IMPLICACIONES DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO II (IGF-II) EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD TROFOBLASTICA GESTACIONAL

RICARDO JULIAN CABEZAS PEREZ

Trabajo de grado presentado para optar al título de

Maestría en Ciencias-Bioquímica

Dirigido por

MYRIAM SANCHEZ DE GOMEZ
Profesora Titular Departamento de Química
Grupo de Investigación en Hormonas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

Bogotá, Enero de 2010

TABLA DE CONTENIDO

	Resumen	
	Introducción	1
1.	Marco Teórico	2
1.1	El trofoblasto	2
1.2	Enfermedad trofoblástica gestacional	4
1.3	Factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs)	6
1.4	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo II (IGF-II)	8
1.5	Receptor IGF-II/M6P	8
1.6	Expresión de los Factores de Crecimiento Similares a la Insulina en tejidos trofoblásticos	9
1.7	Vías de señalización del receptor IGF-IR	11
1.8	Hormona Gonadotropina Coriónica (hCG)	12
1.9	Receptor de la Gonadotropina Coriónica/ Hormona Luteinizante (LH/CGR)	14
2	Hipótesis	16
3	Objetivos	16
3.1	Objetivo General	16
3.2	Objetivos específicos	16
4.	Metodología	17
4.1	Línea celular HTR-8/SVneo	17
4.2.	Determinación de la expresión genética de IGF-II, IGF-IIR y hCG	17
4.2.1	Extracción de ARN total	17
4.2.2	Síntesis de ADN complementario por transcripción reversa	18
4.2.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
4.3	Ensayos de proliferación celular	20
4.4	Ensayos de adhesión celular	21
4.5	Ensayo de migración celular	21
4.6	Ensayo de invasión celular	22
4.7	Ensayos de RNA Interferente	22
4.8	Determinación de los niveles de AMPc	23
4.9	Análisis estadístico	23
5	Resultados	24
5.1	Expresión de genes por RT-PCR en la línea HTR-8/SVneo	24
5.2	Ensayos funcionales	27
5.2.1	Ensayos de proliferación celular	27
5.2.2	Ensayos de adhesión celular	31
5.2.3	Ensayo de migración celular	35
5.2.4	Ensayo de invasión celular	37
5.3	Activación de la vía de la Adenilato Ciclasa	38
5.3.1	Activación de la vía de la Adenilato Ciclasa en células no silenciadas	38
5.3.2	Ensayos con RNA interferente contra el receptor IGF-IIR en la activación de la vía de la Adenilato Ciclasa	40
6	Discusión	42
7	Conclusiones	58
	Bibliografía	59
	Anexos	66

INDICE DE TABLAS

1	Niveles de IGF-I, IGF-II y hCG en embarazo normal y mola completa	11
2	Concentraciones Séricas de hCG en embarazo normal y en patologías	14
3	Mezcla de la reacción de transcripción reversa	18
4	Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR convencional	19
5	Condiciones para la reacción por PCR	19
6	Condiciones de amplificación de los genes evaluados por PCR convencional	26

INDICE DE FIGURAS

1	Proceso de implantación trofoblástica	3
2	Sistema IGF, ligandos y receptores.	7
3	Vía de señalización de la gonadotropina coriónica	15
4	Verificación de la integridad del RNA en la línea celular HTR8/SVneo	24
5	Electroforesis de los productos de amplificación por PCR convencional de hCG	25
6	Electroforesis de los productos de amplificación por PCR convencional de igf2r e igf2	26
7	Efecto de la hCG sobre la proliferación celular de HTR-8	28
8	Efecto de los IGFs sobre la proliferación celular de HTR-8	29
9	Efectos combinados del IGF-I y hCG sobre la proliferación celular de HTR-8	30
10	Efectos combinados del IGF-II y hCG sobre la proliferación celular de HTR-8	31
11	Efecto de la hCG sobre la adhesión celular de HTR-8	32
12	Efecto de los IGFs sobre la adhesión celular de HTR8	33
13	Efectos combinados de IGF-I y hCG sobre la adhesión celular de HTR-8	34
14	Efectos combinados de IGF-II e INS con hCG sobre la adhesión celular de HTR-8	35
15	Ensayo de migración celular	36
16	Ensayo de invasión celular	37
17	Efectos de los IGFs y la hCG en la producción de AMPc	39
18	Efecto del silenciamiento de IGF-IIR sobre los niveles de AMPc en células HTR-8	41
19	Transactivación de receptores acoplados a proteínas G a inducidos por la unión del IGF-2 a su receptor	56

INDICE DE ANEXOS

1	Extracción de ARN total y evaluación de la calidad	66
2	Cuantificación de niveles de AMP cíclico	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CT	Citotrofoblasto
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
ERK	Proteina quinasa de regulación extracelular
ETG	Enfermedad trofoblástica gestacional
EVT	Trofoblasto extravelloso
FAK	quinasa de adhesión focal
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona del crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
hCG	Hormona Gonadotropina coriónica humana
IGFBP	Proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina
IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-IR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II
IGF-IIR	Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
INS	Insulina
INS-Ra	Receptor de insulina isoforma alfa
INS-Rb	Receptor de insulina isoforma beta
LH	Hormona Luteinizante
LH/HCGR	Receptor de la Hormona Luteinizante/Gonadotropina coriónica
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MH	Mola hidatidiforme
PBS	Buffer fosfato salino
PI3K	Fosfatidil Inositol-3 quinasa
PKA	Proteína quinasa A
SBF	Suero fetal bovino
SHC	Proteína adaptadora
siRNA	ARN pequeño interferente
shRNA	ARN de horquilla corta
ST	Sincitiotrofoblasto
TGF- β	Factor de crecimiento transformante
TI	Trofoblasto intermedio
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSH	Hormona estimulante de la tiroides

RESUMEN

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG), comprende un conjunto de patologías que comprometen severamente la capacidad reproductiva de la mujer. Dentro de éstas se incluyen enfermedades como la mola completa, la mola parcial o incompleta, la mola invasiva y el coriocarcinoma. La mola hidatidiforme y el coriocarcinoma, constituyen un importante problema de salud pública en Colombia con una incidencia de 3.75 casos de mola por cada 1000 embarazos, de los cuales entre 10 % a 20% se transforman en coriocarcinoma. En estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación, se estableció que niveles séricos elevados de la hormona gonadotropina coriónica (hCG) se presentan durante esta enfermedad en comparación con casos de embarazos normales. Igualmente los niveles séricos de IGF-II en mola completa presentan un incremento inusual respecto a placentas no molares, lo cual sugiere una correlación entre ambas hormonas en el desarrollo de esta patología.

En este trabajo se evaluaron los posibles efectos compartidos por la hCG y el IGF-II en procesos de proliferación, adhesión, migración e invasión trofoblásticas, cuya desregulación caracteriza a la ETG. Se utilizó como modelo de estudio, la línea celular HTR-8/SVneo de trofoblasto extravelloso de primer trimestre. Inicialmente se determinó la expresión de genes del sistema IGF y de la hCG y su receptor, por medio de PCR convencional, corroborando su presencia en la línea celular de estudio. Por otra parte, se evaluaron los efectos sobre la proliferación empleando ensayos MTT y utilizando estímulos con IGF-I (10 nM), IGF-II (10 nM), Insulina (10 nM), hCG (50, 5000, 50000 mUI/ml) y combinaciones de las mismas. Estos resultados mostraron que la hCG estimula la proliferación de manera dosis dependiente tal como se esperaría ver en patologías trofoblásticas de la ETG. Igualmente tanto el IGF-I como el IGF-II incrementaron la proliferación celular y no se encontró evidencia de efectos aditivos con hGC. También se encontró que tanto IGF-I como IGF-II y hCG, estimulan la migración celular, la cual se ve incrementada en presencia de los ligandos IGF-II y hCG. La hCG, en combinación con el IGF-II estimula la migración y potencia los efectos a nivel de la invasión en esta línea celular.

Con el fin de establecer si las vías de señalización activadas por IGF-II y hCG presentan interacción evaluada mediante el empleo de intermediarios comunes, se examinó la producción de AMP cíclico en células control y en células silenciadas contra el receptor IGF-IIR mediante

RNA interferente. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de AMPc en las células que no expresaban IGF-IIR, lo cual no ha sido reportado previamente y sugiere la existencia de interacciones entre los efectos de IGF-II y hCG en células trofoblásticas.

En conclusión nuestros resultados demuestran la interacción entre las vías de señalización activadas por el sistema IGF y la hGC en células trofoblásticas, lo que potencia los efectos a nivel de proliferación e invasión de los mismos, y podría ser un mecanismo molecular para la progresión de la Enfermedad Trofoblástica Gestacional.

INTRODUCCION

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG), es un conjunto de patologías que comprometen severamente la capacidad reproductiva de la mujer. Dentro de estas, se incluyen enfermedades como la mola completa, la mola parcial o incompleta, la mola invasiva y el coriocarcinoma.

La mola hidatidiforme y el coriocarcinoma, constituyen un importante problema de salud pública en Colombia con una incidencia de 3.73 casos de mola por cada 1000 embarazos de los cuales entre 10% a 20% se transforman en coriocarcinoma. A pesar de la importancia que la mola hidatidiforme posee en nuestro país, son muy pocos los estudios que han abordado las razones de su origen, sus factores de riesgo y su incidencia en el medio colombiano. En un estudio reciente se mostró que la mayoría de las mujeres afectadas pertenecen a estratos socioeconómicos bajos, con un alto porcentaje de adolescentes, lo que hace más vulnerable a esta población [1] .

Actualmente el diagnóstico de estas patologías, se realiza por la medición en suero de la hormona gonadotropina coriónica (hCG), fácilmente confundible con abortos causados por razones diferentes y de menor gravedad para la salud reproductiva de la mujer. Resulta por lo tanto de gran importancia, la evaluación de los distintos factores hormonales implicados en la patogénesis de la mola, especialmente aquellos que podrían ser candidatos para el desarrollo de un diagnóstico temprano de la enfermedad.

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) son importantes reguladores del crecimiento y desarrollo de muchos tejidos incluida la placenta. Investigaciones previas realizadas en nuestro grupo de investigación han demostrado la existencia de alteraciones en el sistema IGF en mola hidatidiforme y coriocarcinoma. Con este trabajo se pretende establecer el papel del IGF-II en la regulación de las propiedades invasivas del trofoblasto y su relación con la gonadotropina coriónica, mediante el análisis de las interacciones entre las vías de señalización activadas por estos factores hormonales, como un aporte a los mecanismos biológicos que regulan la ETG.

1. MARCO TEORICO

1.1 El trofoblasto

Al iniciarse la implantación blastocística, se producen rápidas transformaciones en la interface compartida por la placenta materna y el blastocisto implantado, las cuales son vitales para la supervivencia y desarrollo embrionarios. Inicialmente se producen dos linajes celulares a partir de la división de los blastómeros: las células trofectodérmicas epiteliales que formarán la placenta, y el embrioblasto que formará al embrión como tal. A partir del trofectodermo se originará el trofoblasto, que a su vez se diferenciará en 3 tipos celulares: El citotrofoblasto, el sincitiotrofoblasto y el trofoblasto intermedio [2-5] .

Las células del citotrofoblasto (CT), son células mononucleares con citoplasma bien definido y que están en constante mitosis diferenciándose en dos poblaciones: trofoblasto velloso y trofoblasto extravelloso. El sincitiotrofoblasto (ST) se diferencia a partir de células madre del CT que se fusionan luego de la expresión de numerosos factores como hormonas, citoquinas y niveles de oxígeno.

El ST consiste en células multinucleadas que no presentan mitosis y que están expuestas a la sangre materna y a los efectores del sistema inmune. Es una capa celular que rodea al feto y funciona como una membrana de diálisis que permite el intercambio bidireccional de moléculas que entran y salen de la circulación fetal. Por último el trofoblasto intermedio (TI), que forma una transición entre el sincitiotrofoblasto y el citotrofoblasto, se desprende de las vellosidades y reemplaza las células endoteliales de las arterias maternas que migran a la placenta [6].

La función más importante del trofoblasto es establecer y mantener el sitio de implantación embrionario (Figura 1). Para esto se requiere invadir la vasculatura del endometrio materno permitiendo desarrollar la circulación materno-fetal, la cual depende de la sincronización entre las etapas de desarrollo del embrión y eventos moleculares y celulares mediados por reguladores paracrinos y endocrinos. Durante la primera semana de implantación, antes de la formación de las vellosidades, el ST invade el endometrio y pequeños capilares. Comienzan a aparecer lagunas aisladas en el citoplasma del ST que luego coalescen. Es en estas lagunas donde ocurre la absorción sanguínea, siendo luego el TI el encargado de rodear e invadir las arterias.

En este punto la función del trofoblasto es clave ya que ejerce una regulación directa e indirecta sobre la producción de progesterona, mediante la hormona gonadotropina coriónica (hCG). Igualmente el citotrofoblasto es al parecer el encargado de la producción de factores de crecimiento necesarios para mantener el comportamiento invasivo y proliferativo de estas células durante el proceso de implantación, entre los cuales se contaría, según estudios recientes al factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) [3, 7].

Es importante resaltar también las características compartidas por las células trofoblásticas y las células neoplásicas, tales como alta proliferación, ausencia de inhibición por contacto, alta invasividad, alta migración y capacidad de escapar a efectores del sistema inmune particularmente durante el primer trimestre de embarazo. Sin embargo las células trofoblásticas tienen estos procesos invasivos fuertemente regulados espacial y temporalmente [8].

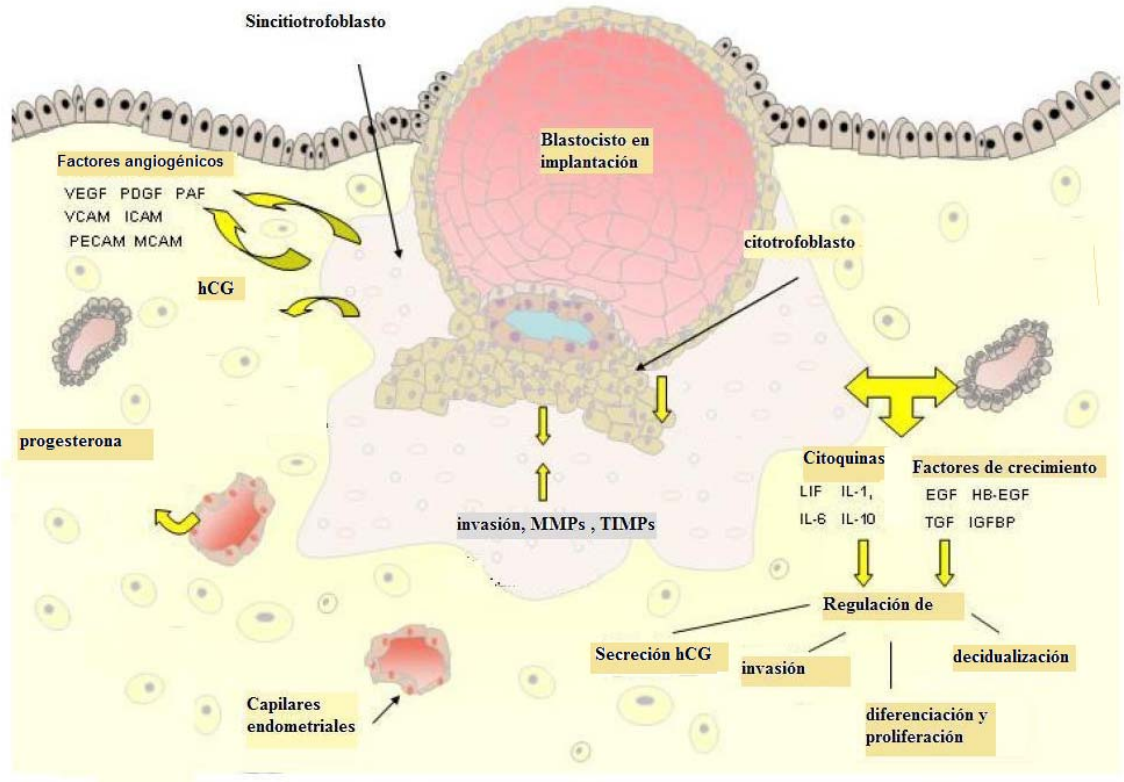


Figura 1. Proceso de implantación trofoblástica. Modificado de Staun-Ram and Shalev, 2005

1.2 Enfermedad trofoblástica gestacional

La invasión y proliferación inapropiadas del trofoblasto están implicadas en numerosas complicaciones del embarazo, tales como preeclampsia, tumores trofoblásticos, restricción del crecimiento uterino, y enfermedad trofoblástica gestacional (ETG). Se conoce con el nombre de ETG a un conjunto de procesos benignos y malignos poco habituales, derivados de una proliferación anormal de la placenta humana y de un proceso de fertilización con exceso de genoma paterno. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en conjunto con la Sociedad Internacional de Patología Ginecológica, incluye dentro de estas patologías a la mola hidatidiforme, mola invasiva, coriocarcinoma y tumor trofoblástico del sitio placentario. Se caracterizan por la transformación del tejido placentario en vesículas o quistes de diferente tamaño. Algunas de estas lesiones son neoplasias verdaderas y otras representan formaciones anormales de la placenta con predisposición a la transformación neoplásica del trofoblasto [9].

La mola hidatidiforme (MH) se caracteriza por una hiperplasia trofoblástica y tumefacción edematosa de las vellosidades coriónicas o tumefacción quística de las vellosidades placentarias, acompañada de una proliferación trofoblástica variable. Actualmente se reconoce que la mola puede subdividirse en mola completa y en mola parcial, sobre la base de su apariencia morfológica, sus características histopatológicas y el origen genético establecido a través de polimorfismos genéticos [6, 10].

Generalmente la mola hidatidiforme completa se presenta con vellosidades hidrópicas, hiperplasia del trofoblasto y ausencia de tejidos fetales. La mola completa surge por la fertilización de un óvulo vacío, generando un tejido diploide con dotación cromosómica de origen completamente paterno. La mola parcial posee vellosidades coriónicas de tamaño diverso, con tejidos fetales frecuentemente identificables; en su mayoría son triploides, con genoma de origen paterno y materno [11].

La mola hidatidiforme se presenta en aproximadamente 1 de cada 1000 embarazos en Europa y Estados Unidos, 0.5 por cada 1000 embarazos en Argentina, mientras en Colombia es de 3.73 casos por cada 1000 embarazos, desarrollándose coriocarcinoma en 10 a 20% de los pacientes con mola [1].

En la mola invasiva se produce la invasión del miometrio o de sus vasos sanguíneos por células del citotrofoblasto y del sincitiotrofoblasto. Morfológicamente este proceso se distingue por la persistencia de las vellosidades placentarias que no se observan en el coriocarcinoma ni en el tumor trofoblástico de sitio placentario [9].

En el coriocarcinoma, ocurre una proliferación atípica tanto del citotrofoblasto como del sincitiotrofoblasto sin presencia del estroma. Generalmente la lesión está formada por un área central de tejido necrótico, rodeada por un anillo periférico de tejido tumoral. Es uno de los tumores malignos más invasores con metástasis extensas, siendo frecuentes a nivel de pulmones (50%), vagina (30-40%), cerebro, hígado y riñones [12-13].

Las patologías anteriormente mencionadas se caracterizan por una secreción anormalmente elevada y prolongada de la hCG después del suceso gestacional, lo cual se ha utilizado como método diagnóstico de la enfermedad. Un contenido mayor a 100.000 UI/mL de hCG se utiliza como marcador diagnóstico de la mola hidatidiforme, aunque cantidades similares pueden corresponder a un embarazo normal o múltiple, por lo cual no debe ser usado como un factor determinante en el diagnóstico de MH. Este problema se agrava por el desconocimiento existente sobre la fisiopatología de la enfermedad, junto con la ausencia de técnicas que permitan un diagnóstico preciso, lo cual es fundamental en el manejo de la enfermedad [14].

En la actualidad, el diagnóstico de estas enfermedades se basa en criterios clínicos y de ultrasonografía corroborados por los altos niveles circulantes de hCG e histopatología. La experiencia ha mostrado que estos criterios son insuficientes y frecuentemente contradictorios, lo cual lleva a diagnósticos erróneos y tratamiento inadecuado, que dada la progresión de la enfermedad ponen en serio riesgo la vida de las pacientes. Se ha establecido, por ejemplo, que la concordancia entre patólogos en el diagnóstico de mola oscila entre el 55 y 75% [15].

Intentos por afinar el diagnóstico han llevado a utilizar otras herramientas, como citometría de flujo para determinar la ploidía del tejido molar, o técnicas de citogenética molecular como FISH (hibridación fluorescente *in situ*), lo cual no ha mejorado

sustancialmente la eficiencia diagnóstica, debido a la imposibilidad de establecer el origen parental mediante este método [16].

1.3 Factores de Crecimiento Similares a la Insulina (IGFs)

La familia de los IGFs está compuesta por el Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I y el tipo II (IGF-I e IGF-II), los cuales son importantes mitógenos que afectan el crecimiento, el metabolismo, la diferenciación celular y la expresión genética. Los IGFs interactúan con los receptores tipo I (IGF-IR), tipo II (IGF-IIR) y con el receptor de insulina (Figura 2). Adicionalmente pueden señalizar a través de receptores híbridos formados por la dimerización del receptor IGF-IR con las isoformas A o B del receptor de insulina. [17]

El principal receptor de la señalización celular inducida por los IGFs es IGF-IR, una glicoproteína transmembranal con actividad tirosina quinasa que posee mayor afinidad por el IGF-I que por el IGF-II [17-20] . Por su parte el IGF-IIR presenta un gran dominio extracelular sin actividad tirosina quinasa en su dominio intracelular. Se une con mayor afinidad al IGF-II que al IGF-I y al parecer su principal función es la regulación de los niveles séricos del IGF-II, pues no se conoce claramente si posee algún mecanismo de señalización intracelular. Este receptor no se une a la insulina pero sí actúa como un receptor de ligandos con manosa-6-fosfato, a los cuales internaliza y conduce hacia el lisosoma [21-22].

Otros componentes fundamentales del sistema IGF son las proteínas de unión o IGFBPs numeradas del 1 al 6, las cuales regulan la unión de los IGFs con sus receptores y que también poseen efectos biológicos independientes. Se ha propuesto que las IGFBPs modulan las acciones de los IGFs por distintos mecanismos, tales como el incremento de la vida media, su transporte y localización en tejidos específicos, y la modulación de su unión a los receptores de superficie [23-24].

Los receptores y ligandos del sistema IGF se expresan en numerosos tejidos donde juegan un papel importante en el desarrollo y crecimiento de los mismos. Por ejemplo, se ha demostrado que el eje formado por la hormona de crecimiento (GH) y el IGF-I es un componente esencial de la red inmunoendocrina, ya que tanto GH como IGF-I son sintetizados y secretados por varías células inmunocompetentes y sus receptores

específicos son expresados sobre dichas células. El eje GH/IGF-I también estimula la proliferación de células inmunocompentes y refuerza la función inmune celular y humoral [25].

Tanto el IGF-I como el IGF-II se requieren para el desarrollo normal del embrión y a lo largo de la vida adulta se encuentran en la circulación con niveles diferenciales para el IGF-I y el IGF-II. La fuente principal de IGF-I circulante en periodos postnatales es el hígado, pero también puede ser producido por otros tejidos, teniendo por lo tanto actividad tanto autocrina como paracrina. No existe en cambio un órgano principal de producción del IGF-II. Sus niveles se mantienen altos en adulto y su señalización se da principalmente a través del receptor IGF-IR [26-28].

Debido a su amplia distribución y a sus múltiples funciones, la desregulación del sistema IGF se encuentra asociada con problemas en el desarrollo y crecimiento neonatal, desarrollo y funcionamiento del sistema inmune y procesos implicados en la progresión y desarrollo de tumores malignos. Incrementos en la expresión de IGF-I, IGF-II o IGF-IR se han documentado en enfermedades como glioblastomas, neuroblastomas, meningiomas, meduloblastomas, carcinomas de seno, ovario, colorectal y cáncer pulmonar [19-20, 29]

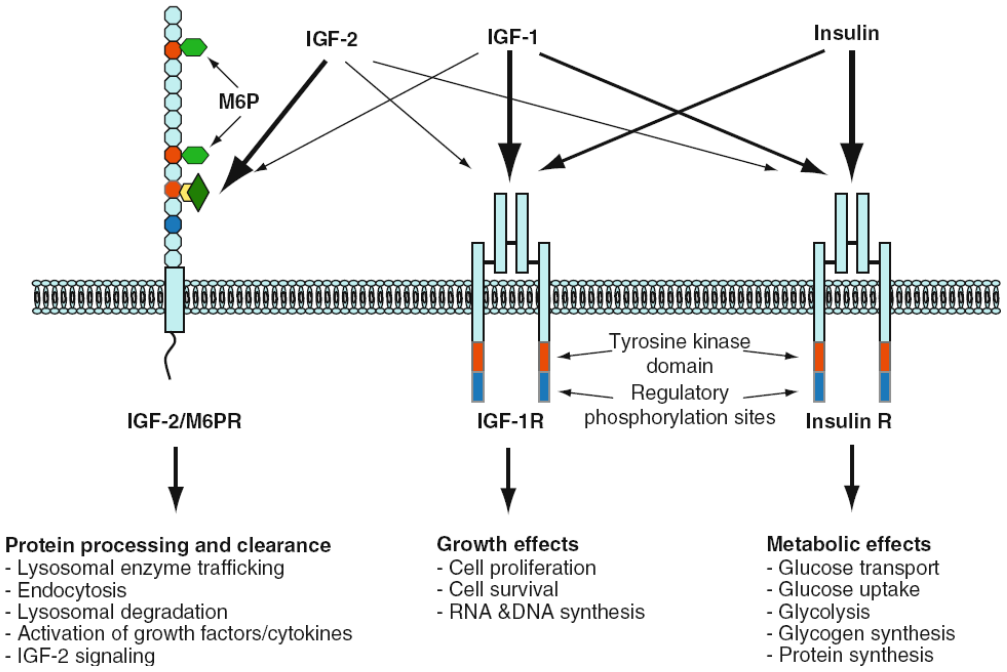


Figura 2. Sistema IGF, ligandos y receptores. Tomado de Begley *et al.* 2009.

1.4 Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo II (IGF-II)

El IGF-II es un polipéptido de 67 aminoácidos, con fuerte homología estructural y funcional con el IGF-I y la insulina. Consta de 4 dominios A, B, C y D y tiene un peso de 7.5 kDa. Su gen igf2, se encuentra ubicado en un cluster del cromosoma 11 (cluster 11p15) junto con otros genes y regiones genéticas que no codifican para proteína. Este gen se encuentra sujeto a improntación genética paterna, es decir su expresión sólo se da desde el alelo paterno y no desde el materno. En tumores y anomalías trofoblásticas como mola hidatidiforme, coriocarcinoma y otras, se ha visto que se produce la pérdida de la improntación genética expresándose el IGF-II desde ambos alelos [30-32].

El IGF-II predomina durante el desarrollo embrionario y fetal estimulando la proliferación y diferenciación celular. Los niveles de ARNm de IGF-II y IGF-II circulante en tejidos fetales de muchas especies estudiadas, han resultado ser significativamente elevados en comparación con los de tejidos postnatales. Después del nacimiento, la función del IGF-II es gradualmente reemplazada por el IGF-I, si bien se encuentra altamente expresado en tumores y en tejidos de adultos normales [33].

Entre los múltiples roles que posee el IGF-II, se ha visto que promueve la migración celular y regula el crecimiento fetal y placentario, mientras que su desregulación puede causar tanto retardo de crecimiento como crecimiento fetal excesivo. Por ejemplo, en ratones silenciados para el igf2 se produce retraso en crecimiento placentario y fetal. Igualmente, el IGF-II es un factor clave en la regulación de la inducción de la angiogénesis durante el embarazo, mediante la estimulación de la expresión del VEGF [34-38].

1.5 Receptor IGF-II/M6P

El receptor IGF-II/M6P también conocido como receptor de citoquinas CD222 es una proteína monomérica de 250 kDa codificado por un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 6 humano (6q26). Posee una afinidad 100 veces mayor por el IGF-II que por el IGF-I y la insulina. Estructuralmente contiene 15 repeticiones contiguas en su porción extracelular, cada una de ellas con un patrón similar de repeticiones de 8

cisteínas, una región transmembranal de 23 residuos y una porción citoplasmática corta. Esta región citoplasmática de 163-164 residuos no contiene dominio tirosina quinasa, pero sí algunos sitios potenciales de fosforilación, aunque sigue siendo controversial su actividad en la señalización intracelular [21-22, 39].

Este receptor está principalmente involucrado en el tráfico de enzimas lisosomales desde el complejo de Golgi hacia los lisosomas y en la internalización de enzimas lisosomales que han escapado de la célula, mientras que en la membrana celular sólo se encuentra un 10% de estos receptores. Otros ligandos de este receptor incluirían al TGF-B, al LIF, proliferina, tiroglobulina, granzimas A y B, CD26 y al ácido retinoico. El receptor se expresa en casi todos los tipos celulares y tejidos estudiados, si bien su nivel de expresión varía según el tejido en el que se exprese y dependiendo del estadio de desarrollo del individuo. El IGF-IIR ha sido denotado como un supresor tumoral por su actividad moduladora de los niveles locales de IGF-II, facilitar la activación del inhibidor de crecimiento TGF-β1 y regular el tráfico de enzimas lisosomales. Igualmente se ha sugerido que este receptor podría mediar otras funciones biológicas incluyendo el flujo de calcio en fibroblastos embrionarios de ratón, incremento en captación de aminoácidos en células musculares, síntesis de glicógeno en células de hepatoma, actividad aromatasa en citotrofoblastos entre otras, siendo desconocidas en su mayoría las vías de señalización activadas durante estos procesos biológicos [40-41].

1.6 Expresión de los Factores de Crecimiento Similares a la Insulina en tejidos trofoblásticos

Tanto el IGF-I como el IGF-II se encuentran en casi todos los tipos celulares de la placenta desde la sexta semana de gestación, y parecen estar involucrados en todos los aspectos de su desarrollo y función. Se ha demostrado que los IGFs están presentes en las vellosidades coriónicas placentales (citotrofoblasto, núcleo mesodérmico y endotelio) al igual que en las membranas fetales, amnión y corión, siendo el IGF-II más abundante en el trofoblasto. El IGF-II se produce aproximadamente desde la sexta semana del embarazo desde el trofoblasto extravelloso. No cruza la placenta hacia la circulación fetal pero puede regular el crecimiento placentario. Igualmente, podría estar relacionado con el proceso de invasión del trofoblasto extravelloso *in vitro*. [7, 34, 42].

Ambos factores incrementan la proliferación y supervivencia de fibroblastos placentares y pueden rescatar a los trofoblastos y a los fibroblastos placentares de la apoptosis. El IGF-I también es importante en la diferenciación del sincitiotrofoblasto o del trofoblasto extravelloso, sin conocerse funciones similares para el IGF-II, pero este último es importante en el intercambio de nutrientes, al incrementar el área superficial de la placenta. Muchos estudios reportan el incremento en suero de estos dos factores durante el embarazo al igual que el aumento de los niveles del ARNm del IGF-I y del IGF-II [43].

Respecto a las IGFBPs se ha encontrado que en la placenta humana no se expresa IGFBP-1 pero es la proteína de unión con mayor expresión en el endometrio decidualizado. El IGFBP-3 se expresa en grandes cantidades en el trofoblasto por el estroma velloso. El IGF-IR se localiza en todos los tipos celulares placentarios incluyendo el trofoblasto, el endotelio velloso y el núcleo mesenquimal, encontrándose también receptores híbridos con altas afinidades por el IGF-II. El receptor tipo II se expresa en la placenta en las membranas plasmáticas del trofoblasto, pero puede ser fragmentado resultando en la liberación de una forma soluble del receptor, el cual al unirse al IGF-II conduciría a su degradación, aunque en otros trabajos se ha mostrado su posible actividad en vías de señalización intracelular [44-45].

En trabajos anteriores del grupo de investigación se encontró que pacientes con mola completa a los cuales se les determinaron los niveles séricos de estos factores mediante radioinmunoanálisis, mostraban una tendencia a valores elevados de IGF-II durante el primer trimestre gestacional, en comparación con aborto no molar (1050 ng/ml y 986 ng/ml respectivamente). Estos valores también fueron correlacionados con niveles séricos elevados de hCG durante el primer trimestre de edad gestacional (Tabla 1). Estos datos sugieren que podría existir una interrelación entre los IGFs y la hCG en el desarrollo de la patología molar (ETG) [14].

Concentraciones	IGF-I (ng/ml)		IGF-II (ng/ml)		hCG promedio (mUI/ml)	
Población	Primer trimestre	Segundo trimestre	Primer trimestre	Segundo trimestre	Primer trimestre	Segundo trimestre
Aborto	204 ± 19	262± 18	986± 49	732±138	82.234	115.295
Mola Completa	214 ± 20	246± 57	1050± 63	1077± 77	542.706	493.586
Embarazo	343±20	312±7,2	756 ±9,7	818± 22	73.500	69.000

Tabla 1. Niveles de IGF-I, IGF-II y hCG en embarazo normal y mola completa. Tomado de Cantero, 2004

1.7 Vías de señalización del receptor IGF-IR

El receptor IGF-IR, es un receptor glicoproteíco transmembranal con actividad tirosina quinasa, formado por dos subunidades extracelulares α y dos subunidades transmembranales β, cada una de 90 kDa. Es similar al receptor de insulina, con el cual puede formar heterodímeros, donde una cadena del IGF-IR está conectada a una cadena InsR-a o InsR-b. El receptor IGF-IR es el producto de un único gen ubicado en el cromosoma 15q26, siendo un gen de más de 100 kB con 21 exones. Su organización genética es bastante similar a la del receptor de insulina. Su ARNm se detecta en etapas embrionarias abundantemente, siendo sus funciones antiapoptóticas y de supervivencia. Se encuentran grandes niveles del ARNm del IGF-IR en sistema nervioso central de rata. Niveles elevados se han visto asociados con cáncer de seno. La sobreexpresión del gen IGF-IR es un común denominador para cánceres humanos como próstata, seno, ovario, colón y rabdomiosarcoma [46-48].

Tanto el IGF-I como el IGF-II propagan sus señales intercelulares por unión al receptor IGF-IR, si bien el IGF-II se une con menor afinidad a este receptor que el IGF-I. Tras la unión del ligando a la subunidad alfa del receptor, se produce una autofosforilación de la porción citoplásmica de la subunidad beta del receptor y una fosforilación en tirosina de una serie de proteínas como las IRS-1 y -2 y la proteína SHC. Tanto la IRS-I como la proteína SHC inician varias cascadas de señalización, siendo las más importantes la PI3K/AKT, involucrada en procesos metabólicos de crecimiento celular y

antiapoptóticos, la vía MAPK, implicada en procesos de mitogénesis y diferenciación celular, y la vía de la FAK, relacionada con procesos de movilidad e invasión [18-19, 48].

Se ha sugerido que la interacción del IGF-II con el IGF-IR podría inducir migración celular de EVT, dependiente de las GTPasas monoméricas Rho, RhoA, RhoC y de la ROCK, las cuales juegan un papel clave en la remodelación del citoesqueleto de actina que conduce a la migración celular. También se estableció que existe una migración independiente de IGF-IR en la que no se requieren de estas proteínas. Los efectos de RhoA y RhoC como inducción de adhesiones focales y fibras de stress son mediados por ROCK que conducen a la fosforilación de la cadena liviana de miosina (MLC), y cambios en el citoesqueleto de actina que son necesarios para la migración celular [49].

1.8 Hormona Gonadotropina Coriónica (hCG)

La hCG es una glicoproteína perteneciente a la familia de la LH, FSH y TSH. Todas estas hormonas son heterodímeros que consisten de una subunidad alfa y una subunidad beta, unidas por enlaces disulfuro. La subunidad α de 92 aminoácidos y 14.5 kDa es común a todas estas glicoproteínas mientras que la subunidad β confiere la actividad biológica específica. Para la hCG, la subunidad β tiene una longitud de 145 aminoácidos y 22.2 kDa de peso. Varios de sus residuos sufren O- y N-glicosilación la cual presenta cambios en el embarazo y en estados de cáncer. Es importante señalar que existen diferentes formas metabólicas de la hCG, tales como la subunidad α libre, la subunidad β libre, la hCG fragmentada con ausencia del extremo C terminal de la subunidad β, y la hCG hiperglicosilada. Esta última contiene una mayor cantidad de oligosacáridos, es predominante en las primeras etapas del embarazo y en algunos cánceres trofoblásticos donde cumpliría una función relevante en los procesos invasivos [50-53].

La hCG es producida en las células placentarias principalmente en el sincitiotrofoblasto, desde el 6 día post-fecundación, siendo las células de citotrofoblasto extravelloso las únicas que producen la forma hiperglicosilada e invasiva de esta hormona [51, 54-55]. La síntesis de esta hormona está regulada por

varios factores independientes, incluyendo la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) , la leptina, las interleuquinas 1 y 6, el EGF, y el TNF- α [56].

El gen de la subunidad alfa se encuentra en el cromosoma 12 (12q21), mientras que la subunidad beta posee 6 genes ubicados en un cluster del cromosoma 19 (19q13.3), algunos de los cuales son expresados en tejidos trofoblásticos malignos [51, 57].

La hCG realiza su función mediante la unión a su receptor, el receptor LH/GC, y sus principales funciones son regular la producción de progesterona a partir del cuerpo lúteo en las primeras 8 semanas de gestación, además de inhibir a la LH y a la FSH durante el embarazo para impedir la ovulación. Otros efectos promovidos por esta hormona incluirían la producción de hormonas esteroides y factores de crecimiento en el cuerpo lúteo, la diferenciación del trofoblasto y decidualización, inhibición de la contractilidad miometrial, promoción de angiogénesis uterina, el control de la apoptosis en células granulosas y servir como marcador molecular en la diferenciación del citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto [58-60].

Durante el embarazo normal o patológico los niveles de la hCG se incrementan rápidamente comenzando pocos días después de la implantación y llegando a concentraciones máximas de 20000 a 100000 UI/l en las semanas 7-10 de embarazo, disminuyendo luego hasta niveles bajos en el término (Tabla 2). En procesos anormales como la mola hidatidiforme, se pueden detectar contenidos elevados de hCG (200000 a 1.000.000 UI/L), aunque cantidades similares pueden corresponder a un embarazo normal o múltiple, por lo cual no debe ser usado como un factor determinante en el diagnóstico de mola hidatidiforme [14].

Existe una correlación positiva entre los niveles de hCG y la invasión trofoblástica como se ha observado en embarazos ectópicos, indicando un posible efecto estimulatorio en la invasión trofoblástica. La hCG se ha encontrado que *in vitro* incrementa la invasividad de la línea trofoblástica de coriocarcinoma JEG-3. No se conoce claramente cómo esta hormona estimula la invasividad trofoblástica *in vivo*, pero sí se sabe que incrementa los niveles de la metaloproteasa MMP-9, un importante factor en la invasión trofoblástica. La hCG estimula igualmente otros factores uterinos como la expresión del gen COX-2, una enzima involucrada en la

biosíntesis de prostaglandinas, el factor de crecimiento vascular endotelial VEGF y el LIF (Factor inhibitorio de leucemia) [3, 61].

Semanas luego de último periodo menstrual	**Rango de concentraciones de hCG (mIU/ml)**
3	5-50
4	5-425
5	18-7.340
6	1.080-56.500
7-8	7.650-229.000
9-12	**25.700-229.000**
17-24	13.300 – 254.000
25-40	3.640 – 117.000
No embarazadas	<5.0
Postmenopáusicas	<9.5
Aborto	82.394
Mola completa	**189.000-1.306.091**

Tabla 2. Concentraciones Séricas de hCG en embarazo normal y en patologías. Modificado de Stenman et al. 2006

1.9 Receptor de la Gonadotropina Coriónica/ Hormona Luteinizante (LH/CGR)

Este receptor glicoproteico perteneciente a la familia de receptores acoplados a proteínas G, es utilizado tanto por la gonadotropina coriónica como por la hormona luteinizante (LH). Posee 3 dominios funcionales: un domino N terminal extracelular, el dominio de siete segmentos transmembranales con repeticiones de leucina y el extremo C terminal localizado intracelularmente. El receptor tiene un tamaño de 675 aminoácidos con un peso de 75 kDa antes de la unión de residuos glicosídicos, en su mayoría residuos de manosa. En su forma madura y glicosilada, alcanza un peso de 85 a 95 kDa. Este receptor presenta una amplia similaridad con los receptores de la FSH y de la TSH y es codificado por un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma 2, de 80 Kb, constituido por 10 intrones y 11 exones. La transcripción de este gen produce numerosas especies de ARNm en tejidos gonadales, con distintas

abundancias, pero al parecer muchos de ellos no codifican para una proteína [50, 62-64].

Inicialmente se creía que este receptor sólo se expresaba en células gonadales como células de Leydig y células tecales del ovario, pero ha aumentado la evidencia de su presencia en otros lugares del tracto reproductivo y en tejidos no gonadales, como en la corteza adrenal, útero, oviducto, cérvix, Trompas de Falopio, vesículas seminales, piel, glándulas mamarias y tiroides [65].

Tras la unión del receptor con su ligando en el dominio extracelular, se pueden activar varias vías de señalización pertenecientes a la vía de las proteínas G heterotriméricas, que a su vez activan a la enzima adenilato ciclasa y la vía mediada por la proteína quinasa A (PKA), que conducen a la expresión de distintos genes involucrados en el desarrollo gestacional (Figura 3). En células trofoblásticas SGHPL-5, la estimulación con hCG promueve la activación de ERK1 y 2 y de AKT. Datos recientes sugieren la posibilidad de dimerización e internalización del receptor para disminuir su activación por el ligando. Por su parte se ha sugerido que la forma hiperglicosilada de la hCG podría señalizar a través del receptor TGF-β para promover la invasión [53, 63, 66].

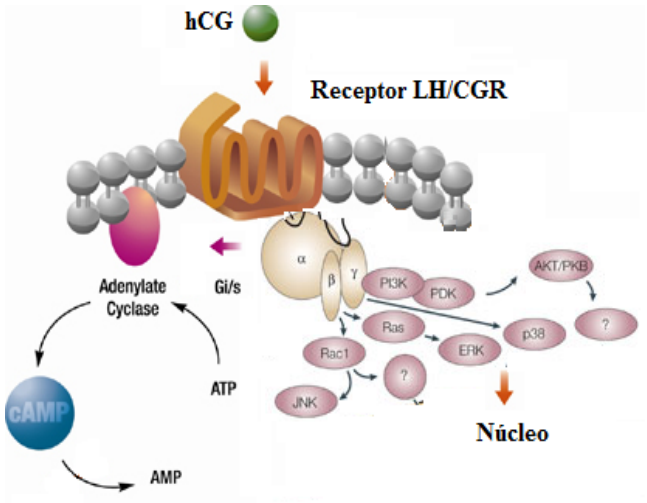


Figura 3. Vía de señalización de la gonadotropina coriónica. Modificado de Sodhi et al. 2004.

2. HIPOTESIS

Se ha establecido que la Enfermedad Trofoblástica Gestacional (ETG) está asociada con una producción elevada de hCG en comparación con un embarazo de la misma edad gestacional. Estudios previos han arrojado evidencias sobre la existencia de alteraciones del sistema IGF en mola hidatidiforme y coriocarcinoma, en particular, la sobreexpresión de IGF-II y del receptor IGF-IR. La hipótesis a probar en este estudio es si en células trofoblásticas existe una interacción entre las vías de señalización mediadas por IGF-II y hCG y si la sobreexpresión de IGF-II podría conducir al incremento en la proliferación e invasión trofoblásticas que caracterizan a la ETG.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Estudiar el papel del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) en el desarrollo de la Enfermedad Trofoblástica Gestacional.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar la expresión de hCG, IGF-II e IGF-IIR en cultivos celulares de la línea HTR-8/SVneo de trofoblasto extravelloso por medio de RT-PCR.

3.2.2 Determinar los efectos de la estimulación con hCG y los ligandos del sistema IGF en la proliferación, adhesión, migración e invasión celular en la línea trofoblástica HTR-8/SVneo

3.2.3 Evaluar la posible interacción entre las vías de señalización activadas por hCG e IGF-II mediante los cambios en los niveles de AMP cíclico (AMPc) en la línea celular HTR-8/SVneo.

3.2.4 Establecer el efecto del silenciamiento del receptor IGF-IIR en la secreción de AMPc en la línea celular HTR-8/SVneo.

4. METODOLOGIA

4.1 Línea celular HTR-8/SVneo

Se empleó la línea celular de citotrofoblato extravelloso HTR-8/SVneo proveniente de un cultivo de explante de placenta humana de primer trimestre e inmortalizada por transfección con un cDNA que codifica para el antígeno T del virus SV-40. Esta línea fue donada por la Dra. Angela Cadavid de la Universidad de Antioquia, se caracteriza por exhibir un alto índice de proliferación y ser altamente invasiva *in vitro*. Igualmente expresa IGF-II, hCG y otros con marcadores específicos del trofoblasto [67].

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbeco´s Eagle Medium, Sigma) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 1% aminoácidos esenciales, 50 µg /ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y 25 ng/ml de anfotericina. Las células se sembraron en cajas de Petri de 60 mm a una concentración de 10^6 células por caja. Se mantuvieron los cultivos celulares a 37 ^{0} C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%.

4.2 Determinación de la expresión genética de IGF-II, IGF-IIR y hCG

4.2.1 Extracción de ARN total

El ARN se extrajo utilizando el reactivo Trizol ® (Invitrogen, USA) el cual es una mezcla constituida por isotiocianato de guanidinio y fenol. En presencia de esta solución las células se lisan rápidamente, se solubilizan sus componentes y se inactivan las ribonucleasas presentes. Posteriormente se adicionó cloroformo, generándose una fase acuosa y una fase orgánica. De la fase acuosa se separó el ARN total por precipitación con isopropanol y se purificó luego en etanol al 75% (ver Anexo 1).

El ARN precipitado se resuspendió en un volumen de 100 µl de agua tratada con dietilpirocarbonato al 0,01% (DEPC), que inactiva las ribonucleasas remanentes. La cantidad de ARN total obtenido por muestra, se cuantificó de acuerdo con la relación de absorbancias a 260/280 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Se verificó la calidad de ARN visualizando las fracciones ribosomales mediante electroforesis en gel

de agarosa al 0,8% en buffer MOPS 20 mM, acetato de sodio 50 mM, EDTA 10 mM. La electroforesis se corrió a 75 V durante 30 minutos y se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (Br-Et) 1 µg/ml (ver Anexo 1). Los productos se observaron en transiluminador de luz ultravioleta.

4.2.2 Síntesis de ADN complementario por transcripción reversa

La síntesis de ADN complementario (ADNc), se hizo por retrotranscripción *in vitro,* partiendo de 5 µg de ARN total empleando el sistema de transcriptasa reversa (RT) Superscript III (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 3. El ADN complementario obtenido se refrigeró a 4^0C hasta su posterior análisis por PCR.

Reactivos	**Concentración**
ARN total	5 µg
Hexámeros al azar	12,5 ng/ µl
dNTPs	0,50 mM
Agua DEPC	Completar a volumen de 20 µl
Buffer de transcripción reversa	50 mMTris-HCl pH 8,3 75 mM KCl 3 mM $MgCl_2$
DTT	10 mM
SuperScript III RT	10 Unidades

Tabla 3. Mezcla de la reacción de transcripción reversa

4.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos correspondientes a IGF-II, IGF-IIR y hCG se realizó mediante el sistema de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando la enzima Taq Polimerasa (Invitrogen, USA) y con secuencias de iniciadores específicos para cada uno de los genes, los cuales fueron diseñados usando el programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu) con base en las secuencias reportadas en el GenBank del NCBI. Las secuencias de los iniciadores utilizados fueron (Tabla 4):

GEN	Iniciador derecho	Iniciador reverso	Tamaño amplímero
IGF-II	5´CGAGGCAGAGAGACACCAATGG -3	5´-TTGCGGGCCTGCTGAAGTAGA-3´	187 pb
IGF-IIR	5´GAGTAGAGAAGTGTCCGGATCGGAGTC-3´	5´-TCAACATCTGTGGAAGTGTG-3´	428 pb
hCG	5´-GCAGGGGACGCACCAAGGA -3′	5'-CACGCGGGTCATGGTGGG-3	540 pb
LH/HCGR	5´-AATGGGACGACACTGAC-3	5´- ATTAGCCTCTGAATGGACTC-3	165 pb

Tabla 4. Secuencias de iniciadores utilizados en la PCR convencional

Durante los experimentos realizados, se estandarizaron las condiciones de amplificación para la subunidad β del gen hcg, incluyendo las concentraciones de iniciadores, la temperatura de alineamiento (Ta), la concentración de $MgCl_2$ y el número de ciclos de amplificación.

Para el procedimiento de amplificación, la mezcla de reacción (Tabla 5) se desnaturalizó a 95^0C por 5 minutos, se llevaron a cabo 35 ciclos de amplificación, cada ciclo incluyó calentamiento a 95^0C por 45 segundos, alineamiento por 30 - 60 segundos con temperatura apropiada según las condiciones de los iniciadores para cada gen, calentamiento a 72 ^{0}C para asegurar la extensión de los fragmentos a amplificar y por último un calentamiento a 72 ^{0}C por 5 minutos para culminar la extensión.

Reactivos	Concentración Final
Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl) pH 8,3	1 X
$MgCl_2$	2 - 3 mM
Mezcla de dNTPs	0,2 mM
Iniciador Derecho	0,4 µM
Iniciador Reverso (nM)	0,4 µM
ADN complementario	2 ng/µl
Taq Polimerasa	1 U/µl

Tabla 5. Condiciones para la reacción por PCR

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE durante 45 minutos a 80 V. Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio (Br-Et) 1 ug/ml. Los productos se observaron en transiluminador de luz ultravioleta y las bandas obtenidas se analizaron por densitometría empleando el programa Quantity One V. 4.1.1

4.3 Ensayos de proliferación celular

La medida de proliferación/sobrevivencia, fue medida con el ensayo de celularidad usando el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), el cual se basa en la conversión de sales de tetrazolium (MTT) en un producto coloreado llamado formazán, realizado por las mitocondrias intactas de las células viables [68].

La metodología empleada fue la siguiente:

En una placa de ELISA se sembraron 10000 células por cada pozo, siendo deprivadas de medio con suero por 12- 24 horas antes del inicio del experimento. Luego se añadieron los estímulos ; (SFB 10% , IGF-I (100 ng/ ml), IGF-II (100 ng/ ml), INS (100 ng/ml) y HCG (50000 mU/ml), IGF-I , IGF-II e INS en combinación con dosis de HCG. Los platos fueron incubados durante 24 horas a 37ºC en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Se agregaron 10 µl del reactivo MTT (Bromuro de 3- (4,5-. dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a cada pozo de interés, durante 4 horas . Se removió el medio de los pozos con MTT y se agregaron 100 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) dejando incubar durante 15 minutos, para disolver los cristales de Formazan. En espectrofotómetro (Biorad 680 microplate reader) se midió la absorbancia a 570 nm y se eliminó el DMSO. Posteriormente se adicionaron 150 µl de PBS en cada pozo. Cada ensayo se realizó por triplicado.

4.4 Ensayos de adhesión celular

Para el ensayo de adhesión se sembraron 20000 células por pozo en una placa de ELISA para ser incubadas, junto con los estímulos correspondientes: SFB 10% , IGF-I (100 ng/ml), IGF-II (100 ng/ml, INS (100 ng/ml) y hCG (50000 mU/ml), IGF-I , IGF-II e INS en combinación con dosis de hCG. Las células se incubaron durante 1 o 2 horas a 37ºC en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Al final del período de incubación se retiraron las células que no se adhirieron y se lavaron los pozos con PBS. Se adicionaron 100 μl de cristal violeta en metanol 5% (Sigma Chemical, USA) dejando en incubación durante 15 minutos. Se extrajo el colorante cristal violeta evitando que las células se despegaran de los pozos. Luego las células se incubaron durante media hora en ácido acético al 10 % (100 µl) y se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Biorad 680 Microplate Reader) a 595 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado.

4.5 Ensayo de migración celular

Se incubaron las células durante 12 horas en medio libre de SFB, se despegaron utilizando una solución de tripsina/EDTA (tripsina 0.05%, EDTA 0.02%). Se depositaron aproximadamente 1 x 10^5 células en alícuotas de 0.2 ml en los pozos superiores de cámaras de Boyden con filtros de 8 µm. En el compartimiento inferior se colocaron los diferentes estímulos: SFB 10% ,IGF-I (100 ng/ml), IGF-II (100 ng/ ml), hCG (5000 mU/ml) e IGF-II (100 ng/ml) combinado con hCG (5000 mU/ml). Las células se incubaron por 12 horas a 37ºC en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Al final del período de incubación se removieron las células que no migraron y se lavaron las células que migraron con PBS dos veces. Estás células se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% por 30 minutos y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% en etanol por 30 minutos. Las células teñidas se trataron con 0.25 ml de una solución de ácido acético al 10% y la absorbancia del extracto coloreado se midió a 595 nm en espectrofotómetro (Biorad 680 Microplate Reader). Los filtros fueron examinados al microscopio contándose las células de 4 campos (200X), determinándose el promedio ± sem. Los resultados se presentan como el índice de migración con respecto al control (RPMI, 100%). Cada ensayo se realizó por duplicado.

4.6 Ensayo de invasión celular

Las células previamente al ensayo de invasión fueron incubadas durante 12 horas en medio libre de SFB, luego se despegaron utilizando una solución de tripsina EDTA (tripsina 0.05% y EDTA 0.02%). Se depositaron aproximadamente 1 x 10^5 células en alícuotas de 0.2 ml en los pozos superiores de los transwell recubiertos con matrigel en una concentración de 9 µg/µl. En el compartimiento inferior se colocaron los diferentes estímulos: IGF-I (100 ng/ml), IGF-II (100 ng/ ml), hCG (5000 mU/ml) e IGF-II + hCG (5000 mU/ml). Las células se incubaron por 24 horas a 37ºC en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%. Al final del período de incubación las células de la superficie del matrigel fueron completamente removidas con copos de algodón; las células que migraron fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% (Sigma Chemical, U.S.A) y teñidas usando una solución de cristal violeta en metanol 5% (Sigma Chemical, U.S.A). Las membranas fueron lavadas con PBS dos veces y cortadas de los transwells. El cristal violeta de las membranas fue disuelto en una solución de ácido acético al 10% y cuantificado mediante la lectura de su absorbancia a 595 nm. Cada experimento fue realizado por duplicado. Los resultados se reportan como el índice de invasión en comparación con el control (RPMI 100%).

4.7 Ensayos de RNA Interferente

Para determinar si el IGF-IIR tenía un papel como mediador de los efectos del IGF-II en células de trofoblasto, se utilizaron células de la línea HTR-8/SVneo establemente silenciada en el IGF-IIR, obtenidas dentro del grupo de Investigación en Hormonas por Andrés F. Vallejo Pulido (manuscrito en preparación). El silenciamiento de este receptor se llevó a cabo empleando un ¨pool¨ de plásmidos de transfección con shRNA diseñados para este fin (Santa Cruz Biotechnology), las células exitosamente transfectadas fueron seleccionadas empleando puromicina y el silenciamiento se verificó mediante PCR en tiempo real, dando como resultado una eficiencia del 83% en el silenciamiento. Adicionalmente, se empleó como control un plásmido con una secuencia no codificante para el receptor de interés.

4.8 Determinación de los niveles de AMP cíclico

La medición de AMPc intracelular se realizó utilizando un kit de ELISA (Amersham AMPc Biotrak 2251). El ensayo está basado en la competencia entre el AMPc no marcado y una cantidad fija de AMPc acoplado a peroxidasa, por la unión a un número limitado de sitios en un anticuerpo específico contra AMPc.

Las células sembradas (aproximadamente 1 x 10^4 por pozo) en un microplato de ELISA de 96 pozos, se deprivaron por 12 horas en medio libre de proteína y se adicionaron los diferentes estímulos mencionados anteriormente y se evaluaron los niveles a los 10 min de estimulación. Las células se lisaron con 200 µl de reactivo de lisis agitando por 10 min, se adicionaron 100 µl de antisuero y se dejó en incubación durante 2 h a una temperatura entre 3º- 5ºC. Al término de este período se adicionaron 50 µl de conjugado AMPc –Peroxidasa, con agitación y después de un tiempo de 1 hora de incubación a 4 ºC se lavó cada pozo 4 veces con 400 µl de buffer de lavado y se adicionaron 150 µl de sustrato enzimático dejando incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. El producto final coloreado se cuantificó por lectura espectrofotométrica a 630 nm (Biorad 680 Microplate Reader). La concentración de AMPc en las muestras se determinó por interpolación en una curva de calibración con los respectivos estándares. Las determinaciones se realizaron por duplicado (ver Anexo 2).

4.9 Análisis estadístico

Los datos de los resultados experimentales fueron evaluados mediante el test-T de Student utilizando el programa GraphPad Software Inc (San Diego, Ca). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Expresión de genes por RT-PCR en la línea HTR-8/SVneo

Inicialmente se extrajo ARN total de las células de trofoblasto de cultivos no estimulados (medio RPMI) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa. La figura 4 muestra el corrido electroforético de dos muestras de ARN total donde se pudo diferenciar las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S y que presentaron una relación de Abs 260/280 nm cercana a 1,8.

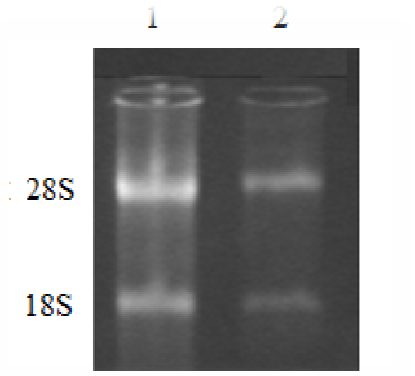


Figura 4. Verificación de la integridad del ARN total obtenido a partir de la línea celular HTR-8/ SVneo. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de dos extractos de ARN de células en cultivo.

Posteriormente se realizó la transcripción reversa para obtener el ADNc a partir del cual se realizaron las amplificaciones de los genes de interés. En trabajos previos en nuestro laboratorio se ha estudiado la expresión de algunos miembros del sistema IGF, como los ligandos IGF-I e IGF-II y los receptores IGF-IR e IGF-IIR. Empleando las condiciones estandarizadas previamente, en este trabajo se estudió la expresión de los genes antes mencionados en la línea celular HTR-8/SVneo y se evaluó por primera vez la expresión de la hormona gonadotropina coriónica subunidad ß. Se estandarizaron las condiciones de amplificación por PCR convencional, considerando la temperatura de alineamiento, concentración de iniciadores, concentración de $MgCl_2$ y número de ciclos de amplificación (Fig.5). Las condiciones finales se muestran en la Tabla 6.

En cuanto al receptor de la hormona gonadotropina coriónica, se evaluaron diferentes condiciones para su amplificación por PCR pero los resultados no permitieron establecer de manera cierta la presencia de transcritos. Es posible que las células en condiciones basales no expresen el receptor o lo hagan en niveles muy bajos no detectables y que su expresión aumente en etapas posteriores con la progresión del proceso de diferenciación.

Los resultados permiten corroborar la expresión de genes del sistema IGF (Figura 6) y de la hormona gonadotropina coriónica en la línea celular de trofoblasto extravelloso, lo que representa un modelo adecuado para investigar el papel de estos genes en la regulación del crecimiento e invasión celular trofoblástica.

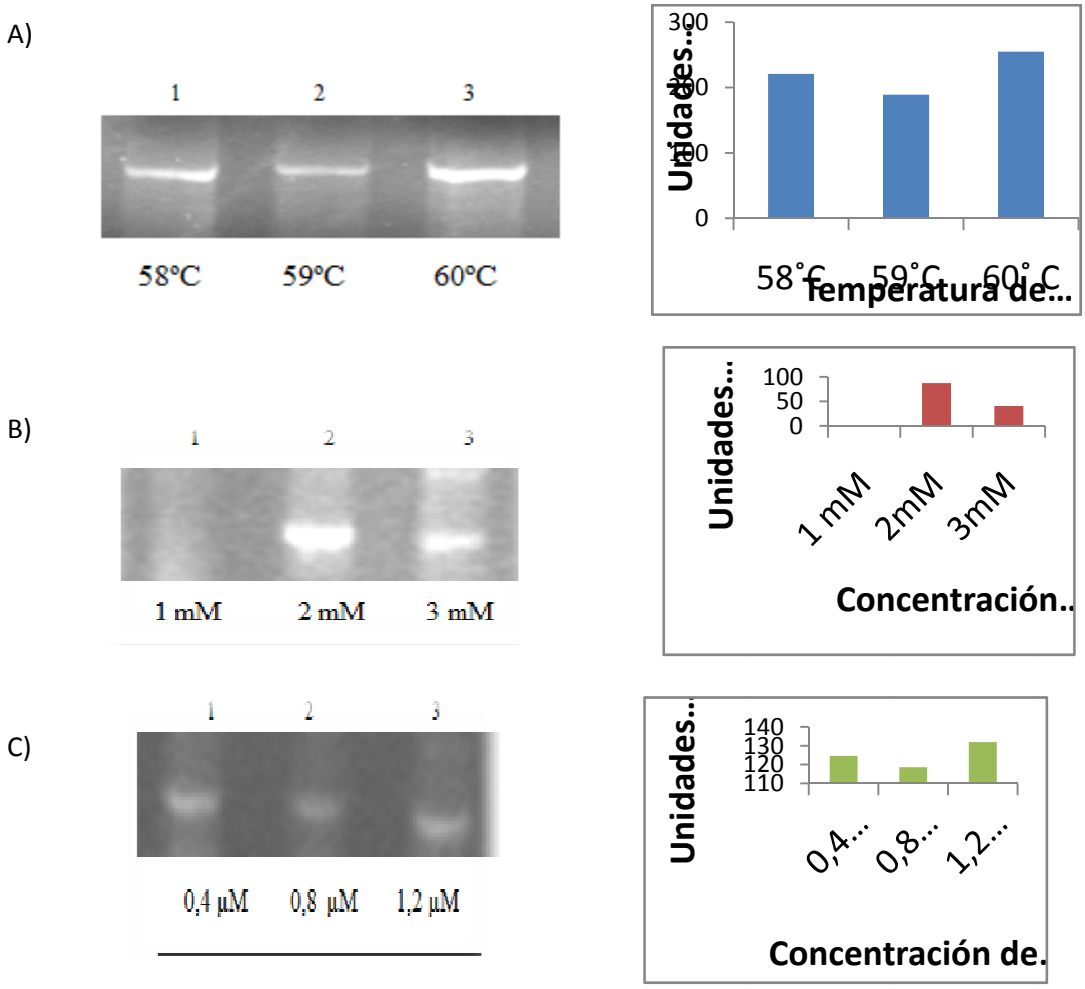


Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR convencional de hCG. Geles de agarosa al 1.5% a) Estandarización de la temperatura de alineamiento B) Estandarización de la concentración de $MgCl_2$ C) Estandarización de la concentración de iniciadores. En barras: datos densitométricos de la intensidad relativa de las bandas (unidades arbitrarias).

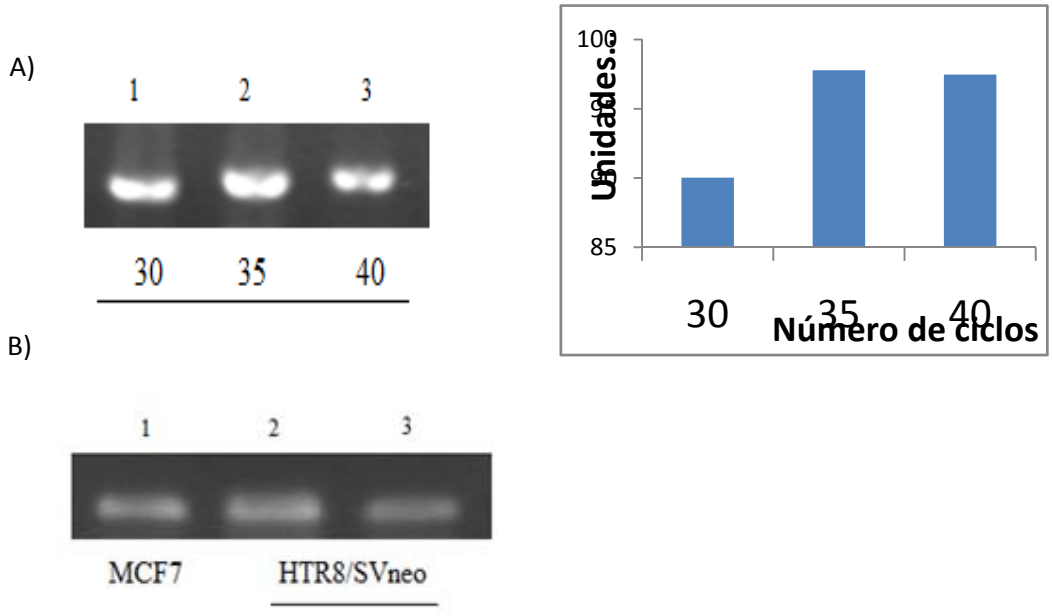


Figura 6. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR convencional de igf2r e igf2 en gel de agarosa al 1.5% A) Amplificación de igf2r, amplificado 428 pb. Carriles 1 a 3 muestran intensidad de la banda amplificada al cambiar el número de ciclos. B) Amplificados de igf2, 187pb. Carril 1: control positivo de amplificación en células MCF7. Carriles 2 y 3: amplificados en HTR-8/SVneo. En barras: datos densitométricos de la intensidad relativa de las bandas (unidades arbitrarias).

Gen	Igf2	Igf2r	hcg
Alineamiento (min)	1	0,5	1
Elongación (min)	1	1,5	1
Temp. Alineamiento (ºC)	56	58	60
Ciclos	35	35	35
iniciadores (µM)	0,8	1,2	1,2
$MgCl_2$(mM)	3,0	3,0	2,0

Tabla 6. Condiciones de amplificación de los genes evaluados por PCR convencional. Cada uno de los 35 ciclos de PCR consistió en una desnaturalización de 5 minutos y una hibridización de las sondas a temperaturas de 56 a 60 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

5.2 Ensayos funcionales

Una vez establecida, la presencia de los genes de interés en la línea celular, se procedieron a realizar estudios funcionales destinados a establecer si los ligandos del sistema IGF y la hCG poseían efectos sobre la proliferación, adhesión, migración e invasión celulares, usando como modelo la HTR-8/SVneo, una línea celular premaligna de trofoblasto extravelloso de primer trimestre, altamente invasiva, la cual ha demostrado ser ideal para evaluar los procesos de migración e invasión que ocurren en patologías trofoblásticas de la ETG. Los efectos funcionales mediados por los IGFs y la hCG se evaluaron tanto por separado como conjuntamente, para intentar establecer si existían vías de señalización comunes, que pudieran estar implicadas en estos procesos.

5.2.1 Ensayos de proliferación celular

Inicialmente se buscó determinar si los factores de crecimiento y la hCG tenían efectos sobre la proliferación de la línea HTR-8/SVneo, utilizando para este fin el método MTT y realizando tratamientos a 24 horas. Se utilizaron dosis de IGF-I, IGF-II e INS en concentraciones de 100 ng/ml y dosis de hCG de 50, 5000 y 50000 mUI/ml representativas de las concentraciones séricas presentes en el suero de mujeres no embarazadas (50 mUI/ml), placentas normales en las primeras semanas de embarazo (5000 mUI/ml) y placentas en un estado altamente invasivo (50000 mUI/ml) característico de patologías de la ETG. Como control positivo se utilizó SFB 10% (Figuras 7-10).

En un primer ensayo se evaluaron los efectos de la hCG sobre la proliferación celular a 24 horas (Figura 7) encontrándose que la proliferación celular se incrementaba de manera dependiente a la dosis empleada. Estos resultados sugieren que la hCG podría ser fundamental en los procesos de proliferación trofoblástica tal y como se ha visto en otras líneas de EVT. Igualmente estos resultados son un primer indicio de que al incrementar las concentraciones de hCG, especialmente en dosis elevadas, se podría promover un efecto de proliferación trofoblástica descontrolada, como el que se presenta en la mola hidatidiforme y otras patologías de la ETG [9, 66].

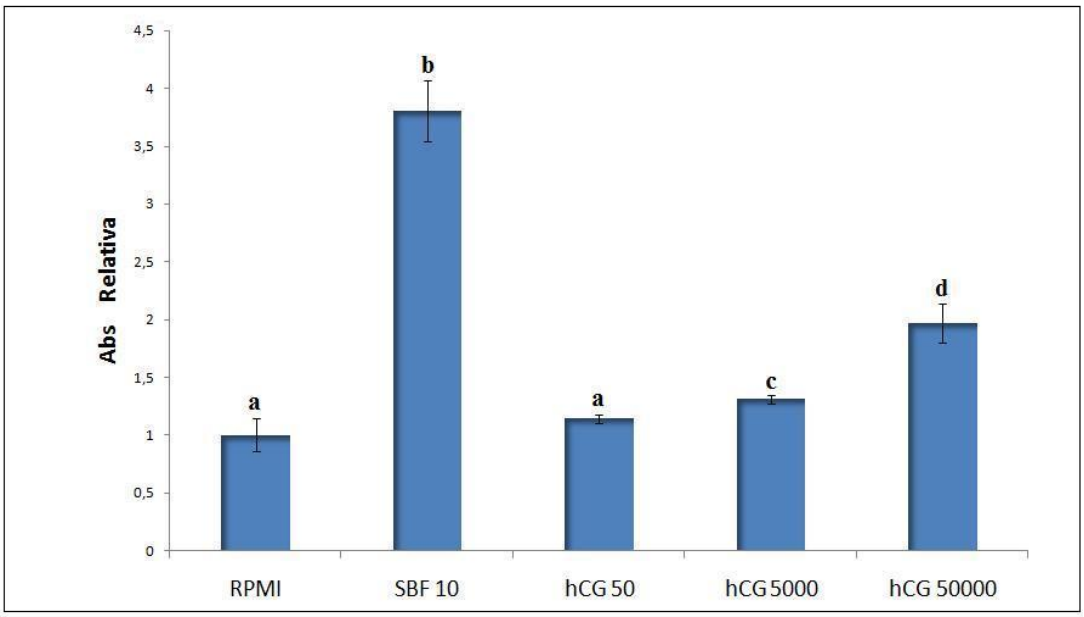


Figura 7. Efecto de la hCG sobre la proliferación celular de HTR-8. Las células HTR-8 se trataron con los estímulos indicados durante 24 horas y se midió la proliferación celular mediante el ensayo de MTT. Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control RPMI ($p < 0,05$).

En un segundo ensayo, se evaluaron los efectos proliferativos ejercidos por el IGF-I, IGF-II e INS en dosis de 100 ng/ml sobre esta línea celular. Se encontró que el IGF-I y la INS no poseen efecto proliferativo sobre las células HTR-8, en contraste con IGF-II que la incrementa más de 2 veces con respecto al control no estimulado (Figura 8).

Estos resultados sugieren que podrían existir efectos diferenciales entre los IGFs con relación a la proliferación trofoblástica, debidos tal vez a la activación de distintos receptores y vías de señalización celulares. Igualmente se conoce que el IGF-II posee una mayor importancia que el IGF-I en los procesos iniciales de la implantación trofoblástica, como son la migración e invasión del endometrio materno, mientras que el IGF-I juega un papel fundamental durante el crecimiento fetal [34].

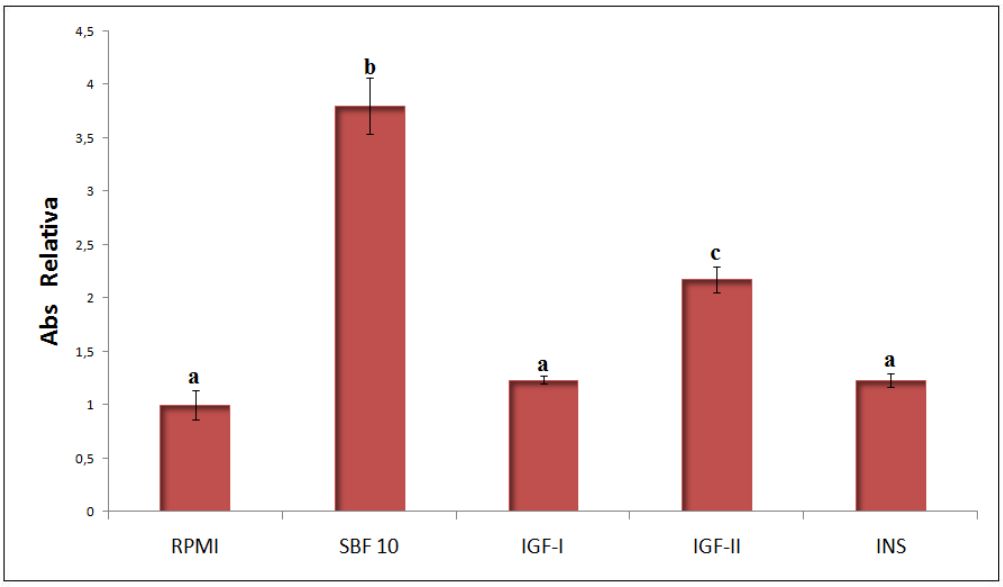


Figura 8. Efecto de los IGFs sobre la proliferación celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-I, IGF-II e INS (100 ng/ml cada uno) durante 24 horas y la proliferación se midió por medio del ensayo de MTT**.** Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

Con el fin de examinar el efecto de la coestimulación con IGFs y hCG, se utilizaron dosis combinadas de IGF-I o IGF-II (100 ng/ml) con hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml). Se encontró que la combinación de IGF-I con 50 y 5000 mUI/ml, incrementa la proliferación celular a 24 horas de manera significativa en comparación con el efecto inducido por el IGF-I en solitario (Figura 9). Estos resultados sugieren que los efectos proliferativos ejercidos durante la combinación de los estímulos, son debidos en su mayor parte a los efectos ejercidos por la hCG, más que a un efecto aditivo debido a la combinación de ambos estímulos, reforzando la idea del efecto proliferativo de la hCG sobre el trofoblasto.

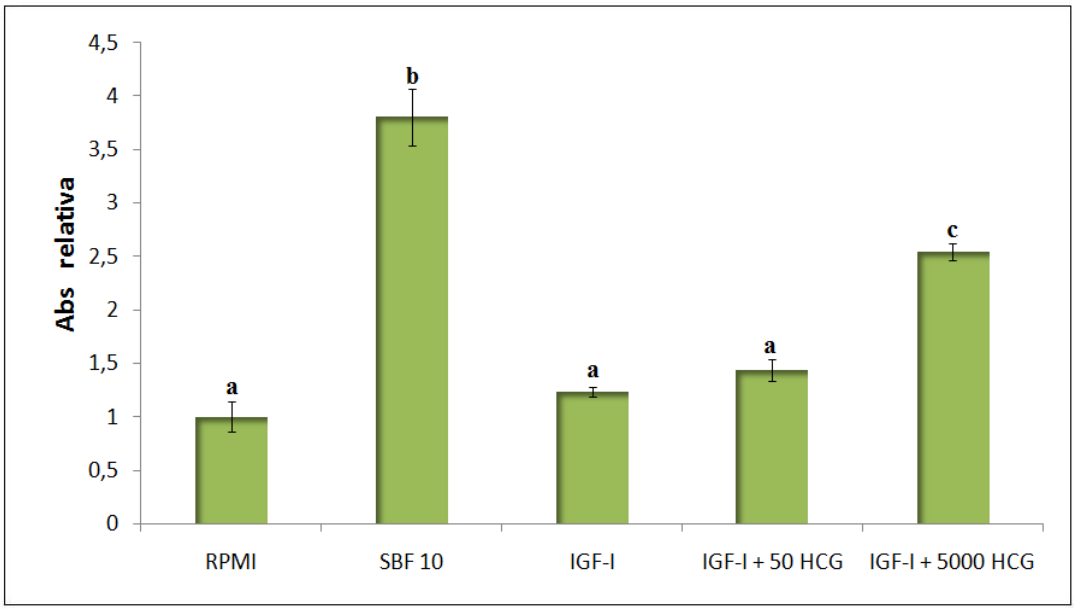


Figura 9. Efectos combinados del IGF-I y hCG sobre la proliferación celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-I (100 ng/ml) en combinación con 50 y 5000 mUI/ml de hCG durante 24 horas y la proliferación se midió por medio del ensayo de MTT**.** Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

Puesto que el IGF-II mostró su capacidad para estimular la proliferación de las células HTR-8/SVneo (Figura 8), se investigó el efecto proliferativo de esta hormona en combinación con la hCG. No se encontraron efectos aditivos del IGF-II al combinar con la hCG (50000 mUI/ml). Estos resultados plantearían que en combinaciones la hCG y el IGF-II podrían estar compitiendo por la unión a una vía de señalización determinada o que la hCG en concentraciones altas pudiera estar interfiriendo con la unión del IGF-II a sus receptores, tal y como ha sido planteado en estudios anteriores para el IGF-IIR. [7] Otra explicación posible para este resultado es que la combinación de IGF-II y de hCG podría causar un incremento en los niveles del AMPc, lo cual a su vez disminuiría la proliferación celular trofoblástica tal y como ha sido reportado para HTR-8/SVneo en trabajos anteriores [69] , y que también estaría en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo para los ensayos de AMPc (Figura 10).

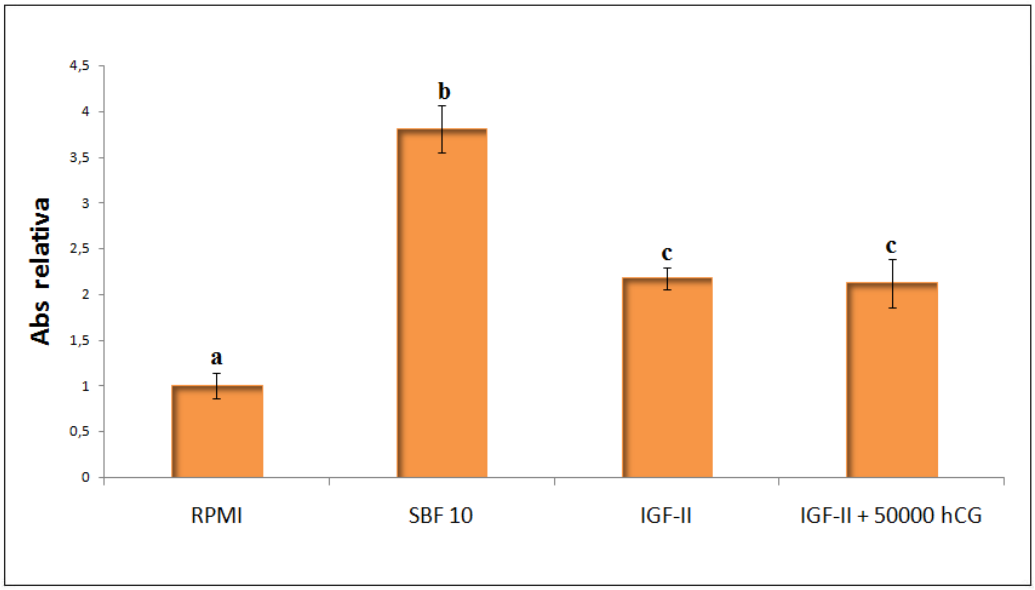


Figura 10. Efectos combinados del IGF-II y hCG sobre la proliferación celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-II (100 ng/ml) en combinación con 50000 mUI/ml de hCG durante 24 horas y la proliferación se midió por medio del ensayo de MTT**.** Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

5.2.2 Ensayos de adhesión celular

Teniendo en cuenta que las células invasivas poseen un fenotipo alterado en sus moléculas de adhesión celular lo cual les permite escapar a los controles ejercidos por el organismo e invadir otros tejidos, se buscó examinar la adhesión celular en la línea HTR-8/SVneo y observar cómo se afectaba el proceso al estimular las células con INS, IGF-I, IGF-II y hCG, tanto en solitario como en combinación, usando las mismas dosis de los ensayos de proliferación. Los ensayos de adhesión se realizaron durante 1 y 2 horas de estimulación, presentándose aquí los resultados obtenidos luego de 2 horas, ya que en la primera hora de tratamiento no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos y las células sin estimular (Figuras 11-14).

Inicialmente se realizaron ensayos con dosis de 50, 5000 y 50000 mUI/ml de hCG. Los resultados indican que tras 2 horas de estimulación, la hCG en todas las dosis usadas, incrementaba en un 70 % la adhesión celular respecto al control sin estimular, disminuyendo este efecto ligeramente en la dosis de 50000 mUI/ml (Figura 11). La

hCG es una molécula que se expresa tempranamente en el blastocisto en formación y que estimula diversos procesos funcionales a lo largo del embarazo, como la implantación, la invasión endometrial y diferenciación trofoblástica. En los resultados obtenidos en este ensayo, se sugiere que la hCG podría estar incrementando la expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular del trofoblasto, tal y como se ha reportado en estudios anteriores.[70-71]

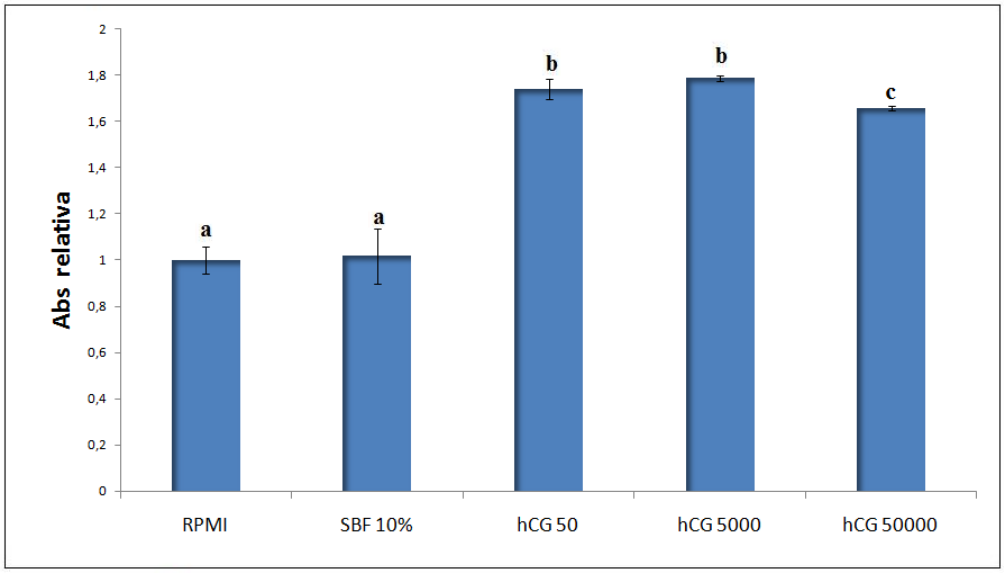


Figura 11. Efecto de la hCG sobre la adhesión celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con dosis crecientes de hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml) y se evaluó la adhesión a las 2 horas. Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

A continuación se realizaron ensayos utilizando estímulos de IGF-I, IGF-II e INS, para observar si estimulaban de manera diferencial la adhesión celular. Los resultados mostraron que tras 2 horas de estimulación, ni IGF-I ni IGF-II incrementaban la adhesión celular respecto a los controles, en contraste con la INS, la cual mostró un efecto marcado sobre la adhesión (Figura 12). En otros modelos trofoblásticos se ha observado que los IGFs poseen principalmente efectos en la migración o la proliferación del trofoblasto, e igualmente promueven la expresión de metaloproteinasas que degradan la membrana basal. El resultado con la insulina similar al obtenido con las dosis de hCG, sugiere que la dosis utilizada (100 ng/ml)

podría estar incrementando la expresión de moléculas de adhesión celular. [43, 45, 72].

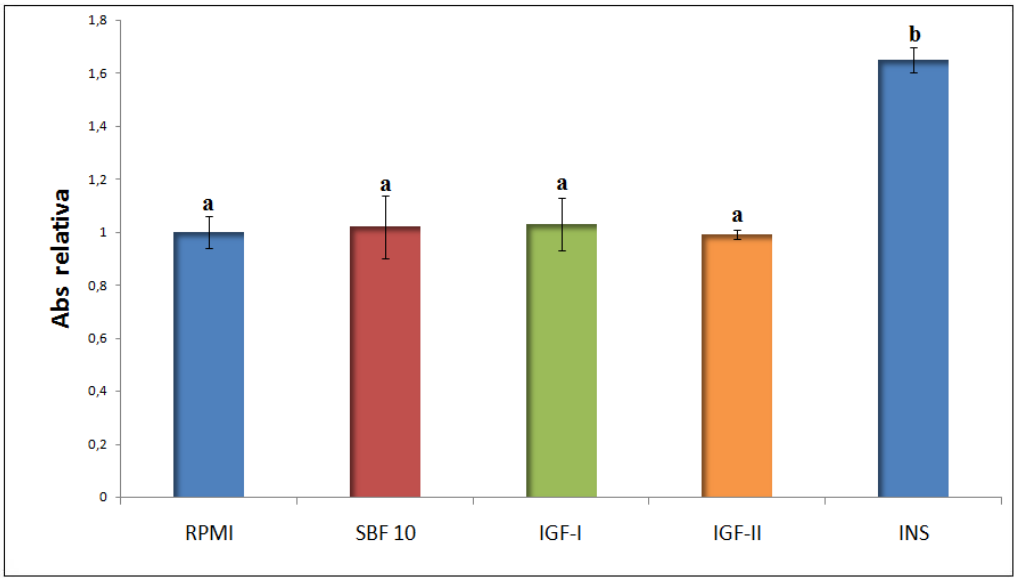


Figura 12. Efecto de los IGFs sobre la adhesión celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-I, IGF-II e INS (100 ng/ml cada uno) y se evaluó la adhesión a las 2 horas. Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

Posteriormente se realizaron ensayos combinados de IGF-I en solitario y en combinación con las diferentes dosis de hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml). Se encontró que el estimulo del IGF-I no incrementa la adhesión celular respecto a los controles. Pero al combinar IGF-I con dosis de 50 y de 5000 mUI/ml la adhesión celular se incrementaba, regresando a niveles sin estimulación al combinar IGF-I con de 50000 mUI/ml. (Figura 13). Estos resultados sugieren que al combinar la hCG con el IGF-I, predominarían en las dosis bajas los efectos de adhesión ejercidos por la hCG como se mostraba en los resultados de la figura 11, pero en la combinación con la dosis 50000 mUI/ml, disminuirían estos efectos. En la figura 11 también se observa una ligera disminución en la adhesión celular con la dosis de 50000 mUI/ml de hCG.

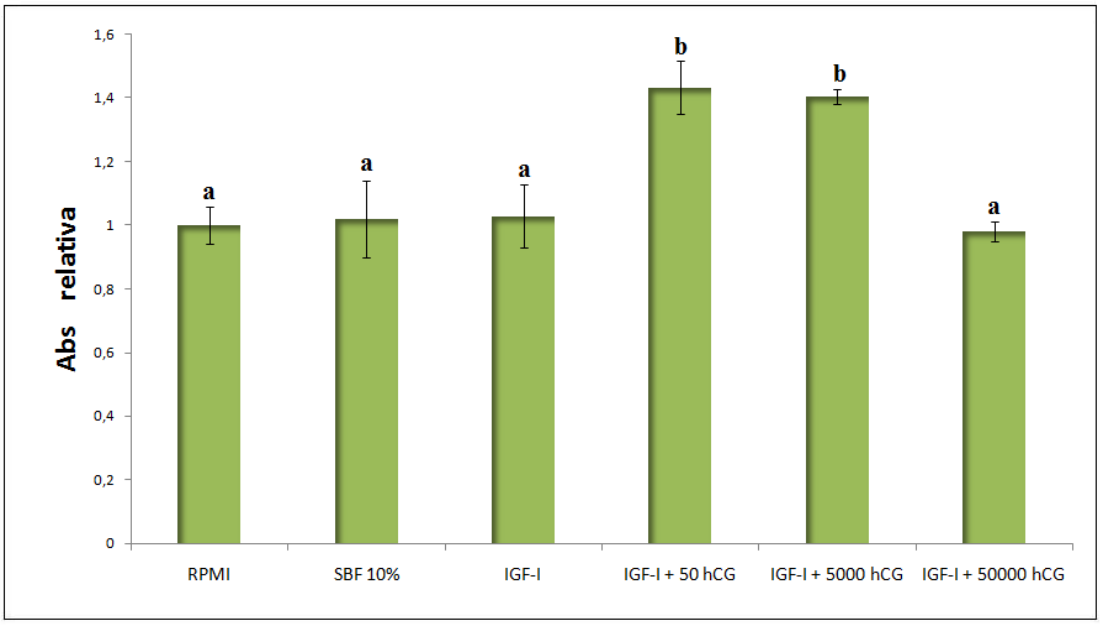


Figura 13. Efectos combinados de IGF-I y hCG sobre la adhesión celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-I (100 ng/ml) y en combinación con hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml) y se evaluó la adhesión a las 2 horas. Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

Finalmente, se evaluaron los efectos en la adhesión celular ejercidos por el IGF-II (100 mg/ml) en combinación con las distintas dosis de hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml), y los efectos ejercidos por INS en combinación con 5000 mUI/ml de hCG. En las combinaciones de 50 y de 50000 mUI/ml el IGF-II tenía una adhesión similar a la de los controles, mientras que en combinación con 5000 mUI/ml la adhesión celular se ve ligeramente incrementada. (Figura 14) Estos resultados indican que el efecto sobre la migración celular ejercido por el IGF-II, predomina sobre los efectos de la hCG en tratamientos combinados. Por su parte la INS tanto en solitario como en combinación con 5000 mUI/ml de hCG incrementaban la adhesión celular siendo estos resultados concordantes con lo que se observó en los experimentos anteriores.

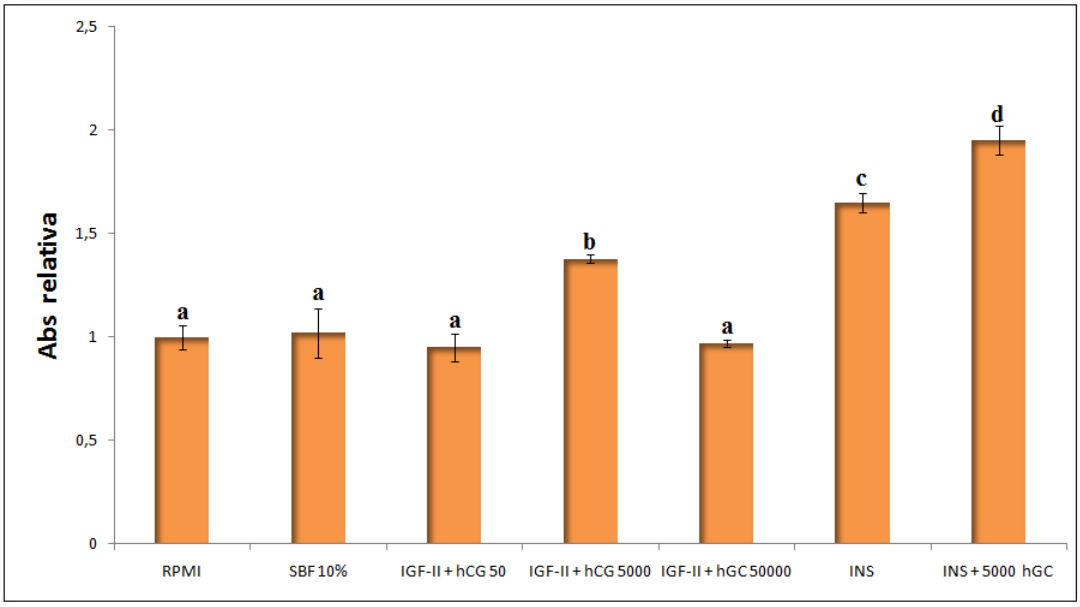


Figura 14. Efectos combinados de IGF-II e INS con hCG sobre la adhesión celular de HTR-8. Las células HTR-8 se estimularon con IGF-I o INS (100 ng/ml cada uno) y en combinación con hCG (50, 5000 y 50000 mUI/ml) y se evaluó la adhesión a las 2 horas. Como control positivo se empleó SFB (10%). Los valores de absorbancia están normalizados contra los obtenidos en el control RPMI. Cada barra corresponde al promedio de 3 mediciones, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control ($p < 0,05$).

5.2.3 Ensayo de migración celular

En estudios anteriores en este grupo y en otros en esta área de investigación, se había demostrado que tanto los IGFs como la hCG estimulan la migración e invasión trofoblástica durante los procesos de implantación del blastocisto en el endometrio materno y a lo largo del embarazo. Durante las etapas invasivas de la ETG como en el caso del coriocarcinoma, pueden presentarse metástasis externas al útero que afectan tejidos como el riñón, pulmón y cerebro y que pueden ser mortales si no son tratadas a tiempo [9].

Debido a que la línea HTR-8/SVneo posee tanto características premalignas como invasivas, se evaluaron los efectos que poseen los IGFs y la hCG por sí solos o en combinación en los procesos de migración e invasión. Se opto por no usar INS en estos ensayos, ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión celular y según estudios anteriores, esta hormona no afecta la migración celular de la línea de estudio. Igualmente se decidió usar la dosis de 5000 mUI/ml de

hCG como tratamiento, ya que representa una dosis intermedia respecto a las usadas en los experimentos anteriores, pero que a su vez es una concentración lo suficientemente elevada para causar efectos cualitativos. Los ensayos de migración se realizaron a 12 horas para evitar que los resultados obtenidos se vieran alterados por la proliferación celular.

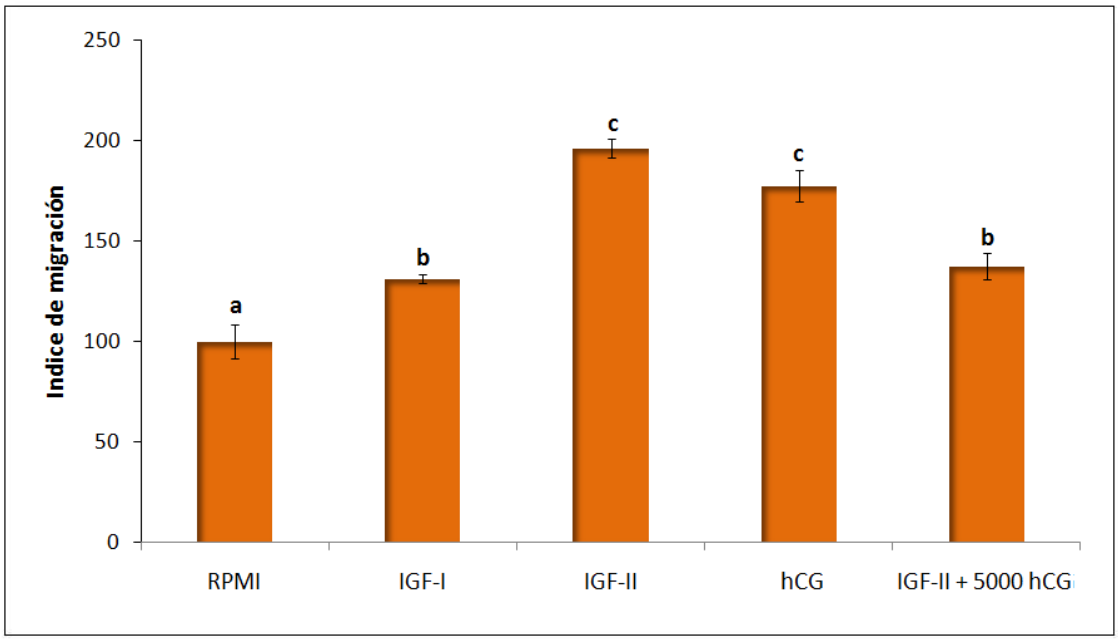


Figura 15. Ensayo de migración celular. Tiempo 12 horas. Los resultados se presentan como índice de migración respecto a RPMI (100%). Los datos expresan el promedio de 2 experimentos ± SEM. Tratamientos: RPMI, IGF-I (100 ng/ ml), IGF-II (100 ng/ml), hCG (50000 mUI/ml), e IGF-II en combinación con hCG (5000 mUI/ml). Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control en cada tratamiento ($p < 0,05$).

Los resultados del ensayo de migración celular indican que el IGF-II estimula fuertemente la migración celular respecto al control no estimulado (196%) al igual que la hCG en concentración de 5000 mUI/ml (177%). El tratamiento con IGF-I también incrementa la migración celular, aunque en menor proporción (131%). No se observó un efecto aditivo por la combinación de IGF-II con la hCG (137%). Estos resultados refuerzan la idea de la importancia del IGF-II sobre la migración celular trofoblástica, y señalan que concentraciones elevadas de la hCG podrían contribuir a los procesos invasivos del trofoblasto durante la implantación normal y anormal (Figura 15). Los resultados del ensayo de combinación de la hCG (5000 mUI/ml) con IGF-II, refuerzan la idea de que estas 2 hormonas comparten vías comunes de señalización o

interferencia en los mecanismos de unión a sus receptores, tal y como sugieren los resultados del ensayo de proliferación de la figura 10. Estos resultados también podrían ser explicados por la elevación en los niveles de AMPc, los cuales se ha visto disminuyen la migración trofoblástica. [45, 69]

5.2.4 Ensayo de invasión

Teniendo en cuenta que los IGFs potencian la invasividad celular en numerosos modelos celulares, incluyendo la línea trofoblásticas JEG-3 de coriocarcinoma y que niveles exagerados de la hCG están presentes en la mola completa la cual posee características trofoblásticas invasivas, se procedió a realizar un ensayo de invasión a 24 horas en pozos transwell recubiertos con matrigel para determinar si los IGFs por si solos o en combinación con la hCG incrementaban el proceso de invasión en la línea HTR-8/SVneo.

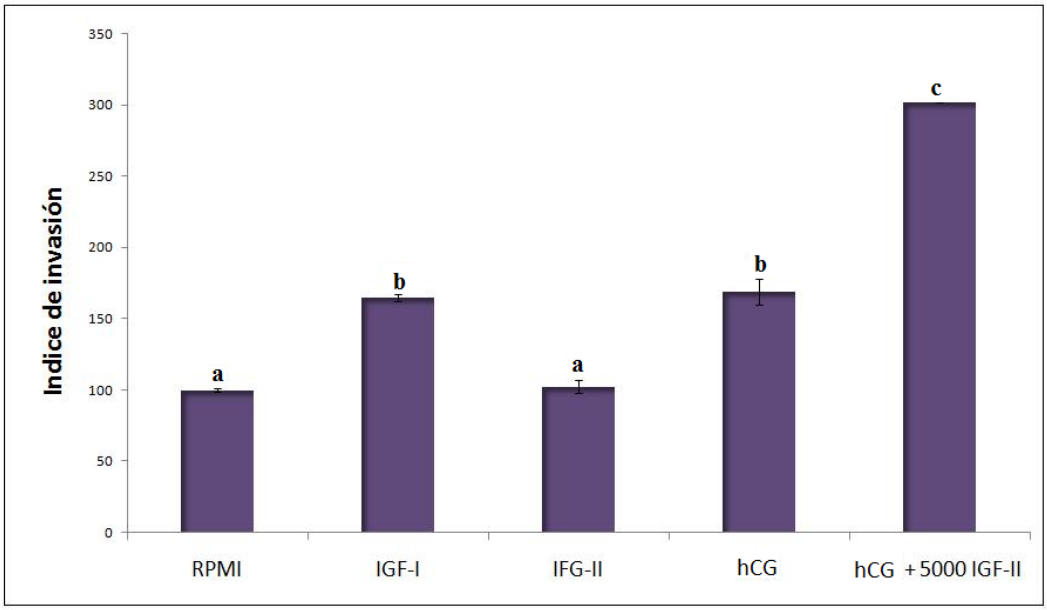


Figura 16. Ensayo de invasión celular. Tiempo 24 horas. Tratamientos: IGF-I (100 ng/ ml), IGF-II (100 ng/ml), hCG (50000 mU/ml), e IGF-II (100 ng/ ml) en combinación con hCG (5000 mUI/ml). Los resultados se presentan como índice de invasión respecto a RPMI (100%). Los resultados son representativos del promedio de 2 experimentos, las barras de error representan la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia estadística respecto al control en cada tratamiento ($p < 0,05$).

Los resultados de este experimento indican que el IGF-I estimula la invasión celular (164%) al igual que la hCG en concentración de 5000 mUI/ml (169%). El tratamiento con IGF-II en combinación con hCG incrementa la invasión celular en una cantidad mucho mayor (301%), mientras que el IGF-II no muestra efectos en comparación con el control no estimulado. (Figura 16). Estos resultados sugieren que el IGF-II y la hCG poseen efectos sinérgicos sobre la invasión celular trofoblástica, lo cual concuerda con las concentraciones séricas elevadas de ambas hormonas, presentes en mola completa y con la activación de procesos angiogénicos necesarios para la metástasis, los cuales se han propuesto que son estimulados tanto por el IGF-II como por la hCG. [14, 35, 59]

5.3 Activación de la vía de la Adenilato Ciclasa

5.3.1 Niveles de AMPc en células estimuladas con IGFs y hCG

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos funcionales, se observa que tanto los IGFs como la hCG poseen efectos en la proliferación, adhesión, migración e invasión celulares de la línea HTR-8/SVneo ya sea individualmente o en combinación. Por este motivo se buscó evaluar una vía de señalización que pudiera ser común tanto a los IGFs como a la hCG y que pudiera estar relacionada con los efectos funcionales de los resultados anteriores. Teniendo en cuenta que las vías MAPK y PI3K/AKT ya han sido evaluadas anteriormente en células JEG-3 y en HTR-8/SVneo, se decidió evaluar la activación de la vía adenilato ciclasa, ya que la hCG señaliza a través de un receptor (LH/CGR) acoplado a proteínas G heterotriméricas que a su vez activan la enzima adenilato ciclasa y síntesis del AMPc. Por estas razones, se realizó un ensayo ELISA para medición de AMPc intracelular, utilizando los mismos estímulos y combinaciones de los experimentos anteriores. Se decidió utilizar un tiempo de 10 minutos, pues anteriormente se había reportado que la producción de AMPc se incrementaba rápidamente luego de la unión del ligando a su receptor acoplado a proteína G [51, 66, 72-73].

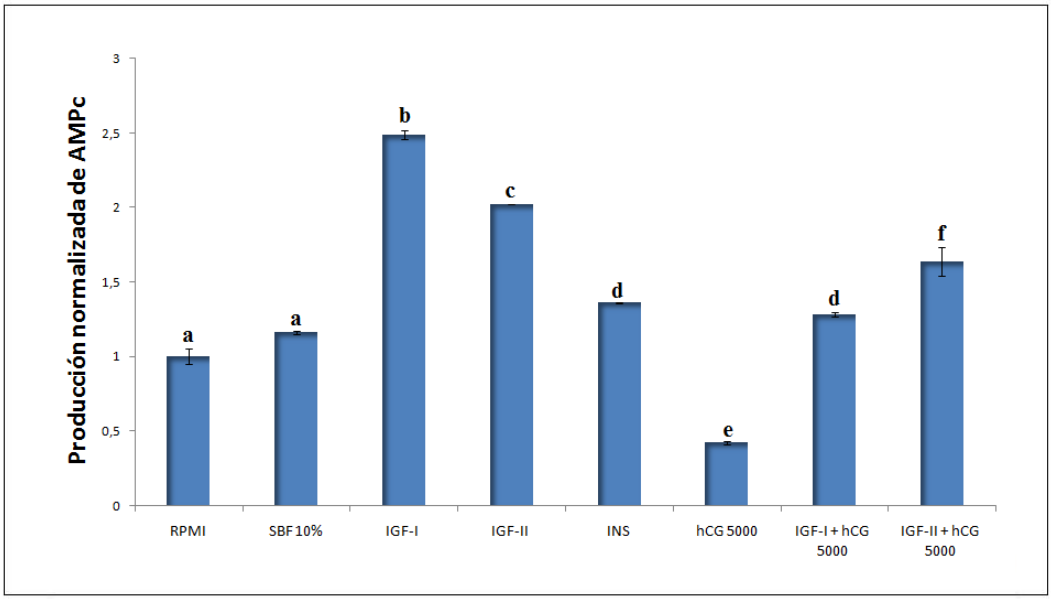


Figura 17. Ensayo ELISA de producción de AMPc normalizado contra RPMI. Tiempo 10 minutos Tratamientos: SFB 10% , IGF-I (100 ng/ ml), IGF-II (100 ng/8 ml), INS (100 ng/ml) y hCG (50000 mU/ml), IGF-I, IGF-II e INS en combinación con dosis de hCG (5000 mUI/ml). Los resultados son representativos del promedio de 2 experimentos, las barras de error representan la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística respecto al control en cada tratamiento ($p < 0,05$).

Los resultados (Fig 17) muestran un incremento en la producción de AMPc al tratar las células con IGF-I, IGF-II e INS (100 ng/ml) y combinaciones de hCG (5000 mUI/ml) con IGF-I e IGF-II (100 ng/ml). Por su parte la hCG no incrementa la producción de AMPc para este periodo de tiempo, debido posiblemente a los bajos niveles de expresión de su receptor. Por su parte los resultados de la estimulación con IGF-I, IGF-II e INS sugieren que estas hormonas están activando la vía de señalización por adenilato ciclasa, como muestran estudios recientes [74-75]. Son también interesantes los resultados de combinaciones entre los IGFs I y II y la hCG (5000 mUI/ml) pues muestran un incremento en la producción del AMPc en comparación con lo que se presenta para la estimulación con hCG en solitario. Sin embargo estos incrementos no son tan elevados como los que se observan para los estímulos en solitario de IGF-I o de IGF-II, lo cual nuevamente es un indicio de que el IGF-II posee mecanismos comunes de señalización con la hCG, en los cuales podrían estar involucrados los receptores del sistema IGF (Figura 17).

5.3.2 Ensayos con RNA interferente contra el receptor IGF-IIR en la activación de la vía de la Adenilato Ciclasa

En trabajos anteriores, se han estudiado los receptores IGF-IR e INSR del sistema IGF, en la activación de procesos celulares como proliferación, migración, e invasión trofoblásticas. [37, 72] Sin embargo el receptor IGF-IIR ha sido poco estudiado y no se conoce claramente si podría estar implicado en actividades funcionales de la célula. Recientemente se ha sugerido que la unión del IGF-II a su receptor IGF-IIR podría activar mediante la esfingosina quinasa, receptores acoplados a proteínas G los cuales a su vez activarían vías de señalización como el AMPc [74, 76]. Teniendo en cuenta los trabajos anteriores y en base a los resultados del ensayo anterior en los que se observa un incremento en la producción de AMPc por estímulos con IGF-I e IGF-II, se realizaron ensayos con células HTR-8/SVneo establemente silenciadas contra este receptor, para discernir si el IGF-IIR poseía efectos sobre la activación de la adenilato ciclasa. Las células fueron estimuladas con IGF-I, IGF-II, hCG y combinaciones de los mismos, tal y como se realizó en los experimentos anteriores. En la figura 18 se compara la producción de AMPc en células con silenciamiento del receptor IGF-IIR respecto a las células control.

Los resultados muestran que en todos los tratamientos para células silenciadas, se presentan incrementos notables en la producción de AMPc respecto a células control no silenciadas. Estos resultados sugieren que IGF-I, IGF-II e INS, al igual que la hCG individualmente y en combinación con IGF-II, están induciendo la producción de AMPc, lo cual podría explicarse en parte por el mecanismo propuesto recientemente mediante la activación de la esfingosina quinasa y el cual será expuesto más adelante. Estos resultados de silenciamiento del IGF-IIR son novedosos y plantean una posible señalización mediada por el IGF-IIR en la activación de la adenilato ciclasa.

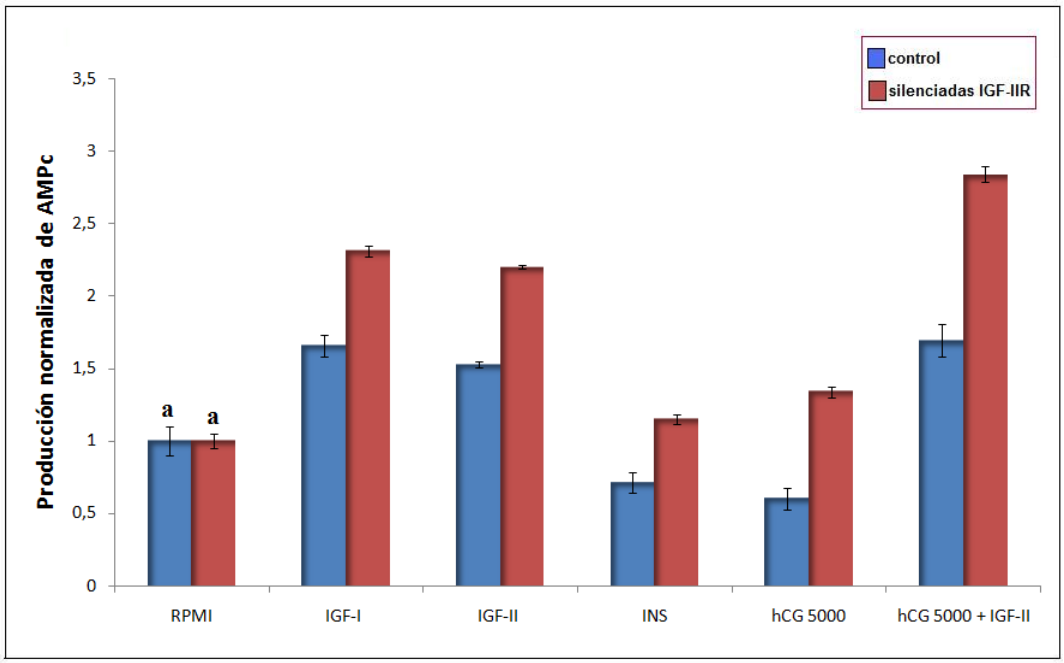


Figura 18. Efecto del silenciamiento de IGF-IIR sobre los niveles de AMPc en células HTR-8 Las células control (barras azules) y las silenciadas (barras rojas) se estimularon durante 10 min con los tratamientos indicados y se cuantificó el contenido de AMPc intracelular mediante ensayo ELISA. Los valores están normalizados frente al control RPMI. Los datos son el promedio de dos determinaciones, las barras de error representan la desviación estándar. Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas en comparación con su control respectivo y entre tratamientos. ($p < 0.05$).

6. DISCUSION

Expresión genética

Los IGFs son potentes estimuladores del crecimiento de numerosos tejidos, regulando el metabolismo, la mitogénesis, la diferenciación y la supervivencia celular. Se ha visto que la desregulación en los niveles de expresión de los genes del sistema IGF, incluyendo los ligandos IGF-I e IGF-II y las proteínas de unión IGFBP-2, -3 y -6 conducen tanto a retardo en el crecimiento como a organomegalia generalizada en ratones, al igual que procesos de malignización y patologías trofoblásticas en humanos [33, 43, 77-78].

Los tejidos humanos fetales incluyendo el trofoblasto, expresan tanto IGF-I como IGF-II desde etapas tempranas de la gestación de manera característica; particularmente la expresión del gen igf2 es más abundante que la de igf1 durante la segunda mitad de la gestación en humanos, roedores y ungulados. Igualmente ambos IGFs se detectan en la circulación fetal desde etapas tempranas de la gestación, si bien las concentraciones en plasma de IGF-II son 3 a 10 veces mayores que las de IGF-I durante las etapas finales en todas las especies estudiadas. Esta elevación en los niveles del IGF-II durante el embarazo, concuerda con la alta expresión del ARNm del IGF-II en trofoblasto intermedio y con la regulación del comportamiento invasivo del trofoblasto, durante este periodo del embarazo [33-34, 43].

En tejidos molares, se ha encontrado disminución en los niveles de expresión del IGF-I al compararse con abortos no molares de primer trimestre, lo que indicaría que existe una regulación transcripcional de la síntesis de IGF-I pero no una regulación traduccional [73]. Por su parte, en los pacientes con mola completa se ha demostrado una expresión elevada del ARNm del IGF-II en comparación con abortos espontáneos de la misma edad gestacional, lo cual es consistente con la expresión elevada de IGF-II en tejidos y en suero de pacientes con esta enfermedad. La sobreexpresión del gen igf2 en patologías trofoblásticas se encuentra directamente asociada con la pérdida o relajamiento de la impronta genética de este gen y del gen H19, como se ha visto en pacientes con mola completa y coriocarcinoma [11, 77-78]. Estos hechos demuestran que cambios en los niveles de expresión del igf2 y de su

ARNm, se encuentran estrechamente relacionados con la aparición de patologías trofoblásticas como la ETG. En nuestros resultados encontramos que el IGF-II se expresa en la línea celular de estudio, lo cual es concordante con trabajos anteriores [79-80].

El gen del receptor IGF-II se expresa en numerosos tipos celulares incluyendo hígado, seno, ovario y útero humanos, siendo su nivel de expresión específico del tejido y etapa de desarrollo del individuo. En ratones y ratas durante etapas gestacionales se incrementa la expresión del igf2r llegando a ser de 20 a 40 veces mayor que en adultos, mientras que en humanos, no se presenta esta diferencia. Sin embargo, se han observado mutaciones, pérdida de la heterocigosidad e inestabilidad microsatelital en el gen igf2r en humanos en cáncer de seno e hígado y tumores gastrointestinales, al igual que en líneas celulares de cáncer de próstata y mama. En la línea celular JEG-3 de coriocarcinoma, que expresa los receptores del sistema IGF, se han encontrado niveles bajos en la expresión del IGF-IIR los cuales se han asociado con un incremento en el crecimiento tumoral. Por su parte, en ratones la sobreexpresión del IGF-IIR en una línea de tumor mamario poseía efectos antiproliferativos e inhibía la formación de tumores *in vivo.* Estos hechos sugieren que el IGF-IIR podría actuar como un supresor tumoral y que su pérdida podría estar involucrada en el crecimiento tumoral [20-21, 78, 81]. En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, no se encontraron diferencias significativas en el ARNm del receptor igf-iir en tejidos de mola respecto a tejidos de placenta normal, pero sí se encontró una tendencia a niveles mayores del ARNm en tejidos de aborto no molar respecto a los otros dos tejidos estudiados [73]. En la línea celular HTR-8/SVneo, encontramos una expresión notoria del receptor IGF-IIR lo cual es concordante con estudios anteriores y sugiere la importancia de este receptor en procesos funcionales trofoblásticos.

Por su parte la hCG se expresa a lo largo de todo el embarazo, ya que esta hormona es indispensable para la implantación embrionaria y el mantenimiento del proceso de gestación normal. Se han encontrado cambios respecto a las cantidades relativas en que se expresan cada uno de los 6 genes de la subunidad β de esta hormona; pues si bien estos 6 genes se expresan a lo largo de todo el embarazo, los genes 3, 5 y 8 se expresan en mayores cantidades que los otros genes, siendo el gen 5 el que posee los mayores niveles de expresión en tejidos normales (64% del total). Otros estudios han mostrado que los genes de la subunidad β tipo 2 (como el gen tipo 7), se

expresan en mayor cantidad, desde tejidos trofoblásticos malignos, sugiriéndose que esta expresión diferencial podría ser usada como un marcador genético en el diagnóstico de enfermedades trofoblásticas, como aborto espontáneo, coriocarcinoma y mola hidatidiforme [51, 57, 82-83]. En el presente trabajo se confirmó la presencia del gen hcg, subunidad β, en esta línea de estudio como ya había sido reportado en trabajos anteriores [79-80]. Igualmente se estandarizaron condiciones de amplificación como la temperatura de alineamiento, la concentración de $MgCl_2$ y la concentración de iniciadores. La hCG juega un papel fundamental en los diversos procesos trofoblásticos, tal y como se muestra a lo largo del presente trabajo.

El receptor LH/CGR se ha encontrado en la placenta normal humana, el cuerpo lúteo y en líneas celulares inmortalizadas como la SGHV-5 de trofoblasto extravelloso. Respecto a la expresión de este receptor, se ha mostrado que ésta cambia a lo largo de la diferenciación trofoblástica, disminuyendo durante la fusión y diferenciación del citotrofoblasto velloso a sincitiotrofoblasto, al igual que los niveles de su ARNm y de su receptor en membrana. Se ha sugerido que la unión de la hCG intervendría sobre la diferenciación trofoblástica al unirse a su receptor, causando la activación de la vía AMPc, inositol fosfato, Ca^{2+} y otros mensajeros secundarios, ya que si se silencia este receptor con oligonucleótidos antisentido, se inhibe la diferenciación trofoblástica que podría conducir a complicaciones como preeclapmsia y retraso en el crecimiento intrauterino [62-64, 71]. Igualmente se presentan niveles anormales de este receptor, en coriocarcinoma y mola hidatidiforme lo que podría estar implicado en crecimiento e invasión anormal de la placenta [83]. No se encontraron niveles detectables de transcritos del gen hcgr en esta línea celular en condiciones basales de cultivo, por medio de PCR convencional, lo cual hace pensar que la expresión de este receptor es demasiado baja para ser detectada por esta metodología, en los primeros días de cultivo. Es posible que la expresión de este receptor se incremente en los días siguientes, o por efecto de estímulos diferenciales que conduzcan a la diferenciación trofoblástica. En un estudio en desarrollo en nuestro laboratorio empleando análogos del AMPc como la forskolina, se observó un incremento en la diferenciación trofoblástica de la línea celular HTR-8/SVneo tras 72 horas de tratamiento (S. Freyre, resultados no publicados), lo que plantea que podría incrementarse la expresión de este receptor.

El modelo celular HTR-8/SVneo utilizado en el presente trabajo es un modelo ideal de estudio, ya que expresa genes del sistema IGF, incluyendo el igf2, hcg y su receptor, junto con varios marcadores específicos del linaje trofoblástico, como hPL+, CK+, SP1 y HLA tipo 1+, además de varias integrinas del tipo alfa y beta implicadas en procesos de migración e invasión celular. La HTR-8/SVneo es una línea celular premaligna de trofoblasto extravelloso de primer trimestre altamente invasiva, además de ser ideal para el estudio de los procesos de migración e invasión que ocurren durante el primer trimestre de embarazo y durante patologías trofoblásticas. En nuestros resultados confirmamos la expresión de los genes igf2, igf-iir y hcg en esta línea celular, y se estandarizaron las condiciones de amplificación para el gen hcg Estos resultados iníciales permiten proseguir hacia estudios relativos a la adhesión, proliferación, migración e invasión celulares, ya que todos los genes mencionados intervienen en estos procesos [79-80, 84-85].

Proliferación

Las células trofoblásticas placentarias comparten varias características con células malignas, tales como una alta proliferación, ausencia de inhibición por contacto, alta invasividad, alta migración, y capacidad de escapar a efectores del sistema inmune particularmente durante el primer trimestre de embarazo. Sin embargo estos procesos están fuertemente regulados de manera espacial y temporal en las células trofoblásticas, lo cual permite una implantación embrionaria exitosa, a diferencia de las células metastásicas [8].

Diferentes tipos de efectores tanto autocrinos como paracrinos deciduales, se encargan de regular la proliferación trofoblástica. Entre los factores que incrementan la proliferación se encuentran: la adrenomedulina, niveles bajos de oxígeno que estimulan la expresión de HIF-I (hipoxia inducible factor-1), angiopoietinas, el EGF y el VEGF entre otros. Muchos de estos factores estimulan la proliferación del EVT sin influenciar su invasividad, pero otros también tienen funciones invasivas como el IGF-II producido por el trofoblasto y la IGFBP-I producida por la decidua. Por otra parte el TGF-β producido por la decidua materna es un regulador negativo de la invasión, proliferación y migración trofoblásticas [5, 84, 86-88].

Los IGFs estimulan el crecimiento celular, regulan el metabolismo, la mitogénesis la diferenciación y supervivencia de varios tipos celulares tanto de células somáticas como tumorales de diverso origen. A través de la unión al receptor IGF-IR, los IGFs pueden regular la progresión del ciclo celular, controlando varios puntos de chequeo de este proceso. Por activación de las vías PI3K/AKT y de la vía ERK, los IGFs pueden facilitar la transición de G_0 a G_1 mediante la activación de p70 S6K llevando a la fosforilación de la proteína ribosomal S6. También pueden promover la transición de G1 a S incrementando la ciclina D1 y la expresión genética de CDK4 y promoviendo la liberación del factor de transcripción E2F y la síntesis de ciclina E [20, 43, 89].

Se han observado efectos diferenciales de los IGFs sobre la proliferación celular de linajes trofoblásticos. En explantes vellosos de placenta de primer trimestre, se ha mostrado que tanto el IGF-I como el IGF-II y la IGFBP-1, incrementan la proliferación trofoblástica e inducen la formación de sincitiotrofoblasto y disminuyen la taza de apoptosis [43, 90]. Por su parte en células JEG-3 de coriocarcinoma humano, dosis de 10 nM de IGF-I e IGF-II no incrementaban la proliferación celular, pero sí la invasión y migración [72]. Los efectos proliferativos ejercidos por los IGFs en células trofoblásticas, podrían ser mediados tanto por las isoformas del receptor de insulina (IR-A) como por el IGF-IR, los cuales pueden activar la síntesis de ADN y promover la proliferación celular. En los resultados del presente trabajo las dosis de 100 ng/ ml (10 nM) estimulaban la proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo 2 veces respecto al control de RPMI, de manera similar a lo que se ha visto en explantes vellosos (incremento de 3.5 veces en proliferación), al contrario de lo que se observó en células JEG-3 de coriocarcinoma, en las que no habían efectos proliferativos [14, 43, 72, 87].

Como se mencionó antes, se han encontrado concentraciones séricas elevadas del IGF-II circulante en pacientes con mola hidatidiforme, respecto a controles de embarazos no molares de la misma edad gestacional. Si bien no se han realizado estudios al respecto, es posible suponer que la proliferación anormal trofoblástica de carácter invasivo que se observa en esta patología, podría estar mediada en parte por la alta concentración del IGF-II en la placenta [14].

Se ha mostrado que el efecto de la hCG sobre la proliferación celular cambia en distintas líneas celulares placentarias estudiadas. En las líneas HPMVEC de origen endotelial vascular la hCG posee efectos mitogénicos que podrían modular la

angiogénesis placentaria. Por su parte en la línea trofoblástica SGHPL5, dosis tanto de 5 como de 50 mUI/ml de hCG no incrementaban la proliferación celular en tratamientos de 24 a 72 horas [59, 66]. Esto contrasta con los resultados obtenidos para HTR-8/SVneo en el presente trabajo, donde se encuentra un incremento en la proliferación de manera dosis dependiente de hCG al usar dosis de 50 a 50000 mUI/ml de hCG, luego de 24 horas de tratamiento. Los resultados del presente trabajo sugieren que la hCG podría estar incrementando la proliferación trofoblástica especialmente en dosis elevadas. En mola completa se encuentran tanto niveles elevados de la hCG como proliferación trofoblástica exagerada, hechos que sugieren que las concentraciones elevadas de la hCG se encuentran implicadas con la proliferación trofoblástica.

Por el contrario, no se observaron efectos aditivos en la proliferación celular al combinar IGF-II con hCG 5000 mUI/ml. Zygmunt y colaboradores han mostrado que al estimular células HTR-8/SVneo con dosis crecientes de 5000 mUI/ml de hCG ocurren cambios en la distribución de los receptores IGF-IIR, lo cual podría generar cambios en la internalización del IGF-II dentro de la célula y disminuir sus efectos proliferativos [7] . Alternativamente se puede sugerir que la combinación de IGF-II y de hCG al incrementar en los niveles del AMPc como se muestra posteriormente, podría disminuir la proliferación celular trofoblástica tal y como fue reportado en trabajos anteriores con HTR-8/SVneo [69]. Sin embargo, la proliferación que se observaba con dosis combinadas era muy superior a la obtenida para controles no estimulados y sugiere que tanto el IGF-II como la hCG están involucrados en la proliferación celular trofoblástica, tanto en condiciones normales como en patologías del trofoblasto.
En nuestros resultados tampoco se observaron incrementos en la proliferación mediados por IGF-I o por INS. Esto es concordante con los niveles de IGF-I detectados en la circulación fetal, los cuales son mucho menores a los de IGF-II. Igualmente tanto los niveles de IGF-I en suero como la expresión de su ARNm, son significativamente menores en mola hidatidiforme que en placentas normales [34, 91] . El IGF-I parece estar más relacionado con el crecimiento fetal que con el crecimiento placentario, siendo sus niveles regulados por la disponibilidad nutricional tal y como se ha visto en modelos animales. Estas observaciones son también consistentes con los cambios en el peso de los recién nacidos, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con las concentraciones en plasma del IGF-I [34, 90, 92] .

Los efectos de la insulina en el trofoblasto son principalmente metabólicos, ya que esta hormona incrementa la incorporación de glucosa a los tejidos fetales y de esta manera regula los niveles en plasma de IGF-I, pero no los de IGF-II. En enfermedades como la diabetes gestacional en las cuales se produce resistencia a la insulina, pueden presentarse fetos macrosómicos y con malformaciones [93].

Efectos sobre la adhesión celular

Las células altamente invasivas como células metastáticas o células del trofoblasto, poseen un fenotipo alterado en sus moléculas de adhesión [6]. Estas incluyen integrinas, cadherinas, receptores de adhesión de la familia de las inmunoglobulinas y niveles de oxígeno entre otras. Las células de citotrofoblasto dejan la membrana basal para diferenciarse a células de trofoblasto extravelloso, proceso durante el cual se disminuye la expresión de receptores de adhesión característicos de las células madre citotrofoblásticas y se incrementan los receptores de adhesión característicos de células vasculares. Este cambio en la expresión de receptores de adhesión incrementa la habilidad del trofoblasto extravelloso para invadir el miometrio uterino, requerido en el proceso de placentación normal. Al respecto se ha visto que las células madre del citotrofoblasto dentro del espacio velloso, expresan la integrina α6β4, un receptor de laminina epitelial, implicado en la formación y estabilización de hemidesmosomas conectados al filamento intermedio. Al dejar la membrana basal, los citotrofoblastos disminuyen la expresión de esta integrina y comienzan a expresar la αVβ1, un receptor de fibronectina. Incrementos en las integrinas del tipo αV se han visto implicados en la formación de algunos tipos de tumores metastáticos al igual que en las células del trofoblasto extravelloso durante los procesos de implantación e invasión uterina [8, 41, 94-97].

Para el ensayo de adhesión a 2 horas, se encontró que las distintas concentraciones de hCG (50-50000 mU/ml) ejercen un estímulo moderado de adhesión sobre la línea celular HTR-8/SVneo sin que se observen diferencias significativas entre los distintos tratamientos de hCG. Igualmente, parecen existir efectos diferenciales entre los tratamientos combinados de IGF-I y de IGF-II con hCG. Mientras que los tratamientos de IGF-I con hCG (50 y 5000 mU/ml) aumentaban la adhesión celular, los tratamientos combinados de IGF-II y hCG (50 y 5000 mU/ml) no poseen un efecto aditivo sobre la adhesión, y sólo en combinación con 50000 mU/ml se presenta un ligero aumento en

la adhesión, que podría deberse a la elevada concentración de hCG. La hCG que comienza a ser secretada desde las primeras etapas de implantación blastocística, estimula de manera paracrina la expresión genética de trofinina, una molécula de adhesión que se expresa en la superficie apical del trofectodermo y el endometrio. La trofinina también se ha visto expresada de manera irregular en diversos tipos de cáncer incluyendo cáncer pulmonar, testicular y de colon [70, 98].

El IGF-I, El IGF-II y el IGFBP-I estimulan la secreción de MMP-9 y de uPA en células JEG-3 de coriocarcinoma, por unión a los receptores IGF-I, IR e integrina αVβ1 activando las vías MAPK y PI3K indispensables para la secreción de estas proteasas, fenómeno que también se ha observado en células citotrofoblásticas de placentas normales [73]. Todos estos factores son importantes en las funciones migratorias e invasivas del trofoblasto y señalan la importancia de los IGFs en estos procesos. En nuestros resultados encontramos que ni el IGF-I ni el IGF-II afectan la adhesión de la línea celular de estudio, pero sí incrementan la migración celular y la invasión.

La insulina y la combinación de Insulina con hCG incrementaron la adhesión celular por encima de los otros tratamientos utilizados. En células endoteliales umbilicales U937, tratamientos con 10^{-10} mol/l de INS incrementaban la concentración de moléculas de adhesión vascular VCAM-1 al igual que la adhesión de esta línea celular [99-100]. Es posible que al usar concentraciones elevadas de INS en los experimentos realizados, se desencadenará un efecto similar en la línea celular de estudio y que la combinación con hCG incrementará el proceso de adhesión.

Efectos sobre la migración e invasión en la línea HTR-8/SVneo

Las características de alta proliferación, invasión y migración del EVT durante el proceso de implantación embrionaria en humanos, son necesarias para establecer y mantener el sitio de implantación del embrión durante el embarazo de tal forma que pueda mantenerse un adecuado intercambio sanguíneo materno-fetal. Por el contrario la desregulación de estos procesos, como una débil invasividad trofoblástica en las arterias espirales, es causante de la preeclampsia y una invasión descontrolada está asociada con la mola invasiva, placenta accreta y coriocarcinoma [49]. En los procesos de invasión celular, además de un incremento en la migración celular ocurre una penetración de las barreras tisulares como la membrana basal y el estroma

intersticial. Las células invasivas incrementan su capacidad de adhesión, proteólisis de matriz extracelular y mecanismos de migración. Ocurre tanto en procesos normales de morfogénesis celular e implantación blastocística, como durante la malignización tumoral [101].

El control de los procesos proliferativos, migratorios o invasivos del EVT se lleva a cabo a través de regulación paracrina y autocrina ejercida por numerosos factores de crecimiento, proteínas de MEC y proteoglicanos, entre otros. Entre estos se encuentran, el factor de crecimiento transformante (TGF-β), el factor inhibidor de leucemia (LIF), glucocorticoides, los niveles de oxígeno placentarios, la hormona gonadotropina coriónica (hCG), los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) y sus proteínas de unión (IGFBPs) [6-8] .

Se ha demostrado la habilidad del IGF-II para estimular la migración de varios tipos celulares, tanto normales como malignos, incluyendo células de trofoblasto extravelloso, rabdomiosarcoma, células endoteliales bovinas y células de cáncer de pulmón. En el proceso de implantación el IGF-II no sólo estaría promoviendo migración celular, sino que igualmente contribuiría a la angiogénesis uterina, ambos procesos indispensables para que se lleve a cabo la gestación normal [35, 45, 59, 98, 102].

En resultados obtenidos por el grupo de investigación con células JEG-3 de coriocarcinoma, se encontró que el IGF-II induce la invasión trofoblástica mediante la activación del receptor de Insulina- isoforma A (IR-A) mediante activación de la vía PI3K. Igualmente, el IGF-I y la IGFBP-I eran capaces de promover la invasión celular en esta línea. En este estudio se sugiere que el IGF-II por unión al receptor de insulina IR-A podría inducir la activación de la unión de la integrina αVβ3 a vitronectina, promoviendo la migración celular [72]. En otros trabajos se ha sugerido que la migración de las células del trofoblasto extravelloso podría estar mediada por el receptor IGF-IIR, involucrando proteínas G y fosforilación de MAPK, siendo independiente de IGF-IR e IGFBP-1, aunque son necesarios más estudios al respecto que permitan evaluar si los receptores de INS, el IGF-IIR o los receptores híbridos participan en estos procesos [45, 103].

Por su parte se ha mostrado que el IGF-I posee efectos en la migración de varios tipos celulares cómo espermatozoides, linfocitos T, queratinocitos, células de músculo

esquelético, células de Schwann y citotrofoblastos. Se piensa que tras la unión del IGF-I a su receptor se activarían las integrinas αVβ3 y α5β1 por la fosforilación en tirosinas de la FAK y de paxilina, que llevarían a la formación de protrusiones ricas en actina similares a lamelipodios, las cuales son características de células en migración. En mujeres que desarrollaron preeclampsia se encontraron niveles bajos en suero de IGF-I e IGFBP-I, sugiriéndose que éstos podrían estar relacionados con la invasión anormal del trofoblasto característica de esta patología [27, 104-106]

Niveles elevados de la hCG se correlacionan con la actividad invasiva del trofoblasto tanto en gestación normal como en patologías pertenecientes a la ETG. Las concentraciones fisiológicas de la hCG estimulan tanto la angiogénesis como la migración celular de células uterinas microvasculares endoteliales humanas, UMVEC. La hCG también incrementa la migración de las líneas celulares HTR-8 y JEG3 de coriocarcinoma. No se conoce el modo preciso por el cual la hCG induce la migración celular trofoblástica, pero podría deberse a estimulación en la actividad de metaloproteinasas, por activación de la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. Se ha sugerido que la hCG, al unirse a su receptor y por activación de las vías ERK/AKT, podría causar cambios sobre la expresión de factores promotores de invasión, cambios en el citoesqueleto y cambios en proteinasas como las MMP-2 y la MMP-9, las cuales se han correlacionado con la actividad invasiva del trofoblasto. También se ha sugerido que la hCG (5000 mUI/ml) podría estar incrementando la invasión y migración trofoblásticas por cambios en reciclamiento del IGF-IIR que podrían conducir a un incremento en la externalización del receptor junto con una mayor captación del IGF-II por medio del receptor. [7, 66, 107].

En los resultados del presente estudio, se encontró que tanto IGF-I como hCG y la combinación de dosis de 5000 mU/ml de hCG con IGF-II (100 ng/ml), estimulan notablemente la invasión de la línea celular HTR-8/SVneo en los ensayos de invasión en matrigel. En los ensayos de migración se encuentra a su vez que los IGFs y la hCG estimulan significativamente la migración celular siendo mayores los efectos promovidos por el IGF-II (196%) que los observados para el IGF-I (131%). Si bien son pocos los estudios que muestran una contribución a la migración trofoblástica por medio del IGF-I, sí se ha mostrado que puede ayudar de manera paracrina a este proceso al ser producido desde células mesenquimales placentarias, por lo cual sus efectos serían menores que los del IGF-II que actúa de manera autocrina [41, 105].

Nuestros resultados muestran que la combinación de IGF-II con hCG (5000 mU/ml) no presenta efectos aditivos o sinérgicos en la migración celular obteniéndose un índice de migración de 137%, en comparación con los estímulos de IGF-II en solitario (196%) y de hCG (178%) en solitario. Por el contrario se encuentra una disminución respecto a los tratamientos con IGF-II y hCG individuales. En un estudio anterior, Zygmunt y colaboradores tampoco encontraron efectos aditivos o sinérgicos al combinar la hCG 5000 mUI/ml con dosis de 100 ng/ml de IGF-II. Ellos sugieren que este efecto podría deberse a que ambas hormonas utilizan una vía de señalización común en la migración trofoblástica *in vitro* [7]. Alternativamente se ha sugerido en estudios anteriores que incrementos en los niveles de AMPc causados por la estimulación con hCG e IGF-II, podrían estar implicados en la disminución de la proliferación y migración trofoblástica, lo cual sería concordante con la menor migración observada para nuestros resultados al combinar ambos tratamientos. [45, 69]

Los resultados del presente trabajo, referentes al incremento de migración ejercido por la hCG (178%), son concordantes también con los obtenidos por Prast y colaboradores en células trofoblásticas SGHPLV-5, donde utilizando dosis de 50 UI/ml de hCG se incrementaban tanto la migración como la invasión trofoblástica más de 2 veces respecto a controles sin estimular [66].

En el presente trabajo también se encontró que tanto el IGF-I como la hCG y la combinación de hCG (5000 mUI/ml) con IGF-II incrementaban la invasividad de la línea celular trofoblástica HTR-8/SVneo (301%). El notorio incremento de la invasión celular, al combinar IGF-II con hCG 5000 mUI/ml, podría sugerir efectos sinérgicos de ambas hormonas en procesos invasivos, tal como ha sido observado en mola hidatidiforme parcial y completa. Es importante resaltar este resultado, ya que no se han reportado ensayos previos relativos a la combinación de IGF-II con hCG en ensayos de invasión. El hecho de que se incrementara la invasividad al combinar estas hormonas, se sugiere la existencia de interacciones en sus mecanismos moleculares de señalización en la línea HTR-8/SVneo.

Tanto la hCG cómo los IGFs activan las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT las cuales han mostrado regular la migración e invasión de diferentes tipos celulares mediante mecanismos que incluyen la activación de la quinasa de adhesión focal

(FAK), activación de la quinasa de cadena liviana de miosina, sobreregulación de MMP-9 y procesamiento de MMP-2. En estudios anteriores, empleando HTR-8/SVneo se ha visto que la acción integrada de PI3K y ERK fosforiladas por estimulación con EGF, eran determinantes en los procesos de invasión celular de esta línea [70]. Es muy posible que las propiedades de migración e invasión activadas por ambas hormonas, confluyan en estas cascadas de señalización, tal como sugieren los resultados experimentales del presente trabajo.

Por último, es también importante, estudiar el efecto de las IGFBPs en la migración celular, mediante la modulación ejercida sobre los IGFs o de forma independiente. En algunos estudios, se ha señalado que la IGFBP-1 aumenta o inhibe la invasión del trofoblasto por estimulación de la integrina αVβ3). Por otro lado en una investigación reciente se muestra que la IGFBP-6 estimula la migración de las células RD de rabdomiosarcoma de manera independiente a los IGFs [87, 108].

Efectos en la producción de AMPc en la línea celular HTR-8/SVneo mediados por la hCG y los IGFs. Silenciamiento del receptor IGF-IIR

La vía de señalización del AMPc se ha visto implicada en múltiples procesos biológicos, transfiriendo los efectos de hormonas como glucagón y adrenalina, la activación de proteínas quinasas, la regulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales iónicos y regulando el metabolismo del glicógeno, carbohidratos y lípidos. A través de la activación de la proteína quinasa PKA, puede regular el crecimiento, la división, la diferenciación celular, la motilidad del esperma, y conductividad de canales iónicos, aunque también puede producirse una señalización independiente de PKA [109-110]. En el trofoblasto humano se observa un incremento de AMPc intracelular durante la sincitialización trofoblástica *in vitro*. Varios genes relacionados con la diferenciación trofoblástica se encuentran bajo control del AMPc, Incluyendo osteopontina, MCAM (molécula de adhesión celular de melanoma), sincitina, GCMA y síntesis de leptinas. Se ha propuesto que la mayor parte de los efectos en la diferenciación trofoblástica hacia sincitiotrofoblasto son ejercidos por la activación de PKA por medio del AMPc, incrementando la fusión celular y produciendo agrupaciones sincitiales multinucleares. Por su parte la proteína Giα (inhibitoria), la cual regula los niveles del AMPc por inhibición de la adenilato ciclasa, muestra una disminución en sus niveles proteicos durante el proceso de diferenciación trofoblástica [111-114].

En el presente estudio se evaluó la producción del AMPc por parte de la línea celular HTR-8/SVneo, demostrando que IGF-I, IGF-II y la combinación de éste último con hCG eran capaces de elevar los niveles intracelulares de AMPc. La ausencia de efecto de hCG en la producción de AMPc, podría deberse a la baja expresión del receptor LH/CG por células en estado no diferenciado [71]. El hecho de que tanto IGF-I como IGF-II incrementen notablemente la producción de AMPc, sugiere que ambos ligandos estarían activando la vía de la adenilato ciclasa, ya sea de manera directa, o de manera indirecta por activación de las vías MAPK o PI3K/AKT que son las principales vías de señalización, activadas por la unión de los IGFs al IGF-IR.

Un resultado importante del presente estudio es el efecto aditivo en la activación de la adenilato ciclasa por parte de IGF-II y hCG, lo cual no ha sido reportado previamente. Teniendo en cuenta este resultado, y los resultados de los ensayos funcionales de proliferación, migración e invasión realizados durante el presente trabajo, parecen sugerir mecanismos comunes de activación entre el IGF-II y la hCG que estarían implicando a un receptor del sistema IGF con fuerte afinidad por el IGF-II ya que son los tratamientos con este péptido los que muestran un mayor efecto diferencial en todos los ensayos funcionales. Por esta razón nos centramos en el estudio de la señalización mediada a través del IGF-IIR pues es el receptor con mayor afinidad por el IGF-II y no ha sido suficientemente estudiado.

La señalización por medio del IGF-IIR ha sido objeto de una gran controversia; Inicialmente se planteó que este receptor de carácter multifuncional estaba involucrado principalmente en el tráfico de ligandos con M6P y en la internalización del IGF-II para su degradación. Por lo tanto los efectos biológicos inducidos por el IGF-II en proliferación, migración e invasión, estarían mediados por la unión del IGF-II a los receptores IGF-IR y a la isoforma A del receptor de insulina (INS-Ra) [18-19]. Sin embargo en los últimos años se ha incrementado la evidencia experimental de que este receptor activa mecanismos de señalización intracelular por la unión del IGF-II [21-22, 39, 45, 74, 76].

Estructuralmente se conoce que la región citoplásmica del IGF-IIR, con un tamaño de 163 aminoácidos, posee 4 regiones que podrían ser sustratos potenciales para varias proteínas quinasas como la PKC, AMPc-quinasa y la caseína quinasa I y II, junto con

un posible mecanismo de dimerización [21,22]. Otros grupos han planteado que la unión del IGF-II al receptor IGF-IIR, activaría la vía Gi (proteínas G inhibitorias) y la vía MAPK (ERK1/2), causando la estimulación de la migración celular de manera independiente a IGF-IR, proceso en el que también disminuirían las concentraciones de AMPc. Sin embargo otros estudios han presentado evidencia contra la interacción directa entre el IGF-IIR y proteínas G [115].

Recientemente El-Shewy [74, 76] postuló un mecanismo alternativo de señalización mediante proteínas G, en el cual la unión del IGF-I y el IGF-II a sus respectivos receptores promueven el reclutamiento y activación de la esfingosina quinasa lo que llevaría a la producción de S1P (esfingosina 1-fosfato) que actúa como ligando de receptores S1PR acoplados a proteínas G_i (Figura 19). Estos receptores al ser activados, pueden regular la activación o inhibición de la adenilato ciclasa y promover la fosforilación de AKT y ERK entre otras funciones [116]. El mecanismo propuesto por estos autores, podría explicar en buena parte los efectos observados en los ensayos de activación de la vía de la adenilato ciclasa tanto para las células control como para las células silenciadas (Figs 17 y 18). En efecto, se observa que las células con silenciamiento del receptor IGF-IIR muestran un incremento notable en la producción de AMPc, Al verse disminuida drásticamente la expresión del IGF-IIR, no se induciría la activación del receptor S1PR ni tampoco la inhibición de la adenilato ciclasa, produciéndose así una mayor síntesis de AMPc. De igual forma, la expresión de un receptor IGF-IIR funcional causaría la activación de las vías anteriormente señaladas que determinarían una menor actividad de la adenilato ciclasa, como se pudo comprobar en el presente trabajo (Figs 17 y 18).

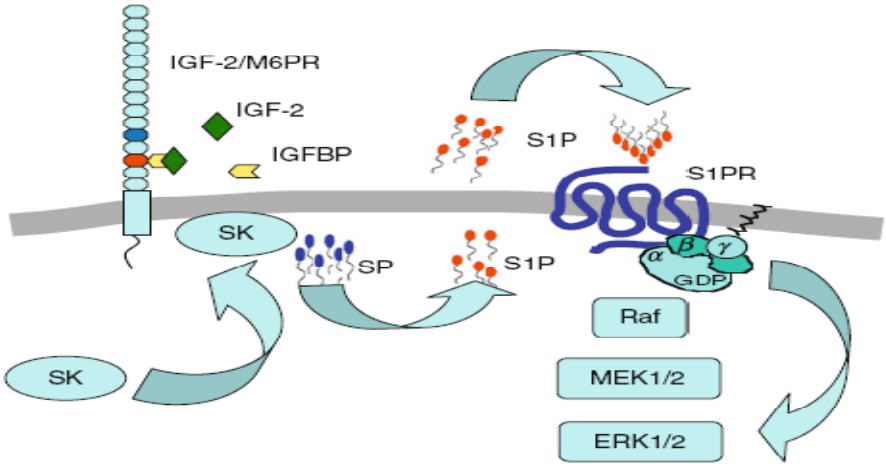


Figura 19. Transactivación de receptores acoplados a proteínas G inducidos por la unión del IGF-II a su receptor, según modelo de El-Shewy et al. 2007. La unión de IGF-2 a su receptor IGF-IIR promueve una rápida translocación de membrana y la activación de la esfingosina quinasa (SK), lo que resulta en la producción y liberación extracelular de esfingosina 1-fosfato (S1P), la cual actuaria como ligando de receptores acoplados a proteínas G.

Si bien el mecanismo propuesto por El-Shewy *et al,* podría explicar los efectos a nivel de IGF-I e IGF-II, no brinda una respuesta satisfactoria respecto a los estímulos con INS y hCG. En el caso de la Insulina es posible que el silenciamiento induzca la señalización y activación de la adenilato ciclasa por la unión de la INS a sus propios receptores INSR o mediante la unión a receptores híbridos, como un mecanismo de compensación. También se ha estudiado que tanto el IGF-IR como el INS-R se encuentran localizados en caveolas membranales en asociación con caveolina y que este tipo de asociaciones podría ejercer mecanismos de regulación en señalización de vías metabólicas y mitogénicas que igualmente podrían explicar la activación de la adenilato ciclasa por parte de la insulina [117-119].

Ahora bien, en el caso de hCG, una de las hipótesis que puede explicar este resultado es que el receptor IGF-IIR podría estar regulando las actividades de señalización ejercidas por la hCG cuando ésta se encuentra en alta concentración, como ocurre durante el embarazo o en patologías de la ETG.

Durante el proceso de revisión bibliográfica para el presente trabajo se encontraron pocos estudios que relacionaran las actividades de los ligandos o receptores del sistema IGF con la hCG. En estudios iniciales se sugería que las hormonas pituitarias y placentarias controlaban la secreción de IGF-II en células granulosas humanas [120].

Posteriormente se ha sugerido que la hCG y los IGFs en la interfase endometrial embriónica controlan la secreción de citoquinas como LIF e IL-6 [121], o que en células granulosas en monos Rhesus, los IGFs I y II ejercen efectos sinérgicos con la hCG en la secreción del VEGF [122]. Una relación funcional más estrecha entre la hCG y el receptor IGF-IIR en la línea celular HTR-8/SVneo, fue establecida recientemente por el grupo de Zygmunt y cols. En dicho estudio se planteaba que la estimulación con hCG de 50 a 50000 mUI/ml estimulaba la externalización del receptor IGF-IIR en la membrana celular, la cual podría incrementar la unión del IGF-II a este receptor influenciando cambios en la migración e invasión trofoblásticas. Sin embargo, no se daban explicaciones detalladas sobre los mecanismos involucrados en este proceso, ni sobre cómo podía inducir la hCG estos cambios sobre el receptor IGF-IIR[7].

En el presente trabajo se plantea un mecanismo novedoso por medio del cual los IGFs, particularmente el IGF-II podrían señalizar conjuntamente con la hCG en la línea celular HTR-8/SVneo, en un proceso en el cual estaría involucrado el IGF-IIR y la vía de señalización activada por la adenilato ciclasa. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio tienen implicaciones importantes en la comprensión del papel que poseen estas hormonas en el desarrollo de patologías de la ETG.

.

7. CONCLUSIONES

Se comprobó que la hCG posee efectos proliferativos sobre la línea trofoblástica HTR-8/SVneo de manera dosis dependiente. Este hecho se puede correlacionar con patologías de la enfermedad trofoblástica gestacional, como la mola completa, donde se presentan niveles elevados de hCG en suero, acompañados de una proliferación trofoblástica anormal. El IGF-II también estimula la proliferación de células trofoblásticas, pero sus efectos no son aditivos con los de la hCG.

Se pudo establecer que los IGFs y la hormona Gonadotropina Coriónica promueven la invasividad de las células HTR-8/SVneo. De manera notable se pudo demostrar que los efectos de IGF-II y hCG se unen sinérgicamente para producir un incremento drástico en las propiedades invasivas del trofoblasto, lo que explicaría el fenómeno de invasión incontrolada que caracteriza a la enfermedad trofoblástica gestacional.

Se demostró la interacción de las vías de señalización desencadenadas por la hormona Gonadotropina Coriónica y los IGFs mediante la activación común de la adenilato ciclasa y producción del segundo mensajero AMPc. Estos mecanismos conjuntos involucran probablemente al receptor IGF-IIR y dan soporte experimental al papel importante de este receptor en fenómenos de señalización intracelular, contribuyendo al mecanismo de acción del sistema IGF en el desarrollo de la placenta y sus patologías.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Cortés, C., et al.,, *La mola hidatidiforme: un indicador de la situación sociodemográfica en salud sexual y reproductiva.* Inf Quinc Epidemiol Nac, 2003. **8**(12): p. 193-208

2. Bischof, P. and I. Irminger-Finger, *The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon.* Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(1): p. 1-16.
3. Staun-Ram, E. and E. Shalev, *Human trophoblast function during the implantation process.* Reprod Biol Endocrinol, 2005. **3**: p. 56.
4. Handwerger, S. and B. Aronow, *Dynamic changes in gene expression during human trophoblast differentiation.* Recent Prog Horm Res, 2003. **58**: p. 263-81.
5. Lunghi, L., et al., *Control of human trophoblast function.* Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 6.
6. Moffett, A., CL., A McLaren, *Biology and Pathology of Trophoblast.*ed. E. C. U. Press. 2006.
7. Zygmunt, M., et al., *HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor.* Mol Hum Reprod, 2005. **11**(4): p. 261-7.
8. Ferretti, C., et al., *Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts.* Hum Reprod Update, 2007. **13**(2): p. 121-41.
9. Ezpeleta, J.M.y.A.L.C., *Enfermedad trofoblástica gestacional aspectos clínicos y morfológicos.* Rev Esp Patol, 2002. **35**(2): p. 187-200.
10. Berkowits, R.S., Goldstein, D. P *Recent advances in Gestational Trophoblastic Disease*. Vol. 10. 1998: Lippincott-Raven Publishers. 61-64.
11. Kim, S.J., et al., *Alterations in promoter usage and expression levels of insulin-like growth factor-II and H19 genes in cervical carcinoma exhibiting biallelic expression of IGF-II.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1586**(3): p. 307-15.
12. Le Bret, T., et al., *Endometrial choriocarcinoma in peri-menopausal women.* J Gynecol Obstet Biol Reprod 2005. **34**(1 Pt 1): p. 85-9.
13. Sierra-Bergua, B., et al., *Choriocarcinoma with pulmonary and cerebral metastases.* Singapore Med J, 2008. **49**(10): p. e286-8.
14. Cantero, M.E., *Estudio Predictivo de algunos Marcadores Bioquímicos en Suero de Pacientes con Mola Hidatidiforme*. 2004, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 64
15. Genest, D.R., *Partial hydatidiform mole: clinicopathological features, differential diagnosis, ploidy and molecular studies, and gold standards for diagnosis.* Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(4): p. 315-22.
16. Bell, K.A., et al., *Molecular genetic testing from paraffin-embedded tissue distinguishes nonmolar hydropic abortion from hydatidiform mole.* Mol Diagn, 1999. **4**(1): p. 11-9.
17. Pavelic, J., T. Matijevic, and J. Knezevic, *Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family.* Indian J Med Res, 2007. **125**(4): p. 511-22.
18. Pandini, G., et al., *Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved.* J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39684-95.
19. Denley, A., et al., *Molecular interactions of the IGF system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(4-5): p. 421-39.

20. Samani, A.A., et al., *The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights.* Endocr Rev, 2007. **28**(1): p. 20-47.
21. Hawkes, C. and S. Kar, *The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system.* Brain Res Brain Res Rev, 2004. **44**(2-3): p. 117-40.
22. Brown, J., et al., *Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction.* EMBO J, 2008. **27**(1): p. 265-76.
23. Firth, S.M. and R.C. Baxter, *Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins.* Endocr Rev, 2002. **23**(6): p. 824-54.
24. Duan, C., *Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins.* J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 41-54.
25. LeRoith, D., et al., *Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor.* Endocr Rev, 1995. **16**(2): p. 143-63.
26. Allan, G.J., D.J. Flint, and K. Patel, *Insulin-like growth factor axis during embryonic development.* Reproduction, 2001. **122**(1): p. 31-9.
27. Guvakova, M.A., *Insulin-like growth factors control cell migration in health and disease.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(5): p. 890-909.
28. Rowzee, A.M., et al., *IGF ligand and receptor regulation of mammary development.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. **13**(4): p. 361-70.
29. Linnerth, N.M., et al., *Type I insulin-like growth factor receptor induces pulmonary tumorigenesis.* Neoplasia, 2009. **11**(7): p. 672-82.
30. O'Dell, S.D. and I.N. Day, *Insulin-like growth factor II (IGF-II).* Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(7): p. 767-71.
31. Arney, K.L., *H19 and Igf2--enhancing the confusion?* Trends Genet, 2003. **19**(1): p. 17-23.
32. Kurukuti, S., et al., *CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10684-9.
33. Gluckman, P.D., *Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(4): p. 1047-50.
34. Fowden, A.L., *The insulin-like growth factors and feto-placental growth.* Placenta, 2003. **24**(8-9): p. 803-12.
35. Herr, F., et al., *Possible angiogenic roles of insulin-like growth factor II and its receptors in uterine vascular adaptation to pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 4811-7.
36. Ostojic, S., et al., *Genetic predisposition to idiopathic recurrent spontaneous abortion: contribution of genetic variations in IGF-2 and H19 imprinted genes.* Am J Reprod Immunol, 2008. **60**(2): p. 111-7.
37. Shields, S.K., C. Nicola, and C. Chakraborty, *Rho guanosine 5'-triphosphatases differentially regulate insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-dependent and -independent actions of IGF-II on human trophoblast migration.* Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 4906-17.
38. Fowden, A.L., et al., *Imprinted genes, placental development and fetal growth.* Horm Res, 2006. **65 Suppl 3**: p. 50-8.
39. Begley, T.P., *Insulin and IGFs* ed. V.a. hormones. Vol. 80. 2009: Academic press.
40. Laube, F., *Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor in human melanoma cells: effect of ligands and antibodies on the receptor expression.* Anticancer Res, 2009. **29**(4): p. 1383-8.

41. Zhou, Y., et al., *Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?* J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2139-51.
42. Irwin, J.C., et al., *Insulin-like growth factor (IGF)-II inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the decidua:trophoblast interface during human implantation.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2060-4.
43. Forbes, K., et al., *Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta.* Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(6): p. C1313-22.
44. Chiesa, C., et al., *Ghrelin, leptin, IGF-1, IGFBP-3, and insulin concentrations at birth: is there a relationship with fetal growth and neonatal anthropometry?* Clin Chem, 2008. **54**(3): p. 550-8.
45. McKinnon, T., et al., *Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3665-74.
46. Sarfstein, R., et al., *Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene in breast cancer.* Mol Cell Endocrinol, 2006. **252**(1-2): p. 241-6.
47. Gennigens, C., C. Menetrier-Caux, and J.P. Droz, *Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer.* Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **58**(2): p. 124-45.
48. Werner, H. and I. Bruchim, *The insulin-like growth factor-I receptor as an oncogene.* Arch Physiol Biochem, 2009. **115**(2): p. 58-71.
49. Chakraborty, C., et al., *Regulation of human trophoblast migration and invasiveness.* Can J Physiol Pharmacol, 2002. **80**(2): p. 116-24.
50. Cameo, P., et al., *Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate.* Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 50.
51. Stenman, U.H., et al., *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG.* Hum Reprod Update, 2006. **12**(6): p. 769-84.
52. Cole, L.A., *Hyperglycosylated hCG.* Placenta, 2007. **28**(10): p. 977-86.
53. Cole, L.A., *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin.* Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 8.
54. Bischof, P., A. Meisser, and A. Campana, *Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review.* Placenta, 2000. **21 Suppl A**: p. S55-60.
55. Handschuh, K., et al., *Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Endocrinology, 2007. **148**(10): p. 5011-9.
56. Rama, S. and A.J. Rao, *Embryo implantation and GnRH antagonists: the search for the human placental GnRH receptor.* Hum Reprod, 2001. **16**(2): p. 201-5.
57. Rull, K. and M. Laan, *Expression of beta-subunit of HCG genes during normal and failed pregnancy.* Hum Reprod, 2005. **20**(12): p. 3360-8.
58. Martínez-Florez, A., et al.,, *Desarrollo y validación de un modelo de cultivo in vitro para el estudio de la diferenciación del trofoblasto Humano.* Ginecol Obstet. 2006. **74**: p. 657-65.
59. Herr, F., et al., *HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study.* Placenta, 2007. **28 Suppl A**: p. S85-93.
60. Matsubara, H., et al., *Gonadotropins and cytokines affect luteal function through control of apoptosis in human luteinized granulosa cells.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(4): p. 1620-6.
61. Zygmunt, M., et al., *Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro.* Placenta, 1998. **19**(8): p. 587-93.

62. Remy, J.J., et al., *Purification and structural analysis of a soluble human chorionogonadotropin hormone-receptor complex.* J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 1681-7.
63. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective.* Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 141-74.
64. Costagliola, S., et al., *Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors.* Reproduction, 2005. **130**(3): p. 275-81.
65. Fields, M.J. and M. Shemesh, *Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals.* Biol Reprod, 2004. **71**(5): p. 1412-8.
66. Prast, J., et al., *Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling.* Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 979-87.
67. Graham, C.H., et al., *Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan.* Exp Cell Res, 1993. **206**(2): p. 204-11.
68. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
69. Biondi, C., et al., *Prostaglandin E2 inhibits proliferation and migration of HTR-8/SVneo cells, a human trophoblast-derived cell line.* Placenta, 2006. **27**(6-7): p. 592-601.
70. Qiu, Q., et al., *EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways.* Reproduction, 2004. **128**(3): p. 355-63.
71. Pidoux, G., et al., *Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation.* J Cell Physiol, 2007. **212**(1): p. 26-35.
72. Diaz, L.E., et al., *IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor.* Mol Hum Reprod, 2007. **13**(8): p. 567-76.
73. Díaz, L.E., *Niveles de expresión del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) en el desarrollo del tejido molar*. 2006, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 155
74. El-Shewy, H.M., et al., *The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells.* J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26150-7.
75. Ikezu, T., et al., *In vivo coupling of insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor to heteromeric G proteins. Distinct roles of cytoplasmic domains and signal sequestration by the receptor.* J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29224-8.
76. El-Shewy, H.M., et al., *Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors.* J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 31399-407.
77. Kim, S.J., et al., *Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases.* Gynecol Oncol, 2003. **88**(3): p. 411-8.
78. O'Gorman, D.B., et al., *Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo.* Endocrinology, 2002. **143**(11): p. 4287-94.
79. Khoo, N.K., et al., *SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. I. Mechanisms responsible for hyperinvasiveness and resistance to anti-invasive action of TGFbeta.* Int J Cancer, 1998. **77**(3): p. 429-39.
80. Khoo, N.K., et al., *SV40 Tag transformation of the normal invasive trophoblast results in a premalignant phenotype. II. Changes in gap junctional intercellular communication.* Int J Cancer, 1998. **77**(3): p. 440-8.

81. Xu, Y., A. Papageorgiou, and C. Polychronakos, *Developmental regulation of the soluble form of insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor in human serum and amniotic fluid.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(2): p. 437-42.
82. Miller-Lindholm, A.K., et al., *Human chorionic gonadotropin-beta gene expression in first trimester placenta.* Endocrinology, 1997. **138**(12): p. 5459-65.
83. Lei, Z.M., et al., *The expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors in human gestational trophoblastic neoplasms.* J Clin Endocrinol Metab, 1992. **74**(6): p. 1236-41.
84. Irving, J.A. and P.K. Lala, *Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1.* Exp Cell Res, 1995. **217**(2): p. 419-27.
85. Shiverick, K.T., et al., *Cell culture models of human trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report.* Placenta, 2001. **22 Suppl A**: p. S104-6.
86. Zhang, X., et al., *Adrenomedullin enhances invasion by trophoblast cell lines.* Biol Reprod, 2005. **73**(4): p. 619-26.
87. Hamilton, G.S., et al., *Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1.* Exp Cell Res, 1998. **244**(1): p. 147-56.
88. Athanassiades, A., G.S. Hamilton, and P.K. Lala, *Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast.* Biol Reprod, 1998. **59**(3): p. 643-54.
89. Dupont, J., et al., *The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression.* Horm Metab Res, 2003. **35**(11-12): p. 740-50.
90. Hills, F.A., et al., *Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1.* J Endocrinol, 2004. **183**(3): p. 487-96.
91. Wihman, I.L., K. Carlstrom, and M. Faxen, *Insulin-like growth factor-I in women with hydatidiform mole and in normal pregnancy.* Obstet Gynecol, 1998. **92**(3): p. 431-4.
92. Brameld, J.M., et al., *Maternal nutrition alters the expression of insulin-like growth factors in fetal sheep liver and skeletal muscle.* J Endocrinol, 2000. **167**(3): p. 429-37.
93. Weller, K.A., *Diagnosis and management of gestational diabetes.* Am Fam Physician, 1996. **53**(6): p. 2053-7, 2061-2.
94. Harris, L.K., C.J. Jones, and J.D. Aplin, *Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast.* Placenta, 2009. **30**(4): p. 299-304.
95. Aplin, J.D., C.J. Jones, and L.K. Harris, *Adhesion molecules in human trophoblast - a review. I. Villous trophoblast.* Placenta, 2009. **30**(4): p. 293-8.
96. Fukuda, M.N., K. Sugihara, and J. Nakayama, *Trophinin: what embryo implantation teaches us about human cancer.* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(8): p. 1165.
97. Wilhelmsen, K., S.H. Litjens, and A. Sonnenberg, *Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis.* Mol Cell Biol, 2006. **26**(8): p. 2877-86.
98. Makawita, S., et al., *Expression of insulin-like growth factor pathway proteins in rhabdomyosarcoma: IGF-2 expression is associated with translocation-negative tumors.* Pediatr Dev Pathol, 2009. **12**(2): p. 127-35.
99. Madonna, R., et al., *Insulin enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human cultured endothelial cells through a pro-atherogenic pathway mediated by p38 mitogen-activated protein-kinase.* Diabetologia, 2004. **47**(3): p. 532-6.
100. Sugihara, K., et al., *Induction of trophinin in human endometrial surface epithelia by CGbeta and IL-1beta.* FEBS Lett, 2008. **582**(2): p. 197-202.
101. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.

102. Bredin, C.G., et al., *Growth-factor-dependent migration of human lung-cancer cells.* Int J Cancer, 1999. **82**(3): p. 338-45.
103. Holthuizen, P.E., et al., *Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes.* Regul Pept, 1993. **48**(1-2): p. 77-89.
104. Grobman, W.A. and R.R. Kazer, *Serum insulin, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding protein-1 in women who develop preeclampsia.* Obstet Gynecol, 2001. **97**(4): p. 521-6.
105. Lacey, H., et al., *Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration.* BMC Dev Biol, 2002. **2**: p. 5.
106. Cheng, H.L., et al., *GTPases and phosphatidylinositol 3-kinase are critical for insulin-like growth factor-I-mediated Schwann cell motility.* J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27197-204.
107. Zygmunt, M., et al., *Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5290-6.
108. Fu, P., J.A. Thompson, and L.A. Bach, *Promotion of cancer cell migration: an insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-6.* J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22298-306.
109. Cooper, D.M., *Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP.* Biochem J, 2003. **375**(Pt 3): p. 517-29.
110. Serezani, C.H., et al., *Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **39**(2): p. 127-32.
111. Daiter, E., et al., *Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts.* Endocrinology, 1996. **137**(5): p. 1785-90.
112. Nulsen, J.C., et al., *Adenylate cyclase in human cytotrophoblasts: characterization and its role in modulating human chorionic gonadotropin secretion.* J Clin Endocrinol Metab, 1988. **66**(2): p. 258-65.
113. Keryer, G., et al., *Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro.* J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 7)**: p. 995-1004.
114. Knerr, I., et al., *Stimulation of GCMa and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions.* FEBS Lett, 2005. **579**(18): p. 3991-8.
115. Korner, C., et al., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-proteins. Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains.* J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 287-95.
116. Rosen, H., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor signaling.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 743-68.
117. Matthews, L.C., M.J. Taggart, and M. Westwood, *Effect of cholesterol depletion on mitogenesis and survival: the role of caveolar and noncaveolar domains in insulin-like growth factor-mediated cellular function.* Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5463-73.
118. Matthews, L.C., M.J. Taggart, and M. Westwood, *Modulation of caveolin-1 expression can affect signalling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and cellular proliferation in response to insulin-like growth factor I.* Endocrinology, 2008. **149**(10): p. 5199-208.
119. Salani, B., et al., *Caveolin-1 down-regulation inhibits insulin-like growth factor-I receptor signal transduction in H9C2 rat cardiomyoblasts.* Endocrinology, 2008. **149**(2): p. 461-5.
120. Ramasharma, K. and C.H. Li, *Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 2643-7.

121. Perrier d'Hauterive, S., et al., *Human chorionic gonadotropin and growth factors at the embryonic-endometrial interface control leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin 6 (IL-6) secretion by human endometrial epithelium.* Hum Reprod, 2004. **19**(11): p. 2633-43.
122. Martinez-Chequer, J.C., et al., *Insulin-like growth factors-1 and -2, but not hypoxia, synergize with gonadotropin hormone to promote vascular endothelial growth factor-A secretion by monkey granulosa cells from preovulatory follicles.* Biol Reprod, 2003. **68**(4): p. 1112-8.

ANEXO 1

EXTRACCION DE ARN TOTAL Y EVALUACION DE LA CALIDAD

1. Extracción de ARN total

Reactivos

- Agua DEPC (dietilpirocarbonato al 0,01%)
- Reactivo Trizol (Invitrogen, USA)
- Etanol 75%
- Buffer fosfato salino (PBS) frio
- Isopropanol 70%
- Cloroformo 100%

Protocolo

1. Lavar la monocapa celular con PBS frio. Lisar las células directamente en el plato de cultivo por adición de 1 ml de trizol y policía. Pasar el lisado celular por pipeta y sacudir en vortex.
2. Añadir 0.2 ml de cloroformo, dejar en incubación por 3 minutos.
3. Centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C.
4. Retirar la fase acuosa en la que se encuentra el RNA.
5. Precipitar el RNA mezclando con 0,5 ml de isopropanol. Incubar las muestras a 20°C por 10 minutos.
6. Centrifugar a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C.
7. Remover el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 75%.
8. Centrifugar a 5000 x g a 4 C. Remover el etanol
9. Redisolver el RNA en agua DEPC
10. Medir en espectrofotómetro la absorbancia a 260 nm y medir la razón de absorción A260/A280 para determinar la concentración y pureza de la muestra.

Utilizar materiales libres de ARNasas tratados con DEPC

2. Electroforesis de ARN en gel de agarosa

Reactivos

- Agarosa 1,5%
- Buffer MOPS: MOPS 0,02 M, Acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM
- Buffer carga 5 X: Glicerol 50 %. EDTA 10 mM, azul de Bromofenol y Xilencianol 0,025%
- Formaldehído 3,7%
- Formamida 50%

Protocolo

1. Preparar un gel de agarosa 1,5% en buffer MOPS y formaldehido al 3,7%

2. Depositar la mezcla fundida en la placa correspondiente y permitir la gelificación.

3. Preparar las muestras de ARN en una mezcla de formamida 50%, formaldehido 6,5% en buffer MOPS y buffer carga 1X.

4. Sembrar las muestras y el marcador de peso molecular en los pozos del gel correspondientes.

5. Correr la electroforesis en buffer MOPS durante 40 minutos a 80 V.

6. Teñir el gel con solución de bromuro de etidio en una concentración de 1 ug/mL.

7: Observar los fragmentos ribosomales en un transiluminador de luz ultravioleta.

Utilizar materiales libres de ARNasas tratados con DEPC

ANEXO 2

CUANTIFICACION DE NIVELES DE AMP CICLICO

Curva de calibración

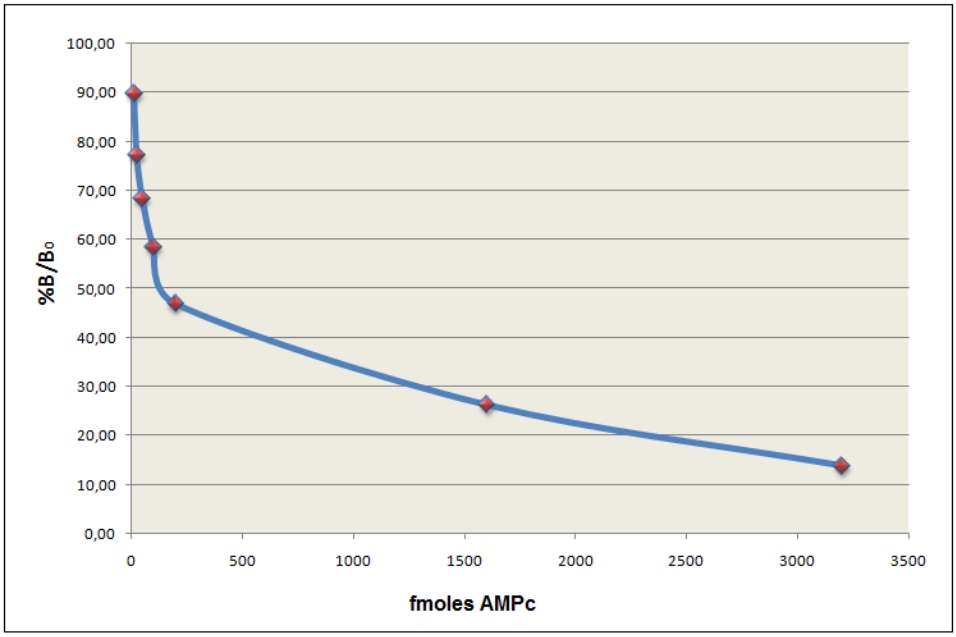
La medición de AMPc intracelular se realizó utilizando un kit inmunoenzimático competititivo (Amersham cAMP Biotrak RPN 2251, USA) analizando muestras por duplicado. El ensayo está basado en la competición entre el AMPc no marcado y una cantidad fija de AMPc acoplado a peroxidasa por la unión a un número limitado de sitios de unión en un anticuerpo específico para AMPc. Este kit posee una sensibilidad de 12.5 a 3200 fmol /pozo de AMPc.

En la preparación de la curva de calibración se utilizan estándares incluidos en el kit, con valores de 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 fmol/pozo. A estos estándares les es calculada la absorbancia a 630 nm junto con las respectivas muestras, según instrucciones de la metodología.

Se calcula el porcentaje de unión para cada estándar y muestra utilizando la relación:

$$\%B/B_0 = \frac{(\text{Abs estándar o muestra} - \text{abs NSB})}{(\text{Abs estándar 0 fmol} - \text{abs NSB})} \times 100$$

Donde NSB son estándares sin unión específica al conjugado de peroxidasa con AMPc

La curva de calibración se genera, graficando el porcentaje $\%B/B_0$ como función de la concentración de los estándares de AMPc (fmol). Para determinar la concentración de fmol de AMPc de las muestras, se comparan los valores de las muestras contra la curva de calibración.

La curva de calibración utilizada en los ensayos de AMPc fue la siguiente: