

Evaluación del efecto de la hipoxia/reoxigenación en el proceso de sincialización del trofoblasto. Efecto sobre el ambiente lipídico.

Autora: Florencia Loureiro

Tesis de Licenciatura en Biotecnología

LU:1083977

Tutoras:

Dra. Mariana G. Farina

Dra. Paula Accialini

Laboratorio de Fisiopatología Placentaria

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

Facultad de Medicina, UBA

CONICET

Co-tutora:

Dra. Romina Girotti

Universidad Argentina de la Empresa

Colaboración:

Dra. Sabina Maté

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata
(INIBIOLP-UNLP-CONICET)

Septiembre de 2021



PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

Agradecimientos

Gracias infinitas al grupo hermoso del Laboratorio de Fisiopatología Placentaria, y a todos quienes conforman el CEFyBo, y la Dra. Sabina Maté de la UNLP. Mari, por darme la oportunidad y encaminarme en éste trabajo, con presencia maternal que cree en el potencial y el valor de cada uno. Tomi, preciso pero siempre creativo a la vez, acompaña el pensamiento de aprendizaje e invita a la curiosidad constante. Pauli, presente, dedicada y con gran espíritu de trabajo. Más allá de lo académico y profesional, por la paciencia, entre cada abrazo, me inspiraron y me dieron las fuerzas y herramientas.

Gracias a mis papás, y mis hermanas por siempre ser mis mayores fans, por darme cada oportunidad para estudiar, su incondicionalidad, iluminar y transmitir la gratitud que subyace en cada prueba, por todo el amor. Gracias a toda mi familia hermosa, por siempre apoyar con interés y afecto.

Gracias a mis amigos, grandes figuras con su ejemplo de orden y templanza, nos dimos la mano durante todo el camino, quiénes llenaron cada momento de color, tiñiéndolo de alegría y descubrimiento, básicamente suena música de fondo al mirar para atrás.

A cada oportunidad laboral que me dio la carrera, que me llenaron de valor y determinación, en mi trabajo actual mis compañeros me llenan de soporte y ánimos. Gracias a la carrera, y los profesores por asombrarme constantemente ante el maravilloso mundo de la ciencia.

Este camino recorre en lo más profundo de mí, transformándome como persona y abriendo mis ojos, mente, horizontes y corazón, soy quién soy hoy gracias a la suma de esto. En cada momento, cada detalle, esfuerzo, alegría, y cada persona quién forma parte y aporta a este gran logro, prevalece todo el amor, el recibido como el vivenciado en cada acción y experiencia.

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

Resumen:

La placenta humana es un órgano transitorio altamente especializado que cumple funciones metabólicas, protectoras y endocrinas. Es fundamental en el transporte de oxígeno, agua y nutrientes necesarios para que el feto se desarrolle de una manera adecuada. Durante el desarrollo de la placenta humana, el trofoblasto se expande y se diferencia en dos linajes: el citotrofoblasto (CTB) extraveloso, que invade los tejidos y los vasos maternos; y el CTB veloso, que mediante un proceso de sincialización dará origen al sincitiotrofoblasto (STB) de las vellosidades, epitelio de transporte responsable del intercambio de nutrientes, gases y productos de desecho entre la madre y el embrión en desarrollo.

La hipoxia es un factor importante que regula la fisiología placentaria. Durante la gestación, la concentración de oxígeno se modifica, y estos cambios son esenciales para la formación y funcionalidad de la placenta. Es así que hacia el final de la gestación, la hipoxia placentaria provoca un incremento en la presión sanguínea, lo cual daña la arquitectura de las vellosidades y aumenta el riesgo de vasoconstricción, provocando fenómenos de isquemia-reperfusión (hipoxia-reoxigenación, H/R) que resultan en un aumento del estrés oxidativo. Este modelo de H/R plantea que las concentraciones de oxígeno en el espacio intervelloso fluctúan, aunque la oxigenación general del feto se mantiene.

En el presente trabajo se estudió el efecto de la H/R durante la diferenciación del trofoblasto, analizando parámetros de sincialización y de la composición lipídica de las membranas celulares. Nuestros resultados sugieren que los cambios en la tensión de oxígeno pueden alterar el proceso de sincialización del trofoblasto, evento clave para la adecuada funcionalidad placentaria.

TABLA DE CONTENIDOS:

INTRODUCCIÓN	9
<hr/>	
1. La placenta	10
1.1. El trofoblasto	
1.2. Estructura de la placenta: formación de vellosidades placentarias	
2. Rol del Oxígeno	16
2.1. Rol del oxígeno durante la formación placentaria	
2.2. Estrés oxidativo y fenómeno de Hipoxia/Reoxigenación	
3. Sincialización del trofoblasto	19
3.1. Marcadores de la sincialización	
4. Relevancia de los lípidos	22
4.1. Función estructural y fisiológica en el trofoblasto	
4.2. Rol lipídico en el proceso de la sincialización	
4.3. Rol de los lipid rafts y caveolas	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
<hr/>	
1. Hipótesis general	
2. Objetivo general	
3. Objetivos específicos	

MATERIALES Y MÉTODOS	28
<hr/>	
1. Soluciones y Reactivos	29
2. Cultivo Celular	30
2.1. Control de micoplasma	
2.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT)	
3. Tratamientos	31
3.1. Tratamiento con forskolina	
3.2. Tratamiento con Cloruro de Cobalto	
3.3. Condiciones de hipoxia/reoxigenación	
4. Verificación de una efectiva sincialización y efecto de la H/R	33
4.1. Extracción y cuantificación proteica	
4.2. Western Blot	
4.3. Cuantificación de β -hCG	
4.4. Extracción y cuantificación de ARN	
4.5. RT-PCR	
4.6. PCR en tiempo real	
4.7. Inmunocitoquímica	
5. Análisis de ácidos grasos	38
6. Análisis Estadístico	

RESULTADOS	41
<hr/>	
1. Cultivo Celular	42
1.1. Control de micoplasma	
2. Verificación de una efectiva sincialización	42
2.1. Extracción y cuantificación proteica	
2.2. Western Blot: Análisis de Sincitina-1	
2.3. Cuantificación de β -hCG	
2.4. Inmunocitoquímica	
3. Análisis de la sincialización en Condiciones de Hipoxia/Reoxigenación	46
3.1. Ensayo de viabilidad celular (MTT)	
3.2. Efecto de la H/R sobre la secreción de β -hCG	
3.3. Análisis de Caveolina-1	
3.4. Análisis de la Aromatasa-1	
3.5. Análisis de la expresión de GCM-1 por qPCR	
4. Análisis de ácidos grasos	50
DISCUSIÓN	53
<hr/>	
CONCLUSIONES	60
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	62
<hr/>	

INTRODUCCIÓN

1. La placenta:

La placenta humana es un órgano transitorio altamente especializado que efectúa diversas funciones vitales para mantener la supervivencia y promover el desarrollo normal del feto. Se encuentra en un estado de constante crecimiento y diferenciación durante el cual provee una interfase inmune; transporta nutrientes, lípidos y agua entre la madre y el feto, y expresa diversas sustancias que participan activamente en el desarrollo y metabolismo materno-fetal (Gude NM. et al., 2004). Además, presenta una organización progresiva y funcional que, de manera sincrónica, se adapta a las necesidades para el bienestar fetal (Acevedo Gallegos S. et al., 2008).

1.1. El Trofoblasto

El trofoblasto es la parte fetal de la placenta y el responsable de invadir el útero materno durante la implantación. Además de constituir una parte crucial de la estructura placentaria, juega un importante rol en su fisiología: el trofoblasto sintetiza hormonas que regulan el crecimiento y desarrollo fetal. Una de estas hormonas es el estradiol, que favorece la proliferación del endometrio y las glándulas mamarias, y la retención de calcio. Otra de estas hormonas es la progesterona, cuya función principal es la conservación del embarazo, contribuyendo a mantener la quiescencia miometrial; mientras que la gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona que tiene un rol central en la formación de la placenta y en la regulación de la sincialización.

El trofoblasto es el primer tipo celular que se diferencia en el blastocisto. Conformar la estructura básica del árbol vellosos placentario y se diferencia en distintos tipos celulares que se detallan a continuación:

Citotrofoblasto (CTB): Son células poliédricas, mononucleadas, con citoplasma granuloso y membranas bien definidas. Se disponen sobre la membrana basal del sinciotrofoblasto, quedando recubiertas por éste y formando las vellosidades coriónicas. La actividad mitótica de estas células suele ser intensa, se estima que al menos la mitad de las células del CTB se encuentran en división. En cuanto a su predominancia, el CTB es muy abundante hasta el segundo mes del embarazo, sin embargo comienza a desaparecer gradualmente, y después de la semana 20 de gestación forma una capa discontinua sobre las vellosidades. Además de su alta tasa de proliferación, existe una alta tasa de diferenciación celular, por la cual se generan otros tipos celulares altamente especializados: el sinciotrofoblasto (STB) y el trofoblasto extraveloso (TEV).

Sinciotrofoblasto (STB): Esta capa celular se origina por la fusión de las células del CTB veloso mediante un proceso denominado sincialización. El STB presenta un citoplasma continuo con múltiples núcleos entre los cuales no existe una membrana celular que los delimite. Esta monocapa epitelial que reviste la vellosidad coriónica posee dos membranas: una membrana apical, en contacto con la sangre materna; y una basal, en contacto con el CTB subyacente. Como el STB forma parte de la barrera placentaria en contacto con la sangre materna, estas células especializadas son responsables del intercambio de gases y nutrientes, y la secreción de hormonas y péptidos, cumpliendo un rol fundamental metabólico madre-feto y en la homeostasis del embarazo. La actividad proliferativa del STB es nula frente a su fuerte actividad metabólica.

Trofoblasto extraveloso (TEV): Es el componente trofoblástico que se ubica fuera de las vellosidades coriónicas de intercambio y conforma las vellosidades de anclaje. Una vez que estas células proliferan, adquieren un fenotipo invasivo que logra adentrarse en el estroma uterino. Así, entra en contacto directo con las células inmunitarias y estromales del útero materno. A su vez, invade las arterias espiraladas del endometrio

con el fin de remodelar las paredes vasculares y transformar una circulación de alta resistencia al flujo sanguíneo en una de baja resistencia. Se distinguen dos tipos de TEV: el TEV intersticial, que invade decidua y posteriormente miometrio para luego fusionarse y convertirse en células placentarias gigantes; y el TEV endovascular, que invade las paredes de las arterias. El mecanismo del TEV endovascular consiste en obstruir inicialmente la luz de las arterias espiraladas y así entrar en contacto directo con la sangre materna.

Debido a lo mencionado anteriormente, se puede concluir que el crecimiento y mantención de la superficie epitelial que cubre el árbol veloso depende de una proliferación celular continua del CTB, y por lo tanto, este mismo CTB se encuentra en permanente recambio.

1.2. Estructura de la placenta: formación de las vellosidades placentarias

Durante las primeras etapas del desarrollo, las células del CTB veloso proliferan localmente y comienzan a formar proyecciones, dando origen a las vellosidades primarias. Con el avance de la gestación, las células mesodérmicas penetran estas vellosidades y esta nueva estructura pasa a denominarse vellosidad secundaria.

Luego, las células mesodérmicas de la parte central de la vellosidad comienzan a diferenciarse en células sanguíneas y en vasos de pequeño calibre, que forman el sistema capilar vellositario. Estas vellosidades se denominan terciarias o vellosidades placentarias definitivas (Pogozhykh, O. et al., 2018) (Figura 1).

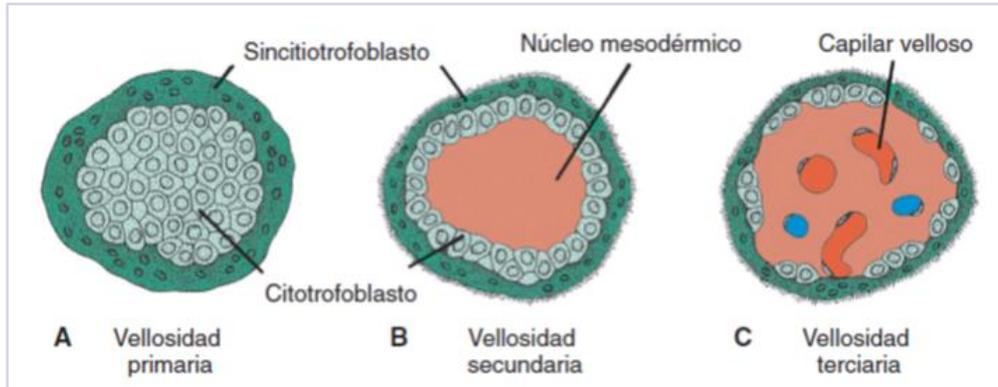


Figura 1: Estructura de las vellosidades primarias (A), secundarias (B) y terciarias (C).

Hacia las 8 semanas de gestación, el trofoblasto está compuesto por abundantes vellosidades secundarias y terciarias ancladas a la lámina coriónica (corion liso o leve). A medida que avanza la gestación, las vellosidades continúan creciendo y expandiéndose, lo cual origina el corion frondoso (Figura 2).

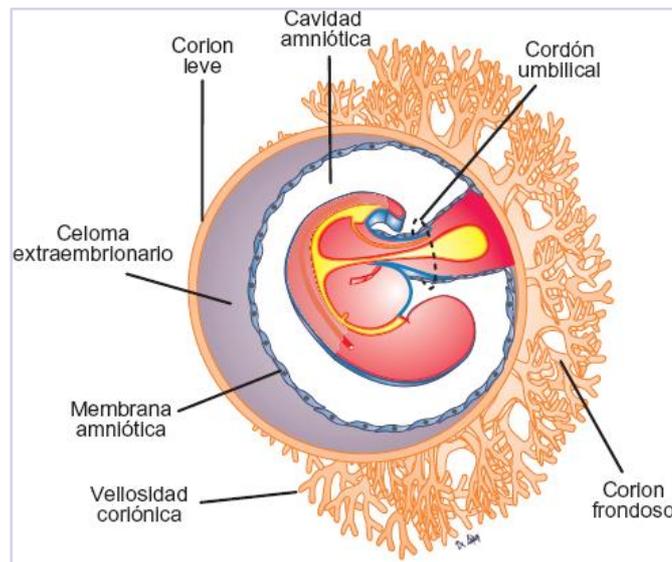


Figura 2: Esquema representativo de la estructura placentaria.

La placenta presenta dos componentes: una porción materna o decidua basal y una porción fetal o corion frondoso/velloso, el cual se encuentra bañado por la sangre materna que circula en el espacio intervelloso (Figura 3).

Cara fetal: se caracteriza por ser lisa y tener un aspecto brillante, debido a la membrana amniótica, a través de la cual se logran visualizar los vasos coriónicos que convergen hacia el cordón umbilical.

Cara materna: tiene un aspecto mate, está en íntima relación con la cavidad uterina y presenta entre 15 a 20 cotiledones, cada uno constituido por una vellosidad coriónica precursora con todas sus ramas.

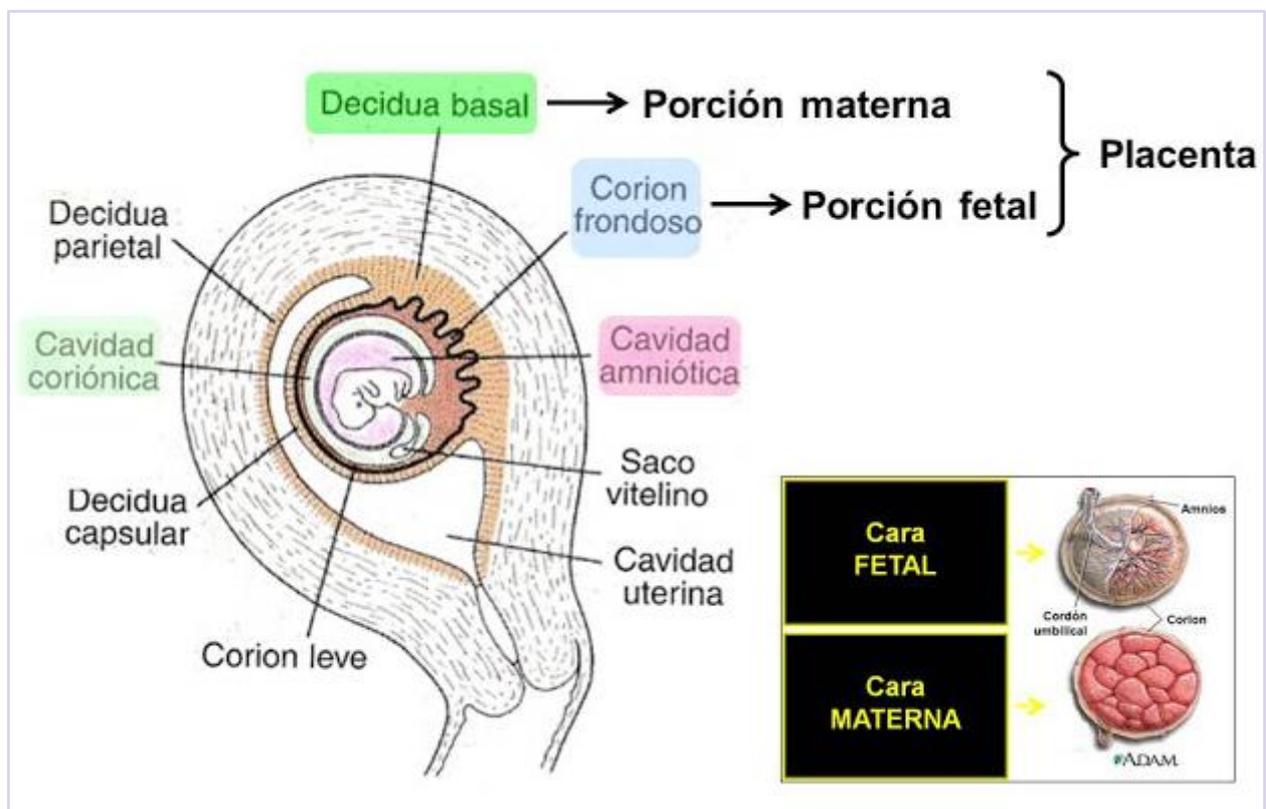


Figura 3: Esquema representativo de la unidad feto-placentaria

En las primeras etapas de la placentación, el CTB comienza a invadir y entra en contacto con las arterias espiraladas endometriales. Una vez que entra en contacto con las paredes, llega a la luz de las arterias y bloquea la transferencia de células sanguíneas hacia la placenta, formando agregados y obstruyendo los extremos distales de los vasos.

Por ende, no se establece una comunicación libre entre las arterias espiraladas y la placenta hasta el final del primer trimestre. Este taponamiento dificulta la entrada de células sanguíneas maternas al interior de la placenta, lo que implica que el desarrollo de la misma ocurre en un ambiente hipóxico (menos de 20 mm Hg de O₂) hasta las 10-12 semanas de gestación. Durante el desarrollo de la placenta y de los principales órganos embrionarios, existe una alta vulnerabilidad a la perturbación por radicales libres. Es por eso que se cree que el taponamiento de las arterias espiraladas puede servir como un mecanismo que contribuye a brindar protección, no solo a la placenta sino también al feto frente al estrés oxidativo generado por los radicales libres. A su vez, se postula que este bajo nivel de oxígeno inicial es necesario para prevenir la diferenciación del trofoblasto hacia un fenotipo invasivo (Parodi, C. et al., 2019). Al final del primer trimestre, se comienzan a liberar los tapones generados por las células trofoblásticas y se observa el comienzo del flujo de sangre materna al espacio intervilloso. Este aumento del flujo sanguíneo intervilloso está asociado a un aumento de la concentración de oxígeno. Por lo descripto, la placenta humana es de tipo hemocorial, lo que quiere decir que el tejido fetal penetra el endometrio hasta el punto de estar en contacto con la sangre materna.

Para cumplir con su principal función como órgano de intercambio de sustancias entre la madre y el feto, la morfología general de la placenta ofrece una superficie de sincitiotrofoblasto que ha sido estimada entre 10 a 14 metros cuadrados. Esta barrera tiene un comportamiento dinámico influido por el movimiento de la sangre que ingresa en forma pulsátil al espacio intervilloso. Hacia el final de la gestación, la placenta pesa entre 500 - 600 g y se observa como una estructura redondeada en forma de disco de unos 25 cm de diámetro y unos 2,5 cm de grosor adosada a la cara interna del útero (Figura 4).

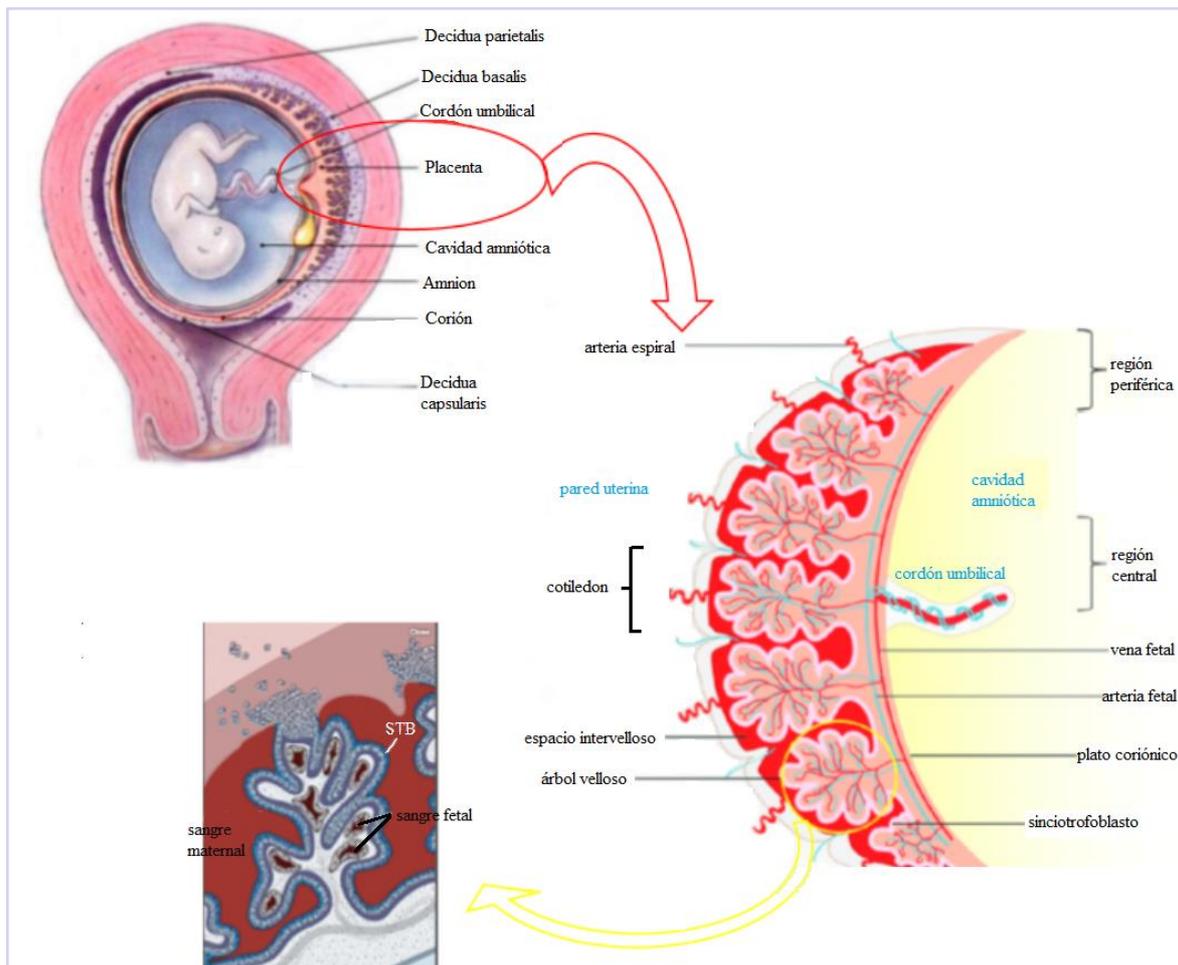


Figura 4: Esquema detallado de la unidad feto-placentaria, de la estructura placentaria y de la capa sincicial.

2. Rol del Oxígeno

El oxígeno cumple una función dinámica y vital durante la formación de la placenta. Dependiendo del estadio de desarrollo, los cambios que ocurran en la concentración de oxígeno pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la gestación. Por lo tanto se requiere un ajuste fino de los niveles de oxígeno durante el embarazo ya que dicha tensión es un factor relevante en la fisiopatología placentaria (Burton, G.J. et al., 2009).

2.1. Rol del oxígeno durante la formación placentaria:

Durante los estadios tempranos, el desarrollo embrionario ocurre en un ambiente relativamente hipóxico que actúa como un regulador clave en la diferenciación temprana del trofoblasto. De hecho, las bajas tensiones de oxígeno estimulan al trofoblasto a entrar en mitosis y así lo mantienen en un estado proliferativo característico del desarrollo placentario temprano (Genbacev, O. et al., 1997). Hacia el final del primer trimestre, se establece la circulación materno-fetal, lo cual permite un flujo continuo de sangre materna hacia el espacio intervelloso. Este aumento en la tensión de oxígeno podría ser uno de los factores críticos para completar el proceso de invasión y diferenciación del trofoblasto (Jaffe, R., et al., 1997).

Por lo tanto la hipoxia estimula la invasión controlada, diferenciación, supervivencia, angiogénesis y vasculogénesis del trofoblasto. Sin embargo, en forma crónica se asocia con una reducción del crecimiento fetal y una alteración del desarrollo placentario (Huppertz, B. et al, 2006).

En el trofoblasto, el sensor molecular que detecta y responde frente a los cambios en la tensión de oxígeno es una proteína heterodimérica denominada HIF (Factor inducible por hipoxia). El factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF-1) pertenece a la familia de factores de transcripción que median la respuesta a cambios en los niveles de oxígeno intracelular. Dicho factor de transcripción es un complejo proteico que en condiciones hipóxicas es activado de manera exponencial, permitiendo aumentar la expresión de genes específicos destinados a la regulación bajo el estrés hipóxico generado. El factor HIF también puede ser activado por algunos metales de transición como el cobalto u otros quelantes de hierro.

La estructura de este complejo es heterodimérica, estando constituido por dos subunidades, α y β , siendo α la subunidad la regulada por oxígeno. Se ha observado en trabajos previos, que el factor HIF-1 α se activa bajo condiciones hipóxicas, pero aún queda por profundizar en el mecanismo detrás de su aumento en un fenómeno de H/R (Wagner Grau, P. et al., 2011). Adicionalmente, trabajos previos de nuestro laboratorio

demonstraron que la estabilización de HIF-1 α altera el recambio celular del STB mediante la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Abán, C. et al., 2016).

2.2. Estrés oxidativo y el fenómeno de Hipoxia/Reoxigenación:

Hacia el final de la gestación, un evento de hipoxia placentaria provocaría un incremento en la presión sanguínea materna, lo cual dañaría la arquitectura de las vellosidades placentarias y aumentaría el riesgo de vasoconstricción. Esta situación provocaría fenómenos de isquemia-reperfusión, que resultarían en un aumento del estrés oxidativo y la apoptosis del trofoblasto. Dichas alteraciones desencadenan una serie de eventos que resultan en la liberación de fragmentos apoptóticos a la circulación materna. Esto conlleva al desarrollo de patologías, siendo la preeclampsia una de las que posee mayor tasa de morbilidad. La preeclampsia es un trastorno exclusivo del embarazo humano caracterizado por una respuesta inflamatoria materna generalizada. Conocida como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal, afecta del 5% al 7% de todos los embarazos. El desencadenante del aumento del estrés oxidativo en esta condición patológica aún se desconoce, sin embargo se cree que la perfusión placentaria intermitente, resultado de una invasión trofoblástica deficiente de las arterias endometriales, conduce a un fenómeno de isquemia-reperfusión (hipoxia-reoxigenación). Es decir, la remodelación defectuosa resulta en la perfusión intermitente del espacio intervelloso, produciendo así concentraciones fluctuantes de oxígeno en la placenta (Huppertz, B. 2018).

Durante la fase de perfusión, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la mitocondria. Este desbalance de las ROS conduce a una serie de eventos que generan la pérdida de integridad tisular y contribuyen así a la liberación de fragmentos del sincicio a la circulación materna, proceso que se ve aumentado en patologías. La magnitud del estrés oxidativo dependerá del grado de lesión producida y en la efectividad de las defensas placentarias antioxidantes. Por todo lo expuesto es de interés

profundizar en los conocimientos sobre los efectos de la hipoxia-reoxigenación (H/R) sobre el trofoblasto durante el proceso de sincialización.

3. Sincialización del trofoblasto:

La formación del STB se da mediante un proceso llamado sincialización, en el cual el CTB se fusiona y se diferencia tanto a nivel funcional como bioquímico (Huppertz, B. et al., 2008). Dicho proceso se inicia durante la implantación y se mantiene hasta el final de la gestación, permitiendo la renovación continua del STB.

La sincialización está regulada por múltiples factores autócrinos y parácrinos que incluyen factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, actividad proteolítica, cambios en la composición y arquitectura de la membrana, señales intracelulares y factores de transcripción (Lyden et al., 1993; Alsat et al., 1996; Mi S. et al., 2000; Kudo, Y. et al., 2003; Knerr, I. et al., 2005; Gauster, M. et al., 2009). Las células del CTB se someten a un proceso de fusión previo a diferenciarse en STB, que se detalla a continuación.

La fusión es un evento complejo que implica cambios morfológicos, formaciones de uniones gap y la expresión de proteínas fusogénicas como son sincitina 1 y 2. Dicha fusión sincicial permite la transferencia de proteínas, organelas, citoplasma y membranas desde el CTB hacia el STB (Gauster, M. et al., 2009) y es de vital importancia para el mantenimiento de su integridad y funcionalidad.

Por otra parte, la diferenciación bioquímica permite que el sincicio sintetice diversas proteínas que participan en el metabolismo, transporte y producción de hormonas que no se expresan en el CTB.

El STB presenta una actividad transcripcional que va disminuyendo progresivamente, demostrado por el cambio morfológico del núcleo celular, que en el caso del CTB presenta cromatina de estructura difusa, mientras que en el STB se observa una mayor cantidad de cromatina condensada. A lo largo del embarazo, a medida que avanza la gestación, decae en un 50% la cantidad de núcleos celulares en el STB (Fogarty, N. et al., 2011; Huppertz, B. et al., 1999; Kar, M. et al., 2007). Dado que las células del STB

tienen baja capacidad de proliferación celular, la mantención y expansión del sincicio dependerá de la incorporación continua de las células del CTB mediante fusión sincicial. De esta forma, el STB se mantiene funcionalmente activo.

Esta remodelación continua sucede sobre la membrana basal del sincicio. Lo que ocurre del otro lado, es decir sobre la superficie apical del sincicio, es la generación de material celular envejecido y desechable que es vertido hacia la circulación materna envuelto en una membrana protectora.

3.1. Marcadores de la Sincialización

Existen diversos parámetros utilizados como marcadores para estudiar el proceso de fusión y diferenciación celular. Para detallar a los marcadores se dividirán en dos grandes grupos: los factores de transcripción involucrados y las proteínas sintetizadas en el STB.

Factores de transcripción:

El factor de transcripción GCM-1 (glial cells missing 1) se expresa principalmente en el tejido placentario, y es clave para su desarrollo. Trabajos previos confirmaron que GCM-1 promueve la fusión del trofoblasto mediante la regulación positiva de la expresión de proteínas fusogénicas, como es la Sincitina-1, de la que profundizaremos a continuación. Por ende, es clave su participación en la diferenciación de CTB a STB. También se ha observado una reducción de la expresión de GCM-1 en condiciones hipóxicas, asociadas a trastornos del embarazo como la preeclampsia (Lu, X. et al., 2016).

Una vez diferenciada a STB, se sintetizan proteínas que no se producían en el CTB o se producían en significativamente menor cantidad, como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la aromatasa.

Proteínas sintetizadas en el STB:

La expresión de proteínas fusogénicas es esencial para que ocurra la fusión celular, siendo sincitina-1 la primera proteína identificada en la formación del STB (Frendo, J.L. et al., 2003). Además, este proceso requiere la participación de moléculas que promueven la agregación y la comunicación celular, como la E-cadherina y proteínas del desmosoma (Gerbaud, P. & Pidoux, G., 2015.)

La diferenciación bioquímica del STB comprende cambios en la biosíntesis de varias proteínas que están ausentes en el CTB. El STB expresa citoqueratina, hCG, lactógeno placentario humano (hLP) y fosfatasa alcalina placentaria (hPLAP), entre otras. Estas proteínas desempeñan distintas funciones celulares, jugando un rol preponderante en el metabolismo, el transporte y la producción de hormonas. (Guibourdenche, J. et al., 2009).

Una alteración en la formación y regeneración sincitial durante la gestación podría afectar el crecimiento fetal y/o la progresión del embarazo y conducir a severas patologías como la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) o la preeclampsia (Newhouse, S.M. et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, el STB sintetiza hCG, una sialoglicoproteína heterodimérica con dos subunidades, α y β . La subunidad β determina las propiedades biológicas e inmunoquímicas, es por eso que se utiliza β -hCG como marcador molecular. La hCG es secretada inicialmente por las células trofoblásticas poco después de la implantación del embrión en la pared uterina. El rápido aumento de los niveles séricos de hCG después de la concepción lo convierte entonces en un marcador clave para la confirmación temprana y seguimiento del embarazo. Fisiológicamente, la hCG cumple la función de mantenimiento del cuerpo lúteo, el cual sintetiza progesterona y estrógenos. A medida que avanza la gestación, la placenta asume la producción de dichas hormonas. La hCG circula como molécula intacta en el suero de la sangre materna (cuando no existen complicaciones), y es eliminada por vía renal, donde las subunidades se escinden.

Otro marcador relevante de la sincialización es la aromatasa, enzima responsable de un paso fundamental de la biosíntesis de los estrógenos. Se expresa mayoritariamente en STB, participando en la formación de hormonas a través de la esteroidogénesis. En la placenta humana, los andrógenos derivados de las glándulas suprarrenales maternas y fetales son convertidos en estrógenos por la acción enzimática de la aromatasa placentaria.

E-cadherina como marcador de sincialización:

La E-cadherina, también conocida como molécula de adhesión dependiente de calcio (CAM), presenta un rol importante en el proceso de sincialización del CTB. Se ha demostrado en trabajos anteriores (Coutifaris, C. et al., 1991) que la expresión de E-cadherina en el CTB se ve aumentada. Interesantemente, E-cadherina presenta una disminución al inducirse la sincialización de dichas células, hasta su desaparición. Por ende, la E-cadherina se expresa de manera dinámica según el estado de diferenciación de CTB a STB, viéndose reducida cuánto más diferenciada está la célula.

4. Relevancia de los lípidos

4.1. Función estructural y fisiológica en el trofoblasto

Los lípidos tienen una función estructural fundamental, al ser constituyentes de las membranas celulares y mitocondriales del feto. Además son una importante fuente de energía en la placenta, dado que aportan un alto valor energético. La inhibición del almacenamiento de lípidos implica una reducción de la protección contra los daños provocados por especies reactivas del oxígeno, es así que disminuye la supervivencia de las células sometidas a hipoxia con posterior reoxigenación. La composición, estructura y funciones de la bicapa lipídica de las membranas se modifican con el

progreso de la gestación para ajustarse a las necesidades metabólicas del feto en crecimiento. En condiciones patológicas, se ha observado una alteración en la composición lipídica de la membrana del sincitiotrofoblasto y una expresión anormal de proteínas de transporte, alterando así las funciones placentarias. Como hemos mencionado anteriormente, la placenta media el transporte de nutrientes, y el metabolismo y mantenimiento de una concentración óptima de ácidos grasos (AG). De tal forma que para el desarrollo normal de la placenta, se mantiene el equilibrio y biodisponibilidad materno-fetal de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFAs).

4.2. Rol lipídico en el proceso de la sincialización

La composición lipídica tiene una importancia tanto estructural como fisiológica, y es por eso que dichos cambios durante el proceso de sincialización también representan una alteración en las funciones de la célula diferenciada.

Existe una concentración mucho mayor de LCPUFAs en el feto, lo cual indica que existe una estrategia de paso unidireccional, dado por el gradiente de concentración, siendo la sangre fetal el extremo de menor concentración. Dado que el STB es una célula polarizada, la contribución de cada fosfolípido es fundamental para determinar el transporte desde la membrana apical del trofoblasto (en contacto con la circulación materna) hacia la membrana basal (en contacto con el endotelio) (Levi, L. et al., 2016). El proceso de sincialización también representa el inicio de una cascada apoptótica que involucra un giro de fosfatidilserina (PS) dentro de la membrana celular del CTB, lo cual remarca aún más la importancia de la composición lipídica de la membrana. El flujo de salida de aminofosfolípidos, particularmente PS, es esencial para la fusión del trofoblasto. Se sabe además que la fusión del CTB se caracteriza por la salida del ciclo celular, la fusión de membranas adyacentes mediadas por una o más proteínas de fusión entre ellas sincitina-1 y la reorganización de los componentes del citoesqueleto.

En cuánto a la importancia fisiológica, se conocen algunos AG que poseen funciones claves en la placenta, tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6 n-3), ácido eicopentaenoico (EPA) (20:5 n-3) (ambos pertenecientes a la familia de AG con insaturación n-3, conocido como omega-3) y el ácido araquidónico (AA) (perteneciente a la familia de AG con insaturación n-6, conocido como omega-6). Ambos son LCPUFAs y son vitales para muchos procesos fisiológicos tales como vías de señalización, expresión de genes, y estructura y fisiología de membranas. Tan fundamentales son, que se depositan en las membranas celulares que forman la materia gris, representando el 25% del contenido de AG cerebrales. Cabe destacar que dichos AG tienen efectos sobre el crecimiento y diferenciación neuronal a través de la modulación de las propiedades físicas de las membranas neuronales, particularmente tienen un rol importante en la neuroprotección contra patologías degenerativas como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Estas últimas dos patologías se encuentran estrechamente asociadas con la disfunción mitocondrial, neuroinflamación y de nuestro interés particular, el estrés oxidativo.

Se ha estudiado extensamente el rol que tienen los omega-3 y omega-6 en la gestación, en el último trimestre del embarazo y en los dos primeros años de vida, y se conocen los mecanismos biológicos implicados en la transferencia de DHA y AA de madre a feto. Se destaca que la sangre fetal se encuentra relativamente más enriquecida en DHA y AA que la sangre materna, puntualmente habiendo una mayor acumulación de los mismos en el cerebro. El feto carece de la capacidad de sintetizar cantidades adecuadas de LCPUFAs, es por eso que depende del transporte de éstos desde la madre a través de la placenta. Una desregulación en este transporte esencial podría resultar crítico, ya que el equilibrio de los LCPUFAs se puede ver impactado y generar anomalías en el desarrollo y funcionamiento placentario. Algunas de las consecuencias de esto es el desarrollo de preeclampsia, IUGR, retraso del desarrollo neurológico, y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades en la vida adulta, como las mencionadas previamente (Alzheimer y Parkinson). En cambio, la captura de AG más cortos, como el ácido oleico (OA) dentro de la célula trofoblástica en forma de gotas lipídicas puede retrasar su

transporte a la circulación fetal. La capacidad que tienen las células del trofoblasto de acumular dichos AG podría prevenir la acumulación intracelular de moléculas potencialmente tóxicas.

4.3. Rol de los lipid rafts y caveolas

Los lipid rafts o balsas lipídicas son conjuntos dinámicos de microdominios compuesto principalmente por esfingolípidos y colesterol ubicados en las membranas plasmáticas celulares. Los lipid rafts incorporan o excluyen de forma selectiva proteínas, es así que se especializan y adquieren funciones distintas. Distintos tipos de balsas lipídicas coexisten en la membrana celular, entre ellas están las caveolas, que son particularmente más abundantes en células endoteliales (Linton, E. et al., 2003). Las caveolas son un tipo particular de microdominio de membrana. Se describen como invaginaciones de la membrana plasmática (de 50 a 100 nm de diámetro), que cumplen un rol esencial en la endocitosis, el transporte de lípidos y la transducción de señales. La composición lipídica juega un papel importante en la regulación de las propiedades biofísicas de las bicapas lipídicas, permitiendo una adecuada formación de las caveolas. Su principal componente estructural está representado por las proteínas de caveolina, actualmente se han caracterizado tres isoformas de caveolina en mamíferos: caveolina 1, caveolina 2 y caveolina 3 (cav-1, cav-2 y cav-3 respectivamente).

En la placenta humana existe una alta expresión de Cav-1 en las células endoteliales, disminuyendo esta expresión en el CTB, células mesenquimales y STB. La reducción de Cav-1 a medida que el CTB se diferencia a STB puede deberse al hecho de que ocurre una pérdida de las membranas celulares laterales después de la fusión celular. A su vez, se desconoce si las alteraciones en dicho proceso de sincialización pueden alterar la expresión de Cav-1. Se sabe que están implicadas en la patogénesis de distintas lesiones de órganos como la isquemia, en donde se produce un desajuste entre la producción y la utilización de energía, éstas condiciones se asocian con la expresión alterada de caveolas o la redistribución de caveolina.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis general:

El proceso de sincialización modifica la composición lipídica de las membranas del trofoblasto. Los eventos de hipoxia/reoxigenación alteran la sincialización, proceso fundamental para un normal funcionamiento placentario.

2. Objetivo general:

Observar el proceso de la sincialización del trofoblasto bajo distintas condiciones de tensión de oxígeno: normoxia e hipoxia/reoxigenación. Analizar el efecto sobre la composición lipídica de las membranas plasmáticas.

3. Objetivos específicos:

- Desarrollar un modelo de sincialización del trofoblasto a partir de la línea celular BeWo.
- Verificar una efectiva sincialización, evaluando los marcadores correspondientes.
- Determinar los cambios provocados por la hipoxia /reoxigenación sobre los parámetros de sincialización del trofoblasto.
- Determinar los cambios provocados por la hipoxia/reoxigenación en la composición lipídica de la membrana plasmática, tanto en CTB como STB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Soluciones y Reactivos

Solución/Reactivo	Composición
Medio de Cultivo	DMEM/F-12 1:1 con HEPES, con 10% SFB
Forskolina	18 uL Fsk 50mM, 162uL DMEM 0,5% concentración efectiva de uso: 25 uM
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ 10mM sn madre (se prepararon concentraciones 100 uM, 75 uM, 50 uM)
Buffer RIPA	Tris HCl 0,1975 g, Tris base 0,1514g, NaCl 0,81816g, Deoxicolato 0,1g, EGTA 0,019g
Buffer de Transferencia	Tris pH 8,3 3,027 g, Glicina 14,41 g, Metanol 200 mL
Buffer de Corrida 5x	Tris pH 8,3 15,1 g, Glicina 72 g, SDS 5g
Reactivo de Bradford	Etanol Absoluto 12,5 mL, Coomassie Blue 25mg, H ₃ PO ₄ 85% 25 mL, H ₂ O 187,5 mL
PSA 10%	PSA 1 g en 10 mL H ₂ O

Tabla 1: Reactivos y Soluciones Utilizadas

2. Cultivo Celular:

Se utilizó la línea celular BeWo como modelo de estudio. Estas células derivan de coriocarcinoma humano y representan un modelo de uso frecuente y aceptado para estudiar el comportamiento del trofoblasto, incluida su diferenciación en sincicios multinucleados. Las células BeWo son comúnmente utilizadas para el estudio del trofoblasto debido a que representan un modelo *in vitro* eficaz en el que las células forman una monocapa confluyente sobre un soporte semipermeable. Dicha línea celular es además fácil de mantener y de tiempo de crecimiento relativamente corto, también posee propiedades de secreción hormonal como la de trofoblastos típicos de tercer trimestre. Una gran diferencia sería la incapacidad de las células BeWo de diferenciarse espontáneamente en sinciciotrofoblasto, por lo que necesita de un tratamiento con forskolina o adenosín monofosfato cíclico (cAMP) como estimulante (Bode, C. et al., 2006).

Obtención de muestras:

Se descongelaron diferentes crioviales de células BeWo para su cultivo y expansión mediante técnicas de cultivo celular. Cada criovial corresponde a un experimento independiente.

2.1. Control de Micoplasma:

El control de micoplasma se realizó de acuerdo a la técnica de Hoescht. La misma consistió en la incubación de células (previamente crecidas sobre un cubreobjeto, sin llegar a confluencia del 100%) con Hoescht 33342 en medio de cultivo (concentración final 2µg/ml) durante 15 minutos en estufa. Posteriormente a esto, se realizó un lavado con PBS y se montó inmediatamente en glicerina/agua 1:1. Una vez realizado este paso, se observó en el microscopio de fluorescencia.

2.2. Ensayo de Viabilidad Celular:

Para medir la viabilidad celular, se realizó el ensayo MTT. Este ensayo colorimétrico indica si las células presentan actividad metabólica activa, indicativo de que son células viables para ser utilizadas en experimentos.

Se plaqueó en una placa de 96 wells una cantidad de células que no llegase a saturar la señal del experimento, esto significa que no se dejó que el crecimiento llegara a 100% de confluencia. Para las células BeWo se calcularon 5000-8000 células por well, y el ensayo se realizó por triplicado.

La solución de reactivo MTT se preparó a una concentración de 5mg/mL en PBS, y se agregaron 20 uL del mismo a cada well, de tal modo que el volumen final fue de 200 uL. Se incubó a 37°C durante 1 hora, luego se resuspendieron los cristales en 150 uL de DMSO con 2% v/v de glicina 0,1M pH=11. Para medir la reacción colorimétrica, dentro de los 30min de agregado del DMSO, se midió la absorbancia a 570 nm.

3. Tratamientos:

3.1. Forskolina:

Inductor del proceso de sincialización, se utilizó una concentración de 25 uM (Tabla 1)

Una vez llegadas a confluencia, las células BeWo se separaron en dos poblaciones y alternativamente se las trató con Forskolina. Así, se obtuvieron dos poblaciones celulares distintas:

1. Citotrofoblasto (CTB - BeWo sin tratar)
2. Sinciotrofoblasto (STB - BeWo tratadas con forskolina)

3.2. Cloruro de Cobalto (CoCl_2):

Estabiliza al factor inducible por hipoxia ($\text{HIF1}\alpha$), generando así condiciones de hipoxia química. De manera resumida, el CoCl_2 estabiliza $\text{HIF-1}\alpha$ por inhibición de la prolin hidroxilasa (PHD), a través del reemplazo de Fe por Co. Así, esta enzima no puede marcar a $\text{HIF-1}\alpha$ para su degradación, dando lugar a un estado intracelular similar a la hipoxia fisiológica (Cervellati, F. et al., 2014).

3.3. Condiciones de hipoxia/reoxigenación:

Posteriormente a ser diferenciadas en CTB y STB, las células fueron tratadas en distintas condiciones de tensión de oxígeno:

- Normoxia: el nivel de oxígeno no se encuentra alterado, se llevan a cabo los procesos celulares con normalidad.
- Hipoxia/Reoxigenación (H/R): se utilizó una cámara de hipoxia glove box (Billups-Rothenberg Inc, USA) gaseada con 2% O_2 - 5% CO_2 y con balance de N_2 (Figura 5).

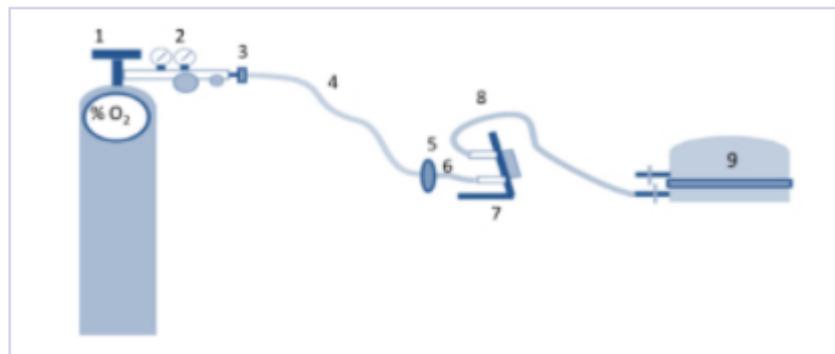


Figura 5: Representación de sistema utilizado para generar condiciones de H/R: (1) Tanque de gas, (2) Regulador, (3) Clamp, (4) Manguera, (5) Filtro inlet, (6) Manguera de inlet, (7) Medidor de flujo, (8) Manguera de outlet, (9) Cámara de hipoxia (Sagrillo-Fagundes, Clabault, Laurent, 2016).

Las células se sembraron y se dejaron crecer por 24 hs (Figura 6). Pasado ese tiempo (tiempo 0 horas), se realizó una hipoxia de 3 horas (2% O₂). Luego se reoxigenó y se esperó 24 horas para una segunda ronda de hipoxia de 3 horas. Luego se reoxigenó y se cosecharon las muestras a las 48 horas. En total fueron 48 horas del procedimiento, donde se realizaron dos eventos de hipoxia (de 3 horas cada uno). Finalizado cada set experimental, se colectaron células para su posterior análisis.

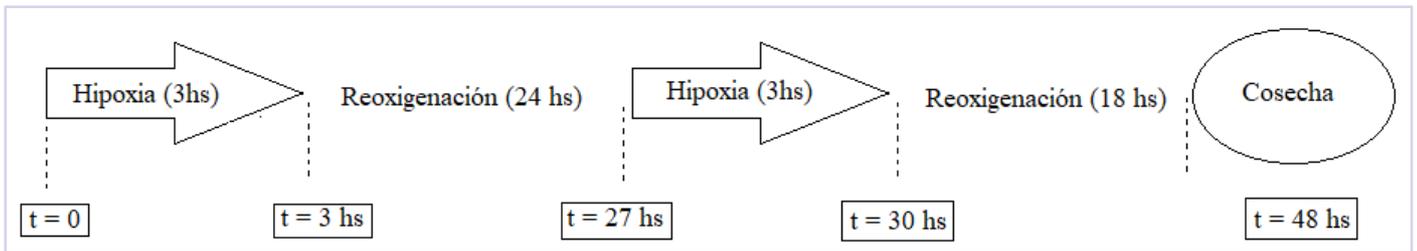


Figura 6: Esquema representativo del procedimiento utilizado para generar H/R.

4. Verificación de una efectiva sincialización y efecto de la H/R

4.1. Extracción y cuantificación proteica:

Se cuantificó la masa de proteínas de cada experimento mediante el método de Bradford.

4.2. Western Blot:

A partir de las muestras cuantificadas, se calculó el volumen para sembrar la misma masa de proteína en todas las muestras. Luego de preparadas, se hirvieron durante 5 minutos con Buffer de carga, y se sembraron en un gel de poliacrilamida.

<p>Gel de SDS Poliacrilamida</p>	<p>Running gel al 12%: 6,6 mL H₂O, 8,0 mL mix acrilamida 30%, 5,0 mL Tris 1,5M (pH 8,8), 0,2 mL SDS 10%, 0,2 PSA 10%, 0,008 mL TEMED</p> <p>Running gel al 15%: 4,6 mL H₂O, 10,0 mL mix acrilamida 30%, 5,0 mL Tris 1,5M (pH 8,8), 0,2 mL SDS 10%, 0,2 PSA 10%, 0,008 mL TEMED</p> <p>Stacking gel: 2,7 mL H₂O, 0,67 mL mix acrilamida 30%, 0,5 mL Tris 1M (pH 6,8), 0,04 mL SDS 10%, 0,04 PSA 10%, 0,004 mL TEMED</p>
----------------------------------	---

Tabla 2: Protocolo para la preparación de geles de poliacrilamida.

Las proteínas resueltas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia húmeda. Después se incubó la membrana en solución de bloqueo (5% p/v de leche en polvo descremada en 1% v/v de Tween-PBS), y se lavó la membrana con Tween-PBS. Luego de esto, se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario apropiado (todos provenientes de Santa Cruz Biotechnology).

- Análisis de Sincitina-1:
Se incubó con anti-Sincitina 1/100
- Análisis de Caveolina-1:
Se incubó con anti-Caveolina-1 1/300
- Análisis de Aromatasa-1:
Se incubó con anti-Aromatasa-1 1/100

Luego de tres lavados con Tween-PBS, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa (1/5000), a temperatura ambiente durante 1 hora (Jackson Immunoresearch Laboratories).

Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia, mediante la incubación con el reactivo ECL (Sigma, St. Louis, Estados Unidos). Se detectó la emisión de luz al exponer la membrana en un Image Quant 350 GE Healthcare.

4.3. Cuantificación de β -hCG total:

Se cuantificó la concentración de β -hCG secretada al medio de cultivo. Para ello, al finalizar los tratamientos de H/R, se rescató el medio y se lo centrifugó (12000g por 5 minutos) para quitar las debris celular. En el sobrenadante resultante se cuantificó la concentración de β -hCG total, mediante el protocolo descrito en Architect System (Total β -hCG, Abbott) .

4.4. Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARN total, en primer lugar las muestras se homogeneizaron en Trizol, y luego se las dejó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se les agregó 100 uL de cloroformo, se agitó con vortex por 15 segundos, y se las dejó por 3 minutos a temperatura ambiente.

Una vez pasado este tiempo, se centrifugaron (a 12000g por 10 minutos a 4°C), para lograr una separación de fases. La fase de nuestro interés es la acuosa. Una vez apartada esta fase acuosa, se le agregó 250 uL de isopropanol, para generar un cambio de solubilidad y así la precipitación del ARN. A continuación, se centrifugaron las muestras (1200g por 10 minutos a 4°C), y conservamos el pellet. Se realizaron lavados del pellet con 400 uL de Etanol al 70% frío mediante centrifugación (1200g por 5 minutos a 4°C).

Una vez concluido esto, se retiró el etanol sobrenadante, se resuspendieron los pellets con 25 uL de agua libre de RNAsa, y se almacenaron a -70°C.

Se cuantificó la concentración de ARN total mediante nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

4.5. RT-PCR:

Para la RT-PCR, se utilizó el ARN total extraído previamente. Se realizó el protocolo correspondiente a la enzima Promega M-MLV Reverse Transcriptase (Tabla 2). La técnica se basa en la síntesis de cDNA a partir de moléculas de ARN, para la cual se utilizó el protocolo descrito en la figura 7.

- Para la síntesis de cDNA:

	para 1 reacción	para 8,5 reacciones
Buffer	2,5 uL	21,25uL
dNTPs 10 mM	0,025 uL	5,31 uL
M-MLV (200 ug/uL)	0,5 uL	4,25 uL
H ₂ O para llegar a Vf=5 uL	1,375 uL	11,68 uL

Tabla 3: Componentes del Mix utilizado para la RT-PCR.

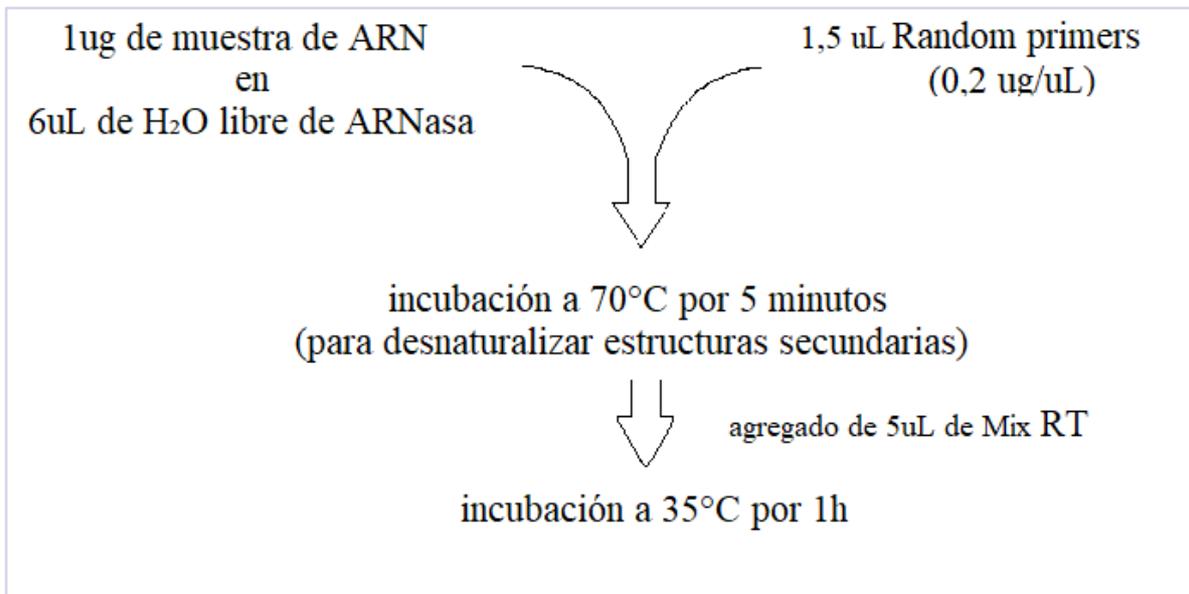


Figura 7: Protocolo descrito para la síntesis de cDNA.

- qPCR:

Los niveles de ARNm de GCM-1 se midieron cuantitativamente mediante qPCR en RG6000 (Corvette) utilizando EasyTaq ADN Polimerasa (TransGen Biotech, Buenos Aires, Argentina) y EvaGreen (Biotium). El programa utilizado fue de 5 min a 95°C (un ciclo), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. Se utilizó como control interno al gen TBP (TATA-box binding protein), y en todos los casos se incluyó un control negativo (sin templado). Los niveles de ARNm de GCM-1 se normalizaron al de TBP y la expresión relativa se calculó usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.6. Inmunocitoquímica:

Como método de verificación de una efectiva sincialización, también corroboramos la localización de E-cadherina mediante inmunocitoquímica, en muestras BeWo Control y BeWo tratadas con forskolina.

Las células BeWo fueron crecidas en vidrios xilanizados. La fijación se realizó con una mezcla de ácido acético glacial: metanol (4:1) durante 15 min. Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con PBS y bloqueadas con leche 5% durante 1 h. Luego, los vidrios fueron incubados con el anticuerpo primario E-cadherina (1:100) overnight a 4°C. Al día siguiente, los vidrios fueron lavados tres veces durante 10 min con PBS y posteriormente incubados con anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (1:1000). Adicionalmente, se realizó una contratinción con DAPI. Para la observación de los preparados se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 200 (NY, USA). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital acoplada al microscopio.

5. Análisis de ácidos grasos:

Se trabajó en conjunto con el laboratorio de la Dra. Sabina Maté (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, INIBIOLP-UNLP-CONICET) para el análisis de la composición lipídica de las muestras. Se enviaron muestras de C, C+F, C (H/R), C+F (H/R), previamente cultivadas en flasks de T75 con el fin de obtener una cantidad de muestra suficiente para el análisis.

Para el análisis de lípidos totales (LT), el procedimiento se puede dividir en dos grandes partes: la extracción de LTs de las distintas muestras (Folch, J. et al., 1957), y el posterior análisis de los mismos por cromatografía gas-líquido (GLC).

Brevemente, el mismo consiste en el agregado de 1 volumen determinado de muestra a 20 volúmenes de cloroformo-metanol (2:1, v/v). La mezcla resultante se agitó con

vórtex y se filtró por papel de filtro. Luego se agregó al filtrado un 20% de su volumen de agua, se agitó por inversión y se dejó durante la noche a 4°C para permitir la separación de dos fases: una superior metanólica acuosa y una inferior, clorofórmica.

La fase superior se separó por sifonación y la inferior, con el extracto lipídico. Ésto se llevó a sequedad mediante corriente de N₂. Dicho extracto lipídico se resuspendió en cloroformo, a -20°C y en atmósfera de N₂, para su posterior análisis.

Determinación de la composición de ácidos grasos (AG) por cromatografía gas-líquido (GLC):

La composición de AG se determinó por GLC de los respectivos ésteres metílicos (EMAG). Si bien los AG pueden separarse como tales por GLC, las mejores separaciones se obtienen con AG de cadena corta. En una muestra biológica se encuentran habitualmente no sólo AG de cadena corta, sino también de cadena media y larga, tanto saturados como insaturados. Es así que se hace necesario transformar a los mismos en sus ésteres metílicos, lo que los hace más estables que los ácidos grasos libres.

La obtención de los AG totales requiere la saponificación previa de las muestras, tratándolas con álcali para hidrolizar los AG de los ésteres de colesterol, acilglicéridos y fosfoglicéridos y convertirlos en jabones insolubles, en solventes poco polares, utilizados para la extracción de lípidos. Para ello se tomaron alícuotas de cada una de las muestras, se les agregó una solución de KOH al 10% (p/v) en etanol absoluto (libre de carbonatos) en una proporción de 8 mL por gramo de lípido, se gasearon con N₂ para evitar oxidaciones y se calentaron en tubos tapados a 80°C durante 45 minutos. Los lípidos insaponificables se extrajeron por agitación de la fase alcohólica con 2 mL de hexano, repitiendo esta operación tres veces.

Completada la extracción de lípidos insaponificables, se acidifica el medio con HCl para desplazar el equilibrio hacia la formación de AG, los cuales fueron extraídos por

agitación de la fase alcohólica con 2 mL de hexano, tres veces. Los AG libres provenientes de la saponificación de los lípidos totales fueron metilados (Morrison, WR, et al. 1964). La muestra se cargó en tubos de vidrio con tapa esmerilada, a los que se les agregó 2 mL de trifluoruro de boro en metanol al 10%. Los tubos se gasearon con N₂, se taparon y se colocaron a 64°C durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó a cada tubo 2 mL de hexano y 1 mL de agua; la muestra se agitó y, luego de la separación de fases, se recuperó la fase superior para extraer con hexano los EMAG (2 veces).

Así se conservaron las muestras a -20°C, bajo atmósfera de N₂, hasta el momento de ser utilizados. Los EMAG fueron analizados en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard modelo 6890 con detector de ionización de llama, sobre una columna capilar DB-23 (J y W Scientific) de 30 m de largo.

El método de identificación de los EMAG se basó en el tiempo de retención relativo, que es característico de cada éster metílico, dependiente de la columna utilizada, de la fase móvil y de la temperatura, e independiente de otras condiciones experimentales. Por último, los picos fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los tiempos de retención de una mezcla de estándares de EMAG conocidos.

6. Análisis Estadístico:

Para el análisis estadístico de los datos experimentales, realizamos la prueba T de Student para los datos con dos agrupaciones, y una prueba de ANOVA seguida de la Prueba de Tukey para los análisis con más de dos agrupaciones.

RESULTADOS

1. Cultivo Celular

Para conocer la calidad del stock de las células BeWo que fueron descongeladas, se realizó una tinción con Hoechst con el objetivo de corroborar la ausencia de micoplasma.

1.1. Control de Micoplasma:

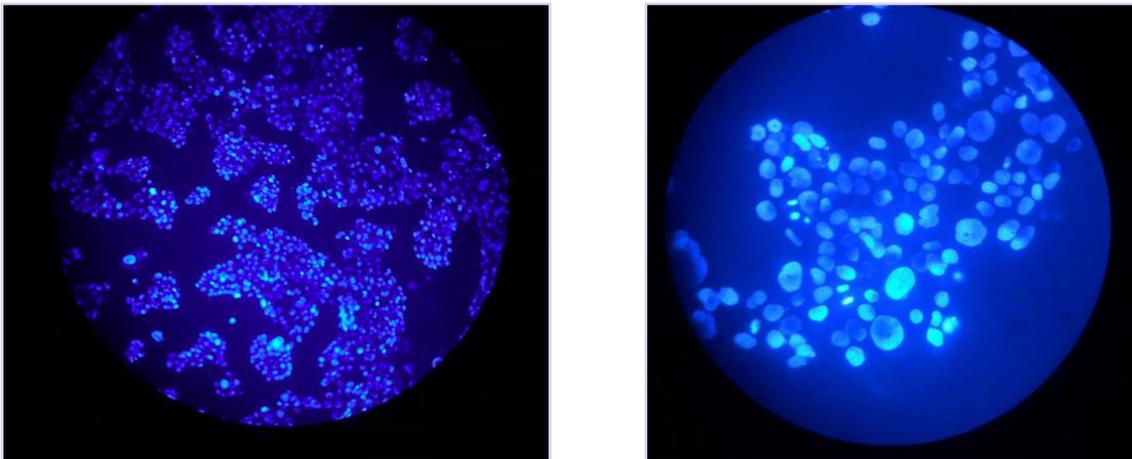


Figura 8A y 8B : Imágenes representativas de la tinción con Hoechst que corroboran la ausencia de contaminación por Micoplasma.

No se observan granulaciones en el citoplasma, sombra de la membrana plasmática ni vacuolización fluorescente. Se observan sólo los núcleos, por ende se puede confirmar que el cultivo no está contaminado (Figura 8, paneles A y B).

2. Verificación de una efectiva sincialización:

Como se detalló anteriormente, distintos parámetros son utilizados para analizar el proceso de sincialización. En nuestro modelo, luego de incubar las células con 25uM de forskolina, se realizaron mediciones a las 48 horas de cultivo para determinar si

efectivamente las células BeWo se sincializaron. Para ello se analizó la expresión proteica de sincitina-1, principal proteína fusogénica, y se cuantificó los niveles de β - hCG como estimación bioquímica. Finalmente observamos por inmunocitoquímica la distribución de E-cadherina, proteína transmembrana que se encuentra involucrada en la unión célula-célula.

2.1. Cuantificación Proteica

En primer lugar se realizó la cuantificación proteica de las muestras que luego se utilizaron para western blot. Para ello se utilizó el método de Bradford. El resultado se muestra en la siguiente tabla.

Experimento	Muestra	Concentración proteica ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
#9	C	0,69
#9	C + Co	1,01
#9	C + F	1,12
#9	C + F + Co	1,05
#11	C	1,50
#11	C + Co	1,02
#11	C + F	1,46
#11	C + F + Co	1,08
#12	C	2,35
#12	Co	1,24
#12	C + F	2,10
#12	Co + F	1,50
#28	C	1,98
#28	C + F	2,44
#28	C (H/R)	2,24
#28	C + F (H/R)	2,65
#29	C	2,16
#29	C + F	2,94
#29	C (H/R)	1,84
#29	C + F (H/R)	2,65
#29	C + Co 75	1,34

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

#29	C + F + Co 50	2,70
#29	C + F + Co 75	2,39
#29	C + F + Co 100	1,83
#30	C	2,16
#30	C + F	2,78
#30	C (H/R)	2,75
#30	C + F (H/R)	2,48
#30	C + F + Co75	2,45

Tabla 4 : Resultados de la cuantificación proteica según el método de Bradford

2.2. Western Blot: Análisis de sincitina-1:

El análisis por western blot (Figura 9) demuestra un claro aumento de las dos subunidades de Sincitina-1 (50 kDa, 72 kDa), en particular de su subunidad catalítica (banda superior), al tratar las BeWo con 25 uM de forskolina. Este resultado demuestra de manera cualitativa el aumento del contenido proteico de Sincitina-1 al inducir la sincialización.

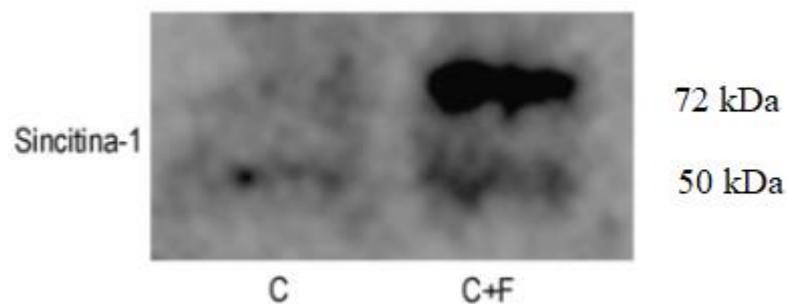


Figura 9: Análisis por WB del contenido proteico de sincitina 1: BeWo Control (citotrofoblasto) (C), BeWo incubadas con forskolina (sinciotrofoblasto) (C+F)

2.3. Cuantificación β -hCG

Otro parámetro que evaluamos para determinar una correcta sincialización fue la concentración de β -hCG liberada al medio, y se detectó un aumento entre citotrofoblasto y sinciotrofoblasto. El citotrofoblasto sintetizó una concentración de $(1,1 \pm 0,45)$ mUI/mL de β -hCG, mientras que el sinciotrofoblasto sintetizó una concentración de $(113,1 \pm 47,95)$ mUI/mL de dicha hormona.

Este resultado junto con el análisis de Sincitina-1 demuestran que el tratamiento con 25 μ M de Forskolina por 48 hs induce la sincialización de las células.

2.4. Inmunocitoquímica:

A fin de corroborar la sincialización, se realizó el ensayo de inmunocitoquímica para E-cadherina para las células BeWo Control y BeWo tratadas con Forskolina. Como indica la Figura 10, se logra visualizar la formación de sincicios, indicada por la pérdida de marca para E-cadherina, en las BeWo tratadas con Forskolina por 48 horas, lo cual indica una correcta fusión celular.

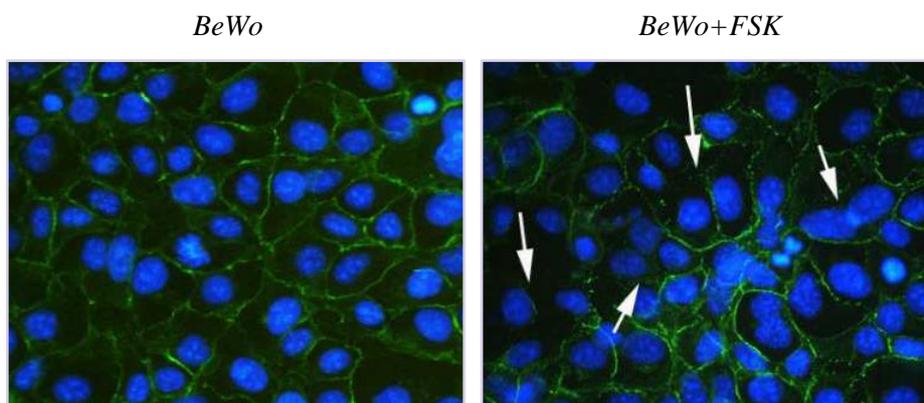


Figura 10: Inmunocitoquímica de E-cadherina en células BeWo. Las células fueron incubadas con medio ó suplementadas con Forskolina. Flechas blancas indican la formación de sincicios. Aumento x400

3. Análisis de la sincialización en Condiciones de Hipoxia/Reoxigenación

Con el fin de analizar el efecto de la hipoxia-reoxigenación sobre la sincialización del trofoblasto, se sometieron las células BeWo control y a las tratadas con Forskolina a condiciones de H/R de acuerdo al esquema señalado en Materiales y Métodos (Figura 6).

3.1. Ensayo de Viabilidad Celular:

En primer lugar se realizó un ensayo de MTT con el objetivo de determinar si la H/R alteró la viabilidad de las células.

La figura 11 muestra que la viabilidad de las células BeWo no se modifica bajo condiciones de H/R.

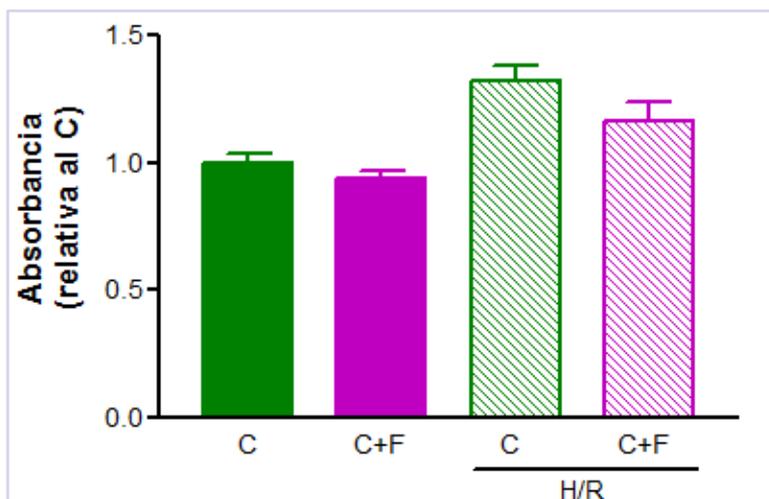


Figura 11: Ensayo de Viabilidad Celular para las muestras C, C+F en condiciones de normoxia e H/R.

3.2. Efecto de la H/R sobre la secreción de β -hCG:

Con el objetivo de analizar si la H/R afecta al proceso de sincialización, en primer lugar se cuantificó la concentración de β -hCG en el medio de cultivo.

La H/R no modifica la producción basal de β -hCG por el citotrofoblasto (BeWo control) (Figura 12). El CTB de por sí presenta escasos niveles de producción de β -hCG.

En cuanto al efecto sobre el STB, parámetro de relevancia, se puede observar en la Figura 12 que el tratamiento de las células a condiciones de H/R causa una disminución de los niveles de β -hCG, lo cual nuevamente indica que dicha injuria está generando un impacto sobre el proceso normal de sincialización.

En nuestro laboratorio previamente demostramos que el tratamiento con CoCl_2 altera la apoptosis y el recambio celular (Aban, C. et al., 2016). Por ello, a modo de control, incubamos células BeWo con diferentes concentraciones de CoCl_2 y demostramos que para todas las concentraciones ensayadas disminuye la producción de β -hCG, sugiriendo que el proceso de sincialización es sensible a los cambios en la tensión de oxígeno (Figura 13).

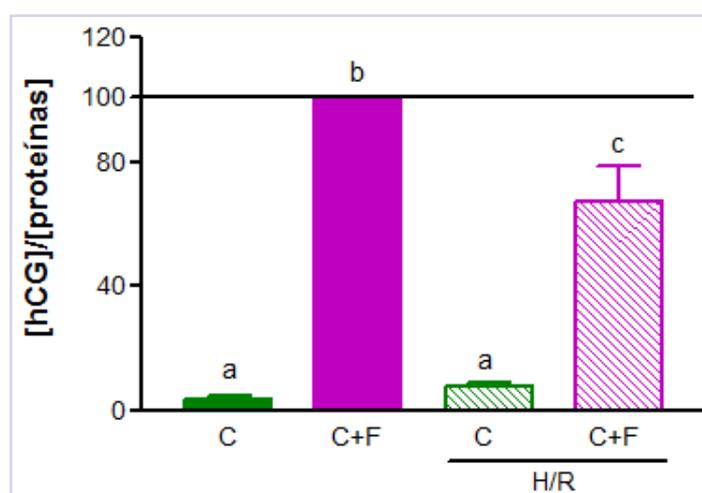


Figura 12: Cuantificación de la concentración de hCG medida como $[\text{hCG}]/[\text{proteínas}]$ para las muestras C, C+F en condiciones de normoxia e H/R. El resultado se muestra relativizado a la producción de hCG de las muestras C+F.

Los valores indicados para cada muestra, a, b, y c indican a qué grupo de datos tiende cada resultado, habiendo diferencias significativas entre cada letra. (Diferencia significativa, p -valor $<0,05$)

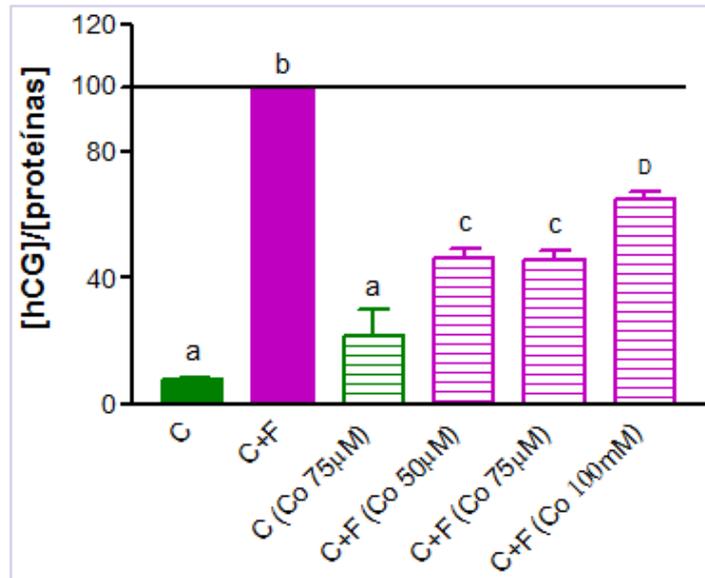


Figura 13: Cuantificación de la concentración de hCG, medida como $[hCG]/[proteínas]$ para las muestras C, C+F, C (Co 75 uM), C+F (Co 50 uM), C+F (Co 75 uM), C+F (Co 100 mM). El resultado se muestra relativizado a la producción de hCG de las muestras C+F. Los valores indicados para cada muestra, a, b, c y d indican a qué grupo de datos tiende cada resultado, habiendo diferencias significativas entre cada letra. (Diferencia significativa, p -valor $<0,05$)

3.3. Análisis de caveolina-1:

Como se mencionó anteriormente, la expresión de caveolina-1 disminuye con la sincialización. Los resultados obtenidos en normoxia demuestran que disminuye la expresión proteica de Caveolina-1 cuando las células BeWo se diferencian a STB, evidenciado por un marca más tenue en las muestras C+F (Figura 14).

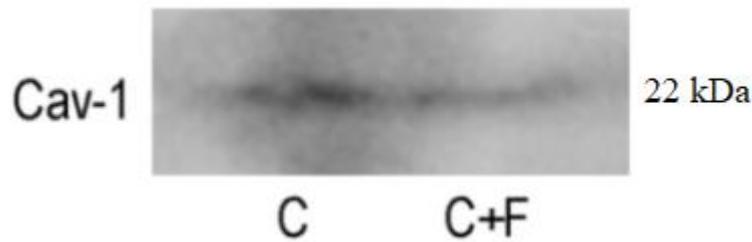


Figura 14: Análisis por WB del contenido proteico de Caveolina-1, para las muestras BeWo Control (citotrofoblasto; C) y BeWo incubadas con forskolina (sinciotrofoblasto; C+F).

En cambio, en las muestras correspondientes a C y C+F en condiciones de H/R se puede observar de manera cualitativa, que los niveles de Cav-1 no se ven disminuidos en las células BeWo tratadas con forskolina (C+F) (figura 15). Esto indica que el proceso de sincialización normal se ve alterado o desregulado por la H/R.

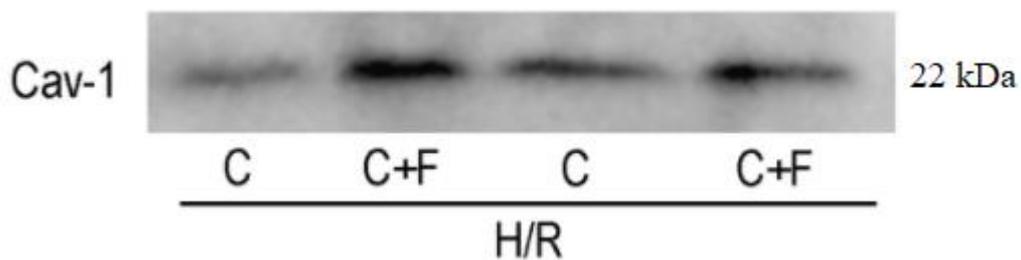


Figura 15: Análisis por WB del contenido proteico de Caveolina-1, para las muestras BeWo Control (Citotofoblasto) (C), BeWo incubadas con forskolina (sinciotrofoblasto) (C+F), en condiciones de H/R.

3.4. Análisis de Aromatasa-1:

La enzima aromatasa-1 es otra proteína cuya expresión se modifica con la sincialización. No se logró una efectiva visualización de Aromatasa-1 (58 kDa), debido a una posible falla en el anticuerpo primario. Se ven manchas difusas que se atribuyen a la técnica misma, no a bandas de proteína (Figura 16).

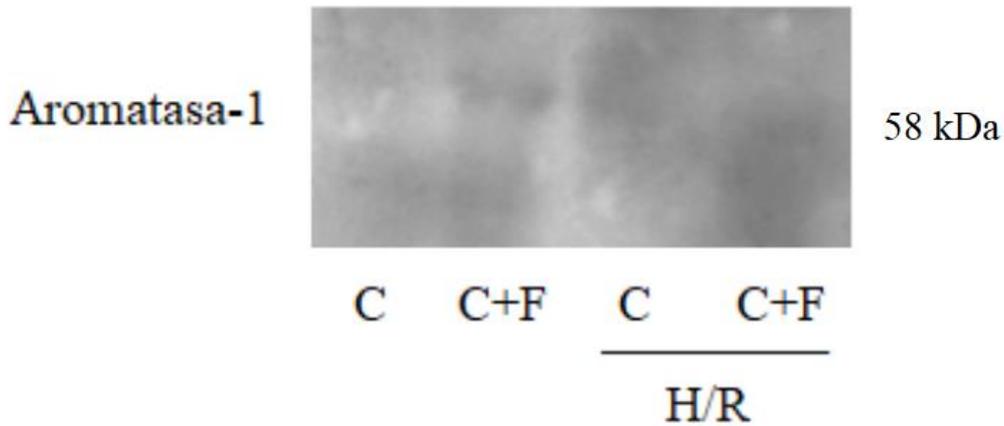


Figura 16: Análisis por WB del contenido proteico de Aromatasa-1

3.5. Análisis de la expresión de GCM-1 por qPCR

GCM-1 es el factor de transcripción que promueve la fusión del trofoblasto, al regular la expresión de proteínas fusogénicas de manera positiva, tales como Sincitina-1. Con el objetivo de analizar si su expresión se altera en condiciones de H/R, se midieron los niveles de ARNm mediante PCR en tiempo real.

Podemos observar que, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas con respecto al tratamiento con forskolina, la expresión de GCM-1 disminuye tendiendo nuevamente a los valores obtenidos para el CTB, sugiriendo estos resultados que la H/R desregula la expresión de este importante factor de transcripción (Figura 17).

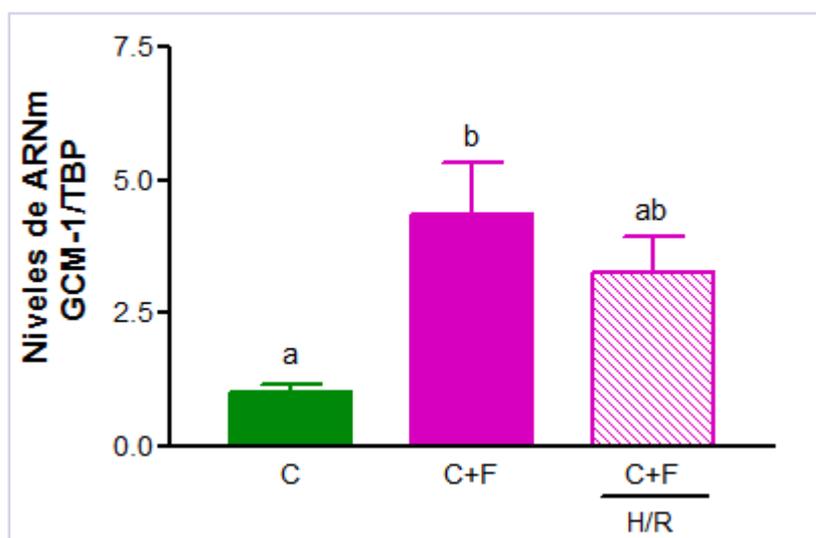


Figura 17: Cuantificación de los niveles de expresión de GCM-1. La indicación de valores ab indican que los datos tienden a los obtenidos en la categoría a. (Diferencia significativa, p -valor $< 0,05$)

4. Análisis de ácidos grasos:

Como se detalló previamente, los lípidos presentan una función estructural fundamental en las membranas celulares y mitocondriales del feto, además de su gran aporte fisiológico en una amplia variedad de funciones vitales, entre ellas la protección contra ROS. La composición, estructura y función de las bicapas lipídicas, compuestas por AG, se modifican durante la gestación, por ello es de nuestro interés analizar el posible impacto de las condiciones de H/R sobre la composición de AG en el proceso de sincialización del CTB.

En la tabla que se presenta a continuación se detalla el contenido de ácidos grasos totales de células BeWo control y tratadas con Forskolina, en condiciones de normoxia e H/R (Tabla 5).

Luego de varias determinaciones se pudieron identificar y cuantificar (mediante cromatografía G-L) 15 ácidos grasos distintos, tanto saturados como insaturados,

siendo mayoritarios los AGs:

- 16:0 (Ácido palmítico)
- 18:0 (Ácido esteárico)
- 18:1 (Ácido Oleico, OA)

Es relevante destacar que surgió la necesidad de una puesta a punto, dado que en los primeros ensayos realizados se lograron detectar sólo los ácidos grasos mayoritarios. Cuando se aumentó el número de células y se optimizó el procedimiento utilizado, se pudieron detectar ácidos grasos minoritarios en contenido, pero de gran relevancia en las funciones celulares:

- 18:3
- 20:4 (AA) (ácido araquidónico)
- 20:5 (EPA) (ácido eicosapentaenoico)
- 22:6 (DHA) (ácido docosahexaenoico)

En cuanto a los cambios observados entre CTB y STB, se ven aumentados significativamente en STB el AA y OA y disminuye considerablemente los niveles de EPA y DHA.

Cuando analizamos el efecto de la H/R sobre la composición lipídica de los principales AG no detectamos cambios significativos en la mayoría de ellos. Sin embargo, el AG que sí evidencia un cambio apreciable entre normoxia e H/R es el 20:2 (Ácido eicosadienoico), perteneciente a la familia del AA.

Es relevante aclarar que las determinaciones de los ácidos minoritarios debe ser repetida para confirmar el efecto de la H/R sobre el contenido de estos AGs en la membrana del trofoblasto.

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

	C	C+F	C (H/R)	C+ F (H/R)
Ácido graso	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje	Porcentaje
16:0	23,57	20,47	21,13	20,16
16:1 n9	4,92	4,16	3,78	4,87
16:1 n7	2,23	2,45	1,53	2,17
18:0	13,24	12,98	12,22	12,59
18:1 n9	23,99	32,26	21,07	34,82
18:1 n7	2,41	3,03	2,36	3,41
18:2	1,90	1,32	1,53	1,52
18:3 n3	3,78	3,24	4,74	3,33
20:0	4,77	3,81	5,40	3,52
20:2	5,24	4,96	5,94	2,39
20:4	1,35	1,99	1,21	1,96
20:5 n3	3,97	2,97	9,13	2,88
22:0	3,91	2,77	4,47	2,95
22:5 n6	2,52	2,10	3,14	1,90
22:6 n3	2,20	1,50	2,35	1,54
% de Omega 3:	11,30	9,7	17,4	9,7

Tabla 5: Contenido de AG totales en las muestras de C, C+F, C (H/R), y C+F (H/R). Se muestran resaltados los AG de mayor relevancia.

DISCUSIÓN

La placenta es un órgano especializado que a través de sus funciones vitales promueve la supervivencia y desarrollo normal del feto. La fisiología placentaria es dinámica, por lo cual a lo largo de la gestación los requerimientos cambian para sostener una correcta homeostasis. Un desequilibrio de este complejo proceso puede contribuir al desencadenamiento de patologías gestacionales como la preeclampsia (PE). Se ha reportado que las placentas de gestaciones preeclámpticas presentan una desregulación del proceso de sincialización, así como una alteración en el grado de proliferación y diferenciación del CTB, registrándose incrementos en los niveles de apoptosis (Langbein, M. et al., 2008). Aunque la etiología de la PE no ha sido establecida, esta patología se ha asociado a una deficiente placentación, con escasa remodelación de las arterias espiraladas uterinas (Roland, C.S., et al., 2016). La reducción del flujo arterial útero-placentario provoca episodios de perfusión irregular, generando hipoxia intermitente y reoxigenación, que finalmente contribuyen a la disfunción placentaria observada. Una alteración en la formación y regeneración sincitial durante la preñez podría afectar el crecimiento fetal y/o la progresión de la gestación, sin embargo aún no está claro el efecto de las fluctuaciones de tensión de oxígeno en el proceso de diferenciación de CTB a STB, células especializadas de la placenta.

Durante el embarazo, hay un proceso constante de renovación del STB, el cual es mantenido por los CTBs subyacentes. Las células de CTB se dividen asimétricamente para producir una célula hija que se diferencia y se fusiona con el sincitio, y otra que permanece en la agrupación de células progenitoras. Este delicado proceso es finamente regulado para que la estructura funcional de la placenta se mantenga hasta el término de la gestación.

Las lesiones de tipo isquemia-reperfusión representan la generación de un ambiente hipóxico, es decir de baja tensión de oxígeno, con el posterior reingreso de oxígeno al

tejido. Este tipo de lesión conlleva no sólo a daño tisular por especies reactivas de oxígeno, sino también a una modificación en los procesos celulares.

Como mencionamos anteriormente, investigamos el efecto de la H/R en el proceso de diferenciación del trofoblasto. Para ello, se puso a punto un modelo de diferenciación celular, a partir de células BeWo, y posteriormente se analizaron mediante distintos parámetros los efectos de las condiciones de H/R.

La forskolina es un diterpeno producido por la planta *Coleus forskohlii* que activa la enzima adenilil ciclasa (AC) e incrementa los niveles intracelulares de AMPc. Debido a que las células BeWo no logran sincializar espontáneamente, se realizaron incubaciones con este inductor químico para que el CTB se diferencie en STB. Utilizando los distintos marcadores, previamente detallados, se verificó una efectiva sincialización, logrando así poner a punto un modelo de sincialización del citotrofoblasto.

En el presente trabajo demostramos que, bajo las condiciones de cultivo establecidas, las células BeWo sincializan dado que dos de los principales parámetros (expresión de la proteína fusogénica sincitina-1, e incremento en los niveles de β -hCG), mostraron aumentos significativos cuando las células fueron tratadas con forskolina.

La desaparición de la E-cadherina en las uniones celulares ha sido utilizada como indicador de la formación de sincitios (Coutifaris C., et al., 1991.). Para corroborar los resultados obtenidos realizamos ensayos de inmunocitoquímica para E-cadherina. En dicho ensayo se pueden visualizar la formación de sincitios entre las células, lo cual confirma un modelo de diferenciación celular efectivo.

Trabajos previos han demostrado que la condición de hipoxia induce numerosos cambios, siendo relevantes los daños que se producen a nivel de la fusión celular, la sincialización y la inducción de la apoptosis. Tanto en cultivos de citotrofoblasto aislados sometidos a hipoxia (Hardy, DB. et al., 2002) como en la línea celular BeWo, las bajas tensiones de oxígeno suprimen este proceso (Kudo, Y. et al., 2003). Sin embargo, aún no se ha explorado el efecto de la hipoxia intermitente (proceso que acompaña diversas situaciones patológicas) en la sincialización del trofoblasto.

Para el desarrollo del presente proyecto pusimos a punto un modelo en el cual realizamos dos eventos de hipoxia/reoxigenación durante el período de sincialización, con el fin de investigar si estos cambios en la tensión de oxígeno provocan modificaciones en el recambio celular del trofoblasto.

En primer lugar, mediante un ensayo de MTT, corroboramos que nuestro modelo no altera de manera significativa la viabilidad de las células. Analizamos entonces diferentes parámetros de sincialización, demostrando que varios de ellos se vieron alterados, y que los efectos fueron detectados principalmente sobre el STB. Detectamos una disminución significativa en la secreción de β -hCG, lo cual concuerda con una menor cantidad de sincicios formados en condiciones de H/R. Este resultado es acorde a lo informado por otros (Esterman, A. et al., 1996), quienes demostraron que en condiciones de hipoxia hay una marcada disminución de β -hCG. A modo de control, en el presente trabajo incubamos células BeWo con cloruro de cobalto, inductor de hipoxia química, demostrando que el sistema es sensible a los cambios en la tensión de oxígeno así como a la estabilización de HIF-1 α .

Dado que el proceso de sincialización implica un remodelado de membranas, al fusionarse las células es esperable observar una disminución en la expresión de cav-1, tal como lo detectamos en la figura 14. Sin embargo, cuando las células fueron sometidas a H/R la expresión de la misma no disminuye sino que se mantiene constante o aumenta, sugiriendo que esta injuria afecta el remodelado de las membranas.

Posteriormente analizamos la expresión de otra proteína que se expresa principalmente en el STB, la Aromatasa-1, crucial en el proceso de esteroidogénesis placentaria. En este caso no logramos detectar por western blot la expresión de la misma, lo cual nos deja a la espera de poder realizar nuevamente otros ensayos que nos permitan concluir qué ocurre con esta enzima en condiciones de H/R.

Por último investigamos en nuestro modelo de H/R la expresión de GCM-1, factor de transcripción que regula la expresión de la principal proteína fusogénica, sincitina-1.

Hasta el momento los resultados sobre la expresión de este factor de transcripción son controversiales. Algunos trabajos demuestran que cuando el trofoblasto aislado de placenta a término es cultivado en 1% O₂, se reducen los niveles de los transcritos de GCM-1 y Sincitina-1 y estas variaciones perturban el proceso de fusión celular (Wich, C. et al., 2009). Otros trabajos afirman que bajas tensiones de oxígeno no alteran la fusión del CTB (Depoix et al., 2013), o sugieren que los efectos son diferenciales dependiendo de si el modelo de estudio son explantos o células de citotrofoblasto aislado (McCaig, D. et al., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro modelo sugieren que los eventos de H/R disminuyen la expresión de este crucial factor de transcripción, aunque son necesarios experimentos adicionales en la línea celular BeWo para concluir el rol de la tensión de oxígeno sobre GCM-1. Los presentes hallazgos están en consonancia con los complejos efectos del oxígeno en función de las condiciones utilizadas.

Dado que el proceso de sincialización es un evento que implica la fusión de membranas celulares, es esperable un remodelado de la estructura y composición de dichas membranas. Es por ello que nuestro interés se focalizó también en analizar la composición fosfolipídica de las membranas, con el fin de estudiar las alteraciones producidas a nivel lipídico durante la diferenciación celular.

Para realizar el análisis sobre la composición de ácidos grasos (AG) de las muestras, se trabajó en conjunto con la Dra. Sabina Maté, especialista en lípidos del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Universidad Nacional de La Plata. Con la colaboración de la Dra. Maté se analizó la composición de AG totales obtenidos a partir de cultivos de CTB y de STB, tanto en condiciones de normoxia como en H/R.

En el análisis de AG realizado en este trabajo se observa un aumento en el porcentaje de AA y DHA con el proceso de sincialización. Se sabe que estos AG, sobre todo el 20:4 (AA), 20:5 (EPA) y el 22:6 (DHA), desempeñan funciones clave en el desarrollo y maduración del sistema nervioso del feto, por lo que la placenta cumple un rol fundamental en su captación selectiva desde la sangre materna hacia la sangre fetal.

En particular, el AA y el DHA ejercen sus funciones metabólicas formando parte de la estructura de los fosfolípidos de las membranas celulares, y por su alto grado de poliinsaturación, estos AGs le aportan gran fluidez a las membranas.

Es reconocido que el cerebro fetal contiene un 60% de su peso seco en lípidos; de ellos un 40% son AG poliinsaturados de cadena larga, y de éstos un 10% es AA y un 15% es DHA. El AG de mayor proporción en la retina es el DHA, que junto con el AA, suponen más del 45% del total de los de AG poliinsaturados. Por ello, una alteración en estos AGs durante el embarazo puede tener repercusiones importantes en la funcionalidad de éstos órganos.

En relación al efecto de la H/R sobre la composición lipídica, podemos decir que de manera global, no se observan grandes modificaciones en las proporciones de los AG analizados cuando las células son sometidas a H/R durante el proceso de sincialización. Sin embargo, es interesante destacar el efecto del mismo sobre el EPA en CTB, observamos un aumento de 2,2x en condiciones de H/R. Sin embargo, no se observa un cambio significativo en el STB. Éste aumento pronunciado podría llegar a atribuirse a alguna respuesta ante el estrés oxidativo, resultando en el aumento de este ácido graso en particular.

Es de especial relevancia destacar que se identificaron casos de mujeres que, transitando la semana 16-18 de gestación, presentaron elevados niveles de OA, PA y ácido linoleico, y estas mismas mujeres posteriormente desarrollaron PE (Lorentzen, et al., 1998). Por ende, la desregulación del metabolismo de los AG en la unidad fetoplacentaria podría ser un factor clave a analizar en diferentes patologías gestacionales.

Es importante destacar que en el presente trabajo de investigación se utiliza un modelo de H/R que simula posibles situaciones a las que puede estar sometido el trofoblasto durante la diferenciación celular. Sin embargo no se conocen cómo son *in vivo* los fenómenos de H/R en cuanto a su frecuencia y cambios en la tensión de oxígeno, por lo

que este modelo tiene sus limitaciones. Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en el presente trabajo y lo expuesto por otros investigadores pueden atribuirse no sólo a los cambios en la tensión de oxígeno simulados sino a las diferentes muestras utilizadas (explantos de placentas, trofoblastos de primer trimestre, trofoblastos de tercer trimestre o líneas celulares establecidas). Por esto, se considera importante estandarizar las condiciones experimentales adecuadas que permitan mimetizar el microambiente placentario de las distintas etapas de la gestación, con el fin de confirmar si los cambios en la tensión de oxígeno en el microambiente placentario tienen o no un efecto deletéreo sobre el proceso de sincialización.

La profundización de estos estudios permitirá conocer de manera efectiva el efecto de la H/R sobre el proceso de sincialización, permitiendo esclarecer las alteraciones ocurridas en diversas patologías que se relacionan con este evento, como la preeclampsia.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos concluir que:

- Las células BeWo demuestran ser un excelente modelo para el estudio de la sincialización.
- Se puede verificar la sincialización mediante el estudio de distintos parámetros.
- La sincialización modifica la composición lipídica de las membranas.
- Se observa que los eventos de H/R alteran el proceso de sincialización.

Todos los experimentos de la presente tesina se realizaron a lo largo de 2019 hasta marzo 2020 en donde comenzó la situación de la pandemia por COVID-19. La profundización del trabajo se vio acotada por dicha limitación, aún así las evidencias postuladas nos permiten sugerir que los eventos de H/R desregulan el proceso de sincialización, evento clave para el normal funcionamiento placentario.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Abán, C., Martínez, N., Carou, C., Albamonte, I., Toro A., Seyahian A., Franchi, A., Leguizamón, G., Trigubo, D., Damiano, A., Farina, M.. Endocannabinoids participate in placental apoptosis induced by hypoxia inducible factor-1. *Apoptosis* 21, 1094–1105 (2016).
2. Acevedo Gallegos, S. Espino y Sosa, S., Gallardo Gaona, JM., Velásquez Torres, B., Camargo Marín, L., Guzmán Huerta, ME. *La placenta humana: Revisión* (2008).
3. Alsat, E., Wyplosz, P., Malassiné, A., Guibourdenche, J., Porquet, D., Nessmann, C., Evain-Brion, D . Hypoxia imparis cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiology* (1996).
4. B.S. Holder, C.L. Tower, V.M. Abrahams, J.D. Aplina. Syncytin 1 in the human placenta. *Placenta* (2012).
5. Bensaad, K. Favaro, E., A Lewis, C., Peck, B., Lord, S., Collins, JM., Pinnick, KE., Wigfield, S. Buffa, FM., Li, JL., Zhang, Q., Wakelam, MJO. , Karpe, F., Schulze, A., Harris, AL. Fatty acid uptake and lipid storage induced by HIF-1 α contribute to cell growth and survival after hypoxia-reoxygenation. *Cell Rep.* 9, 349–365 (2014).
6. Berkane, N., Liere, P., Lefevre, G., Alfaidy, N., Abi Nahed, R., Vincent, J., Oudinet, JP, Pianos, A., Cambourg, A., Rozenberg, P., Galichon, P., Rousseau, A., Simon, T., Schumacher, M., Chabber-Buffer, N., Hertig, A. Abnormal steroidogenesis and aromatase activity in preeclampsia. *Placenta* (2018).
7. Bode, C. J., Jin, H., Rytting, E., Silverstein, PS., Young, AM., Audus, KL. *In Vitro Models for Studying Trophoblast Transcellular Transport. Methods Molecular Medicine* (2006).

8. Butler, T. M., Elustondo, P. A., Hannigan, G. E. & MacPhee, D. J. Integrin-linked kinase can facilitate syncytialization and hormonal differentiation of the human trophoblast-derived BeWo cell line. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, (2009).
9. Castro-Parodi, M., Marino, GI., Dietrich, V., Damiano, AE. Aquaporin-9 is expressed in villous trophoblast mitochondria. *International Federation of Placenta Associations; Latin America Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta. Placenta*, (2019).
10. Cervellati, F., Muresan, XM., Sticozzi, C., Gambari, R., Montagner, G., Forman, HJ., Torricelli C., Maioli, E., Valacchi, G. Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* (2014).
11. Coutifaris, C., Kao, LC., Sehdev, HM., Chin, U., Babalola, GO., Blaschuk, OW., Strauss, JF. E-cadherin expression during the differentiation of human trophoblasts. *Development* (1991).
12. Depoix, C., Barret, L. A., Hubinont, C. & Debieve, F. Viability of primary term cytotrophoblast cell culture in normoxia and hypoxia. *Mol. Hum. Reprod.* 19, (2013).
13. E. Jauniaux, Gulbis, B., Burton, GJ. The Human First Trimester Gestational Sac Limits Rather than Facilitates Oxygen Transfer to the Foetus - A Review. *Placenta* (2003).
14. Esterman, A., Finlay, TH., Dancis, J. The effect of hypoxia on herm trophoblast: Hormone synthesis and release. *Placenta* (1996).
15. Esther Molina Montes, M. *Ámbito Farmacéutico Ácidos Grasos esenciales Omega-3 y Omega-6, Papel en el Embarazo y la Lactancia.* vol. 29.
16. Fogarty, NME., Mayhew, TM., Ferguson-Smith, AC., Burton, GJ. A quantitative analysis of transcriptionally active syncytiotrophoblast nuclei across human gestation. *J. Anat.* 219 (2011).

17. Folch, J. Lees, M. Sloane Stanley, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* (1957).
18. Frendo, JL., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, JL., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M. Evain-Brion, D., Mallet, F. Direct Involvement of HERV-W Env Glycoprotein in Human Trophoblast Cell Fusion and Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 3566–3574 (2003).
19. G.J Burton, Woods, AW., Jauniaux, E., Kingdom, JCP. Rheological and Physiological Consequences of Conversion of the Maternal Spiral Arteries for Uteroplacental Blood Flow during Human Pregnancy. A Review. *Placenta* (2009).
20. Gauster, M., Moser, G., Orendi, K. & Huppertz, B. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta* 30, 49–54 (2009).
21. Genbacev O., Zhou, Y., Ludlow, JW., Fisher, SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* (1997).
22. Gerbaud, P. & Pidoux, G. Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta* vol. 36 S35–S42 (2015).
23. Gude, NM., Roberts, CT., Kalionis, B., King, RG. Growth and function of the normal human placenta. A Review. *Thromb Res.* (2004).
24. Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassiné, A. & Evain-Brion, D. Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica et Cytobiologica* vol. 47 (2009).
25. Hardy, DB., Yang, K. The Expression of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Is Induced during Trophoblast Differentiation: Effects of Hypoxia. *The Journal of Endocrinology & Differentiation: Effects of Hypoxia* (2002).

26. Hung, T. H., Skepper, J. N., Charnock-Jones, D. S. & Burton, G. J. Hypoxia-reoxygenation: A potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ. Res.* 90, 1274–1281 (2002).
27. Hung, T. H. & Burton, G. J. Hypoxia and reoxygenation: A possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 45 189–200 (2006).
28. Huppertz, B., Frank, HG, Reister, F., Kingdom, J., Korr, H., Kaufmann, P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Investigation* (1999).
29. Huppertz, B., Kadyrov, M., Kingdom, JCP. Apoptosis and its role in the trophoblast. A Review. *AM J Obstet Gynecology*. (2006).
30. Huppertz, B., Borges, M. Placenta trophoblast fusion. A Review, *Methods Molecular Biology* (2008).
31. Huppertz, B. Pregnancy complications (FGR, preeclampsia). in *Encyclopedia of Reproduction* 607–614. Elsevier (2018).
32. Hung, TH., Burton, GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. A Review. *Taiwan J Obstet Gynecology* (2006).
33. Jaffe, R., Jauniaux, E. & Hustin, J. Current Development Maternal circulation in the placenta Myth or reality? First-trimester human. (1997).
34. Kar, M., Ghosh, D. & Sengupta, J. Histochemical and morphological examination of proliferation and apoptosis in human first trimester villous trophoblast. *Hum. Reprod.* 22, 2814–2823 (2007).

35. Knerr, I., Schubert, SW, Wich, C., Amann, K., Aigner, T., Vogler, T., Jung, R., Dötsch, J., Rashcer, W., Hashemolhosseini, S. Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett.* (2005).
36. Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, TKJB, James, J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 76 3479–3496 (2019).
37. Kudo, Y., Boyd, CAR., Kimura, H., Cook, PR., Redman, CWG., Sargent, IL. Quantifying the syncytialisation of human placental trophoblast BeWo cells grown in vitro. *Biochim Biophys Acta.* (2003).
38. Kudo, Y., Boyd, CAR., Sargent, IL., Redman, CWG. Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia. *Biochim Biophys Acta.* (2003).
39. Langbein, M., Strick, R., Strissel, PL., Vogt, N., Parsch, H., Beckmann, MW., Schild, RL. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev.* (2008).
40. Levi, L., Castro-Parodi, M., Martínez, N., Piehl, LL., Rubín De Celis, E., Herlax, V., Mate, S., Farina, M., Damiano, AE. The unfavorable lipid environment reduced caveolin-1 expression in apical membranes from human preeclamptic placentas. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 2171–2180 (2016).
41. Linton, E. A., Rodriguez-Linares, B., Rashid-Doubell, F., Ferguson, D. J. P. & Redman, C. W. G. Caveolae and caveolin-1 in human term villous trophoblast. *Placenta* 24, 745–757 (2003).

42. Lorentzen, B., Henriksen, T. Plasma lipids and vascular dysfunction in preeclampsia. A Review. *Semin Reprod Endocrinology* (1998).
43. Lu, X., He, Y., Zhu, C., Wang, H., Chen, S., Lin, HY. Twist1 is involved in trophoblast syncytialization by regulating GCM1. *Placenta* 39, 45–54 (2016).
44. Lyden, PD., Zivin, JA. Hemorrhagic transformation after cerebral ischemia: mechanisms and incidence. A Review: *Cerebrovascular Brain Metabolism Review*. (1993)
45. McCaig, D., Lyall, F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants. *Hypertens Pregnancy* (2009).
46. Moser, G., Windsperger, K., Pollheimer, J., de Sousa Lopes, S. C. & Huppertz, B. Human trophoblast invasion: new and unexpected routes and functions. *Histochemistry and Cell Biology* vol. 150 361–370 (2018).
47. Mi, S., Lee, X., Veldman, GM., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, XY., Edouard, P., Howes, S., Keith, JC., McCoy, JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* (2000).
48. Morrison WR, Smith, LM. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride-Methanol. *J Lipid Res*. (1964).
49. Muller, F., Savey, L., Le Fiblec, B., Bussièrès, L., Colau, JC, Giraudet, P. Maternal serum human chorionic gonadotropin level at fifteen weeks is a predictor for preeclampsia. (1996).
50. Newhouse, S. M., Davidge, S. T., Winkler-Lowen, B., Demianczuk, N. & Guilbert, L. J. In Vitro Differentiation of Villous Trophoblasts from Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Restriction With and Without Pre-Eclampsia. *Placenta* 28, 999–1003 (2007).

51. Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H. & Huppertz, B. The choriocarcinoma cell line BeWo: Syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction* 140, 759–766 (2010).
52. Perez-Sepúlveda, A., Monteiro, L.J., Dobierzexska, A., España-Perrot, P.P., Venegas-Araneda, P., Guzmán-Rojas, A.M., González, M.I., Palominos-River, M., Irarrazabal, C.E., Figueroa-Diesel, H., Varas-Godoy, M., Illanes, S.E. Placental Aromatase Is Deficient in Placental Ischemia and Preeclampsia. *PLoS One* (2015).
53. Pogozykh, O., Prokopyuk, V., Figueiredo, C., Pogozykh, D. Placenta and Placental Derivatives in Regenerative Therapies: Experimental Studies, History, and Prospects. *Stem Cells International* vol. 2018 (2018).
54. Robins, J.C., Heizer, A., Hardiman, A., Hubert, M., Handwerger, S. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells. *Placenta* (2007).
55. Rothbauer, M., Patel, N., Gondola, H., Siwetz, M., Huppertz, B., Ertl, P. A comparative study of five physiological key parameters between four different human trophoblast-derived cell lines. *Sci. Rep.* 7, (2017).
56. Sagrillo-Fagundes, L. et al. Human Primary Trophoblast Cell Culture Model to Study the Protective Effects of Melatonin Against Hypoxia/reoxygenation-induced Disruption. *J. Vis. Exp.* (2016).
57. Wagner Grau, P.. HIF-1 factor induced by hypoxia and oxygen sensitivity. Role of intracellular iron. (2011).
58. Wich, C., Kausler, S., Dotsch, J., Rascher, W., Knerr, I. Syncytin-q and glial cells missing a: hypoxia-induced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts. *Gynecol Obstet Investigation* (2009).

59. Y Zhou, Fisher, SJ, Janatpur, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M., Damsky, CH. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion (1997).
60. Yang, M., Lei, ZM., Rao, CV. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144, 1108–1120 (2003).