



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**PAPEL DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA
INSULINA (IGF) EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACIÓN TROFOBASTICA**

Sofía Isabel Freyre Bernal

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia
2010**

**PAPEL DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO SIMILARES A LA
INSULINA (IGF) EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACIÓN TROFOBASTICA**

Sofía Isabel Freyre Bernal

Trabajo de grado presentado para optar al título de
Maestría en Ciencias-Bioquímica

Dirigido por

Msc. Myriam Sánchez De Gómez

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C, Colombia
2010**

A mi familia, especialmente a mis hermanos capaces de transformar mis emociones, y aún lejos de lo terrenal, logran motivar cada uno de mis pasos. Finalmente a mi ángel guardián: mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos:

A la Dra. Myriam Sánchez de Gómez, Directora de tesis, por la forma que me acogió en su grupo, su eterna bondad y sin lugar a dudas representa un ejemplo de vida y academia.

A todos los integrantes del Grupo de investigación en Hormonas del Departamento de Química de la Universidad Nacional, especialmente a Diana, Andrés, Susana, Mónica, Juan Carlos, Sergio, María Claudia y a la profesora Adriana por su apoyo y amistad.

Al instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, a su director Dr Luis Fernando Cadavid por facilitar los equipos e instalaciones para desarrollar parte de este trabajo. Un agradecimiento especial a Rita Baldrich por su completa disposición a colaborar y excelente calidad humana.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, al profesor Hernando Curtidor por facilitar los equipos e instalaciones para desarrollar parte de este trabajo.

A cada uno de mis amigos que de manera oportuna supieron tenderme su mano para cruzar los momentos difíciles y seguir adelante en mis propósitos.

CONTENIDO

	Pág
Resumen	
Introducción	
1. Marco Teórico	3
1.1 Implantación Embrionaria	3
1.2 El trofoblasto y sus linajes celulares	5
1.3 Sistema de factores de crecimiento similares a la Insulina (IGF)	6
1.3.1 Factores de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I)	10
1.3.2 Factores de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-II)	11
1.3.3 Receptores de los factores de crecimiento similar a la insulina	12
1.4 El sistema IGF en tejidos trofoblásticos	14
1.5 Hormona Gonadotropina coriónica humana (hCG)	16
1.6 Receptor de la Hormona Gonadotropina coriónica humana (LH/CG-R)	20
1.7 Enfermedad trofoblástica gestacional	21
2. Definición del problema	23
3. Hipótesis	23
4. Objetivos	24
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. Materiales y métodos	25
5.1 Aproximación metodológica	25
5.2 Línea celular	25
5.3 Inducción de diferenciación	26
5.4 Determinación del estado de diferenciación en HTR-8/SVneo	26
5.5 Niveles de secreción de hCG en sobrenadantes del Cultivo celular de la línea celular HTR-8/SVneo con inductor de diferenciación.	27
5.6 Efecto de IGF-I e IGF-II en proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo	27
5.7 Perfiles de expresión de ligandos y receptores del sistema IGF	28
5.7.1 Extracción del ARN total	28
5.7.2 Síntesis de ADN complementario	29
5.7.3 Diseño de primers	29
5.7.4 PCR en tiempo real	30
5.8 Ensayo de ARN interferente	31
5.9 Análisis estadístico	32
6. Resultados	33

6.1 IGF-I e IGF-II estimulan la proliferación trofoblástica	33
6.2 Cambios de los niveles de expresión del sistema IGF hCG y su receptor en procesos de diferenciación	34
6.2.1 Expresión de miembros del sistema IGF en Células HTR-8/SVneo estimuladas con FSK	34
6.2.2 Expresión de miembros del sistema IGF en Células HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-I e IGF-II	35
6.2.3 Expresión de miembros del sistema IGF en Células HTR-8/SVneo tratadas con estímulos Combinados de IGF-II y FSK	36
6.2.4 Expresión de la hCG y su receptor (LH/CG-R) en células HTR-8/SVneo durante la diferenciación trofoblástica.	38
6.3 Niveles de secreción de hCG durante el proceso de diferenciación trofoblástica	40
6.4 Cambios morfológicos de la línea celular del trofoblasto extravelloso durante diferenciación trofoblástica	42
6.5 Papel de los receptores IGF-IR e IGF-IIR en la expresión de hCG en la línea celular HTR-8/SVneo.	43
7. Discusión	48
7.1 IGF-I, IGF-II estimulan la proliferación trofoblástica	48
7.2 Durante el proceso de diferenciación trofoblástica aumenta la expresión de IGF-II y su receptor	49
7.3 IGF-II induce de su receptor en células trofoblásticas	50
7.4 La diferenciación trofoblástica humana está acompañada de la expresión de hCG y su receptor (LH/CG-R)	52
7.5 IGF-II induce la secreción de hCG durante la la diferenciación trofoblástica	53
7.6 El receptor de IGF-IIR tiene un papel significativo en la Expresión y secreción de hCG durante la diferenciación trofoblástica	55
8. Conclusiones	58
9. Recomendaciones	60
10. Financiación	61
11. Producción Científica	62
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

1.	Niveles de IGF-I, IGF-II y hCG en embarazo normal y mola completa.	16
2.	Concentraciones Séricas de hCG en embarazo normal y en patologías	20
3.	Mezcla de la reacción de transcripción reversa	29
4.	Secuencia de los primers utilizados para PCR en tiempo real	30
5.	Cambios de expresión de miembros del sistema IGF, hCG y LH/CG-R durante el proceso de diferenciación en la línea celular HTR-8/SVneo	40
6.	Concentraciones de hCG de los estándares de calibración	71

INDICE DE GRÁFICAS

1	El periodo de compactación durante el desarrollo embrionario	3
2	Pasos de implantación del blastocisto humano	4
3	Diferenciación del trofoblasto	6
4	Expresión y clivaje proteolítico de la hormona polipeptídica Insulina	8
5	Estructura terciaria de ligandos del sistema IGF	8
6	Sistema IGF, ligandos y receptores	13
7	Representación esquemática de las isoformas del receptor de insulina y su afinidad por ligandos del sistema IGF	13
8.	Representación esquemática de la formación de los receptores híbridos	14
9	Esquema de las estructuras de las 15 variantes de HCG más comunes presentes en muestras de suero y la orina	18
10	Reducción del MTT por actividad mitocondrial	27

11	Programa de PCR en tiempo real	31
12	Proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo medida por MTT	34
13	Expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/SVneo tratadas con FSK a 48h y 72h	35
14	Expresión de receptores del sistema IGF en la línea celular HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-I e IGF-II (10nM).	36
15	Efecto de la combinación de FSK e IGF-II en la expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/Svneo	37
16	Expresión de hCG en células de trofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-II (10nM)	38
17	Expresión del receptor de hCG en células HTR-8/SVneo tratadas con FSK (25µM), IGF-I (10nM), IGF-II (10nM) y combinación de estímulos de IGF-II y FSK	39
18	Secreción de hCG en células HTR-8/SVneo	41
19	Cambios morfológicos de células HTR-8/SVneo durante procesos de diferenciación trofoblástica	42
20	Perfil de expresión de hCG en células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR).	44
21	Secreción de hCG de células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o interferidas para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR)	45
22	Secreción de HCG de células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) e interferidas para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR)	46
23	Secreción de hCG en células HTR-8 con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR).	47
24	Curvas de calibración para inmunoensayo IRMA	72

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	Proteína quinasa de regulación extracelular
ETG	Enfermedad trofoblástica gestacional
EVT	Trofoblasto extraveloso
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-R α	Receptor de insulina isoforma alfa
INS-R β	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

El desarrollo de la placenta humana involucra procesos de diferenciación y fusión intercelular del citotrofoblasto vellosos hasta sincitiotrofoblasto. En la fase inicial de la diferenciación trofoblástica, las células del citotrofoblasto proliferan y se fusionan para formar un sincitio multinucleado. Durante este proceso de diferenciación se sabe que las células se someten a cambios en la expresión de genes y secreción de proteínas como la hormona Gonadotropina Coriónica humana (hCG), no obstante, el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso aún no es claro. Así mismo, el sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) participa en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron alteraciones del sistema IGF en la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG), corrientemente diagnosticada por los elevados niveles circulantes de la hCG.

En este trabajo se evaluó la influencia de algunos componentes del sistema IGF sobre la diferenciación del trofoblasto humano, la interacción entre IGF-II y la expresión y/o secreción de hCG, al igual que las alteraciones en el sistema IGF y su posible implicación en la patogénesis de la ETG. Se utilizó como modelo de estudio la línea celular HTR-8/SVneo de trofoblasto extraveloso de primer trimestre. Inicialmente se indujo diferenciación por tratamiento con forskolina (FSK) 25 μ M sola o en combinación con IGF-I e IGF-II (10 nM). Los cambios en la expresión de miembros del sistema IGF, hCG y su receptor se evaluaron a través de qPCR, y los niveles de secreción de hCG mediante inmunoensayo (IRMA).

Los resultados mostraron que IGF-II estimula la diferenciación trofoblástica y la producción de la hCG. El tratamiento con el inductor de diferenciación, FSK (25 μ M) en combinación con IGF-II incrementó los niveles de hCG (700 veces) con respecto al resultado observado solo con IGF-II (400 veces). Este efecto es específico para IGF-II y no se observó con IGF-I. Estos incrementos correlacionaron con los resultados de expresión medidos por qPCR, donde los

mayores niveles de transcritos para hCG (seis veces) se encontraron en células tratadas con IGF-II. Mediante el uso de línea celular HTR-8/SVneo interferida para el IGF-IIR se encontró que los niveles de secreción de hCG en periodos de 48h y 72h de estímulo con IGF-II disminuyeron a valores de 3 mUI/ml después de 72h de cultivo comparado con valores de hasta 1289mUI/ml para células HTR-8/SVneo sin interferencia. Los hallazgos por microscopia evidenciaron que después de 48h de exposición a FSK, las células crecieron en extensión, formaron proyecciones mayores de su citoplasma y comenzaron a interactuar más estrechamente con células vecinas. Por su parte el tratamiento con IGF-II (10 nM) a 72h mostro presencia de células gigantes e indicios de transformaciones celulares.

Estos hallazgos demuestran que IGF-II induce específicamente la secreción de hCG, probablemente de forma similar, a lo que ocurre en la ETG. Esto lleva a proponer que el aumento en los niveles de IGF-II puede estar relacionado con el desarrollo de la enfermedad, por lo que podría ser usado como un marcador pronóstico temprano.

INTRODUCCIÓN

Durante el primer trimestre del embarazo, células primarias bien diferenciadas de la placenta conocidas como células trofoblásticas crecen de una manera invasiva y destructiva de manera análoga a las células malignas, pero con límites en espacio y tiempo. La comparación de células trofoblásticas con sus homólogas malignas ofrece un modelo atractivo para entender el origen o desarrollo del crecimiento maligno. Precisamente, esta condición innata de las células trofoblásticas permite que se lleven a cabo estudios sobre éste modelo celular. Dichos estudios conducen a aclarar fenómenos moleculares de desregulación trofoblástica asociados a la génesis de patologías como la Enfermedad Trofoblástica Gestacional (ETG).

La ETG se conoce como 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. A pesar de la importancia que la mola hidatidiforme posee en nuestro país, existen muy pocos estudios que han abordado las razones de su origen, sus factores de riesgo y su incidencia en el medio colombiano. En un estudio reciente adelantado en la ciudad de Bogotá 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].

Con respecto a las bases moleculares del origen de la enfermedad y de su progresión a la malignidad, existe un gran desconocimiento. El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) es un regulador importante de la

proliferación, diferenciación e invasión en un gran número de tejidos y tipos celulares y ha sido involucrado en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto. La expresión de los IGF y sus receptores en las membranas placentales, sugieren que este sistema de factores de crecimiento puede tener un papel en la invasión anómala característica de la enfermedad trofoblástica gestacional. Tanto el sistema IGF como la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) aumentan sus niveles de expresión durante las fases tempranas del embarazo, lo cual sugiere la importancia de estudiar los fenómenos de diferenciación trofoblástica y su relación con la estimulación y expresión con cada uno de éstas moléculas. En consecuencia, este proyecto tuvo como objetivo establecer el papel del sistema IGF en el crecimiento y diferenciación de células trofoblásticas mediante la inducción y seguimiento del proceso, evaluando cambios en la expresión de hCG y miembros del sistema IGF. Esta investigación es complementaria a otros trabajos que se adelantan en el Grupo de Investigación en Hormonas del Departamento de Química y que buscan comprender los fenómenos moleculares asociados a ETG y las implicaciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) en el diagnóstico de la ETG.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Implantación embrionaria

La implantación es el proceso a través del cual el ovulo fertilizado o cigoto se adhiere e invade el endometrio. Esto le garantiza acceso a la circulación materna que lo sostendrá desde las etapas tempranas de su desarrollo hasta su nacimiento [2]. La implantación suele dividirse en tres fases: transporte del cigoto, interacción con el epitelio y fase invasora. La fase de transporte comprende el desplazamiento del cigoto al sitio de anidamiento o implantación dentro de la cavidad uterina. La fase de interacción involucra una etapa de adhesión inestable conocida como aposición y otra estable conocida como adhesión. A partir de este punto de contacto, el cigoto inicia la invasión y avanza hacia regiones más profundas o subyacentes al epitelio uterino [3]. El cigoto, que en esta etapa de desarrollo se encuentra en estadio de blastocisto, desarrolla una línea celular periférica llamada trofoectodermo o trofoblasto (Figura 1 y 2), el cual da origen a un tipo celular conocido como citotrofoblasto.

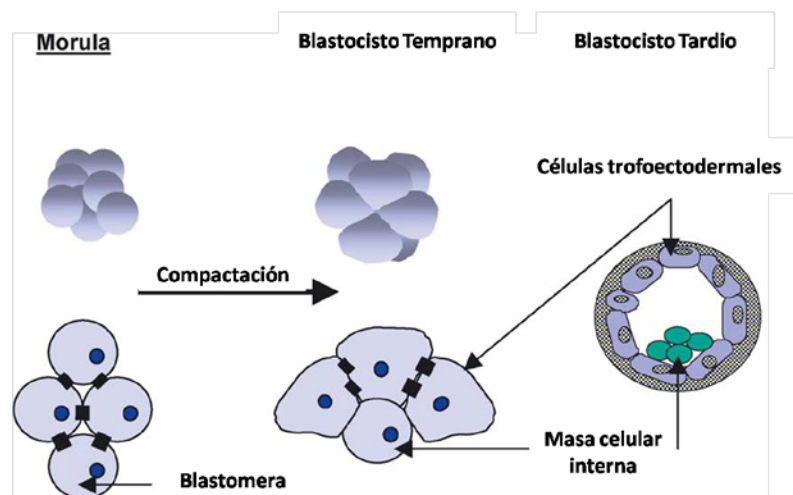


Figura 1. El periodo de compactación durante el desarrollo embrionario. Tomado y adaptado de Paul Bischof, Irmgard Irminger-Finger. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (2005)

Durante la fase de invasión, las células del citotrofoblasto se alteran en dos destinos diferentes, que dan origen al citotrofoblasto vellosos y al citotrofoblasto extraveloso. El vellosos es una célula de naturaleza no invasora que se diferencia a sinciotrofoblasto, el cual es una célula multinuclear no proliferativa localizada en la parte más externa del blastocisto. El sinciotrofoblasto está en contacto con la circulación materna, por lo tanto, tiene un papel importante como barrera de intercambio de gases y nutrientes en la remoción de productos de desecho del feto; proporciona protección inmunológica y tiene la capacidad de secretar hormonas [4]. El citotrofoblasto extraveloso es una célula proliferativa de naturaleza invasora. Durante la fase invasora migra a través del epitelio uterino con dirección a la lámina basal en la que descansa e invade el estroma uterino hasta el nivel superficial del miometrio en búsqueda de las arterias espirales, hace contacto con ellas, las invade e induce cambios estructurales y fisiológicos, los cuales permiten la comunicación entre el sistema circulatorio materno y el fetal [2].

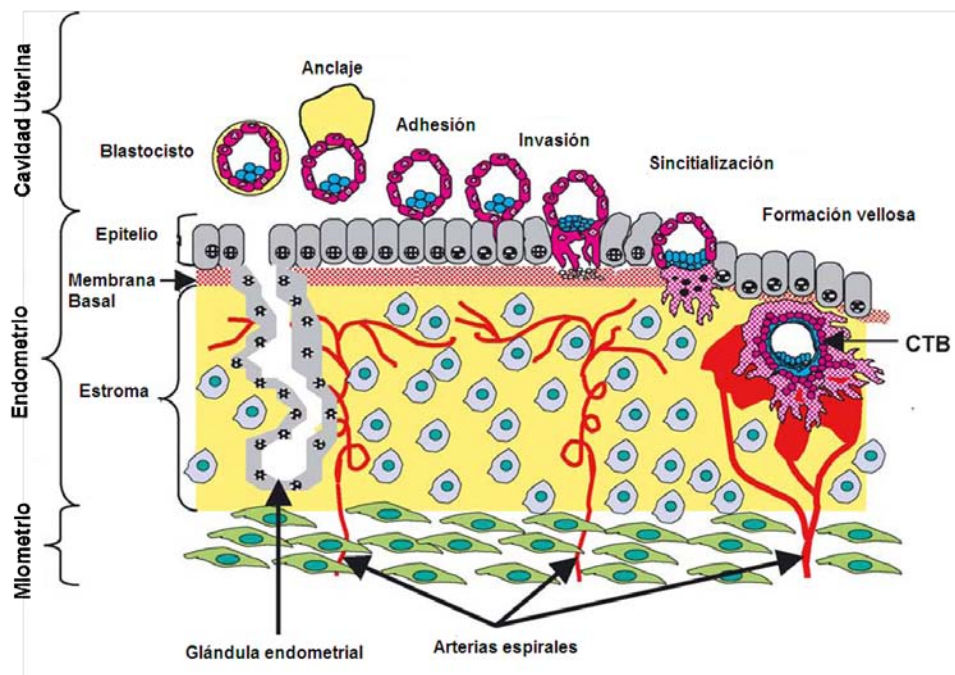


Figura 2. Pasos de implantación del blastocisto humano. Tomado y adaptado de Paul Bischof, Irmgard Irminger-Finger. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (2005)

1.2 El trofoblasto y sus linajes celulares

Al iniciarse la gestación, el ser humano sufre una serie de rápidas transformaciones que son vitales para su supervivencia. Se producen inicialmente dos linajes celulares: el trofoblasto que formará la placenta y el embrioblasto que formará al embrión. El linaje celular trofoblástico está compuesto por tres tipos diferentes de células: el citotrofoblasto (CT), el sincitiotrofoblasto (ST) y el trofoblasto intermedio (TI) [3]

El trofoblasto se forma durante el primer trimestre de embarazo y está compuesto por células invasivas, erosionantes y metastáticas de la placenta, por medio de las cuales se logra la implantación del embrión al endometrio uterino. Está conformado por diferentes poblaciones celulares como el citotrofoblasto vellosos (vCT), el ST y el citotrofoblasto extraveloso (evCT) que invade el estroma uterino junto con las arterias espirales y forma las vellosidades coriónicas de anclaje. [2, 5]. Las células del citotrofoblasto, son células mononucleares con citoplasma bien definido, por su parte el sincitiotrofoblasto que se desarrolla a partir del citotrofoblasto, consiste en células multinucleadas que no presentan mitosis y que están expuestas a la sangre materna y a sus efectores inmunes. Por último el TI, que forma una transición entre el ST y el CT, se desprende de las vellosidades y reemplaza las células endoteliales de las arterias maternas que migran a la placenta [6]. Para tener mayor claridad al respecto la figura 3 ilustra el proceso de diferenciación trofoblástica.

La función más importante del trofoblasto es establecer y mantener el sitio de implantación embrionario; para esto se requiere invadir la vasculatura del endometrio materno y 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 [7].

Esta función trofoblástica es clave, ya que ejerce una regulación directa e indirecta sobre la producción de progesterona, mediante la hGC. 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 para el proceso de implantación [8], entre los cuales se encuentran, según estudios recientes, al factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) y la hCG [9, 10]. Por su parte, el sincitiotrofoblasto expresa otro tipo de hormonas como la variante placentar de la hormona de crecimiento (hGHv) [11, 12]

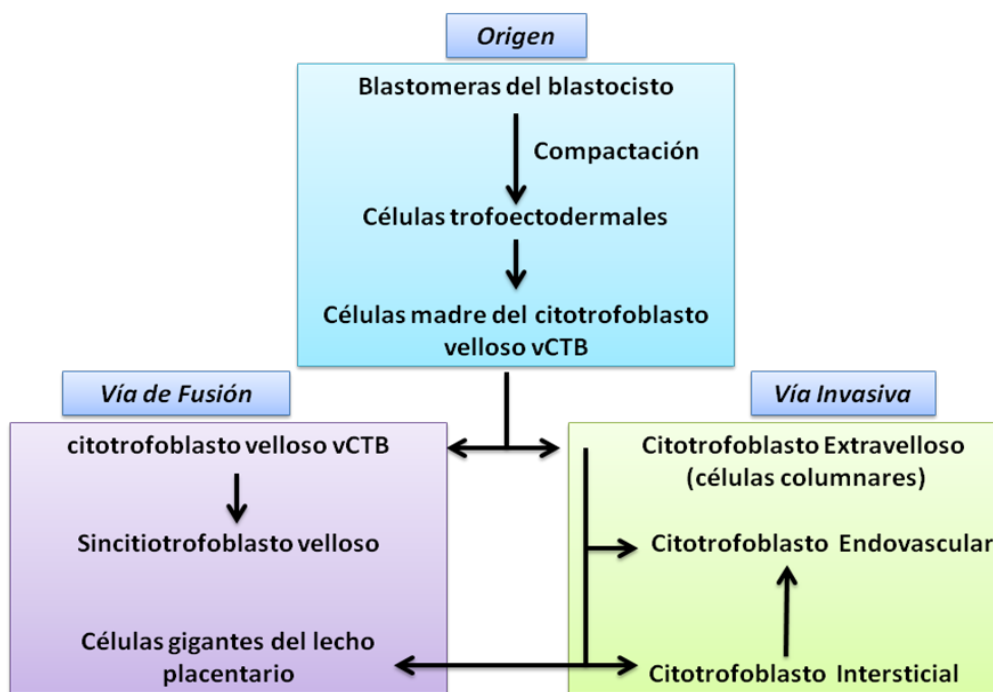


Figura 3. Diferenciación del trofoblasto. Tomado y Adaptado de Paul Bischof, Irmgard Irminger-Finger. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 37 (2005)

1.3 Sistema Factores de Crecimiento similares a la Insulina (IGF)

La Hormona de Crecimiento (GH) y los Factores de Crecimiento Similares a la Insulina (IGF-I e IGF-II) juegan un importante papel en el crecimiento y desarrollo

normal de las células. El sistema IGF es importante para el crecimiento y desarrollo de muchos tejidos, tanto durante el desarrollo embrionario, fetal y postnatal del ser humano. De igual manera el sistema IGF también se ha considerado como un factor fisiopatológico directamente en el desarrollo tumorigénico.

La hormona insulina fue el primer miembro de la familia de los factores de crecimiento IGF. Esta hormona de origen pancreático se expresa como una preprohormona inmadura con cuatro segmentos funcionales: (1) un péptido señal N-terminal para secreción, (2) una cadena B conservada, (3) un péptido C no conservado, y (4) y una cadena A, C-terminal. Para la convertir de preprohormona a prohormona es necesario la pérdida del péptido señal N-terminal, la consecuente formación de dos puentes disulfuro entre las cadenas A y B y otro enlace disulfuro en la cadena A, seguido por el clivaje proteolítico el péptido C (con la excepción para IGF-I y II, los cuales son péptidos de una sola cadena), resultando en un maduro, activo y heterodimérico péptido A-B [13], (figura 4). La estructura primaria de cada miembro del sistema IGF ya fue determinada. La homología entre los miembros no presenta mayor diferencia, sin embargo adoptan estructuras terciarias similares como se muestra en la figura 3. Las estructuras terciarias de insulina, IGF-I e IGF-II fueron establecidas por cristalografía de rayos X o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [13, 14] (figura 5)

Como se había mencionado el sistema IGF constituido por los ligandos IGF-I e IGF-II, seis proteínas de unión completamente caracterizadas (IGFBP-1 a -6), y cuatro receptores de superficie celular que median la acción de los ligandos, receptor de IGF-I (IGF-IR), el receptor de IGF-II (IGF-IIR), el receptor de insulina (InsR) y los denominados receptores híbridos [14, 15].

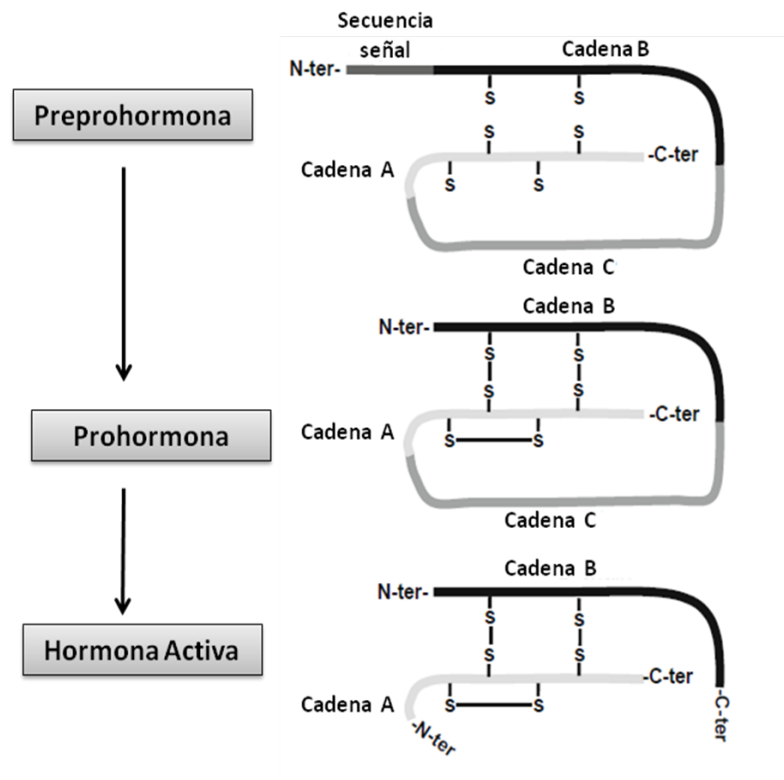


Figura 4. Expresión y clivaje proteolítico de la hormona polipeptídica insulina. Tomado y adaptado de Fazel Shabanpoor, Frances Separovic and John D. Wade. *The Human Insulin Superfamily of Polypeptide Hormones* (2009).

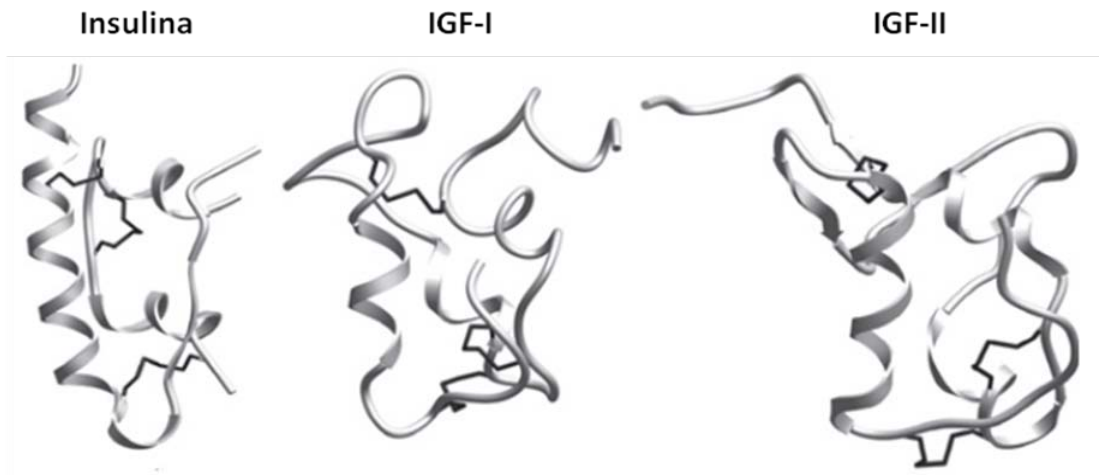


Figura 5. Estructura terciaria de ligandos del sistema IGF. Tomado y adaptado de Fazel Shabanpoor, Frances Separovic and John D. Wade. *The Human Insulin Superfamily of Polypeptide Hormones* (2009).

El principal mediador de sus actividades celulares es el receptor IGF-IR una proteína transmembranal con actividad tirosina quinasa que posee mayor afinidad por el IGF-I que por el IGF-II. El receptor IGF-IIR posee un gran dominio extracelular y no presenta actividad tirosina quinasa. Se une con mayor afinidad al IGF-II que al IGF-I. Este receptor no se une a insulina pero sí actúa como un receptor de ligandos con manosa-6-fosfato [16]

Las acciones biológicas de los IGF, pero no de la insulina, están moduladas por las proteínas de unión, también denominadas como proteínas transportadoras, las cuales modulan disponibilidad de los IGF y regulan la interacción con sus receptores. La actividad biológica de los IGF es controlada por varios factores como el número de sitios receptores en la superficie de las células blanco (lo cual determina la intensidad del efecto del péptido), la asociación con las proteínas de unión IGFBPs y el control hormonal de la expresión de su receptor.

La desregulación del sistema IGF está asociada con la estimulación del crecimiento y supervivencia de células cancerosas. Igualmente se ha demostrado que el eje GH/IGF-I es un componente esencial de la red inmunoendocrina ya que tanto la GH como el IGF-I son sintetizados y secretados por varias células inmunocompetentes y sus receptores específicos son expresados sobre dichas células.

El IGF-I y el IGF-II son factores de crecimiento estructuralmente relacionados con la insulina, lo que hace pensar que los IGF y la insulina se han derivado de una molécula ancestral común. Su estructura está muy conservada en la naturaleza ya que todos los IGF de mamíferos contienen el mismo número de aminoácidos y el número de sustituciones es relativamente bajo [16, 17]

Los niveles de expresión del gen IGF-I son diferentes en las etapas consecutivas del desarrollo. Varios reportes han descrito la presencia de bajos niveles de

proteína y ARNm de IGF-I durante las últimas etapas de embriogénesis. El modo de acción de IGF-I en las etapas embrionarias es generalmente considerada como autocrina/paracrina. Los niveles de ARNm y proteína de IGF-II son altos en la mayoría de tejidos fetales, placenta y notablemente en el hígado [18]. El IGF-II juega un importante papel en el desarrollo embrionario y fetal y ha sido identificado en una variedad de células de la placenta humana y la decidua durante la gestación.

1.3.1 Factor de Crecimiento Similar a la Insulina Tipo I (IGF-I)

El IGF-I es un péptido de 70 aminoácidos, relacionado estructuralmente a la insulina (50% de homología en la secuencia) y al factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2 (IGF-II) (70% de homología), es normalmente considerado como una hormona metabólica, la cual media varios de los efectos anabólicos de la GH [19]. El IGF-I humano es una cadena sencilla de 7.5 kDa y al comparar la secuencia primaria se observa tres dominios designados A, B y C semejantes a la proinsulina y un dominio adicional D que posee el carboxilo terminal, el cual no se encuentra en la proinsulina [20].

Los niveles de expresión del IGF-I son diferentes en las etapas consecutivas del desarrollo. El transcrito de IGF-I ha mostrado estar presente en la preimplantación del embrión de ratón. Un aumento en los niveles de ARNm ha sido observado en etapas de blastocisto [21]. Numerosos reportes han descrito la presencia de bajos niveles de proteína y ARNm de IGF-I durante las últimas etapas de embriogénesis. El modo de acción de IGF-I en las etapas embrionarias es generalmente considerada como autocrina/paracrina.

Los niveles hepáticos de ARNm de IGF-I aumentan marcadamente alrededor del nacimiento cuando el hígado llega a ser el principal productor de IGF-I endocrino. En humanos, un segundo pico de la producción de IGF-I coincide con el período

de la pubertad en consecuencia de un incremento transitorio en la secreción de la GH como resultado de la acción de las hormonas sexuales [22]

1.3.2 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 la insulina. La proteína consta de 4 dominios A, B, C y D y tiene un peso de 7.5 kDa. El IGF-II juega un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo fetal, estimula la proliferación celular y puede inducir diferenciación celular. El gen del factor de crecimiento IGF-II, se encuentra ubicado en un clúster del cromosoma 11, (clúster 11p15 en humanos, cromosoma 7 en ratones) de aproximadamente 160 Kb junto con el gen H19 no codificante. El gen *Igf2* posee 4 promotores [23] numerados de P1-P4, 4 regiones diferencialmente metiladas (DMRs) y comparte con el H19 una serie de 6 amplificadores (enhancers) de los cuales 2 conducen a la expresión en tejidos endodérmicos y 4 en tejidos mesodérmicos [24]. Si bien el H19 es coexpresado con el *Igf2* y comparte elementos comunes, no se ha determinado un rol para su ARN transcrito, aunque se ha sugerido que este puede regular la impronta del *Igf2* actuando como un elemento en *trans* [25].

El IGF-II se expresa en el citotrofoblasto y en el sincitiotrofoblasto y su patrón de expresión cambia con la edad gestacional, ya que se expresa de manera abundante en el primer trimestre de embarazo, disminuyendo gradualmente durante el segundo y tercer trimestre [26]. Por su parte el IGF-I es expresado por las membranas fetales en baja concentración en el primer trimestre y no es expresado por la decidua o el trofoblasto, mientras que en el segundo y tercer trimestres de gestación es expresado por el citotrofoblasto. También se ha demostrado la habilidad del IGF-II para estimular la migración de varios tipos celulares, tanto normales como malignos, incluyendo células de trofoblasto extraveloso y cáncer de pulmón. Está migración de las células del trofoblasto

extravelloso estaría mediada por su receptor (IGF-IIR) y sería independiente de IGF-IR e IGFBP-1 [27, 28]. El IGF-II podría inducir la invasión trofoblástica mediante la activación del receptor de Insulina y activando la vía PI3K, como se ha mostrado en estudios realizados en células JEG-3 de coriocarcinoma [16]

1.3.3 Receptores de los factores de crecimiento similares a la Insulina

Los receptores para IGF e insulina son específicos y están situados en la membrana celular de las células diana y mediante la activación de éstos pueden desencadenar sus efectos biológicos. Los receptores son: Receptor IGF-I (IGF-IR), receptor IGF-II (IGF-IIR), receptor de insulina (InsR), receptor híbrido de insulina e IGF-I (IGF-IR/InsR) (figura 6).

El IGF-I como el IGF-II interactúan con el receptor IGF-IR [29], un receptor transmembranal de tipo tirosina quinasa y estructuralmente relacionado con el receptor de insulina.

Aunque el IGF-IIR es el receptor inicial de IGF-II, la mayoría de sus acciones son llevadas a cabo mediante el IGF-IR [30]. El IGF-IIR, actúa también como receptor independiente de cationes de manosa-6-fosfato (M6P). Esta proteína funciona como receptor para la depuración del IGF-II regulando los niveles extracelulares del mismo [31], a pesar que otros autores han sugerido que el IGF-II señala directamente por su receptor dando lugar a efectos biológicos como la migración e invasión trofoblástica [8].

Con respecto al InsR se han identificado en mamíferos dos isoformas derivadas del empalme variado del exón 11, que codifica para un fragmento de 12 aminoácidos en el terminal carboxilo de la subunidad extracelular [32]. La isoforma A (InsR-A) carece del exón 11 y tiene afinidad dos veces mayor por la insulina que la isoforma que posee el exón (InsR-B). El IGF-II tiene mayor afinidad por InsR-A y pueden mediar efectos proliferativos (figura 7) [33].

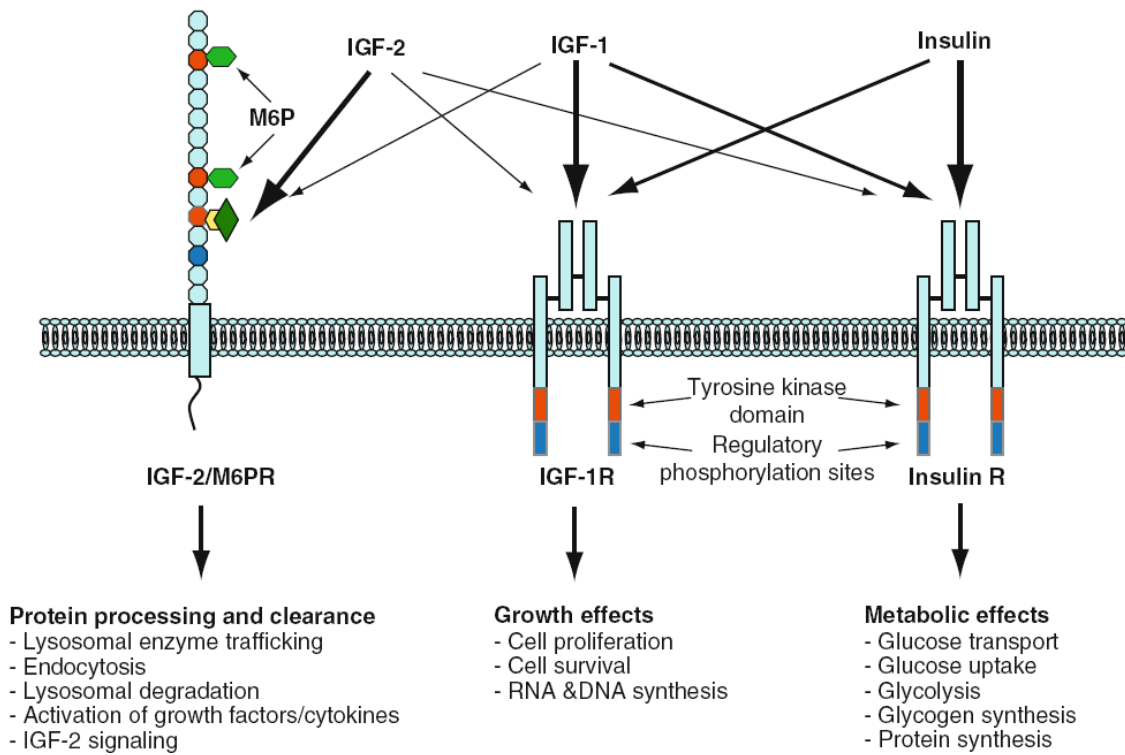


Figura 6. Sistema IGF, ligandos y receptores. Tomado de Begley *et al.* 2009.

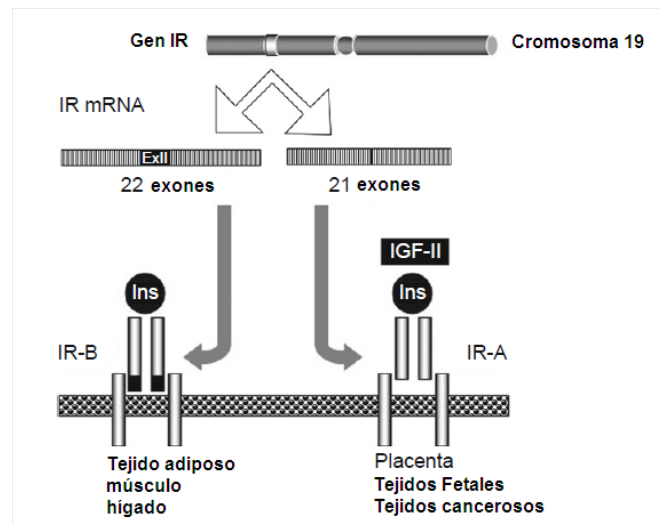


Figura 7. Representación esquemática de las isoformas del receptor de insulina y su afinidad por ligandos del sistema IGF. Tomado y adaptado de Begley *et al.* 2009

Por su parte los receptores híbridos (HRs) presentan homología por el receptor de insulina y el IGF-IR, en consecuencia existe en las células y los tejidos co-expresión de ambos receptores y se observa heterodimerización entre el hemireceptor de insulina y el hemireceptor de IGF-I, lo cual conduce a la formación del receptor híbrido (figura 8). El rol biológico de éstos receptores no está totalmente claro, sin embargo se sabe que ellos pueden enlazar con alta afinidad al IGF-I [34, 35], mientras que lo hacen con baja afinidad para la insulina [36].

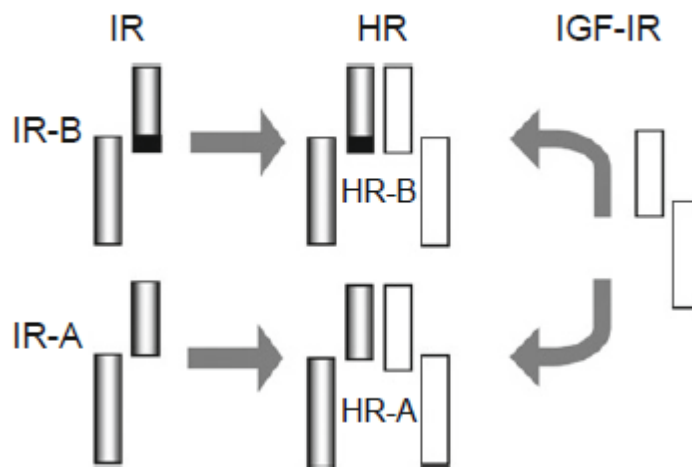


Figura 8. Representación esquemática de la formación de los receptores híbridos. Tomado de Genua M, Pandini G, Cassarino MF. Vitamins and hormones. 2009

1.4 El sistema IGF 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 extraveloso. 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 extraveloso *in vitro* [8, 37, 38].

Ambos factores incrementan la proliferación y supervivencia de fibroblastos placentares y pueden rescatar a los trofoblastos y a los fibroblastos placentales de la apoptosis. El IGF-I también es importante en la diferenciación del sincitiotrofoblasto o del trofoblasto extraveloso, 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 [39]

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 veloso. El IGF-IR se localiza en todos los tipos celulares placentarios incluyendo el trofoblasto, el endotelio veloso 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 [28, 40]

En trabajos anteriores del grupo de investigación se encontró que pacientes con mola completa a las 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) [26].

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

Concentraciones Sericas	IGF-I (ng/ml)		IGF-II (ng/ml)		hCG Promedio (mUI/ml)	
	Primer Trimestre	Segundo Trimestre	Primer Trimestre	Segundo Trimestre	Primer Trimestre	Segundo Trimestre
Aborto	204 \pm 19	262 \pm 18	986 \pm 49	732 \pm 138	82.232	115.293
Mola Completa	214 \pm 20	246 \pm 57	1050 \pm 63	1077 \pm 77	542.706	493.586
Embarazo	343 \pm 20	312 \pm 7,2	756 \pm 9,7	818 \pm 22	73.500	69

Tomado de Cantero, 2004

1.5 Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hGC)

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una glicoproteína heterodimérica compuesta de una subunidad α y una subunidad β . La subunidad α es idéntica a la subunidad α de la hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante de tiroides (TSH), mientras que la subunidad β es específica y por tanto le confiere su actividad biológica [4, 39]. La subunidad β esta codificada por 6 genes localizados en el cromosoma 19 que a su vez dan origen a una proteína de 165 aminoácidos, por su parte el gen de la subunidad α localizado sobre el cromosoma 6 y codifica para una proteína de 166 residuos. Además tanto la subunidad β como la α están marcadamente glicosiladas [3]; a

pesar que la glicosilación de las cadenas polipeptídicas es normal, existe una variante de la hCG que contiene mayor cantidad de oligosacáridos, a esta variante se le llama hiperglicosilada, la cual es predominante en las primeras etapas del embarazo, sin embargo también se ha evaluado la presencia de hCG hiperglicosilada en algunos cánceres trofoblásticos [41] (Figura 9). La síntesis de hCG está regulada por varios factores independientes incluyendo la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y leptina, las cuales inducen a la secreción pulsátil de hCG [42].

La hCG es producida específicamente por la placenta, principalmente por el sincitiotrofoblasto [43] y también algunas células del citotrofoblasto veloso. Se considera que la síntesis de hCG en ST depende de la tasa de diferenciación del CT [3].

Para que la hCG pueda llevar a cabo sus efectos biológicos como la regulación de la invasión trofoblástica, se hace necesario activar sus receptores, los cuales se conocen como receptores LH/CG-R, los cuales se han identificado como miembros de la subfamilia de los receptores acoplados a proteína G denominados rodopsina/ β 2-adrenérgicos. La forma madura del receptor de hCG, presente en la superficie de la membrana celular, es un glicoproteína con un aparente peso molecular de 85-95KDa [44]. Por enlace al receptor LH/CG-R, el papel clásico de la hormona está en mantener la producción de hormonas esteroidales en el cuerpo lúteo hasta la séptima semana de gestación [45]. Diversos efectos de hCG sobre células fetales y maternas fueron detectados incluyendo aumento de diferenciación de trofoblasto y decidualización, inhibición de la contractilidad miometral, y promoción de angiogénesis uterina [9, 10]. Esto seguramente ha llevado a pensar que el uso de la hormona puede ser de aprovechamiento terapéutico para tratar diversas enfermedades asociadas a estos tejidos

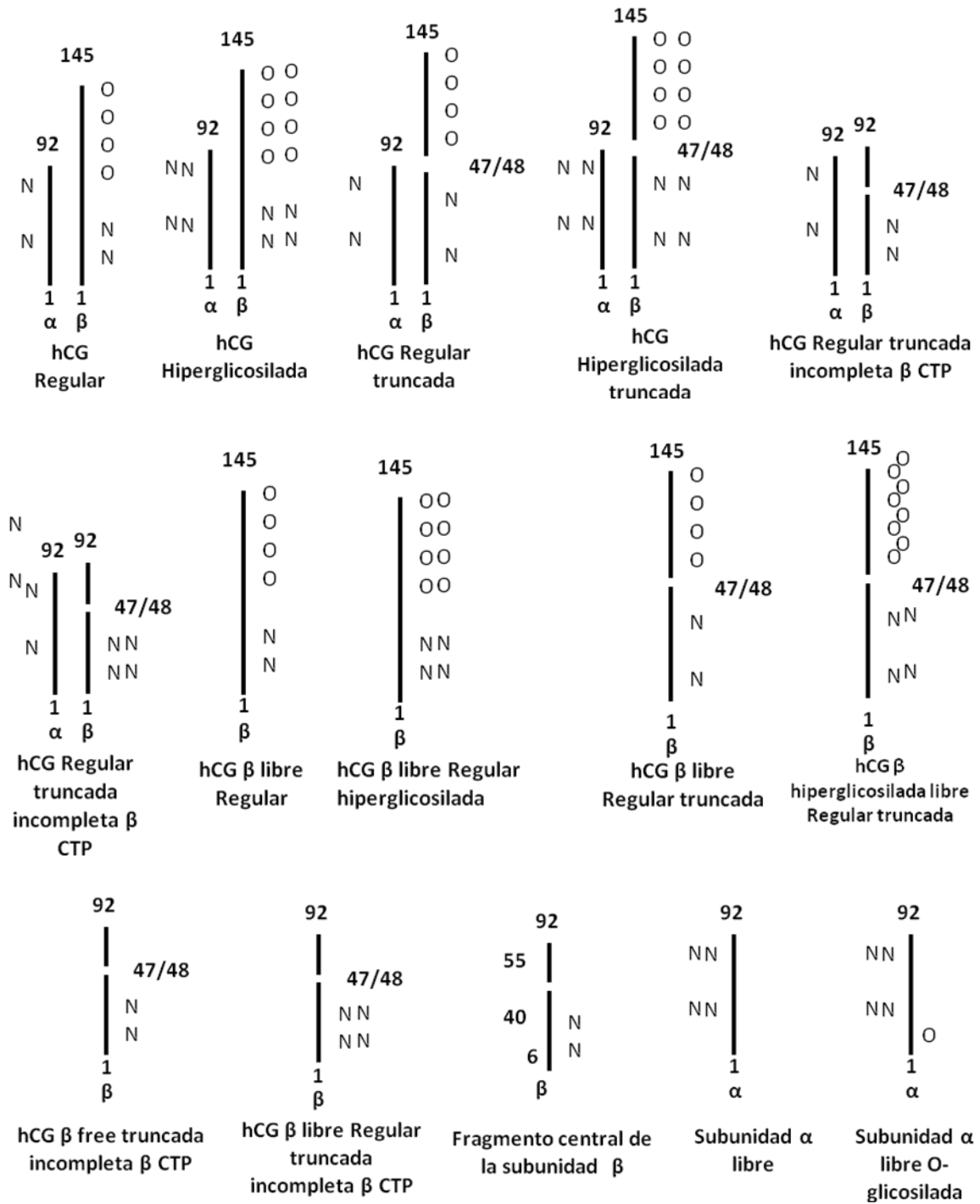


Figura 9. Esquema de las estructuras de las 15 variantes de HCG más comunes presentes en muestras de suero y la orina. Tomado y adaptado de Laurence A Cole 2009

Actualmente, resultados positivos del uso terapéutico de hCG se han observado en pacientes con aborto espontáneo, labor pre término, cáncer de seno, o endometriosis [41], lo cual puede ser parcialmente explicado por los efectos anti-inflamatorios de la hormona [46, 47].

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 [26].

Existe una correlación positiva entre los niveles de hCG y la invasión trofoblástica como se ha observado en embarazos ectópicos, indicando un posible efecto estimulador 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) [7, 48].

Tabla 2. Concentraciones Séricas de hCG en embarazo normal y en patologías.

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

Modificado de Stenman et al. 2006

1.6 Receptor de la Gonadotropina Coriónica/ Hormona Luteinizante (LH/CG-R)

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 dominio 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 [49-51]. 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 [52].

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. En células trofoblásticas SGHPL-5, la estimulación con hCG promueve la activación entre otras de la vía de MAP quinasas. 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 señalar a través del receptor TGF- β para promover la invasión [45, 53, 54].

1.7 Enfermedad Trofoblástica Gestacional

Se conoce con el nombre de Enfermedad Trofoblástica Gestacional (ETG) a un conjunto de procesos benignos y malignos poco habituales, originados por una fertilización anormal dando lugar a un concepto con exceso de genoma paterno. Incluye enfermedades como la mola completa, la mola parcial o incompleta, la mola invasiva, el coriocarcinoma y el tumor trofoblástico de sitio placentario.

Se caracterizan por la transformación del tejido placentario en vesículas hidrópicas de diferente tamaño. Algunas de estas lesiones son neoplasias verdaderas y otras

representan formaciones anormales de la placenta con predisposición de transformación neoplásica del trofoblasto [55].

La mola hidatidiforme (MH) se caracteriza por hiperplasia trofoblástica y tumefacción edematosa de las vellosidades coriónicas o tumefacción quística de las vellosidades placentarias, acompañada de una proliferación trofoblástica variable [6]. Constituye aproximadamente el 80% de los tumores del trofoblasto. Se trata de un embarazo intrauterino, excepcionalmente extrauterino en el que las vellosidades coriónicas están dilatadas formando quistes. Microscópicamente aparece como un tejido esponjoso, trabecular, lleno de coágulos y vesículas independientes de tamaño variable de hasta 2 cm de diámetro, adquiriendo la morfología de bandas y cúmulos de vesículas que se asemejan a granas o racimos de uvas, con proliferación variable del citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto. La mola se presenta en aproximadamente 1 de cada 1000 embarazos en Europa y en Asia, mientras que en Colombia es de 3.75 casos por cada 1000 embarazos, lo cual la convierte en un problema de salud pública [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 [56].

En el coriocarcinoma, ocurre una proliferación atípica del trofoblasto 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 [57]. Todos estos procesos se caracterizan por una secreción anormalmente elevada y prolongada de la hGC por más de 6 semanas después del suceso gestacional utilizándose la elevada secreción de esta hormona como método diagnóstico de la enfermedad.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El trofoblasto comparte muchas características con células malignas, tales como el alto nivel de proliferación celular, falta de inhibición por contacto celular, propiedades de migración e invasión, perfil de proteasas, moléculas de adhesión y capacidad para escapar de efectores del sistema inmune, por lo cual muchas veces se le denomina “pseudo-maligno” o “fisiológicamente metastático”.

El sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) es un regulador importante de la proliferación, diferenciación e invasión en un gran número de tejidos y tipos celulares y ha sido involucrado en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la sobreexpresión del IGF-II y del receptor IGF-IR en coriocarcinoma y mola hidatidiforme en comparación con abortos no molares de la misma edad gestacional, lo que correlacionó con los niveles circulantes elevados de IGF-II. Más recientemente, un estudio *in vitro* permitió establecer que IGF-I e IGF-II regulan las propiedades metastáticas de células de coriocarcinoma JEG-3. Este trabajo tuvo como objetivo profundizar en el papel del sistema IGF en el proceso de crecimiento y diferenciación del trofoblasto utilizando la línea celular HTR-8 de trofoblasto altamente invasiva. Se indujo diferenciación por tratamiento con forskolina y se evaluó el proceso a través del aumento en la producción de hCG, los cambios morfológicos celulares, así como, los cambios en los perfiles de expresión de los ligandos y receptores del sistema IGF a lo largo del proceso de diferenciación trofoblástica.

3. HIPÓTESIS

El sistema de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) ha sido involucrado en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto, además la

expresión de sus componentes cambia con la edad gestacional. La hipótesis a probar en este estudio es sí la diferenciación del trofoblasto se encuentra bajo la influencia de algunos componentes del sistema IGF y sí existe interacción a nivel de la expresión y/o secreción de hCG.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar el papel del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la regulación del crecimiento y diferenciación de la línea celular de trofoblasto extravelloso HTR-8/SVneo.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1** Establecer los perfiles de expresión de los ligandos y receptores del sistema IGF, la hCG y su receptor en la línea celular de trofoblasto HTR-8/SVneo por medio de RT-PCR en tiempo real
- 4.2.2** Determinar el efecto del estímulo con IGF-I o IGF-II en la proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo por medio del ensayo MTT.
- 4.2.3** Evaluar el proceso de diferenciación de las células HTR-8/SVneo inducido por forskolina mediante microscopía y niveles de secreción de hCG.
- 4.2.4** Evaluar el efecto del estímulo con IGF-I o IGF-II en la diferenciación del trofoblasto inducida por forskolina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aproximación metodológica

Este estudio *in vitro* se realizó usando como modelo celular la línea HTR-8/SVneo de trofoblasto extraveloso la cual se caracterizó en cuanto a morfología celular y expresión de miembros del sistema IGF, la hCG y su receptor LH/CG. Se indujo proceso de diferenciación por tratamiento con Forskolina (FSK), un agonista de la adenilato ciclasa [58], en concentración y tiempo adecuados, se examinaron los cambios morfológicos mediante ensayos de microscopía, expresión diferencial de genes por medio RT-PCR en tiempo real y niveles de secreción de hCG mediante inmunoensayo. Además, se evaluó el papel del IGF-I e IGF-II en el crecimiento y diferenciación de las células de trofoblasto y se investigó el mecanismo molecular a través del cual ejercen sus acciones mediante la inhibición de la expresión de los receptores IGF-IR e IGF-IIR mediante RNA interferente.

5.2 Línea celular

La línea celular de citotrofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo fue desarrollada a partir de un cultivo de explante de placenta humana de primer trimestre e inmortalizada por transfección con un cDNA que codifica para el antígeno T40 grande del virus de simio [59, 60]. Esta línea se caracteriza por exhibir un alto índice de proliferación y ser altamente invasiva; adicionalmente se conoce que expresa hCG e IGF-II [59, 61]. La línea fue donada al grupo de investigación por la Dra. Angela Cadavid de la Universidad de Antioquia.

La línea celular fue cultivada en RPMI 1640 (Sigma Chemicals, U.S.A) suplementado con suero bovino fetal (SFB) al 10% (Gibco, U.S.A), y 100 U/ml de

penicilina/estreptomicina (Sigma Chemicals, U.S.A.). Se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%.

Para el desarrollo de los diversos ensayos, las células se sembraron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro, a una concentración de 10⁶ células por caja, y se cultivaron en medio libre de suero durante 12 horas antes de aplicar algún tratamiento. Una vez establecido el modelo celular se caracterizó la expresión de miembros del sistema IGF.

5.3 Inducción de diferenciación

El proceso de diferenciación se indujo en la línea celular HTR-8/SVneo por la adición de FSK (Sigma Chemical Co, USA) 25 µM disuelta en dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma Chemical, U.S.A.) [62]. Además de la concentración anterior se probó una concentración superior (50µM) y otra inferior (2,5 µM) [28]. Para determinar si IGF-I o IGF-II tienen efecto sobre la diferenciación trofoblástica se estimularon células HTR-8/SVneo con los ligandos en concentración de 10nM, así como se probó su efecto combinado con FSK 25µM. Como controles se utilizaron células en medio RPMI con y sin DMSO (50µM). Las células y el medio de cultivo se colectaron a tiempos 0h, 48h y 72h para los respectivos análisis como se describe a continuación.

5.4 Determinación del estado de diferenciación en HTR-8/SVneo

Después de estimular los cultivos de las líneas celulares HTR-8/SVneo para inducir la diferenciación, se procedió a llevar a cabo pruebas de microscopía con el fin de establecer morfología celular propia del proceso de diferenciación del citotrofoblasto (CT) a sinciotrofoblasto (ST). Los cultivos celulares una vez fueron sometidos a procesos de diferenciación con FSK (2.5, 25 y 50µM) y estímulos con IGF-I e IGF-II (10nM), se procedió a teñir con hematoxilina y eosina, se visualizó

en microscopio de contraste de fase (Leica DMIL) y se documento mediante captura fotográfica de cada uno de los eventos evaluados (Anexo 1)

5.5 Niveles de secreción de hCG en sobrenadantes de cultivo celular de línea celular HTR-8/SVneo con inductor de diferenciación

La concentración de hCG total se evaluó de los sobrenadantes provenientes de los cultivos celulares bajo los tratamientos respectivos mediante el ensayo inmunoradiométrico (IRMA) usando un kit comercial Coat –A- Count HCG IRMA (IKCG1, Siemens U.S.A). Los estándares y las muestras se evaluaron por duplicado (Anexo 2).

5.6 Efecto de IGF-I e IGF-II en proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo

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 (figura 10) [63].

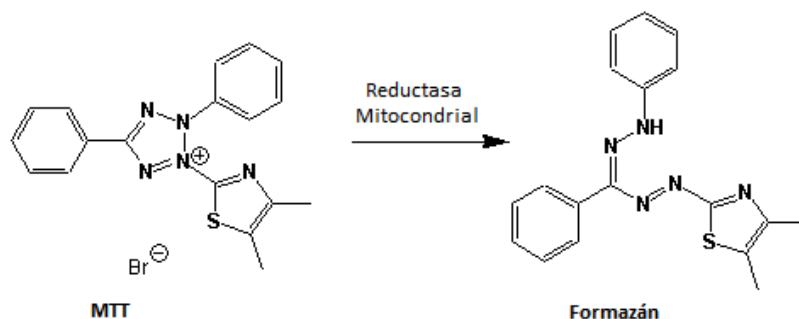


Figura 10. Reducción del MTT por actividad mitocondrial.

Luego de períodos definidos de cultivo, las células creciendo en RPMI suplementado al 10% con SFB, fueron despegadas usando una solución de tripsina 0.05% en EDTA (Sigma Chemicals, U.S.A.) y resuspendidas en RPMI

completo (con SFB al 10%). Las suspensiones celulares fueron contadas por medio de la tinción con azul de tripan (Sigma Chemical, U.S.A.) y sembradas en placas de 96 pozos en una concentración de 1×10^5 células/100 μ l. Se permitió que las células se adhirieran a la superficie de los pozos por un lapso de 12 horas, al cabo del cual fueron incubadas por 12 horas con medio libre de SFB, luego de este periodo de incubación las células fueron sometidas en medio con los diferentes estímulos de la siguiente manera: RPMI, SFB 10%, DMSO 50 μ M, FSK (2.5 μ M, 25 μ M y 50 μ M), IGF-II 10nM, IGF-I 10nM y estímulos combinados de FSK 25 μ M más IGF-I 10nM y FSK 25 μ M más IGF-II 10nM. El efecto de estos estímulos fue medido a 24h, 48h y 72h. Al final de los tratamientos se adicionó la solución de MTT, la cual se dejó actuar por 4 horas, seguido por la disolución de los cristales de formazan con DMSO. La concentración se cuantificó mediante la lectura de absorbancia a 570 nm. Cambios en el número de células fueron obtenidos de los datos de absorbancia. Cada ensayo se realizó por triplicado.

5.7 Perfiles de expresión de ligandos y receptores del sistema IGF

5.7.1 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% (Anexo 3).

El ARN precipitado se resuspendió en un volumen de 50 μ l de agua tratada con dietilpircarbonato (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. Los productos se observaron en transiluminador de luz ultravioleta.

5.7.2 Síntesis de ADN complementario. Del ARN total extraído de las células, se llevó a cabo la síntesis de ADNc empleando 5µg del ARN total y un sistema de retrotranscripción, SuperScript III (Invitrogen), donde se utilizó como oligonucleótidos iniciadores oligo dT y hexameros al azar. La composición de la mezcla de reacción se muestra en la Tabla 3. El ADN complementario obtenido se refrigeró a 4°C hasta su posterior análisis por PCR en tiempo real.

Tabla 3. Mezcla de la reacción de transcripción reversa

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 mM Tris-HCl pH 8,3 75 mM KCl 3 mM MgCl ₂
DTT	10 mM
SuperScript III RT	10 Unidades

5.7.3 Diseño de Primers. Para cada uno de los genes a evaluar su expresión se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores específicos con la ayuda de los programas Vector NTI verificando su especificidad e idoneidad para la detección de los transcritos de los IGFs, sus receptores, hCG, LH/CG-R y los

genes caseros β -Actina y la subunidad ribosomal 18S humana (Hrs-18S). Las secuencias más adecuadas obtenidas en el diseño de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados para PCR en tiempo real

Nombre del gen	Primer
IGF-I	D: GGAGGCTGGAGATGTATTG R: GACTTCGTGTTCTTGTTGG
IGF-II	D: GTTGAGGAGTGCTGTTTC R: AGGTGTCATATTGGAAGAAC
IGF-IR	D: GCCGACGAGTGGAGAAATC R: AGCAGGATGTGGAGGTAGC
IGF-IIR	D: AGGTGAATAAGGAAGAAGAGAC R: ACTGACTTGGTGGTAATATGG
Ins-R	D: GCCTCTACAACCTGATGAAC R: ACAGATGTCTCCACACTCC
hCG	D: GCTGTTGCTGCTGCTGAG R: GTGGTGTGACGGTGATGC
LH/CG-R	D: CAATGGGACGACACTGAC R: ATTAGCCTCTGAATGGACTC
Hrs-18S	D: AGCAGAGACACTAACGACTTCAG R: TACTGGCGTGGATTCTGC
β -Actina	D: GCGTGACATTAAGGAGAAG R: GAAGGAAGGCTGGAAGAG

D: Hace referencia a primer derecho y R: primer Reverso

5.7.4 PCR en tiempo Real. Para determinar la expresión relativa de genes del sistema IGF, hCG y LH/GC-R de las células de trofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo, tratadas con FSK, IGF-II e IGF-I. Se empleo PCR en tiempo real en un equipo LightCycler (Roche) y Master Mix SYBR Green IQ. Los genes del sistema IGF y LH/GC-R fueron normalizados contra el gen casero Hrs-18, por su parte para hCG se empleó β -Actin. El volumen total de reacción fue de 10 μ l.

El programa de PCR en tiempo real utilizado en el equipo LightCycler (Roche) para determinar la expresión de genes del sistema IGF y genes caseros Hrs-18S y

β -Actina se muestra en la figura 11 A. Por su parte para determinar la expresión de hCG y su receptor se uso el programa de PCR en tiempo real que se muestra en la figura 11 B.

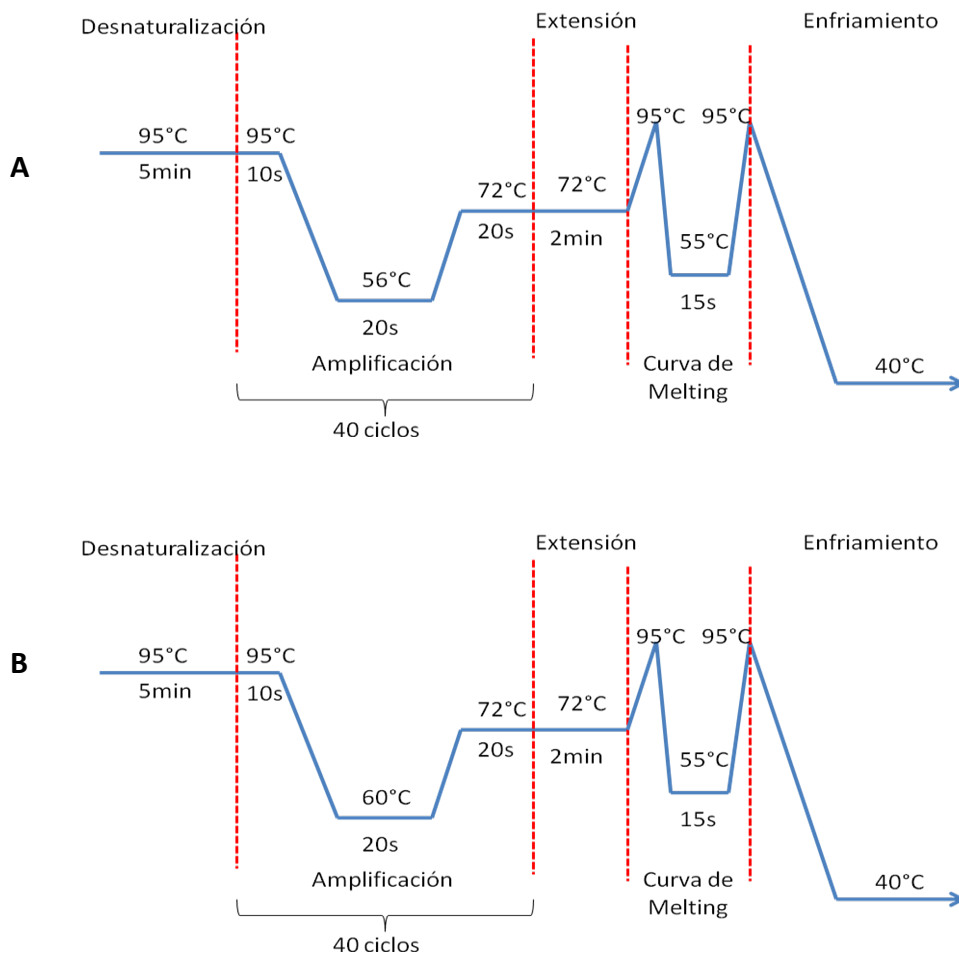


Figura 11. Programa de PCR en tiempo real. (A) Para miembros del sistema IGF y genes caseros (hrs 18S y β -Actina) y en **(B)** para hCG y LH/CG-R

5.8 Ensayos de ARN 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 HTR8/SVneo establemente silenciada en el IGF-IIR o IGF-IR, obtenidas dentro del grupo de

Investigación en Hormonas por Andrés Felipe 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% y del 60% respectivamente en el silenciamiento. Adicionalmente, se empleó como control un plásmido con una secuencia no codificante para el receptor de interés.

5.9 Análisis Estadístico

La evaluación estadística de las diferencias en los resultados se analizó por ANOVA utilizando el programa de análisis estadístico SAS (SAS Institute Inc). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 IGF-I, IGF-II estimulan la proliferación Trofoblástica

Inicialmente fue necesario determinar la concentración de FSK que permita viabilidad celular, con el objetivo de visualizar los cambios celulares morfológicos y de proliferación, utilizando para este fin el método MTT por 24 horas, 48 horas y 72 horas con FSK. Se utilizaron dosis de FSK de 2.5 μ M, 25 μ M y 50 μ M. Como control positivo se utilizó SFB 10%.

Los ensayos de proliferación celular mostraron que concentraciones superiores de FSK (50 μ M) disminuían la viabilidad celular incluso por debajo del control. Por observaciones microscópicas se encontró que células HTR-8/SVneo sometidas a concentraciones de 50 μ M perdían morfología celular en las primeras 24h de exposición a FSK, además el número de células por pozo se mostró por debajo del número total de células sembradas en las etapas iniciales del ensayo. Esto no fue observado en pozos de células que fueron tratadas con FSK a concentraciones menores (Figura 12 A). En consecuencias para ensayos de expresión de genes, análisis microscópico y niveles de secreción de hCG se emplearon concentraciones de 2,5 μ M y 25 μ M.

En un segundo ensayo, se evaluaron los efectos proliferativos ejercidos por los péptidos IGF-I e IGF-II (10nM) sobre la línea celular HTR-8 a 24h, 48h y 72h. Se encontró que IGF-I e IGF-II tienen efectos en proliferación superiores a los encontrados para cultivos sin estímulo, pero sin existir diferencias significativas entre tiempos de ensayo y factores de crecimiento evaluados (Figura 12 B). Sin embargo, cuando se realizaron combinaciones de IGF-I e IGF-II más forskolina 25 μ M se encontró que predomina el efecto mitótico sobre el de diferenciación trofoblástica (Figura 12B).

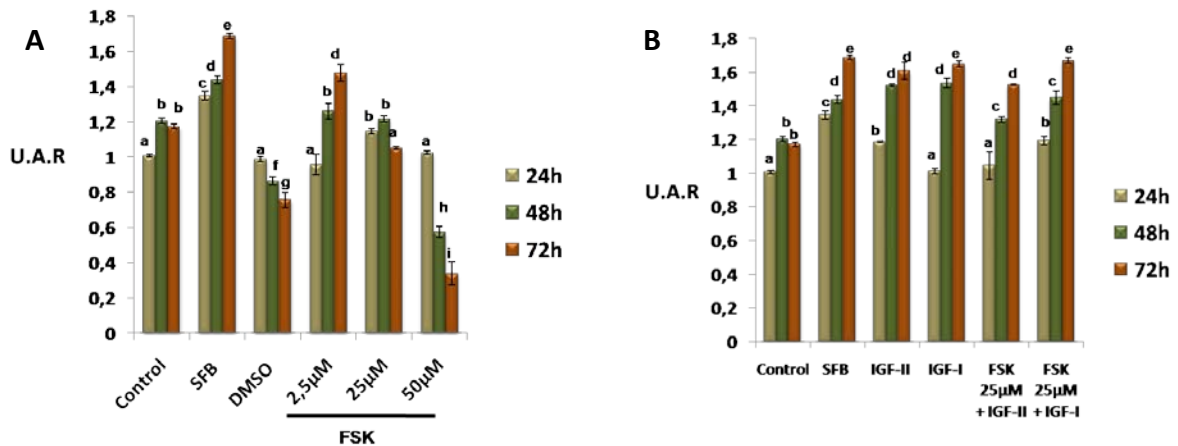


Figura 12. Proliferación celular de la línea HTR-8/SVneo medida por MTT. (A) Efecto de diferentes concentraciones de FSK **(B)** Efecto de IGF-I e IGF-II (10nM) y combinaciones con FSK (25μM). SFB (10%) como control positivo. DMSO vehículo. Unidades de Absorbancia Relativa (U.A.R). Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.2 Cambios en los niveles de expresión del sistema IGF, hCG y su receptor en procesos de diferenciación

6.2.1. Expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8 estimuladas con FSK.

Con el fin de establecer los perfiles de expresión de los ligandos y receptores del sistema IGF se realizaron ensayos de PCR en tiempo real. Se encontró que los transcritos de IGF-II se incrementan seis veces con respecto al control para células estimuladas con FSK 25μM a 72h (figura 13 A). Los ensayos de expresión de IGF-I no mostraron niveles de transcritos suficientes para ser detectables por ensayos de PCR, motivo por el cual no se muestran.

Los niveles de transcritos para los receptores IGF-IR e Ins-R fueron semejantes hasta 48h de cultivo y predominó la expresión de Ins-R a 72h. En contraste, IGF-IIR incrementó marcadamente su transcripción (cuatro veces) a las 72h en comparación con los niveles basales (figura 13 B).

6.2.2. Expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-I e IGF-II. Para establecer el efecto del tratamiento con IGF-II e IGF-I (10nM) se midió por PCR en tiempo real el perfil de expresión de los miembros del sistema IGF en la línea celular HTR-8/SVneo. Bajo estas condiciones, los niveles de transcritos de IGF-II e IGF-I fueron menores en comparación con el control, lo cual sugiere sistemas de autoregulación negativa [64].

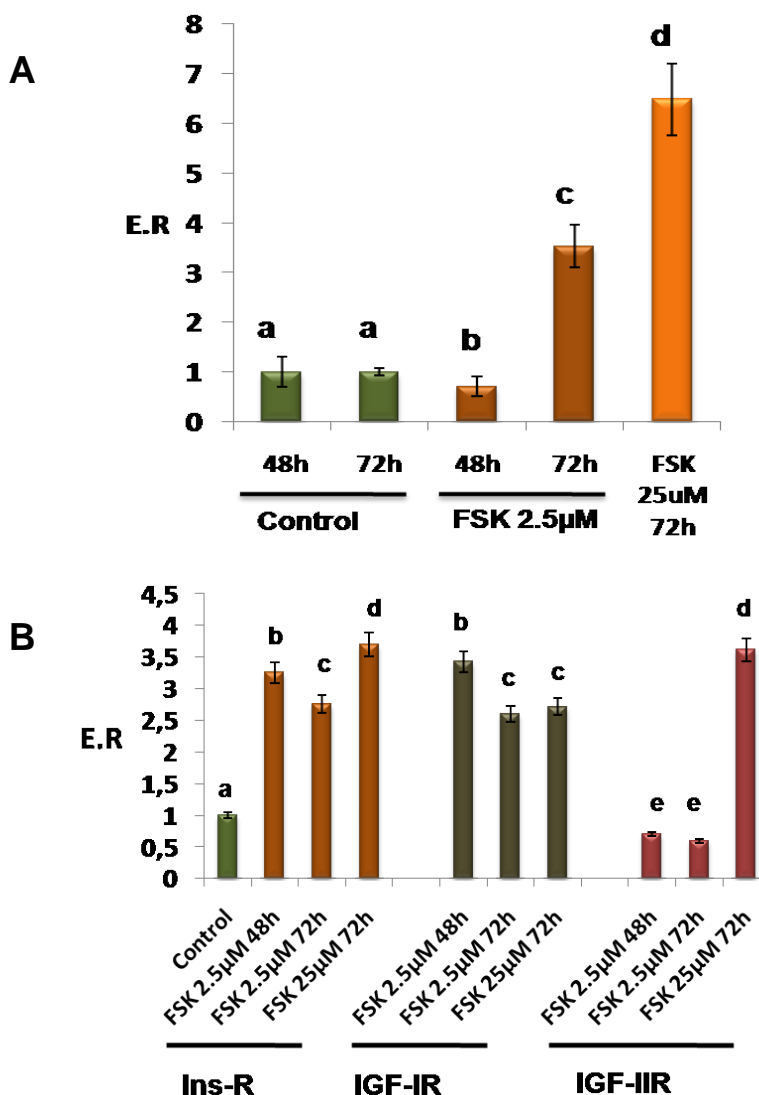


Figura 13. Expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/SVneo tratadas con FSK a 48h y 72h. (A) Expresión de IGF-II (B) Expresión de receptores de IGF-I, IGF-II e insulina. DMSO, vehículo para FSK. E.R: Expresión relativa con respecto al gen casero Hrs 18S. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Por su parte los receptores IGF-IR e IGF-IIR incrementaron su expresión hasta cuatro y siete veces respectivamente, en tanto que el receptor de insulina mantuvo niveles de expresión similares al control e incluso inferiores. De otra parte, los resultados muestran que IGF-II induce expresión significativa de los tres receptores a 48h, posiblemente porque la biodisponibilidad de ligandos sea mayor a este tiempo que en tiempos superiores, lo cual es coherente con lo observado en proliferación (figura 14).

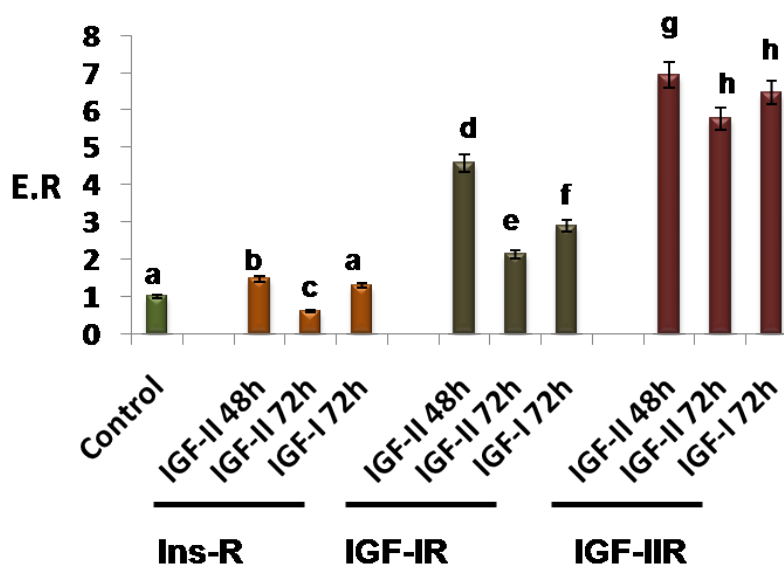


Figura 14. Expresión de receptores del sistema IGF en la línea celular HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-I e IGF-II (10nM). Control: células cultivadas en medio RPMI 1640. E.R.: Expresión relativa con respecto al gen casero Hrs 18S. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

6.2.3. Expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/SVneo tratadas con estímulos combinados de IGF-II y FSK. Se probaron estímulos combinados de FSK más IGF-II; en este caso, se encontró que los niveles de transcrito de IGF-II y de los receptores IGF-IR e Ins-R aumentaron significativamente con respecto al control a 72h de cultivo (figura 15 A y B).

Consistente con los resultados anteriores, IGF-IIR presentó el mayor incremento en expresión (cinco veces) a las 72h con respecto al control.

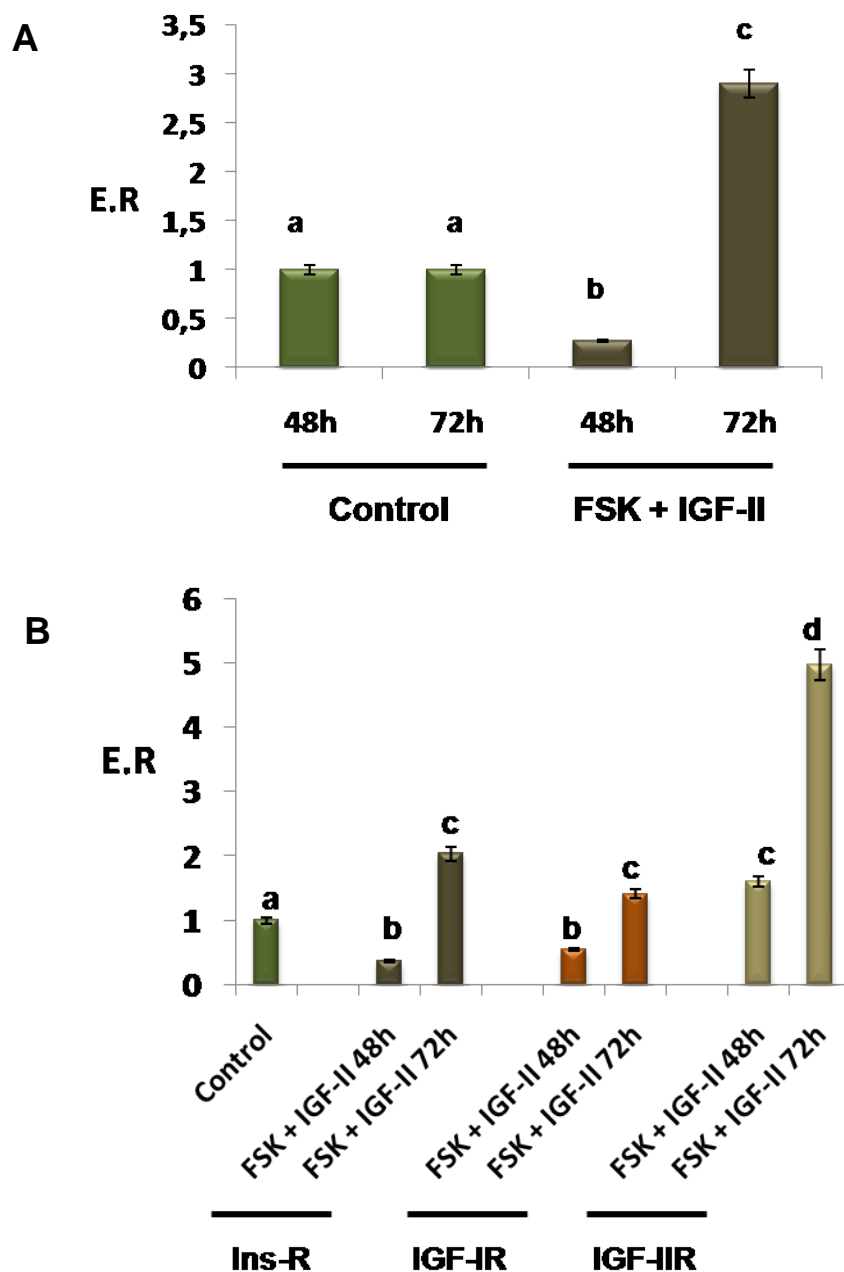


Figura 15. Efecto de la combinación de FSK e IGF-II en la expresión de miembros del sistema IGF en células HTR-8/Svneo. (A) Expresión relativa de IGF-II. **(B)** Expresión relativa de los receptores Ins-R, IGF-IR e IGF-IIR. Control: DMSO vehículo de FSK. E.R: Expresión Relativa con respecto al gen casero Hrs 18S. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

6.2.4. Expresión de la hormona gonadotropina coriónica humana y su receptor (LH/CG-R) en células HTR-8/SVneo durante la diferenciación trofoblástica. Los resultados anteriormente expuestos evidencian cambios en los perfiles de expresión del sistema IGF cuando las células de trofoblasto extravelloso son inducidas a diferenciación, lo cual correlaciona con resultados previos reportados por el grupo de Investigación en Hormonas, en los cuales se encontró que los niveles de IGF-II en suero y en proteína incrementaron considerablemente en mola hidatidiforme [16]. Partiendo de este hecho y que además en la ETG los niveles de hCG son elevados [48], se investigó el papel de IGF-II en la regulación en la expresión de hCG.

Las determinaciones realizadas a tiempos mayores de 48h no mostraron niveles detectables de transcritos de hCG en ninguno de los tratamientos aplicados. En contraste, los ensayos a tiempos cortos mostraron que IGF-II estimula la expresión de hCG en trofoblasto extravelloso hasta seis veces con respecto al control (figura 16). Por su parte IGF-I no mostró efectos sobre la expresión de hCG en periodos superiores a 24h ni anteriores a éste.

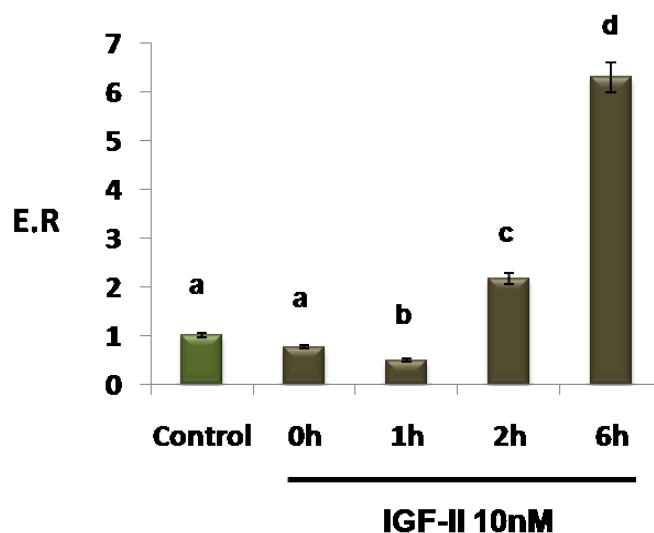


Figura 16. Expresión de hCG en células de trofoblasto extravelloso HTR-8/SVneo estimuladas con IGF-II (10nM). E.R: Expresión relativa con respecto al gen casero β -actina. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Este hecho, sugiere que la expresión de hCG se lleva a cabo en etapas tempranas de la diferenciación trofoblástica y que posiblemente la proteína sintetizada se mantenga en granulos de secreción hasta el momento de su liberación y su consecuente función biológica en el sincitiotrofoblasto.

La expresión relativa del receptor de hCG bajo el estímulo de los ligandos IGF (10nM) y FSK (25µM) se muestra en la figura 17. Se encontró que la expresión de LH/CG-R es cuatro veces mayor respecto al control tanto en células estimuladas con FSK como en las que fueron tratadas con estímulos combinados, lo cual sugiere predominio del inductor de diferenciación sobre el efecto del péptido IGF-II, por su parte cuando éste último es el único estímulo, la expresión del receptor de hCG es hasta tres veces mayor con respecto al control (figura 17). IGF-I no mostró efecto sobre la expresión del receptor y no se encontraron niveles detectables del mismo a tiempos inferiores a 72h.

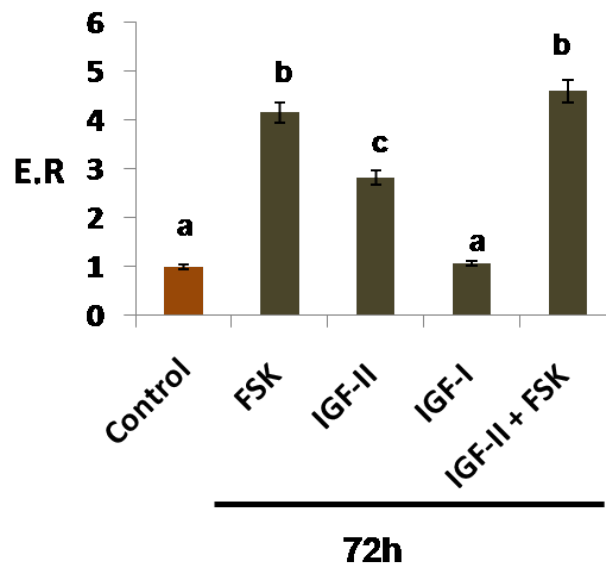


Figura 17. Expresión del receptor de hCG en células HTR-8/SVneo tratadas con FSK (25µM), IGF-I (10nM), IGF-II (10nM) y combinación de estímulos de IGF-II y FSK. Valores promedio a las 72 hr. de estímulo. DMSO vehículo de FSK. E.R.: Expresión Relativa con respecto al gen casero Hrs 18S. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En resumen, durante la diferenciación del trofoblasto se observan cambios importantes en los perfiles de expresión de los genes evaluados, los cuales se pueden observar en la tabla 5

Tabla 5. Cambios de expresión de miembros del sistema IGF, hCG y LH/CG-R durante el proceso de diferenciación en la línea celular HTR-8/SVneo.

ESTÍMULO	GENES EVALUADOS						
	IGF-II	IGF-I	IGF-IR	IGF-IIR	Ins-R	hCG	LH/CG-R
72h de tratamiento							
FSK 25µM	Aumenta 6 veces	N.D	Aumenta 3 veces	Aumenta 3.5 veces	Aumenta 3,5veces	N.D	Aumenta 4 veces
IGF-I 10nM	N.D	N.D	Aumenta 3 veces	Aumenta 6.5 veces	Igual al control	N.D	Igual al control
IGF-II 10nM	N.D	N.D	Aumenta 2 veces	Aumenta 6 veces	Menor al control	N.D	Aumenta 3 veces
FSK 25µM + IGF-II 10nM	Aumenta 3 veces	N.D	Aumenta 1.8 veces	Aumenta 5 veces	Aumenta 2 veces	N.D	Aumenta 4 veces
6h de tratamiento							
IGF-II 10nM	N.E	N.E	N.E	N.E	N.E	Aumenta 6 veces	N.E

N.D: Hace referencia a Niveles de transcritos no detectables; **N.E:** Hace referencia a genes no evaluados.

6.3 Niveles de secreción de hCG durante el proceso de diferenciación trofoblástica.

Para correlacionar los hallazgos encontrado hasta el momento se midieron los niveles de secreción de hCG mediante inmunoensayo IRMA, en los medios de cultivo provenientes de células tratadas con FSK 25µM, IGF-II 10nM y FSK 25µM en combinación con IGF-II 10nM en periodos de tiempo de 24h, 48h y 72h. Los cambios en los niveles de secreción de hCG son uno de los indicadores de diferenciación del trofoblasto a sincitiotrofoblasto [8]; por lo tanto, las

concentraciones de esta hormona se cuantificaron durante la diferenciación del trofoblasto en cultivo. Después de las primeras 24 horas de cultivo con FSK las células de trofoblasto comenzaron a secretar hCG (53,6mUI/ml) y el contenido aumentó progresivamente hasta 72h de cultivo (311,2mUI/ml) como se muestra en la figura 18. Interesantemente, estos valores aumentaron significativamente cuando las células se estimularon con IGF-II alcanzando concentraciones de 506,8mIU/ml para 72h de cultivo, lo cual sugiere que IGF-II puede inducir diferenciación trofoblástica (Figura 18). Además, este efecto es específico para IGF-II ya que con IGF-I no se observó incremento en la secreción de hCG. De otra parte, cuando los estímulos fueron combinados por el mismo periodo de tiempo se encontró que los niveles de secreción de hCG alcanzaron valores de 908mUI/ml para 72h, que comparado con los valores de hCG registrados para cada uno de los estímulos por separado podría sugerir que se presentan efectos aditivos o sinérgicos lo cual conduce a pensar que puede existir una interacción en las vías de señalización involucradas.

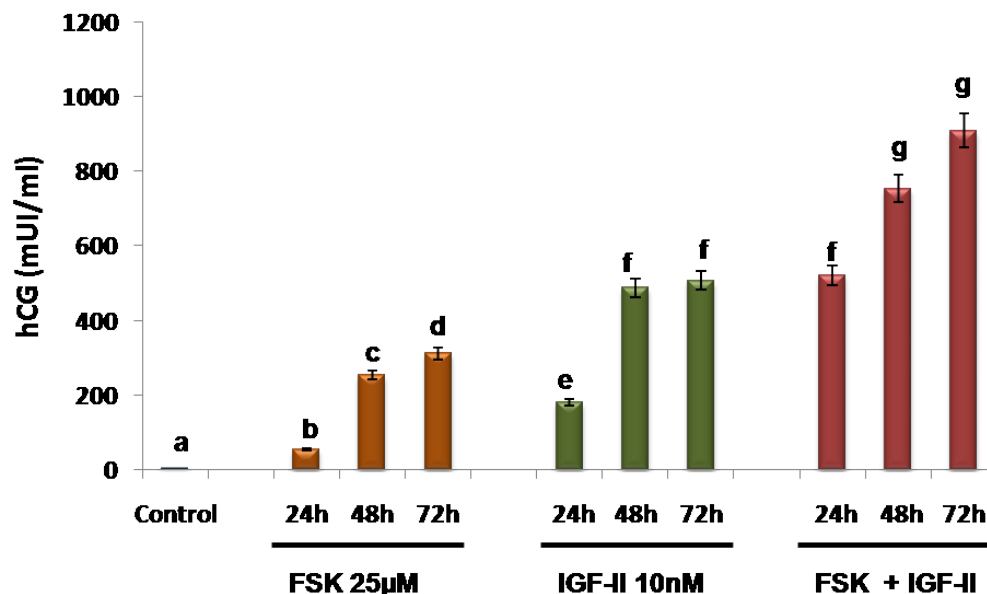
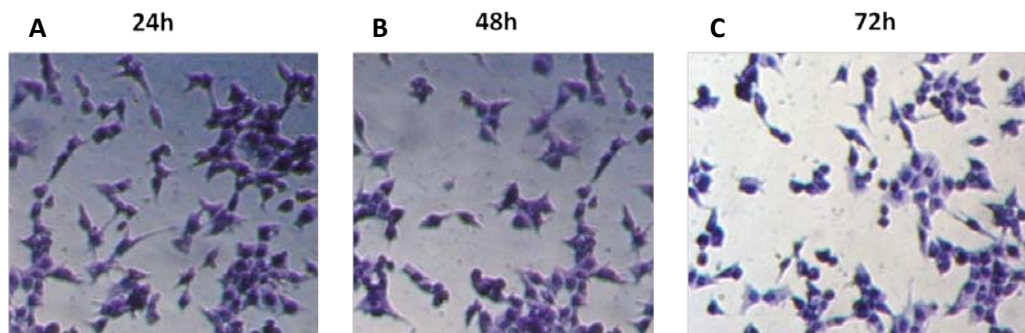


Figura 18. Secreción de hCG en células HTR-8/SVneo. Células estimuladas con FSK (25µM), IGF-II (10nM) y FSK (25µM) en combinación con IGF-II (10nM), en periodos de tiempo de 24h, 48h y 72h. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

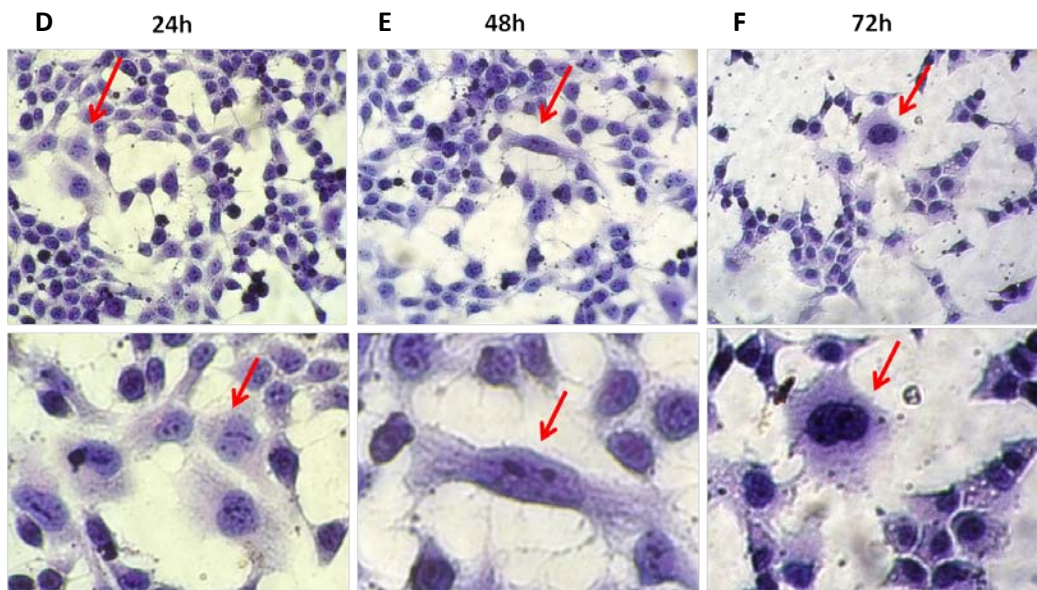
6.4 Cambios morfológicos de línea celular de trofoblasto extraveloso durante diferenciación trofoblástica.

Las células que no fueron sometidas a estímulo mostraron una población de células mononucleares distribuidas uniformemente en la superficie del cultivo (figura 19 A, B y C); mostraron adherencia y un citoplasma poco desarrollado. Después de 48h de cultivo y exposición a FSK, las células crecieron en extensión, formaron proyecciones mayores de su citoplasma y comenzaron a interactuar más estrechamente con células vecinas (figura 19E); en tiempos superiores (72h) se dio lugar a la formación de estructuras similares a sincitios, donde se observaron células gigantes y un mayor grado de compactación de sus núcleos (figura 19F).

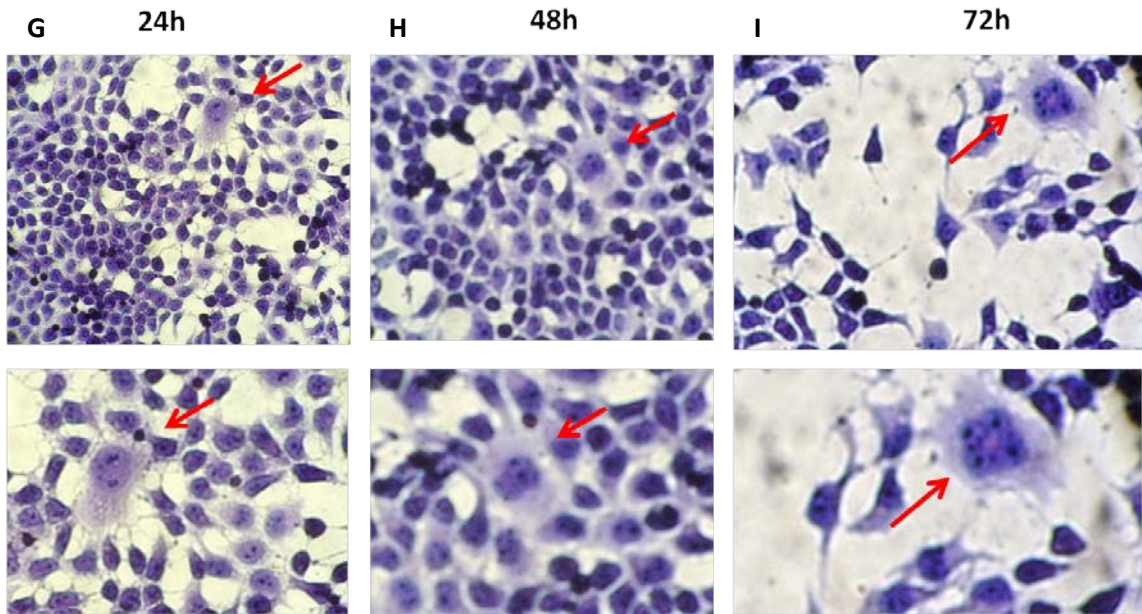
Evidencia microscópica de células de trofoblasto extraveloso sin estímulo



Evidencia microscópica de células de trofoblasto extraveloso con inductor de diferenciación FSK 25 μ M



Evidencia microscópica de células de trofoblasto extraveloso con IGF-II 10nM



Evidencia microscópica de células de trofoblasto extraveloso con FSK 25μM e IGF-II 10nM

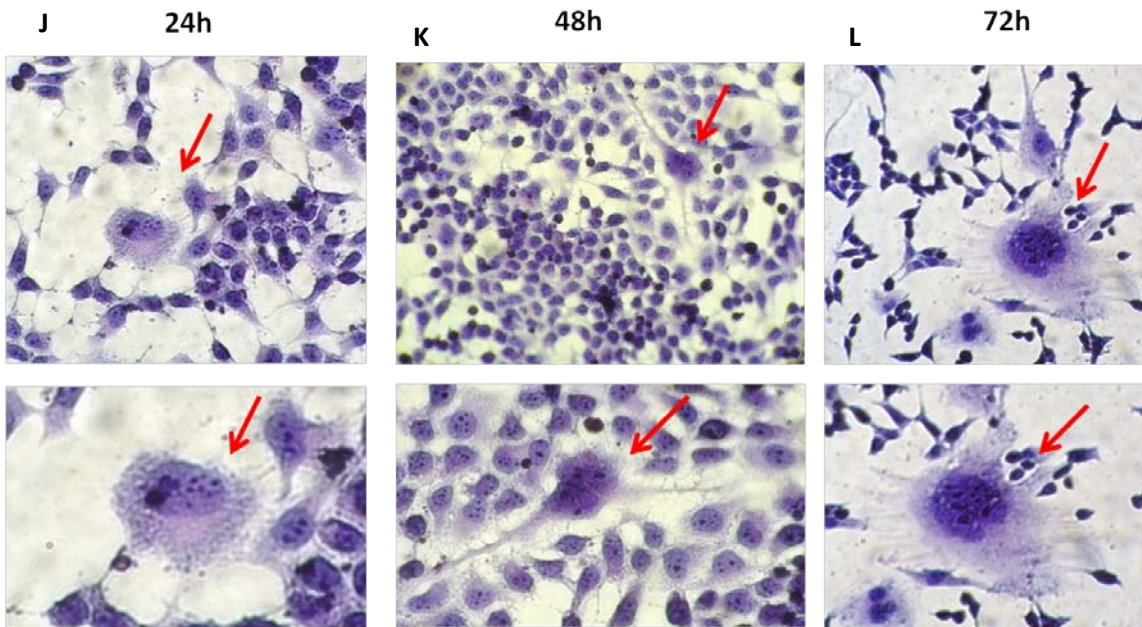


Figura 19. Cambios morfológicos de células HTR-8/SVneo durante procesos de diferenciación trofoblástica. Las células control se muestran en **A, B** y **C**. Los cultivos de células que fueron sometidos al inductor de diferenciación forskolina 25μM (FSK) corresponden a **D, E, F**. A 72h de exposición a FSK se encontró presencia de ocasionales células binucleadas (**F**). En las células sometidas al péptido IGF-II 10nM se observó cambios morfológicos desde las 24h de exposición al estímulo (**G**) siendo mayor a las 72h de exposición al péptido (**I**). Por su parte, las células sometidas a estímulos combinados de FSK 25μM e IGF-II 10nM (**J, K, L**) muestran aumento de tamaño celular a partir de 24h de exposición a los estímulos.

Por su parte cuando las células fueron sometidas al péptido IGF-II 10nM, se observó que a tiempos de 24h ya se evidenció la presencia de células gigantes y proyecciones citoplasmáticas continuas (figura 19H), evento que para el caso de células estimuladas con FSK se presentó a 48h y 72h. De igual forma, cuando las células cumplieron 72h de exposición al péptido IGF-II 10nM la formación de sincitios fue más evidente (figura 19 I). Cuando las células fueron cultivadas con el inductor de diferenciación más el péptido IGF-II, mostraron cambios morfológicos que nuevamente conducen a formación de sincitios, esta vez posiblemente por el efecto común de IGF-II y FSK; los cambios más significativos se observaron a 72h de exposición a los estímulos (figura 19 L).

6.5 Papel de los receptores IGF-IR e IGF-IIR en la expresión y secreción de hCG en línea celular HTR-8/SVneo

Con el objetivo de empezar a examinar el mecanismo a través del cual el IGF-II promueve sus acciones estimuladoras sobre la expresión de hCG, se emplearon líneas celulares HTR-8/SVneo con silenciamiento específico de los receptores IGF-IIR e IGF-IR. Se encontró que la interferencia en la expresión de los dos receptores conduce a una disminución en los transcritos del gen de la hormona hCG, en comparación con las células normales (no interferidas) (figura 20). Ambos receptores están aparentemente implicados en la regulación, aunque los mayores efectos se dieron al silenciar el receptor IGF-IIR, conduciendo a niveles a las 6 horas por debajo de los controles (células no interferidas y no estimuladas).

Estos resultados muestran que IGF-II está interactuando principalmente a través del receptor IGF-IIR en regulación de la expresión de hCG.

Con el fin de establecer si además se estaban afectando los mecanismos de secreción de la hormona, se procedió a medir los niveles de hCG en los sobrenadantes de los cultivos de células silenciadas después de 48h y 72h de aplicado el estímulo con IGF-II (figura 21).

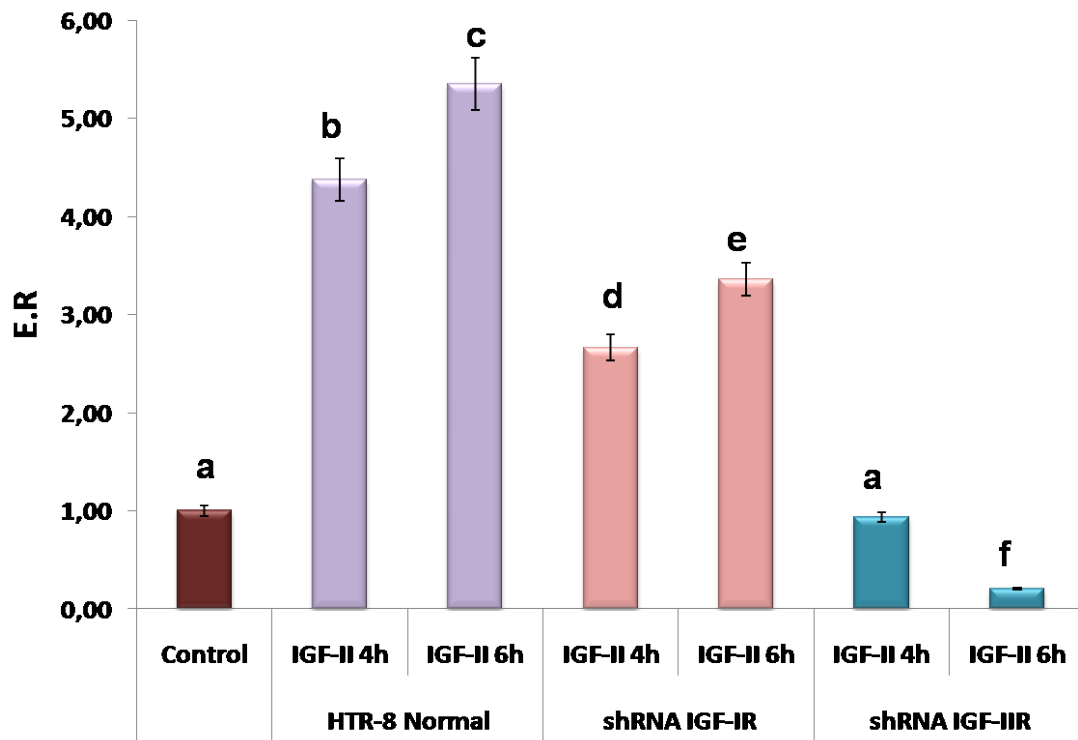


Figura 20. Perfil de expresión de hCG en células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR). Los valores de expresión están normalizados con su control respectivo. E.R: Expresión relativa con respecto al gen casero β -actina. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Interesantemente, se encontró una reducción dramática en los niveles de secreción de la hormona hCG en las células que no expresan IGF-IIR (3mUI/ml, 72h), en comparación con las células control (1289 mUI/ml, 72 h) y con células interferidas en el receptor IGF-IR (1422mUI/m, 72h) (figura 21). Como resultado de lo anterior, se muestra que las acciones de IGF-II sobre la expresión y secreción de hCG en células trofoblásticas están mediados por el receptor IGF-IIR.

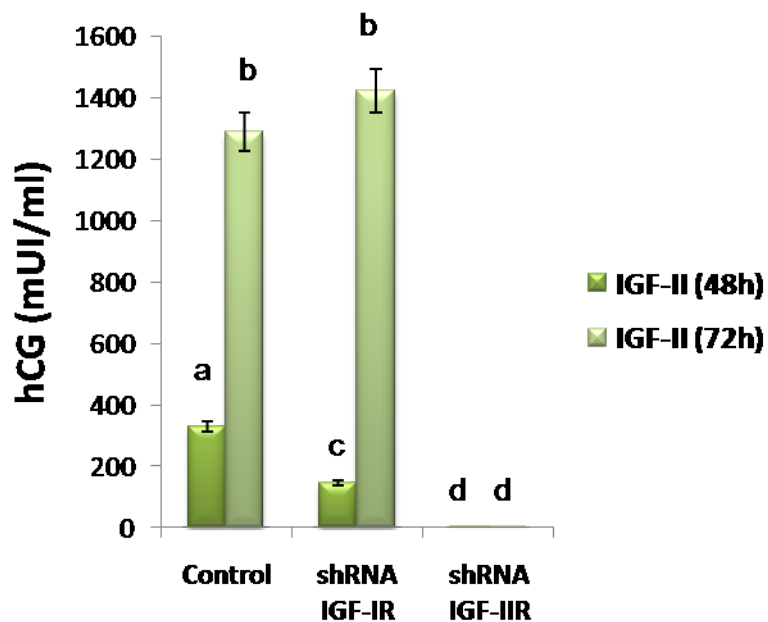


Figura 21. Secreción de hCG de células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o interferidas para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR). Células estimuladas con IGF-II (10nM) por periodos de tiempo de 48h y 72h. El control corresponde a las células HTR-8 normales. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Conociendo que el tratamiento con FSK estimula diferenciación trofoblástica y la producción y secreción de hCG, se investigó a continuación el posible efecto del silenciamiento de los receptores IGF en dichas acciones. Cuando las células silenciadas para IGF-IR e IGF-IIR fueron tratadas con FSK (25 μ M) hasta 72h no se encontraron diferencias en los modelos celulares evaluados en comparación con el control (valores de 1769mUI/ml y similares) como se muestra en la figura 22.

Cuando los cultivos celulares fueron tratados con IGF-I (10nM) no se evidenciaron niveles de secreción de hCG suficiente para ser detectados, lo cual corrobora los resultados mostrados en el numeral 6.3 donde se menciona que el incremento en los niveles de secreción de hCG son específicos para IGF-II.

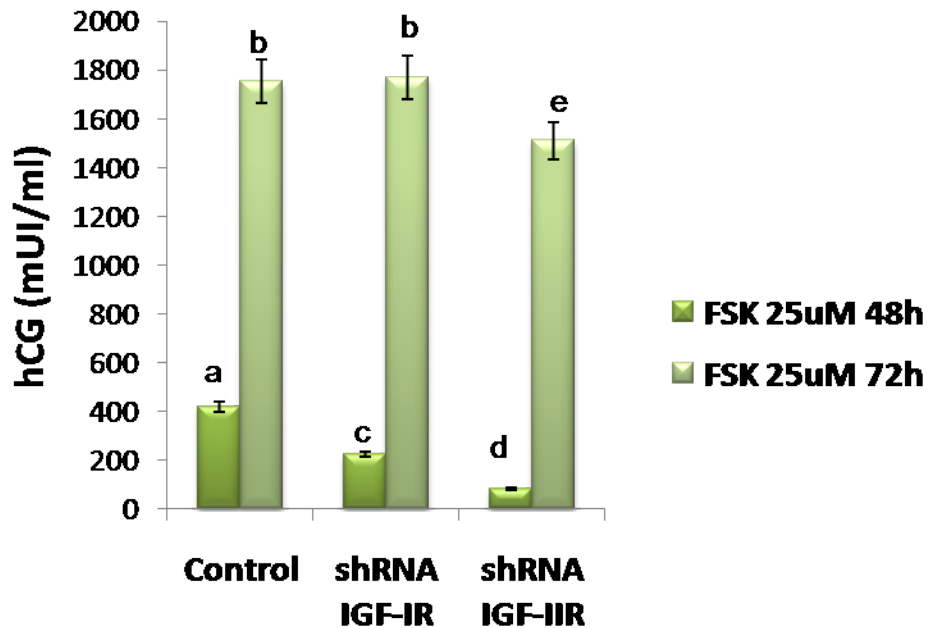


Figura 22. Secreción de HCG de células de trofoblasto extraveloso con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) e interferidas para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR). Células estimuladas con FSK 25µM por periodos de tiempo de 48h y 72h. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

De igual forma cuando las células fueron tratadas con insulina los resultados fueron similares a los encontrados con IGF-I, otra evidencia más que IGF-II posiblemente tiene una relación directa con los incrementos en los niveles de expresión y secreción de hCG. Para tener una visión global de los resultados encontrados en la respuesta celular a los estímulos con IGF-II (10nM), IGF-I (10nM), Insulina (10nM) y FSK (25µM) en modelos celulares interferidos para el IGF-IR o el IGF-IIR se muestra la figura 23, donde la presencia del IGF-IIR y el ligando IGF-II son necesarios para elevar los niveles de secreción de hCG.

Por su parte, la vía de diferenciación trofoblastica inducida por FSK mantiene los niveles elevados de hCG, excepto para el caso de las células con interferencia para IGF-IIR donde se observa que a 48h de estímulo los valores de hCG son de

81.56mUI/ml por debajo de los valores observados para el control (420mUI/ml) y para células HTR-8 silenciadas para el IGF-IR (221.95mUI/ml), pero a 72h los niveles de secreción de la hormona alcanzan a ser relativamente similares (figura 23)

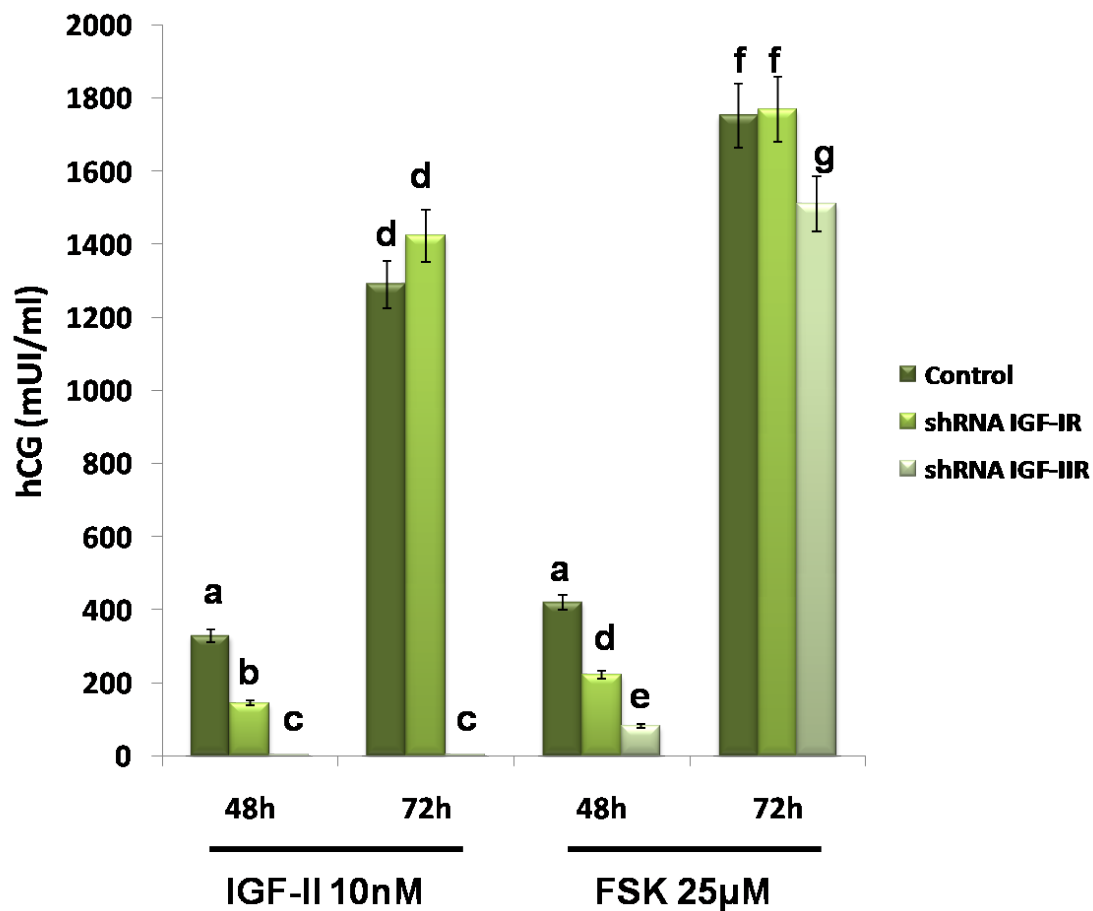


Figura 23. Secreción de hCG en células HTR-8 con interferencia para el receptor IGF-IR (shRNA IGF-IR) o para el receptor IGF-IIR (shRNA IGF-IIR). Células estimuladas con FSK (25µM), IGF-II (10nM) por periodos de tiempo de 48h y 72h. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

7. DISCUSIÓN

7.1 IGF-I, IGF-II estimulan la proliferación Trofoblástica

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 [20, 65] . Por su parte, 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 de 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 [5]. Muchos factores estimulan la proliferación del EVT sin influenciar su invasividad como IGF-I, 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 trofoblástica [66-70].

Los IGFs a través de la unión al receptor IGF-IR, pueden regular la progresión del ciclo celular, controlando varios puntos de chequeo de este proceso. Por activación de las vías PI3K/AKT y ERK, los IGFs pueden facilitar la transición de G₀ a G₁ 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 promoviendo la liberación del factor de transcripción E2F y la síntesis de ciclina E [39, 65, 71].

Se han observado efectos diferenciales de los IGFs sobre la proliferación celular de linajes trofoblásticos. En explantes vellosos de placenta de primer trimestre, se mostró que tanto IGF-I como IGF-II y la IGFBP-1, incrementan la proliferación trofoblástica e inducen la formación de sincitiotrofoblasto y disminuyen la tasa de apoptosis [16, 39, 72]. 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 [16]. 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 el presente estudio tanto IGF-I como IGF-II (10nM) estimularon la proliferación celular de la línea HTR-8 en aproximadamente dos veces respecto al control. Estos resultados concuerdan con reportes de incrementos en proliferación de hasta 3.5 veces en explantes vellosos [16, 26, 39, 69].

7.2 Durante el proceso de diferenciación trofoblástica aumenta la expresión de IGF-II y su receptor

El desarrollo de la placenta humana involucra procesos de diferenciación y fusión intercelular del citotrofoblasto vellosos hasta sincitiotrofoblasto. En la fase inicial de la diferenciación trofoblástica, las células del citotrofoblasto proliferan y se fusionan para formar un sincitio multinucleado. Durante este proceso de diferenciación se sabe que las células se someten a cambios en la expresión de genes y secreción de proteínas como la hCG, no obstante, el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso aún no es claro [73]. De otra parte, el sistema IGF participa en el desarrollo adecuado de la placenta y del feto y se sabe que IGF-II se expresa en tejidos fetales sobre la interface materno-fetal de la placenta, en trofoblasto invasivo y que además su expresión se incrementa en sincitiotrofoblasto y en todos los tejidos vellosos a medida que aumenta la edad gestacional [38]. Lo anterior explicaría el visible incremento de transcritos de IGF-II

a 72h, encontrados en este trabajo, donde las células HTR-8 tratadas con FSK mostraron características morfológicas propias del sincitiotrofoblasto.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran cambios en los perfiles de expresión del sistema IGF cuando células de trofoblasto extraveloso son inducidas a diferenciación, de manera similar con resultados previos donde se encontró que los niveles de IGF-II en suero y en proteína incrementaron considerablemente en mola hidatidiforme y coriocarcinoma [16].

El incremento simultáneo en la expresión de IGF-II e IGF-IIR llama la atención y podría interpretarse como un mecanismo celular para regular la biodisponibilidad del ligando, ya que al receptor de IGF-II se le atribuyen funciones de internalización, tráfico lisosomal, degradación de IGF-II, proliferina y factor inhibitorio de leucemia glicosilado [74]. Sin embargo, hallazgos experimentales recientes dan soporte al papel del IGF-IIR en la activación de cascadas de señalización a través de un mecanismo que involucra la activación de esfingosina quinasa (SK) y la transactivación de receptores acoplados a proteína G. Además, en células HEK293 se encontró que independientemente de la expresión de IGF-IR había activación de ERK1/2 inducida por IGF-II [75].

7.3 IGF-II induce la expresión de su receptor en células trofoblásticas

Durante el desarrollo fetal, los niveles de transcritos de IGF-II y su receptor están aumentados, sin embargo éstos niveles declinan a medida que avanza la gestación dando paso al aumento en los niveles de IGF-I [76]. Por su parte, el receptor IGF-IIR está expresado en altos niveles entre los días 16-20 del desarrollo fetal, y se espera que decline a medida que avanza el desarrollo embrionario, como fue detectado en tejidos de ratones y en humanos [74, 77]. Al receptor IGF-IIR se han atribuido funciones de modulación y reciclamiento del ligando IGF-II, esto se observó en fibroblastos humanos expuestos a IGF-I e IGF-II

donde fue evidente la rápida redistribución del receptor IGF-IIR desde el interior de la célula hacia la superficie celular, lo cual conlleva a incrementar la internalización del ligando [31, 78]. De igual forma, en estudios realizados en modelos murinos se encontraron resultados similares, donde los niveles séricos de IGF-II aumentaban debido a la ausencia su receptor [79]

Por su parte, en este estudio, las células trofoblásticas HTR-8, mostraron aumentos en la expresión del receptor IGF-IIR (5 veces) cuando fueron estimuladas con IGF-II e IGF-I por lo cual es posible suponer que concentraciones elevadas de ligando desencadenan mecanismos de modulación molecular, lo cual conduce a incrementos en la expresión para IGF-IIR con el fin de equilibrar los niveles de IGF-II circulante, de modo que el receptor IGF-IIR pueda internalizar las cantidades excesivas del ligando. Lo antes mencionado también explica la disminución e incluso ausencia en la expresión del ligando IGF-II, debido posiblemente a la inhibición de factores de transcripción o expresión de represores involucrados en la expresión génica [43].

Por su parte, estudios previos han demostrado que IGF-IIR no sólo desempeña funciones de normalizar las cantidades extracelulares de IGF-II, sino que además puede regular la señalización del mismo a través de endocitosis celular. En la ausencia de receptores IGF-IIR, incrementa las concentraciones locales de IGF-II, lo cual conduce a aumentar la proliferación y respuestas hipertróficas, debido a la interacción de IGF-II con el receptor IGF-IR o con la isoforma A del receptor de insulina, sin embargo los mecanismos de señalización antes mencionados aun están en discusión. No obstante, por los resultados encontrados en este trabajo se puede inferir que en estados de diferenciación trofoblástica los niveles de transcritos tanto de IGF-II como de su receptor aumentan, esto debido a que IGF-II normalmente participa en procesos de proliferación trofoblástica y además como fue encontrado en el presente estudio, IGF-II está relacionado con procesos de sincitización.

Del mismo modo, cuando las células trofoblásticas fueron tratadas con el inductor de diferenciación y además con el péptido IGF-II, los niveles del transcrito del ligando y del receptor IGF-IIR aumentaron. Bajo las mismas condiciones experimentales los transcritos del receptor de insulina también se elevaron, lo cual para el caso de células trofoblásticas puede deberse a un posible incremento en la isoforma A del receptor de insulina, el cual ha sido reportado como un promotor antiapoptótico en condiciones patológicas del desarrollo embrionario [15] [36]. Esto conduce a pensar, que posiblemente, IGF-II interactuó con la isoforma A del receptor de insulina debido a la mayor afinidad que posee con ésta isoforma [16].

7.4 La diferenciación trofoblástica humana está acompañada de la expresión de hCG y su receptor (LH/CG-R)

Debido a que la hCG es clave para el desarrollo placental, fue necesario determinar su expresión y la de su receptor. Se encontró que en periodos superiores a 24h los niveles de transcritos no fueron suficientes para ser detectados, lo cual condujo a medir los niveles de expresión de hCG en tiempos inferiores, donde se encontró que existe una relación directa entre IGF-II y la expresión de la hormona. Partiendo de este hecho y que además en la ETG los niveles de hCG son elevados [48], se puede pensar que IGF-II participe de forma directa en la regulación de la expresión de hCG [8]. Esto adquiere importancia, por el hecho que trabajos anteriores demostraron que los niveles sericos de IGF-II en pacientes con diagnostico de ETG estan elevados [26]; en consecuencia, el aumento paralelo de transcritos de IGF-II y hCG encontrado en la línea celular HTR-8 sometida a diferenciación, es un avance para comprender el proceso de malignización en la ETG, sobre todo por el hecho que el incremento en expresión de hCG es específico para IGF-II, ya que cultivos estimulados con IGF-I no mostraron el mismo comportamiento.

La expresión de LH/CG-R durante la formación del sincitiotrofoblasto no está totalmente documentada. En el presente trabajo, se encontró que durante el proceso de diferenciación trofoblástica, la expresión del receptor se incrementó hasta cuatro veces comparado con sus controles. Un comportamiento similar se encontró cuando las células fueron estimuladas con IGF-II (tres veces) y la combinación de éste último con FSK (cuatro veces). Existen reportes controversiales en la literatura en los que se ha demostrado que los niveles de LH/CG/R en cultivo de trofoblasto primario son mayores en citotrofoblasto y en menor proporción en sincitiotrofoblasto [80], en tanto que en otro estudio se afirma que la expresión al parecer está regulada, y puede involucrar disminución [80] o incrementos [81] en la disponibilidad del receptor. Estos incrementos o descensos en la expresión pueden deberse posiblemente a la biodisponibilidad del ligando y su función biológica.

7.5 IGF-II induce la secreción de hCG durante la diferenciación trofoblástica

Se ha demostrado la habilidad del IGF-II para estimular la proliferación, migración e invasión de varios tipos celulares, tanto normales como malignos, incluyendo células de trofoblasto extraveloso, rhabdomyosarcoma, células endoteliales bovinas y células de cáncer de pulmón. En el proceso de implantación el IGF-II no sólo promueve migración celular, sino que igualmente contribuye a la angiogénesis uterina, ambos procesos indispensables para que se lleve a cabo la gestación normal [28, 82-84].

En el presente trabajo, se determinó el efecto de IGF-II y su capacidad para inducir secreción de hCG en células de trofoblasto extraveloso. Se encontró que IGF-II en concentraciones de 10nM induce la secreción de hCG y que además éste efecto es específico para IGF-II. Estos hallazgos se correlacionan con el hecho que IGF-II también indujo la expresión e incremento de transcritos de hCG en las etapas iniciales de la diferenciación trofoblástica, lo cual nuevamente es un

indicio de que IGF-II participa en procesos de diferenciación trofoblástica y que los aumentos paralelos de IGF-II y hCG en patologías como ETG pueden tener una relación estrecha en los procesos de malignización de la enfermedad [8]. De igual forma, cuando las células HTR-8 fueron expuestas a IGF-II, los cambios morfológicos observados, incluso desde las primeras 24h son un indicio más de un proceso de sincitización en desarrollo [85], lo cual es comparable con los resultados encontrados con las células expuestas a FSK, donde las cantidades de hCG secretadas aumentaron a medida que avanzaba el proceso de diferenciación. Se debe anotar que bajo estimulación con IGF-II, tanto las cantidades de hCG secretadas como los cambios morfológicos observados, son mayores que los encontrados sólo con el inductor de diferenciación.

La interpretación de estos hallazgos podría explicarse a través del aumento en la expresión de IGF-II y la consecuente secreción de hCG y sus cambios morfológicos similares a las células tratadas con FSK. Sin embargo, cuando a las células trofoblásticas se les suministra IGF-II en su medio de cultivo, estas no incrementan sus transcritos de IGF-II pero el estímulo es suficiente para generar secreción de hCG en etapas más tempranas del proceso de diferenciación. Estos incrementos tempranos en los niveles de la hCG durante la diferenciación trofoblástica comprometen funciones propias de la hormona, como aumento de la diferenciación y deciduización trofoblástica, inhibición de la contractibilidad miometrial y promoción de la angiogenesis uterina [86] [10]. Los procesos de diferenciación atribuidos a hCG se consideran claves porque sus vías de señalización pueden conducir a múltiples efectos como cambio a nivel de citoesqueleto, expresión de factores de crecimiento que promueven la migración, o secreción de proteínas que digieren la matriz extracelular [54]. Así mismo se ha reportado que factores de crecimiento tales como el TGF α , el factor inhibitorio de leucemia o el factor de crecimiento epidermal (EGF), requieren del receptor LH/CG para promover la diferenciación trofoblástica [87]; esto coincide con los resultados del presente estudio donde se encontró que los niveles de expresión de LH/CG

aumentaron tanto en procesos de diferenciación promovidos por el inductor FSK como por efecto de IGF-II. Todo lo anterior explicaría los cambios morfológicos tempranos observados en células trofoblásticas estimuladas con IGF-II y la formación de sincitio después de de 72h de cultivo.

De igual forma, haber estimulado las células trofoblásticas con FSK e IGF-II de forma simultánea muestra como las células trofoblásticas son capaces de modular y la vez sumar efectos para llegar a diferenciarse y por su puesto evidenciar sincitización, ya que se encontró que los cantidades de hCG secretada bajo éstas condiciones supera los niveles encontrados para cada uno de los estímulos por separado, lo cual podría sugerir que se presentan efectos aditivos o sinérgicos y conduce a pensar que puede existir una interacción en las vías de señalización involucradas.

7.6. El receptor IGF-IIR tiene un papel significativo en la expresión y secreción de hCG durante la diferenciación trofoblástica

Como se mencionó en párrafos anteriores, las funciones y señalización por medio del IGF-IIR ha sido objeto de grandes discusiones; en principio se postuló 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. En consecuencia, efectos como proliferación, migración e invasión, estarían mediados por la unión de IGF-II a los receptores IGF-IR y a la isoforma A del receptor de insulina [16, 34]. Sin embargo en los últimos años se ha incrementado la evidencia experimental de que IGF-IIR activa mecanismos de señalización intracelular por la unión del ligando IGF-II [13, 28, 30, 31, 75, 88]. Con respecto a esto, se conoce que la región citoplasmática del IGF-IIR tiene un tamaño de 163 aminoácidos y posee cuatro regiones que podrían ser dominios potenciales de unión para varias proteínas quinasas como la PKC, AMPc-quinasa y la caseína quinasa I y un posible mecanismo de dimerización [31, 88]. De otra parte, otras investigaciones

anotan que la interacción de IGF-II con su receptor, activaría la vía de las proteínas G inhibitorias y la vía MAPK (ERK1/2), lo cual conduce a un efecto biológico como la migración celular de manera independiente del IGF-IR. Sin embargo, en la literatura otros estudios demuestran evidencias contrarias a lo antes mencionado [89].

Por su parte, en el presente estudio se encontró que debido a la ausencia de IGF-IIR, la expresión de hCG decreció incluso hasta niveles por debajo del control; al igual que los niveles de secreción de hCG disminuyeron a valores de 3m UI/ml, prácticamente indetectables, muy por debajo de los niveles encontrados para línea celular no interferida (1290 mUI/ml). Estos hallazgos, por demás originales, conducen a pensar que IGF-II por interacción con su receptor modula las cantidades de hCG que se expresan y se secretan en células de trofoblasto extraveloso. Interesantemente, los ensayos con células interferidas en el IGF-IR indicaron que el receptor IGF-IR también desempeña un rol importante en la señalización activada por IGF-II y en la resultante expresión de hCG. Para correlacionar esta afirmación, reportes previos han demostrado que IGF-II puede señalar a través del receptor IGF-IR y promover efectos biológicos como proliferación celular, sobrevivencia celular, síntesis de ADN y ARN [13, 65].

De otra parte, cuando los tres modelos celulares estudiados son tratados con FSK hasta 72h de cultivo, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de hCG secretada, lo cual indica que las acciones de FSK, estos es, diferenciación y secreción de hCG por parte del sincitiotrofoblasto son independientes del receptor IGF-IIR. Así mismo, se conoce que FSK activa la adenilato ciclasa [58] [73] y en consecuencias las cantidades de AMPc intracelular se elevan, lo cual permite la activación final de una proteína sincitina y en consecuencia se forma el sincitiotrofoblasto [90]. Todo lo anterior, permite pensar que IGF-II tiene mecanismos de señalización diferentes a FSK para inducir diferenciación trofoblástica y secreción de hCG.

De acuerdo a las evidencias observadas en el presente estudio se puede afirmar que la disminución drástica de la expresión de hCG por la ausencia del receptor IGF-IIR contribuye al supuesto que IGF-II y su receptor están implicados en el aumento de hCG durante del desarrollo gestacional y que además el exceso de la hormona durante la patogénesis de la ETG tiene relación directa con los incrementos considerables de IGF-II reportados en suero y muestra de tejidos molar de mujeres con ETG. Así mismo, cuando en el presente estudio se encontró que el IGF-IIR además de estar implicado en la expresión de hCG en las etapas tempranas de la diferenciación trofoblástica también presenta relación directa con los elevados niveles de secreción de la misma, corrobora la hipótesis que IGF-II y su receptor podrían estar íntimamente ligados durante el desarrollo trofoblástico patológico.

La presente investigación abre un camino importante hacia la regulación de los mecanismos de expresión de IGF-II, su sistema de impronta y sus alteraciones, como base para comprender la biología del trofoblasto y su malignización.

8. CONCLUSIONES

Se pudo establecer que el perfil de expresión de miembros del sistema IGF durante el proceso de diferenciación trofoblástica cambia y está relacionado con incrementos en los transcritos de IGF-II, IGF-IIR, IGF-IR y el receptor de insulina. Estos cambios en los niveles de expresión conllevan a transformaciones celulares que afectan la morfología de células trofoblásticas de modo que se transformen de citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto, el cual por sus funciones endocrinas secreta hCG, hormona que a su vez cumple funciones de diferenciación celular, angiogenesis y decidualización, las cuales son importantes para el adecuado desarrollo embrionario y fetal.

Se demostró que IGF-II en concentraciones de 10nM tiene la capacidad de inducir expresión y secreción de hCG en la línea celular de trofoblasto extraveloso HTR-8/SVneo. Estos niveles de secreción de hCG inducidos por la presencia de IGF-II son superiores a los encontrados para células tratadas con el inductor de diferenciación, lo cual genera una relación directa entre niveles elevados de IGF-II e incrementos en la secreción de hCG.

Se pudo establecer que IGF-II tiene efectos significativos sobre el proceso de diferenciación trofoblástica debido a que es capaz de modificar la morfología celular de la línea HTR-8/SVneo e incrementar los niveles de la hormona hCG después de 72h de exposición al estímulo, lo cual es evidencia que IGF-II está comprometido en fenómenos de sincitización trofoblástica.

Se determinó que existe una relación directa entre IGF-II y su receptor IGF-IIR en los incrementos de transcritos y proteína hCG durante el proceso de diferenciación trofoblástica, ya que al tener un modelo celular silenciado para el receptor IGF-IIR y estimulado con IGF-II los niveles de expresión y secreción de hCG disminuyeron incluso por debajo de sus controles experimentales. Estos mecanismos conjuntos

involucran al receptor IGF-IIR dan soporte experimental del importante rol de este receptor en fenómenos de señalización y funcionalidad celular, contribuyendo al mecanismo de acción del sistema IGF en el desarrollo de la placenta y sus patologías.

9. RECOMENDACIONES

Si bien es cierto el presente trabajo buscaba determinar el papel de miembros del sistema IGF en los procesos de diferenciación trofoblástica, es necesario examinar las funciones biológicas, perfiles de expresión y secreción de hCG e IGF-II en periodos posteriores a 72h, y así establecer el tipo de interacción y vías de señalización por las cuales IGF-II ejerce sus funciones de promover expresión y secreción de hCG en trofoblasto extraveloso.

Es necesario determinar el comportamiento bioquímico del receptor de hCG durante el proceso de diferenciación trofoblástica en la línea celular HTR-8/SVneo, de ésta manera establecer con mayor certeza la función de este receptor durante la diferenciación trofoblástica.

El importante hallazgo que el receptor IGF-IIR está implicado en la modulación de los niveles de hCG, abre un panorama suficiente para continuar con trabajos que conduzcan a dilucidar los mecanismos de señalización intracelular a través de los cuales éste receptor ejecuta sus funciones biológicas.

Las evidencias microscópicas mostradas en el presente trabajo dan el soporte necesario para continuar con abordajes experimentales que permitan tener claridad del fenómeno de sincitización en la línea celular HTR-8/SVneo y el efecto que IGF-II genera sobre las células en diferenciación.

10. FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación de la sede Bogotá DIB, bajo el título: Papel del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la regulación del crecimiento y diferenciación trofoblástica y hizo parte del proyecto: Papel de los Factores de crecimiento similares a la Insulina (IGF) en la migración e invasión de células trofoblásticas. Implicaciones en la enfermedad trofoblástica gestacional y coriocarcinoma, financiado por la DIB (código DIB: 8003364).

También hizo parte del proyecto: Importancia de los receptores híbridos receptor de insulina-receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (InsR/IGF-IR) en las redes de señalización del sistema IGF, financiado por Colciencias (Código HERMES: 11386, Contrato 374/2008).

11. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Sofía Freyre Bernal, Andrés F. Vallejo, Adriana Umaña, Myriam Sánchez-Gómez. Diferenciación trofoblástica y efecto del factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) en la secreción de la hormona gonadotropina coriónica humana. Resumen publicado en Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas ACCB. Numero 21, Suplemento 1 año 2009. Páginas 233-234. Ponencia Oral: Congreso de Ciencias Biológicas. Popayán 2009.

Sofía Freyre Bernal, Andrés F. Vallejo, Adriana Umaña, Myriam Sánchez-Gómez. Efecto de IGF-II en la secreción de hCG y su posible papel en el desarrollo de la enfermedad trofoblástica gestacional. Resumen publicado en la Revista Colombiana de Cancerología en el volumen 13 número 4. Dic de 2009. Presentación en poster en la Jornada de investigación "Conocimiento para el control del cáncer" del Instituto Nacional de Cancerología 2009.

Ricardo Cabezas, Andrés Vallejo, Sofía Freyre Bernal, Adriana Umaña, Myriam Sánchez-Gómez. Efectos funcionales de la gonadotropina coriónica humana y de los factores de crecimiento similares a la insulina en la línea celular trofoblástica HTR-8/SVneo. Artículo científico enviado a la revista Acta Biológica de la Universidad Nacional y actualmente el proceso de edición.

Sofía Freyre Bernal, Andrés Vallejo, Juan Carlos Alarcón, , Adriana Umaña, Myriam Sánchez-Gómez. IGF-IIR: A novel autocrine loop between IGF-II and hCG. Resumen aprobado para ponencia oral en "The 5th international Congress of the GRS and IGF Society " en New York. Octubre 2010.

Juan Carlos Alarcón, Sofía Freyre Bernal, Andrés Vallejo, Adriana Umaña, Myriam Sánchez-Gómez. Expression of the IGF system and trophoblastic cell differentiation. Resumen aprobado para presentación en poster en "The 5th international Congress of the GRS and IGF Society "en New York. Octubre 2010.

12. BIBLIOGRAFÍA

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., A. Meisser, and A. Campana, *Biochemistry and Molecular Biology of Trophoblast Invasion*. Ann NY Acad Sci, 2001. **943**(1): p. 157-162.
3. Bischof, P. and I. Irminger-Finger, *The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(1): p. 1-16.
4. Bischof, P., et al., *Implantation of the Human Embryo: Research Lines and Models*. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2006. **62**(4): p. 206-216.
5. 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. 121-141.
6. Moffett-King, A., *Natural killer cells and pregnancy*. Nature Reviews. Immunology, 2002. **2**(9): p. 656-663.
7. Staun-Ram, E., et al., *Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2004. **2**(1): p. 59.
8. Zygumt, 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. 261-267.
9. Ticconi C, Z.A., Belmonte A, Realacci M, Rao CV, Piccione E., *Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes*. Placenta, 2007. **28**(Suppl A): p. S137-S143.
10. Zygumt, M., et al., *Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5290-6.
11. Hull, K.H.e.a., *Growth hormone: roles in female reproduction*. Journal of endocrinology, 2001. **168**: p. 1-23.
12. Silva, C., Kloth, M. Lyons, C., Dunn, C. and Kirk S, *Intracellular signaling by growth hormone variant (GH-V)*. Growth Hormone & IGF Research, 2002. **12**: p. 374-380.
13. Begley, T.P., *Insulin and IGFs*. Hormones Academic press, 2009. **80**.
14. Jones JI, C.D., *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. Endocr Rev, 1995. **16**(1): p. 3-34.
15. Nissley P, L.W., *Insulin-like growth factor receptors*. Growth Factors, 1991. **5**(1): p. 29-43.
16. 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. 567-576.
17. Sanchez.-Gomez. M, e.a., *Significado Biológico del Eje Hormona de Crecimiento (GH)/ Factor de Crecimiento Similar a la Insulina*. Rev Acad Colomb Cienc, 2006. **30**(114): p. 108.
18. Han, V.K., et al., *Expression of somatomedin/insulin like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **66**(2): p. 422-9.

19. Duan, C., *Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins*. J Endocrinol., 2002. **175**(1): p. 41-54.
20. 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.
21. Handwerger, S.a.B.A., *Dynamic changes in gene expression during human trophoblast differentiation*. Recent Prog Horm Res, 2003. **58**: p. 263-81.
22. Mandl, M., et al., *Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models*. Histochem Cell Biol, 2002. **117**(5): p. 391-9.
23. Tang H T, D.H.Y., W Huang, H K Zhou, X H Lu y G Ye., *Hypome-thylated P4 Promoter Induces Expression of the Insulin-Like Growth Factor-II Gene in Hepatocellular Carcinoma in a Chinese Population*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(14): p. 4171-4177.
24. Arney, K.L., *H19 and Igf2 enhancing the confusion*. Trends Genet, 2003. **19**(1): p. 17-23.
25. Gabory A, M.A.R., T Yoshimisu y L Dandolo, *The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA*. Cytogenet Genome Res, 2006. **113**: p. 188-193.
26. Cantero, M.E., *Estudio Predictivo de algunos Marcadores Bioquímicos en Suero de Pacientes con Mola Hidatidiforme*, in *in Tesis de Maestría en Bioquímica*. 2004, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá.
27. Xu, G., et al., *Control of Proliferation, Migration, and Invasiveness of Human Extravillous Trophoblast by Decorin, a Decidual Product*. Biol Reprod, 2002. **67**(2): p. 681-689.
28. 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. 3665-3674.
29. Martin L. Adamo, L.W., Lisa Heron, Dalit Ben-Yosef, Hong Zhao, and Derek Le Roith. .NJ, Editor. . , *Overview and molecular aspects of the insulin-like growth factor system, in IGF and nutrition in health and disease*. E.L.Feldman. Humana Press Inc.,. 2003, Houston.
30. Hawkes, C., et al., *Single Transmembrane Domain Insulin-Like Growth Factor-II/Mannose-6-Phosphate Receptor Regulates Central Cholinergic Function by Activating a G-Protein-Sensitive, Protein Kinase C-Dependent Pathway*. J. Neurosci., 2006. **26**(2): p. 585-596.
31. Brown, J., Delaine Carlie, Zaccheo Oliver, Siebold Christian, *Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF-IIR interaction*. The EMBO journal, 2008. **27**: p. 265-276.
32. Brande, J.L.V.d., *Structure of the human insulin-like growth factors: relationship to function, in The insulin-like Growth factors: structure and biological functions*, O.m. publications, Editor. 1992: Oxford.
33. Denley, A., et al *Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C domain*. Endocrinology, 2005.
34. Belfiore A, F.F., Pandini G, Sciacca L, Vigneri R, *Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor/Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease*. Endocrine Reviews, 2009. **30**(6): p. 586-623.
35. Genua M, P.G., Cassarino MF, Messina RL, and Frasca F., *c-Abl and Insulin Receptor Signalling*, in *Vitamins and Hormones*, Elsevier, Editor. 2009: Oxford.

36. Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A., *Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved*. J. Biol. Chem, 2002. **277**: p. 39684-39695.
37. 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.
38. Fowden, A.L., *The Insulin-like Growth Factors and feto-placental Growth*. Placenta, 2003. **24**(8-9): p. 803-812.
39. 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.
40. 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.
41. Ulf-Hakan Stenman, A.T., Henrik Alftan and Leena Valmu., *The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG*. Human Reproduction, 2006. **12**(6): p. 769-784.
42. Fluhr, H., et al., *Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells*. Fertility and Sterility, 2008. **90**(4, Supplement 1): p. 1390-1395.
43. Bischof, P. and A. Campana, *Molecular mediators of implantation*. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 2000. **14**(5): p. 801-814.
44. Reisinger K., M.T., Münstedt, Zygmunt, M. , *The gonadotropins: Tissue-specific angiogenic factors?* Molecular and cellular endocrinology, 2007. **269**: p. 65-80.
45. Cole, L.A., *New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 8.
46. Huber AV, S.L., Prast J, Haslinger P, Knöfler M, *Human chorionic gonadotropin attenuates NF-kB activation and cytokine expression of endometriotic stromal cells*. Mol Hum Reprod, 2007. **13**: p. 604.
47. Rao, C.V., Li X, Manna SK, Lei ZM, Aggarwal BB, *Human Chorionic gonadotropic decreases proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF-kB and AP-1 activation*. J Biol Chem, 2004. **279**: p. 25503-25510.
48. Zygmunt, M., et al., *Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro*. Placenta, 1998. **19**(8): p. 587-93.
49. Cameo, P., et al., *Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**(50).
50. 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.
51. Costagliola, S., et al., *Specificity and promiscuity of gonadotropin receptors*. Reproduction, 2005. **130**(3): p. 275-81.
52. Fields, M.J.a.M.S., *Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals*. Biol Reprod, 2004. **71**(5): p. 1412-8.
53. Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff., *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocr Rev, 2002. **23**(2): p. 141-74.

54. Prast, J., et al., *Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling*. *Endocrinology*. 149, 2008. **3**(979-87).
55. 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. 3665-3674.
56. Novoa-Herrán, S.S. and M.Y. Sánchez-Gómez, *Efecto del IGF-II sobre la actividad de la MMP-9 en la línea celular derivada de trofoblasto, HTR8.*, in *Química*. 2007, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 8.
57. La Bret T, P.T., J Benbunan, D Salet-Lizée y R Villet., *Endometrial Choriocarcinoma in Peri-menopausal Women*. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, 2005. **34**(1): p. 85-89.
58. Kebabian, J.W., *The cyclic AMP cascade: a signal transduction system*. *Neurotransmission*, 1992. **8**: p. 1-4.
59. Graham, C.H., et al., *Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan*. *Experimental Cell Research*, 1993. **206**(2): p. 204-211.
60. 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.
61. 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*. *Experimental Cell Research*, 1995. **217**(2): p. 419-427.
62. Neelima, P.S. and A.J. Rao, *Gene expression profiling during Forskolin induced differentiation of BeWo cells by differential display RT-PCR*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008. **281**(1-2): p. 37-46.
63. Mosmann, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. *J. Immunol. Meth*, 1983. **65**: p. 55-63.
64. Roberts, C.T., J.A. Owens, and A.N. Sferruzzi-Perri, *Distinct Actions of Insulin-Like Growth Factors (IGFs) on Placental Development and Fetal Growth: Lessons from Mice and Guinea Pigs*. *Placenta*, 2008. **29**(Supplement 1): p. 42-47.
65. 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.
66. Lunghi, L., et al., *Control of human trophoblast function*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2007. **5**(1): p. 6.
67. 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.
68. Zhang, X., et al., *Adrenomedullin enhances invasion by trophoblast cell lines*. *Biol Reprod*, 2005. **73**(4): p. 619-26.
69. 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*. *Experimental Cell Research*, 1998. **244**(1): p. 147-156.
70. Lala, P.K., G.S. Hamilton, and A. Athanassiades, *Role of growth factors and other placental signals in extravillous trophoblast cell function: A review*. *Placenta*, 1998. **19**: p. 327-339.
71. Dupont, J., et al., *The insulin like growth factor axis in cell cycle progression*. *Horm Metab Res*, 2003. **35**(11-12): p. 740-50.

72. 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.
73. Lambot N, L.P., Delporte C., *Effect of IPs, cAMP, and cGMP on the hPL and hCG secretion from human term placenta*. Molecular and Cellular Endocrinology 2005. **243** p. 80-85.
74. Kreiling, J., Byrds, J., MacDonald, R., *Domain Interactions of the Mannose 6-Phosphate/Insuline-like Growth Factor II Receptor*. The Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(22): p. 21067-21077.
75. El-Shewy, H., Lee, M., Obeid, L., Jaffa, A. and Luttrell, L., *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*. The Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(36): p. 26150-26157.
76. Pollak, M., *Insulin, insulin-like growth factors and neoplasia*. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **22**(4): p. 625-638.
77. 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.
78. El-Shewy, H.M., Lee, M. H., Obeid, L. M., Jaffa, A. A., and Luttrell, L. M. , *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**: p. 26150-26157.
79. Adams, T.E., Epa, V. C., Garrett, T. P., and Ward, C. W. , *Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor*. Cell. Mol. Life Sci, 2000. **57**: p. 1050-1093.
80. 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.
81. Frenco J-L, V.M., Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagranti Y, Tarrade and P.D. A, Blot P, Evain-Brion D., *Defect of villous cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in Down's syndrome*. J Clin Endocrinol Metab., 2000b. **85**(3700-3707).
82. David-Pfeuty, T., *The flexible evolutionary anchorage-dependent Pardee's restriction point of mammalian cells. How its deregulation may lead to cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2006. **1765**(1): p. 38-66.
83. 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.
84. 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.
85. Martínez F.A, B.J., Alicia Ortega A, Vadillo F. , *Desarrollo y validación de un modelo de cultivo in vitro para el estudio de la diferenciación del trofoblasto humano*. Ginecol Obstet Mex, 2006. **74**: p. 657-65.
86. Shi QJ, L.Z., Rao CV, Lin J and 1395, *Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts*. Endocrinology, 1993. **132**: p. 1387-1395.
87. Yang M, L.Z., Rao CV . , *The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium*. Endocrinology, 2003. **144**: p. 1108-1120

88. Hawkes, C., S. Kar., *The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system*. Brain Research Reviews, 2003. **44**: p. 117-140.
89. Korner, C., et al., *Analysis of mutant cytoplasmic receptor domains Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor fails to interact with G-protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(1): p. 287-95.
90. Knerra I, S.S., Wicha C., *Stimulation of GCMa and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions* FEBS Letters 2005. **579**: p. 3991-3998.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de tinción Hematoxilina & Eosina para células HTR-8/SVneo.

1. Para fijar las células a teñir se cubre las mismas con 200µl de alcohol etílico absoluto por un tiempo máximo de 5 minutos.
2. Retirar por completo el volumen anterior y reemplazarlo por 200 µl de hematoxilina de Harris y dejar reaccionar por 2 minutos.
3. Retirar completamente el volumen y lavar dos veces con un volumen igual de agua. Se deben evitar movimientos bruscos durante los lavados.
4. Lavar con 100 µl de agua amoniacal. Este paso es fundamental y requiere realizarse con rapidez y cuidado.
5. Una vez retirada el agua amoniacal se debe poner 200 µl de Eosina por un tiempo de 2 min y 30 segundos.
6. Se retira el volumen anterior y se reemplaza con agua para efectuar los lavados como en el paso 3.
7. Se deja un volumen aproximado de 100 µl de agua en el pozo y se procede a visualizar en microscopio de luz.

Anexo 2.

Cuantificación de Niveles de hCG por inmunoensayo IRMA.

Coat-A-Count hCG IRMA es un ensayo radioinmunométrico en fase sólida. El ensayo utiliza anticuerpos policlonales anti-hCG marcados con ^{125}I en fase líquida y anticuerpos monoclonales anti-hCG inmovilizados en la pared de un tubo de poliestireno.

En el procedimiento la hCG es capturada entre el trazador policlonal y los anticuerpos monoclonales que recubren el tubo. EL trazador policlonal no unido se remueve por decantación y lavado del tubo. El tubo se cuenta en un contador gama durante 1 minuto. La concentración de hCG en la muestra del paciente es directamente proporcional al número de cuentas por minuto. La concentración de hCG se determina comparando el número cuentas con las obtenidas con el juego de calibradores suministrados. En la figura 24 se muestra las curvas de calibración que relacionan la concentración de hCG en mUI/ml de cada uno de los estándares (Tabla 6) con los valores de unión porcentual calculado para cada uno de los estándares.

Tabla 6. Concentraciones de hCG de los estándares de calibración

Calibrador	hCG en mUI/ml
A	0
B	5
C	25
D	50
E	100
F	250
G	500

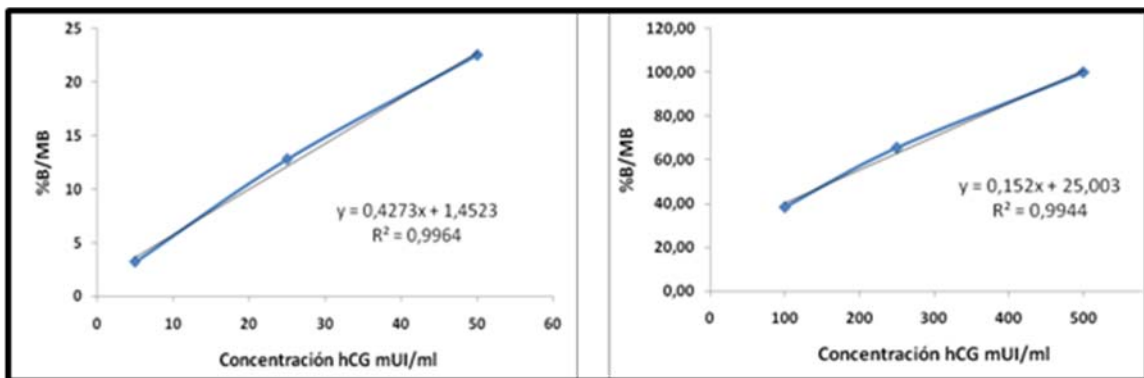
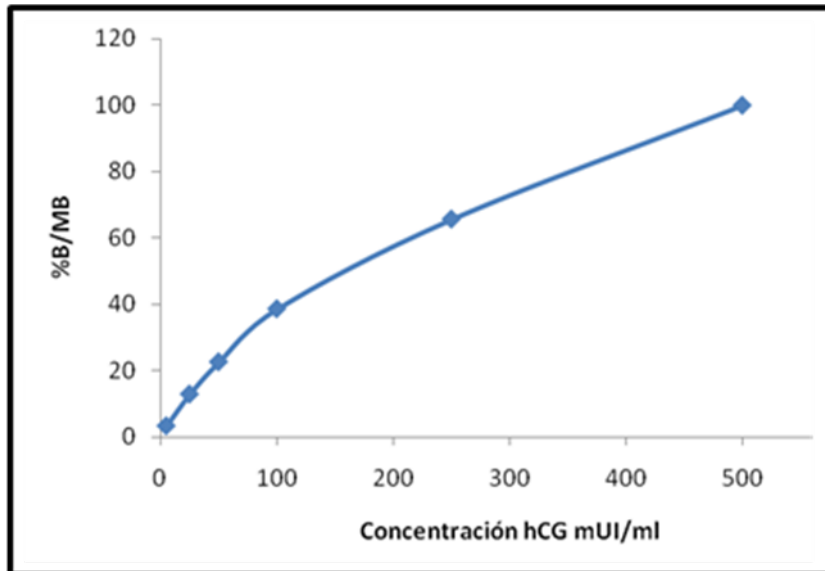


Figura 24. Curvas de calibración para inmunoensayo IRMA. (A) Curva de calibración global. **(B)** curva de calibración para concentraciones de hCG menores a 50mUI/ml **(C)** curva de calibración para concentraciones de hCG superiores a 100mUI/ml.

Anexo 3.

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 120000 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 4C.
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.

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 formaldehído 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%, formaldehído 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