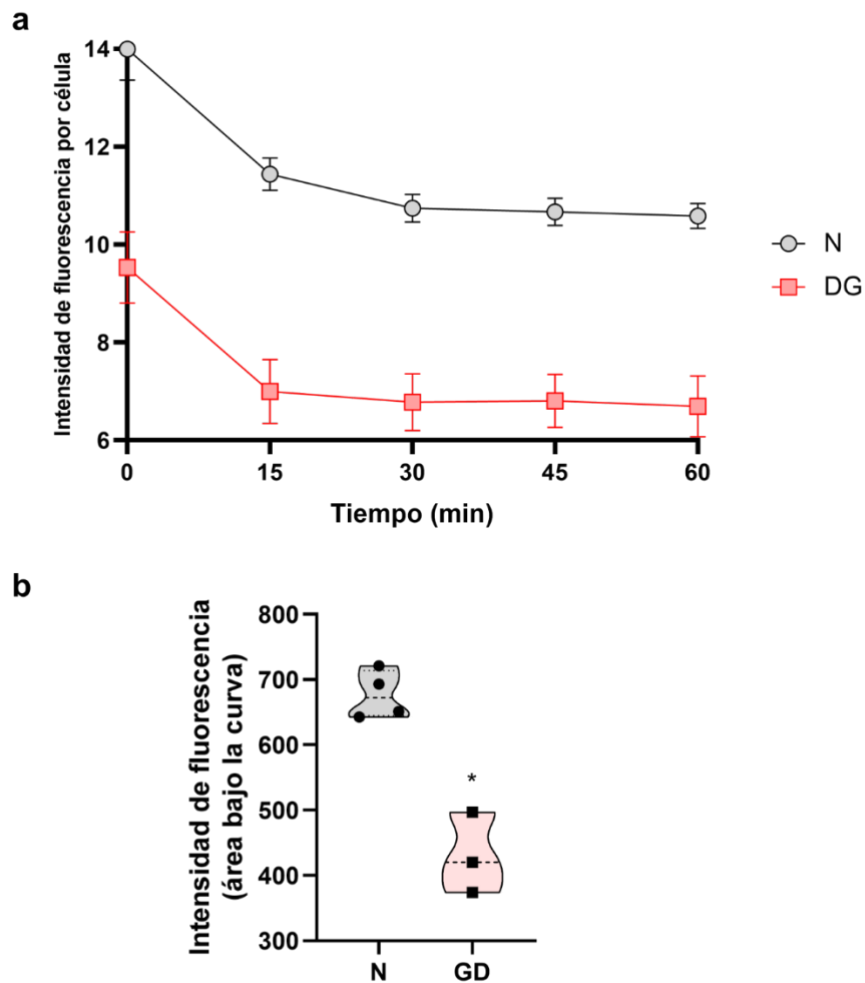


Figura 14. Cuantificación del efecto de DG sobre el potencial de membrana. a) Intensidad promedio de fluorescencia por célula en HUVECs normales (N) o de diabetes gestacional (DG). La disminución de la fluorescencia en contracción con N, indica que en DG existe mayor hiperpolarización de membrana plasmática. **b)** Área bajo la curva del gráfico A. Valores son promedio $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ vs N. $n = 7$.

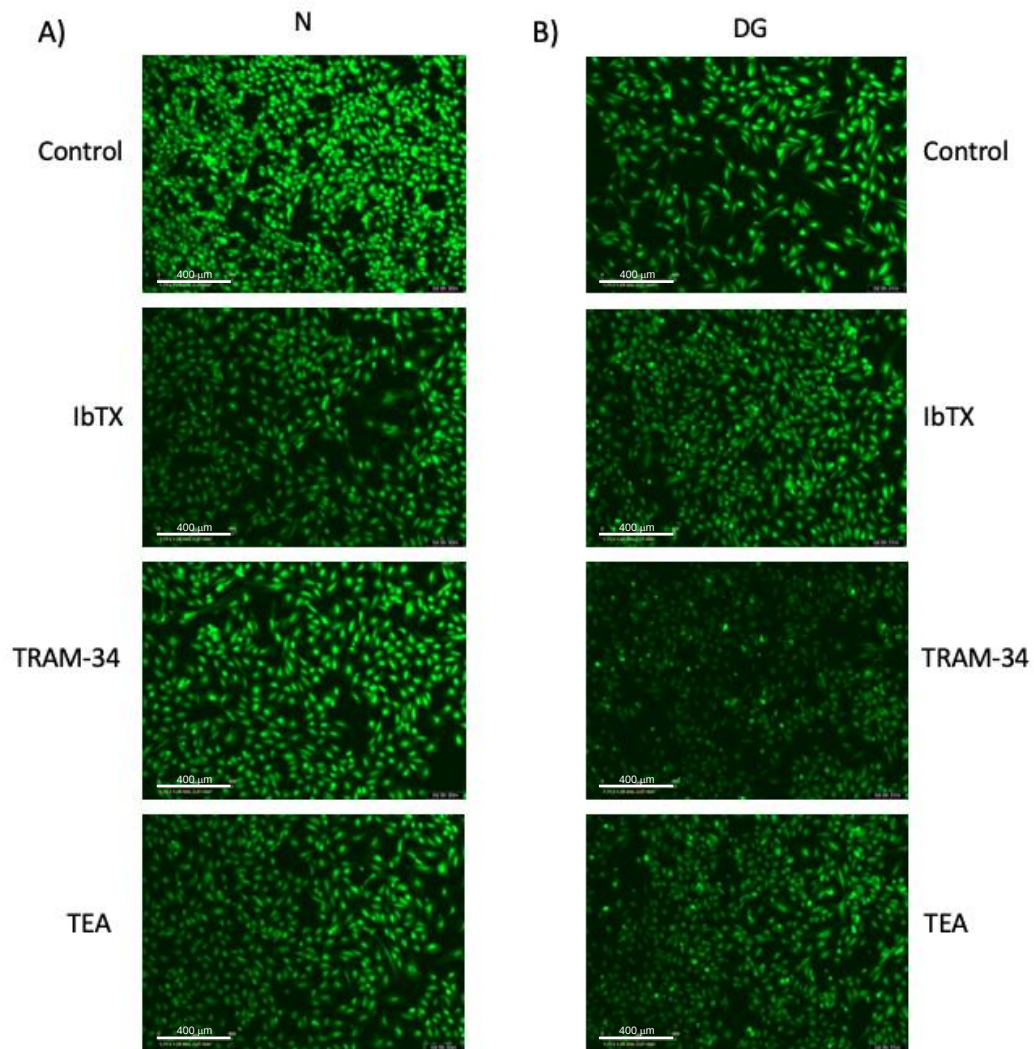


Figura 15. Fluorescencia DIBAC₄(3) en HUVECs normales y DG. HUVECs normales (N) y de diabetes gestacional (DG) fueron cargadas con sonda DIBAC₄(3) y luego incubadas (5 min) con inhibidores iberitoxina (IbTX 100 nM), TRAM – 34 (0,2 μm), Tetraetilamonio (TEA 1 mM). Se obtuvieron imágenes con aumento 10x y se cuantificó la fluorescencia en sistema Incucyte por 1h a 37°C.

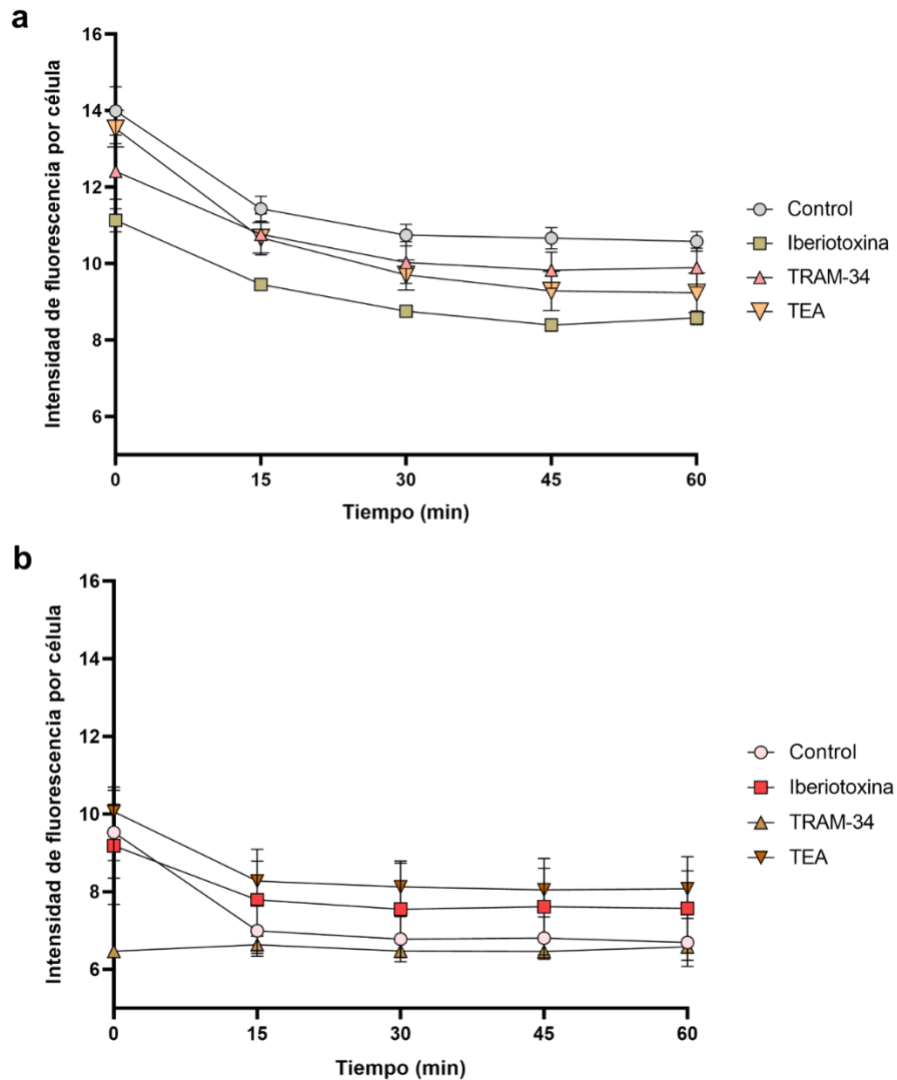


Figura 16. Cuantificación del efecto de Inhibidores sobre la fluorescencia de DIBAC₄(3). HUVECs normales (**a**) y de diabetes gestacional (**b**) fueron cargadas con sonda DIBAC₄(3) y luego incubadas (5 min) con inhibidores Iberiotoxina (IbTX 100 nM), TRAM – 34 (0,2 μ M), Tetraetilamonio (TEA 1 mM). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio por célula mediante sistema Incucyte. Valores son promedios $\pm$ error estándar. n=6.

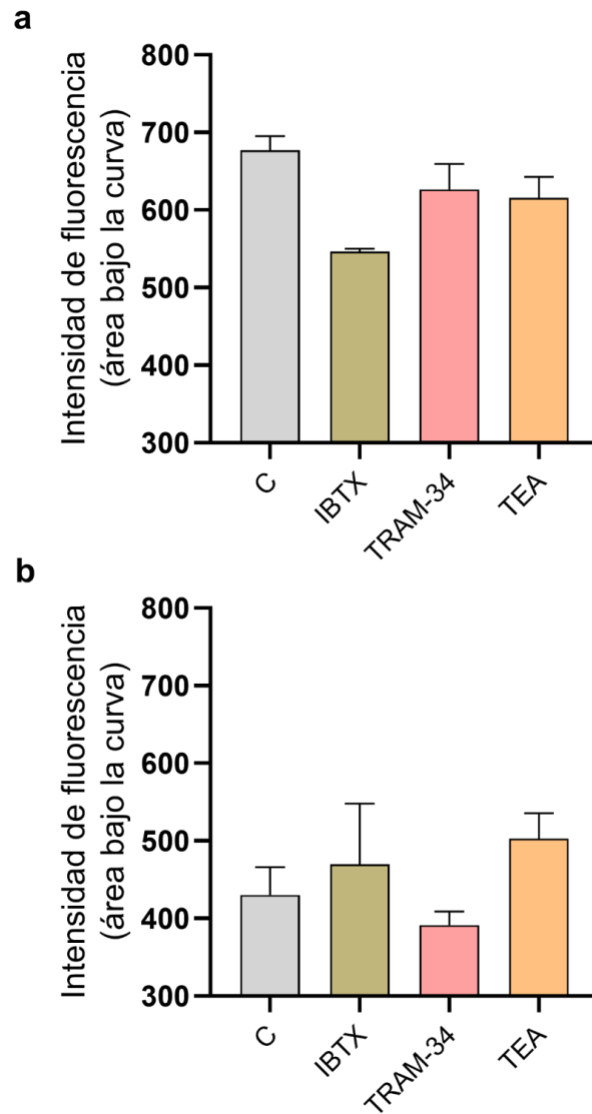


Figura 17. Efecto total de inhibidores sobre el potencial de membrana. Se cuantificó el área bajo la curva de las respuestas a inhibidores en HUVECs normales (a) y de diabetes gestacional (b). Valores son promedios $\pm$ error estándar. n=6.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la insulina en concentraciones crecientes (0,1 nM; 1 nM; 10 nM; 100 nM), y se observó que en HUVECs N se generó una disminución gradual de la fluorescencia (Fig.21). Al evaluar el mismo efecto en HUVECs GD, se observó que la fluorescencia se mantuvo constante hasta 10 nM (Fig.22), disminuyendo significativamente con la concentración de 100 nM (Fig.22, 23).

Finalmente, considerando lo anterior, se evaluó estadísticamente el efecto de la insulina y se observó una reducción del efecto de la insulina de 4,36 veces en HUVECs DG vs HUVECs N (Fig.25).

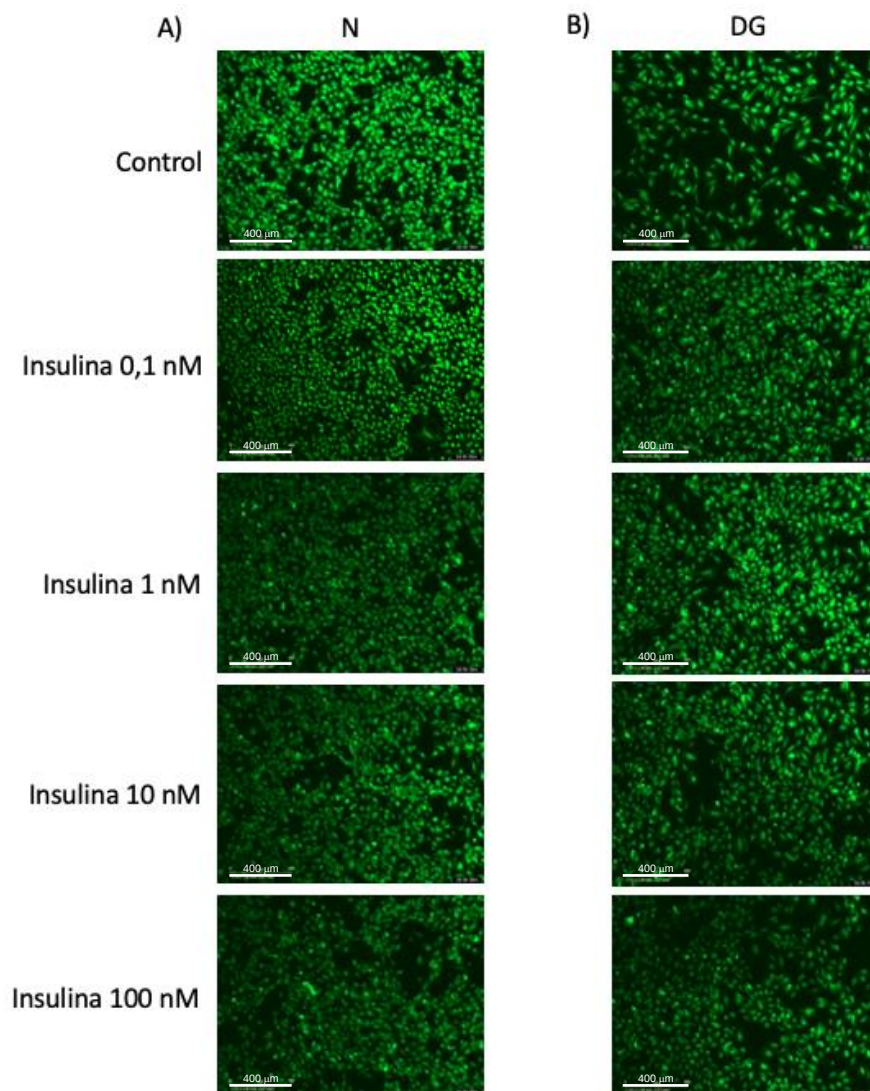


Figura 18. Efecto de insulina sobre la fluorescencia DIBAC₄(3) en HUVECs normales y DG . HUVECs normales (N) y de diabetes gestacional (DG) fueron cargadas con sonda DIBAC₄(3) y luego incubadas (30 min) con insulina (0,1 – 100 nM). Se obtuvieron imágenes con aumento 10x y se cuantificó la fluorescencia en sistema Incucyte por 1h a 37°C.

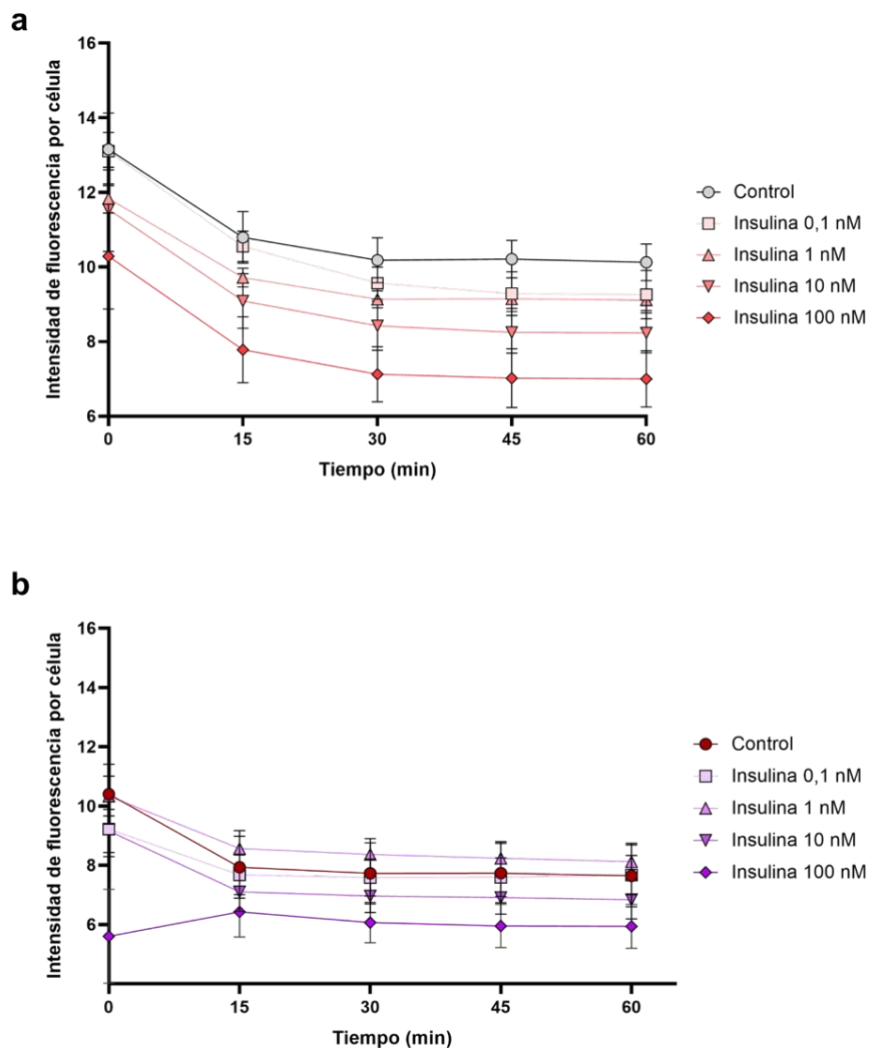


Figura 19. Cuantificación del efecto de insulina sobre la fluorescencia de DIBAC₄(3) en HUVECs normales y DG. HUVECs normales (**a**) y de diabetes gestacional (**b**) fueron cargadas con la sonda DIBAC₄(3) y luego incubadas (30 min) con insulina (0,1 – 100 nM). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia promedio por célula mediante el sistema Incucyte. Valores son promedios $\pm$ error estándar. n=6.

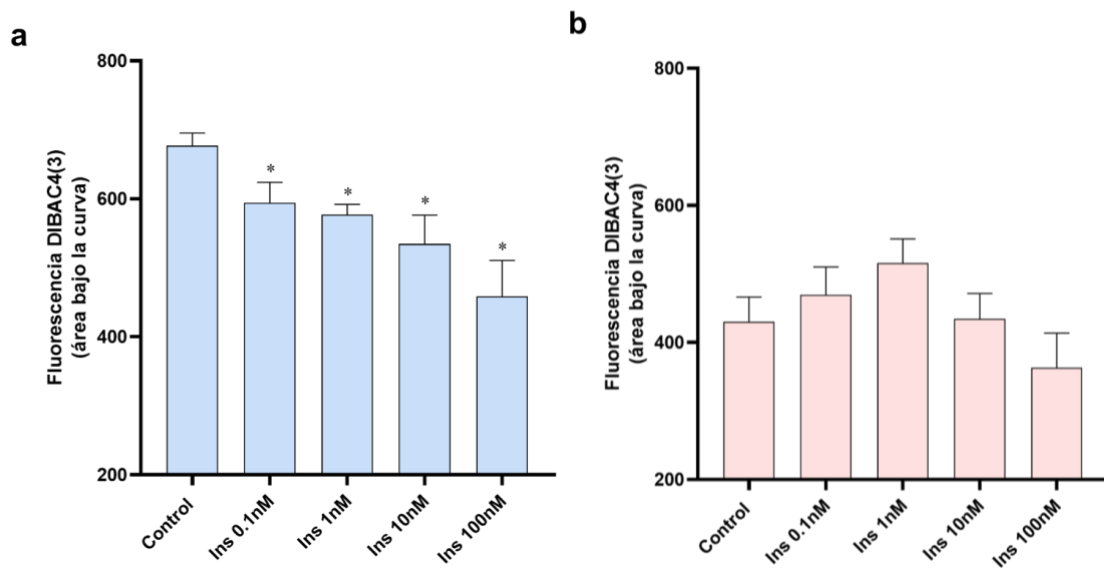


Figura 20. Efecto total de insulina sobre la fluorescencia de DIBAC₄(3) en HUVECs normales y DG. Se cuantificó el área bajo la curva de las respuestas a insulina en HUVECs normales (**a**) y de diabetes gestacional (**b**). Valores son promedios $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ vs control. $n=6$.

4. Discusión

4.1. Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa) en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs).

Los canales de potasio activados por calcio de alta conductancia (BKCa) constan de un grupo de subunidades (α, β, γ) que en conjunto permiten el flujo iónico y la hiperpolarización, actividad que es gatillada por estímulos eléctricos o por un cambio en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. A pesar que estos canales han sido ampliamente estudiados en células de músculo liso vascular (*Dopico., et al., 2018*), en nuestro estudio confirmamos su expresión en células endoteliales, lo cual había sido anteriormente registrado por Lovinger y colaboradores (*M. Lovinger., et al., 2003*), quienes revelan la existencia de los canales BKCa en HUVECs mediante RT – PCR.

En patologías placentarias como preeclampsia se ha descrito una disminución de la expresión de las subunidades $\alpha\text{-}\beta 1$ en arterias de placa coriónica placentaria humana (*He M., et al., 2018*). Además, en células

musculares lisas de arteria umbilical humana (HUASMCs) con diabetes mellitus gestacional también se ha descrito una disminución de la expresión de las subunidades α - β 1 de canales BKCa (H. Li., et al., 2022). A diferencia de los estudios mencionados, en el presente estudio observamos que hay una tendencia al aumento en la expresión de RNA de la subunidad α en HUVECs DG, lo que se confirma con el aumento de la expresión de la proteína determinado por Inmunofluorescencia. También se determinó un aumento de la expresión proteica de la subunidad β 1.

Proponemos que el aumento de subunidades β 1 en HUVECs DG podría ser una respuesta compensatoria ante la fisiopatología de la DG, que se caracteriza por disfunción endotelial placentaria y alteración del flujo fetoplacentario (Despaigne O.L.P., 2012; Desoye y van Poppel, 2015). Ante este escenario, una potenciación de mecanismos vasodilatadores (como EDH) sería una forma de regular la resistencia vascular y mantener un flujo sanguíneo adecuado. Cabe destacar que, a diferencia de la preeclampsia, en que existe hipertensión materna y restricción de crecimiento fetal, en los embarazos con DG se puede mantener estable la presión y el crecimiento fetal (Desoye y van Poppel, 2015).

Por otro lado, a pesar de determinar aumentos de la expresión de α y $\beta 1$ en la célula endotelial, desconocemos el grado de interacción entre ambas proteínas. Estudios realizados por Dennis Leo y Colaboradores (*Dennis Leo M., et al., 2015*) plantean la movilización de subunidades α - $\beta 1$ mediante vesículas en células musculares lisas de arteria cerebral de ratas, lo cual puede dar una idea del comportamiento de las subunidades en HUVECs, ya que el mecanismo de movilización vesicular podría ser similar. Esto podría ser la razón del cambio en la distribución de la fluorescencia en las células DG comparadas con normales, ya que se aprecia mayor intensidad de fluorescencia en la zona perinuclear mientras que las células normales muestran una distribución uniforme con expresión a nivel de membrana plasmática. (Fig. 21).

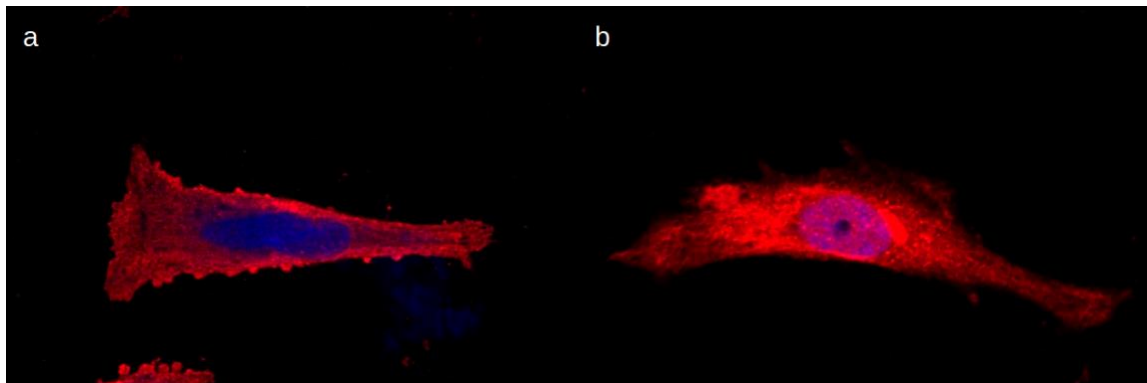


Figura 21. Cambio en distribución de $\beta 1$ en DG. Magnificación digital de imágenes mostradas en figura 12 (a y d). Se aumentó por igual el brillo y saturación para apreciar los cambios en la distribución de fluorescencia entre HUVECs normales (a) y DG (b).

Además, otro reporte de Won S. y colaboradores (*Won S., et al., 2010*) evaluó el movimiento de BKCa en la línea celular Cos-7 (células tipo fibroblasto de riñón de mono) y en neuronas hipocampales utilizando “quantum dots”. De esta manera, concluyeron que la movilidad de BKCa depende del tipo de célula, localización subcelular y composición de subunidades. Entonces, sí se puede teorizar sobre el movimiento de vesículas que contengan estas subunidades considerando la necesidad celular en HUVECs en estado fisiológico o con alguna alteración por parte de una patología subyacente. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar si las subunidades de BKCa se mueven por vesículas entre citoplasma y membrana plasmática, ya sea ante estímulos fisiológicos o en patologías como DG.

En resumen, las subunidades α y $\beta 1$ están expresadas en HUVECs de embarazos normales (N), lo que confirma la presencia de estos canales en células endoteliales de vena umbilical humana, por otro lado, el aumento de la expresión de proteínas de ambas subunidades en HUVECs de embarazos con diabetes gestacional (DG) estaría asociado a una respuesta compensatoria y la distribución de fluorescencia en la célula podría indicar mayor expresión citosólica (en vesículas u organelos) de subunidad $\beta 1$ en DG, comparada con la expresión en membrana plasmática en embarazo normal.

4.2. Rol funcional de los canales BKCa en HUVECs.

Los resultados mostraron una disminución significativa de la fluorescencia de DIBAC₄(3) en HUVECs DG en comparación de la condición normal, lo cuál plantea un estado hiperpolarizante en HUVECs DG. Al considerar esto último, no se puede atribuir completamente el aumento en la hiperpolarización al canal BKCa ya que podrían estar participando otros canales de potasio como IKCa, SKCa o K_{ir} (*Droogmans y Nilius, 2001*). Es por esto que se evaluó el efecto de la Iberiotoxina, debido a que es una molécula capaz de interaccionar específicamente con el poro del canal BKCa. La Iberiotoxina indujo un efecto hiperpolarizante en HUVECs N, mientras que en HUVECs DG no se observó ningún cambio significativo. Esto podría indicar una alteración en la interacción de la toxina con la subunidad α de BKCa, lo cual se podría dar por un cambio estructural en la subunidad α , impidiendo la interacción con IbTX (*Latorre R., et al., 1992*).

Anteriormente se ha descrito que la Iberiotoxina causa un efecto depolarizante en células musculares lisas de arteria umbilical humana (HUASMCs) (*Li Y., et al., 2022*) y en células endoteliales microvasculares de pulmón (LMVEC) (*Vang A., et al., 2010*). Otro estudio por Burgazli y colaboradores (*Burgazli K.M., et al., 2014*) evaluó el efecto hiperpolarizante de la

IL-1 β sobre los canales BKCa, indica que al co incubar IL-1 β + IbTX en HUVECs normales se genera una disminución del efecto hiperpolarizante de la IL-1 β por acción de IbTX. A partir de esto, resulta relevante observar esta diferencia funcional por parte de la IbTX sobre los canales BKCa.

Al utilizar Iberiotoxina en células normales se esperaría un aumento en la fluorescencia por el bloqueo del poro iónico, lo que llevaría a una disminución en la función de hiperpolarización, tendiendo a la depolarización, sin embargo, se puede observar que al aplicar Iberiotoxina hay una disminución en la fluorescencia y se acentúa el estado hiperpolarizante. Esto contrasta con lo reportado por Rojas y colaboradores (*Rojas S., et al., 2020*) en que se observó un aumento de la fluorescencia luego de 30 min de incubación con Iberiotoxina. La diferencia con nuestro estudio se puede deber al cambio en la manera de cuantificar la fluorescencia, teniendo el sistema Incucyte mayor sensibilidad que los lectores de uso común, además que entrega un resultado de fluorescencia por célula, lo cual tiene mayor validez cuantitativa y refleja de mejor manera lo que está ocurriendo en el cultivo celular. Cabe destacar que en el estudio de Rojas y Colaboradores el efecto de la Iberiotoxina se asoció con un aumento de transportador h – CAT1 en membrana que lleva finalmente a aumentar la captación de L – arginina y, en consecuencia, a la liberación de óxido nítrico (NO), molécula que puede desencadenar en el aumento de la hiperpolarización (*Dusting J.D., 1995; Bauer & Sotníková, 2010*). Entonces, el efecto de

hiperpolarización observado con Iberiotoxina puede ser a través de un mecanismo indirecto que se relaciona con la síntesis de óxido nítrico, antes que un efecto directo sobre la actividad de BKCa. Por otro lado, se ha reportado la existencia de un subconjunto de canales BKCa insensibles a Iberiotoxina en el sistema nervioso central, conformados por la interacción de α con la subunidad $\beta 4$ (Wang., et al., 2014), cuya existencia o actividad se desconoce en HUVECs. En este contexto, es importante el antecedente del estudio de Li y Colaboradores, en que se muestra que la subunidad $\beta 4$ se expresa en tejido de arteria umbilical humana y que su expresión no cambia en muestras de DMG (Li., et al., 2022). Entonces, la subunidad α podría estar interaccionando con la subunidad $\beta 4$ para inducir hiperpolarización, actividad que no sería inhibida por Iberiotoxina. Son necesarios más estudios para determinar la expresión de este subtipo de canales en HUVECs y detallar el mecanismo por el cuál se estaría induciendo la hiperpolarización en DG.

En base a nuestros resultados, en diabetes gestacional el estado hiperpolarizante estaría correlacionado con el aumento de subunidades α y $\beta 1$. Estudios de Yang y colaboradores (Yang Y., et al., 2013) relacionan el aumento de subunidades con una mayor sensibilidad a Ca^{2+} y a voltaje, en consecuencia, se promueve un mayor estado de hiperpolarización por la actividad del canal.

La expresión de las subunidades en función a la relación $\beta 1:\alpha$ en DG se encuentra disminuida a expensas del aumento significativo de α , esto indica una mayor abundancia de subunidades α por sobre $\beta 1$, lo que podría tener un efecto en el funcionamiento del canal ya que la estequiometría juega un rol importante en su función. Se ha descrito por Wang y colaboradores (*Ying YW., et al., 2002*) que el canal es activo con las 4 subunidades α pero no necesariamente deben estar las 4 subunidades $\beta 1$, es decir, la actividad y/o función del canal se puede generar con un mínimo de subunidades $\beta 1$. El aumento de la interacción $\beta 1 - \alpha$ regularía la sensibilidad a Ca^{2+} y voltaje, lo que puede aumentar o disminuir la actividad del canal. Además, como señalamos anteriormente, podrían verse afectadas las subunidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$, cuya expresión se documentado en arteria umbilical (*Li., et al., 2022*), desconociéndose su expresión o actividad en HUVECs.

Finalmente, se mantiene la idea de la generación de un estado de hiperpolarización en DG, que se asociaría con un aumento de la expresión de subunidad α de BKCa.

4.3. Efecto de la Insulina

La insulina ha demostrado ser una molécula capaz de aumentar la hiperpolarización de membrana en HUVECs. En este proceso, la insulina induciría a la vasodilatación que sería dependiente de la actividad de canales BKCa, los cuales serían activados por insulina mediante mecanismos no conocidos (*González y Rivas, 2016*).

Al evaluar HUVECs normales con concentraciones crecientes de Insulina se pudo confirmar el efecto hiperpolarizante derivado de la acción de esta molécula, lo cual coincide con lo observado por Rojas y colaboradores (*Rojas S., et al., 2020*), en donde se asocia la síntesis de óxido nítrico (NO) mediada por insulina con la posible participación de la actividad de canales BKCa. Por otro lado, en HUVECs DG se observa que no hay un efecto hiperpolarizante derivado de la acción de la insulina, en cambio hay un estado de hiperpolarización basal en donde la insulina no estaría participando. Esto último puede tener sentido debido a la naturaleza de la patología, es decir, por el desarrollo de la resistencia a la insulina y la hiperglicemia. En podocitos se ha descrito que la Insulina regula la actividad de canales BKCa, lo que se vería alterado en condiciones de hiperglicemia (*Kim y Dryer, 2010*). Entonces, en diabetes gestacional podría afectarse la acción de la insulina sobre el canal BKCa. De todas formas, esto último sería especulativo ya que al día de hoy aún no se conoce con detalle el mecanismo por el cual la insulina activa los canales BKCa.

Finalmente, tanto el estado hiperpolarizante como los estudios de expresión de BKCa en HUVECs DG nos permite proponer que la diabetes gestacional es una condición que afecta el potencial de membrana de células endoteliales fetales, lo que se asocia con mayor expresión de BKCa. La regulación fisiológica del potencial de membrana por insulina se perdería en la diabetes gestacional, lo cual sería otra manifestación del estado de resistencia a la insulina en que se encuentra la circulación fetoplacentaria. De todas maneras, siguen siendo necesarios nuevos estudios para comprender el comportamiento de las subunidades beta de BKCa en HUVECs y los mecanismos por los cuales la insulina es capaz de regular estos canales.

Con respecto a las limitaciones del estudio, la evaluación del potencial de membrana con la sonda DIBAC₄(3) puede tener ciertas variables difíciles de manejar, es decir, al momento de incubar las moléculas a estudiar, como insulina o inhibidores, se pueden generar lecturas que no consideran un tiempo inicial de la actividad debido al tiempo que se necesita para agregar estas condiciones a la placa. Sin embargo, se intentaron mantener tiempos similares, pero no sabemos con exactitud el tiempo de acción que pueden tener ciertas moléculas al entrar en contacto con las células. Por otro lado, en Inmunofluorescencia podemos teorizar sobre la distribución de la fluorescencia asociado a movilización de subunidades, pero es necesario realizar otros experimentos, a pesar de que se puede cuantificar la distribución por software.

5. Conclusión y Proyecciones

Contrario a lo planteado, los canales BKCa presentan un aumento de la expresión de sus subunidades α y $\beta 1$ en diabetes gestacional. Proponemos que este cambio se da como un posible mecanismo compensatorio durante el desarrollo de la patología, propiciando un aumento de la hiperpolarización derivada de endotelio con el fin de equilibrar el estado vascular que podría generar la diabetes gestacional. Por otro lado, es importante no olvidar la participación de otros canales como IKCa o SKCa en los procesos de hiperpolarización en HUVECs.

Bajo la perspectiva de los canales BKCa, iberiotoxina generaría una mayor hiperpolarización en condiciones fisiológicas que aún no se han comprendido del todo. Por otro lado, la insulina presenta un menor efecto en DG lo que remarca la resistencia a la insulina en la patología estudiada. Además, los mecanismos por el cual la insulina interacciona con los canales BKCa aún son desconocidos.

Esta investigación profundizó en varios aspectos la presencia y variación del potencial de membrana asociado a los canales BKCa en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) de pacientes con embarazo normal (N) y con diabetes gestacional (DG). A partir de lo anterior, es necesario comprender que ocurre con la interacción y movilización de las subunidades de estos canales en condiciones fisiológicas y de diabetes gestacional, ya que ambos procesos permitirían comprender mejor los mecanismos desconocidos que fueron anteriormente nombrados.

Finalmente, es necesario aplicar técnicas más específicas para confirmar firmemente la presencia de estos canales y la interacción con otras proteínas, por ejemplo, western blot, ensayos de co – localización y ensayos de ligación de proteínas (PLA), por otro lado, sería fundamental estudiar lo que ocurriría con canales BKCa a nivel mitocondrial, como también sería interesante evaluar el comportamiento de subunidades gamma que también participan en el complejo del canal.

6. GLOSARIO

BKCa: Canal de potasio activado por Ca^{2+} de alta conductancia

Ca^{2+} : Calcio

DG: Diabetes gestacional

DMG: Diabetes mellitus gestacional

DIBAC₄(3): bis-(ácido-1,3-dibutilbarbiturico) trimetinoxonol

EDH: Hiperpolarización derivada de endotelio

FCS: Suero fetal bovino

HUVECS: Células endoteliales de vena umbilical

HBS: Solución buffer hanks

IbTX: Iberiotoxina

IKCa: Canal de potasio activado por Ca^{2+} de conductancia intermedia

KCa: Canal de potasio activado por Ca^{2+}

MV: Microvellosidad

M199: Medio 199

NO: Óxido nítrico

NBCS: Suero fetal de bovino recién nacido

PBS: Buffer fosfato salino

PCM: Medio de cultivo primario

PC: Placa coriónica

RT-PCR: Retrotranscripción reversa – Reacción en cadena de polimerasa

SKCa: Canales de potasio activados por Ca^{2+} de baja conductancia

TEA: Tetraetilamonio

TNG: Tolerante normal a la glucosa

7. Bibliografía

- [1] Adams, D. S., & Levin, M. (2012). Measuring resting membrane potential using the fluorescent voltage reporters DiBAC4 (3) and CC2-DMPE. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(4), pdb.prot067702.
- [2] Ando, M., Matsumoto, T., Kobayashi, S., Iguchi, M., Taguchi, K., & Kobayashi, T. (2018). Differential participation of calcium-activated potassium channel in endothelium-dependent hyperpolarization-type relaxation in superior mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96(8), 839-844.
- [3] Avogaro, A., Albiero, M., Menegazzo, L., de Kreutzenberg, S., & Fadini, G. P. (2011). Endothelial dysfunction in diabetes: The role of reparatory mechanisms. *Diabetes care*, 34(Supplement_2), S285-S290.
- [4] Bauer, V., & Sotníková, R. (2010). Nitric oxide—The endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. *General*

physiology and biophysics, 29(4), 319.

- [5] Begg, M., Mo, F.-M., Offertáler, L., Bátakai, S., Pacher, P., Razdan, R. K., Lovinger, D. M., & Kunos, G. (2003). G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca^{2+} -dependent K^{+} current. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 46188-46194.
- [6] Blickstein, I., Doyev, R., Trojner Bregar, A., Bržan Šimenc, G., Verdenik, I., & Tul, N. (2018). The effect of gestational diabetes, pre-gravid maternal obesity, and their combination ('diabesity') on outcomes of singleton gestations. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 31(5), 640-643.
- [7] Burgazli, K. M., Venker, C. J., Mericliler, M., Atmaca, N., Parahuleva, M., & Erdogan, A. (2014). Importance of large conductance calcium-activated potassium channels (BKCa) in interleukin-1b-induced adhesion of monocytes to endothelial cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(5), 646-656.
- [8] Burnham, M. P., Johnson, I. T., & Weston, A. H. (2006). Reduced Ca^{2+} -dependent activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels from arteries of Type 2 diabetic Zucker diabetic fatty rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(4), H1520-H1527.

- [9] Butler, A. R., & Williams, D. L. H. (1993). The physiological role of nitric oxide. *Chemical Society Reviews*, 22(4), 233-241.
- [10] Cabrera, L., Saavedra, A., Rojas, S., Cid, M., Valenzuela, C., Gallegos, D., Careaga, P., Basualto, E., Haensgen, A., & Pena, E. (2016). Insulin induces relaxation and decreases hydrogen peroxide-induced vasoconstriction in human placental vascular bed in a mechanism mediated by calcium-activated potassium channels and L-arginine/nitric oxide pathways. *Frontiers in Physiology*, 7, 529.
- [11] Candia, S., Garcia, M. L., & Latorre, R. (1992). Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca (2+)-activated K⁺ channel. *Biophysical journal*, 63(2), 583-590.
- [12] Carvajal Carvajal, C. (2017). El endotelio: Estructura, función y disfunción endotelial. *Medicina Legal de Costa Rica*, 34(2), 90-100.
- [13] Chauhan, H. K. (2012). Diabetes: The 'Achilles Heel' of our modernized society. En *Revista da Associação Médica Brasileira* (Vol. 58, pp. 399-399). SciELO Brasil.
- [14] Chen, C., & Wagoner, P. K. (1991). Endothelin induces a nonselective cation current in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 69(2), 447-454.

- [15] Choi, S., Kim, J. A., Oh, S., Park, M. H., Cho, G. J., & Suh, S. H. (2019). Internalization and Transportation of Endothelial Cell Surface K Ca 2.3 and K Ca 3.1 in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
- [16] Climent, B., Sánchez, A., Moreno, L., Pérez-Vizcaíno, F., García-Sacristán, A., Rivera, L., & Prieto, D. (2017). Underlying mechanisms preserving coronary basal tone and NO-mediated relaxation in obesity: Involvement of $\beta 1$ subunit-mediated upregulation of BKCa channels. *Atherosclerosis*, 263, 227-236.
- [17] Coleman, H. A., Tare, M., & Parkinson, H. C. (2004). Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 31(9), 641-649.
- [18] Corompt, E., Bessard, G., Lantuejoul, S., Naline, E., Advenier, C., & Devillier, P. (1997). Inhibitory effects of large Ca²⁺-activated K⁺-channel blockers on β -adrenergic-and NO-donor-mediated relaxations of human and guinea-pig airway smooth muscles. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 357, 77-86.
- [19] Cox, D. H. (2007). BK Ca-channel structure and function.

Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure, and Applications, 171-218.

- [20] Daly, A. (1994). Diabetes: The deadly pentad disease. *The Diabetes Educator*, 20(2), 156-162.
- [21] Deanfield, J. E., Halcox, J. P., & Rabelink, T. J. (2007). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), 1285-1295.
- [22] Desoye, G., & van Poppel, M. (2015). The feto-placental dialogue and diabetes. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 29(1), 15-23.
- [23] Despaigne, O. L. P. (2012). Diabetes: An epidemic of the XXI century. *MediSan*, 16(02), 294-297.
- [24] Dogan, M. F., Yildiz, O., Arslan, S. O., & Ulusoy, K. G. (2019). Potassium channels in vascular smooth muscle: A pathophysiological and pharmacological perspective. *Fundamental & clinical pharmacology*, 33(5), 504-523.
- [25] Dong, D.-L., Bai, Y.-L., & Cai, B.-Z. (2016). Calcium-activated potassium channels: Potential target for cardiovascular diseases. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 104, 233-261.
- [26] Dopico, A. M., Bukiya, A. N., & Jaggar, J. H. (2018).

- Calcium-and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 470, 1271-1289.
- [27] Dusting, G. J. (1995). Nitric oxide in cardiovascular disorders. *Journal of vascular research*, 32(3), 143-161.
- [28] EA, A. (2016). Canales de potasio (K⁺) y Calcio (Ca²⁺) en el músculo liso vascular. *Hipertensión arterial, epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica [Internet]*. Buenos Aires: Inter-Médica.
- [29] Farag, Y. M., & Gaballa, M. R. (2011). Diabetes: An overview of a rising epidemic. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(1), 28-35.
- [30] Félétou, M. (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: Therapeutic options? *British journal of pharmacology*, 156(4), 545-562.
- [31] Félétou, M. (2016). Endothelium-dependent hyperpolarization and endothelial dysfunction. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 67(5), 373-387.
- [32] Félétou, M., & Vanhoutte, P. M. (2006). Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(6), 1215-

1225.

- [33] Gauster, M., Desoye, G., Tötsch, M., & Hiden, U. (2012). The placenta and gestational diabetes mellitus. *Current diabetes reports*, 12, 16-23.
- [34] Ghassibe-Sabbagh, M., Mehanna, Z., Abi Farraj, L., Salloum, A. K., & Zalloua, P. A. (2019). Gestational diabetes mellitus and macrosomia predispose to diabetes in the Lebanese population. *Journal of clinical & translational endocrinology*, 16, 100185.
- [35] Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., & O'Rourke, S. T. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: Structural and functional implications. *Pharmacology & therapeutics*, 110(1), 103-116.
- [36] González, M., & Rivas, J. C. (2020). L-Arginine/nitric oxide pathway and KCa channels in endothelial cells: A Mini-Review. *Vascular Biology-Selection of Mechanisms and Clinical Applications*.
- [37] Guéguinou, M., Chantôme, A., Fromont, G., Bougnoux, P., Vandier, C., & Potier-Cartereau, M. (2014). KCa and Ca²⁺ channels: The complex thought. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(10), 2322-2333.

- [38] Haburcák, M., Wei, L., Viana, F., Prenen, J., Droogmans, G., & Nilius, B. (1997). Calciummactivated potassium channels in cultured human endothelial cells are not directly modulated by nitric oxide. *Cell calcium*, 21(4), 291-300.
- [39] He, M., Li, F., Yang, M., Fan, Y., Beejadhursing, R., Xie, Y., Zhou, Y., & Deng, D. (2018). Impairment of BKca channels in human placental chorionic plate arteries is potentially relevant to the development of preeclampsia. *Hypertension Research*, 41(2), 126-134.
- [40] Hille, B. (2011). Ionic basis of resting and action potentials. *Comprehensive Physiology*, 99 - 136.
- [41] Howitt, L., Sandow, S. L., Grayson, T. H., Ellis, Z. E., Morris, M. J., & Murphy, T. V. (2011). Differential effects of diet-induced obesity on BKCa β 1-subunit expression and function in rat skeletal muscle arterioles and small cerebral arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(1), H29-H40.
- [42] Hristov, K. L., Chen, M., Kellett, W. F., Rovner, E. S., & Petkov, G. V. (2011). Large-conductance voltage-and Ca^{2+} -activated K^{+} channels regulate human detrusor smooth muscle function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301(4),

C903-C912.

- [43] Huidobro, A., Fulford, A., & Carrasco, E. (2004). Incidencia de diabetes gestacional y su relación con obesidad en embarazadas chilenas. *Revista médica de Chile*, 132(8), 931-938.
- [44] Kim, E. Y., & Dryer, S. E. (2011). Effects of insulin and high glucose on mobilization of slo1 BKCa channels in podocytes. *Journal of cellular physiology*, 226(9), 2307-2315.
- [45] Kogutt, B. K., & Szymanski, L. M. (2021). Diabetesity and Pregnancy: How Do We Get Our Patients Moving? *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 64(1), 185-195.
- [46] Kshatri, A. S., Gonzalez-Hernandez, A., & Giraldez, T. (2018). Physiological roles and therapeutic potential of Ca²⁺ activated potassium channels in the nervous system. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 258.
- [47] Kuhlmann, C. R. W., Most, A. K., Li, F., Münz, B. M., Schaefer, C. A., Walther, S., Raedle-Hurst, T., Waldecker, B., Piper, H. M., & Tillmanns, H. (2005). Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K⁺ channels and Ca²⁺ influx. *Acta physiologica scandinavica*, 183(2), 161-169.
- [48] Leiva, A., Pardo, F., Ramirez, M. A., Farias, M., Casanello,

- P., & Sobrevia, L. (2011). Fetoplacental vascular endothelial dysfunction as an early phenomenon in the programming of human adult diseases in subjects born from gestational diabetes mellitus or obesity in pregnancy. *Experimental diabetes research*, 2011.
- [49] Leo, M. D., Bulley, S., Bannister, J. P., Kuruvilla, K. P., Narayanan, D., & Jaggar, J. H. (2015). Angiotensin II stimulates internalization and degradation of arterial myocyte plasma membrane BK channels to induce vasoconstriction. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(6), C392-C402.
- [50] Li, F., Xie, Y., He, M., Fan, Y., Yang, M., Wang, S., Li, X., Sun, Y., Xu, H., & Liu, X. (2020). IkCa and SKCa might participate in preeclampsia through regulating placental angiogenesis. *Pregnancy Hypertension*, 21, 90-95.
- [51] Li, H., An, J. R., Seo, M. S., Kang, M., Heo, R., Park, S., Mun, S.-Y., Bae, Y. M., Han, E.-T., & Han, J.-H. (2022). Downregulation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in human umbilical arterial smooth muscle cells in gestational diabetes mellitus. *Life Sciences*, 288, 120169.
- [52] Li, Y., Bai, J., Yang, Y., Hoshi, N., & Chen, D. (2020). Hydrogen sulfide relaxes human uterine artery via activating

smooth muscle BKCa channels. *Antioxidants*, 9(11), 1127.

[53] Li, Y., Ren, X., He, L., Li, J., Zhang, S., & Chen, W. (2020).

Maternal age and the risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. *Diabetes research and clinical practice*, 162, 108044.

[54] Liang, G. H., Kim, M. Y., Park, S., Kim, J. A., Choi, S., &

Suh, S. H. (2008). Intracellular Na⁺ modulates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ currents in human umbilical vein endothelial cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 457, 67-75.

[55] Lorca, R. A., Wakle-Prabakaran, M., Freeman, W. E., Pillai,

M. K., & England, S. K. (2018). The large-conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel and its γ 1-subunit modulate mouse uterine artery function during pregnancy. *The Journal of Physiology*, 596(6), 1019-1033.

[56] Lorigo, M., Oliveira, N., & Cairrao, E. (2020). Clinical

importance of the human umbilical artery potassium channels. *Cells*, 9(9), 1956.

[57] Lu, R., Alioua, A., Kumar, Y., Eghbali, M., Stefani, E., &

Toro, L. (2006). MaxiK channel partners: Physiological impact. *The Journal of physiology*, 570(1), 65-72.

[58] Ministerio de Salud. Guía Clínica: Diabetes y embarazo.

Santiago, MINSAL (2015).

- [59] Ministerio de Salud. Guía Perinatal. Santiago, MINSAL (2015).
- [60] Mishra, R. C., Kyle, B. D., Kendrick, D. J., Svystonyuk, D., Kieser, T. M., Fedak, P. W., Wulff, H., & Braun, A. P. (2021). KCa channel activation normalizes endothelial function in Type 2 Diabetic resistance arteries by improving intracellular Ca²⁺ mobilization. *Metabolism*, 114, 154390.
- [61] Neylon, C. B., Lang, R. J., Fu, Y., Bobik, A., & Reinhart, P. H. (1999). Molecular cloning and characterization of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in vascular smooth muscle: Relationship between KCa channel diversity and smooth muscle cell function. *Circulation research*, 85(9), e33-e43.
- [62] Nieves-Cintrón, M., Syed, A. U., Buonarati, O. R., Rigor, R. R., Nystoriak, M. A., Ghosh, D., Sasse, K. C., Ward, S. M., Santana, L. F., & Hell, J. W. (2017). Impaired BKCa channel function in native vascular smooth muscle from humans with type 2 diabetes. *Scientific reports*, 7(1), 14058.
- [63] Nilius, B., & Droogmans, G. U. Y. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiological reviews*, 81(4), 1415-1459.

- [64] Ogori, A. F., Girgih, A. T., & Eke, M. O. (2019). Review on the Mechanism of Diabetes: In-vitro and In-vivo Methods of Evaluations. *J Diab Obes Metab*, 2(2), 112.
- [65] Ozkor, M. A., & Quyyumi, A. A. (2011). Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function. *Cardiology research and practice*, 2011.
- [66] Pardo, F., Subiabre, M., Fuentes, G., Toledo, F., Silva, L., Villalobos-Labra, R., & Sobrevia, L. (2019). Altered foetoplacental vascular endothelial signalling to insulin in diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, 66, 40-48.
- [67] Qian, L., Liu, X., & Wang, R. (2014). Role of BKCa channels in diabetic vascular complications. *Chinese Medical Journal*, 127(09), 1775-1781.
- [68] Rojas, S., Basualto, E., Valdivia, L., Vallejos, N., Ceballos, K., Peña, E., Rivas, C., Nualart, F., Guzmán-Gutiérrez, E., & Escudero, C. (2020). The activity of IKCa and BKCa channels contributes to insulin-mediated NO synthesis and vascular tone regulation in human umbilical vein. *Nitric Oxide*, 99, 7-16.
- [69] Sáez, T., Toledo, F., & Sobrevia, L. (2019). Impaired signalling pathways mediated by extracellular vesicles in diabetes. *Molecular Aspects of Medicine*, 66, 13-20.

- [70] Sandow, S. L., & Grayson, T. H. (2009). Limits of isolation and culture: Intact vascular endothelium and BKCa. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), H1-H7.
- [71] Serván, P. R. (2013). Obesity and diabetes. *Nutricion Hospitalaria*, 28(5), 138-143.
- [72] Severino, P., D'Amato, A., Netti, L., Pucci, M., De Marchis, M., Palmirotta, R., Volterrani, M., Mancone, M., & Fedele, F. (2018). Diabetes mellitus and ischemic heart disease: The role of ion channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 802.
- [73] Simmons, D. (2011). Diabetes and obesity in pregnancy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(1), 25-36.
- [74] Sobrevia, L., & Desoye, G. (2019). Molecular aspects of signalling in diabetes. En *Molecular aspects of medicine* (Vol. 66, pp. 1-2).
- [75] Tian, C., Zhu, R., Zhu, L., Qiu, T., Cao, Z., & Kang, T. (2014). Potassium channels: Structures, diseases, and modulators. *Chemical biology & drug design*, 83(1), 1-26.
- [76] Tykocki, N. R., Boerman, E. M., & Jackson, W. F. (2017).

Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 485.

- [77] United Kingdom National Health Service. Cardiovascular Diseases (CVEs). UK, NIH 2017.
- [78] Vallance, P., Calver, A., & Collier, J. (1992). The vascular endothelium in diabetes and hypertension. *Journal of hypertension*, 10, S31.
- [79] Vang, A., Mazer, J., Casserly, B., & Choudhary, G. (2010). Activation of endothelial BKCa channels causes pulmonary vasodilation. *Vascular pharmacology*, 53(3-4), 122-129.
- [80] Vásquez, G., Sanhueza, F., Vásquez, R., González, M., Martín, R. S., Casanello, P., & Sobrevia, L. (2004). Role of adenosine transport in gestational diabetes-induced L-arginine transport and nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelium. *The journal of physiology*, 560(1), 111-122.
- [81] Verma, S., & Hussain, M. E. (2017). Obesity and diabetes: An update. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11(1), 73-79.
- [82] Wang, Y. W., Ding, J. P., Xia, X. M., & Lingle, C. J. (2002). Consequences of the stoichiometry of Slo1 and auxiliary subunits

- on functional properties of BK-type Ca^{2+} -activated K channels. *J. Neurosci*, 22, 1550-1561.
- [83] World Health Organization. Cardiovascular disease. USA, WHO 2017.
- [84] World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. USA, WHO 2006.
- [85] World Health Organization. Diabetes. USA, WHO 2017.
- [86] Wareing, M., Bai, X., Seghier, F., Turner, C. M., Greenwood, S. L., Baker, P. N., Taggart, M. J., & Fyfe, G. K. (2006). Expression and function of potassium channels in the human placental vasculature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291(2), R437-R446.
- [87] Wells, J. C. (2019). The diabetes epidemic in the light of evolution: Insights from the capacity-load model. *Diabetologia*, 62(10), 1740-1750.
- [88] Won, S., Kim, H.-D., Kim, J.-Y., Lee, B.-C., Chang, S., & Park, C.-S. (2010). Movements of individual BKCa channels in live cell membrane monitored by site-specific labeling using quantum dots. *Biophysical journal*, 99(9), 2853-2862.

- [89] Yang, Y., Sohma, Y., Nourian, Z., Ella, S. R., Li, M., Stupica, A., Korthuis, R. J., Davis, M. J., Braun, A. P., & Hill, M. A. (2013). Mechanisms underlying regional differences in the Ca^{2+} sensitivity of BKCa current in arteriolar smooth muscle. *The Journal of physiology*, 591(5), 1277-1293.
- [90] Zhu, Y.-R., Jiang, X.-X., Ye, P., Chen, S., & Zhang, D.-M. (2018). Potassium channels in the vascular diseases. En *Vascular biology-selection of mechanisms and clinical applications*. IntechOpen.
- [91] Zimmet, P., Alberti, K., & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414(6865), 782-787.

8. ANEXOS

Versión 2

9 de Junio de 2021

1



*Investigación en Muestra de Placenta y Cordón Umbilical
Servicio de Obstetricia y Ginecología
Hospital Clínico Regional Guillermo Grant Benavente, Concepción
Departamento de Obstetricia y Ginecología
Facultad de Medicina
Universidad de Concepción*

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

“Caracterización de alteraciones mecánicas y viscoelásticas de membrana plasmática y su asociación con mecanismos de síntesis de óxido nítrico e hiperpolarización de membrana en células vasculares fetales humanas expuestas a diabetes gestacional”

Investigador Principal: Dr. Marcelo González Ortiz
Colaborador clínico responsable: Dr. Cristián Campos

Centro: Servicio de Obstetricia y Ginecología, Hospital Guillermo Grant Benavente

El Laboratorio de Investigación Materno-Fetal del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Concepción, liderado por el Dr. Marcelo González la invita a participar en el estudio **“Caracterización de alteraciones mecánicas y viscoelásticas de membrana plasmática y su asociación con mecanismos de síntesis de óxido nítrico e hiperpolarización de membrana en células vasculares fetales humanas expuestas a diabetes gestacional”**.

Este estudio tiene como objetivo determinar si en las células que forman la placenta se producen cambios cuando el embarazo se desarrolla con condición de diabetes gestacional en conjunto con obesidad. Estos cambios involucran que las células de la placenta puedan adaptarse a las condiciones del embarazo para regular la nutrición y el aporte de oxígeno al feto y así lograr que llegue a buen término el embarazo. El poder estudiar la placenta luego del parto nos permite conocer estos cambios y adaptaciones, con tal de describir cómo la placenta humana responde a las diferentes condiciones que se dan durante el embarazo.

A través de este consentimiento informado solicitamos su participación en este estudio, en donde estamos invitando a mujeres como usted, embarazadas sin patologías o con diagnóstico de diabetes gestacional. Su participación, si decide aceptar, se traduce en dos actividades que son esenciales para nuestro estudio. 1) Se requerirá revisar toda la información que se encuentra en su ficha clínica respecto a la evolución y desenlace de su embarazo. 2) Se requerirá una muestra de placenta y cordón umbilical que se tomarán

- Consentimiento Informado

Versión 2

9 de Junio de 2021

posterior al nacimiento de su hijo o hija. Cabe destacar que este estudio será realizado bajo resguardo estricto de su identificación.

En este estudio, vuestra participación involucra solamente el tiempo destinado para la aprobación o rechazo de este consentimiento.

En este estudio:

1. Las muestras de placentas serán obtenidas post-parto después de producido el alumbramiento (salida de la placenta).
2. La toma de esta muestra no involucra, en ningún sentido, un riesgo ni para el recién nacido ni su madre, puesto que las muestras no serán tomadas directamente del cuerpo del recién nacido, ni del cuerpo de la madre sino de la placenta que habitualmente se desecha.
3. En cuanto a riesgos y molestias, el único riesgo de participar en este estudio se refiere al resguardo de privacidad de los datos clínicos que se solicitan.
4. Se le solicitarán datos de su historia clínica, específicamente diagnósticos durante el embarazo y datos clínicos de la gestación y parto.
5. Se resguardará la confidencialidad de la información que identifica a cada participante, mediante codificación de muestras y documentos. De esta manera, la información estará asociada a un código para mantener el anonimato y la confidencialidad de la información recolectada.
6. Se excluyen expresamente cualquier tipo de análisis genético. Únicamente, utilizaremos la muestra para la identificación de marcadores propios de la enfermedad, de la función placentaria y de la identificación de los tipos de células existentes en la placenta.
7. El material biológico excedente de estos estudios será resguardado bajo responsabilidad de nuestro laboratorio, y en concordancia con las normas de bioseguridad de la Universidad de Concepción. En caso de que la investigación requiera el uso de este material en posteriores investigaciones, se presentará un nuevo estudio a aprobación por el Comité de Ética Científica del Servicio de Salud Concepción.
8. Si decide firmar este consentimiento informado, usted debe saber que no tendrá ningún beneficio directo. Sin embargo, la información recogida ayudará a los investigadores a conocer aspectos importantes de la diabetes gestacional y la obesidad que hasta el momento se desconocen.
9. No existe costo económico para los pacientes. Asimismo, tampoco se contempla pago o estipendio alguno por participar. Todos los gastos de la investigación serán cubierto por la Universidad de Concepción a través de laboratorios involucrados.
10. Es posible que durante las investigaciones surjan conocimientos nuevos que podrían tener implicancias sobre su salud. En cuyo caso, el equipo de investigación está comprometido a revelar información que pudiera tener alguna utilidad clínica inmediata.
11. La información recogida será utilizada para realizar reportes de investigación, charlas informativas a la comunidad científica y general. Todo ello, respetando la confidencialidad de la información y en ningún caso individualizando a los sujetos

Versión 2

9 de Junio de 2021

de estudio.

12. Este consentimiento ha sido dado en forma **voluntaria**. Negarse a participar no cambiará en modo alguno el cuidado médico recibido para la madre o el recién nacido. Puede revocar este consentimiento en cualquier momento, sin dar explicaciones al respecto.
13. Si Ud. quiere conocer los resultados del estudio, los puede solicitar al equipo de investigación liderado por el Dr. Marcelo González.
14. Cualquier consulta respecto de este estudio podrá hacerla a: Dr. Marcelo González, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción (Teléfono: 41-2204816 / 56-959744483).
15. El presente consentimiento informado ha sido revisado y autorizado por el Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción.

Contacto con CEC-SSC:

Para las preguntas relacionadas con los derechos como sujeto de investigación, relacionadas con el estudio en el que está participando, puede contactarse con el comité revisor: Dr. Nelson Pérez, Presidente del Comité Ético Científico del Servicio de Salud Concepción, ubicado en San Martín 1436, Concepción, al teléfono 41 - 2722745.

“ESTE DOCUMENTO SE FIRMARÁ POR DUPLICADO QUEDANDO UNA COPIA CON EL INVESTIGADOR Y OTRA EN MANOS DE LA VOLUNTARIA, LA QUE DEBE CONSERVAR MIENTRAS SE LLEVE A CABO EL ESTUDIO”

.....
Nombre y firma de la participante

HOJA DE FIRMAS

Fecha: _____

AUTORIZACIÓN

He leído el (los) procedimiento descrito. El (la) investigador (a) me ha explicado el estudio y ha contestado mis preguntas. Voluntariamente yo, _____ doy mi consentimiento para participar en el estudio **“Caracterización de alteraciones mecánicas y viscoelásticas de membrana plasmática y su asociación con mecanismos de síntesis de óxido nítrico e hiperpolarización de membrana en células vasculares fetales humanas expuestas a diabetes gestacional”**.

Recibiré una copia firmada de este consentimiento, y sé que puedo revocar mi autorización en cualquier momento, sin dar explicaciones.

NOMBRE Y FIRMA DE LA PARTICIPANTE_____
Fecha

He explicado a la Señora _____ la naturaleza y propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación en esta investigación. He contestado a sus preguntas y aclarado sus dudas en la medida de lo posible. Acepto que he leído y conozco la normativa correspondiente para realizar investigaciones con seres humanos y me apegó.

Nombre y Firma Investigador Responsable_____
Fecha_____
Nombre y Firma Director del centro o su delegado_____
Fecha

Información de pacientes

Tabla II: Historial clínico

Condición	IMC (Promedio $\pm$ SD)	IPN (Promedio $\pm$ SD)	Sexo RN (%)
Normal (n=17)	24,39 $\pm$ 2,82	2,71 $\pm$ 0,26	M (57,1%) F (42,9%)
DG (n=9)	39,32 $\pm$ 3,88	2,95 $\pm$ 0,29	M (50%) F (50%)