

Expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en placenta humana a término

Lilly Cristina Colmenero Salas,* Margarita Levario Carrillo,** Ana Torres Reyes,* Carmen González Horta,* Blanca Sánchez Ramírez*

Nivel de evidencia: II-3

RESUMEN

Antecedentes: los estudios realizados en la placenta humana a término han demostrado que los receptores colinérgicos muscarínicos M1 - M4 se localizan en el sincitiotrofoblasto, en la membrana basal y en la membrana con borde en cepillo de las vellosidades. Sin embargo, en ambos estudios la metodología no ha implicado métodos de microscopía que permitan evidenciar su localización.

Objetivo: determinar la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en placenta humana a término.

Material y método: se analizaron 20 muestras de placenta humana de recién nacidos a término. Los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 se detectaron por inmunohistoquímica y antisueros policlonales. La densidad óptica de la señal para cada receptor colinérgico muscarínico se analizó con el software Image Pro Plus. Se realizaron 30 lecturas por placenta (n=600). La expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos se analizó mediante la prueba de t de Student.

Resultados: la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en la placenta humana a término se localizó en el sincitiotrofoblasto de las vellosidades secundarias y terciarias. La expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en la población mostró que el RCM M2 se expresa en mayor proporción que los RCM M1 ($p < 0.01$). La expresión de receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 fue menor en recién nacidos con peso menor para la edad gestacional, aunque la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

Conclusiones: la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos se identificó en el sincitiotrofoblasto placentario con predominio del receptor colinérgico muscarínico M2. Los valores aquí reportados constituyen una referencia que puede utilizarse para analizar la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en la placenta de mujeres con antecedentes de exposición ambiental a sustancias tóxicas.

Palabras clave: receptores colinérgicos muscarínicos, placenta.

ABSTRACT

Background: Studies in the human term placenta have shown that muscarinic cholinergic receptors M1 - M4 are located in the syncytiotrophoblast in the basement membrane and in the brush border membrane of the villi. However, in both studies the methodology has not been implicated microscopy methods to reveal its location.

Objective: To determine the expression of muscarinic cholinergic receptors M1 and M2 in human term placenta.

Materials and methods: we analyzed 20 samples of human placenta at term newborns. Muscarinic cholinergic receptors M1 and M2 were detected by immunohistochemistry and polyclonal antisera. The optical density of the signal for each muscarinic cholinergic receptor was analyzed with Image Pro Plus software. 30 readings were made by the placenta (n = 600). The expression of muscarinic cholinergic receptors were analyzed using the Student t test.

Results: The expression of muscarinic cholinergic receptors M1 and M2 in human term placenta were found in the syncytiotrophoblast of secondary and tertiary villi. The expression of muscarinic cholinergic receptors M1 and M2 in the population showed that the RCM M2 is expressed in a greater proportion than RCM M1 ($p < 0.01$). The expression of muscarinic cholinergic receptors M1 and M2 was lower in newborns with low weight for gestational age, although the difference was not significant ($p > 0.05$).

Conclusions: The expression of muscarinic cholinergic receptors were identified in placental syncytiotrophoblast predominantly M2 muscarinic cholinergic receptor. The values reported here represent a baseline that can be used to analyze the expression of muscarinic cholinergic receptors in the placenta of women with a history of environmental exposure to toxic substances.

Keywords: muscarinic cholinergic receptors, placenta.

RÉSUMÉ

Antécédents: des études réalisées dans la placenta humain à terme ont montré que les récepteurs cholinergiques muscariniques M1 au M4 sont situés dans le syncytiotrophoblaste, dans la membrane basale et dans la membrane avec bordure en brosse des villosités. Cependant, dans les deux études la méthodologie n'a pas compris des méthodes de microscopie qui permettent mettre en évidence leur localisation.

Objectif: faire la détermination de l'expression des récepteurs cholinergiques muscariniques M1 et M2 dans le placenta humain à terme.

Matériel et méthode: on a fait l'analyse de 20 échantillons de placenta humain de nouveau-nés à terme. Les récepteurs cholinergiques muscariniques M1 et M2 ont été détectés par immunohistochimie et antisérums polyclonaux. La densité optique du signal pour chaque récepteur cholinergique muscarinique a été analysée avec le logiciel Image Pro Plus. On a fait 30 lectures par placenta ($n = 600$). L'expression des récepteurs cholinergiques muscariniques a été analysée au moyen du test t de Student.

Résultats: l'expression des récepteurs cholinergiques muscariniques M1 et M2 dans le placenta humain à terme a été localisée dans le syncytiotrophoblaste des villosités secondaires et tertiaires. L'expression des récepteurs cholinergiques muscariniques M1 et M2 dans la population a montré que le RCm M2 s'exprime avec une proportion majeure que les RCm M1 ($p < 0.01$). L'expression de récepteurs cholinergiques muscariniques M1 et M2 a été mineure dans les nouveau-nés avec un poids mineur pour l'âge gestationnel, toutefois la différence n'a pas été significative ($p > 0.05$).

Conclusions: l'expression de récepteurs cholinergiques muscariniques a été identifiée dans le syncytiotrophoblaste placentaire avec prédominance du récepteur cholinergique muscarinique M2. Les valeurs rapportées ici constituent une référence qui peut être utilisée pour faire l'analyse de l'expression de récepteurs cholinergiques muscariniques dans le placenta de femmes avec des antécédents d'exposition environnementale à des substances toxiques.

Mots-clés: récepteurs cholinergiques muscariniques, placenta.

RESUMO

Antecedentes: Estudos realizados na placenta humana a término demonstraram que os receptores colinérgicos muscarínicos M1 a M4 se localizam no sincitiotrofoblasto, na membrana basal e na membrana com borde no pincel da lanosidade. Entretanto, em ambos os estudos, a metodologia não envolveu métodos de microscopia que permitam evidenciar sua localização.

Objetivo: Determinar a expressão dos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M2 na placenta humana a término.

Material e Método: Foram analisadas 20 amostras de placenta humana de recém-nascidos a término. Os receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M2 foram detectados por imunohistoquímica e anti-soros policlonais. A densidade óptica do sinal para cada receptor colinérgico muscarínico foi analisada com o software Image Pro Plus. Foram analisadas 30 leituras por placenta ($n = 600$). A expressão dos receptores colinérgicos muscarínicos foi realizada diante da prova de t de Student.

Resultados: A expressão dos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M2 na placenta humana a término foi localizada no sincitiotrofoblasto das vilosidades secundárias e terciárias. A expressão dos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M2 na população mostrou que o RCm M2 se expressa em maior proporção que os RCm M1 ($p < 0,01$). A expressão de receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M2 foi menor em recém-nascidos com peso inferior para a idade gestacional, ainda que a diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

Conclusões: A expressão de receptores colinérgicos muscarínicos foi identificada com o sincitiotrofoblasto placentário com predomínio do receptor colinérgico muscarínico M2. Os valores aqui informados constituem uma referência que pode ser utilizada para analisar a expressão de receptores colinérgicos muscarínicos na placenta de mulheres com antecedentes de exposição ambiental a substâncias tóxicas.

Palavras-chave: Receptores colinérgicos muscarínicos, placenta.

La placenta es un órgano especializado que realiza numerosas funciones en el desarrollo del feto.¹ El desarrollo fetal normal requiere el aporte materno de nutrientes dependientes del estado de salud de la madre y de la anatomía y fisiología de la vasculatura útero-placentaria.² El crecimiento fetal se regula por señalamiento endocrino, que participa en la invasión trofoblástica, en el establecimiento del flujo sanguíneo a la unidad útero

placentaria y en el transporte de nutrientes.³ Existen diversos factores a los que la madre puede estar expuesta durante el embarazo (tabaquismo, consumo de drogas e hipoxia, entre otros) y que condicionan alteraciones en el desarrollo de la placenta.⁴ Estas alteraciones pueden promover modificaciones en el crecimiento intrauterino y efectos neonatales adversos o aun en etapas posteriores: en la infancia o en la vida adulta.³

* Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua.
** Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica. Instituto Mexicano del Seguro Social. Chihuahua, Chihuahua.

Correspondencia: Dra. Blanca Sánchez Ramírez. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Circuito 1, Nuevo Campus Universitario. CP 31125 Apartado Postal 1542-C Chihuahua, Chih. Correo electrónico: bsanche@uach.mx

Recibido: agosto, 2008. Aceptado: marzo, 2009.

Este artículo debe citarse como: Colmenero SLC, Levario CM, Torres RA, González HC, Sánchez RB. Expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en la placenta humana a término. Ginecol Obstet Mex 2009;77(7):323-8.

El contenido completo de este artículo también está disponible en: www.revistasmedicasmexicanas.com.mx

El transporte de micronutrientes al feto, a través de la placenta, lo realizan transportadores específicos y está condicionado por la regulación de diversos sistemas, como el colinérgico placentario.^{5,6} Este sistema comprende a la acetilcolina y a sus precursores, las enzimas acetilcolinesterasa y colina acetiltransferasa y a los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos (RCn), a los cuales la acetilcolina se une para iniciar la respuesta fisiológica.⁶

Entre las funciones atribuidas al sistema colinérgico placentario se incluyen: la regulación del flujo sanguíneo, el transporte de aminoácidos y la liberación de hormonas placentarias y de ácidos grasos, entre otros.^{5,6,7}

La función de la acetilcolina es la de mensajero local en la placenta. Ésta se forma en el citoplasma del sincitiotrofoblasto y se libera en la placenta por la circulación materna y fetal.⁶ La activación de los receptores colinérgicos muscarínicos activados por la acetilcolina media la liberación del factor de relajación derivado del endotelio, el cual promueve la relajación del músculo liso vascular inducida por la acetilcolina.⁶

Los estudios en ratas y en humanos han demostrado que la placenta expresa receptores colinérgicos. La nicotina se une a los receptores colinérgicos impidiendo su función en la placenta y la sobrestimulación de estos receptores desequilibra su función, seguida por los efectos patológicos producidos por la exposición a nicotina.⁸

En cuanto a los subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, éstos difieren por su localización en los tejidos, en su afinidad agonista y antagonista y por el sistema de segundos mensajeros, al que se encuentran acoplados.⁹ Desde el punto de vista estructural, estos receptores cumplen con las características de los receptores asociados a proteínas G; los genes de los cinco tipos de receptores colinérgicos muscarínicos (M1, M2, M3, M4, M5) ya se han clonado.⁹ Los estudios realizados en la placenta humana a término han demostrado que los receptores colinérgicos muscarínicos M1 al M4 se localizan en el sincitiotrofoblasto, en la membrana basal y en la membrana con borde en cepillo de las vellosidades.^{10,11} Sin embargo, en ambos estudios la metodología no ha implicado métodos de microscopia que permitan evidenciar su localización. Además, los estudios realizados en el cerebro de ratas neonatas y en la placenta de ratas expuestas experimentalmente a plaguicidas organofosforados del tipo del metil para-

tión, han demostrado que la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 puede regularse disminuyendo su densidad en el tejido expuesto a dichos compuestos.^{12,13} Los estudios específicos a este respecto realizados en placenta humana no se han desarrollado a la fecha.

El objetivo de este trabajo es determinar la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en la placenta humana a término, mediante inmunohistoquímica y análisis de imágenes, con el propósito de analizar su variabilidad en este tejido.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras biológicas

El estudio se realizó en placentas de recién nacidos a término, sin complicaciones neonatales agudas (n=20). Las muestras se obtuvieron de pacientes del Instituto Mexicano del Seguro Social de la ciudad de Chihuahua, México. Al ingreso al hospital se les realizó una entrevista para identificar los antecedentes de importancia. Se excluyeron las pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus pregestacional y gestacional, hipertensión arterial pregestacional y gestacional, hiper o hipotiroidismo, enfermedades renales, anomalías uterinas y embarazo gemelar. Se excluyeron las pacientes con exposición expresa a plaguicidas inhibidores de colinesterasas. El proyecto lo aprobó el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social de la ciudad de Chihuahua.

Posterior al alumbramiento, la placenta se evaluó macroscópicamente, se retiró el coágulo placentario, se pesó y se midió el diámetro mayor. Se tomó una muestra de 2 cm del área central de la cara materna de la placenta y se fijó en paraformaldehído (3.7%) para, posteriormente, embeberse en parafina.

Personal previamente estandarizado determinó la antropometría del recién nacido y, según el peso para la edad gestacional, se clasificó como menor para ésta cuando el peso fue menor al percentil 10; adecuado, cuando se encontró entre el percentil 10 y el 90; y mayor, cuando el peso superó el percentil 90.¹⁴

Inmunohistoquímica

Mediante inmunohistoquímica se analizaron cortes en parafina de 4 µm de grosor; para esto se desparafinaron e hidrataron las secciones con xileno (JT Baker, Estado

de México, México) y concentraciones descendentes de etanol (100%, 96%, 80%, 70%). La inactivación de las peroxidasas endógenas se realizó mediante incubación con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno en metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis Missouri, EUA) (v/v) y, posteriormente, se bloquearon las proteínas inespecíficas del tejido con una solución amortiguada de fosfatos (PBS) y leche descremada (Sveltes, Nestlé, México) al 10%. Las secciones se incubaron por separado con el anticuerpo específico anti-RCm M1 o M2 (dilución 1:100 en PBS-Tween leche descremada al 1%; Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) a 4°C toda la noche. Previo lavado, las secciones se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG de cabra biotinilado (Zymed Lab, San Francisco, California, EUA).

La señal del anticuerpo se detectó con un equipo Histostain Plus (Zymed Lab.) según las instrucciones del fabricante. Por último, las secciones se deshidrataron y cubrieron con resina sintética Entellan (Merck, Alemania). En cada evaluación se utilizaron, para los controles positivos, secciones de corazón de rata y para los negativos se omitió el primer anticuerpo.

Análisis de imágenes

Con un objetivo 10X y un microscopio Olympus BX41 equipado con cámara CCD se obtuvieron microfotografías de cada muestra. El análisis de las imágenes se realizó con el software IMAGE pro-plus 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA) para obtener la densidad óptica de la señal. Para la calibración del programa se tomaron microfotografías del control negativo con el objetivo 10X y se transformó a escala de grises (calibración de la máxima intensidad). Para las mediciones de densidad se tomaron cinco microfotografías representativas de la zona con expresión, de cada placenta para cada receptor. Las mediciones de densidad óptica se realizaron sobre una línea de aproximadamente 20 µm de largo. Se hicieron al azar seis mediciones de densidad de cada una de las microfotografías, con 30 mediciones de densidad en total, para cada una de las placentas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software STATA 9 (Stata Statistical Software, Release 9.0, College Station, Texas, EUA). La diferencia en la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 se obtuvo

mediante t de Student. Para determinar la diferencia en la expresión de éstos en placentas de recién nacidos con peso menor, mayor o adecuado para la edad gestacional se utilizó el análisis de varianza y la prueba de Bonferroni. Se consideró diferencia significativa si el valor de p fue < 0.05.

RESULTADOS

Se estudiaron 20 placentas de mujeres con embarazo a término, con edad gestacional entre 37 y 42 semanas (promedio 39 ± 1). La edad de las pacientes fue de 25 ± 5 años y el número de gestaciones de 2 ± 1 . Las características antropométricas del recién nacido y la placenta se enlistan en el cuadro 1. Los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional fueron 13 (65%), con peso menor para la edad gestacional 3 (15%) y los que tuvieron peso mayor según su edad gestacional 4 (20%).

Cuadro 1. Características del recién nacido y la placenta

<i>Variables del recién nacido y la placenta</i>	<i>N</i>	<i>± DE*</i>	<i>Rango</i>
Peso (g)	20	3300 ± 455	2110 a 4030
Longitud (cm)	17	53 ± 2	50 a 57
Perímetro cefálico (cm)	13	34 ± 1	32 a 37
Perímetro torácico (cm)	13	34 ± 2	32 a 38
Perímetro abdominal (cm)	13	32 ± 3	27 a 37
Peso placenta (g)	20	503 ± 86	310 a 640
Diámetro placenta (cm)	19	20 ± 2	14 a 23

* Los datos se presentan como media ± desviación estándar. La variación en la n en algunas variables antropométricas se debe a que sólo en los casos informados fue posible obtener los datos correspondientes.

La proporción de género fue de 50% (10 masculinos y 10 femeninos). El peso y diámetro promedio de las placentas se detalla en el cuadro 1, donde se aprecia que ambos parámetros se encuentran dentro de los valores normales para recién nacidos a término.

Inmunolocalización y expresión de receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en placenta humana a término

En las muestras se observaron, principalmente, velloidades secundarias y terciarias, que corresponden a

la madurez de la placenta a término. En general, no se observó congestión vascular, ni procesos de fibrosis o degeneración anormal en las muestras.

La señal positiva de los receptores colinérgicos muscarínicos se observó en las muestras mediante una coloración parda rojiza (figura 1). La expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 mostró un patrón similar, localizado en el borde de las vellosidades terciarias, esto es, en la capa del sincitiotrofoblasto, principalmente en la región apical con borde en cepillo (figuras 1 A y 1C). La señal fue, evidentemente, más intensa en la región apical que en el borde basal (figuras 1A y 1C, flecha). Los controles negativos no mostraron señal de reconocimiento inespecífico (figuras 1B y 1D).

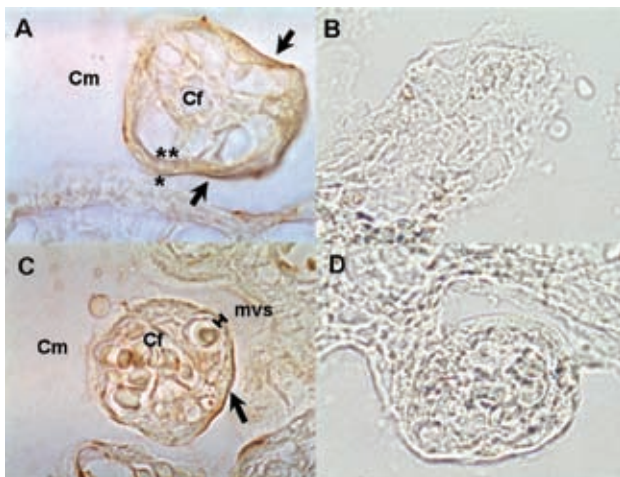


Figura 1. Inmunolocalización de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en la placenta humana a término. A) inmunolocalización de receptores colinérgicos muscarínicos M1 en el sincitiotrofoblasto (flecha) de una vellosidad terciaria. Aumento original X 60. B) y D) Controles negativos, en los cuales se omitió el primer anticuerpo. Aumento original X60. C) Inmunolocalización de los receptores colinérgicos muscarínicos M2 (flecha) Aumento original X60.

* cara materna. ** cara fetal. Cm, circulación materna. Cf, circulación fetal. mvs, membrana vasculosincitial.

Al analizar la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en cada una de las muestras, se encontró mayor expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M2 (1.33 ± 0.64) con respecto a los M1 (1.19 ± 0.68) (figura 2) con una diferencia significativa ($p < 0.01$).

La expresión de receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en placentas de recién nacidos con peso menor

para la edad gestacional fue menor (1.04 ± 0.12 y 0.97 ± 0.12 UAD, respectivamente) que en las de los recién nacidos adecuados para la edad gestacional (1.22 ± 0.29 y 1.46 ± 0.36 UAD) o en placentas de recién nacido con peso mayor para la edad gestacional (1.24 ± 0.33 y 1.15 ± 1.11 UAD); sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

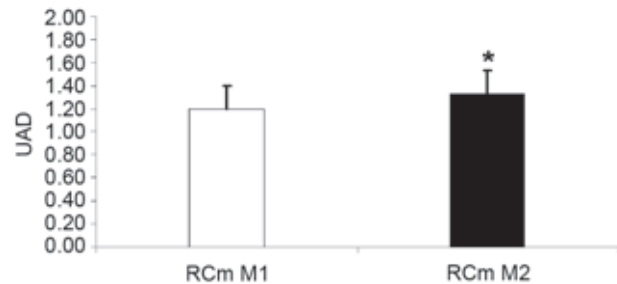


Figura 2. Expresión de los RCm M1 y M2 en placenta humana a término. □ RCm M1 ■ RCm M2. Cada barra corresponde a la $\pm$ DE del total de mediciones (n= 600).

UAD, Unidades arbitrarias de densidad óptica. *p <0.01.

DISCUSIÓN

En este estudio, la localización de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 ocurrió en la membrana con borde en cepillo y en la membrana basal del sincitiotrofoblasto. Esto coincide con los reportes de Pavía y su grupo (1997), quienes identificaron los receptores utilizando ligandos radioactivos (agentes antagonistas). También Tayebati y colaboradores (1998) encontraron estos receptores en el sincitiotrofoblasto, mediante el uso de ligandos radioactivos y autorradiografía.

Nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Pavía y su grupo (1997), quienes encontraron que los receptores colinérgicos muscarínicos M2 están presentes en mayor proporción que los M1. Sin embargo, nuestros datos discrepan de los del grupo de Tayebati y sus colaboradores (1998), quienes reportaron que los M1 se presentan con más frecuencia que los M2 en la porción apical del sincitiotrofoblasto. Esta diferencia, según señalan Tayebati y su grupo, puede deberse a la sensibilidad del método empleado; ellos cuantificaron los gránulos de plata existentes en la porción apical o basal del sincitiotrofoblasto placentario, generado por exposición del tejido marcado en una placa de autorradiografía. Pavía y sus colaboradores realizaron la

cuantificación en la membrana basal y apical separadas antes de la utilización de los análogos radioactivos y cuantificaron sus concentraciones con un contador de centelleo. En nuestro estudio la inmunohistoquímica permitió la localización con mayor exactitud en el tejido y, aunada al análisis de imágenes, su cuantificación y análisis específico.

Una ventaja adicional de nuestro estudio fue, a diferencia de los grupos referidos, mayor población estudiada.

Si bien los estudios fisiológicos específicos acerca de estos receptores en la membrana del sincitiotrofoblasto no se han realizado a la fecha, existe evidencia que indica que los receptores colinérgicos muscarínicos se relacionan con la apertura de canales iónicos y la modificación de las concentraciones de segundos mensajeros, como el AMP cíclico y el inositol 1, 4, 5 trifosfato.⁶ Puesto que existe un gran número de agentes tóxicos que pueden afectar la funcionalidad de estos receptores, el establecimiento de valores de referencia en población normal puede ser de utilidad al analizar el efecto de contaminantes ambientales sobre la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos en la placenta humana en poblaciones expuestas a tóxicos que pudieran alterar la expresión de estos receptores.

Aunque la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 fue menor en placentas de recién nacidos con peso menor para la edad gestacional, la diferencia no fue estadísticamente significativa, lo cual pudiera estar relacionado con el tamaño de la muestra evaluada.

CONCLUSIÓN

Se determinó que la expresión de los receptores M1 y M2 en la placenta humana a término se localizó en el sincitiotrofoblasto de las vellosidades secundarias y terciarias, lo cual está de acuerdo con los reportes realizados al respecto de otros trabajos. Asimismo, al analizar la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos M1 y M2 en la población de mujeres, se encontró que el receptor colinérgico muscarínico M2 se expresa en mayor proporción que el receptor colinérgico muscarínico M1 ($p < 0.01$), lo cual quizá esté relacionado con la función que regulan cada uno de ellos en la placenta humana.

La demostración de la expresión de los receptores colinérgicos muscarínicos mediante esta metodología puede utilizarse para analizar la variabilidad de estos componentes en la placenta humana. Los valores de expresión obtenidos en este estudio podrían ser de utilidad al analizar la expresión de receptores colinérgicos muscarínicos en placenta de mujeres con antecedentes de exposición ambiental a sustancias tóxicas, como los plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa.

REFERENCIAS

1. Gude N, Roberts C, Kalionis B, King R. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004;114:387-407.
2. Salafia C. Histopatología placentaria del retraso del crecimiento fetal. En: *Clínicas obstétricas y ginecológicas*. México: McGraw-Hill Interamericana, 1997;pp:695-703.
3. Murphy V, Smith R, Warwick B, Clifton G, Clifton V. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta and foetus. *Endocr Rev* 2006;27:141-69.
4. Gupta R. Environmental agents and placental toxicity: Anticholinesterases and other insecticides. In: *Placental toxicology*. USA. Editor Sastry, R. Editorial CRC; 1995;pp:257-78.
5. Knipp G, Audus K, Soares M. Nutrient transport across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;38:41-58.
6. Sastry B. Human placental cholinergic system. *Biochem Pharmacology* 1997;53:1577-86.
7. Moe A. Placental amino acid transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995;268:1321-31.
8. Lips K, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, et al. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* 2005;26:735-46.
9. Caulfield M, Birdsall N. XVII International Union of Pharmacology. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998;50:279-90.
10. Pavía J, Muñoz M, Jiménez E, Martos F, et al. Pharmacological characterization and distribution of muscarinic receptors in human placental syncytiotrophoblast brush-border and basal plasma membranes. *Eur J Pharmacol* 1997;320:209-14.
11. Tayebati S, Vitaioli L, Zaccheo D, Amenta F. Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptor subtypes in human placenta. *Neurosci Lett* 1998;247:167-70.
12. Guo-Ross SX, Chambers JE, Meek EC, Carr RL. Altered muscarinic acetylcholine receptor subtype binding in neonatal rat brain following exposure to chlorpyrifos or methyl parathion. *Toxicol Sci* 2007;100:118-27.
13. González-García B, Olave ME, Ramos-Martínez E, González-Horta C, et al. Decrease of muscarinic cholinergic receptors expression in placenta from rats exposed to methyl parathion. *Human & Exp Toxicol* 2008;27:241-46.
14. Ríos J, Tufiño-Olivares E, Reza-López S, Sanin LH, Levario-Carrillo M. Birthweight percentiles by gestational age and gender for children in the North of Mexico. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2008;22:188-94.