

Tesis Doctoral

Participación del ácido lisofosfatídico en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre

Beltrame, Jimena Soledad

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Beltrame, Jimena Soledad. (2017). Participación del ácido lisofosfatídico en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6465_Beltrame

Cita tipo Chicago:

Beltrame, Jimena Soledad. "Participación del ácido lisofosfatídico en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6465_Beltrame

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Departamento de Química Biológica.

Participación del ácido lisofosfatídico en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica.

Jimena S. Beltrame

Directora de tesis: Dra. María Laura Ribeiro.

Consejera de estudios: Dra. Adalí Pecci.

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2017.

Los resultados presentes en esta tesis han sido parcialmente publicados en:

- Lysophosphatidic acid-triggered pathways promote the acquisition of trophoblast endovascular phenotype in vitro. **Beltrame JS**, Sordelli MS, Cañumil VA, Franchi AM, Ribeiro ML. J Cell Biochem. 2017. DOI: 10.1002/jcb.26239.

- Endogenous lysophosphatidic acid participates in vascularization and decidualization at the maternal-fetal interphase in the rat. Sordelli MS* and **Beltrame JS***, Zotta E, Gomez N, Dmytrenko G, Sales ME, Blois SM, Davio C, Perez Martinez S, Franchi AM, Ribeiro ML. Reprod. Fertil. Devel., 2017. DOI: 10.1071/RD16235.

***Ambos autores contribuyeron equitativamente.**

A Temer...

AGRADECIMIENTOS.

Quisiera empezar agradeciendo a la FCEyN. A mi facultad, por formarme y educarme. A los docentes por transmitirme sus conocimientos y ayudarme a desarrollar un pensamiento científico.

Al CONICET y al FONCyT, por las becas y los subsidios que hicieron que este trabajo sea posible.

A mi directora de tesis. A mi jefa y mi mentora. A mi oreja y mi guía... a Lauchi. Principalmente, por no seguir los esquemas. Porque el conocimiento nunca fue direccional. Porque siempre escuchó y permitió mi opinión y mis ideas. Hace 7 años busqué un lugar para realizar mi tesis de licenciatura y sin saber me encontré con una gran persona, que me iba a guiar y formar en esta hermosa vocación que compartimos. Tengo una admiración aparte por las mujeres que demuestran día a día que se puede tener una vida, tener hijos, y seguir logrando lo que uno quiere. Gracias por la confianza, la motivación y por hacer siempre mucho más de lo que deberías.

A Ana, nuestra directora, por haber corregido con tanta dedicación y rapidez los archivos que le mandamos sin importar días ni horarios. Junto con Silvi, nos compartieron su criterio y conocimiento científico.

A Mica. Porque nunca estuve sola, y nunca hubo distancias. Gracias por tu humildad y sencillez. Por ser la Dra. Sordelli pero siempre aprender a la par. Especialmente, gracias por ser prolija solo para mí, por ocupar el puesto de la sensible del grupo y por enseñarme cuánto es mil por uno.

A Cyntia. A mi compañera de viernes musicales. La que sabe apreciar una buena interpretación de las letras de las canciones. A la que se la extraña, pero que tuvo el valor y el coraje de buscar nuevos horizontes. Por más cervezas, y por muchos más momentos compartidos.

A Vanesa Soledad. A la que comprende la Batischeñal de perros salchichas. Gracias por ser mi compañera de gym, y como todo buen deportista: de afterlab.

A Mari. A la que me hizo darle sentido a "Desde Ranelagh me vengo". Gracias por la compañía y la ayuda diaria.

A Maki, porque si tenés alguna duda siempre tenés a Maki.

A Rami, que siempre supo estar para todo y para todos. La de los mates, la buena onda y la que en una mirada te saca la ficha.

A María Zorrilla, por haberme introducido en el mundo mágico de la qPCR.

A Pampi, Fernando Gabriel, Agustinson, Rachel, Lu, Martin, Turi, Manu, Juli 1, Juli 2 y Agustincito. Por hacerme reír día a día. Por hacer más llevaderas las horas de espera, los experimentos fallidos y sobretodo estar al pie del cañón para festejar los experimentos que SI salen bien.

A todo el CEFYBO. A mi lugar de trabajo y segunda casa. A todos y cada uno de los integrantes. A las nuevas adquisiciones, a Tomi y Andreína. A Pachi, Vane, y Roxi. Aunque a Vane no sé si tanto, porque siempre me echa del labo. A Dani porque siempre que lo necesitamos, viene con tanta predisposición y buena onda. A Julito, Daniel, Eduardo, Marcela y Enzo. A las chicas de administración, Patri, Ale y Cris, las que están y las que se fueron. A los chicos del 17, del 5to piso, a los malenos, los chulus, a Coco, a la tía Andre y a los AFE.

A Fernanda Parborell y a Leopoldina. Por su colaboración y por compartir sus conocimientos de células endoteliales que tanto enriquecieron este trabajo de tesis.

A Sole, mi compañera de esperas eternas en la facu. Por las mil charlas, y porque parece que nunca pasó el tiempo.

A Flor, Dani, Marian, Yani, Juli y Carlo. A mis compañeras de vida, las que no entienden bien que soy, si soy bioquímica, bióloga o médica. Por compartir mis pasiones. Por cada momento vivido. Y a lo mejor que pudieron hacer a Agus, a Giuli, y al pequeño que nos rompe el club de chicas.

A mi gemela fantástica y hermana del alma, a María. A la que vence las distancias.

A Diego. Al que se las arregló para estar en los agradecimientos de la tesina y en los de la tesis. Te quiero.

A mis tías Dori y Ele, por estar siempre, en las buenas y en las malas.

A mi familia, a mi Hermosa familia. A la que siempre apostó por mí. Especialmente a mis padres, a mi gran ejemplo de amor, superación y mis modelos a seguir. A Emi, por cuidarme siempre, y siempre fiel a su manera. Y a Mati, por romper las estructuras y complementar este hermoso rompecabezas familiar.

A mi abuela Sari ♥.

Y a mi abuelo, al único, a Temer. Daría muchas cosas por escuchar una vez más “la doctorcita”. Es todo tuyo.

Y a Dios, por ser una privilegiada. Porque no es poco poder formarse, estudiar y trabajar de lo que a uno le gusta. Gracias.

**Participación del ácido lisofosfatídico en la angiogénesis
del trofoblasto humano de primer trimestre.**

El establecimiento de la preñez depende de una adecuada coordinación entre diferentes procesos vasculares que ocurren en la interfase materno-fetal. En las etapas tempranas, el trofoblasto extraveloso invasor cumple un rol crítico ya que reemplaza a las células endoteliales de los vasos remodelando las arterias espiraladas uterinas. Durante este proceso, el trofoblasto adquiere un fenotipo endotelial y tapiza las arterias espiraladas del útero transformando los vasos musculares rígidos en sacos sinusoidales flácidos. Este remodelado es fundamental ya que de él depende la formación de la placenta y la llegada de oxígeno y nutrientes al embrión en crecimiento. Se ha postulado que defectos en este mecanismo podrían contribuir a la disfunción placentaria provocando complicaciones obstétricas como las fallas implantatorias o la preclampsia.

En nuestro laboratorio estudiamos el rol de mediadores lipídicos en los procesos que tienen lugar en la interfase materno-fetal. En particular, teniendo en cuenta resultados propios y de otros grupos de investigación, en este proyecto nos propusimos investigar el rol del ácido lisofosfatídico (LPA), un potente mensajero de origen lipídico que ejerce su función a través de 6 receptores (LPA1-6). El estudio de la participación del LPA en la implantación del blastocisto, ha puesto de manifiesto el rol preponderante del receptor LPA3 en las primeras etapas de la gestación⁴⁻⁶. Sin embargo, el papel del LPA en la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre, así como en la transformación de la vasculatura uterina durante las etapas tempranas de la gestación, aún no han sido estudiados. Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo es investigar el rol del LPA en la angiogénesis de la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

Dada la imposibilidad ética de estudiar el proceso de implantación en humanos, necesariamente se debe recurrir a modelos experimentales *in vitro* (cultivos de líneas celulares) e *in vivo* (animales de laboratorio). Por lo tanto, en el presente trabajo adoptamos dos estrategias experimentales. En el primer diseño, utilizamos una línea celular de trofoblasto humano de primer trimestre, HTR-8/SVneo (H8), para investigar la acción *in vitro* del LPA en la respuesta endovascular del trofoblasto. En el segundo, hembras de la cepa Wistar en día 5 de gestación recibieron una dosis única intra-uterina de un antagonista selectivo del LPA3 (DGPP 0.1 mg/kg). Mediante este diseño experimental *in vivo* investigamos la participación del LPA endógeno y su receptor LPA3 en diferentes aspectos de la fisiología vascular uterina durante la implantación embrionaria.

Observamos que el LPA induce la formación de túbulos, la migración y la proliferación del trofoblasto humano de primer trimestre, indicando que este mediador lipídico promueve la angiogénesis in vitro del trofoblasto en la interfase materno-fetal. Utilizando antagonistas selectivos de los diferentes subtipos de receptores de LPA, observamos que la formación de túbulos está mediada por el LPA3. Este nuevo rol del LPA en las funciones del trofoblasto implica la participación de las vías de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), siendo el óxido nítrico el último efector en esta cascada de señalización. Además, estudiamos la expresión de diferentes mediadores angiogénicos (VEGF-C, IL-8, IL-6) y observamos que el LPA incrementa la expresión del mRNA de IL-6, y que la liberación de esta citoquina al sobrenadante de cultivo media el efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto.

Las hormonas esteroideas, estradiol y progesterona, funcionan como grandes orquestadoras de los procesos que tienen lugar en el sitio de implantación durante las primeras etapas de la gestación. Observamos que la incubación con estradiol y progesterona promueve el fenotipo endovascular del trofoblasto y que este efecto está mediado por el receptor LPA3.

La interacción del trofoblasto con el endotelio es fundamental durante el remodelado de las arterias espiraladas. Por lo tanto, decidimos investigar si la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto inducido por LPA, modula el comportamiento de las células endoteliales. Para ello, utilizamos medios condicionados provenientes de ensayos de tubulogénesis de las células H8 incubadas con LPA. Observamos que estos sobrenadantes promueven la migración de las células endoteliales (línea EA.hy926). Esta interacción trofoblasto-endotelio ocurre por la secreción de factores solubles que involucran los productos de las vías de la COX-2, la iNOS y la IL-6.

Por último, observamos que el bloqueo farmacológico in vivo del receptor LPA3 aumenta la reabsorción embrionaria en ratas (~60%), lo que se correlaciona con defectos en la macro y microvasculatura, apoyando por lo tanto los resultados obtenidos in vitro.

En resumen, en este trabajo de tesis hemos demostrado que el LPA promueve los procesos vasculares del sitio de implantación regulando el fenotipo endovascular del trofoblasto, la interacción trofoblasto-endotelio, y el desarrollo de los vasos sanguíneos del útero. Además, describimos que estos fenómenos estarían modulados por las hormonas esteroideas, las cuales son partícipes fundamentales de los eventos que tienen lugar durante la implantación embrionaria. Estos resultados nos permiten postular nuevas funciones para el LPA vinculadas con el remodelado vascular que tiene lugar en la interfase materno-fetal durante la gestación temprana, mecanismo fundamental para el mantenimiento y el progreso del embarazo.

Palabras claves: ácido lisofosfatídico, interfase materno-fetal, trofoblasto endovascular, angiogénesis, ciclooxigenasa-2, óxido nítrico sintasa inducible, interleuquina-6, hormonas esteroideas, células endoteliales.

ABSTRACT.

Participation of lysophosphatidic acid in human first trimester trophoblast angiogenesis.

The establishment of successful pregnancy requires a profound reorganization of uterine and fetal tissues. The coordination of vascular processes at the maternal-fetal interface is crucial and involves extravillous trophoblast differentiation into endovascular trophoblast. Endovascular trophoblast invades maternal spiral arteries, and not only disrupts the endothelium-myometrium interactions, but also replaces endothelial and myometrial cells, while acquiring an endothelial-like phenotype. The adequate remodeling of the uterine vessels ensures sufficient blood flow in response to the increasing metabolic demands of the embryo. Failure to achieve these transformations is correlated with severe obstetric complications such as implantation failure and preeclampsia. Much effort is being made to elucidate the molecules and mechanisms that underlie the transformation of fetal trophoblast into the endovascular phenotype. Understanding the possible causes of the disorders associated with inadequate vascular remodeling would help to design new strategies to alleviate these pathologies.

Some of the most widely studied mediators in reproduction are the phosphorylated lipids such as Lysophosphatidic acid (LPA). LPA regulates several female reproductive functions through 6 G-protein coupled receptors, LPA1-6. LPA participates in embryo implantation and contributes to vascular physiology in different biological systems. However, the role of LPA on vascular processes at the implantation site has not been investigated.

We adopted an *in vitro* and an *in vivo* pharmacological approach to study LPA action on trophoblast endovascular response and uterine transformation during early gestation.

The HTR-8/SVneo cell line (H8) was used to model the acquisition of the trophoblast endovascular phenotype *in vitro*. We observed that LPA increased trophoblast tube formation, migration and proliferation. By using selective antagonists, we showed that enhanced tubulogenesis was mediated by LPA3 receptor. In addition, COX-2 and iNOS pathways participated in LPA-stimulated tubulogenesis, being nitric oxide the last effector.

When we investigated if the master hormones that orchestrate crucial events at the implantation sites, modulate trophoblast angiogenesis, we observed that estradiol + progesterone increased H8 tube formation via LPA3.

The interaction between the trophoblast and the endothelium is relevant during the remodeling of the spiral arteries. We demonstrated that trophoblast LPA-triggered secreted factors increased the migration of the EA.hy926 endothelial cell line.

Finally, the administration of a selective LPA3 antagonist to Wistar rats in day 5 of gestation increased the rate of embryo resorption (60%) associated to macro and microvascular defects.

Our results demonstrate a new role for LPA during spiral artery remodeling at the maternal-fetal interface, and could help to elucidate the causes of obstetric complications as implantation failure and preeclampsia.

Keywords: lysophosphatidic acid, maternal-fetal interface, endovascular trophoblast, angiogenesis, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, interleukin-6, steroid hormones, endothelial cells.

ÍNDICE.

| | |
|---|----|
| Introducción. | 1 |
| 1. Importancia del tema de estudio. | 1 |
| 2. La gestación temprana. | 2 |
| 2.1. Características generales. | 2 |
| 2.2. Implantación del blastocisto. | 2 |
| 2.2.1. Trofoblasto. | 4 |
| 2.2.2. Trofoblasto y remodelado vascular. | 6 |
| 2.2.3. Decidualización. | 9 |
| 3. Características del modelo de estudio. | 10 |
| 3.1. Modelos de estudio de la angiogénesis del trofoblasto y la placentación. | 10 |
| 4. El ácido lisofosfatídico. | 13 |
| 4.1. Estructura, metabolismo y mecanismo de acción del ácido lisofosfatídico. | 13 |
| 4.2. El LPA y el receptor LPA3 en el proceso de implantación. | 15 |
| 4.3. El LPA y la angiogénesis. | 16 |
| 5. Mediadores de procesos vasculares. | 18 |
| 5.1. Óxido nítrico. | 18 |
| 5.1.1. Biosíntesis y mecanismo de acción. | 18 |
| 5.1.2. El NO y la angiogénesis. | 19 |
| 5.2. Prostaglandinas. | 21 |
| 5.2.1. Características generales. | 21 |
| 5.2.2. Las PGs y la implantación. | 24 |
| 5.3. Citoquinas y factores angiogénicos. | 25 |
| Hipótesis y objetivos. | 27 |
| Materiales y métodos. | 29 |
| 1. Medios y drogas. | 29 |
| 1.1. Drogas. | 29 |
| 1.2. Medios utilizados. | 30 |
| 2. Modelos experimentales. | 30 |
| 2.1. Diseño <i>in vitro</i> : líneas celulares. | 31 |
| 2.1.1. Trofoblasto humano de primer trimestre. | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.1.2. Línea celular endotelial humana. | 31 |
| 2.2. Modelos animales. | 32 |
| 2.2.1. Declaración ética. | 32 |
| 2.2.2. Animales. | 32 |
| 3. Formación de túbulos. | 33 |
| 4. Proliferación. | 35 |
| 5. Migración. | 35 |
| 6. Tinción con faloidina. | 36 |
| 7. Inmunocitoquímica. | 36 |
| 8. RT-PCR. | 36 |
| 8.1. RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). | 37 |
| 9. Inmunoelctrotransferencia (western blot). | 38 |
| 9.1. Procesamiento de la muestra. | 38 |
| 9.2. Separación electroforética de las muestras. | 39 |
| 9.3. Electrotransferencia de proteínas. | 39 |
| 10. Estudios <i>in vivo</i> . | 40 |
| 11. Análisis estadístico. | 42 |
| Resultados. | 43 |
| Resultados <i>in vitro</i> . | 44 |
| 1. Expresión del sistema LPA/LPA3. | 44 |
| 2. Efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre <i>in vitro</i> . | 46 |
| 2.1. Formación de túbulos. | 46 |
| 2.1.1. Efecto del LPA sobre la formación de túbulos. | 46 |
| 2.2. Efecto del LPA sobre la migración del trofoblasto. | 49 |
| 2.2.1. Tinción con faloidina (faloidina – TRITC). | 50 |
| 2.2.2. Migración por herida. | 50 |
| 2.3. Proliferación del trofoblasto. | 51 |
| 3. Estudio del receptor involucrado en el efecto del LPA sobre la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto. | 53 |
| 4. Validación de los resultados obtenidos en la línea H8 utilizando otra línea de trofoblasto humano de primer trimestre: SWAN71. | 55 |
| 5. Regulación de la progesterona y el estradiol sobre la formación de túbulos. | 57 |
| 5.1. Efecto de la P4 y el E2 sobre la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. | 57 |

| | |
|--|-----|
| 5.2. Estudio de la participación del receptor LPA3 en el efecto de las hormonas esteroideas sobre la angiogénesis del trofoblasto. | 61 |
| 5.3. Regulación de los niveles de mensajero del LPA3 y la Lyso-PLD por las hormonas esteroideas. | 62 |
| 6. Mediadores involucrados en el efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. | 63 |
| 6.1. Prostaglandinas y óxido nítrico. | 63 |
| 6.1.1. Prostaglandinas. | 63 |
| 6.1.2. Óxido nítrico. | 67 |
| 6.1.3. Rescate de la inhibición ejercida por NS-398 y 1400W sobre la angiogénesis inducida por LPA mediante la incubación con PGE2 y NO. | 70 |
| 6.1.4. El NO es el último efector en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre inducida por LPA. | 72 |
| 6.1.5. Estudio de la expresión de COX-2 e iNOS en el trofoblasto humano de primer trimestre. | 75 |
| 6.2. Estudio del efecto del LPA sobre los niveles de VEGF-A y citoquinas vasculares. | 77 |
| 6.2.1. Participación de IL-6 en el efecto del LPA sobre la formación de túbulos en la línea celular H8. | 79 |
| 7. Interacción del trofoblasto con las células endoteliales. | 81 |
| 7.1. Ensayo de migración por herida en células endoteliales EA.hy926. | 81 |
| 8. Rol del receptor LPA3 en la angiogénesis de la interfase materno-fetal en un modelo de implantación <i>in vivo</i> . | 86 |
| Discusión. | 91 |
| Bibliografía. | 100 |

1. IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTUDIO.

Estadísticas a nivel mundial indican que el 15% de las parejas presenta problemas de infertilidad (Zhang y col., 2013). Este porcentaje se ve agravado cuando se tiene en cuenta que solamente un 50–60% de los embarazos sobrepasa las 20 semanas de gestación (Norwitz y col., 2001), siendo las fallas en la implantación la causa de las pérdidas gestacionales en el 75% de los casos.

Si bien la aplicación de las técnicas de fecundación asistida ha logrado superar varios obstáculos durante las primeras etapas del proceso reproductivo, la implantación en la cavidad uterina parece ser un paso limitante en la aplicación de estas nuevas tecnologías. A pesar del mejoramiento en los métodos de selección de embriones y en los medios de cultivo empleados, en los últimos 10 años la tasa de fallas implantatorias en las pacientes sometidas a programas de fecundación asistida no ha mejorado (~33% de éxito por ciclo de FIV-ET; Inhorn y Patrizio, 2015).

Aunque no existen estadísticas confiables a nivel nacional, la mayoría de los obstetras y médicos abocados a los problemas de infertilidad coinciden en que las pérdidas gestacionales por fallas en la implantación son un problema a nivel mundial que se agrava en el contexto nacional cuando se tiene en cuenta el gasto económico que implica para los establecimientos sanitarios y las pacientes. La imposibilidad de concebir pasando por repetidas pérdidas de un embarazo tiene graves consecuencias psicológicas y emocionales para las parejas que las sufren. Se estima que, en Argentina, entre el 10% y el 15% de la población en edad reproductiva tiene dificultades para llegar a un embarazo a término. En el país existirían un millón y medio de parejas con dificultad para procrear en algún momento de su vida. Por su parte, el Ministerio de Salud Bonaerense informó que los hospitales provinciales reciben unas 5000 consultas anuales por problemas de fertilidad (Ministerio de Salud Bonaerense, 2015). En la actualidad, las mujeres con aborto recurrente por fallas en la implantación no tienen un diagnóstico en el 50% de los casos ya que su etiología es desconocida. La Ley de Fecundación Médicamente Asistida (Ley N°26862) reconoce a la infertilidad como una patología en Argentina e informa que el número de mujeres con fallas en la implantación ha aumentado considerablemente.

Las pérdidas tempranas del embarazo están relacionadas directamente con fallas en los eventos que tienen lugar antes, durante o inmediatamente después del proceso de implantación. Entender el mecanismo de implantación es un desafío que nos brindará las herramientas necesarias para poder aliviar los problemas de infertilidad y permitir el establecimiento de una preñez exitosa.

2. LA GESTACIÓN TEMPRANA.

2.1. Características generales.

En la primera etapa luego de la fecundación del óvulo, se reinicia la meiosis y los pronúcleos masculino y femenino se fusionan originándose el cigoto. De esta manera, mientras el embrión es transportado por el oviducto hacia el útero, se inicia el desarrollo embrionario. En los seres humanos, los embriones llegan al útero en el día 5 de preñez y comienzan su diferenciación al estadio de blastocisto, lo que deberá ocurrir de manera sincronizada con la regulación hormonal que se da en el tejido uterino para permitir la implantación. Este proceso dará origen a la relación íntima que mantienen los tejidos maternos y fetales durante la gestación.

El blastocisto está formado por dos tipos celulares: el **macizo celular interno**, que dará origen al embrión propiamente dicho, y las **células del trofoblasto**, que invadirán el estroma materno hasta alcanzar las arterias espiraladas, y desarrollarán posteriormente la parte fetal de la placenta. De esta manera, la implantación se define como el proceso de invasión del endometrio materno por las células del trofoblasto en el que se establece una comunicación física y molecular entre la madre y el embrión. Durante este proceso, el trofoblasto desarrolla funciones fundamentales, como la invasión, la migración y la diferenciación para formar la parte fetal de la placenta (Staun-Ram y col., 2005).

En paralelo, ocurre la diferenciación de los fibroblastos del estroma endometrial en células deciduales, los cuales darán origen a la parte materna de la placenta.

La gestación temprana culmina con el desarrollo completo de la placenta, la cual a partir de este momento será la encargada de suplir las demandas metabólicas del embrión durante el resto de la preñez.

2.2. Implantación del blastocisto.

El proceso de **implantación** comprende una serie de eventos altamente coordinados e involucra una producción regulada de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas, tanto por parte del tejido materno como del embrión (Figura 1). Todos estos eventos coexisten en un periodo limitado de tiempo denominado **ventana de implantación**, donde la competencia del blastocisto coincide con la receptividad uterina. Fallas en el inicio de los eventos tempranos del proceso de implantación, como los que ocurren durante esta ventana, resultan en pérdidas tempranas del embarazo (Carson y col., 2000).

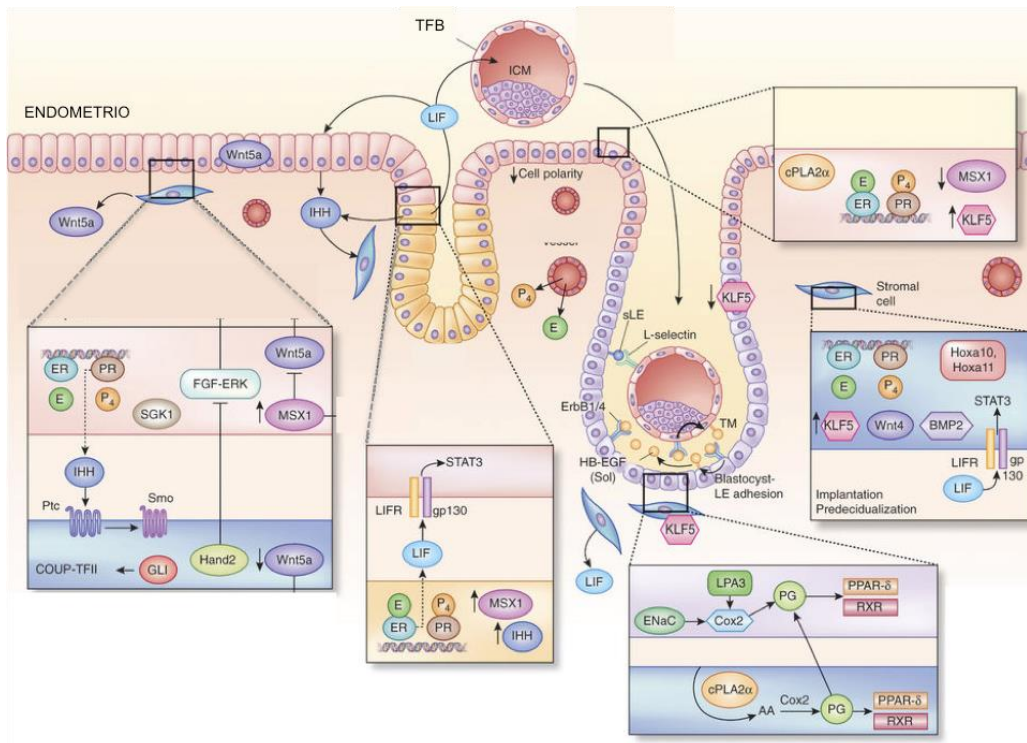


Figura 1. Vías de señalización involucradas en la ventana de implantación. TFB: Trofoblasto. ICM: macizo celular interno. Adaptado de Cha y col., 2012.

La susceptibilidad del útero a iniciar el proceso de implantación se clasifica según su estado en **pre-receptivo, receptivo y no receptivo o refractario.**

Durante la fase pre-receptiva, comprendiendo los primeros 7 días luego de la ovulación, el embrión no puede implantarse en el útero pero se promueve la supervivencia del mismo.

El periodo receptivo, día 7-10 post ovulación, abarca la ventana de implantación y se caracteriza por el incremento de la permeabilidad vascular, un aumento de la actividad secretoria de las glándulas endometriales y el desarrollo de prolongaciones digitiformes en la superficie luminal del epitelio uterino (Usadi y col., 2003).

El periodo refractario se caracteriza por una mayor hostilidad del microambiente uterino que resulta en la imposibilidad de este tejido para responder a la presencia del blastocisto.

Este proceso continuo de interacción entre el trofo-ectodermo embrionario y el epitelio luminal del útero se diferencia en 3 etapas: **aposición, adhesión e invasión** (Schlafke y Enders, 1975).

Las interacciones durante la **fase de aposición** son lábiles y pueden ser interrumpidas fácilmente sin provocar daño en los tejidos involucrados. El inicio de esta fase en los seres humanos, está marcado por un edema generalizado del estroma que conduce a un cerramiento de la luz uterina y por consiguiente, a un acercamiento del embrión al epitelio. Luego, durante la **adhesión**, la asociación entre el trofoectodermo y el epitelio luminal se intensifica y es lo suficientemente fuerte como para resistir el desprendimiento del blastocisto del lumen del útero.

La fase de **invasión** involucra la apoptosis localizada de las células epiteliales del endometrio, lo que facilitaría la penetración del estroma por las células del trofoblasto (Parr y col., 1987).

Los esteroides sexuales son importantes reguladores paracrinos y autocrinos de una amplia gama de funciones maternas y placentarias. En particular, el **estradiol (E2)** y la **progesterona (P4)** regulan los cambios que se producen en el tejido uterino promoviendo la receptividad del mismo y por lo tanto permitiendo la implantación del blastocisto (Wang y Dey, 2006). El estrechamiento luminal de la fase de aposición es altamente dependiente de P4, mientras que la reacción de adhesión no ocurre a menos que se produzca un incremento en el E2 circulante.

Luego de la fase de aposición, las células estromales uterinas que rodean al blastocisto comienzan una diferenciación denominada **decidualización**. En los seres humanos, la implantación ocurre en el lado mesometrial del útero, y es esta diferenciación a células deciduales la que termina de incluir al embrión en el lado antimesometrial.

A su vez, mediante una interacción directa entre el trofoblasto y los componentes de la pared arterial materna, comienza **el remodelado vascular** necesario para suplir las altas demandas metabólicas del embrión en crecimiento.

Es así como la interacción trofoblasto-decidual y trofoblasto-vasos maternos es clave para el proceso de implantación.

2.2.1. Trofoblasto.

En el blastocisto se pueden diferenciar dos tipos celulares: el macizo celular interno y el trofoectodermo. Este último se diferencia a trofoblasto cuando entra en contacto con el epitelio uterino. En particular, las células del trofoblasto están implicadas en la fijación, invasión y consecuente implantación del embrión, así como también en la formación del corion y de la placenta.

En el trofoblasto se distinguen dos capas celulares, una externa: el **sinciotrofoblasto**, y otra interna: el **citotrofoblasto**.

Por su parte, el citotrofoblasto se diferencia en **citotrofoblasto veloso**, que asegura los intercambios entre la madre y el feto y las funciones endocrinas de la placenta, y en **citotrofoblasto extraveloso**, con capacidades invasivas e indispensables para la implantación y el remodelado vascular (Figura 2) (Lunghi y col., 2007; Telugu y col., 2013). El citotrofoblasto extraveloso prolifera, invade y migra hacia la decidua y el miometrio. En particular, es el **trofoblasto extraveloso endovascular** el que coloniza los vasos maternos participando del remodelado vascular, mientras que el **trofoblasto extraveloso intersticial** se diferencia a células gigantes multinucleares (Zhou y col., 1997a; Da Silva-Arnold y col., 2015).

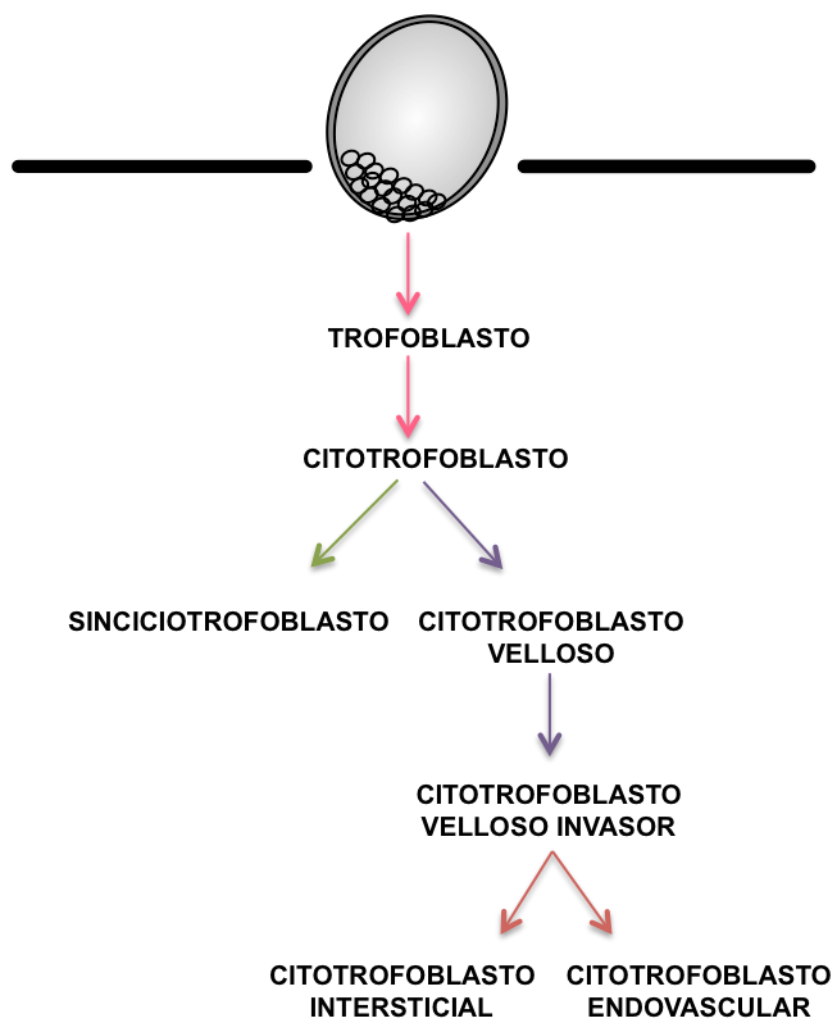


Figura 2. Esquema representativo de las etapas de diferenciación del trofoblasto.

El sinciotrofoblasto se origina por la fusión del citotrofoblasto veloso y su renovación a partir del citotrofoblasto es un proceso continuo durante todo el embarazo, ya que una vez constituido, el sinciotrofoblasto entra en apoptosis.

Esta diferenciación morfológica se acompaña de una diferenciación funcional. El sinciotrofoblasto se convierte en la unidad endocrina de la placenta y secreta numerosas hormonas polipeptídicas y esteroideas. Desarrolla las funciones de intercambio y expresa proteínas que permiten el transporte activo de los aminoácidos y las moléculas transportadoras que permiten la difusión facilitada de la glucosa. En cambio, el citotrofoblasto extraveloso origina columnas que invade la decidua generando cambios en las arterias uterinas maternas, comenzando el remodelado vascular.

2.2.2. Trofoblasto y remodelado vascular.

Durante la formación de la placenta, el citotrofoblasto extraveloso cumple un programa de diferenciación sumamente activo en el que migra e invade el estroma decidual, rodea las arterias espiraladas, penetra hacia el lumen vascular y reemplaza a las células endoteliales de estos vasos (Figura 3). Este proceso conocido como “remodelado de las arterias espiraladas” o “angiogénesis del trofoblasto” implica el cambio de fenotipo y de función del citotrofoblasto desde uno invasor a uno endovascular, y se considera que refleja todos los procesos implicados en la angiogénesis (Pijnenborg y col., 2006; Espinoza y col., 2006, Benirschke y Kaufmann, 2000; Kam y col., 1999). De esta manera, las arterias de paredes musculares tensas y rígidas se transforman en sacos sinusoidales flácidos que permiten un gran incremento en el flujo sanguíneo, supliendo así la alta demanda metabólica del embrión en crecimiento (Leach y col., 2006; Harris y col., 2006). Fallas en alguno de los pasos que implica esta transformación contribuyen a complicaciones obstétricas durante la gestación temprana (fallas implantatorias, aborto recurrente) y tardía (preclampsia, retraso en el crecimiento intrauterino) (Khong y col., 1986).

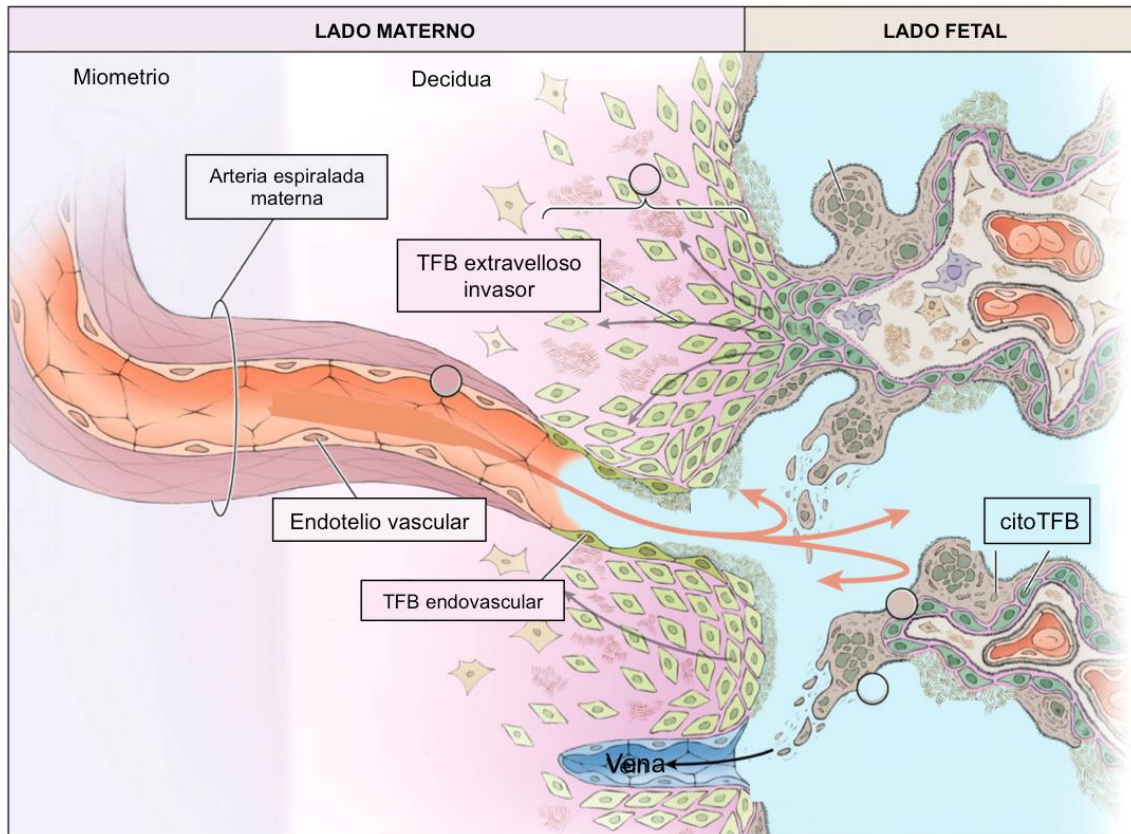


Figura 3. El citotrofoblasto extraveloso endovascular remodela las arterias espiraladas maternas de la interfase materno-fetal. TFB: trofoblasto. Adaptado de Enrique Oquiñeña.

Durante la adquisición del fenotipo vascular, el citotrofoblasto cambia la expresión de las moléculas de adhesión permitiendo la interacción con los distintos tipos celulares (Burrows y col., 1994). Inicialmente el citotrofoblasto expresa moléculas de adhesión del tipo epitelial como integrina $\alpha6/\beta4$ y $\alpha6/\beta1$ y E-caderina. Durante la diferenciación del citotrofoblasto a citotrofoblasto endovascular, éste comienza a expresar las integrinas $\alpha1/\beta1$ y $\alphaV/\beta3$, así como las VE-caderina, PECAM-1 y VCAM-1, las cuales son expresadas por el endotelio que reemplazará. En particular, Zhou y colaboradores (1997a) observaron que la expresión de E-caderina por parte del trofoblasto inhibe la invasión afectando el remodelado vascular. Especialmente, en la preclampsia, el citotrofoblasto no expresa los marcadores endoteliales sugiriendo una falla en la adquisición del fenotipo endotelial necesario para el remodelado vascular (Zhou y col., 1997b; McMaster y col., 2004).

Además de la adquisición de un fenotipo endovascular por parte del citotrofoblasto, el remodelado de las arterias espiraladas implica la pérdida o re-arreglo de las capas de músculo liso y de células endoteliales del vaso materno (Figura 4), involucrando la activación y vacuolización de las células endoteliales como la desorganización de las células del músculo liso (Cartwright y col., 2010). Se cree que es el citotrofoblasto endovascular el que interactúa directamente con las células endoteliales, y mientras que el intersticial lo

haría con las células del músculo liso (Cartwright y Whitley, 2017). Particularmente, se ha detectado la presencia del citotrofoblasto endovascular en las arterias espiraladas a partir de las 8 semanas de gestación siendo más preponderante a las 10 semanas (Pijnenborg y col., 1980). Este remodelado se completa cuando el citotrofoblasto endovascular se rodea de depósitos de fibrina dándole estructura al vaso remodelado. Estos vasos poseen mayor calibre, mayor flujo sanguíneo, y al mismo tiempo baja resistencia.

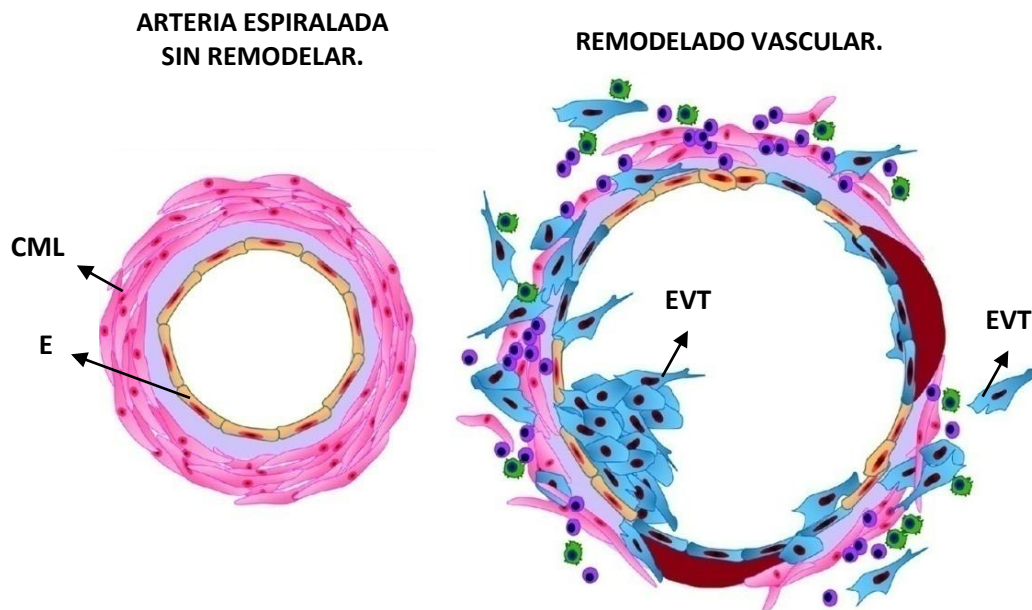


Figura 4. El citotrofoblasto extraveloso adquiere un fenotipo endovascular, reemplazando las capas de músculo liso y el endotelio de las arterias espiraladas uterinas. E: endotelio. CML: capas de músculo liso. EVT: citotrofoblasto extraveloso. Adaptado de Cartwright y col., 2010.

Todos estos cambios drásticos que ocurren en la arquitectura vascular uterina requieren de diversos procesos celulares, los cuales todavía no han sido completamente dilucidados (Pijnenborg y col., 2006). En este sentido, es interesante mencionar que en algunas de las patologías asociadas a un pobre remodelado vascular se observa la presencia del citotrofoblasto intersticial en las arterias espiraladas, sugiriendo que las fallas en el remodelado no se explicarían solamente por una mala invasión trofoblástica (Pijnenborg y col., 1998) e indicando que otros mecanismos estarían participando del amplio remodelado vascular que ocurre luego de la implantación.

2.2.3. Decidualización.

Además de los cambios vasculares que ocurren en la matriz endometrial, durante las primeras etapas del embarazo tiene lugar otro proceso conocido como decidualización. La reacción de decidualización se refiere al cambio bioquímico, funcional y morfológico por el que atraviesan los fibroblastos del estroma ubicado por debajo del epitelio luminal del útero.

La importancia de la formación del tejido decidual radica en que es un regulador crítico de la respuesta inmune materna y del crecimiento embrionario temprano, todos procesos claves en las primeras etapas de la gestación.

En humanos, la decidualización comienza a mitad de la fase secretora del ciclo menstrual, luego de la ovulación e independientemente de la presencia de un embrión (Bazer y col., 2009). Esta reacción se inicia alrededor de los vasos sanguíneos del endometrio y desde allí se expande hacia el resto del estroma durante la fase secretora tardía y eventualmente en las primeras etapas del embarazo (Bell, 1990). Recientemente se ha informado que la decidua posee un rol activo en la interacción con el trofoblasto ya que tiene la propiedad de migrar y regular activamente la invasión del mismo, además de censar la calidad del embrión funcionando como un mecanismo posible de selección natural (Gellersen y col., 2013; Weimar y col., 2012).

Por lo tanto, una intercomunicación coordinada entre el trofoblasto y la decidua durante los procesos de remodelado vascular y de decidualización que tienen lugar en la interfase materno-fetal, son fundamentales para el éxito de la implantación y la continuidad de la gestación.

3. CARACTERÍSTICAS DEL MODELO DE ESTUDIO.

3.1. Modelos de estudio de la angiogénesis del trofoblasto y la placentación.

La relación íntima entre el embrión y la madre comienza con el proceso de implantación, condición necesaria para el éxito de la preñez. Debido principalmente a razones éticas y a la complejidad técnica para estudiar este proceso en humanos, los cultivos celulares y los modelos animales son las mejores herramientas para descifrar los eventos moleculares y mecánicos, así como su regulación durante este proceso.

La comprensión de los mecanismos implicados en la diferenciación del citotrofoblasto veloso de un perfil invasor a uno vascular se ha beneficiado ampliamente de la posibilidad de aislar, purificar y mantener esas células en cultivo. Particularmente, para los modelos de estudios *in vitro* se cuenta con cultivos primarios de trofoblasto, cultivos provenientes de explantos de las vellosidades o cultivos de líneas celulares trofoblásticas. Se ha observado que las células trofoblásticas provenientes de cultivos primarios cesan rápidamente su proliferación, su cantidad es escasa en la placenta de primer trimestre, y los cultivos suelen estar contaminados con fibroblastos y con otros tipos celulares (Graham y col., 1993). Por lo tanto, el uso de líneas celulares de citotrofoblasto humano permite estudiar importantes sucesos del desarrollo de la placenta asociados a las funciones del trofoblasto.

Asimismo, el estudio del proceso de implantación y del remodelado vascular que tiene lugar en la interfase materno-fetal está restringido a la disponibilidad de material debido a las limitaciones éticas, siendo necesario recurrir también a modelos animales.

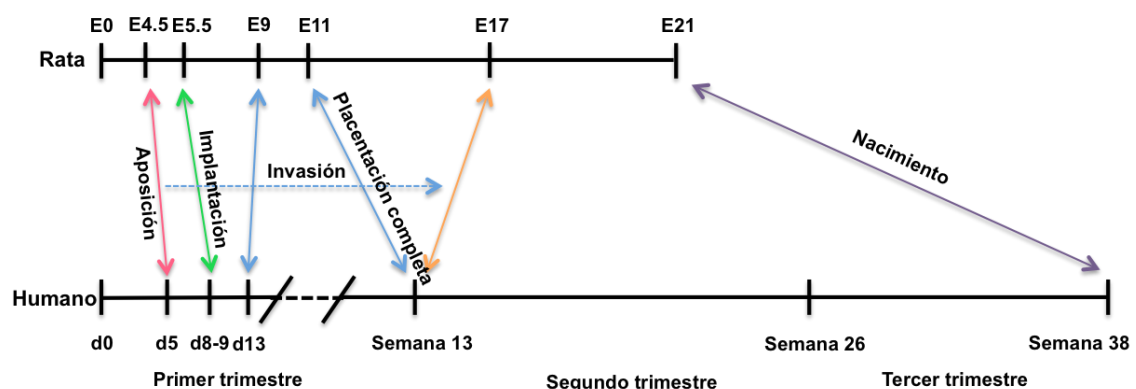


Figura 5. Línea de tiempo del desarrollo gestacional en el humano y en la rata.

En particular, el ratón y la rata son un modelo excepcional para dilucidar los mecanismos involucrados en la placentación hemocorial (Figura 5). Si bien poseen algunas diferencias, exhiben similitudes fundamentales como la invasión de las células trofoblásticas y el remodelado vascular de la interfase materno-fetal. Sin embargo, la invasión en el ratón es limitada (Ain y col., 2003; Coan y col., 2006; Soares y col., 2012).

La placentación se encuentra conservada en la rata y en el humano (Figura 6), ambas especies presentan una profunda invasión por parte del trofoblasto y comparten mecanismos del remodelado de las arterias espiraladas, constituyéndola un buen modelo para el estudio del proceso de placentación (Pijnenborg y col., 1981; Caluwaerts y col., 2005; Dtehend y col., 2005; Vercruyse y col., 2006).

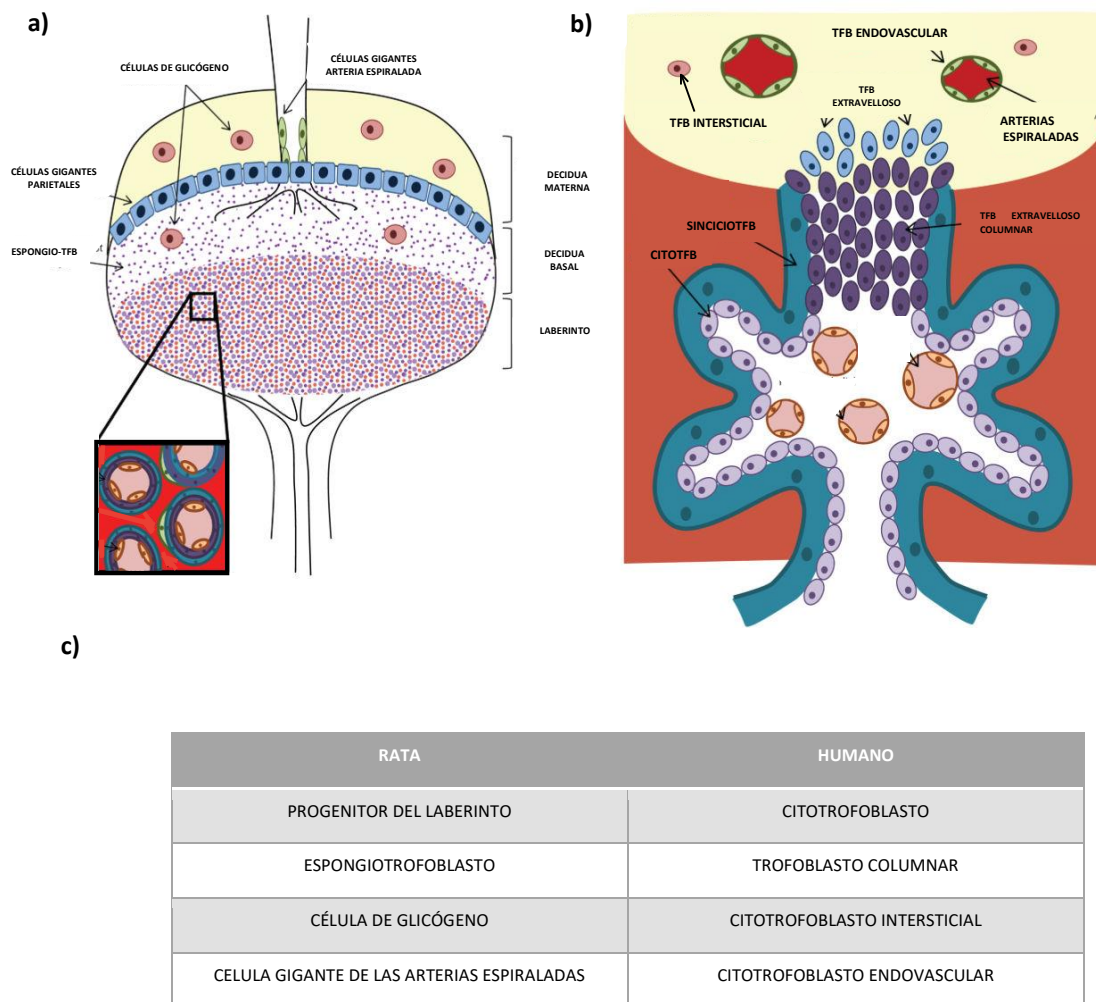


Figura 6. Placenta de rata y humana. a) Placenta de la rata; b) Placenta humana; c) Tabla comparativa del subtipo de trofoblasto que presentan analogías funcionales o estructurales entre la rata y el humano. TFB: Trofoblasto. Adaptado de Soncin y col., 2015.

Estos modelos animales permiten el estudio a nivel celular y molecular, y poseen características similares al proceso de implantación en humanos. Sin embargo, siempre se deben considerar las diferencias que existen entre los modelos así como las limitaciones de los mismos, y por lo tanto, se debe poner especial atención a las conclusiones extrapoladas a humanos a partir de los resultados obtenidos con las líneas celulares y los modelos animales (Soncin y col., 2015).

El uso de forma coordinada de todas las herramientas disponibles permitirá dilucidar los mecanismos presentes en la interfase materno-fetal.

4. EL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO.

4.1. Estructura, metabolismo y mecanismo de acción del ácido lisofosfatídico.

En los últimos años se ha hecho cada vez más evidente la participación de diferentes moléculas lipídicas en el establecimiento de la preñez, las cuales funcionan como verdaderos mediadores biológicamente activos.

En particular, el **ácido lisofosfatídico (LPA)** es un lisofosfolípido, que participa de numerosos procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, la proliferación celular, la angiogénesis, la invasión tumoral, la migración y la supervivencia celular. El LPA posee un rol clave en la reproducción participando además de múltiples procesos como el desarrollo vascular y la implantación del blastocisto.

La estructura del LPA es la de un lípido simple que presenta un grupo fosfato, una molécula de glicerol y una cadena de ácido graso que puede o no estar saturada (Figura 7) (Tokumura, 1995; Moolenaar, 1999; Tigyi y Parrill, 2003).

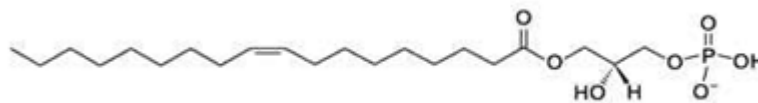


Figura 7. Estructura del ácido lisofosfatídico.

Tanto las especies con ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) como con ácidos grasos insaturados (16:1, 18:1, 18:2, 20:4) pueden encontrarse en el suero, en el plasma y en las plaquetas activadas (Gerrard y Robinson, 1989; Xiao y col., 2000; Baker y col., 2001), además de otros fluidos biológicos.

En particular, el LPA es una molécula que puede encontrarse en cantidades detectables alcanzando niveles micro-molares en suero (Tigyi y Miledi, 1992; Baker y col., 2000; Sano y col., 2002; Aoki y col., 2002), saliva (Sugiura y col., 2002), fluido seminal (Hama y col., 2002), fluido folicular (Tokumura y col., 1999) y líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario (Xiao y col., 2001).

Las concentraciones de LPA se encuentran altamente reguladas a través de la modulación de su síntesis y degradación (Shen y col., 1998; Eder y col., 2000).

Hasta el momento de todas las enzimas descritas que participan en las vías de síntesis del LPA, la mejor caracterizada es la lisofosfolipasa-D (Lyso-PLD), también conocida como autotaxina. La Lyso-PLD fue aislada por primera vez como un factor de estimulación de la motilidad celular en una línea celular de melanoma (Stracke y col., 1992). Luego se la identificó como la principal enzima que participa en la síntesis de LPA (Aoki y col., 2008), la cual tiene actividad de lisofosfolipasa catalizando la producción de LPA a partir de lisofosfatidilcolina.

La actividad de Lyso-PLD se halla presente en sangre periférica y se correlaciona fuertemente con la concentración de LPA circulante (Watanabe y col., 2007). Los niveles más elevados del ARNm de la Lyso-PLD se expresan en cerebro, ovario, pulmones, intestino y riñón.

El mayor porcentaje de LPA es degradado por un mecanismo no específico a través de lisofosfolipasas de membrana y solubles en el citosol y en el espacio extracelular. Sin embargo, aún no está claro cuál de las vías de degradación del LPA predomina en los diferentes sistemas biológicos ya que se hayan involucradas numerosas enzimas de diferentes categorías.

Hasta la fecha se han identificado y caracterizado seis receptores de LPA (LPA1-6) (Ye y col., 2008; Yung y col., 2014; Llona-Minguez y col., 2015). Las funciones pleiotrópicas del LPA se deben a que interacciona con esta amplia variedad de receptores, los cuales están acoplados a diversas proteínas G específicas para iniciar su ruta de señalización (Moolenaar, 1999; Anliker y col., 2004) modulando cascadas de segundos mensajeros como Ras, Rho, Rac, Akt, MAPK, PKC y adenilato ciclasa (Figura 8).

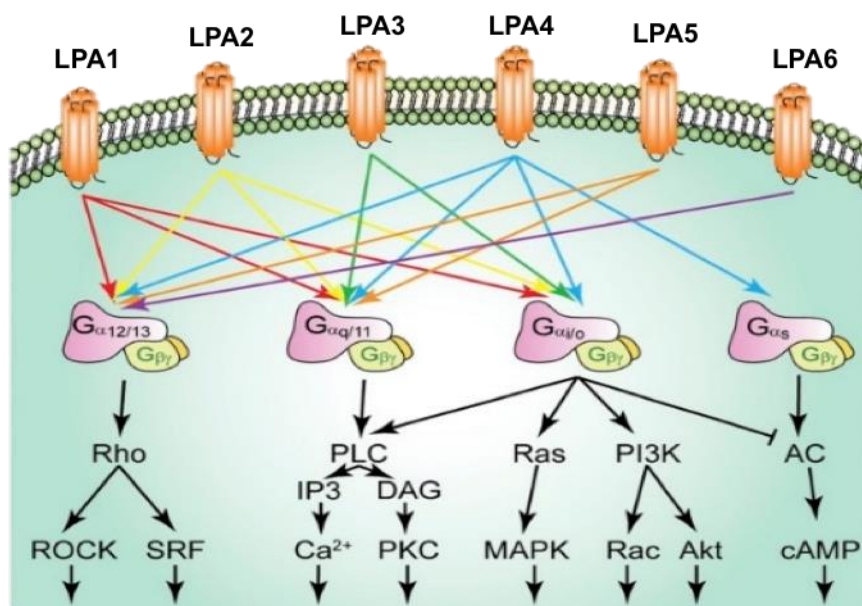


Figura 8. Cascada de señalización de los receptores de LPA. Adaptado de Yung y col., 2014.

4.2. El LPA y el receptor LPA3 en el proceso de implantación.

En los últimos tiempos numerosos estudios aportaron evidencias sobre la participación del LPA en distintos eventos reproductivos como la espermatogénesis, la función sexual masculina, la función ovárica, la fecundación, el espaciamiento de los embriones, la implantación, la decidualización, el mantenimiento de la gestación, el parto y algunas patologías relacionadas con estos procesos (Ye, 2008).

El rol más significativo que se le ha atribuido al LPA en reproducción involucra la señalización mediada por el receptor LPA3 en la implantación del blastocisto en el endometrio materno.

Hasta el momento, el receptor LPA3 parece ser el único que participa activamente en la señalización mediada por LPA durante el proceso de implantación (Ye y col., 2005). Este receptor es una proteína de aproximadamente 40 KDa, que se encuentra expresada en testículo, riñón, pulmón, intestino delgado, corazón, estómago, bazo, cerebro y timo (Contos y col., 2002).

La expresión del ARNm de LPA3 en el útero murino y ovino es exclusiva del epitelio luminal del endometrio durante la ventana de implantación (Ye y col., 2005; Liszewska y col., 2012) y dicha expresión es regulada por E2 y P4 (Hama y col., 2006). En nuestro laboratorio hemos descrito además que el LPA3 se expresa en el epitelio luminal del útero de rata durante el proceso de implantación (Sordelli y col., 2012).

Se ha informado que ratones deficientes en LPA1 y LPA2 pueden reproducirse de forma normal, mientras que las hembras deficientes en LPA3 presentan un retardo en el inicio de la implantación, un espaciamiento aberrante de los embriones en el tracto uterino y una reducción en el tamaño y en el número de las crías (Ye y col., 2005). Este fenotipo es intrínseco de los tejidos maternos ya que la transferencia de embriones wild-type a hembras LPA3^{-/-} no corrige los defectos descritos anteriormente. Sin embargo, la transferencia de embriones LPA3^{-/-} a hembras wild-type, no genera dificultades en el proceso de implantación. Estos hallazgos sugieren que la vía de señalización del LPA modula la implantación embrionaria durante la gestación temprana en mamíferos.

La importancia fisiológica de la producción de LPA en suero por parte de la Lyso-PLD fue descrita por Tokumura y colaboradores (1995) hace aproximadamente 20 años atrás. Años más tarde, él y su grupo describieron un aumento gradual en la actividad de la Lyso-PLD en el suero de mujeres gestantes (Tokumura y col., 2002a y 2002b). Además, observaron que a medida que progresa la gestación se produce un incremento en la proporción de LPA, el cual es aún mayor en mujeres gestantes con trabajo de parto. Estos resultados sugieren que el LPA podría participar del mantenimiento de la gestación.

En mujeres, la concentración plasmática de LPA aumenta conforme progresa la gestación y se ha postulado que la principal fuente de este mediador durante el embarazo la constituye el trofoblasto placentario (Iwasawa y col., 2009; Tokumura y col., 2002a).

En particular, en nuestro laboratorio se observó que la inyección *in vivo* de DGPP, un antagonista del receptor LPA3, en el día que ocurre la implantación aumenta el porcentaje de reabsorciones embrionarias y disminuye el peso de las unidades feto-placentarias. Aunque la administración del antagonista no modifica la morfología histológica del útero, se observan alteraciones en la estructura de la placenta y de la decidua (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Por otro lado, resultados *in vitro* muestran que el LPA aumenta la producción de mediadores implantatorios a través del receptor LPA3 (Sordelli y col., 2012).

4.3. EL LPA y la angiogénesis.

Como mencionamos anteriormente, el proceso de angiogénesis y el remodelado de las arterias espiraladas implica la interacción entre diferentes tipos celulares como así también de mediadores presentes en la interfase materno-fetal. En este sentido, se ha informado que el LPA modula el proceso de angiogénesis regulando la secreción de varias citoquinas pro y anti-inflamatorias. Se ha observado que el LPA induce la expresión de IL-8 en células deciduales de endometrio, en células endoteliales de venas umbilicales humanas y en el trofoblasto humano de primer trimestre (Lin y col., 2006; Chen y col., 2010). Además, el LPA induce la expresión de IL-8 e IL-6 en células de la granulosa de mujeres que se han sometido a tratamientos de fecundación *in vitro*. (Chen y col., 2008). Estas citoquinas median la migración, la permeabilidad y la proliferación de células endoteliales, siendo estos pasos críticos para la angiogénesis.

A su vez, el LPA juega un rol clave al inducir la migración de células endoteliales de aorta bovina y de corazón fetal (Panetti y col., 2000). En una línea de células endoteliales humanas, el LPA induce la migración mediante un incremento en la expresión de la metaloproteinasa-2, la cual juega un rol preponderante en la migración celular y en la remodelación de la matriz extracelular (Wu y col., 1995).

El grupo de van Meeteren (2006) demostró la participación del LPA en el desarrollo de la vasculatura al trabajar con ratones deficientes en Lyso-PLD. Estos autores observaron que los ratones Lyso-PLD^{-/-} morían a los 9.5 días de edad debido a profundos defectos vasculares en el saco vitelino y en el propio embrión.

Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren la participación del receptor LPA3 en el remodelado vascular del sitio de implantación. Observamos que el LPA, vía el receptor LPA3, aumenta la expresión de IL-10, un mediador de la angiogénesis en el útero de rata durante la implantación (Sordelli y col., 2012). A su

vez, observamos que la inyección *in vivo* de DGPP, un antagonista del receptor LPA3, en el día que ocurre la implantación disminuye la longitud transversal de las arterias uterina y arcuata en ratas gestantes con severas consecuencias en la decidualización y la placentación (Sordelli y Beltrame y col., 2017).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que el LPA juega un rol importante en el proceso de angiogénesis. Sin embargo, el efecto del LPA sobre la adquisición del fenotipo endovascular durante la diferenciación del citotrofoblasto humano aún no ha sido explorado.

5. MEDIADORES DE PROCESOS VASCULARES.

5.1. Óxido nítrico.

5.1.1. Biosíntesis y mecanismo de acción.

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa de vida media corta menor a los 30 seg conocida por desempeñar un rol importante en diferentes sistemas biológicos (Norman y Cameron, 1996). Se produce en varios tipos celulares como musculo liso, neuronas, plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales, y llega a los sitios de acción principalmente por difusión a través de las membranas celulares. El NO media diversos procesos fisiológicos, incluyendo la vasodilatación, el crecimiento celular, la apoptosis, la neurotransmisión y la antiagregación plaquetaria.

La síntesis de NO se produce a través de la óxido nítrico sintasa (NOS) que a partir de L-arginina y oxígeno da como producto de reacción L-citrulina y NO, los cuales se producen en cantidades equimolares. Esta reacción requiere como cofactor principal al NADPH (Figura 9).

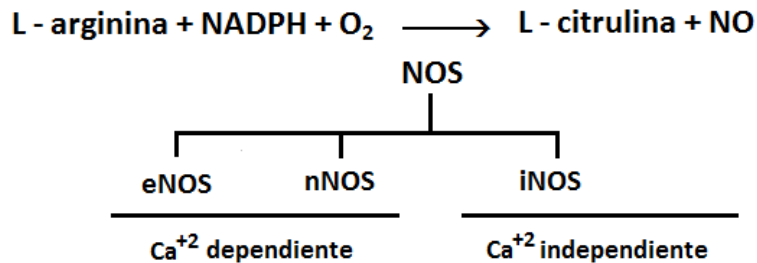


Figura 9. Reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa.

Hasta el momento se han identificado tres isoformas de la NOS. Todas ellas son homodímeros que poseen un hemo y flavina en su sitio activo y presentan un sitio de unión para el complejo calcio-calmodulina.

Las isoformas de la NOS históricamente han sido clasificadas en constitutivas, eNOS y nNOS, e inducible, iNOS. Sin embargo, la expresión de eNOS y nNOS también puede ser inducida y en algunos tejidos la iNOS parecería estar presente en forma constitutiva. Actualmente, la clasificación de las isoformas de la NOS se basa en la dependencia de su actividad por los niveles intracelulares de calcio, siendo la eNOS y la nNOS

dependientes de calcio y calmodulina, mientras que la iNOS al estar fuertemente unida a calmodulina, es independiente de calcio.

En la mayoría de los tejidos, el principal mecanismo de acción del NO es la activación de una guanilato ciclasa soluble con la consecuente formación de GMPc por la acción de la enzima guanosina trifosfato. Solo las formas solubles que contienen hemo de la familia de las guanilato ciclasas pueden ser activadas por NO (Ignarro, 1990).

El GMPc puede activar a la proteína quinasa Gi que fosforila diferentes proteínas de membrana del retículo sarcoplasmático, entre las que se encuentran canales de potasio, un sistema proteico llamado IP3-IRAG y un polipéptido del retículo sarcoplasmático llamado fosfolambam. Estas tres vías disminuyen la concentración intracelular de calcio.

A su vez, el NO puede actuar como secuestrador de radicales libres e inactivar aniones superóxido, previniendo la citotoxicidad celular a través de vías que no dependen de la guanilato ciclasa. Bajo otras condiciones, el NO reacciona con el superóxido y genera peroxinitritos, un compuesto con alto poder oxidante.

5.1.2. El NO y la angiogénesis.

La regulación de la síntesis de NO es de suma importancia dado que el nivel de NO determina su mecanismo de acción. Tanto la disminución como el exceso en los niveles de NO producen fallas en el proceso de implantación debido a un desarrollo aberrante de la vasculatura (Ota y col., 1999; Purcell y col., 1999).

En el útero, las NOS han sido localizadas en diferentes tipos celulares como vasos, epitelio glandular y células del estroma endometrial y del miometrio. En particular, se describió la presencia de iNOS en la decidua, en el citotrofoblasto extravascular y en el sincitiotrofoblasto (Purcell y col., 1999; Myatt y col., 1997; Smith-Jackson y col., 2015). El aumento diferencial de la expresión de las isoformas iNOS y eNOS en los sitios implantatorios sugiere la participación del NO en el remodelado tisular, la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria y la vasoregulación local. Todos estos procesos son fundamentales durante la invasión del trofoblasto, la angiogénesis y la decidualización.

El proceso de implantación se asemeja a una reacción inflamatoria, ya que posee varias características comunes a este proceso como la participación de diferentes citoquinas y el rol crucial del NO. En este sentido, varios tipos de receptores para citoquinas son capaces de estimular la síntesis de NO por la acción de la iNOS

(Salvemini y col., 1993). Asimismo, en la rata se encuentra una elevada actividad de NOS en los sitios de implantación y esta regulación depende de la presencia del blastocisto (Sordelli y col., 2011).

Las metaloproteinasas (MMPs) son las encargadas de la remodelación extensiva de la matriz extracelular, evento necesario durante los procesos de angiogénesis y decidualización. La relación entre el NO y diversas MMPs ha sido ampliamente estudiada. Durante el proceso de implantación, el NO regula la inducción de algunas MMPs necesarias para la invasión uterina ya que las mismas participan de la degradación de la matriz extracelular (Novaro y col., 2001).

La P4 y el E2 poseen un rol fundamental en la regulación del NO en la preñez temprana. Las hormonas esteroideas regulan la producción de NO y GMPc en el útero dependiendo de la dosis y el estado reproductivo del animal (Buhimschi y col., 2000). Además, mientras que el E2 promueve la permeabilidad vascular en el útero de ratón (Ma y col., 2001), la P4 estimula la angiogénesis necesaria para el crecimiento de las células embrionarias en activa división. Asimismo, en células HUVECs, la P4 induce la producción de NO a través del receptor mPR α (Pang y col., 2015). Como se ha mencionado anteriormente, el aumento de la permeabilidad vascular y la angiogénesis son fundamentales para que la implantación del blastocisto ocurra de manera exitosa. En este sentido, el aporte de NO proveniente del blastocisto se incrementa en presencia de E2, cuyo aumento coincide con el inicio de la implantación.

Previamente, observamos que el LPA mediante el receptor LPA3 incrementa la expresión de iNOS durante la implantación en el útero de rata gestante y que estas vías de señalización involucran la expresión de IL-10 (Sordelli y col., 2012; Beltrame y col., 2013). Además, describimos que la actividad de la NOS se encuentra aumentada en los sitios de implantación de la rata, y que su regulación depende del estado de activación del blastocisto (Sordelli y col., 2011).

Por lo tanto, el NO sintetizado tanto por el blastocisto (Gouge y col., 1998) como por el útero (Saxena y col., 2000) podría actuar como una señal necesaria para modular el remodelado vascular de la interfase materno-fetal promoviendo la implantación.

5.2. Prostaglandinas.

5.2.1. Características generales.

Las prostaglandinas (PGs) derivan de ácidos grasos insaturados de 20 carbonos, por lo que son denominadas genéricamente eicosanoides. Se sintetizan en todas las células animales salvo en los glóbulos rojos. En el humano, el ácido araquidónico es el precursor más abundante de las PGs y la mayor parte debe ser liberado de la membrana plasmática para ser sustrato de las enzimas que lo transforman.

Las PGs son consideradas potentes mensajeros lipídicos involucrados en procesos fisiológicos como patológicos, entre los que se pueden mencionar las funciones renales (Adam y Wolfram, 1984; Smith y col., 1989), inflamatorias e inmunes (Kuehl y Egan, 1980), reproductivas, la contracción o relajación del músculo liso intestinal, uterino, bronquial y cardíaco, la regulación del flujo sanguíneo, la liberación de hormonas (Olofsson y Leung, 1994) y la estimulación de las funciones plaquetarias (Samuelsson y col., 1975).

Las PGs poseen ciertas características comunes:

- La concentración que alcanzan en los tejidos y fluidos corporales depende del balance entre su síntesis y degradación, las que ocurren a alta velocidad.
- No se encuentran almacenadas ni preformadas como lo están sus precursores, sólo se sintetizan cuando los ácidos grasos son liberados desde su depósito de membrana en respuesta a estímulos específicos.
- Son autacoides, ejerciendo su efecto autocrino o paracrino en los tejidos que las producen.
- Amplifican o deprimen diversas respuestas funcionando como verdaderas hormonas.
- Pueden actuar como mediadores fisiológicos con implicancia en una variedad de procesos.

Una vez que el ácido graso es liberado de la membrana plasmática puede sufrir diversos procesos, pero principalmente atraviesa por una oxidación enzimática que puede seguir dos vías distintas:

- La vía metabólica cíclica, correspondiente a la etapa de formación de eicosanoides por ciclación, mediada por las ciclooxigenasas, que da lugar específicamente a las PGs y a los tromboxanos.
- La vía metabólica lineal, que incluye los procesos de metabolismo oxidativo que dan origen a los leucotrienos y en la que actúan las lipooxigenasas y las epooxigenasas.

Como ya mencionamos, la vía metabólica cíclica está a cargo de un complejo enzimático llamado sintasa de prostaglandina H (PGHS) o ciclooxigenasa (COX).

La COX es una glicoproteína que existe como homodímero y cuyas subunidades tienen un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (Wu, 1995). Se han identificado dos isoformas de la COX: COX-1 y COX-2. Ambas catalizan la conversión del ácido araquidónico en PGH₂, un intermediario inestable a partir del cual se sintetizan las diferentes PGs de la serie 2 con actividad biológica por la acción de enzimas específicas o por mecanismos no enzimáticos (Figura 10).

La estructura aminoacídica de las COX-1 y COX-2 es similar, aunque cada una está codificada por un gen distinto (Smith y Marnett, 1991). Ambas isoformas de la COX se encuentran ampliamente distribuidas en células y tejidos de mamíferos con excepción de los glóbulos rojos.

La COX-1 fue la primera isoforma en ser identificada y clonada de vesícula seminal ovina (Merlie y col., 1988) y es una de las principales enzimas encargadas de la protección de las mucosas y del mantenimiento de la homeostasis vascular (Whittle y col., 1980). Si bien su expresión es constitutiva en la mayoría de las células de mamíferos, los niveles de COX-1 pueden ser regulados ante un estímulo específico (Wu, 1995; Dong y Yallampalli, 1996).

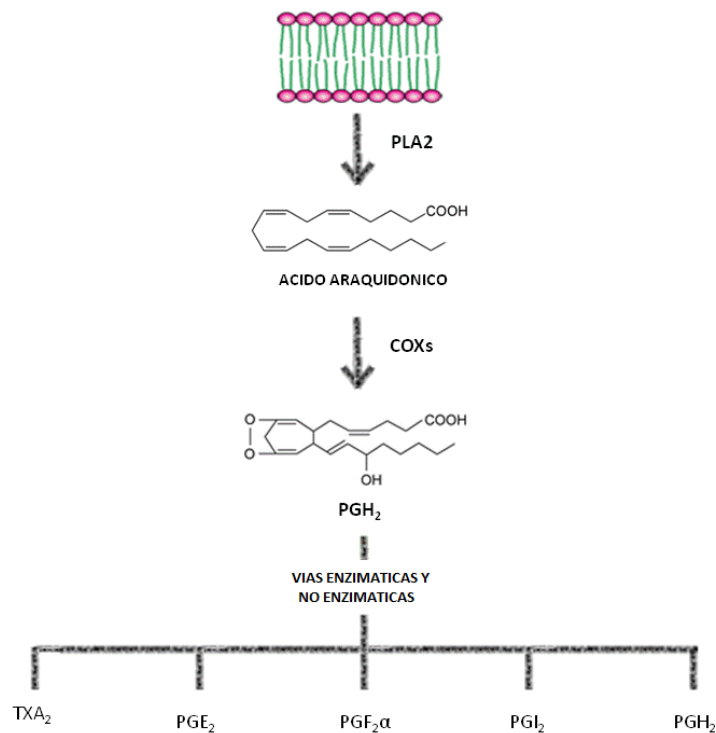


Figura 10. Vía de síntesis de prostanoideos a partir de lípidos de membrana.

La expresión de la COX-2 puede ser inducida por citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y oncogenes (Salvemini y col., 1993), así como también por agentes proinflamatorios y mitogénicos. Esto indica que ambas isoformas de COX son inducibles, aunque los mecanismos por los cuales se regulan son distintos.

El primer paso en la degradación de las PGs involucra la acción de la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH). La 15-PGDH cataliza la oxidación del grupo 15-hidroxilo de las PGs y las convierte en metabolitos inactivos (Hansen, 1976). En general, se ha descrito que las concentraciones máximas de esta enzima se encuentran en bazo, pulmón y corteza renal. Los principales sustratos de la 15-PGDH son la PGE₂ y la PGF₂α.

El segundo paso en la degradación secuencial de las PGs es la reducción del doble enlace en la posición 13, por la 13,14-prostaglandina reductasa. Esta enzima es altamente específica y tiene una distribución tisular semejante a la de la 15-PGDH.

5.2.2. Las PGs y la implantación.

Las PGs son mediadores claves en los procesos de menstruación, ovulación e implantación, como también en el establecimiento y manteniendo de la preñez y en el inicio del parto (Arosh y col., 2004a y 2004b; Kang y col., 2005). Sin embargo, bajo condiciones asociadas con diferentes patologías, las PGs pueden ser liberadas en grandes cantidades durante las etapas tempranas del embarazo teniendo efectos abortivos al estimular la contractilidad del miometrio (Aisemberg y col., 2007).

El patrón de expresión característico de COX-1 y COX-2 en el útero de ratón durante el periodo periimplantatorio sugiere un rol de las PGs en la implantación del embrión (Gao y col., 2007; Cong y col., 2006). Este patrón de expresión sugiere, además, que la COX-2 es esencial para la fase de adhesión embrionaria en la implantación. La COX-2 se expresa en el epitelio luminal y en las células estromales del sitio de implantación donde el blastocisto toma contacto con el endometrio receptivo. En ratones, se ha observado que la PGE2 y la PGI2 derivadas de la COX-2 incrementan la permeabilidad vascular en los sitios de implantación (Matsumoto y col., 2002; Sookvanichsilp y Pulbutr, 2002). Por otro lado, también se detecta la expresión temprana de COX-1 en células epiteliales del endometrio, pero previo al comienzo del proceso de adhesión del blastocisto. Achache y colaboradores (2010) describieron que pacientes con fallas recurrentes en la gestación temprana muestran niveles bajos de COX-2 en el endometrio.

Los ratones *knock out* para COX-2 presentan alteraciones en la gestación temprana. No obstante ratones deficientes en COX-1 no presentan tales anomalías, sugiriendo que la expresión de COX-2 es esencial durante las primeras etapas de la preñez (Lim y col., 1999; Lim y col., 1997; Langenbach y col., 1995; Reese y col., 2000). En este sentido, la administración de un inhibidor selectivo de la COX-1 no produce efectos sobre la implantación, mientras que un inhibidor selectivo de la COX-2 interfiere no solamente con el proceso de implantación, sino también con la ovulación y la fecundación.

Las PGs derivadas de la COX-2 son claves en la regulación de la angiogénesis del sitio de implantación (Lim y col., 1997; Matsumoto y col., 2002; Sookvanichsilp y Pulbutr, 2002). Asimismo, en nuestro laboratorio observamos que el LPA estimula la producción de PGs derivadas de la COX-2 en el útero de rata durante la ventana de implantación, y que este mecanismo involucra la producción de IL-10, un mediador angiogénico (Sordelli y col., 2012; Beltrame y col., 2013).

Las hembras *knock out* para el receptor LPA3 presentan un fenotipo similar al de las hembras COX-2^{-/-}. En este modelo, la administración de PGI2 y PGE2 revierte el retraso en el inicio de la implantación restaurando el fenotipo parcialmente (Hama y col., 2007). Varios autores proponen que la PGE2 contribuye al proceso de decidualización y angiogénesis, mientras que un incremento en la PGF2 α presenta consecuencias negativas

en el mantenimiento de la gestación ya que incrementa la contractibilidad uterina (Hamilton y Kennedy, 1994; Stocco y Deis, 1998; Callegari y col., 2005).

En conjunto, estos antecedentes avalan la hipótesis de que las PGs sintetizadas fundamentalmente por la vía de la COX-2 tendrían un papel fundamental en los cambios fisiológicos asociados al proceso de implantación.

5.3. Citoquinas y factores angiogénicos.

En la interfase materno-fetal se establece un diálogo en el que participan, además del trofoblasto y la decidua, las células del sistema inmune y mediadores pro-implantatorios solubles como las citoquinas (Van Sinderen y col., 2013).

En los últimos años se ha descrito la producción de citoquinas, no sólo por las células del sistema inmune sino por la decidua y otros tipos celulares que conforman la placenta (Bowen y col., 2002). Actualmente, se relaciona el amplio espectro de citoquinas con la implantación del embrión, la regulación de la invasión del trofoblasto y el control de funciones inmunoregulatoras en la interfase materno-fetal (van Mourik y col., 2009; McEwan y col., 2009; Naruse y col., 2010; Altmae y col., 2012).

En particular, se ha descrito que la IL-8 induce la invasión del trofoblasto, sugiriendo un rol en el remodelado vascular (Hanna y col., 2006; Oliveira y col., 2007). Por su parte, Lockwood y colaboradores (2008) observaron que la IL-6 incrementa la permeabilidad vascular mediante la desestabilización de las uniones entre las células endoteliales. Además, se ha observado *in vitro* que el LIF, un miembro de la familia de la IL-6, media la expresión de moléculas de adhesión de células epiteliales humanas implicando un rol en la adhesión del blastocisto y en la invasión del trofoblasto (Marwood y col., 2009). Se ha descrito que los niveles séricos como útero-placentarios de IL-10 y su receptor se incrementan significativamente durante la decidualización y el embarazo. En mujeres con abortos espontáneos en el primer trimestre, los niveles de IL-10 en la interfase materno-fetal son significativamente menores a los hallados en estos tejidos obtenidos de abortos electivos. La producción deficiente de IL-10 se correlaciona con el aumento en la producción de moléculas inflamatorias, lo que podría desencadenar pérdidas tempranas del embarazo e incluso parto pre-término (Thaxton y Sharma, 2010).

Los factores angiogénicos mejor caracterizados y estudiados son los de la familia de proteínas del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El VEGF es una glicoproteína homodimérica dependiente de heparina que se expresa en el útero durante el proceso de implantación, aumentando la permeabilidad vascular durante la invasión del trofoblasto (Rabbani y col., 2001; Rockwell y col., 2002). Estudios recientes

han demostrado que la IL-10 induce la producción de una de las isoformas de VEGF en células de trofoblasto de primer trimestre.

En conjunto, estos antecedentes sugieren que el NO, las PGs y diversas citoquinas podrían participar del remodelado vascular que tiene lugar en la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

El conocimiento actual acerca de los mecanismos y las moléculas que participan en el remodelado vascular de la interfase materno-fetal, nos permite detallar los antecedentes más destacados que tomamos como punto de partida para elaborar la hipótesis de trabajo:

- El citotrofoblasto extraveloso reemplaza las células endoteliales de las arterias espiraladas adquiriendo un fenotipo endovascular, y transformado estos vasos en sacos que permiten un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes al embrión en crecimiento (Zhou y col., 1997a).
- Alteraciones en la invasión o en la diferenciación del trofoblasto se asocian con patologías obstétricas como las fallas implantatorias o la preclampsia (Zhou y col., 1997b; Plaisier y col., 2009).
- El LPA, un lípido bioactivo con funciones pro-implantatorias, aumenta la producción de mediadores angiogénicos como la PGE2, el NO y la IL-10 en el útero de rata durante la ventana de implantación (Sordelli y col., 2012; Beltrame y col., 2013).
- Tanto la concentración de LPA como la actividad de la Lyso-PLD, la principal enzima involucrada en la producción de LPA, aumentan en el suero de mujeres embarazadas conforme progresa la gestación (Tokumura y col., 2002a).
- El bloqueo farmacológico del LPA3, uno de los subtipos de receptor de LPA, aumenta el porcentaje de reabsorción embrionaria en ratas y produce fallas en la macrovasculatura que irriga los cuernos uterinos (Sordelli y Beltrame y col., 2017).
- El sistema LPA/LPA3 se encuentra alterado en patologías obstétricas asociadas a desregulaciones en el remodelado vascular. En particular, se ha observado que las mujeres con fallas implantatorias presentan una menor expresión de LPA3 en el endometrio (Achache y col., 2010). Asimismo, en la preclampsia se han encontrado menores niveles y actividad séricas de Lyso-PLD (Iwasawa y col., 2009; Tokumura y col., 2009).

En este contexto, la hipótesis y los objetivos de este trabajo se circunscriben a:

Hipótesis general

El ácido lisofosfatídico promueve las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

Objetivo general:

Estudiar el rol del ácido lisofosfatídico en las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

Objetivos específicos:

1. Investigar el efecto del LPA y la participación del receptor LPA3 en la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre.
2. Estudiar la participación de diferentes moléculas mediadoras de los procesos vasculares en el efecto del LPA.
3. Analizar el rol de las hormonas esteroideas sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre y la posible participación del sistema LPA/LPA3.
4. Investigar la interacción del trofoblasto endovascular con las células endoteliales bajo el efecto del LPA.
5. Estudiar el rol del LPA/LPA3 sobre las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal en un modelo de implantación *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Medios y drogas.

1.1. Drogas.

Los detergentes e inhibidores utilizados en la técnica de western blot, las membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot, 0,45µm), el anticuerpo contra la β-actina y el diacilglicerol pirofosfato (DGPP 8:0) fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (Bs. As., Argentina) y Biorad (Tecnolab, Bs. As., Argentina).

El anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa fue proporcionado por Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (SERO-IMMUNO DIAGNOSTICS, INC, Tucker, GA, USA).

Los reactivos luminol, ácido p-cumárico y el Dabco 33-LV fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Bs. As., Argentina). El Anticuerpo Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 555) fue adquirido en Abcam (USA).

La indometacina fue comprada a Laboratorios Montpellier. El NS-398, el 1400W, el L-NAME, los anticuerpos primarios contra LPA3, Lyso-PLD, COX-2 e iNOS, y el LPA (1-oleoil-ácido lisofosfatídico 18:0) fueron adquiridos en Cayman Chemical (Migliore Laclaustra, Bs. As., Argentina).

Los insumos para cultivo: DMEM/F12, mix de antibiótico + antimicótico y el Geltrex fueron suministrados por GIBCO (Invitrogen, Bs As, Argentina). La tripsina-EDTA y la glutamina fueron adquiridas en EMEVE medios (Laboratorio MicroVet SRL, Bs. As., Argentina). El suero fetal bovino (SFB) fue suministrado por NATOCOR (Córdoba, Argentina).

Los reactivos de la técnica de PCR: RNase free DNase I, Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT), random primers y primers específicos fueron obtenidos de Invitrogen (Bs. As., Argentina). La enzima GoTaq polimerasa y la Master Mix para la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR) fueron compradas en Promega (Biodynamics, Bs. As., Argentina). Los reactivos Trizol, DNTPs y el inhibidor de RNAsas fueron adquiridos en Genbiotech (Bs. As., Argentina). El colorante Eva green y el Gel Red (Nucleic Acid Gel Stain) fueron comprados en Biotium (Biodynamics, Bs. As., Argentina).

El antagonista del receptor LPA1 (BMT-000001-01-002) fue cedido gentilmente por Bristol-Myers Squibb®.

El antagonista de los receptores LPA1, LPA2, LPA3 y LPA4 (1-Bromo-3(S)-hidroxi-4-(palmitoyloxy)butyl] fosfonato) (BrP-LPA) fue adquirido en Echelon (Echelon Biosciences inc., Salt Lake City, USA)

El 17β-estradiol (1,3,5[10]-Estratrieno-3,17β-diol) y la progesterona (medroxiprogesterona 17-acetato) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Bs. As., Argentina).

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

1.2. Medios utilizados.

- *Buffer de corrida*: Tris base 15 g/l pH=8.3, glicina 72 g/l, SDS 5 g/l.
- *Buffer de transferencia*: Tris pH=8.1-8.4 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v).
- *Rojo Ponceau S*: Rojo Ponceau S (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfonilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico) 0,5 % (p/v); ácido acético 1 % (v/v).
- *Buffer muestra*: Azul de bromofenol 0,3 % (p/v), Tris 0,5 M pH=6,8, SDS 1% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10% (v/v).
- *Solución de lavado (TPBS)*: Tween 20 0,1% (v/v) en PBS 1X.
- *Solución de bloqueo*: Leche descremada 5% (p/v) en PBS 1X.
- *Soluciones de ECL*: Solución A: Luminol 0,25 mM, ácido p-cumárico 0,4 mM, Tris/HCl 0,1M pH=8.5; Solución B: Tris/HCl 0,1 M pH=8, H₂O 0,9 ml, H₂O₂ 19 mM en Tris 0,1M pH=8.
- *Buffer TAE 50X*: Tris base 24,2 % (p/v); ácido acético glacial 5,7 % (v/v); EDTA 1,9 % (p/v) en agua destilada.
- *PBS*: NaCl 80 g/l, KCl 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, Na₂HPO₄ 11.5 g/l en agua destilada pH=8.4.

2. Modelos experimentales.

Dada la imposibilidad ética de estudiar el proceso de implantación en humanos, necesariamente se debe recurrir a modelos experimentales *in vitro* (cultivos de líneas celulares) e *in vivo* (animales de laboratorio). Asimismo, debido a la legislación actual en Argentina, se presenta otra dificultad relacionada con la imposibilidad de obtener muestras de placentas de primer trimestre provenientes de terminaciones electivas del embarazo.

Por otro lado, se ha observado que las células trofoblásticas provenientes de cultivos primarios cesan rápidamente su proliferación, su cantidad es escasa en la placenta de primer trimestre, y los cultivos suelen estar contaminados con fibroblastos y con otros tipos celulares.

Por lo tanto, en el presente trabajo adoptamos dos estrategias experimentales. En el diseño *in vitro*, se utilizaron líneas celulares para investigar la acción del LPA en la respuesta endovascular del trofoblasto y la interacción con los componentes de la interfase materno fetal. En el diseño *in vivo*, se utilizó un modelo de reabsorción embrionaria en ratas hembras de la cepa Wistar (Sordelli y Beltrame y col., 2017) para investigar la participación del LPA endógeno y su receptor LPA3 en diferentes aspectos de la fisiología vascular uterina durante la implantación embrionaria.

2.1. Diseño *in vitro*: líneas celulares.

2.1.1. Trofoblasto humano de primer trimestre.

En el presente trabajo se utilizó como modelo de trofoblasto humano de primer trimestre la línea HTR-8/SVneo (H8), cedida gentilmente por el Dr. Udo Markert (Placenta Lab, Jena, Alemania). Esta línea celular fue establecida a partir de placentas provenientes de terminaciones electivas del embarazo de primer trimestre introduciendo el antígeno T del virus SV40 sin ningún efecto sobre su cariotipo o fenotipo (Graham y col., 1993). Si bien son células inmortalizadas, no presentan las características de las células tumorales o metastásicas por lo que funcionan como una importante herramienta para el estudio de las funciones del trofoblasto de primer trimestre. Las células H8 son positivas para citoqueratina 7, vimentina y HLA-G, moléculas características del trofoblasto extraveloso. Esta línea celular expresa una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento entre los que podemos mencionar IL-8, MCP-1, CXCR2 y CXCL1, TIMP-1 y VEGF, entre otros.

Las células H8 se cultivaron a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂ en medio DMEM/F12 suplementado con 10% suero fetal bovino, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml estreptomicina y 1% glutamina. Se repican dos a tres veces por semana utilizando tripsina 2.5% con EDTA 5 mM en PBS. Las células que se guardan como stock, se cosechan y se centrifugan a 1200 rpm a 4°C por 5 min. Se congelan a -80°C en solución de congelado y, luego se guardan en nitrógeno líquido.

Con el fin de validar los resultados obtenidos en la línea H8, se utilizó otra línea de trofoblasto humano de primer trimestre (Swan71) cedida gentilmente por el Dr. Gil Mor (Yale University School of Medicine, New Haven, EEUU). La línea celular Swan71 fue obtenida a partir de citotrofoblasto humano de 7 semanas inmortalizado por transformación mediante la subunidad catalítica de la telomerasa (Straszewski-Chavez y col., 2009). Esta línea no presenta características metastásicas ni tumorales.

2.1.2. Línea celular endotelial humana.

Para los estudios con células endoteliales humanas, se utilizó la línea EA.hy926, en el marco de una colaboración con el grupo de la Dra. Fernanda Parborell (IBYME, Buenos Aires, Argentina). El establecimiento de la línea celular endotelial EA.hy926 surgió a partir de la hibridación de células endoteliales de la vena umbilical humana con la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549/8. Esta línea celular conserva el fenotipo de las células endoteliales, posee funciones altamente diferenciadas características del endotelio vascular humano, y mantiene su capacidad proliferativa y estabilidad a lo largo de los pasajes. Además,

expresa endotelina-1, cuerpos Weibel-Palade, prostaciclina, y moléculas de adhesión endotelial ICAM-1 y VCAM-1, las cuales son características del linaje endotelial puro (Edgell y col., 1990).

2.2. Modelos animales.

2.2.1. Declaración ética.

Los procedimientos experimentales que se detallarán a continuación fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO - CONICET) y por el Comité Institucional del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires), Número de Permiso: 2550/ 2010.

Además, todos los experimentos se llevaron a cabo en conformidad con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NIH). Todos los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Odontología (Universidad de Buenos Aires).

2.2.2. Animales.

Los animales utilizados fueron ratas hembras de la cepa Wistar de peso homogéneo (200-300 gr.) mantenidas bajo condiciones de temperatura (23°C - 25°C) y ciclos de luz-oscuridad constantes (12 h de luz, 12 h de oscuridad). Los animales recibieron alimento y agua *ad libitum*.

Se pusieron en apareo hembras con machos de la misma cepa. Se verificó el estado de preñez realizando un extendido vaginal. Se colocó una pequeña cantidad de solución fisiológica (NaCl 0.9%) con una pipeta Pasteur en la vagina de la rata, se dejó que el líquido penetre y luego se aspiró el contenido vaginal, extendiéndolo sobre la superficie de un portaobjetos limpio. Se observó al microscopio óptico (aumento 100x) la presencia de espermatozoides.

Se determinó el día 1 de gestación cuando hubo presencia de espermatozoides en el fluido vaginal. Bajo las condiciones de nuestro bioterio, en el 95% de los casos, la presencia de espermatozoides en el fluido vaginal es criterio de predicción de preñez.

La preñez tiene una duración de 22 días. Durante la preñez temprana en la rata, el blastocisto alcanza el lumen del útero entre la tarde-noche del día 4 y la mañana del día 5 de gestación. La implantación ocurre durante la tarde-noche del día 5 de preñez.

3. Formación de túbulos.

Se determinó la angiogénesis de las células del trofoblasto en la línea H8 y Swan71 a través de la formación de túbulos vasculares en placas de 96 pozos sobre una base de matriz extracelular (Geltrex LDEV-Free reduced growth factor basement membrane matrix). En la puesta punto de la técnica se determinó el volumen necesario de matriz y el número mínimo de células para la formación de túbulos. Además, se realizaron curvas para determinar el tiempo óptimo de incubación.

El extracto de membrana basal elegido para esta técnica es reducido en factores de crecimiento, siendo un material ventajoso para pruebas de angiogénesis.

Dado que el SFB es un factor que estimula la formación tubular y que se considera un control positivo para esta técnica, todas las incubaciones se realizaron en ausencia de suero.

El volumen y la concentración de proteínas de la matriz sembrada en el pocillo es un factor determinante ya que incide directamente sobre la formación tubular. El Geltrex es un extracto de matriz extracelular obtenido a partir de un tumor murino por lo que su composición proteica varía de lote a lote. Por lo tanto, se determinó que la concentración mínima necesaria para que la matriz gelifique es de 12 mg/ml de proteínas. Luego, se probaron volúmenes de 20 a 100 μ l de Geltrex, seleccionando un volumen mínimo necesario de 50 μ l por pozo en una placa de 96 pozos.

El número de células que se siembra en las placas es otro paso crítico: muy pocas células producen túbulos incompletos y demasiadas resultan en grandes áreas de monocapa. Por ello, se sembraron placas de 96 pozos con 5000 a 40000 células/pozo, siendo el número óptimo de células de 5000 células/cm² o 15000 células/pocillo en una placa de 96 pozos.

El extracto de matriz extracelular es estable por 24 h, luego de ese tiempo comienza a disolverse. Por lo tanto, se realizaron incubaciones de 0 a 24 h, observándose una formación basal de túbulos a partir de las 3 h de incubación.

En base a estos resultados, se determinó un volumen mínimo de 50 μ l de extracto de matriz extracelular (12 mg/ml de proteínas), y un número de 15000 células por pocillo en una placa de 96 pozos para los experimentos a realizar.

En todos los ensayos el volumen final de incubación (medio + células) fue de 100 μ l por pozo.

Se observaron los túbulos bajo un microscopio de luz invertida (10x, IMT2 Olympus) y se tomaron fotografías con una cámara digital (Olympus C-5060). Se analizaron 5 campos por pozo, excluyéndose los extremos del pozo.

Se cuantificó la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre como la formación de túbulos sobre la matriz extracelular utilizando el programa Image J. Se cuantificó el largo de los túbulos y el número de ramificaciones. El largo de cada tubo se determinó dibujando una línea sobre el túbulo formado, calculando la longitud media (pixel) de la línea dibujada. El número de puntos de contacto a partir de los cuales se generan ramificaciones se cuantificó de forma manual. Los resultados expresan la media \pm el error estándar.

La tubulogénesis en las células H8 se determinó en diferentes condiciones experimentales como se detalla en la sección de resultados. Se realizaron curvas de concentraciones para los diferentes fármacos utilizados (Tabla 1). En el caso de antagonistas e inhibidores se eligieron aquellas concentraciones que no poseen efecto *per se*.

| | Curva de concentraciones. | Concentración utilizada. |
|--|----------------------------------|---------------------------------|
| 8Br-LPA Antagonista LPA1-4. | 1 – 100 μ M | 5 μ M |
| DGPP Antagonista selectivo LPA3. | 1 – 100 μ M | 100 μ M |
| BMT Antagonista selectivo LPA1. | 1 – 100 μ M | 10 μ M |
| NS-398 Inhibidor selectivo COX-2. | 1 – 100 μ M | 1 μ M |
| Indometacina Inhibidor no selectivo COX. | 1 – 100 μ M | 10 μ M |
| 1400W Inhibidor selectivo iNOS. | 1 – 100 μ M | 10 μ M |
| L-NAME Inhibidor no selectivo NOS. | 1 – 100 μ M | 10 μ M |
| Anticuerpo contra IL-6. | 5 – 15 μ M | 5 μ M |

Tabla 1. Inhibidores y antagonistas utilizados.

4. Proliferación.

La proliferación se evaluó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT). En células viables, el MTT es reducido a formazán. Se sembraron 10000 células H8 por pozo en una placa de 96 (volumen final = 100 µl de medio suplementado con SFB 5%). Luego de pegarse por 4 h, las mismas se incubaron con LPA 10 µM durante 24 o 48 h.

Finalizado el tratamiento, se descartó el medio y se agregaron 100 µl de medio sin rojo fenol suplementado con SFB 3% más 10 µl del reactivo MTT en PBS durante 4 h. Pasado este período, se retiraron 85 µl de cada pozo y se agregaron 50 µl de dimetilsulfóxido para solubilizar el producto formado. Después de 10 min se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (BioTek, USA).

La proliferación se calculó como la cantidad de formazán solubilizado (abs. 540 nm) y los valores expresados muestran la media ± el error estándar.

5. Migración.

El ensayo de migración de las células H8 fue puesto a punto en nuestro laboratorio y el de las células endoteliales EA.hy926 fue puesto a punto con el asesoramiento del laboratorio de la Dra. Parborell (IBYME, Buenos Aires, Argentina). Para ello se sembraron 100000 células en placas de 24 pozos y una vez que llegaron a confluencia se realizó una herida mecánica utilizando el extremo de un tip amarillo (tiempo 0, T₀). Se agregaron los estímulos de interés (LPA o medio condicionado) durante 18 h (tiempo 18, T₁₈). Todas las incubaciones se realizaron con el medio correspondiente sin SFB.

Para investigar la migración de las células H8, las mismas se incubaron en presencia o ausencia de LPA 10 µM.

En el ensayo de migración de las células endoteliales EA.hy926, se utilizaron medios condicionados provenientes de ensayos de tubulogénesis con la línea H8 (6 h) en presencia o ausencia de los estímulos angiogénicos. Se utilizó medio sin suplementar como control de la migración basal de las EA.hy926.

En ambos casos, se tomaron fotos bajo microscopio de luz invertida para el tiempo 0 y tiempo 18 y se cuantificó el área de las heridas utilizando el programa Image Pro Plus (versión 4.5.0.29).

Se determinó el índice de migración como porcentaje de cierre de herida $[(T_0 - T_{18}) * 100] / T_0$. Los valores expresados muestran la media ± el error estándar.

6. Tinción con faloidina.

Para llevar a cabo esta técnica se sembraron 50000 células H8 sobre vidrios circulares hasta llegar a confluencia. Posteriormente, las células se incubaron con LPA 10 μ M durante 6 h en medio sin suplementar. Luego de la incubación, las células se fijaron con paraformaldehído 3.7% en PBS por 5 min, se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% en PBS por 5 min, y se tiñeron con TRITC-faloidina por 40 min a temperatura ambiente. Los vidrios circulares se montaron sobre un portaobjetos usando medio de montaje DABCO y se observaron en un microscopio de fluorescencia (100x) acoplado a una máquina fotográfica (Nikon Eclipse 200, NY, USA).

7. Inmunocitoquímica.

Para la inmunomarcación se sembraron 50000 células H8 en vidrios circulares hasta llegar a confluencia. Al evidenciarse la monocapa, se realizó un lavado con solución fisiológica y se incubaron con LPA 10 μ M durante 6 h.

Luego de la incubación, las células se trataron con el colorante Hoescht (nº 33342), el cual tiñe los núcleos de color azul. Se fijaron con paraformaldehído 3.7% en PBS por 5 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1% en PBS por 5 min.

Las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-COX-2 (1:100, anticuerpo policlonal de conejo) o anti-iNOS (1:100, anticuerpo policlonal de conejo) durante 18 h a 4°C en una cámara húmeda.

Los vidrios correspondientes a los controles negativos se trataron bajo las mismas condiciones, pero se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

Luego, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa-Fluor 555 (goat anti-rabbit, IgG 1:500) en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente.

Finalmente, las células fueron montadas para su observación en un microscopio de fluorescencia (100x) acoplado a una máquina fotográfica (Nikon Eclipse 200, NY, USA).

8. RT-PCR.

Se sembraron 400000 células H8 por pozo en una placa de 6. Luego de los tratamientos de interés, se aisló el ARN total. Para ello, las células se levantaron con Trizol y se realizó la extracción del ARN según el protocolo sugerido por el fabricante. El ARN aislado se cuantificó espectrofotométricamente (absorbancia a 260 y 280 nm) y aquellas muestras de ARN con una razón 260/280 entre 1.8 y 2, fueron sometidas a tratamiento con DNAsa I libre de RNAsa con el fin de digerir el DNA genómico contaminante.

La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de ARN total (3 µg) utilizando la enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia virus) y random primers, en presencia de un inhibidor de ribonucleasas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo con la enzima Go Taq polimerasa y primers específicos para LPA1, LPA3 y Lyso-PLD detallados en la Tabla 2. La reacción en cadena de la polimerasa se inició con un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min seguido de un máximo de 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión (94°C 5 min; 59°C 30 seg; 72°C, 1 min).

Los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 2%. Luego de la tinción con Gel Red, las bandas se visualizaron sobre un transiluminador y sus pesos moleculares se identificaron a partir de controles positivos y el marcador de peso molecular.

| Gen | Primer forward (5' - 3'). | Primer reverse (5' - 3'). | Producto. |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| LPA3 NM_012152.2 | CTTAGGGGCGTTTGTGGTAT | GTGCCATACATGTCCTCGTC | 177 |
| Lyso-PLD NM_006209.4 | GGCACACACTCTCCCTACAT | GTTCCAGCTTTCACCCCTTG | 233 |

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en RT-PCR.

8.1. RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Los niveles del ARN mensajero de IL-6, IL-8 y VEGF-C en las células H8 fue analizada por la técnica de PCR en tiempo real. Dicha técnica se realizó a partir de 50 ng de ADNc en un ciclador RG6000 (Corvette), utilizando una Master Mix y primers específicos para los genes a estudiar (Tabla 3). Las condiciones de la PCR, en todos los casos, se iniciaron con un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min seguido de un máximo de 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión (Tabla 3). Los niveles de ARN mensajero de los distintos genes estudiados fueron relativizados a los niveles de GADPH utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

| Gen | Primer forward (5` - 3`). | Primer reverse (5` - 3`). | Condiciones. | Producto. |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|-----------|
| GAPDH NM_000572.2 | CACATCGCTGAGACACCATG | GATGACAAGCTTCCCGTTCTC | 94°C, 5 min 59°C, 30 seg 72°C, 1 min | 224 |
| VEGF-C NM_005429.4 | CATGTACGAACCGCCAGAAG | CCCACAAGGGTCTCTCTGTT | 94°C, 5 min 59°C, 30 seg 72°C, 1 min | 192 |
| IL-6 NM_000600.4 | ATAACCACCCCTGACCCAAC | CCCATGCTACATTGCCGAA | 94°C, 5 min 59°C, 30 seg 72°C, 1 min | 156 |
| IL-8 NM_000584.3 | TTCAGAGACAGCAGAGCACA | TACCTTCACACAGAGCTGCA | 94°C, 5 min 59°C, 30 seg 72°C, 1 min | 150 |

Tabla 3. Secuencias de primers utilizados en qRT-PCR.

9. Inmunoelectrotransferencia (western blot).

Se caracterizaron los niveles de proteína de la enzima Lyso-PLD, del receptor LPA3, de iNOS y de VEGF-A en la línea celular H8 de trofoblasto humano de primer trimestre.

9.1. Procesamiento de la muestra.

Se sembraron 40000 células H8 en una placa de 6 pozos hasta llegar a confluencia. Al evidenciarse la monocapa, se realizó un lavado con solución fisiológica y se incubaron con LPA 10 μ M durante 24 h. Luego, la monocapa se levantó utilizando buffer de inhibidores y detergentes. Los homogenatos obtenidos se centrifugaron a 10000 g por 10 min para eliminar el debris celular. Se recogieron los sobrenadantes tomando alícuotas de 10 μ l para medir las proteínas por el método de Bradford. El volumen restante se fraccionó y se guardó a -20°C hasta realizar el ensayo de western blot.

9.2. Separación electroforética de las muestras.

Las muestras fueron sembradas en una concentración final de 90 µg de proteína / 30 µl de buffer siembra por calle.

Las mismas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS – PAGE) según la técnica descrita por Laemmli (1970).

Las proteínas se corrieron en primer lugar en un gel concentrador 4% 0.125 M Tris pH=6.8 hasta que la muestra entró en el gel separador. El gel separador para la detección del receptor LPA3 y la Lyso-PLD fue del 7.5%, para iNOS fue del 10%, y para VEGF-A fue del 12.5%. La electroforesis se realizó a amperaje constante (20 mA) y a temperatura ambiente.

En todos los geles realizados se sembró además una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular relativo para SDS-PAGE (estándar de PM), un control positivo y un control negativo según las proteínas en estudio.

9.3. Electrotransferencia de proteínas.

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC Sigma, 0.45 µm), utilizando el sistema de transferencia húmedo (Mini-Protean III, BioRad). Previo a la transferencia, tanto los geles como las membranas se equilibraron en buffer de transferencia durante 15 min. La transferencia se realizó a voltaje constante (100 V) a 4°C durante 90 min.

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 min con una solución de colorante Rojo Ponceau S. Esta tinción reversible se realizó para determinar si las muestras sembradas en cada calle presentaban la misma cantidad de proteínas totales y para corroborar que la transferencia de las mismas fuera correcta. Posteriormente las membranas se lavaron exhaustivamente con solución de lavado TPBS y finalizados los lavados, se incubaron con solución de bloqueo (leche descremada al 5%) durante 1 h a temperatura ambiente.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (LPA3 1:150; Lyso-PLD 1:150; iNOS 1:150, VEGF-A 1:1000) durante 18 h en una cámara húmeda a 4°C.

Para eliminar los restos de anticuerpo unido inespecíficamente se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con TPBS. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en PBS (IgG de conejo conjugado con peroxidasa) durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron con el mismo procedimiento utilizado para el anticuerpo primario.

El revelado de las membranas se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia (ECL, por su denominación en inglés). Para ello, las membranas fueron incubadas con la solución de revelado (ver apartado de soluciones) durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se expusieron a una película fotográfica en cuarto oscuro. El revelado de la película se llevó a cabo en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación.

Las bandas proteicas y sus pesos moleculares se identificaron a partir de los controles positivos y de los marcadores de peso molecular.

El peso molecular de cada banda se calculó usando una regresión logarítmica a partir de las posiciones de los marcadores de peso molecular. La posición de las bandas se tomó como la distancia desde el origen de la corrida hasta el centro de cada una de ellas (relación de frentes, R_f).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la proteína a analizar (mm)}}{\text{Distancia recorrida por el frente (mm)}}$$

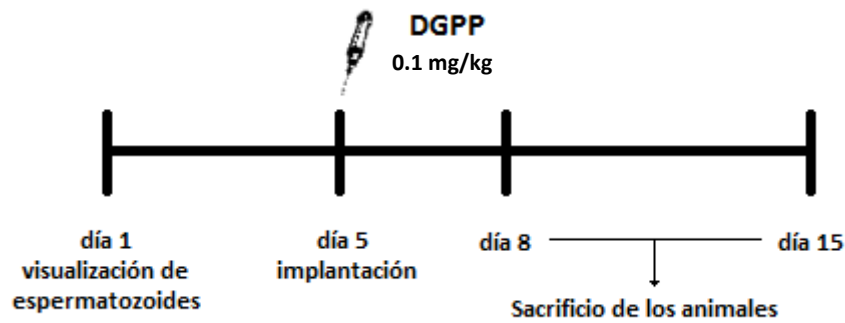
Para iNOS y VEGF-A la intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH). β -actina se utilizó como control de carga y los resultados se expresaron como densidad óptica relativa.

10. Estudios *in vivo*.

Para investigar la participación del LPA y su receptor LPA3 en la angiogénesis *in vivo* durante el proceso de implantación, se utilizó un modelo experimental en la rata puesto a punto en el laboratorio como parte de la tesis de la Dra. Sordelli y la tesis de licenciatura de la Lic. Beltrame (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Se administró en forma intrauterina una dosis única de DGPP (0,1 mg/kg, volumen final de inyección 2 μ l, un antagonista selectivo del LPA3) en el cuerno izquierdo de hembras en día 5 de gestación por la mañana. El cuerno derecho se tomó como control y se inyectó el mismo volumen de vehículo (metanol 100%).

Las ratas fueron sacrificadas en los días 8 y 15 de gestación, en una cámara saturada de dióxido de carbono seguido de dislocación cervical.

El diagrama del protocolo de administración del DGPP se muestra a continuación:



Se aislaron los sitios de implantación enteros (Día 8) o bien se separaron los úteros, de las placentas y los fetos (Día 15). Se observó un porcentaje de reabsorción de aproximadamente un 60% en el día 8 y 15 de gestación. En aquellos casos donde hubo reabsorción embrionaria no fue posible separar el feto de la placenta y por lo tanto se separó el útero de la unidad feto-placentaria completa.

Los sitios de día 8 de gestación y las placentas de día 15 de gestación provenientes de los cuernos tratados y control, se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato-salino (PBS) 0,1 M (pH=7.4) durante 12 h a 4°C. Luego se deshidrataron en gradiente creciente de alcoholes y se los incluyó en parafina.

Se realizaron cortes de 4 μm con micrótopo (Leica RM 2125, Wetzlar, Germany) y se montaron en portaobjetos xilanizados al 2%. Las secciones fueron sometidas a una tinción con hematoxilina-eosina para evaluar la morfología del tejido en un microscopio 4x o 40x (Nikon Eclipse 200, NY, USA).

En el día 8 de gestación, se analizaron 5 campos elegidos al azar por cada corte histológico. En el caso de las placentas de día 15, se estudiaron los cortes histológicos en su totalidad. En ambos casos, se determinaron el número de vasos que cumplían el siguiente criterio: bordes bien definidos, sin discontinuidades en el corte analizado y con al menos una célula endotelial visible. El número de vasos se contabilizó de forma manual.

Se cuantificó el perímetro o circunferencia, el lumen y el ancho de la pared de los vasos mediante el programa Pro Plus (versión 4.5.0.29). Luego de estudiar la frecuencia de distribución de la circunferencia de los vasos, se clasificaron según su calibre, determinándose vasos de bajo calibre (vasos que poseían un calibre menor a 50 μm en día 8 o menor a 500 μm en día 15), o de alto calibre (vasos que poseían un perímetro mayor o igual a 50 μm en día 8 o mayor o igual a 500 μm en día 15).

11. Análisis estadístico.

Todos los valores representan la media \pm S.E.M. Los datos cumplen los supuestos de la prueba de ANOVA: poseen una distribución normal de acuerdo al test de normalidad Shapiro-Wilks y presentaron homogeneidad de varianzas (Test de Levene).

Para la comparación de las medias se utilizó un ANOVA en bloques al azar seguido de pruebas de Bonferroni o Tukey. Utilizando este modelo de ANOVA nos fue posible eliminar las variaciones debidas a la heterogeneidad de las placas de cultivo o de los animales en estudio (Bloque) de las comparaciones entre unidades que reciben los tratamientos.

Se realizaron 3 réplicas por tratamiento y cada experimento se repitió al menos 4 veces. Las medias se consideraron significativamente diferentes cuando $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat (Córdoba, Argentina).

RESULTADOS.

Hace ya varios años que se ha propuesto que durante el remodelado de las arterias espiraladas, el trofoblasto adopta un fenotipo endotelial que lo prepara para poder cumplimentar las respectivas funciones vasculares (Zhou y col., 1997a, 1997b). Fallas en alguno de los pasos que implica esta transformación se correlacionan con complicaciones obstétricas durante la gestación temprana y tardía (Khong y col., 1986).

Varios estudios en humanos y en ratones deficientes en alguno de los receptores de LPA, han demostrado en particular la importancia del receptor LPA3 en múltiples aspectos de la reproducción en vertebrados. Además, previamente observamos que el LPA estimula la expresión de IL-10, un mediador del proceso de angiogénesis, en el útero de rata durante la implantación, y que la administración de un antagonista selectivo del LPA3 genera fallas en el desarrollo de la macrovasculatura que irriga los cuernos uterinos (Beltrame y col., 2013; Sordelli y Beltrame y col., 2017).

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el rol del LPA el rol del LPA en las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal durante la gestación temprana. Dada la imposibilidad ética de estudiar el proceso de implantación en humanos, las investigaciones acerca de los procesos que tienen lugar en la interfase materno-fetal requieren de la utilización de modelos experimentales *in vitro* (cultivos celulares) así como también de modelos animales *in vivo*. Es por ello que se utilizó como modelo experimental *in vitro* la línea celular H8 de citotrofoblasto humano de primer trimestre y un diseño experimental *in vivo* en el que se empleó un modelo de reabsorción embrionaria en ratas hembras de la cepa Wistar.

RESULTADOS *IN VITRO*.

1. EXPRESIÓN DEL SISTEMA LPA/LPA3.

La Lyso-PLD es una de las principales enzimas descritas hasta el momento como partícipes de la síntesis de LPA. En mujeres se ha observado que la actividad sérica de la Lyso-PLD aumenta conforme progresa la gestación (Tokumura y col., 1999). Además, el grupo de Iwasawa (2009) encontró que el trofoblasto presente en la placenta humana expresa Lyso-PLD en los tres trimestres del embarazo y que la expresión de la misma aumenta conforme avanza la gestación. Los resultados de estos dos grupos de investigación sugieren que el LPA tendría una función en el desarrollo y diferenciación del trofoblasto.

Hasta el momento, se han identificado 6 receptores para el LPA (Tigyi, 2010). El receptor LPA3, descrito como el más relevante en el proceso de implantación, se encuentra expresado en el endometrio de mujeres fértiles durante todo el ciclo menstrual, siendo su expresión significativamente menor en las mujeres con fallas repetidas en la implantación (Achache y col., 2010).

En base a estos antecedentes y a los resultados previos de nuestro laboratorio, en primer lugar, se estudió si la línea H8 expresaba a la enzima Lyso-PLD y el receptor LPA3. Mediante la técnica de RT-PCR se detectaron los niveles del ARNm, mientras que los niveles de proteína se determinaron por western blot. Las condiciones adecuadas de annealing y extensión, así como las especificaciones para las determinaciones por western blot están puestas a punto en el laboratorio (Sordelli y col. 2012).

La línea celular H8 expresa constitutivamente la enzima Lyso-PLD (Figura 1a) y el receptor LPA3 (Figura 1b). En primer lugar, se observó la expresión del ARNm de Lyso-PLD y LPA3 (panel superior). Luego, mediante la utilización de marcadores de peso molecular, de controles positivos y siguiendo las especificaciones del fabricante, se determinó que la banda observada a la altura de 125 kDa correspondía a la proteína de la Lyso-PLD mientras que detectada a 43 kDa correspondía al receptor LPA3 (panel inferior).

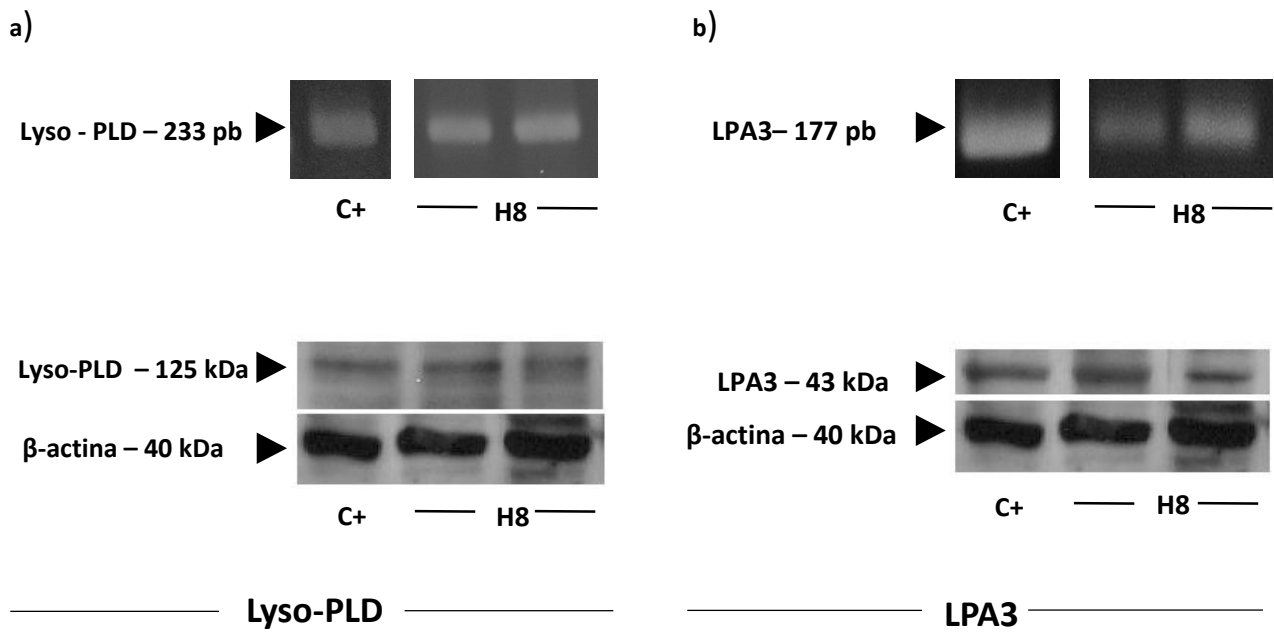


Figura 1. La línea celular H8 expresa la Lyso-PLD y el receptor LPA3. La línea de trofoblasto humano de primer trimestre H8 expresa constitutivamente (a) la principal enzima de síntesis de LPA, la Lyso-PLD y (b) el receptor LPA3. Los niveles del ARNm se determinaron por la técnica de RT-PCR. Se muestran geles de agarosa representativos de Lyso-PLD y de LPA3. C+: control positivo, útero de rata de día 5 de gestación (Sordelli y col., 2012). Los niveles proteicos de la Lyso-PLD y del receptor LPA3 fueron detectados mediante la técnica de western blot. Las proteínas se extrajeron y se separaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante un anticuerpo específico contra Lyso-PLD y LPA3 respectivamente. La figura es representativa de 3 experimentos independientes y se muestran geles de poliacrilamida de Lyso-PLD y LPA3.

2. EFECTO DEL LPA SOBRE LA ANGIOGÉNESIS DEL TROFOBlasto HUMANO DE PRIMER TRIMESTRE *IN VITRO*.

Luego de caracterizar la expresión del receptor LPA3 y de una de las principales enzimas en la síntesis de LPA (Lyso-PLD), se estudió el efecto del LPA sobre los diferentes procesos involucrados en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

Durante la formación de la placenta, el trofoblasto extraveloso cumple un programa de diferenciación sumamente activo en el que migra e invade el estroma decidual, rodea las arterias espiraladas, penetra hacia el lumen vascular y reemplaza a las células endoteliales de estos vasos. Este proceso conocido como “remodelado de las arterias espiraladas” o “angiogénesis del trofoblasto” implica el cambio de fenotipo y de función del trofoblasto desde uno invasor a uno endovascular (Espinoza y col., 2006; Benirschke y Kaufmann, 2000; Kam y col., 1999). Por lo tanto, además de la formación de los túbulos, este proceso requiere de la proliferación y de la migración de las células involucradas.

Mediante una estrategia *in vitro* se evaluó la adquisición del fenotipo vascular por parte del trofoblasto humano de primer trimestre mediante la formación de estructuras de tipo capilares, la migración y la proliferación de la línea celular H8.

2.1. Formación de túbulos.

Se evaluó la formación de túbulos o estructuras de tipo capilares en la línea H8 como medida de la angiogénesis *in vitro* del trofoblasto humano de primer trimestre. La técnica consiste en la formación de túbulos vasculares sobre una base de matriz extracelular (Geltrex).

2.1.1. Efecto del LPA sobre la formación de túbulos.

Se ha observado que la concentración de LPA en suero de mujeres gestantes aumenta durante el embarazo, llegando a valores de 50 μM en el primer trimestre de gestación (Tokumura y col., 2002a). Además, resultados publicados de nuestro laboratorio indican que el LPA a una concentración de 50 μM cumpliría un rol pro-implantatorio en el útero de rata, sugiriendo que este mediador lipídico ejerce una función en la interfase materno-fetal (Sordelli y col., 2012).

Una vez puesta a punto las condiciones óptimas del ensayo de tubulogénesis (ver materiales y métodos), y con el objetivo de estudiar el efecto del LPA sobre la formación de estructuras tipo capilares, se realizó una curva concentración-respuesta a dos tiempos diferentes. En base a los antecedentes mencionados

anteriormente, la línea H8 se incubó con LPA 5, 10, 20 y 50 μM durante 3 y 6 h y se evaluó la formación de la red tubular.

En primer lugar, a las 3 h de incubación, se observó que el LPA estimuló la formación de túbulos y el número de ramificaciones en forma concentración dependiente (Figura 2).

La incubación con LPA 10 y 20 μM aumentó significativamente el largo de los túbulos y el número de ramificaciones formadas con respecto a los controles ($p < 0.05$). Si bien se observó un aumento en el largo de los túbulos con LPA 5 μM , no se observaron cambios en el número de ramificaciones. En el caso de las incubaciones con LPA 50 μM no se observaron cambios en la formación basal de túbulos, siendo semejante al control (Figura 2).

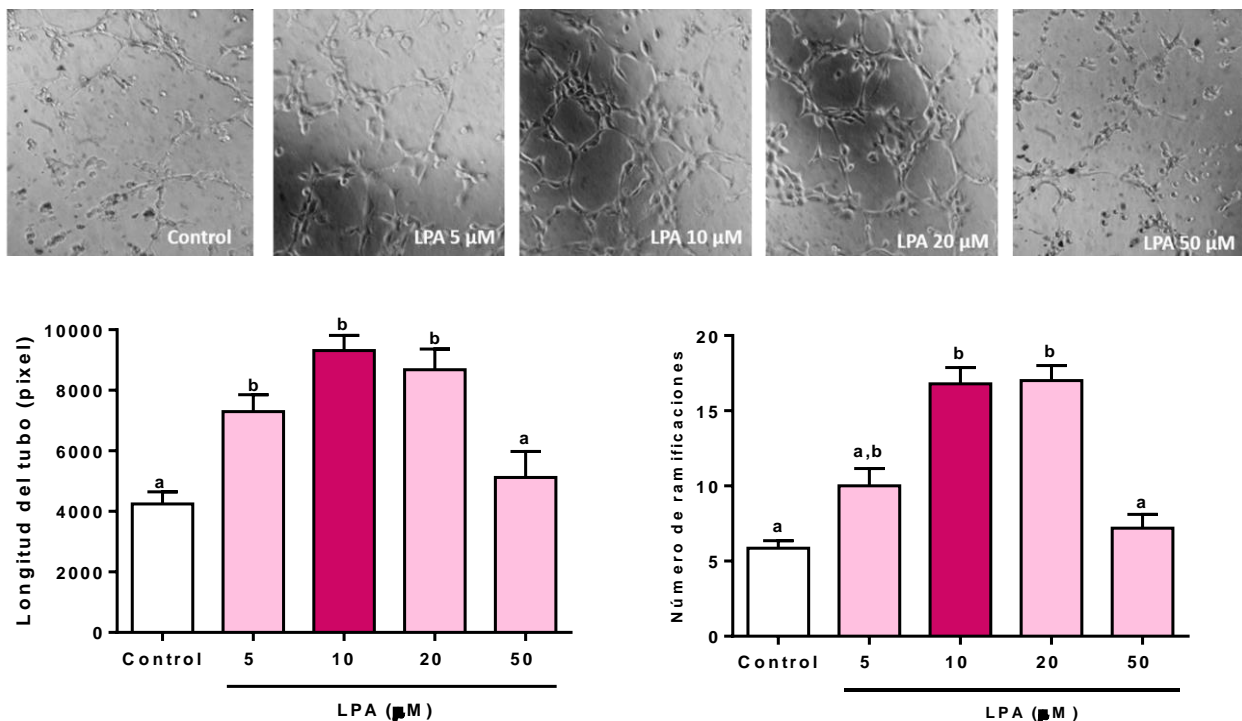


Figura 2. El LPA estimula la tubulogénesis de la línea celular H8 a las 3 h de incubación. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 3 h en presencia de medio sin suplementar (control) o LPA (5, 10, 20 y 50 μM). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

A las 6 h de incubación, el LPA indujo la formación de túbulos y el número de ramificaciones en forma concentración dependiente (Figura 3), observándose una red vascular con estructuras capilares bien definidas.

Al igual que lo observado a las 3 h, la incubación con LPA 10 y 20 μM por 6 h estimuló significativamente el largo de los túbulos y el número de ramificaciones con respecto a los controles. Si bien el tratamiento con LPA 5 μM aumentó el largo de los túbulos, no modificó el número de ramificaciones. Por último, la incubación con LPA 50 μM no tuvo efecto sobre la tubulogénesis basal.

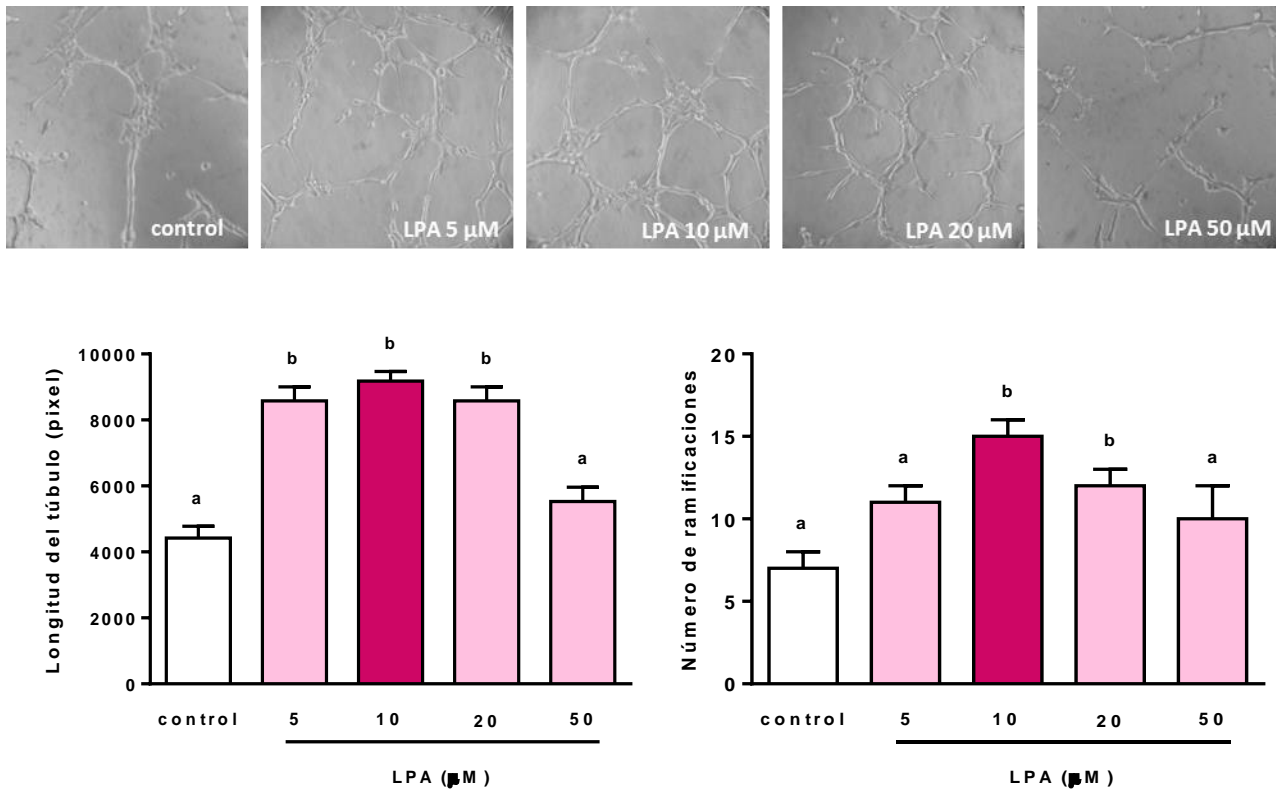


Figura 3. El LPA estimula la tubulogénesis de la línea celular H8 a las 6 h de incubación. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control) o LPA (5, 10, 20 y 50 μM). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

La formación de la malla tubular se hace visible a partir de las 3 h de incubación, involucrando la migración y el alineamiento celular. Posteriormente comienzan el proceso de unión de membranas generando las estructuras tipo capilares. Sin embargo, a partir de las 6 h se observa una red robusta y estable, con vasos bien definidos que se mantienen invariables hasta las 24 h (Figura 4).

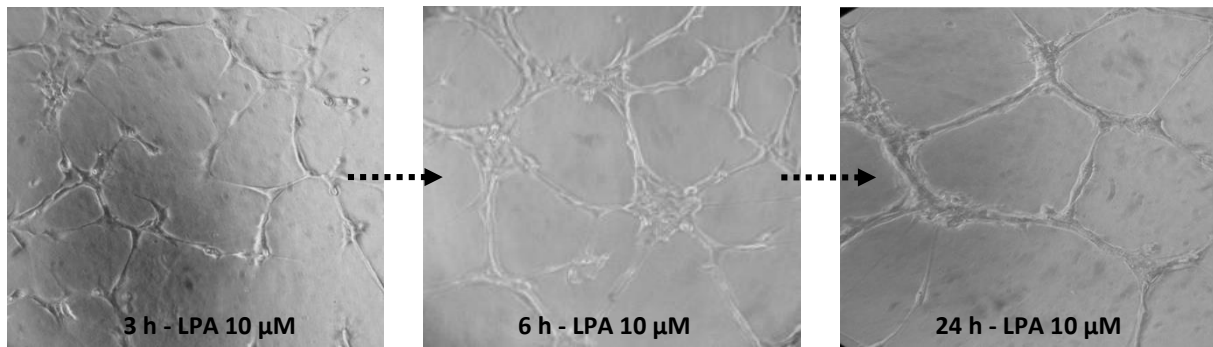


Figura 4. Progreso de la red vascular de la línea celular H8 en función del tiempo de incubación con LPA. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 3, 6 o 24 h con LPA 10 μ M. Se muestran figuras representativas de la red vascular (10x).

Se seleccionó LPA 10 μ M como la concentración óptima para ser utilizada en los siguientes ensayos, dado que es la menor concentración a la cual se observaron diferencias significativas con respecto a los controles, tanto para la longitud de los túbulos como para el número de ramificaciones en todos los tiempos de incubación.

Además, en base a las características de la red capilar a las 3 y 6 h, el tiempo de incubación seleccionado para los ensayos de tubulogénesis fue de 6 h. Por lo tanto, en el resto de los estudios se utilizó una concentración de LPA 10 μ M durante 6 h.

2.2. Efecto del LPA sobre la migración del trofoblasto.

El movimiento (migración) de las células que formarán los nuevos tubos capilares desde los vasos preexistentes hacia la matriz extracelular, es uno de los pasos claves para el proceso de angiogénesis del trofoblasto.

Para determinar si el LPA estimula la migración del trofoblasto de primer trimestre, se realizaron ensayos de migración por herida y de tinción de los filamentos de actina.

2.2.1. Tinción con faloidina (faloidina - TRITC).

La faloidina, una toxina de *Amanita Phalloides*, puede unirse a la actina permitiendo estudiar la disposición de los filamentos del citoesqueleto.

Al observar la tinción con faloidina, las células H8 presentaron cambios en su estructura luego del tratamiento con LPA 10 μM por 6 h. Se observó que las células del trofoblasto presentaron una forma más alargada como consecuencia del re-arreglo en la distribución de los filamentos de actina luego de la incubación con LPA 10 μM (Figura 5). Este resultado sugiere una posible modulación del LPA sobre la migración celular del trofoblasto humano de primer trimestre.

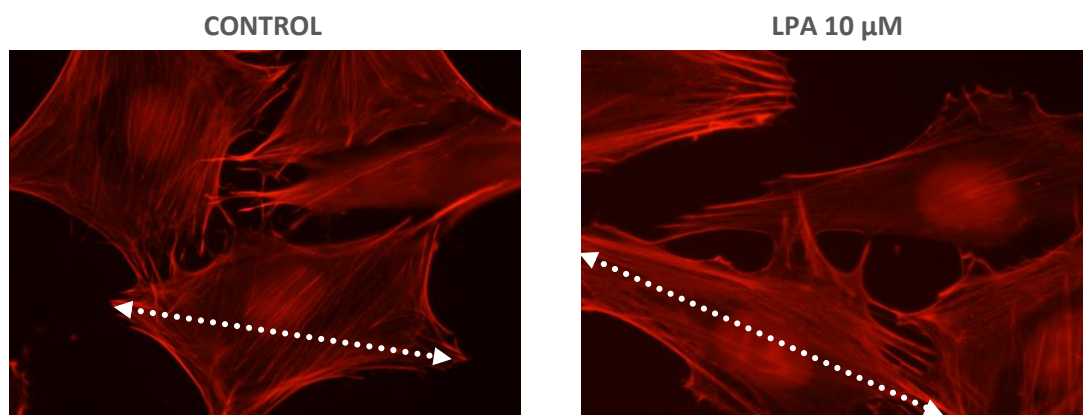


Figura 5. Efecto del LPA sobre la polimerización de los filamentos de actina en la línea celular H8. Se muestran fotos representativas de la tinción con faloidina – TRITC luego de 6 h de incubación con LPA 10 μM . Se tomaron fotografías bajo un microscopio de fluorescencia Nikon (100x). Las flechas indican el eje de mayor longitud.

2.2.2. Migración por herida.

Para corroborar el resultado observado en la tinción con faloidina, se determinó la migración del trofoblasto a través de un ensayo cuantitativo denominado migración por herida.

En primer lugar, se puso a punto el tiempo de incubación tal que la herida no cierre completamente (18 h). Luego, se realizaron incubaciones en presencia o ausencia de LPA 10 μM durante 18 h.

Se observó que el tratamiento con LPA 10 μM estimuló la migración de las células trofoblásticas H8 expresado como un aumento del porcentaje del índice de migración ($p < 0.05$), indicando una regulación del LPA sobre la migración del trofoblasto humano de primer trimestre (Figura 6).

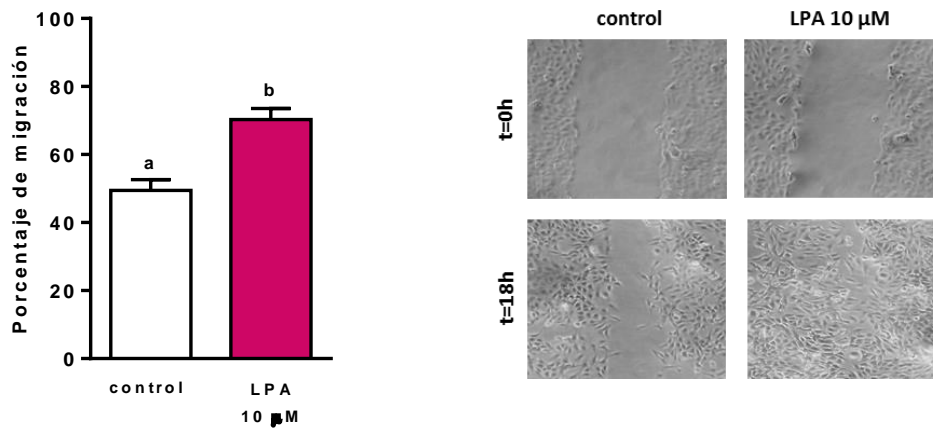


Figura 6. El LPA estimula la migración de la línea celular H8. Se muestran imágenes representativas (4x) a las 0 y 18 h de incubación en presencia de medio sin suplementar (control) o LPA 10 μ M. Los resultados expresan el porcentaje de migración o cierre de herida $[(T_0 - T_{18}) * 100] / T_0$ y representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

2.3. Proliferación del trofoblasto.

La proliferación se evaluó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) y se cuantificó como formazán solubilizado en las células tratadas con LPA (absorbancia 540 nm) respecto a las células controles.

La incubación con LPA 10 μ M por 24 h no produjo cambios en la proliferación del trofoblasto de primer trimestre (Figura 7a). En contraste, el tratamiento con LPA 10 μ M por 48 h estimuló la proliferación de las células H8 de manera significativa con respecto al control ($p < 0.05$), indicando una inducción por parte del LPA sobre el proceso de proliferación del trofoblasto humano de primer trimestre (Figura 7b).

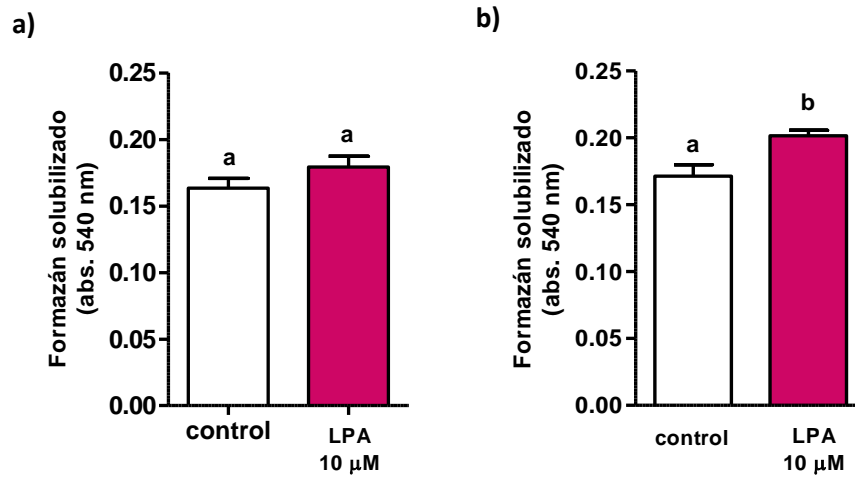


Figura 7. El LPA estimula la proliferación la línea celular H8 a las 48 h de incubación. Las células H8 se incubaron con LPA 10 μ M por (a) 24 h o (b) 48 h y se determinó la proliferación celular mediante el ensayo colorímetro de MTT. Los resultados expresan la absorbancia detectada a 540 nm correspondiente al formazán solubilizado y representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Hasta aquí nuestros resultados sugieren que el LPA induce la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre incrementando los procesos involucrados en este mecanismo, como la tubulogénesis, la migración y la proliferación celular.

3. ESTUDIO DEL RECEPTOR INVOLUCRADO EN EL EFECTO DEL LPA SOBRE LA ADQUISICION DEL FENOTIPO ENDOVASCULAR DEL TROFOBLASTO.

Como se detalló anteriormente, la línea H8 expresa constitutivamente el receptor LPA3, el cual posee un rol clave en el proceso de implantación. Es interesante mencionar que las mujeres con fallas implantatorias múltiples presentan una menor expresión del receptor LPA3 y variaciones en su localización en el endometrio (Achache y col., 2010).

Para estudiar qué receptor participa del efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto, las células se incubaron con LPA + antagonistas selectivos y no selectivos del receptor LPA3. La línea H8 se incubó con: 1) 8Br-LPA, el cual antagoniza los receptores LPA1 al LPA4, 2) DGPP, un antagonista selectivo de LPA3, o 3) BMT, un antagonista selectivo de LPA1.

En primer lugar, se realizó una curva concentración-respuesta para los antagonistas elegidos (8Br-LPA 1 a 100 μ M; DGPP 1 a 100 μ M; BMT 1 a 100 μ M), determinándose la menor concentración a la cual no poseen un efecto *per se* sobre la tubulogénesis del trofoblasto (Tabla 1). Luego, las células H8 se incubaron con LPA 10 μ M por 6 h en presencia o ausencia de los diferentes antagonistas y se cuantificó la tubulogénesis.

| | Curva de concentración. | Concentración óptima elegida. | Longitud del túbulo. | Número de ramificaciones. |
|---|-------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Control. | - | - | 4297 \pm 197 | 6.5 \pm 0.3 |
| 8Br-LPA Antagonista de LPA1 a LPA4. | 1 - 100 μ M | 5 μ M | 3649 \pm 317 | 7.1 \pm 0.9 |
| DGPP Antagonista selectivo de LPA3. | 1 - 100 μ M | 100 μ M | 3700 \pm 430 | 6.4 \pm 0.8 |
| BMT Antagonista selectivo de LPA1. | 1 - 100 μ M | 10 μ M | 4200 \pm 398 | 5.8 \pm 0.6 |

Tabla 1. Las concentraciones utilizadas de antagonistas de los receptores de LPA no presentan un efecto sobre la formación de túbulos basal en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h con BrP-LPA (antagonista de los receptores LPA1, 2, 3, 4), DGPP (antagonista selectivo de LPA3) o BMT (antagonista selectivo de LPA1). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

En la Figura 8, se observa que la co-incubación de LPA con 8Br-LPA (antagonista del LPA1 al LPA4) o con DGPP (antagonista selectivo de LPA3) revirtió significativamente el efecto estimulador del LPA sobre la formación

de túbulos a niveles controles ($p < 0.05$). Este resultado sugiere que el efecto del LPA sobre la tubulogénesis de las células H8 está mediado por el receptor LPA3.

Dado que el DGPP presenta una leve afinidad por el receptor LPA1 (LPA3 $K_i = 106$ nM; LPA1 $K_i = 6.6$ μ M), las células se co-incubaron durante 6 h con LPA 10 μ M + BMT 5 μ M, un antagonista selectivo del receptor LPA1, para determinar su posible participación en la tubulogénesis inducida por LPA.

La co-incubación de LPA con BMT no revirtió el efecto estimulador del LPA sobre la formación de túbulos, indicando que el receptor LPA1 no está involucrado en el efecto del LPA (Figura 8).

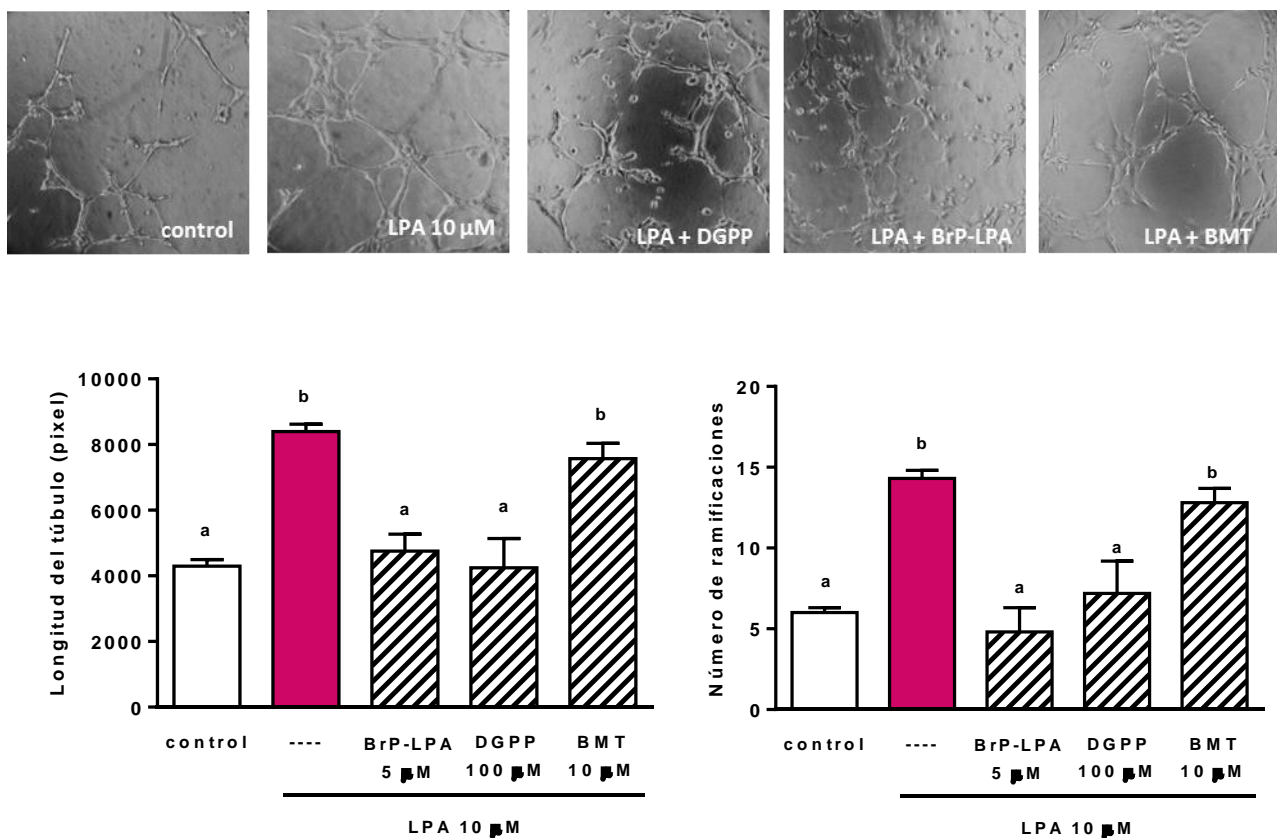


Figura 8. El receptor LPA3 media el efecto del LPA sobre la formación de túbulos en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h con LPA + 8Br-LPA 5 μ M (antagonista de los receptores LPA1, 2, 3, 4), LPA + DGPP 100 μ M (antagonista selectivo de LPA3) o LPA + BMT 10 μ M (antagonista selectivo de LPA1). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados sugieren que el LPA promueve la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre a través del receptor LPA3.

4. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA LÍNEA H8 UTILIZANDO OTRA LÍNEA DE TROFOBLASTO HUMANO DE PRIMER TRIMESTRE: SWAN71.

Con el fin de validar los resultados obtenidos en la línea H8, se utilizó otra línea de trofoblasto humano de primer trimestre (Swan71) obtenida a partir de citotrofoblasto humano de 7 semanas inmortalizado por transformación mediante la subunidad catalítica de la telomerasa (Straszewski-Chavez y col., 2009).

Se realizaron incubaciones con LPA o LPA + DGPP (antagonista selectivo de LPA3) por 6 h y se determinó la tubulogénesis medida como el largo de los túbulos y el número de ramificaciones.

El tratamiento con LPA estimuló la formación de túbulos en la línea Swan71, corroborando los resultados obtenidos con las células trofoblásticas H8 (Figura 9). Asimismo, cuando se co-incubó LPA con el antagonista selectivo del receptor LPA3 (DGPP 100 μ M) se observó una reducción en la formación de túbulos a niveles controles ($p < 0.05$) (Figura 9), sugiriendo la participación del receptor LPA3 sobre la tubulogénesis inducida por LPA en esta línea.

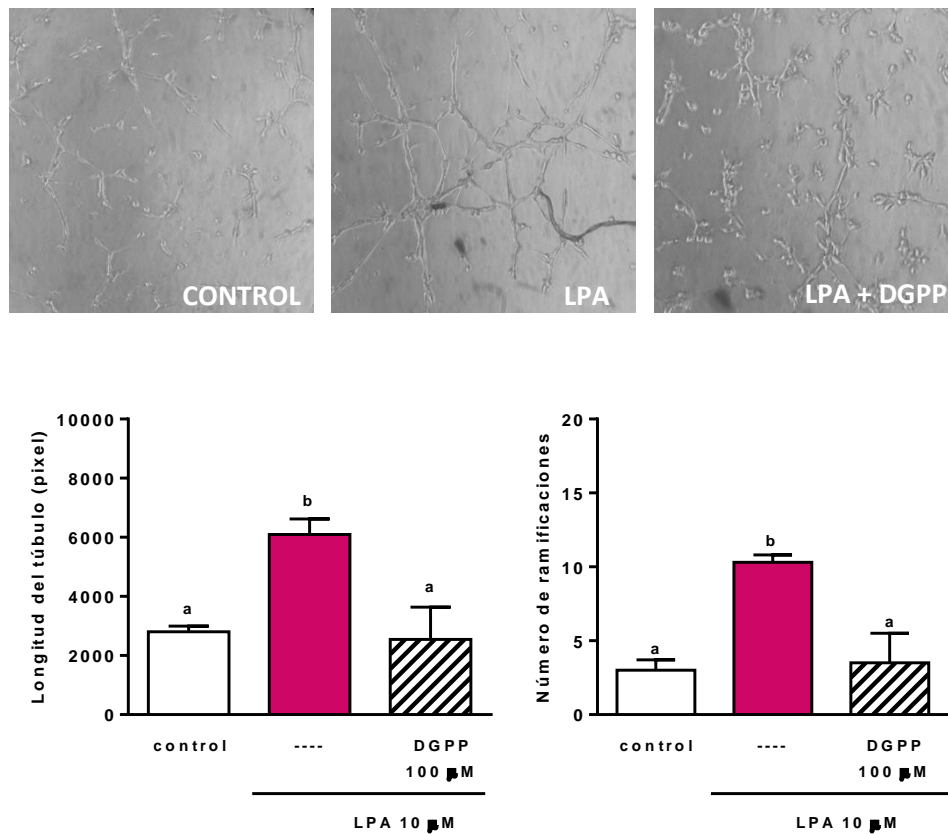


Figura 9. El LPA estimula la tubulogénesis mediada por el receptor LPA3 en la línea celular Swan71. Las células Swan71 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μM o LPA + DGPP 100 μM (antagonista selectivo de LPA3). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados validan los obtenidos en la línea H8 donde se observó que el LPA estimula la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre, y que esta regulación está mediada por el receptor LPA3, demostrando que el mecanismo de inducción del LPA vía LPA3 sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre no es dependiente de la línea celular.

5. REGULACIÓN DE LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL SOBRE LA FORMACIÓN DE TÚBULOS.

Las hormonas esteroideas, progesterona y estradiol, son las grandes reguladoras de los eventos que tienen lugar en la interfase materno-fetal durante el período peri-implantatorio. Previamente en este trabajo de tesis, observamos que el LPA a través del LPA3 estimula la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. Varios autores han descrito que la P4 y el E2 regulan la migración del trofoblasto y la secreción de moléculas con características pro-vasculares (Maliqueo y col., 2016). Sin embargo, hasta el momento no hay evidencias acerca de un posible efecto de estas hormonas sobre la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre, y si el sistema LPA/LPA3 participa de este mecanismo de regulación en la angiogénesis que tiene lugar en la interfase materno-fetal. Por lo tanto, decidimos investigar si la P4 y el E2 regulan la capacidad del trofoblasto de formar estructuras capilares, y si el receptor LPA3 está involucrado en este efecto.

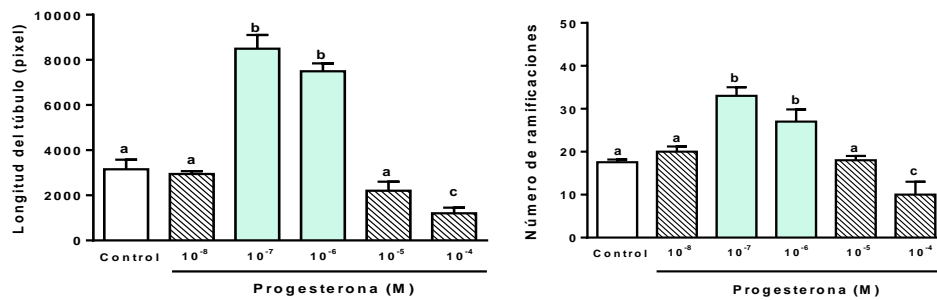
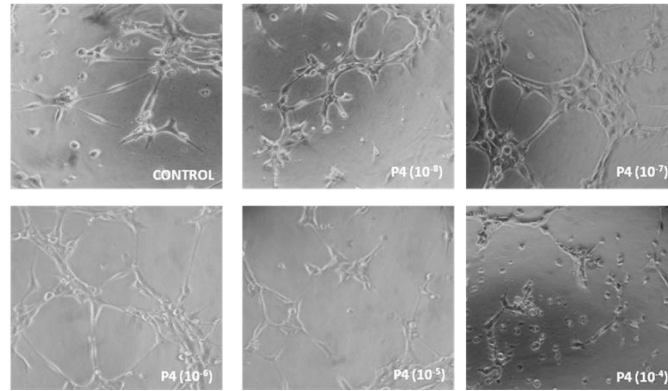
5.1. Efecto de la P4 y el E2 sobre la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

En primer lugar, las células H8 se incubaron con concentraciones crecientes de P4 (10^{-8} – 10^{-4} M) o de E2 (10^{-10} – 10^{-4} M) durante 6 h, y se determinó la longitud de los túbulos y el número de ramificaciones.

Se observó que la P4 estimuló la formación de túbulos en forma concentración dependiente (Figura 10a). La incubación con P4 10^{-7} M o P4 10^{-6} M incrementó el largo de los túbulos y el número de ramificaciones con respecto al control ($p < 0.05$). En cambio, la incubación con P4 10^{-8} M o P4 10^{-5} M no presentó diferencias con respecto a la tubulogénesis basal de la línea H8. En el caso de la incubación con P4 10^{-4} M, se observó una reducción en la formación de túbulos a valores por debajo del control ($p < 0.05$).

Al estudiar el efecto del E2 se observó que la incubación con una concentración de 10^{-8} M estimuló la formación de la red tubular de las células H8 con respecto al control ($p < 0.05$) (Figura 10b), en contraste con las otras concentraciones testeadas las cuales no tuvieron efecto (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M). A su vez, y en forma similar a lo observado con P4 10^{-4} M, la incubación con E2 10^{-4} M inhibió la formación basal de la red tubular ($p < 0.05$).

a)



b)

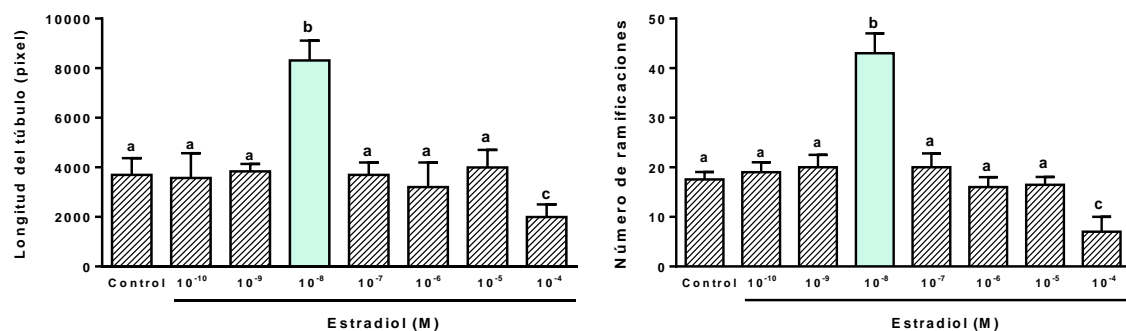
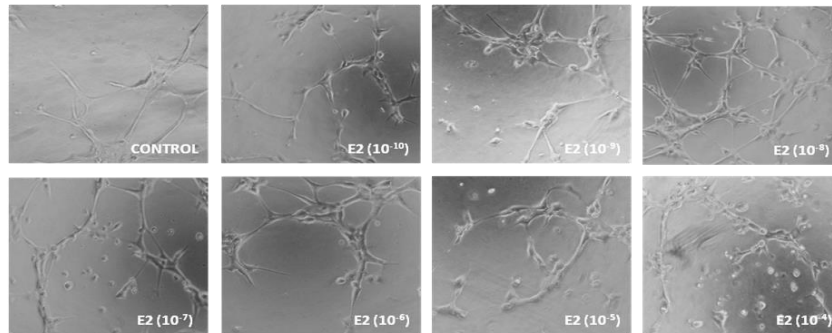


Figura 10. La progesterona y el estradiol estimulan la formación de túbulos de forma concentración dependiente en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron en presencia de medio sin suplementar (control) o (a) P4 (10^{-8} – 10^{-4} M) o (b) E2 (10^{-10} – 10^{-4} M) por 6 h. Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Debido a que en el microambiente uterino las hormonas esteroideas, P4 y E2, se encuentran presentes simultáneamente regulando los procesos que se desencadenan luego de la implantación, se quiso evaluar el efecto conjunto de estas hormonas sobre la tubulogénesis del trofoblasto. Para ello, se realizaron incubaciones con P4 y E2 en las que se tomó como punto de partida aquellas concentraciones de P4 o de E2 que habían estimulado la tubulogénesis de las células H8 (ver Figura 10a y b). Por un lado, las células se co-incubaron con P4 10^{-7} M y con concentraciones crecientes de E2 (10^{-10} – 10^{-4} M). Por otro lado, las células se co-incubaron con E2 10^{-8} M y con concentraciones crecientes de P4 (10^{-8} – 10^{-4} M).

Tomando como punto de comparación los resultados obtenidos para cada una de las hormonas en forma separada, la co-incubación con P4 y E2 simultáneamente, tuvo un efecto diferente al esperado sobre la formación de túbulos (Figura 11). Si bien la incubación de las células H8 con P4 10^{-7} M o con E2 10^{-8} M estimuló la formación de túbulos (Figura 10), cuando se co-incubaron P4 10^{-7} M + E2 10^{-8} M no se observó un efecto estimulador sobre la tubulogénesis. Solamente, la co-incubación con P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M aumentó la formación de estructuras capilares luego de 6 h de incubación ($p < 0.05$), y este efecto fue menor al observado con cada una de las hormonas por separado.

La co-incubación con P4 10^{-4} M + E2 10^{-8} M suprimió la formación de túbulos a niveles por debajo del control (Figura 11). Sin embargo, la incubación con estas concentraciones de P4 y E2 por separado indujo la formación de túbulos a niveles semejantes a los controles (Figura 10). Es importante mencionar que el efecto de ambas hormonas en conjunto no se debió a acciones sobre la viabilidad o supervivencia celular (tinción con colorante vital), sino a una inhibición sobre el proceso de tubulogénesis.

Por último, la co-incubación con P4 10^{-3} M + E2 10^{-8} M tampoco permitió la formación de túbulos en las células H8, pero en este caso fue debido a un efecto negativo sobre la supervivencia de las células trofoblásticas siendo esta combinación de hormonas esteroideas una concentración tóxica para la línea celular.

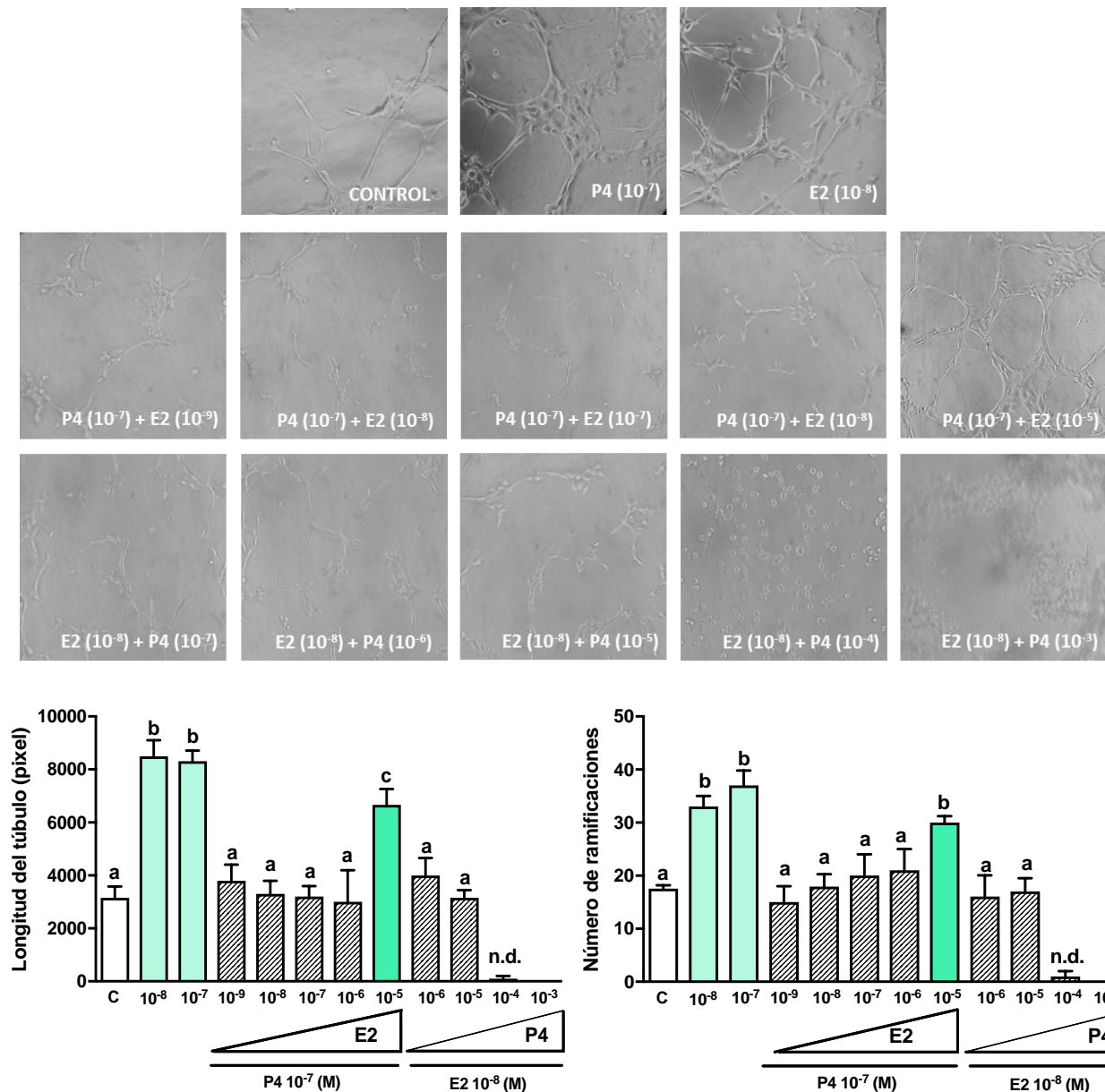


Figura 11. La co-incubación con P4 y E2 estimula la formación de túbulos en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control) o con P4 10^{-7} + E2 (10^{-9} – 10^{-5} M) o con E2 10^{-8} + P4 (10^{-6} – 10^{-3} M). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces. C: control. n.d.: no detectable.

Estos resultados indican que las hormonas esteroideas, progesterona y estradiol, las cuales orquestan los principales eventos que tienen lugar durante la implantación embrionaria, regulan la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre y que esta modulación dependería de su concentración en la interfase materno-fetal.

5.2. Estudio de la participación del receptor LPA3 en el efecto de las hormonas esteroideas sobre la angiogénesis del trofoblasto.

Previamente observamos que el LPA promueve la angiogénesis del trofoblasto de primer trimestre a través del receptor LPA3. Además, describimos que las hormonas P4 y E2 también inducen la formación de túbulos, y que este efecto depende de su concentración. Por lo tanto, decidimos evaluar si el sistema LPA/LPA3 participa del efecto de la P4 y el E2 en la angiogénesis del trofoblasto. Para ello, las células H8 se incubaron por 6 h con P4 10^{-7} + E2 10^{-5} M, en presencia o ausencia de un antagonista selectivo para LPA3 (DGPP 100 μ M) y se estudió la longitud de los túbulos y el número de ramificaciones.

La incubación con P4 + E2 + DGPP revirtió parcialmente el efecto estimulador de las hormonas sobre la formación de túbulos ($p < 0.05$) indicando que la regulación de P4 + E2 está mediada en parte por el receptor LPA3 (Figura 12).

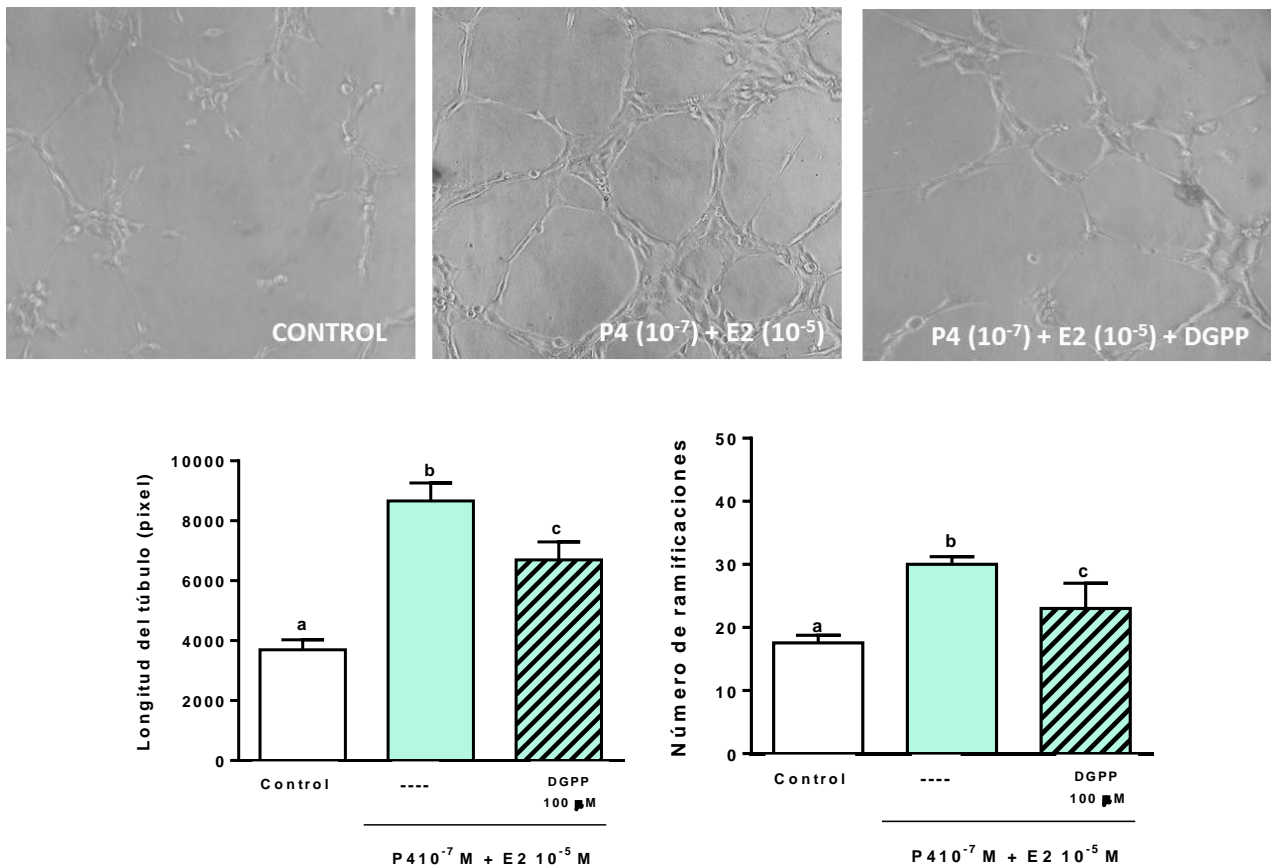


Figura 12. La estimulación de P4 + E2 sobre la tubulogénesis de la línea celular H8 es mediada por el receptor LPA3. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control) o P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M o P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M + DGPP 100 μ M (antagonista selectivo de LPA3). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados sugieren que las hormonas esteroideas, P4 + E2, estimulan la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre al menos en parte a través del LPA3.

5.3. Regulación de los niveles de mensajero del LPA3 y la Lyso-PLD por las hormonas esteroideas.

Hasta aquí se observó que la incubación con P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M incrementa la tubulogénesis de las células H8 y que esta regulación está mediada en parte por el receptor LPA3. Por lo tanto, se investigó si las hormonas esteroideas regulan la expresión de la Lyso-PLD, la principal enzima involucrada en la síntesis de LPA, y del receptor LPA3. Para ello, las células H8 se incubaron en presencia de P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M por 24 h y luego se determinaron los niveles de mensajero de la Lyso-PLD y del LPA3 mediante la técnica de qRT-PCR.

En primer lugar, se observó que la incubación de las células H8 con P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M estimuló los niveles de mensajero de la Lyso-PLD (Figura 13a), sugiriendo un aumento de los niveles de LPA producidos por esta enzima. Por otro lado, los niveles de mensajero del receptor LPA3 no se modificaron luego del tratamiento con las hormonas (Figura 13b).

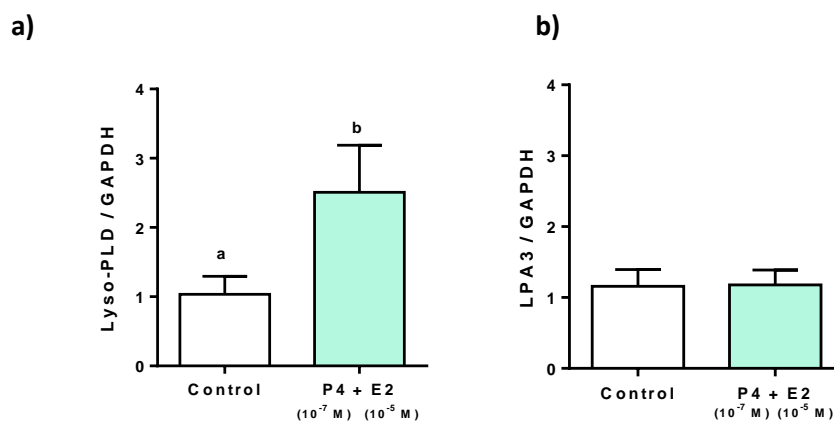


Figura 13. La P4 y el E2 aumentan el nivel de mensajero de Lyso-PLD y no modifican el de LPA3. Las células trofoblásticas H8 se sembraron y se incubaron con medio sin suplementar (control) o con P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M por 24 h. Los niveles del ARNm de (a) Lyso-PLD y (b) LPA3 se determinaron por la técnica de qRT-PCR. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Estos resultados sugieren que la P4 y el E2 aumentan la producción de LPA en la interfase materno-fetal, el cual al unirse al receptor LPA3 estimula la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre.

6. MEDIADORES INVOLUCRADOS EN EL EFECTO DEL LPA SOBRE LA ANGIOGENESIS DEL TROFOBlasto HUMANO DE PRIMER TRIMESTRE.

Previamente en nuestro laboratorio observamos que el LPA mediante la unión al receptor LPA3 actúa como una molécula pro-implantatoria, aumentando en el útero de rata la producción de PGE2 y de NO, dos importantes mediadores de la angiogénesis en el sitio de implantación (Sordelli y col., 2012; Beltrame y col., 2013). Además, en este sistema experimental observamos que, el LPA aumenta la expresión de IL-10, una conocida citoquina mediadora de procesos vasculares, a través de la COX-2 y de iNOS (Beltrame y col., 2013).

Por lo tanto, dado que el LPA promueve la angiogénesis *in vitro* del trofoblasto humano de primer trimestre, decidimos investigar si alguna de estas vías estaba involucrada en su efecto.

Por ello, se estudió la participación de los siguientes mediadores sobre la angiogénesis del trofoblasto inducida por LPA:

6.1. PROSTAGLANDINAS Y ÓXIDO NÍTRICO.

6.1.1. Prostaglandinas.

Para investigar si las PGs modulan el efecto del LPA sobre la vascularización del trofoblasto, las células H8 se incubaron con LPA 10 μ M por 6 h en presencia o ausencia de un inhibidor no selectivo de las enzimas COX-1 y 2 (indometacina 10 μ M), o un inhibidor selectivo de la COX-2 (NS-398 1 μ M). Las concentraciones de indometacina y NS-398 se seleccionaron en base a resultados previos del laboratorio (Beltrame y col., 2013).

La co-incubación de LPA 10 μ M con indometacina o con NS-398 revirtió el efecto estimulador del LPA sobre la formación de vasos a niveles semejantes a los controles (Figura 14).

Este resultado sugiere que las PGs producidas por la isoforma COX-2 median el efecto del LPA sobre la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

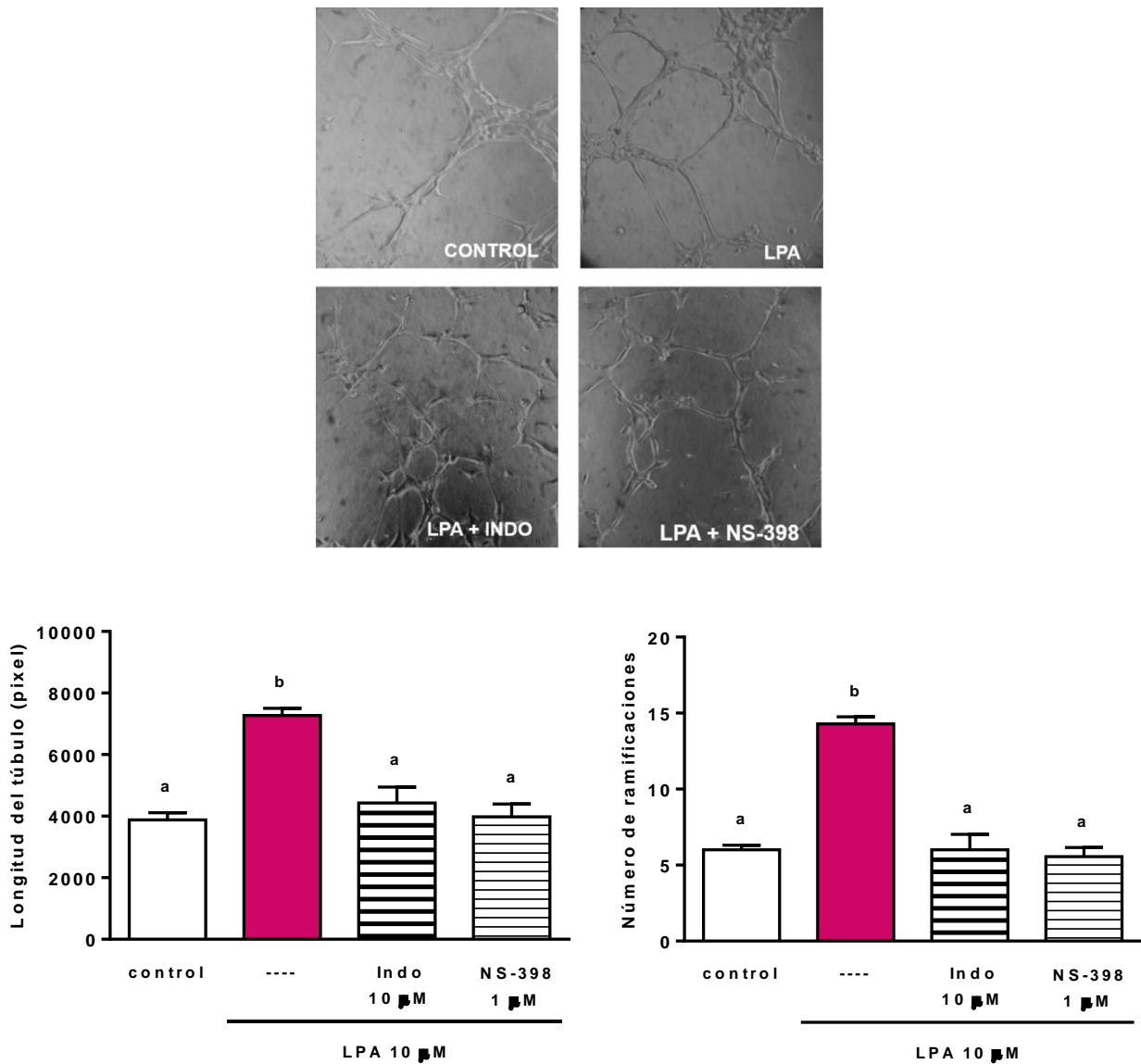


Figura 14. La COX-2 participa de la formación de túbulos mediada por LPA en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μM, LPA + indometacina 10 μM (inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2) o LPA + NS-398 1 μM (inhibidor selectivo de COX-2). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Cuando se estudió el efecto de la indometacina y del NS-398 sobre la formación basal de los túbulos, se observó que ninguno de los inhibidores presenta un efecto *per se* en las concentraciones empleadas (Tabla 2).

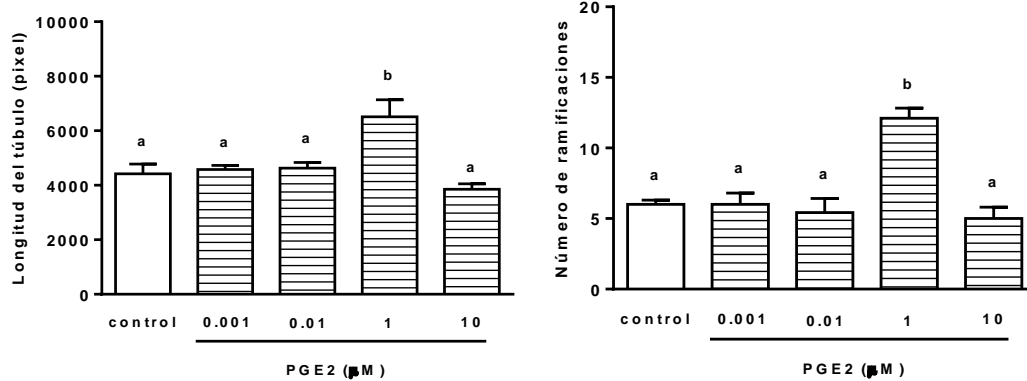
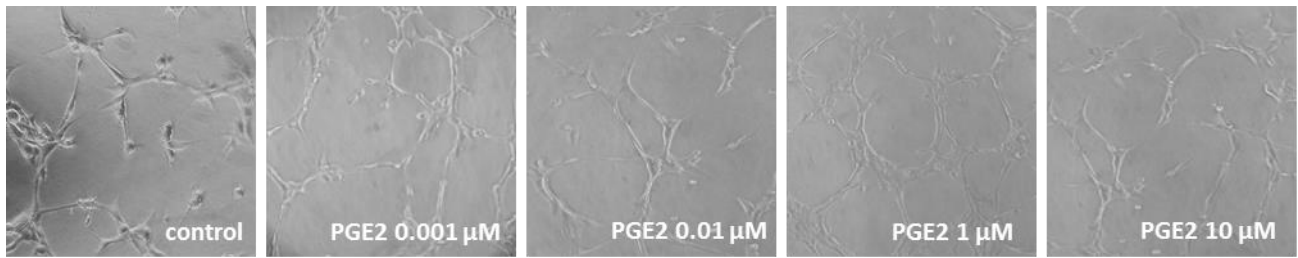
| | Longitud del túbulo. | Número de ramificaciones. |
|---|----------------------|---------------------------|
| Control | 3882 ± 232 | 6.5 ± 0.3 |
| Indometacina Inhibidor no selectivo COX. | 3301 ± 400 | 6.3 ± 0.7 |
| NS-398 Inhibidor selectivo COX-2. | 3293 ± 498 | 5.7 ± 0.7 |

Tabla 2. Las concentraciones utilizadas de los inhibidores de COX no presentan un efecto sobre la formación basal de túbulos en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h con indometacina 10 μ M (inhibidor no selectivo de COX-1 y COX-2) o NS-398 1 μ M (inhibidor selectivo de COX-2). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Por lo tanto, el paso siguiente fue estudiar el efecto de las prostaglandinas *per se* sobre la angiogénesis del trofoblasto. Para ello, las células se incubaron con diferentes concentraciones de PGE2 o PGF2 α por 6 h y se cuantificó la formación de vasos. La PGE2 presentó un efecto concentración-respuesta incrementando la formación de túbulos en la concentración de 1 μ M (Figura 15a). Por su parte, la PGF2 α no estimuló la formación de túbulos en ninguna de las concentraciones testeadas (Figura 15b).

Estos resultados sugieren que al menos la PGE2 proveniente de la vía de la COX-2 podría ser la PGs involucrada en el efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

a)



b)

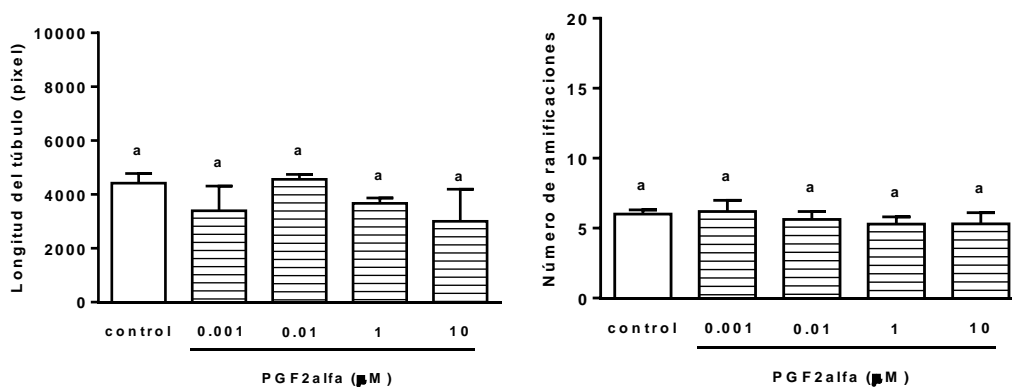
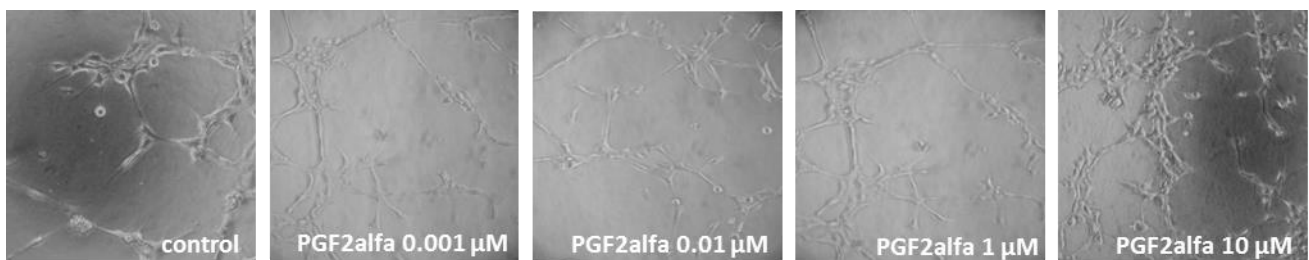


Figura 15. La PGE2, y no la PGF2α, estimula la tubulogénesis de forma concentración dependiente en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), o (a) PGE2 (0.001 – 10 μM) o (b) PGF2α (0.001 – 10 μM). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

6.1.2. Óxido nítrico.

Como ya mencionamos en la introducción, el NO es un mediador gaseoso que participa del remodelado vascular en diferentes sistemas experimentales. Además, resultados previos del laboratorio muestran que el LPA aumenta la actividad de la iNOS en el útero de rata preñada (Beltrame y col., 2013).

Estudiamos entonces, si la vía del NO participa del efecto del LPA sobre el trofoblasto. Para ello, las células se incubaron por 6 h con LPA en presencia o ausencia de un inhibidor no selectivo de las isoformas de la NOS (L-NAME 10 μ M) o un inhibidor selectivo para la isoforma iNOS (1400W 10 μ M).

La co-incubación de LPA 10 μ M con los inhibidores utilizados revirtió el efecto estimulador del LPA sobre la formación de túbulos a niveles semejantes a los controles, indicando que la iNOS también media el efecto del LPA sobre la angiogénesis de las células trofoblásticas H8 (Figura 16).

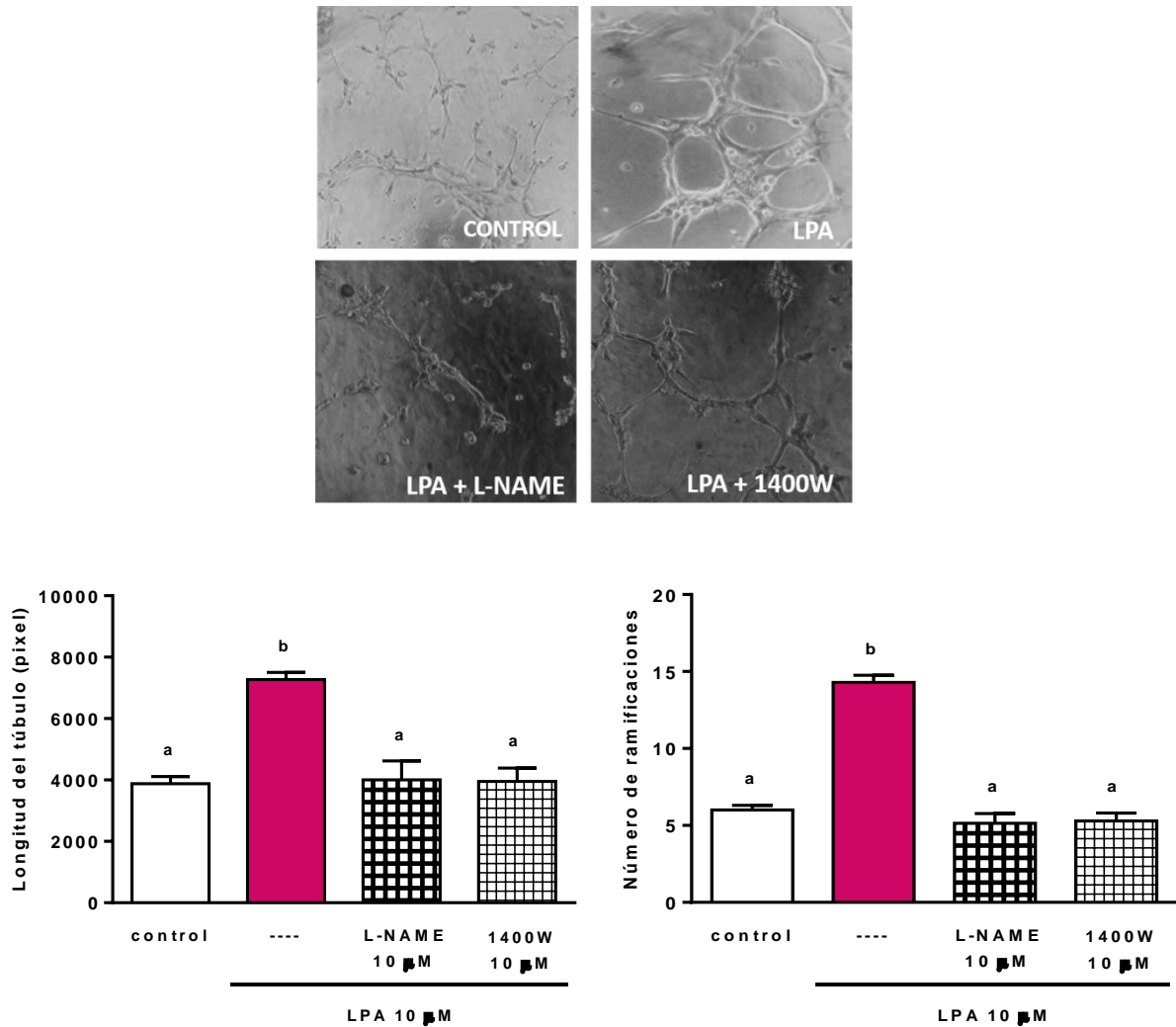


Figura 16. La iNOS participa de la formación de túbulos inducida por LPA en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μ M, LPA + L-NAME 10 μ M (inhibidor no selectivo de las NOS) o LPA + 1400W 10 μ M (inhibidor selectivo de iNOS). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Cuando se estudió el efecto de los inhibidores *per se*, se observó que ninguno presentó un efecto sobre la formación de túbulos basal en las concentraciones empleadas (Tabla 3).

| | Longitud del túbulo. | Número de ramificaciones. |
|---|----------------------|---------------------------|
| Control. | 3882 ± 232 | 6.5 ± 0.3 |
| L-NAME Inhibidor no selectivo NOS. | 3525 ± 150 | 6.1 ± 0.7 |
| 1400 W Inhibidor selectivo iNOS. | 3545 ± 251 | 6.2 ± 0.6 |

Tabla 3. Los inhibidores de NOS en las concentraciones empleadas no presentan un efecto sobre la tubulogénesis basal de la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h con L-NAME 10 μ M (inhibidor no selectivo de las NOS) o 1400W 10 μ M (inhibidor selectivo de iNOS). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Luego, se estudió si el NO regulaba la tubulogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. Para ello, las células H8 se incubaron por 6 h con un dador lento de óxido nítrico (SNAP 0.001 a 100 μ M).

La liberación de NO por el SNAP presentó un efecto concentración-dependiente y estimuló de manera significativa la longitud de los túbulos y el número de ramificaciones en concentraciones de 0.1 y 1 μ M ($p < 0.05$) (Figura 17).

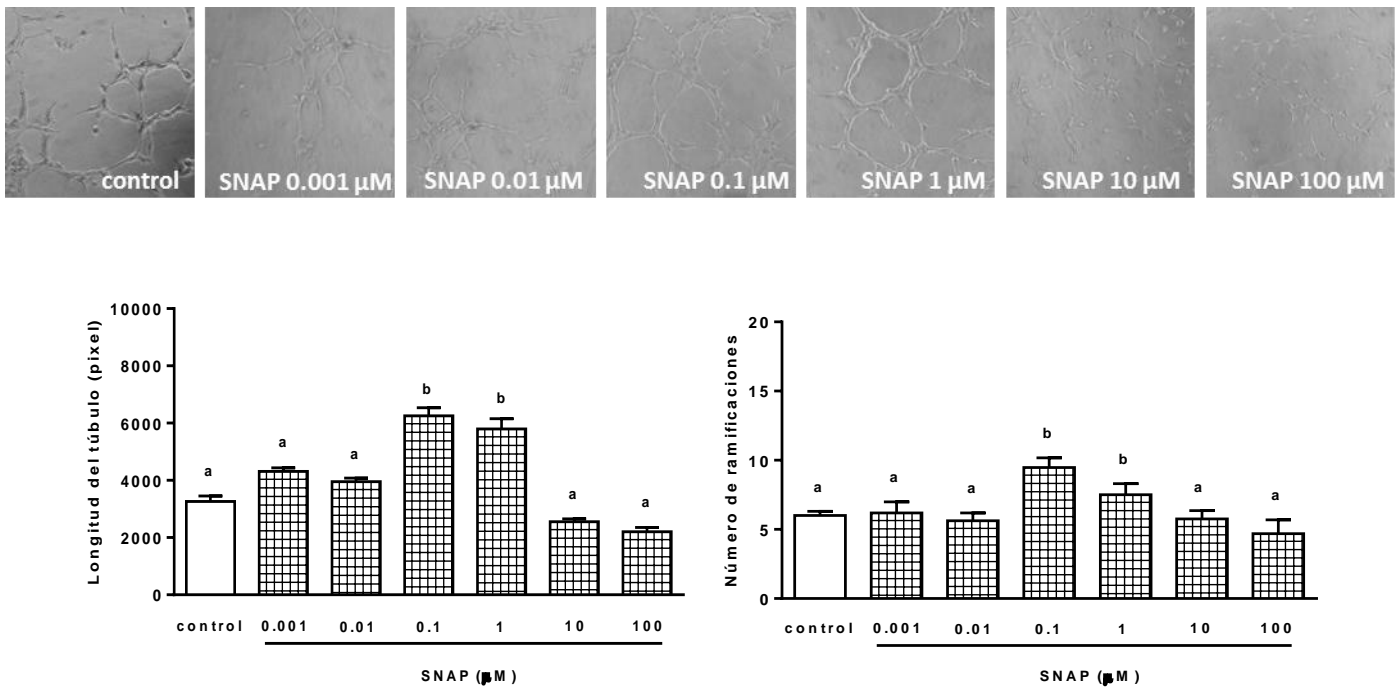


Figura 17. El SNAP, un dador de NO, estimula la formación de túbulos de forma concentración dependiente en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control) o SNAP, un dador lento de óxido nítrico (0.001 - 100 μM). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados sugieren que el NO producido por la iNOS media el efecto estimulador del LPA sobre la formación de los túbulos en el trofoblasto humano de primer trimestre.

6.1.3. Rescate de la inhibición ejercida por NS-398 y 1400W sobre la angiogénesis inducida por LPA mediante la incubación con PGE2 y NO.

Con el objetivo de corroborar si la PGE2 y el NO producidos por las vías de la COX-2 y la iNOS, son posibles mediadores responsables del efecto del LPA, llevamos adelante un diseño experimental que denominamos "rescate lineal". Para ello, las células H8 fueron tratadas como se detalla en la Figura 18. En primer lugar, las células se incubaron con LPA solo, LPA + NS-398 o LPA + 1400W. Luego de 6 h, momento en el que se observa la formación de la red tubular, se removió el sobrenadante de cultivo, y las células H8 se incubaron por 18 h con LPA solo, PGE2 o SNAP respectivamente. Luego se evaluó el estado de la red tubular mediante la determinación de la longitud de los túbulos y el número de ramificaciones formadas. Se observó que la incubación con PGE2 o SNAP (el dador lento de NO) revirtió el efecto de los inhibidores selectivos de COX-2 e iNOS respectivamente sobre el efecto estimulador del LPA ($p < 0.05$) (Figura 18).

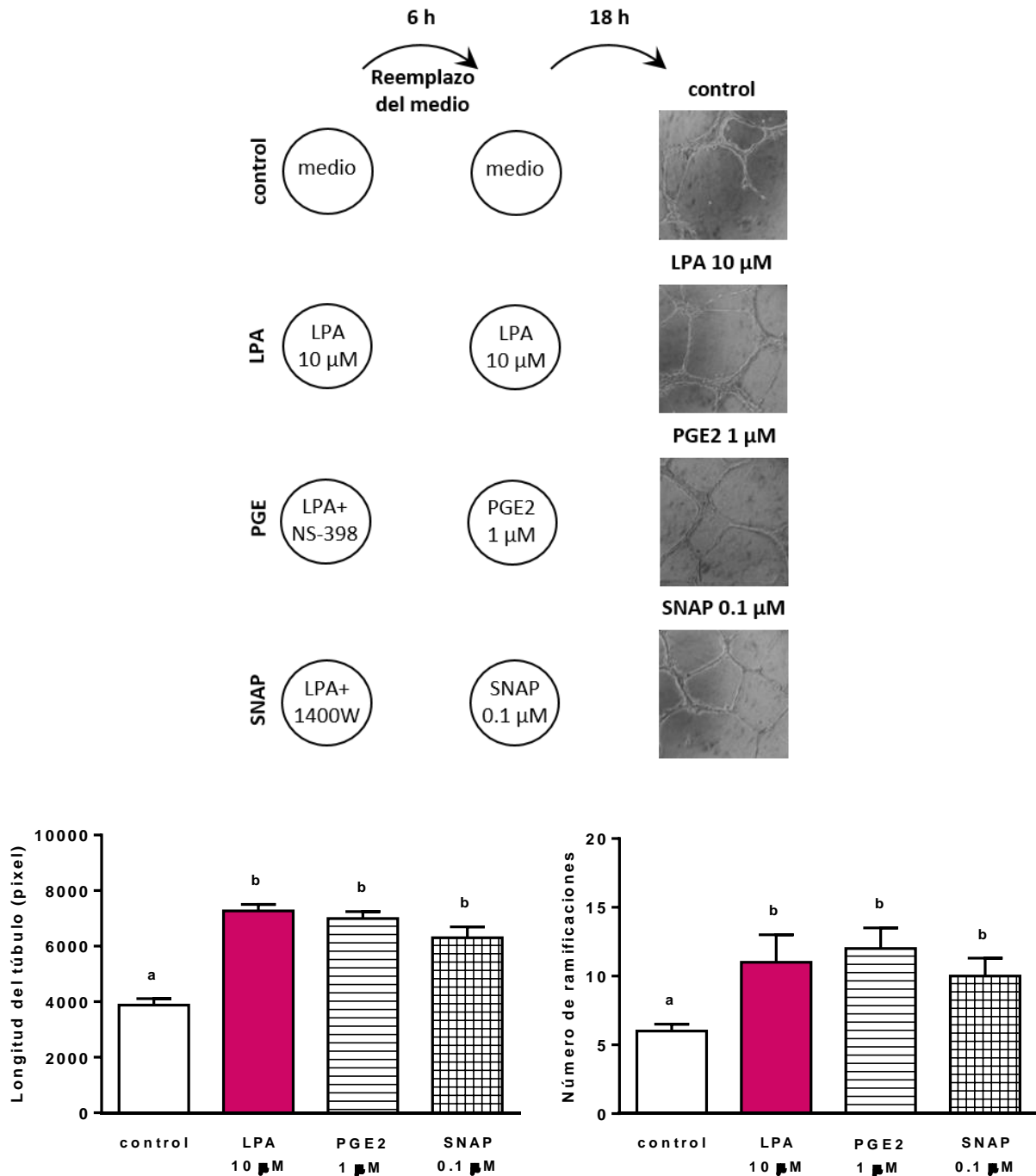


Figura 18. La PGE2 y el SNAP rescatan la inhibición de NS-398 y 1400W durante la tubulogénesis inducida por LPA en la línea H8. El esquema representa el diseño experimental del rescate lineal. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μ M, LPA + NS-398 1 μ M, o LPA + 1400W 10 μ M. Se removieron los sobrenadantes y se incubaron por 18 h con LPA 10 μ M, PGE2 1 μ M o SNAP 0.1 μ M respectivamente. Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Para descartar que este resultado fuera una consecuencia del lavado de los inhibidores (efecto conocido como “wash out”), las células se incubaron con LPA solo o en presencia de los inhibidores de COX-2 e iNOS por 6 h. Luego de remover el medio, todas las células se incubaron con LPA por 18 h más (Figura 19). Se observó que el rescate producido por la PGE2 y el SNAP no era efecto del lavado de los inhibidores, ya que el LPA no pudo sobrepasar la inhibición inicial ejercida por los inhibidores selectivos de COX-2 e iNOS (Figura 19).

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que al menos la PGE2 proveniente de la vía de la COX-2 y el NO sintetizado por la iNOS median el efecto estimulador del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

6.1.4. El NO es el último efector en la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre inducida por LPA.

Luego, se decidió investigar que mediador, PGE2 o NO, se activaba primero en la vía del LPA. Para ello, en un diseño experimental que se denominó “rescate cruzado”, las células que habían sido incubadas por 6 h con LPA solo, LPA + NS-398 o LPA + 1400W, se incubaron por 18 h más con LPA solo, SNAP o PGE2 respectivamente (Figura 20).

Mientras que la incubación con SNAP, un dador lento de NO, revirtió el efecto inhibitorio del NS-398 (inhibidor selectivo de COX-2) sobre la formación de túbulos ($p < 0.05$), la incubación con PGE2 no modificó la inhibición generada por el 1400W (inhibidor selectivo de iNOS) sobre el efecto estimulador del LPA (Figura 20).

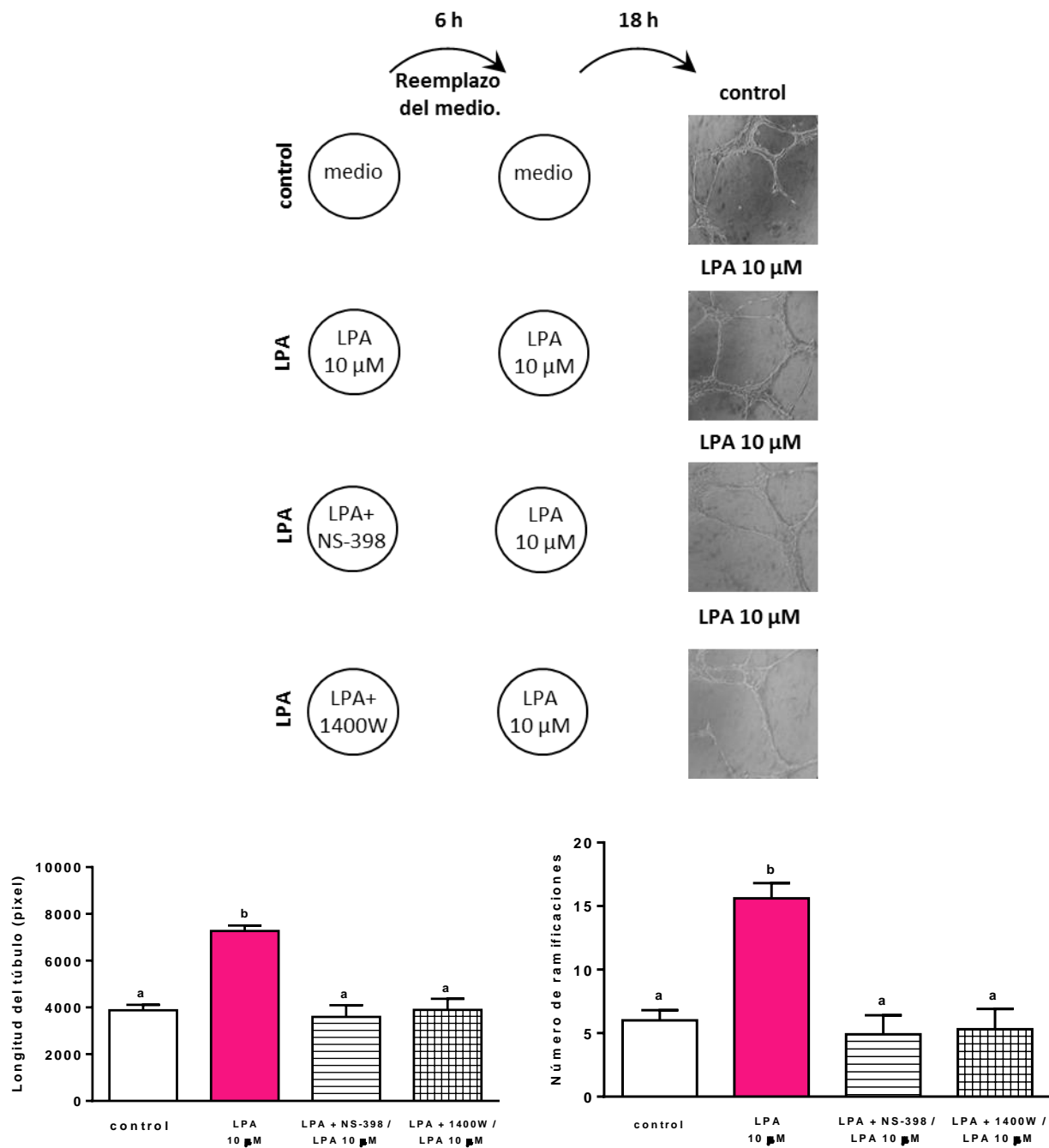


Figura 19. El LPA no rescata la inhibición de NS-398 y 1400W durante la tubulogénesis inducida por LPA en la línea celular H8. El esquema representa el diseño experimental. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μ M, LPA + NS-398 1 μ M, o LPA + 1400W 10 μ M. Se removieron los sobrenadantes y se incubaron por 18 h más con LPA 10 μ M. Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

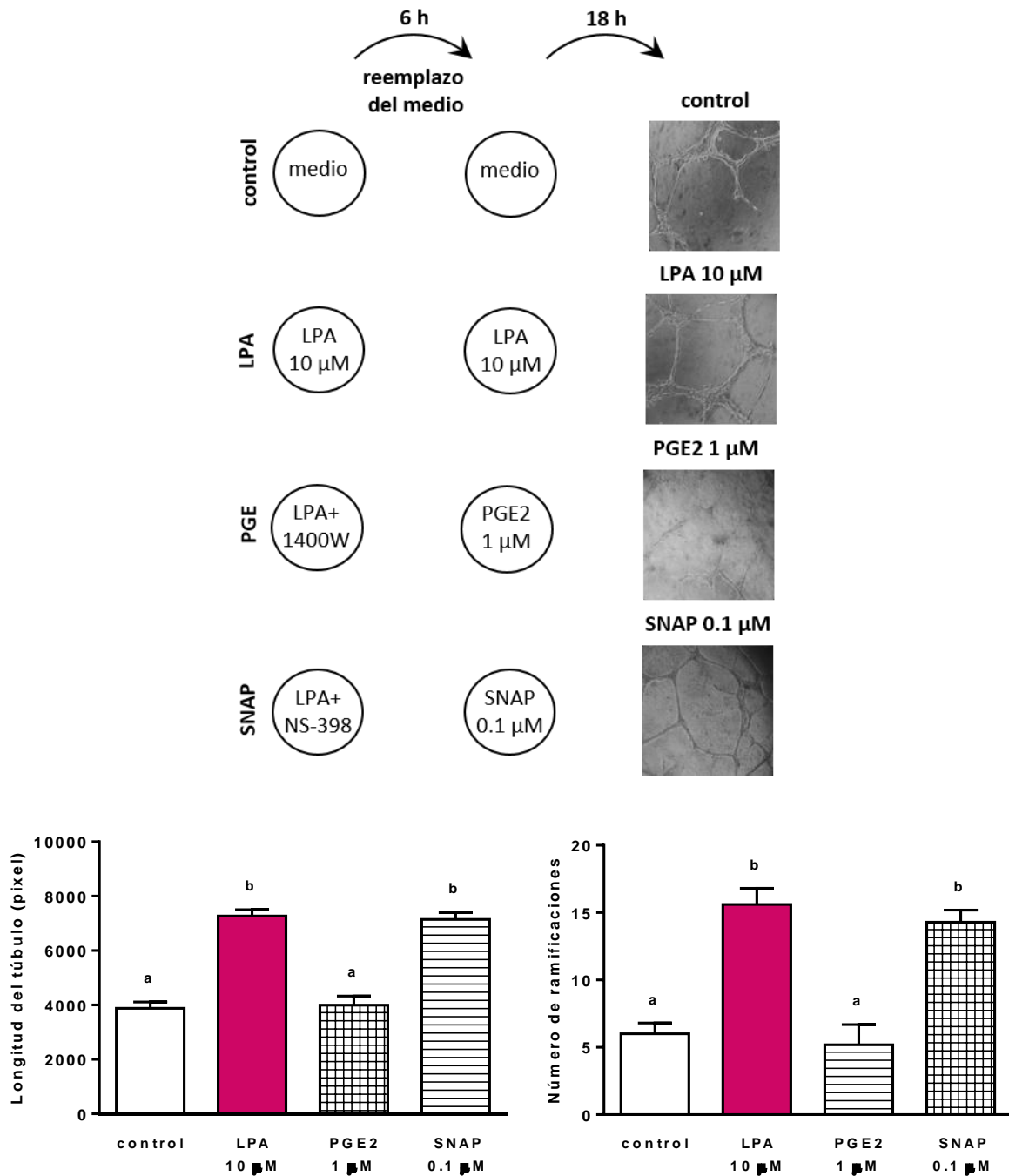


Figura 20. La COX-2 es estimulada río arriba de iNOS durante la tubulogénesis inducida por LPA en la línea celular H8. El esquema representa el diseño experimental del rescate cruzado. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μ M, LPA + 1400W 10 μ M o LPA + NS-398 1 μ M. Se removieron los sobrenadantes y se incubaron por 18 h más con LPA 10 μ M, PGE2 1 μ M o SNAP 0.1 μ M respectivamente. Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados indican que el NO es el último efector en la cascada de señalización que induce el LPA durante la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre. De esta manera, el LPA a través del receptor LPA3 activaría una cascada de segundos mensajeros que regulan, en primer lugar, a la enzima COX-2 con la consecuente producción de al menos PGE2. Esta, a su vez estimularía la vía de la iNOS promoviendo finalmente la adquisición del fenotipo endovascular en el trofoblasto humano de primer trimestre.

6.1.5. Estudio de la expresión de COX-2 e iNOS en el trofoblasto humano de primer trimestre.

Dado que anteriormente observamos que la vía de la COX-2 y de la iNOS participan de la inducción generada por el LPA sobre el trofoblasto de primer trimestre, decidimos investigar la localización de estas isoformas en la línea H8.

Observamos que la COX-2 (Figura 21a) y la iNOS (Figura 21b) se expresan en el núcleo de las células H8, y la incubación con LPA 10 μ M no modifica su localización. Además, se observó una acumulación nuclear de la marca correspondiente a estos mediadores luego de la incubación con LPA 10 μ M.

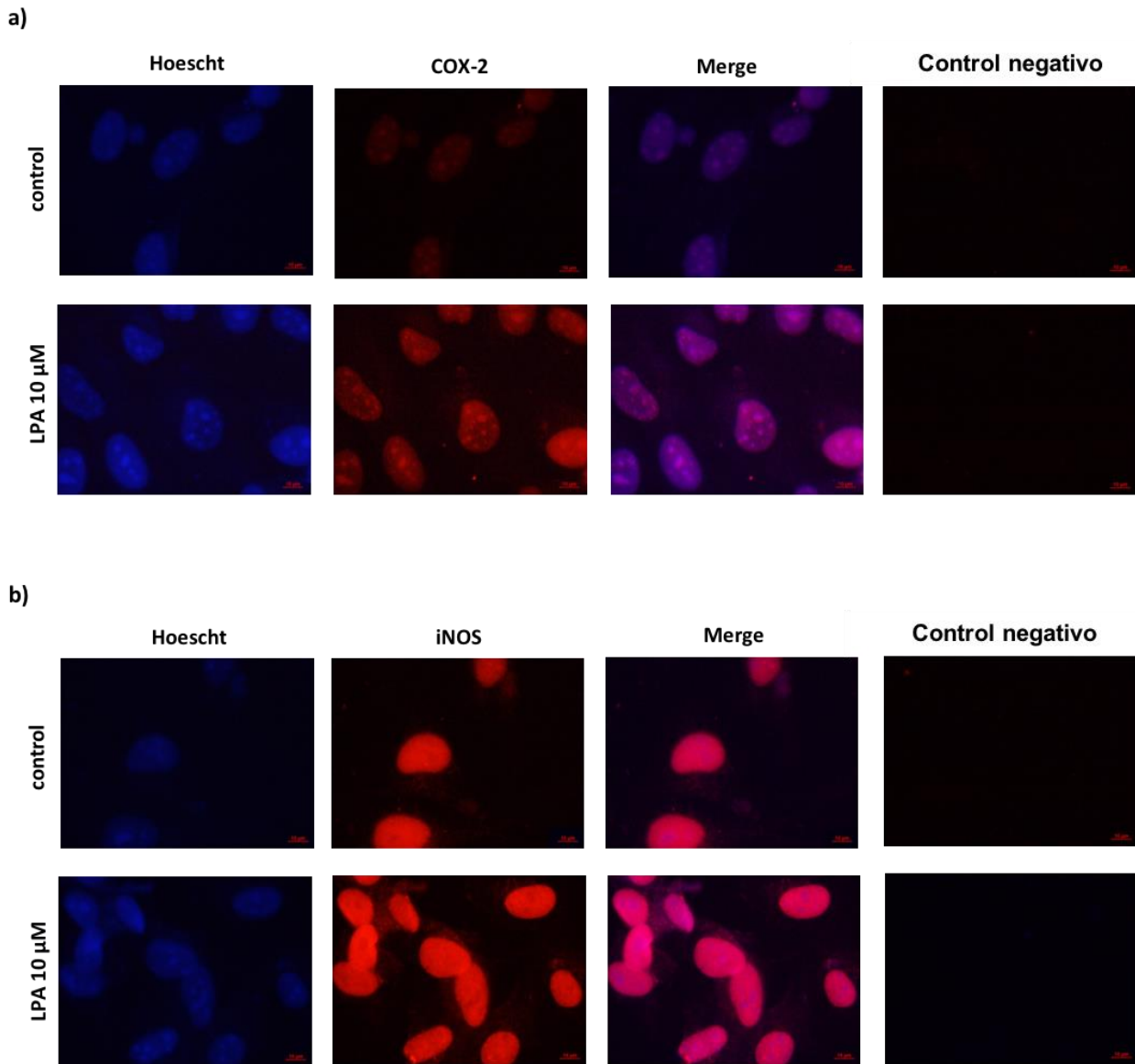


Figura 21. La COX-2 y la iNOS se localizan en el núcleo de las células H8. Las células H8 fueron incubadas por 6 h con LPA 10 μ M y marcadas para (a) COX-2 (1:100) o (b) iNOS (1:100) por inmunofluorescencia. La inmunoreactividad específica fue determinada al omitir el primer anticuerpo (control negativo). Se muestran figuras representativas (escala de la barra: 10 μ m). Los núcleos se tiñeron mediante una coloración con Hoescht (azul). La señal roja corresponde a COX-2 e iNOS. En los paneles de merge se observa la superposición del azul y el rojo. El experimento fue realizado por triplicado.

Dado que a través del ensayo de “rescate cruzado” se demostró que el NO es el último efector en la vía del LPA y que, además, se observó que la iNOS es la isoforma de NOS involucrada en el efecto del LPA sobre la angiogénesis del trofoblasto, se decidió investigar si el LPA modulaba la expresión proteica de la iNOS en la línea H8.

Para ello, las células se incubaron con LPA 10 μ M durante 24 h y se determinó los niveles proteicos de la iNOS por western blot.

Se observó una banda de 130 KDa, la cual mediante la utilización de marcadores de peso molecular y controles positivos y negativos, se determinó que correspondía a iNOS. A su vez, se observó que la incubación con LPA 10 μ M aumentó de manera significativa los niveles proteicos de esta isoforma de la NOS con respecto a los controles ($p < 0.05$) (Figura 22).

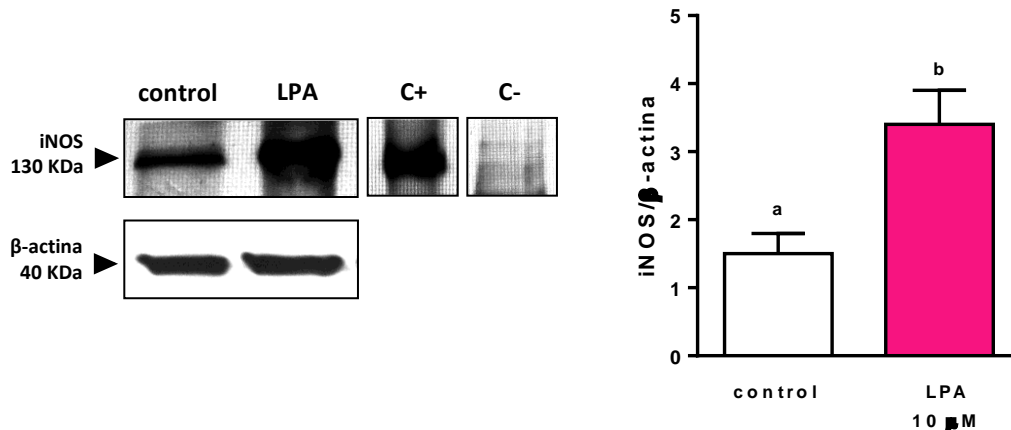


Figura 22. El LPA incrementa los niveles proteicos de iNOS en la línea celular H8. La expresión proteica de iNOS fue detectada mediante la técnica de Western Blot. Las proteínas se extrajeron y se separaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante un anticuerpo específico contra iNOS (1:150). La figura es representativa de 3 experimentos independientes y se muestran las bandas correspondientes a iNOS y β -actina. C+: control positivo (útero de ratón tratado con lipopolisacárido), C-: control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

6.2. Estudio del efecto del LPA sobre los niveles de VEGF-A y citoquinas vasculares.

Los resultados descritos en la sección anterior indican que el LPA promovería la adquisición del fenotipo vascular del trofoblasto humano de primer trimestre incrementando la producción de conocidos mediadores del proceso angiogénico como la PGE2 y el NO.

Durante el remodelado vascular que tiene lugar en la interfase materno-fetal, el trofoblasto atraviesa una serie de cambios moleculares y bioquímicos que lo preparan para poder reemplazar las células endoteliales y tapizar las paredes de las arterias espiraladas.

Por lo tanto, se decidió evaluar si el LPA podría estar regulando también los niveles proteicos de un reconocido factor vascular que participa en procesos angiogénicos, como es el VEGF-A. Para ello, las células

H8 se incubaron con LPA 10 μ M por 24 h y se determinaron los niveles proteicos de VEGF-A mediante la técnica de western blot.

Se observó que la incubación de las células H8 con LPA no produjo cambios significativos en la expresión de VEGF-A (Figura 23).

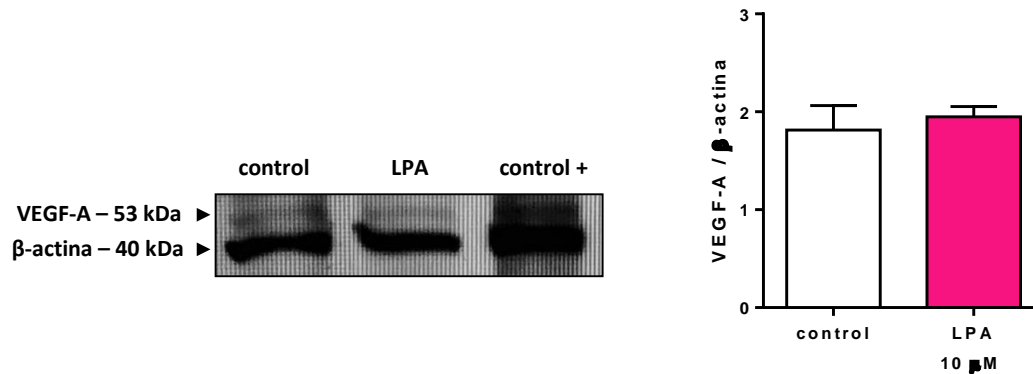


Figura 23. El LPA no modula los niveles proteicos de VEGF-A en la línea celular H8. La expresión proteica de VEGF-A fue detectada mediante la técnica de western blot. Las proteínas se extrajeron y se separaron por SDS-PAGE y se detectaron mediante un anticuerpo específico contra VEGF-A (1:500). La figura es representativa de 3 experimentos independientes y se muestran bandas correspondientes a de VEGF-A y β -actina. C+: control positivo (aorta de rata), C-: control negativo, se omitió el anticuerpo primario.

Previamente observamos que el LPA aumenta la expresión de IL-10 en el útero de rata durante la implantación (Beltrame y col., 2013). Además, describimos que las vías de la COX-2 y la iNOS participan de este efecto. Por otro lado, las células del trofoblasto son capaces de producir un amplio espectro de citoquinas relacionadas con el proceso de angiogénesis como el VEGF, la IL-8 y la IL-10 (Lin y col., 2006; Chen y col., 2008, 2010; Knöfler, 2010). Dado que las citoquinas con funciones vasculares han sido descritas como importantes mediadoras de los cambios angiogénicos que tienen lugar en la interfase materno-fetal, se decidió investigar el efecto del LPA sobre la expresión de algunas de estas citoquinas, así como su participación en la estimulación que ejerce este mediador lipídico sobre la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre.

En primer lugar, se evaluó si el LPA modulaba la expresión de algunas citoquinas mediadoras de la angiogénesis en las células H8. Para ello, las células H8 se incubaron con LPA 10 μ M por 24 h y se determinaron los niveles de mensajero de IL-6, IL-8 y VEGF-C mediante la técnica de qRT-PCR. Se puso a punto la temperatura de melting y la eficiencia de los primers para realizar el análisis de los datos obtenidos mediante $\Delta\Delta$ Ct usando a GAPDH como gen constitutivo.

La incubación con LPA 10 μ M estimuló la expresión del mensajero de IL-6 en comparación con el control ($p < 0.05$), mientras que no modificó los niveles de mensajero de IL-8 ni de VEGF-C (Figura 24).

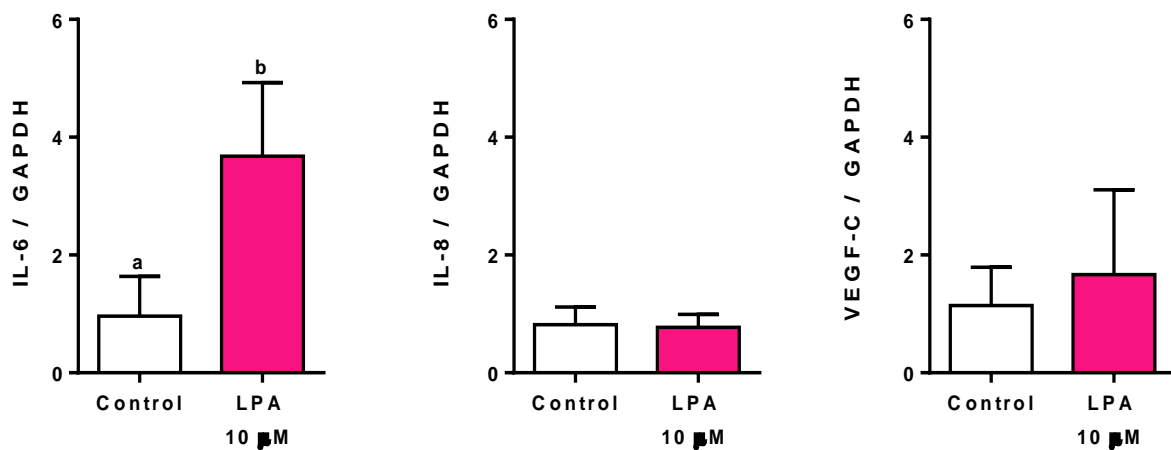


Figura 24. El LPA incrementa la expresión del ARNm de IL-6 y no modifica la de IL-8 y VEGF-C en la línea celular H8. Las células trofoblásticas H8 se sembraron y se incubaron con medio sin suplementar (control) o con LPA 10 μ M por 24 h. Los niveles del ARNm se determinaron por la técnica de qRT-PCR. Los resultados representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

6.2.1. Participación de IL-6 en el efecto del LPA sobre la formación de túbulos en la línea celular H8.

Dado que el LPA estimuló los niveles de mensajero de IL-6, postulamos que esta citoquina podría estar mediando el efecto del LPA sobre la formación de túbulos por parte del trofoblasto. Por lo tanto, las células H8 se incubaron con LPA 10 μ M por 6 h en presencia de un anticuerpo neutralizante de IL-6 y se determinó la tubulogénesis mediante la cuantificación de la longitud de los túbulos y el número de ramificaciones formadas.

Se observó que la presencia del anticuerpo neutralizante de IL-6 en el medio de incubación revirtió el efecto estimulador del LPA sobre la formación de los túbulos en las células H8 ($p < 0.05$) (Figura 25).

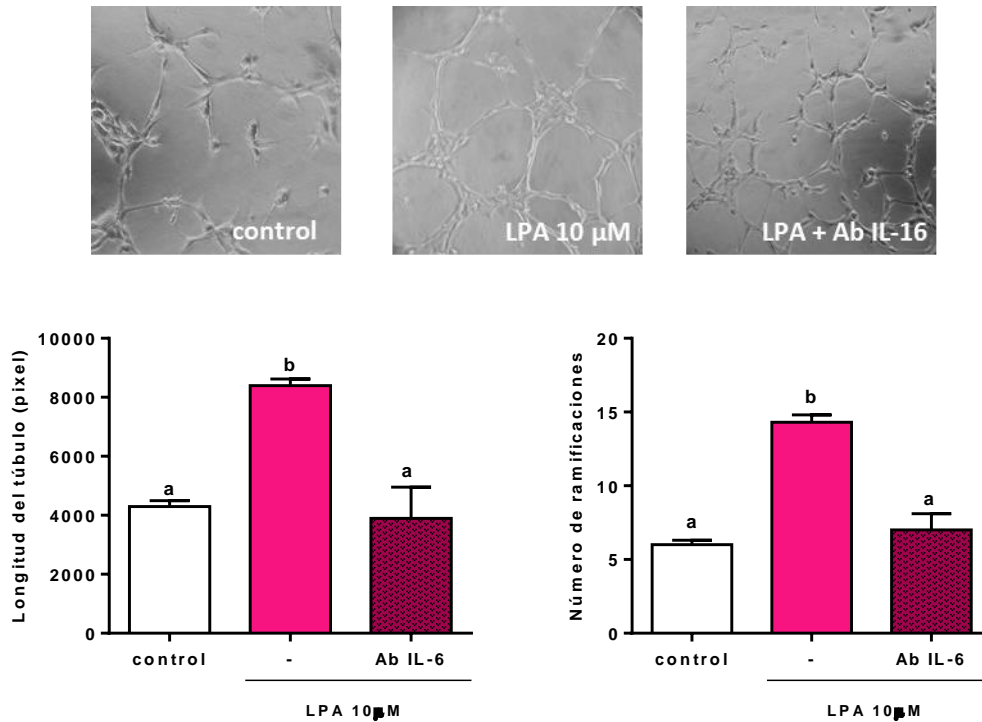


Figura 25. La IL-6 participa de la formación de túbulos inducida por LPA en la línea celular H8. Las células H8 se sembraron sobre un extracto de matriz extracelular (Geltrex) y se incubaron por 6 h en presencia de medio sin suplementar (control), LPA 10 μM, LPA + Ab IL-6 10 μM (anticuerpo neutralizante de IL-6). Se muestran figuras representativas (10x). Se determinó la longitud de los túbulos formados y el número de ramificaciones. Los resultados representan la media ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido entre 4-6 veces.

Estos resultados sugieren que durante el remodelado vascular inducido por LPA, se estimula la liberación de IL-6 la cual actuaría en forma autocrina o paracrina sobre las propias células trofoblásticas.

Hasta aquí se demostró que el LPA estimula la formación de túbulos en el trofoblasto humano de primer trimestre indicando una regulación de la angiogénesis en la interfase materno fetal. Este proceso, además de estar mediado por las vías de la COX-2 y la iNOS, involucra la participación de la IL-6.

7. INTERACCIÓN DEL TROFOBlasto CON LAS CÉLULAS ENDOTELIALES.

La interacción entre distintos tipos celulares en la interfase materno-fetal es crucial durante la implantación embrionaria y para el mantenimiento de la gestación. Durante el remodelado de las arterias espiraladas, el trofoblasto cambia de un fenotipo invasor a uno endotelial, migra a través de la decidua, y reemplaza las células endoteliales de estos vasos. Mediante este proceso transforma las arterias espiraladas en sacos sinusoidales flácidos que potencian la llegada de nutrientes y oxígeno al embrión en crecimiento, sin alterar el estrés oxidativo vascular o la respuesta inflamatoria decidual. Por lo tanto, la interacción entre el trofoblasto y la decidua, y entre el trofoblasto y el endotelio, es fundamental para el control de la invasión y el remodelado vascular durante esta etapa de la gestación.

Decidimos entonces, investigar si la adquisición del fenotipo vascular del trofoblasto inducido por LPA, modula a su vez el comportamiento de las células endoteliales. Para investigar la respuesta de las células endoteliales, decidimos estudiar la regulación del proceso de migración celular.

7.1. Ensayo de migración por herida en células endoteliales EA.hy926.

En primer lugar, se estudió la regulación de la migración de las células endoteliales por parte del trofoblasto humano de primer trimestre. Para ello, se obtuvieron medios condicionados a partir de sobrenadantes de ensayos de tubulogénesis con las células trofoblásticas H8 tratadas bajo diferentes condiciones experimentales, y se incubaron con células endoteliales (línea EA.hy926). Se determinó la capacidad migratoria de las células EA.hy926 mediante el ensayo de cierre de herida. Se utilizó medio sin suplementar como control negativo.

Los sobrenadantes provenientes de ensayos de tubulogénesis de las células trofoblásticas estimularon la migración de las células endoteliales con respecto al control negativo ($p < 0.05$) (Figura 26). En particular, se observó que los sobrenadantes provenientes de los ensayos de tubulogénesis incubados con LPA 10 μM indujeron la migración de las células endoteliales no solo con respecto al control negativo sino también respecto a los medios condicionados control ($p < 0.05$) (Figura 26). Estos resultados sugieren por un lado que la adquisición del fenotipo endotelial por parte del trofoblasto podría modular el comportamiento de las células endoteliales y que además, el LPA estimularía la liberación de sustancias que favorecen esta modulación.

La incubación con LPA 10 μM estimuló la migración de las células endoteliales, pero solo a niveles semejantes a los de los medios condicionados controles, sugiriendo que se necesita de la adquisición del fenotipo endotelial estimulado por LPA por parte del trofoblasto para inducir la liberación de sustancias al medio extracelular que estimulen la migración de las células endoteliales.

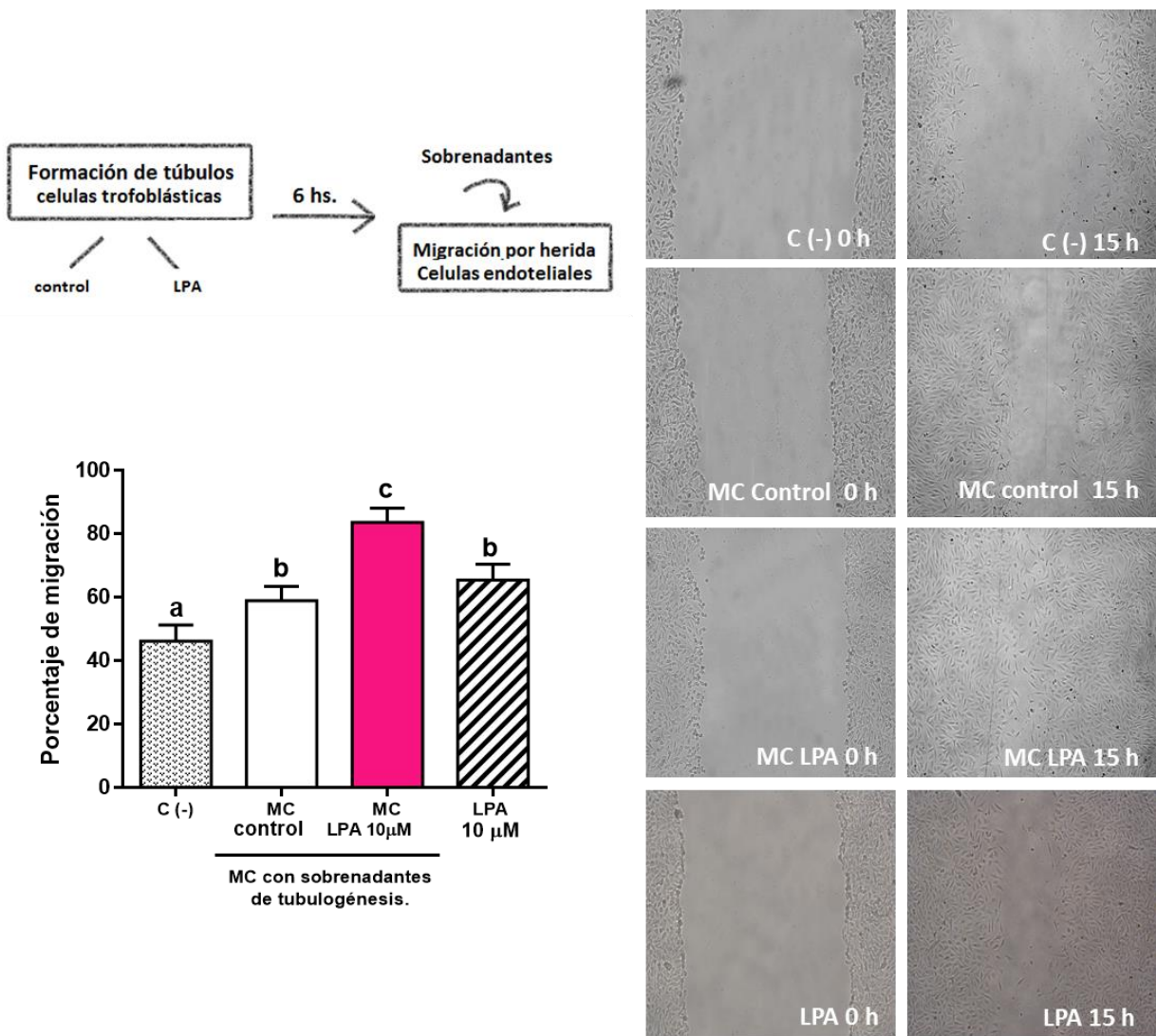


Figura 26. Los sobrenadantes provenientes de ensayos de tubulogénesis en presencia de LPA estimulan la migración de las células endoteliales EA.hy926. Las células EA.hy926 se incubaron con medio sin suplementar (control negativo), o con sobrenadantes de ensayos de tubulogénesis (6 h) controles, tratados con LPA 10 µM, o directamente con LPA 10 µM. Se muestran imágenes representativas (4x) a las 0 y 15 h de incubación. Los resultados expresan el porcentaje de migración o cierre de herida $[(T_0 - T_{18}) * 100] / T_0$ y representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 5 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido 2 veces. C(-): control negativo. MC: medio condicionado.

Nuestra hipótesis se basó en que las células trofoblásticas podrían estar modulando la migración de las células endoteliales mediante la liberación de factores solubles al espacio extracelular durante la adquisición del fenotipo endovascular inducido por LPA. Por lo tanto, evaluamos el aporte de los mediadores anteriormente estudiados en los ensayos de tubulogénesis (PGs, NO, IL-6) sobre la migración de las células endoteliales. Para ello, se utilizaron como medios condicionados los sobrenadantes provenientes de los ensayos de tubulogénesis con LPA + NS-398 (inhibidor selectivo de COX-2) (Figura 27a) o con LPA + 1400W (inhibidor selectivo de iNOS) (Figura 27a) o con LPA + Ab IL-6 (Figura 27b).

En primer lugar, se observó que los sobrenadantes provenientes de los ensayos de tubulogénesis incubados con LPA + el inhibidor selectivo de COX-2 (NS-398) inhibe la inducción de la migración de las células endoteliales a valores semejantes a los controles ($p < 0.05$) (Figura 27a). Este resultado indica que bajo el efecto del LPA es necesaria la liberación de factores solubles que dependen de la vía de la COX-2 por parte del trofoblasto para inducir la migración de las células endoteliales.

Se observó además que si bien la iNOS participa de la inducción por LPA de la tubulogénesis del trofoblasto, esta vía no se encuentra involucrada en la regulación de la migración de las células endoteliales (Figura 27a).

Por su parte, los medios condicionados provenientes de ensayos de tubulogénesis co-incubados con LPA + el anticuerpo contra IL-6 estimularon la migración de las células endoteliales con respecto al control negativo ($p < 0.05$), pero no presentaron diferencias con respecto a los medios condicionados controles (Figura 27b). Este resultado sugiere que la inducción de la migración de las células endoteliales luego de la adquisición del fenotipo endotelial inducida por LPA por parte del trofoblasto es mediada por la liberación de IL-6.

Por último, cuando se estudió el efecto del anticuerpo anti IL-6 sobre la migración de las células endoteliales, se observó que no presentó un efecto *per se* en la concentración empleada (Figura 27b).

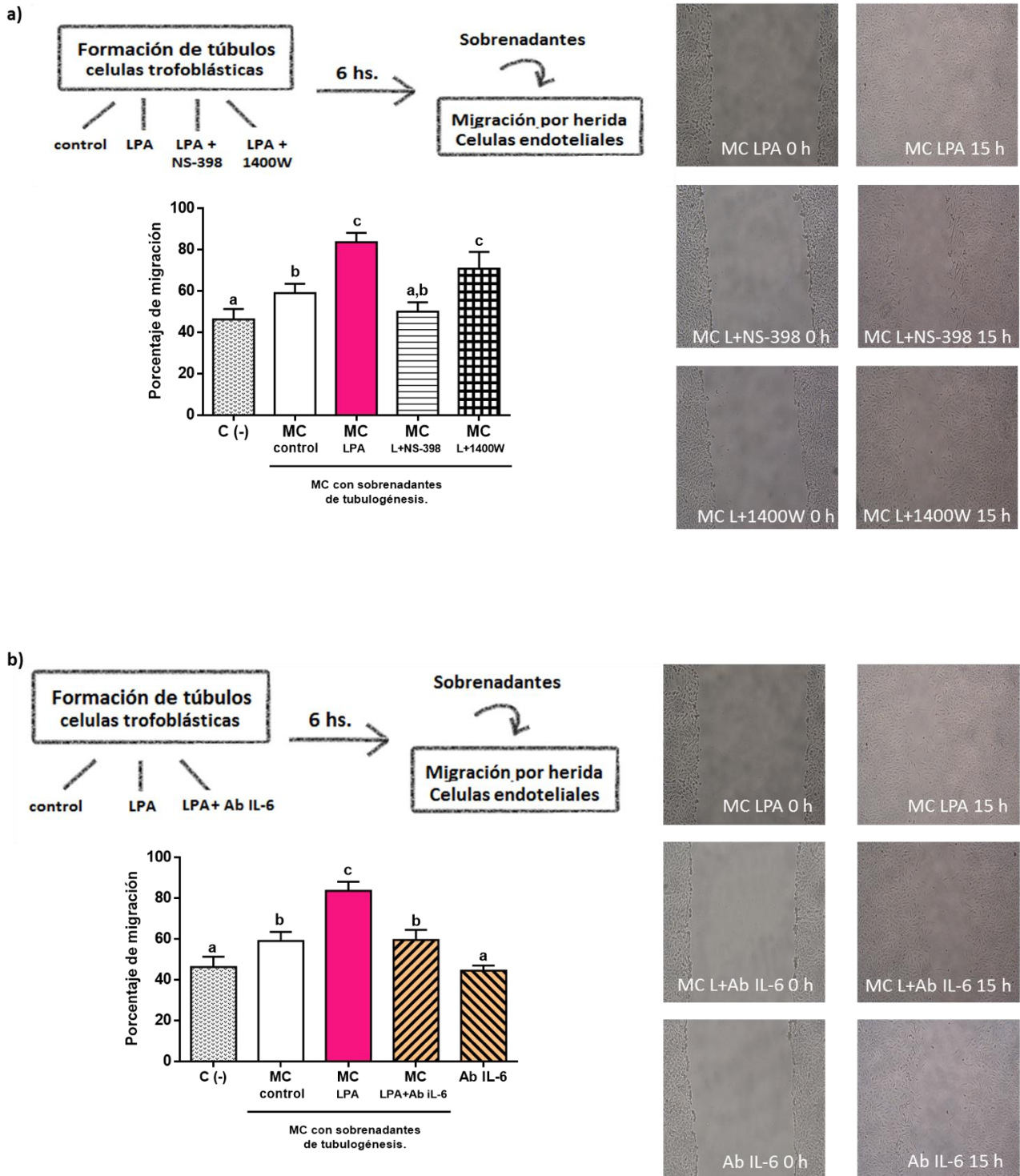


Figura 27. Las vías de la COX-2 y la IL-6 participan de la migración de las células EA.hy926 inducida por las células H8 tratadas con LPA. Las células EA.hy926 se incubaron con medio sin suplementar (control negativo), sobrenadantes de ensayos de tubulogénesis (6 h) controles o con (a) LPA + NS-398 o LPA + 1400W o con (b) LPA + anticuerpo anti IL-6 o directamente el anticuerpo anti IL-6. Se muestran imágenes representativas (4x) a las 0 y 15 h de incubación. Los resultados expresan el porcentaje de migración o cierre de herida $[(T_0 - T_{18}) * 100] / T_0$ y representan la media \pm S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron 5 réplicas por tratamiento, y cada experimento fue repetido 2 veces. C(-): control negativo. MC: medio condiona. Ab: anticuerpo. L:LPA.

Estos resultados indican que durante de la adquisición del fenotipo endotelial inducido por LPA en el trofoblasto humano de primer trimestre, se liberarían factores solubles al espacio extracelular que median el proceso de migración de las células endoteliales como parte de la interacción entre el trofoblasto y el endotelio, lo cual es fundamental para el control de la invasión del trofoblasto y del remodelado vascular durante las primeras etapas de la gestación.

8. ROL DEL RECEPTOR LPA3 EN LA ANGIOGÉNESIS DE LA INTERFASE MATERNO-FETAL EN UN MODELO DE IMPLANTACIÓN *IN VIVO*.

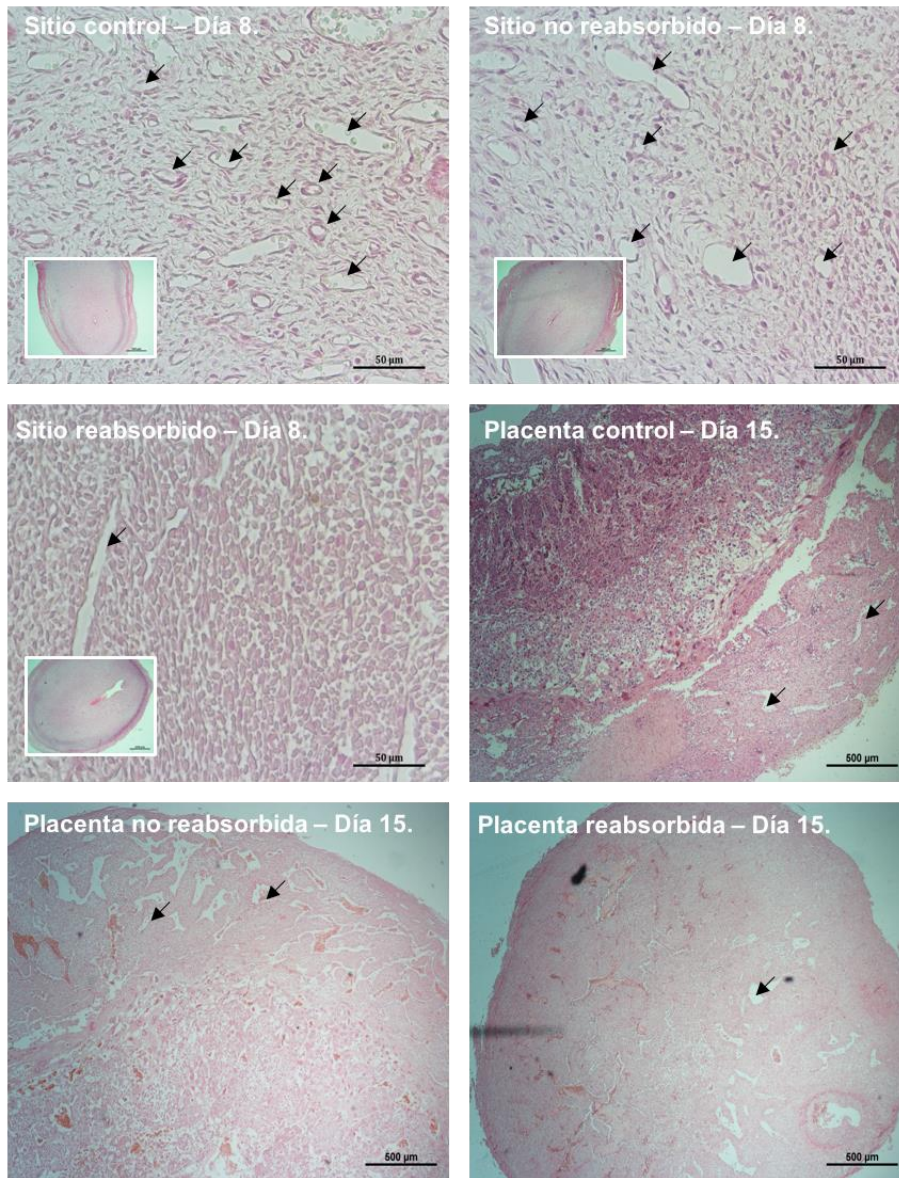
Varios autores han informado que defectos en el remodelado de las arterias espiraladas podrían contribuir a la disfunción placentaria provocando complicaciones obstétricas como las fallas implantatorias múltiples o la preclampsia (Klauber y col., 1997; Plaisier y col., 2009; Fraser y col., 2012).

Para corroborar la participación del receptor LPA3 en los procesos vasculares que tienen lugar durante la implantación, seguimos una estrategia farmacológica *in vivo* en la que ratas hembras de la cepa Wistar en día 5 de gestación por la mañana recibieron en forma intra-uterina (i.u.) una dosis única de DGPP (0.1 mg/kg, el antagonista selectivo del receptor LPA3) en uno de los cuernos uterinos. El cuerno uterino contralateral se tomó como control y se inyectó con el mismo volumen (2 μ l) pero de vehículo. Tanto el volumen de inyección como la dosis de DGPP fueron puestas a punto previamente en el laboratorio (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Las hembras se sacrificaron en los días 8 y 15 de gestación.

Previamente se observó en este modelo experimental que la administración de DGPP induce reabsorción embrionaria en aproximadamente un 60% (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Por lo tanto, en el cuerno tratado se observan tanto sitios de implantación reabsorbidos como sitios no reabsorbidos, los cuales presentan características morfológicas, histológicas y moleculares similares a los sitios de implantación presentes en el cuerno control. Además, se observó que la ablación farmacológica del receptor LPA3 induce cambios en la macrovasculatura uterina pudiéndose detectar una disminución en la longitud transversal de las arterias uterina y arcuata, las principales arterias que irrigan los cuernos uterinos (Sordelli y Beltrame y col., 2017). En base a estos resultados y a los obtenidos con las células trofoblásticas y endoteliales, decidimos investigar la participación del receptor LPA3 en el desarrollo de la microvasculatura de los sitios de implantación en la rata.

Para ello, en el día 8 de gestación se aislaron los sitios de implantación enteros mientras que en el día 15 se separaron los úteros, de las placentas y los fetos. En aquellos casos donde hubo reabsorción embrionaria no fue posible separar el feto de la placenta y por lo tanto se aisló el útero de la unidad feto-placentaria completa.

Tanto los sitios de implantación de día 8 como las placentas de día 15 de gestación fueron fijados en paraformaldehído 4% para su posterior tinción con hematoxilina y eosina. En el día 8 se analizaron 5 campos por corte histológico, mientras que en el día 15 se estudiaron las placentas en su totalidad. Se contabilizó el número de vasos que cumplían el siguiente criterio: bordes bien definidos y sin discontinuidades, con al menos una célula endotelial. Además, en aquellos vasos donde se cumplía este criterio se cuantificó el perímetro o circunferencia de los mismos y la relación entre el lumen y el ancho de la pared vascular.



| Número de vasos sanguíneos. | | | |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Día de gestación | Control | No reabsorbido | Reabsorbido |
| Día 8 | 6 ± 2 ^a | 4 ± 1 ^a | 1 ± 0.5 ^b |
| Día 15 | 16 ± 2 ^a | 18 ± 2 ^a | 9 ± 2 ^b |

Tabla 4. El tratamiento con DGPP reduce el número de vasos sanguíneos en los sitios de implantación reabsorbidos en el día 8 y en las placentas de día 15 de gestación. Hembras en día 5 de gestación por la mañana recibieron 2 µl de DGPP (0.1 mg/kg) en el cuerno uterino izquierdo y 2 µl de metanol (el vehículo del DGPP) en el cuerno uterino derecho. Las hembras se sacrificaron en día 8 y día 15 de gestación. Se muestran imágenes representativas de los cortes provenientes de sitios de implantación de día 8 y placentas de día 15 (Día 8: 40x; recuadro: sitio de implantación día 8 4X; Día 15:4x). Las flechas indican ejemplos de vasos que cumplen el criterio de inclusión. Los resultados representan el número de vasos sanguíneos ± S.E.M. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (p<0.05). Se realizaron entre 4-6 réplicas por tratamiento.

En primer lugar, se observó que los sitios de implantación de día 8 como las placentas de día 15 de gestación, presentaron un número de vasos significativamente menor en los sitios reabsorbidos con respecto a los sitios no reabsorbidos y a los sitios controles ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Luego, se estudió la frecuencia de distribución según el calibre o perímetro que presentaban los vasos contabilizados. Los vasos se clasificaron como vasos de bajo calibre (vasos que poseían un calibre menor a $50 \mu\text{m}$ en día 8 o menor a $500 \mu\text{m}$ en día 15), o de alto calibre (vasos que poseían un perímetro mayor o igual a $50 \mu\text{m}$ en día 8 o mayor o igual a $500 \mu\text{m}$ en día 15).

Los sitios de implantación reabsorbidos de día 8 de gestación como las placentas correspondientes a embriones reabsorbidos de día 15 de gestación, presentaron un porcentaje de vasos de menor perímetro significativamente menor respecto a los no reabsorbidos y a los controles ($p < 0.05$). En cambio, presentaron un aumento en el número de vasos de mayor circunferencia ($p < 0.05$) (Figura 28).

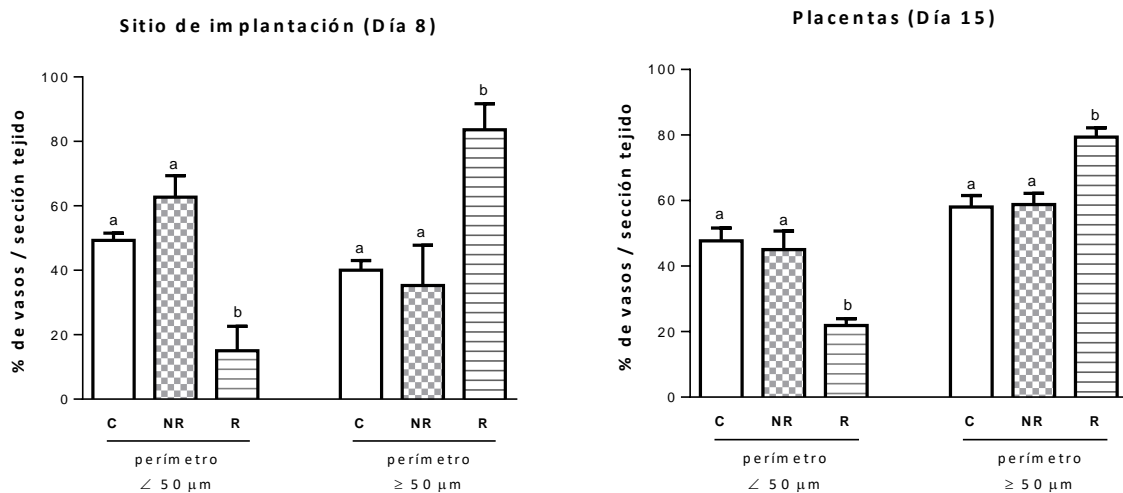


Figura 28. El DGPP altera la distribución de los vasos sanguíneos en los sitios reabsorbidos del cuerno tratado en el día 8 y en las placentas de día 15 de gestación. Hembras en día 5 de gestación por la mañana recibieron $2 \mu\text{l}$ de DGPP (0.1 mg/kg) en el cuerno uterino izquierdo y $2 \mu\text{l}$ de metanol (el vehículo del DGPP) en el cuerno uterino derecho. Las hembras se sacrificaron en día 8 y día 15 de gestación. Los gráficos representan el porcentaje de vasos por sección de tejido con perímetro menor a $50 \mu\text{m}$ o mayor e igual a $50 \mu\text{m}$ en el día 8 de gestación, y menor a $500 \mu\text{m}$ o mayor e igual a $500 \mu\text{m}$ en el día 15. Se muestran los resultados para los sitios control (C), no reabsorbidos (NR) y reabsorbidos (R). Los resultados representan la media \pm S.E.M (4-6 secciones de tejido por grupo). Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron entre 4-6 réplicas por tratamiento.

Estos resultados indican que la ablación farmacológica del receptor LPA3 produce reabsorciones embrionarias que podrían deberse a un desarrollo deficiente de la microvasculatura presente en la interfase materno-fetal (menor número de vasos, los cuales poseen circunferencias mayores).

Las arterias espiraladas experimentan modificaciones estructurales que incluyen cambios en su circunferencia y el aumento del tamaño del lumen. Se cree que el remodelado de estas arterias contribuye a suplir la demanda metabólica del feto en crecimiento aumentando el volumen de sangre materna sin generar una respuesta inflamatoria exacerbada y sin aumentar el *shear stress*. La pérdida de las capas de músculo liso de las paredes de las arterias espiraladas, así como el reemplazo de las células endoteliales por el trofoblasto, es lo que permite un flujo ininterrumpido de sangre materna. Estas adaptaciones vasculares son clínicamente relevantes porque el fracaso de este remodelado vascular está asociado con complicaciones obstétricas como las fallas implantatorias o la preeclampsia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se investigó si el bloqueo farmacológico del receptor LPA3, además de tener un efecto sobre el número y el perímetro de los vasos presentes en los sitios de implantación, también posee un rol en el remodelado vascular. Para ello se estudió la relación entre el lumen y la pared de los vasos presentes en los cortes histológicos de día 8 de gestación. Se seleccionó el día 8 ya que en esta etapa es cuando aún se están produciendo cambios en el remodelado vascular de los sitios de implantación.

En la Figura 29 se muestra el análisis histológico de los vasos de día 8 de gestación en los animales tratados con el antagonista del receptor LPA3. Se observó que los sitios de implantación correspondientes a embriones no reabsorbidos, presentaron una relación pared:lumen mayor que los sitios de embriones controles. En cambio, los sitios de implantación reabsorbidos del cuerno tratado poseen una relación similar a los controles.

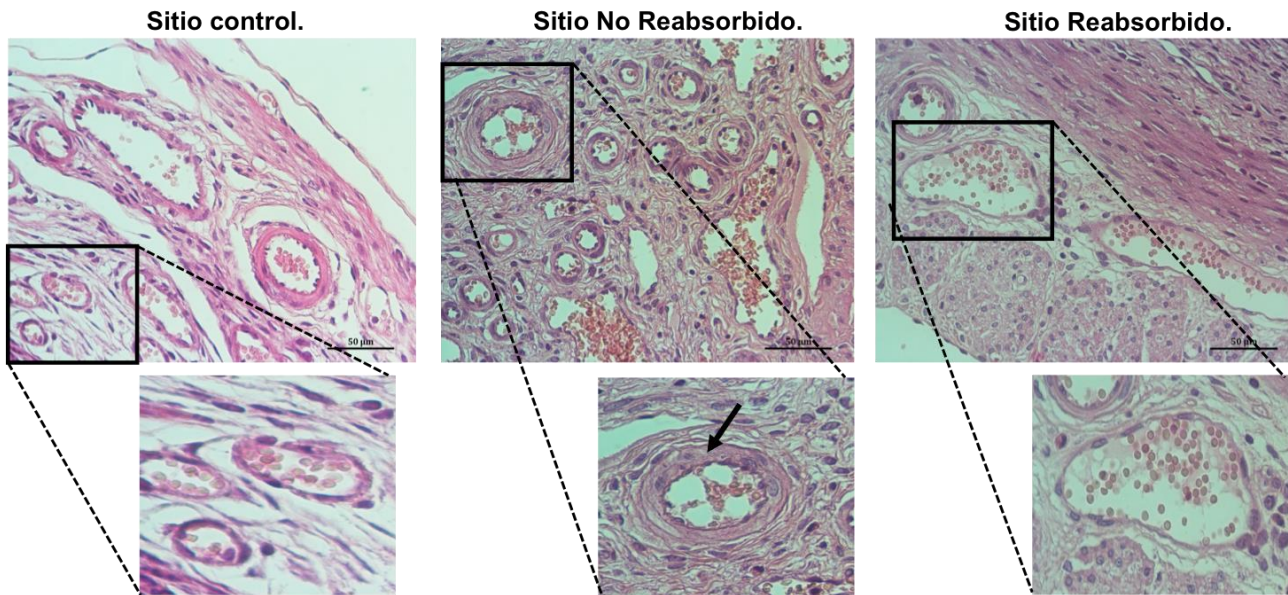


Figura 29. Los sitios de implantación no reabsorbidos del cuerno tratado poseen una mayor relación pared:lumen vascular en el día 8 de gestación. Hembras en día 5 de gestación por la mañana recibieron 2 μ l de DGPP (0.1 mg/kg) en el cuerno uterino izquierdo y 2 μ l de metanol (el vehículo del DGPP) en el cuerno uterino derecho. Las hembras se sacrificaron en día 8. Se muestran imágenes representativas (40x) de los cortes provenientes de sitios de implantación de día 8. El panel ampliado refleja un vaso sanguíneo representativo. La flecha señala las capas de musculo circular presentes en los vasos de los sitios no reabsorbidos. Los resultados representan la media \pm S.E.M y expresan la relación pared:lumen de los vasos. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Se realizaron entre 4-6 réplicas por tratamiento. C: control. NR: no reabsorbido. R: reabsorbido.

En base a lo observado, los resultados in vivo apoyan los resultados obtenidos in vitro y sugieren que el LPA a través del receptor LPA3 regula el proceso de angiogénesis en la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

DISCUSIÓN.

El establecimiento de la preñez requiere del remodelado de los vasos sanguíneos maternos y de una apropiada coordinación de los procesos vasculares de la interfase materno-fetal. Durante el primer trimestre de gestación, el trofoblasto extraveloso adquiere un fenotipo endovascular remodelando las arterias espiraladas maternas. Desregulaciones en las adaptaciones vasculares de las arterias espiraladas, no logran suplir las demandas metabólicas del embrión en crecimiento, resultando en complicaciones obstétricas como las fallas implantatorias y la preclampsia. Debido a las dificultades éticas y experimentales del estudio del proceso de implantación en humanos, los conocimientos de las vías involucradas en la adquisición del fenotipo endovascular por parte del citotrofoblasto siguen siendo escasos.

Los primeros eventos del remodelado de las arterias espiraladas se consideran que reflejan el proceso de angiogénesis, ya que comparten mecanismos como la dilatación de los vasos sanguíneos, el incremento de la permeabilidad vascular, y la pérdida de las capas de músculo liso (Pijnenborg y col., 2006). Se propone que el citotrofoblasto endovascular, el principal orquestador de las adaptaciones vasculares de los vasos sanguíneos maternos en el primer trimestre de gestación, asume un fenotipo endovascular y re-tapiza los vasos sanguíneos constituyendo la pared de los mismos. El reemplazo de las células endoteliales por el citotrofoblasto endovascular podría involucrar la disrupción de las uniones del endotelio causando la desestabilización del vaso. Asimismo, citoquinas como la IL-6, IL-8 y el IFN- γ podrían afectar la integridad endotelial, dando como resultado la disfunción de la barrera endotelial y la permeabilidad vascular. Las mujeres con preclampsia expresan alteraciones severas en la barrera endotelial de la placenta (de Luca Brunori y col., 2005). El citotrofoblasto extraveloso podría desestabilizar la barrera constituida por las uniones estrechas entre células endoteliales, y se ha observado que estas son más susceptibles al trofoblasto preclámpico que a las células trofoblásticas normales (Wang y col., 2004). Además, Fraser y colaboradores (2015) observaron que las estructuras endoteliales se ven afectadas en mujeres embarazadas con altos índices de resistencia, lo que está relacionado con el grado de remodelado de las arterias espiraladas.

La formación de túbulos en el ensayo de tubulogénesis permite el estudio de las vías de señalización de los procesos angiogénicos que no son fáciles de estudiar *in vivo*. La formación de estructuras tipo-capilares interconectadas *in vitro* no es un proceso limitado para células endoteliales, pero requiere de la adquisición de un fenotipo endotelial o endovascular. La tubulogénesis es un proceso extremadamente específico y replica múltiples pasos involucrados en la angiogénesis, como la adhesión, la migración y alineamiento celular, y la formación de túbulos. En este trabajo de tesis se investigaron los diferentes aspectos relacionados con la angiogénesis del trofoblasto humano de primer trimestre como son la tubulogénesis, la migración y la proliferación en presencia de LPA. Se utilizó la línea celular H8 como una herramienta para

modelar la adquisición del fenotipo endovascular por el citotrofoblasto humano de primer trimestre. Observamos que el LPA estimula la formación de estructuras tipo capilares, la migración y la proliferación celular. Se ha propuesto que estos procesos reflejan la angiogénesis placentaria, comprendiendo la diferenciación del citotrofoblasto a un perfil endovascular (Basak y Duttaroy, 2013; Das y col., 2014; Alfaidy y col., 2013; Li y col., 2015). Asimismo, Highet y colaboradores (2016) publicaron recientemente que las células H8 durante la formación de túbulos presentan un perfil génico similar al de las células endoteliales durante la angiogénesis. En base a estos hallazgos, proponemos un nuevo rol para el LPA como inductor de las adaptaciones del citotrofoblasto endovascular involucradas en el remodelado de las arterias espiraladas en la interfase materno-fetal.

La relevancia del LPA en las respuestas vasculares de la interfase materno-fetal está avalada por hallazgos previos que describen la expresión de la Lyso-PLD (la principal enzima implicada en la síntesis de LPA) en el trofoblasto humano placentario (Iwasawa y col., 2009). La actividad de la Lyso-PLD aumenta en el suero de mujeres embarazadas conforme progresa la gestación y produce niveles micromolares de LPA (Tokumura y col., 2002a). Sin embargo, la actividad de la Lyso-PLD disminuye a niveles similares a los de mujeres no embarazadas inmediatamente después del parto (Tokumura y col., 2002b). De esta manera el grupo de Iwasawa (2009) sugirió que la principal fuente de LPA durante la gestación es el trofoblasto placentario.

Resultados previos de nuestro grupo refuerzan la participación del LPA en el remodelado vascular de la interfase materno-fetal. Recientemente informamos que el LPA modula el desarrollo de las arterias uterina y arcuata en ratas preñadas (Sordelli y Beltrame y col., 2017). En este trabajo de tesis, además de estos cambios macrovasculares, observamos alteraciones en la microvasculatura de los sitios de implantación. Particularmente describimos un desbalance en la distribución de los vasos según el perímetro en los sitios de implantación reabsorbidos. Es interesante mencionar en este punto que las mujeres con fallas recurrentes en la implantación muestran menor densidad de vasos, y que estos poseen circunferencias más grandes (Plaisier y col., 2009). Asimismo, las mujeres con preclampsia presentan una disminución en el nivel y en la actividad de la Lyso-PLD en suero (Iwasawa y col., 2009; Tokumura y col., 2009). Sin embargo, en estas pacientes se observa la presencia del citotrofoblasto intersticial en las arterias espiraladas, sugiriendo que las fallas en el remodelado no se explicarían solamente por una mala invasión trofoblástica (Pijnenborg y col., 1998), poniendo de manifiesto la importancia de otros mecanismos independientes de la invasión en las adaptaciones vasculares de la interfase. Por lo tanto, la adquisición inadecuada del fenotipo endovascular por el citotrofoblasto debido a la señalización anormal del LPA podría contribuir al desarrollo de patologías relacionadas con la alteración del remodelado vascular.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo pudimos demostrar que el LPA estimula la tubulogénesis del trofoblasto a través del receptor LPA3. Observamos que la línea celular H8 expresa la Lyso-PLD y el LPA3,

lo que sugiere que el trofoblasto humano de primer trimestre produce LPA, el cual se une al menos al receptor LPA3. Previamente observamos que el bloqueo farmacológico *in vivo* de este receptor induce la reabsorción embrionaria asociada a cambios macrovasculares en el útero de rata (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Además, Ye y colaboradores (2005) identificaron cambios fenotípicos en ratones deficientes de LPA3. Estos autores describieron un retraso en el inicio de la implantación y un espaciamiento aberrante de los embriones. La delección del receptor LPA1 o LPA2 revela otros papeles para estos receptores, sin efectos en el proceso de implantación (Contos y col., 2000, 2002). Asimismo, las mujeres con fallas implantatorias múltiples expresan niveles reducidos de LPA3 en el endometrio (Achache y col., 2010). Por lo tanto, el receptor LPA3 parece ser el subtipo de receptor de LPA con mayor participación durante la gestación temprana.

Las células SWAN71 presentan una respuesta al LPA similar a la observada para la línea H8. Este resultado sugiere que el efecto del LPA sobre la adquisición del fenotipo vascular no sería dependiente de la línea celular, y sustenta la hipótesis de que esta regulación ejercida por el sistema LPA/LPA3 sobre el trofoblasto humano de primer trimestre podría ser un mecanismo que ocurre en la interfase materno-fetal durante la gestación temprana.

Las PGs derivadas de la COX-2 juegan un papel fundamental en la angiogénesis del sitio de implantación (Lim y col., 1997; Matsumoto y col., 2002; Sookvanichsilp y Pulbutr, 2002). En trabajos anteriores observamos que el LPA estimula la producción de PGs derivadas de la COX-2 (Sordelli y col., 2012; Beltrame y col., 2013). Aquí describimos que la COX-2 participa en la tubulogénesis inducida por el LPA en el trofoblasto humano de primer trimestre. Además, el trofoblasto presenta una localización nuclear de COX-2, su distribución no se modifica luego del tratamiento con LPA y los resultados obtenidos por la técnica de inmunohistoquímica sugieren una acumulación de esta isoforma en el núcleo. Otros autores también informaron que la COX-2 se localiza en el núcleo de células HUVEC, lo que sugiere un rol preponderante para esta enzima en la regulación de la expresión génica (Parfenova y col., 2001).

Desde hace varios años, se ha propuesto que durante el primer trimestre la PGE2 contribuye al proceso de decidualización y angiogénesis, mientras que un aumento de la PGF2 α se asocia con la generación de contracciones uterinas, las cuales presentan consecuencias negativas en la progresión del embarazo (Hamilton y Kennedy, 1994; Stocco y Deis, 1998; Callegari y col., 2005). Observamos que la PGE2 promueve la formación de estructuras tipo capilares, mientras que la PGF2 α no las modifica. Por otra parte, la PGE2 rescata la tubulogénesis del trofoblasto a partir de la inhibición selectiva de la COX-2. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente en nuestro laboratorio donde el LPA aumenta la producción de PGE2 sin modificar la de PGF2 α en el útero de rata preñada (Sordelli y col., 2012). Por lo tanto, sugerimos que al menos la PGE2 derivada de la COX-2 es la PGs implicada en el efecto del LPA sobre la formación de

túbulos del trofoblasto. En conjunto, estos resultados refuerzan la importancia de la PGE2 como una hormona de origen lipídico que modula los procesos de remodelado vascular que tienen lugar durante las primeras etapas de la gestación.

El NO es un potente mensajero y reconocido modulador del tono vascular, la angiogénesis y la agregación y adhesión celular, todos mecanismos importantes para establecer y mantener el embarazo. La regulación del tono de NO en la interfase materno-fetal parece ser crucial para la gestación temprana, dado que modificaciones en los niveles de NO se asocian a fallas en las adaptaciones vasculares (Ota y col., 1999). Aquí, describimos que la iNOS se localiza en el núcleo y sería el efector final de la vía de señalización inducida por el LPA en la formación de túbulos del trofoblasto. Por otra parte, el LPA aumenta los niveles proteicos de la iNOS. Los experimentos pioneros de Zhou y colaboradores (1997a) sobre las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal muestran que el NO promueve la invasión del citotrofoblasto endovascular. De hecho, el NO es producido por el trofoblasto mientras invade las arterias espiraladas maternas (Al-Hijji y col., 2003). Resultados anteriores de nuestro laboratorio apoyan estas observaciones. Hemos informado que la actividad de la NOS es mayor en los sitios de implantación de la rata y que la misma está regulada diferencialmente por el estado de activación del blastocisto (Sordelli y col., 2011). Además, encontramos que el LPA estimula específicamente la isoforma iNOS en el útero de rata durante la implantación (Beltrame y col., 2013). Otros autores también describieron la presencia de iNOS en el citotrofoblasto extravascular y en el sinciotrofoblasto (Myatt y col., 1997; Thomson y col., 1997; Smith-Jackson y col., 2015). Usando microscopía confocal, Cartwright y colaboradores (1999) muestran la presencia de iNOS en el núcleo de SGHPL-4, una línea celular de trofoblasto de primer trimestre. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con los de otros autores, y refuerzan el rol específico para el NO en las adaptaciones vasculares del trofoblasto durante el embarazo (Zhou y col., 1997a; Xu y col., 2014; Dunk y col., 2000). En conjunto, nuestros hallazgos señalan un papel protector del NO en las funciones vasculares del trofoblasto, y sugieren que la isoforma iNOS es la implicada en la inducción del fenotipo endovascular en la interfase materno-fetal.

Dentro de la amplia gama de mediadores que participan de los procesos vasculares, diferentes trabajos demuestran la importancia de las citoquinas en estos procesos. Por lo tanto, en este trabajo decidimos estudiar, además de las PGs y el NO, la participación de este grupo de moléculas en la adquisición del fenotipo endovascular por el trofoblasto humano de primer trimestre. Observamos que el LPA aumenta los niveles de mensajero de IL-6, y que esta citoquina participa de la formación de túbulos inducida por el LPA. La secreción de IL-6 por el útero y la placenta durante la gestación temprana en humanos sugiere un rol para esta citoquina en los procesos que tienen lugar en la interfase materno-fetal. Otros autores han descrito que la línea celular H8 secreta IL-6 y expresa el receptor para esta citoquina (Jovanovic y Vicovac, 2009; Champion y col., 2012). Asimismo, tanto el sinciotrofoblasto como el citotrofoblasto de primer trimestre producen IL-6 (Kameda y col., 1990). El rol de la IL-6 sobre la migración e invasión del trofoblasto de primer trimestre es controversial.

Jovanovic y Vicovac (2009) describieron que la IL-6 induce la invasión de la línea H8 a través de las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\beta 1$. Sin embargo, Champion y colaboradores (2012) informaron que la IL-6 no modifica la invasión del trofoblasto. Hasta el momento, no se ha descrito la participación de IL-6 en la adquisición del fenotipo endovascular por parte del trofoblasto de primer trimestre. En este punto es interesante mencionar que las mujeres con abortos recurrentes o preeclampsia presentan concentraciones elevadas de IL-6 en suero (Zhao y col., 2008; Arruvito y col., 2009). Estas observaciones junto con nuestros resultados donde el LPA si bien aumenta los niveles de IL-6, no modifica los niveles del mensajero de otras citoquinas vasculares, sugieren un rol preponderante para esta citoquina en el remodelado vascular de la interfase materno-fetal.

Con respecto al VEGF-A, el tratamiento con LPA no modifica su nivel proteico en las células H8. Si bien el VEGF-A es un conocido inductor de la angiogénesis en otros sistemas, no hay evidencias claras que demuestren que este factor de crecimiento participe en la adquisición del fenotipo endovascular por parte del trofoblasto. En este sentido, diferentes estímulos pro-angiogénicos sobre las células endoteliales, no poseen el mismo efecto sobre la tubulogénesis del trofoblasto. Durante la adquisición del fenotipo endovascular, las células trofoblásticas presentan un patrón de expresión génica similar al de las células endoteliales durante la angiogénesis. Sin embargo, se postula que existen diferencias en los mecanismos que regulan dichas expresiones. Recientemente se ha descrito que durante la tubulogénesis espontánea, las células trofoblásticas H8 poseen el mismo patrón de expresión de VEGF-A que las células H8 crecidas en monocapa y que no adquieren el fenotipo endovascular (Highet y col., 2016). Asimismo, Schiessl y colaboradores (2009) informaron que no se observa una diferencia en la inmunomarcación de VEGF-A entre el citotrofoblasto intramural y el citotrofoblasto endovascular e intersticial. No obstante, no podemos descartar la participación de otros miembros de la familia del VEGF y sus receptores en el efecto del LPA sobre la adquisición del fenotipo endovascular.

Existen múltiples factores que intervienen durante las primeras etapas del embarazo para lograr un flujo sanguíneo adecuado en el útero. Entre estos factores se encuentran las hormonas esteroideas, que son las grandes orquestadoras de todos los eventos reproductivos. Los esteroides sexuales están presentes en concentraciones extremadamente altas en la circulación materna y aunque son fundamentales para mantener el embarazo ya que controlan muchas de las funciones placentarias, su papel en el remodelado vascular sigue siendo controversial (Chen y col., 2012; Maliqueo y col., 2016). Este trabajo de tesis demuestra que los esteroides sexuales aumentan la formación de túbulos en el trofoblasto humano de primer trimestre, y que este efecto implica la participación del receptor LPA3 expresado en la interfase materno-fetal. Las concentraciones de P4 y de E2 utilizadas en nuestros experimentos se seleccionaron en función de los niveles informados en el plasma de mujeres embarazadas, y en el tejido placentario de mujeres en el primer trimestre de la gestación (Chen y col., 2012). Previamente, se ha informado que la línea celular H8 expresa constitutivamente los receptores de P4 y E2 (Lee y col., 2014; Patel y col., 2015). Observamos que la

incubación con P4 10^{-7} M o con E2 10^{-8} M aumenta la angiogénesis *in vitro* del trofoblasto humano de primer trimestre. Sin embargo, solamente la combinación de P4 10^{-7} M + E2 10^{-5} M estimula la formación de túbulos. Estos resultados indican que debe existir una fina regulación del tono de las hormonas esteroideas en la interfase materno-fetal durante el remodelado vascular. De hecho, hemos observado que las concentraciones más altas de P4 suprimen la formación basal de túbulos. En este sentido, se ha informado que la preclampsia se asocia con niveles mayores de P4, la cual afecta el desarrollo de la vasculatura placentaria (Walsh y Coulter, 1989). En humanos, el E2 aumenta el porcentaje de área vascularizada y la densidad de los vasos en el tejido placentario (Albrecht y col., 2004; Robb y col., 2004; Albrecht y Pepe, 2010). Aquí observamos que el E2 aumenta la formación de la red capilar por el trofoblasto humano de primer trimestre. La P4, por su parte, regula la invasión y la migración del citotrofoblasto extraveloso *in vitro*, e induce la secreción de MMP-2 y MMP-9 de la matriz, las cuales son mediadores claves del remodelado vascular y la angiogénesis (Goldman y Shalev, 2006; Chen y col., 2011; Halasz y Szekeres-Bartho, 2013). Además, se postula que la P4 estimula la diferenciación de un tipo de células deciduales (subfracción CD31⁺CD146⁻) en células endoteliales y en células del músculo liso, lo que sugiere que la P4 podría participar en la regulación del remodelado vascular (Wang y col., 2013). Nuestros resultados apoyan la noción de que las hormonas esteroideas pueden modular la adquisición del fenotipo endovascular por parte del trofoblasto, y reemplazar las células endoteliales de las arterias espiraladas. El hecho que la P4 + el E2 aumenten el nivel de mensajero de la Lyso-PLD, y que la co-incubación de las hormonas con el antagonista del receptor LPA3 revierte parcialmente su efecto, indica que la inducción del fenotipo endovascular por las hormonas esteroideas estaría mediado al menos en parte por un aumento en la producción de LPA y por el LPA3.

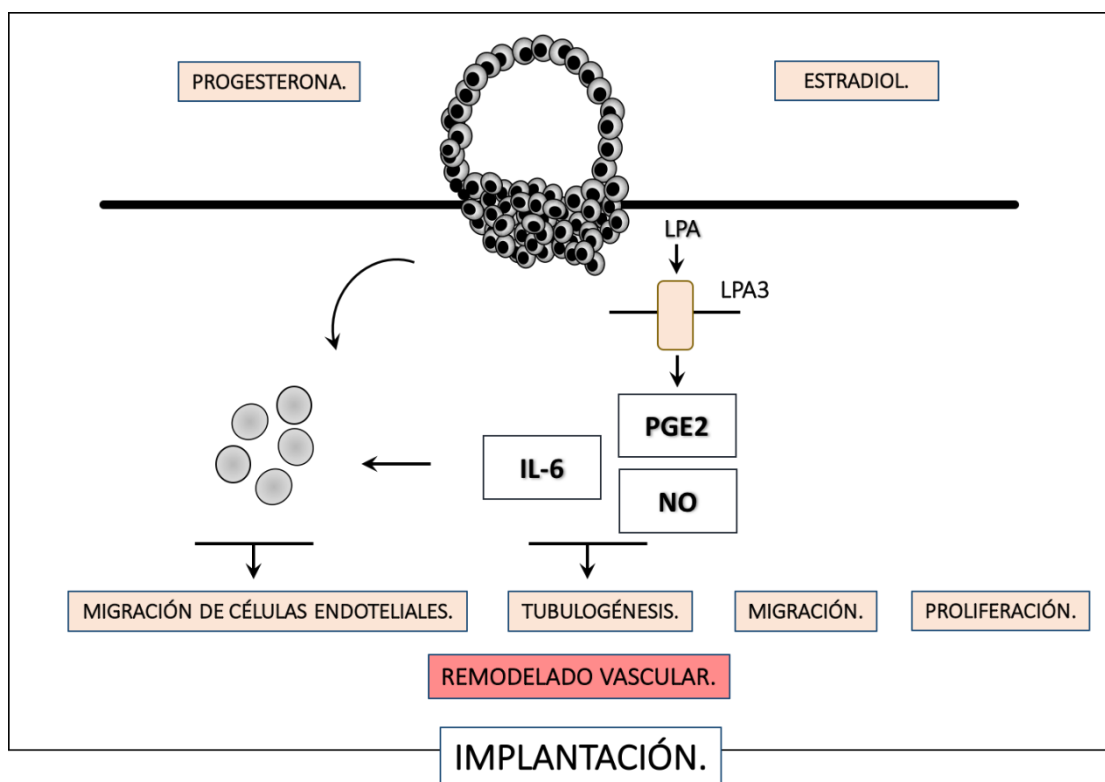
La interacción entre los distintos tipos celulares que componen la interfase materno-fetal es crucial durante la implantación embrionaria y para el posterior mantenimiento de la gestación. El mecanismo por el cual el citotrofoblasto extraveloso, con participación activa de las células del sistema inmune, induce la pérdida del endotelio de los vasos sanguíneos maternos, se encuentra coordinado espacio-temporalmente (Whitley y Cartwright, 2009, 2010; Choudhury y col., 2017). Este proceso comienza con una etapa que es independiente del trofoblasto y que prepara al endometrio para la invasión trofoblástica. Luego, el citotrofoblasto extraveloso adquiere un fenotipo endovascular reemplazando las capas de músculo liso y las células endoteliales. Finalmente, el trofoblasto endovascular re-tapiza los vasos sanguíneos y es rodeado por depósitos de fibrina. Varios trabajos han relacionado los procesos de apoptosis inducidos por el trofoblasto con el remodelado de la matriz extracelular. Particularmente se ha observado que el trofoblasto induce la producción de citoquinas como el ligando apoptótico ligado a TNF (TRAIL) y al FAS ligando, los cuales se unen a sus receptores y activan cascadas de señalización que inducen a caspasas promoviendo la apoptosis celular (Ashton y col., 2005; Harris y col., 2006, 2007; Red-Horse y col., 2006; Keogh y col., 2007). Asimismo, se detectó la presencia de marcadores apoptóticos en las arterias espiraladas en el primer trimestre de

gestación (Smith y col., 2009; Hazan y col., 2010). Sin embargo, además de la inducción de los procesos apoptóticos en las células que componen los vasos sanguíneos maternos, se cree que el remodelado vascular de la interfase materno-fetal es un mecanismo sumamente complejo que no se explica únicamente a través de la apoptosis. Se ha observado que otros eventos participan también del remodelado vascular, como el desprendimiento de las células endoteliales de la pared del vaso sanguíneo y la migración o retracción de las capas de músculo liso y de células endoteliales (Whitley y Cartwright 2010; Cartwright y col., 2010). En este trabajo de tesis hemos observado que la inducción del fenotipo vascular del trofoblasto humano de primer trimestre por el LPA, estimula la migración de las células endoteliales. Estos resultados sugieren que el LPA no solo tendría un efecto directo sobre el trofoblasto, sino que también modificaría indirectamente el comportamiento de las células endoteliales que tapizan las arterias espiraladas, sugiriendo un nuevo mecanismo en el remodelado vascular de la interfase materno-fetal. De hecho, el LPA estimula la migración de las células endoteliales solo hasta valores similares al medio condicionado control. Estos resultados sugieren que no es solo el LPA, sino la adquisición del fenotipo endovascular inducida por LPA, la que modula el diálogo entre el trofoblasto y las células endoteliales. Los factores solubles secretados hacia el espacio extracelular por el trofoblasto bajo el efecto del LPA, podrían difundir hasta alcanzar las células endoteliales de los vasos maternos, y promover la migración de las mismas favoreciendo el remodelado vascular. Hemos observado que las vías de la COX-2 y la IL-6 participan de esta interacción. Otros autores han descrito que las PGs derivadas de la COX-2 inducen la migración de las células endoteliales (Daniel y col., 1999; Zhao y col., 2012). Si bien se conoce que la concentración de tromboxano B2 y de PGI2 varía en el suero de mujeres con preclampsia, hasta el momento no existe consenso respecto de la participación de la PGE2 y de la PGF2 α en esta patología (Liu y col., 1998; Gao y col., 2017). Por su parte, el grupo de Gregor y colaboradores (2016) han observado que la IL-6 podría funcionar como un factor quimioattractante, guiando las células trofoblásticas hacia las endoteliales. Además de estos mediadores, los tipos celulares que están involucrados en las adaptaciones vasculares también secretan proteasas encargadas de degradar la matriz extracelular facilitando la migración celular (Harris y Aplin, 2007; Naruse y col., 2009). Estos cambios fisiológicos en su conjunto permitirían la pérdida de las capas de células musculares y endoteliales, las cuales son reemplazadas por el citotrofoblasto endovascular. La importancia de que estos eventos ocurran de manera regulada se pone de manifiesto por las complicaciones obstétricas asociadas con el remodelado insuficiente de las arterias espiraladas, como las fallas implantatorias, la preclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino. En el tercer trimestre de embarazo las arterias espiraladas poseen un diámetro externo de alrededor de 0.5 mm, en contraste con lo observado en mujeres con preclampsia en donde el diámetro llega solo a 0.2 mm (Brosens y col., 1972). Como mencionamos anteriormente, las mujeres con abortos espontáneos también presentan desregulaciones en las adaptaciones vasculares de la interfase. Estas

observaciones indican que un desbalance en la coordinación espacio-temporal de los eventos que se suceden durante el remodelado vascular pueden afectar el flujo sanguíneo comprometiendo el desarrollo gestacional. Los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* avalan el rol del LPA y su receptor LPA3 en el remodelado vascular de la interfase materno-fetal. La ablación farmacológica del receptor LPA3 aumenta el porcentaje de reabsorción embrionaria asociado a fallas en el desarrollo de la macro y la microvasculatura. Si bien en los vasos de los sitios reabsorbidos se observa un remodelado vascular similar al de los sitios controles, estos sitios también presentan un menor número de vasos los cuales poseen circunferencias mayores. Estos resultados coinciden con los descritos para el endometrio de mujeres con abortos recurrentes (Plaisier y col., 2009) y sugieren que además del remodelado vascular es necesario un adecuado número y tamaño de vasos. Debido al menor número de vasos, es posible que el aumento en el calibre vascular esté vinculado con un fenómeno de compensación, de manera de suplir las demandas metabólicas del embrión en crecimiento. Sin embargo, una desregulación de las dimensiones del lecho vascular puede conducir a un aumento del *shear stress*, como así también a un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno y a una sobre-activación del sistema inmune, lo que podría desencadenar la pérdida embrionaria y la posterior reabsorción. Por su parte, los sitios no reabsorbidos que presentan características histológicas y morfológicas similares a los sitios controles y cuyos embriones llegan a término y nacen normalmente, poseen un menor remodelado vascular. Dado que el remodelado de las arterias espiraladas es un proceso dinámico que se produce aún hasta incluso la mitad del segundo trimestre en humanos, proponemos que estos sitios logran sobrepasar el bloqueo farmacológico del receptor LPA3 más avanzada la gestación, pudiendo llegar a remodelar los vasos, y por lo tanto permitir el correcto crecimiento y desarrollo de los embriones. Previamente informamos que si bien los sitios no reabsorbidos presentan una arquitectura decidual conservada, los sitios reabsorbidos pierden la organización de las células de la decidua no pudiéndose distinguir la zona decidual primaria y la decidua antimesometrial (Sordelli y Beltrame y col., 2017). Por lo tanto, es posible que los sitios no reabsorbidos logren sobrepasar las fallas en las adaptaciones vasculares debido al sustento que brinda una decidua funcional. En resumen, los resultados *in vivo* muestran la importancia del sistema LPA/LPA3 en la coordinación de los eventos que regulan la angiogénesis de la interfase materno-fetal, y que permiten un correcto desarrollo embrionario durante la gestación temprana.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el LPA promueve el remodelado vascular de la interfase materno-fetal. Las células citotrofoblásticas endovasculares son actores cruciales en el remodelado de la vasculatura uterina, y las deficiencias en este proceso podrían conducir a patologías obstétricas graves como las fallas implantatorias y la preeclampsia. El LPA a través del receptor LPA3 y mediante las vías que involucran a la COX-2, la iNOS y la IL-6, induce la adquisición del fenotipo endovascular del trofoblasto humano de primer trimestre. La importancia de este mecanismo se pone de manifiesto al considerar que participa de la acción de las hormonas esteroideas sobre las adaptaciones vasculares de la interfase. Además, la liberación de

factores solubles inducida por LPA al medio extracelular estimula la migración de las células endoteliales demostrando que este mediador lipídico regularía también el diálogo entre el trofoblasto y el endotelio de las arterias espiraladas maternas. Estos procesos junto con la migración y la proliferación de las células trofoblásticas contribuyen al remodelado vascular, asegurando un flujo sanguíneo adecuado en respuesta a las crecientes demandas metabólicas del embrión. Nuestros hallazgos demuestran un nuevo rol para el LPA en las adaptaciones vasculares de la interfase materno-fetal durante la gestación temprana, y contribuyen a una mejor comprensión de la importancia de la señalización del LPA en los eventos vasculares que conducen a un embarazo exitoso.



- Achache H, Tsafirir A, Prus D, Reich R y Revel A. 2010. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 94(4): 1271-8.
- Adam O y Wolfram G. 1984. Effect of different linoleic acid intakes on prostaglandin biosynthesis and kidney function in man. *Am J Clin Nutr.* 40: 763-770.
- Ain R, Canham LN y Soares MJ. 2003. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol.* 260: 176-190.
- Aisemberg J, Vercelli C, Billi S, Ribeiro ML, Ogando D, Meiss R, McCann SM, Rettori V y Franchi AM. 2007. Nitric oxide mediates prostaglandins deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(18): 7534-9.
- Albrecht ED, Robb VA y Pepe GJ. 2004. Regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression and angiogenesis by estrogen during early baboon pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5803–5809.
- Albrecht ED y Pepe G J. 2010. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. *Int. J. Dev. Biol.* 54: 397.
- Alfaidy N, Chauvet S, Donadio-Andrei S, Salomon A, Saoudi Y, Richaud P, Aude-Garcia C, Hoffmann P, Andrieux A, Moulis JM, Feige JJ y Benharouga M. 2013. Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: role in oxidative stress and copper homeostasis. *Antioxid Redox Signal.* 18: 400-11.
- Al-Hijji J, Andolf E, Laurini R y Batra S. 2003. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 28: 1-51.
- Altmäe S, Reimand J, Hovatta O, Zhang P, Kere J, Laisk T, Saare M, Peters M, Vilo J, Stavreus-Evers A y Salumets A. 2012. Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. *Mol Endocrinol.* 26(1): 203-17.
- Anliker B y Chun J. 2004. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 15(5): 457-65.
- Aoki J, Inoue A y Okudaira S. 2008. Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim Biophys Acta.* 1781(9): 513-8.
- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R y Arai H. 2002. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem.* 277(50): 48737-44.
- Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P y Fortier MA. 2004a. Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. *Endocrinology.* 145(1): 407-17.
- Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren LA y Fortier MA. 2004b. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology.* 145(11): 5280-93.
- Arruvito L, Billordo A, Capucchio M, Prada ME y Fainboim L. 2009. IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. *J Reprod Immunol.* 82: 158–165.
- Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN y Cartwright JE. 2005. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 25: 102–108.

- Baker DL, Umstot ES, Desiderio DM y Tigyi GJ. 2000. Quantitative analysis of lysophosphatidic acid in human blood fractions. *Ann N Y Acad Sci.* 905: 267.
- Baker DL, Desiderio DM, Miller DD, Tolley B y Tigyi GJ. 2001. Direct quantitative analysis of lysophosphatidic acid molecular species by stable isotope dilution electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 292(2): 287-95.
- Basak S y Duttaroy AK. 2013. Effects of fatty acids on angiogenic activity in the placental extravillous trophoblast cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 88: 155-62.
- Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC y Wu G. 2009. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 138(2): 195-209.
- Bell SC. 1990. Assessment of endometrial differentiation and function. *Br Med Bull.* 46(3): 720-32.
- Beltrame JS, Sordelli MS, Cella M, Perez Martinez S, Franchi AM y Ribeiro ML. 2013. Lysophosphatidic acid increases the production of pivotal mediators of decidualization and vascularization in the rat uterus. *Placenta.* 34: 751-756.
- Benirschke K y Kaufmann P. 2000. *Pathology of the human placenta.* 4th ed. Springer; 1050.
- Bowen JM, Chamley L, Mitchell MD y Keelan JA. 2002. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: biosynthesis, secretion and roles in establishment of pregnancy in women. *Placenta.* 23: 239–256.
- Brosens IA, Robertson WB y Dixon HG. 1972. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology Annual.* 1: 177–191.
- Buhimschi IA, Yallampalli C, Buhimschi CS, Saade GR y Garfield RE. 2000. Distinct regulation of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate production by steroid hormones in the rat uterus. *Mol Hum Reprod.* 6(5): 404-14.
- Burrows D, King A y Loke YW. 1994. Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: Implications for vascular invasion during implantation. *Placenta.* 15: 21-33.
- Callegari EA, Ferguson-Gottschall S y Gibori G. 2005. PGF2a induced differential expression of genes involved in turnover of extracellular matrix in rat decidual cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 3: 3–13.
- Caluwaerts S, Vercruyse L, Luyten C y Pijnenborg R. 2005. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta.* 26: 574– 584.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA y Yoshinaga K. 2000. *Dev Biol.* 223(2): 217.
- Cartwright JE, Holden DP, Whitley GJ. 1999. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 128: 181-189.
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE y James JL. 2010. Remodelling at the maternal–fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction.* 140: 803–813.
- Cartwright JE y Whitley G, 2017. Strategies for investigating the maternal-fetal interface in the first trimester of pregnancy: What can we learn about pathology? *Placenta.* In press. doi: 10.1016/j.placenta.2017.05.003.
- Cha J, Sun X y Dey SK. 2012. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 18(12): 1754-67.

- Champion H, Innes BA, Robson SC, Lash GE y Bulmer JN. 2012. Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. *Molecular Human Reproduction*. 18: 391–400.
- Chen JZ, Wong MH, Brennecke SP y Keogh RJ. 2011. The effects of human chorionic gonadotrophin, progesterone and oestradiol on trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*. 342: 73-80.
- Chen JZ, Sheehan PM, Brennecke SP y Keogh RJ. 2012. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*. 349: 138–144.
- Chen SU, Chou CH, Hsinyu Lee, Chi-Hong Ho, Chung-Wu Lin, y Yu-Shih Yang. 2008. Lysophosphatidic Acid Up-Regulates Expression of Interleukin-8 and -6 in Granulosa-Lutein Cells through Its Receptors and Nuclear Factor- κ B Dependent Pathways: Implications for Angiogenesis of Corpus Luteum and Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: 935–943.
- Chen SU, Chou CH, Chao KH, Lee H, Lin CW, Lu HF y Yang YS. 2010. Lysophosphatidic Acid Up-Regulates Expression of Growth-Regulated Oncogene- α , Interleukin-8, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human First-Trimester Trophoblasts: Possible Roles in Angiogenesis and Immune Regulation. *Endocrinology*. 151(1): 369-79.
- Choudhury RH, Dunk CE, Lye SJ, Aplin JD, Harris LK y Jones RL. 2017. Extravillous Trophoblast and Endothelial Cell Crosstalk Mediates Leukocyte Infiltration to the Early Remodeling Decidual Spiral Arteriole Wall. *J Immunol*. 198(10): 4115-4128.
- Coan PM, Conroy N, Burton GJ y Ferguson-Smith AC. 2006. Origin and characteristics of glycogen cells in the developing murine placenta. *Dev Dyn*. 235: 3280–3294.
- Cong J, Diao HL, Zhao YC, Ni H, Yan YQ y Yang ZM. 2006. Differential expression and regulation of cyclooxygenases, prostaglandin E synthases and prostacyclin synthase in rat uterus during the peri-implantation period. *Reproduction*. 131(1):139-51.
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. 2000. Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 13384-13389.
- Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH y Chun J. 2002. Characterization of LPA2 (Edg4) and LPA1/LPA2 (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to LPA2. *Mol Cell Biol*. 22: 6921-6929.
- Daniel T, Liu H, Morrow J, Crews B y Marnett LJ. 1999. Thromboxane A2 is a Mediator of Cyclooxygenase-2-dependent Endothelial Migration and Angiogenesis. *Cancer Research*. 59: 4574 – 4577.
- Das MK, Basak S, Ahmed MS, Attramadal H y Duttaroy AK. 2014. Connective tissue growth factor induces tube formation and IL-8 production in first trimester human placental trophoblast cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 181: 183-88.
- DaSilva-Arnold S, James JL, Al-Khan A, Zamudio S y Illsley NP. 2015. Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial-mesenchymal transition. *Placenta*. 36(12): 1412-8.
- de Luca Brunori I, Battini L, Brunori E, Lenzi P, Paparelli A, Simonelli M, Valentino V y Genazzani AR. 2005. Placental barrier breakage in preeclampsia: ultrastructural evidence. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 118: 182-9.
- Dong YL y Yallampalli C. 1996. Interaction between nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in pregnant rat uteri. *Am J Physiol*. 270: E471-6.

- Dtehend R, Gratz P, Wallukat G, Shagdarsuren E, Plehm R, Brosen Jfl, Fiebeler A, Schneider W, Caluwaerts S, Vercruysst L, Pijnenborg R, Luft FC y Mueller ON. 2005. Agonistic auto antibodies to the ATI receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension*. 45: 742–746.
- Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B y Ahmed A. 2000. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol*. 156: 2185–2199.
- Eder AM, Sasagawa T, Mao M, Aoki J y Mills GB. 2000. Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clin Cancer Res*. 6(6): 2482-91.
- Edgell CJ, Haizlip JE, Bagnell CR, Packerham JP, Harrison P, Wilbourn B y Madden VJ. 1990. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol*. 26(12): 1167-72.
- Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, Than NG, Papp Z y Jai Kim C. 2006. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med*. 34(6): 447-58.
- Fraser R, Whitley GS, Johnstone AP, Host AJ, Sebire NJ, Thilaganathan B y Cartwright JE. 2012. Impaired decidual natural killer cell regulation of vascular remodelling in early human pregnancies with high uterine artery resistance. *J Pathol*. 228(3): 322-32.
- Fraser R, Whitley G, Thilaganathan B y Cartwright JE. 2015. Decidual natural killer cells regulate vessel stability: implications for impaired spiral artery remodeling. *J Reprod Immunol*. 110: 54–60.
- Gao F, Lei W, Diao HL, Hu SJ, Luan LM y Yang ZM. 2007. Differential expression and regulation of prostaglandin transporter and metabolic enzymes in mouse uterus during blastocyst implantation. *Fertil Steril*. 88(4): 1256.
- Gao Q, Tang J, Li N, Liu B, Zhang M, Sun M y Xu Z. 2017. What is precise pathophysiology in development of hypertension in pregnancy? Precision medicine requires precise physiology and pathophysiology. *Drug Discovery Today*. In press.
- Gellersen B, Wolf A, Kruse M, Schwenke M y Bamberger AM. 2013. Human endometrial stromal cell-trophoblast interactions: mutual stimulation of chemotactic migration and promigratory roles of cell surface molecules CD82 and CEACAM1. *Biol Reprod*. 28; 88(3):80.
- Gerrard JM y Robinson P. 1989. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*. 1001(3):282-5.
- Goldman S y Shalev E. 2006. Difference in progesterone-receptor isoforms ratio between early and late first-trimester human trophoblast is associated with differential cell invasion and matrix metalloproteinase 2 expression. *Biol. Reprod*. 74: 13–22.
- Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W y Huet-Hudson YM. 1998. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod*. 58(4): 875-9.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N y Lala PK. 1993. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*. 206: 204-211.
- Gregor W, Berthold H, Siwetz M, Lang I y Moser G. 2016. Arterial endothelial cytokines guide extravillous trophoblast invasion towards spiral arteries; an in-vitro study with the trophoblast cell line ACH-3P and female non-uterine endothelial cells. *Placenta*. 38: 49–56.

- Halasz M y Szekeres-Bartho J. 2013. The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* 97: 43–50
- Hama K, Bandoh K, Kakehi Y, Aoki J y Arai H. 2002. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett.* 523: 187-92.
- Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, Amano T, Suzuki H y Arai H. 2006. Lysophosphatidic receptor, LPA3, is positively and negatively regulated by progesterone and estrogen in the mouse uterus. *Life Sci.* 79(18): 1736-40.
- Hama K, Aoki J, Inoue A, Endo T, Amano T, Motoki R, Kanai M, Ye X, Chun J, Matsuki N, Shibasaki M y Arai H. 2007. Embryo spacing and implantation timing are differentially regulated by LPA3-mediated lysophosphatidic acid signaling in mice. *Biol. Reprod.* 77: 954-959.
- Hamilton GS y Kennedy TG. 1994. Uterine vascular changes after unilateral intrauterine infusion of indomethacin and prostaglandin E2 to rats sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod.* 50: 757-764.
- Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S y Mandelboim O. 2006. Decidual NK cell regulate key developmental processes at the human fetal–maternal interface. *Nat. Med.* 12: 1065–1074.
- Hansen HS. 1976. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. A review. *Prostaglandins.* 12(4): 647-79.
- Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD y Whitley GS. 2006. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism. *Am J Pathol.* 169(5): 1863-74.
- Harris LK y Aplin JD. 2007. Vascular remodeling and extracellular matrix breakdown in the uterine spiral arteries during pregnancy. *Reproductive Sciences.* 14: 28–34.
- Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Whitley GS y Aplin JD. 2007. BeWo cells stimulate smooth muscle cell apoptosis and elastin breakdown in a model of spiral artery transformation. *Human Reproduction.* 22: 2834–2841.
- Hazan AD, Smith SD, Jones RL, Whittle W, Lye SJ y Dunk CE. 2010. Vascular–leukocyte interactions: mechanisms of human decidual spiral artery remodeling in vitro. *American Journal of Pathology.* 177: 1017–1030.
- Highet AR, Buckberry S, Mayne BT, Khoda SM, Bianco-Miotto T y Roberts CT. 2016. First trimester trophoblasts forming endothelial-like tubes in vitro emulate a “blood vessel development” gene expression profile. *Gene Expr Patterns.* 21: 103-10.
- Ignarro LJ. 1990. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension.* 16(5): 477-83.
- Inhorn MC y Patrizio P. 2015 Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 21(4): 411-26.
- Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y y Taketani Y. 2009. Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *Am J Reprod Immunol.* 62(2): 90-5.
- Jovanovic M y VicovacL. 2009. Interleukin-6 stimulates cell migration, invasion and integrin expression in HTR-

- 8/SVneo cell line. *Placenta*. 30: 320 – 328.
- Kameda T, Matsuzaki N, Sawai K, Okada T, Saji F, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T y Tanizawa O. 1990. Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*. 11: 205-213.
 - Kam EP, Gardner L, Loke YW y King A. 1999. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod*. 14(8): 2131-8.
 - Kang J, Chapdelaine P, Parent J, Madore E, Laberge PY y Fortier MA. 2005. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(4): 2308-13.
 - Keogh RJ, Harris LK, Freeman A, Baker PN, Aplin JD, Whitley GS y Cartwright JE. 2007. Fetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death. *Circulation Research*. 100: 834–841.
 - Klauber N, Rohan RM, Flynn E y D'amato RJ. 1997. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nature Medicine*. 3: 443–446.
 - Khong TY, De Wolf F, Robertson WB y Brosens I. 1986. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol*. 93(10): 1049-59.
 - Knöfler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*. 54(2-3): 269-80.
 - Kuehl Jr. FA y Egan RW. 1980. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. *Science*. 210: 978–984.
 - Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
 - Langenbach R, Morham SG, Tian HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS y Smithies O. 1995. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell*. 83(3): 483-92.
 - Leach L, Badet J, Brownbill P, Harris L, Keogh R, Kalionis B y Whitley G. 2006. Endothelium, blood vessels and angiogenesis. A workshop report. *Placenta*. 27A: S26-9.
 - Lee BH, Park TC y Lee HJ. 2014. Influence of caffeine on the expression of human chorionic gonadotropin and progesterone receptors in human trophoblast cell lines, *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 93: 1334-1335.
 - Li Y, Zhu H, Klausen C, Peng B, Leung PC. 2015. Vascular endothelial growth factor-a (VEGF-A) mediates activin a-induced human trophoblast endotheliallike tube formation. *Endocrinology*. 156: 4257-368.
 - Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. 1997. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 91: 197-208.
 - Lim H, Gupta RA, Ma WG, Paria BC, Moller DE, Morrow JD, DuBois RN, Trzaskos JM y Dey SK. 1999. Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev*. 13(12): 1561
 - Lin CI, Chen CN, Chen JH y Lee H. 2006. Lysophospholipids increase IL-8 and MCP-1 expressions in human umbilical cord vein endothelial cells through an IL-1-dependent mechanism. *J Cell Biochem*. 99(4): 1216-32.

- Liu HS, Chu TY, Yu MH, Chang YK, Ko CS y Chao CF. 1998. Thromboxane and prostacyclin in maternal and fetal circulation in preeclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 63(1): 1-6.
- Liszewska E, Reinaud P, Dubois O y Charpigny G. 2012. Lysophosphatidic acid receptors in ovine uterus during estrous cycle and early pregnancy and their regulation by progesterone. *Domest Anim Endocrinol.* 42(1): 31-42.
- Livak KJ y Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25(4): 402-8.
- Llona-Minguez S, Ghassemian A y Helleday T. 2015. Lysophosphatidic acid receptor (LPA) modulators: The current pharmacological toolbox. *Prog Lipid Res.* 58: 51-75.
- Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, Buhimschi C, Huang SJ, Krikun G y Schatz F. 2008. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol.* 172(6): 1571–1579.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C y Vesce F. 2007. Control of human trophoblast function. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 5:6.
- Maliqueo M, Echiburú B y Crisosto N. 2016. Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. *Front Physiol.* 26; 7:152.
- Marwood M, Visser K, Salamonsen LA y Dimitriadis E. 2009. Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation. *Endocrinology.* 150: 2915–2923.
- Ma W, Tan J, Matsumoto H, Robert B, Abrahamson DR, Das SK y Dey SK. 2001. Adult tissue angiogenesis: evidence for negative regulation by estrogen in the uterus. *Mol Endocrinol.* 15(11): 1983-92.
- Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, Das SK, Trzaskos JM y Dey SK. 2002. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. *J Biol Chem.* 277: 29260-29267.
- McMaster MT, Zhou Y y Fisher SJ. 2004. Abnormal placentation and the syndrome of pre-eclampsia. *Semin Nephrol.* 24(6): 540–547.
- McEwan M, Lins RJ, Munro SK, Vincent ZL, Ponnampalam AP y Mitchell MD. 2009. Cytokine regulation during the formation of the fetal–maternal interface: focus on cell–cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20: 241–249.
- Merlie JP, Fagan D, Mudd J y Needleman P. 1988. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem.* 263(8): 3550-3.
- Ministerio de Salud (2015). Guía sobre fertilidad para equipos de atención primaria de la salud. Disponible en www.msal.gob.ar.
- Moolenaar WH. 1999. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res.* 253(1): 230-8.
- Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer I y Lyall F. 1997. Inducible (type II) nitric oxide synthase in human placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic and intrauterine growth- restricted pregnancies. *Placenta.* 18(4): 261-8.

- Naruse K, Lash GE, Innes BA, Otun HA, Searle RF, Robson SC y Bulmer JN. 2009. Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy. *Human Reproduction*. 24: 553–561.
- Naruse K, Innes BA, Bulmer JN, Robson SC, Searle RF y Lash GE. 2010. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 86: 148–150.
- Norman JE y Cameron IT. 1996. Nitric oxide in the human uterus. *Rev Reprod*. 1(1): 61-8.
- Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno MF y González E. 2001. Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Reprod Fertil Dev*. 13(5-6): 411-20.
- Norwitz ER, Schust DJ y Fisher SJ. 2001. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med*. 345 (19).
- Oliveira LG, Lash GE, Otun HA, Innes BA, Naruse K, Searle RF, Robson SC y Bulmer JN. 2007. IL8 promotes trophoblast cell invasion in vitro. *Reprod. Sci*. 14: 221A.
- Olofsson J y Leung PC. 1994. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol*. 100(1-2): 87-91.
- Ota H, Igarashi S, Oyama N, Suzuki Y y Tanaka T. 1999. Optimal levels of nitric oxide are crucial for implantation in mice. *Reprod Fertil Dev*. 11: 183-188.
- Pang Y, Dong J y Thomas P. 2015. Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor-alpha. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 308: E899– E911.
- Panetti TS, Nowlen J y Mosher DF. 2000. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20(4): 1013-9.
- Parr EL, Tung HN y Parr MB. 1987. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod*. 36(1): 211-25.
- Parfenova H, Parfenov VN, Shlopov BV, Levine V, Falkos S, Pourcyrous M y Leffler CW. 2001. Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 281: C166-C178.
- Patel S, Kilburn B, Imudia A, Armant DR y Skafar DF. 2015. Estradiol Elicits Proapoptotic and Antiproliferative Effects in Human Trophoblast Cells, *Biol. Reprod*. 93(74): 1-10.
- Plaisier M, Dennert I, Rost E, Koolwijk P, van Hinsbergh VW y Helmerhorst FM. 2009. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. *Human Reprod*. 24: 185-197.
- Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB y Brosens I. 1980. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta*. 1:3e19.
- Pijnenborg R, Robertson WB, Brosens I, y Dixon G. 1981. Trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*. 2: 71-91.
- Pijnenborg R, Vercruysse L, Verbist L y Van Assche FA. 1998. Interaction of interstitial trophoblast with placental bed capillaries and venules of normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Placenta*. 19(8): 569-75.

- Pijnenborg R, Vercruyssen L y Hanssens M. 2006. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta*. 27: 939e58.
- Purcell TL, Given R, Chwalisz K y Garfield RE. 1999. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Mol Hum Reprod*. 5: 467-475.
- Rabbani ML y Rogers PA. 2001. Role of vascular endothelial growth factor in endometrial vascular events before implantation in rats. *Reproduction*. 122(1): 85-90.
- Reese J, Paria BC, Brown N, Zhao X, Morrow JD y Dey SK. 2000. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(17): 9759-64.
- Red-Horse K, Rivera J, Schanz A, Zhou Y, Winn V, Kapidzic M, Maltepe E, Okazaki K, Kochman R, Vo KC, Giudice L, Erlebacher A, McCune JM, Stoddart CA y Fisher SJ. 2006. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation. *Journal of Clinical Investigation*. 116: 2643–2652.
- Robb VA, Pepe GJ y Albrecht ED. 2004. Acute temporal regulation of placental vascular endothelial growth/permeability factor expression in baboons by estrogen. *Biol. Reprod*. 71: 1694–1698.
- Rockwell LC, Pillai S, Olson CE y Koos RD. 2002. Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol Reprod*. 67(6): 1804-10.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG y Needleman P. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(15): 7240.
- Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M y Hammarström S. 1975. Prostaglandins. *Annu Rev Biochem*. 44: 669-95.
- Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y y Tigyi G. 2002. Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem*. 277(24): 21197-206.
- Saxena D, Purohit SB, Kumer GP y Laloraya M. 2000. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. *Nitric Oxide*. 4(4): 384-91.
- Schiessl B, Innes BA, Bulmer JN, Otun H, Chadwick TJ, Robson SC y Lash GE. 2009. Localization of Angiogenic Growth Factors and Their Receptors in the Human Placental Bed Throughout Normal Human Pregnancy. 30(1): 79–87
- Schlafke S y Enders AC. 1975. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod*. 12(1): 41-65.
- Shen Z, Belinson J, Morton RE, Xu Y y Xu Y. 1998. Phorbol 12-myristate 13-acetate stimulates lysophosphatidic acid secretion from ovarian and cervical cancer cells but not from breast or leukemia cells. *Gynecol Oncol*. 71(3): 364-8.
- Smith WL, Sonnenburg WK, Allen ML, Watanabe T, Zhu J y el-Harith EA. 1989. The biosynthesis and actions of prostaglandins in the renal collecting tubule and thick ascending limb. *Adv Exp Med Biol*. 259: 131-47.
- Smith WL y Marnett LJ. 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1083: 1-17.

- Smith SD, Dunk CE, Aplin JD, Harris LK y Jones RL. 2009. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *American Journal of Pathology*. 174: 1959–1971.
- Smith-Jackson K, Hentschke MR, Poli-de-Figueiredo CE, Pinheiro da Costa BE, Kurlak LO, Broughton Pipkin F, Czajka A y Mistry HD. 2015. Placental expression of eNOS, iNOS and the major protein components of caveolae in women with pre-eclampsia. *Placenta*. 36(5): 607-10.
- Soares MJ, Chakraborty D, Renaud SJ, Kubota K, Bu P, Konnq T y Rum MAK. 2012. Regulatory Pathways Controlling the Endovascular Invasive Trophoblast Cell Lineage. *J Reprod Dev*. 58(3): 283–287.
- Soncin F, Natale D y Parast MM. 2015. Signaling pathways in mouse and human trophoblast differentiation: a comparative review. *Cell Mol Life Sci*. 72(7): 1291–1302.
- Sookvanichsilp N y Pulbutr P. 2002. Anti-implantation effects of indomethacin and celecoxib in rats. *Contraception*. 65: 373–378.
- Sordelli MS, Beltrame JS, Burdet J, Zotta E, Pardo R, Cella M, Franchi AM y Ribeiro ML. 2011. The effect of anandamide on uterine nitric oxide synthase activity depends on the presence of the blastocyst. *PLoS One*. 6(4): e18368.
- Sordelli MS, Beltrame JS, Cella M, Gervasi MG, Perez Martinez S, Burdet J, Zotta E, Franchi AM y Ribeiro ML. 2012. Interaction between lysophosphatidic acid, prostaglandins and the endocannabinoid system during the window of implantation in the rat uterus. *PLoS One*. 7(9): e46059.
- Sordelli MS*, Beltrame JS*, Zotta E, Gomez N, Dmytrenko G, Sales ME, Blois SM, Davio C, Martinez SP, Franchi AM y Ribeiro ML. 2017. Endogenous lysophosphatidic acid participates in vascularization and decidualization at the maternal-fetal interface in the rat. *Reprod Fertil Dev*. doi:10.1071/RD16235. *Ambos autores contribuyeron de igual manera.
- Stocco CO y Deis RP. 1998. Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin F2 alpha in LH- induced luteolysis in pregnant rat. *J Endocrinol*. 156: 253-259.
- Staun-Ram E y Shalev E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol*. 20; 3-56.
- Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E y Liotta LA. 1992. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem*. 267(4): 2524-9.
- Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, Romero R y Mor G. 2009. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta*.30(11): 939-48.
- Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K, Yoshioka Y y Tokumura A. 2002. Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. *J Lipid Res*. (12): 2049-55.
- Sookvanichsilp N y Pulbutr P. 2002. Anti-implantation effects of indomethacin and celecoxib in rats. *Contraception*. 65: 373-378.
- Telugu BP, Adachi K, Schlitt JM, Ezashi T, Schust DJ, Roberts RM y Schulzc LC. 2013. Comparison of extravillous trophoblast cells derived from human embryonic stem cells and from first trimester human placentas. *Placenta*. 34: 536e543.

- Thaxton JE y Sharma S. 2010. Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* 63(6): 482-91.
- Thomson AJ, Telfer JF, Kohnen G, Young A, Cameron IT, Greer IA y Norman JE. 1997. Nitric oxide synthase activity and localization do not change in uterus and placenta during human parturition. *Hum Reprod.* 12(11): 2546-52.
- Tigyi G y Miledi R. 1992. Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem.* 267(30): 21360-7.
- Tigyi G y Parrill AL. 2003. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res.* 42(6): 498-526.
- Tigyi G. 2010. Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol.* 161(2): 241-70.
- Tokumura A. 1995. A family of phospholipid autacoids: occurrence, metabolism and bioactions. *Prog Lipid Res.* 34(2): 151-84.
- Tokumura A, Miyake M, Nishioka Y, Yamano S, Aono T y Fukuzawa K. 1999. Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of in vitro fertilization patients. *Biol Reprod.* 61(1): 195-9.
- Tokumura A, Kanaya Y, Miyake M, Yamano S, Irahara M y Fukuzawa K. 2002a. Increased production of bioactive lysophosphatidic acid by serum lysophospholipase D in human pregnancy. *Biol Reprod.* 67(5): 1386-92.
- Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K y Fukuzawa K. 2002b. Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem.* 277(42): 39436-42.
- Tokumura A, Kume T, Taira S, Yasuda K y Kanzaki H. 2009. Altered activity of lysophospholipase D, which produces bioactive lysophosphatidic acid and choline, in serum from women with pathological pregnancy. *Mol Human Reprod.* 15(5): 301–310.
- Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, Fritz MA, Kowalik AI, Meyer WR y Lessey BA. 2003. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril.* 79(4): 970-4.
- Van meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradère JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH y Jonkers J. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol.* 26: 5015-22.
- van Mourik MSM, Macklon NS y Heijnen CJ. 2009. Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J. Leuk. Biol.* 85: 4–19.
- Van Sinderen M, Menkhorst E, Winship A, Cuman C y Dimitriadis E. 2013. Preimplantation human blastocyst-endometrial interactions: the role of inflammatory mediators. *Am J Reprod Immunol.* 69(5): 427-40.
- Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C y Pijneborg R. 2006. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta.* 27: 22–33.
- Walsh SW y Coulter S. 1989. Increased placental progesterone may cause decreased placental prostacyclin production in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 161: 1586–1592.
- Wang Y, Lewis DF, Gu Y, Zhang Y, Alexander JS y Granger DN. 2004. Placental trophoblast-derived factors diminish endothelial barrier function. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2421-8.

- Wang H y Dey SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet.* 7(3): 185-99.
- Wang Q, Shen L, Huang W, Song Y, Xiao L, Xu W y Liu Y. 2013. Vasculogenesis of decidua side population cells of first-trimester pregnancy. *Stem Cell Res. Ther.* 4(3): 50.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, Tomiya T, Tejima K, Nishikawa T, Arai M, Yanase M, Aoki J, Arai H, Omata M, Fujiwara K y Yatomi Y. 2007. Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci.* 81(12): 1009-15.
- Weimar CH, Kavelaars A, Brosens JJ, Gellersen B, de Vreeden-Elbertse JM, Heijnen CJ y Macklon NS. 2012. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. *PLoS One.* 7(7): e41424.
- Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S y Vane JR. 1980. Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature.* 284(5753): 271-3.
- Whitley GS y Cartwright JE. 2009. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *Journal of Anatomy.* 215: 21–26.
- Whitley GS y Cartwright JE. 2010. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta.* 31: 465–474.
- Xiao Y, Chen Y, Kennedy AW, Belinson J y Xu Y. 2000. Evaluation of plasma lysophospholipids for diagnostic significance using electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) analyses. *Ann N Y Acad Sci.* 905: 242-59.
- Xiao YJ, Schwartz B, Washington M, Kennedy A, Webster K, Belinson J y Xu Y. 2001. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal Biochem.* 290(2): 302-13.
- Wu KK. 1995. Molecular regulation and augmentation of prostacyclin biosynthesis. *Agents Actions Suppl.* 45: 11-7.
- Xu B, Charlton F, Makris A y Hennessy A. 2014. Nitric oxide (NO) reversed TNF-alfa inhibition of trophoblast interaction with endothelial cellular networks. *Placenta.* 35: 417-421.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J y Chun J. 2005. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature.* 435(7038): 104-8.
- Ye X. 2008. Lysophospholipid signaling in the function and pathology of the reproductive system. *Hum Reprod Update.* 14(5): 519-36.
- Yung YC, Stoddard NC y Chun J. 2014. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. *J. Lipid Res.* 55: 1192–1214.
- Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, Wang H y Armant RD. 2013. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med.* 34(5): 939–980.
- Zhao S, Gu Y, Dong Q, Fan R y Wang Y. 2008. Altered interleukin-6 receptor, IL-6R and gp130, production and expression and decreased SOCS-3 expression in placentas from women with pre-eclampsia. *Placenta.* 29: 1024-1028.

- Zhao L, Wu Y, Xu Z, Wang H, Zhao Z, Li Y, Yang P y Wei X. 2012. Involvement of COX-2/PGE2 signalling in hypoxia-induced angiogenic response in endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 16(8): 1840-55.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M y Damsky CH. 1997a. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest.* 99: 2139-2151.
- Zhou Y, Damsky CH y Fisher SJ. 1997b. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest.* 99: 2152-64.