



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***“Formación de la vasculatura placentaria y su desregulación  
frente a un estrés osmótico. Participación de la acuaporina-1  
y la acuaporina-4, y su interacción con caveolina-1”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área Ciencias Biológicas

*Autora: Lic. Julieta Reppetti*

*Director de tesis: Dra. Alicia E. Damiano*  
*Director adjunto: Dra. Nora Alicia Martínez*  
*Consejero de Estudios: Dra. Cecilia Varone*

Laboratorio de Biología de la Reproducción  
Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay  
(IFIBIO- Houssay- UBA- CONICET)

Buenos Aires, 20 de Julio de 2023

# AGRADECIMIENTOS

---

*Quisiera agradecer a todos aquellos que me ayudaron a completar este proyecto:*

*A la Universidad de Buenos Aires y el CONICET por las becas otorgadas y subsidios que me permitieron llevar adelante este proyecto.*

*A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por mi formación.*

*Al IFIBIO Houssay, por brindar abiertamente sus espacios para llevar adelante gran parte de este proyecto.*

*Mi más profundo agradecimiento a mis directoras, Alicia Damiano y Nora Martínez, gracias por su dedicación, guía, compromiso y cariño durante todos estos años. Por darme fuerzas siempre para seguir adelante a pesar de que las cosas no salieran como esperábamos y por contenerme siempre.*

*A Cecilia Varone, mi consejera de estudios, por haberme acompañado durante estos años.*

*A todos mis compañeros del Laboratorio de Biología de la Reproducción, Natalia Szpilbarg, Mauricio Di Paola, Mauricio Castro Parodi, Matías Sierra, Nazarena Fernández y Marcus Reis, por compartir el día a día del laboratorio y ayudarme con todo lo que necesité. En particular, a mi compañera y amiga Yollyseth Medina, gracias por tus enseñanzas, por las charlas de todos los días, el cariño y tu amistad. Fue hermoso transitar este camino juntas.*

*A Mariana Farina, Paula Accialini y Tomás Etcheverry, del CEFyBO por su presencia, charlas, consejos y ayuda permanente durante todo este tiempo.*

*A todo el Laboratorio de Fisiopatogenia del IFIBIO Houssay por su invaluable ayuda y por tener las puertas siempre abiertas para nosotros.*

*A Natalia Beltramone, por su gran ayuda en cultivo celular, y a Juan Casal por su ayuda con los experimentos de modelado in silico.*

*A Carlos Escudero de la Universidad de Bío-Bío en Chile por recibirme en su laboratorio y enseñarme el cultivo primario de microvasculatura, y a Germán Gornalusse por invitarme y recibirme tan amablemente en su laboratorio de la Universidad de Washington en Estados Unidos y ayudarme con los últimos experimentos.*

*A mis amigas de la vida por su apoyo incondicional durante todos estos años, agradezco todos los días tenerlas en mi vida.*

*A mis padres, Lucía y Diego, y a mis hermanas, Flopi y Carito, por su amor, por acompañarme, estar cerca siempre y ser mis pilares. A mis abuelos, por su cariño y por prenderme una velita cada vez que lo pedí.*

*A mis suegros, cuñados y sobrinos por su amor y contención.*

*Y finalmente a Tomi, por el amor y el apoyo de todos los días, por incentivarme a crecer, acompañarme en cada decisión, estar al lado mío y cuidarme en todo momento.*

**GRACIAS A TODOS!**

## PUBLICACIONES

---

### Publicaciones que surgieron de resultados de este trabajo de tesis:

- ✓ **Reppetti J.**, Etcheverry T., Sierra M.N., Damiano A.E., Farina M., Martínez N. ***Osmotic stress induces apoptosis in extravillous trophoblast cells. Role of TRPV-1.*** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2019 Jun 18;514(1):58-63.
- ✓ **Reppetti J.**, Reca A., Seyahian E.A., Medina Y., Martínez N., Szpilbarg N., Damiano A.E. ***Intact caveolae are required for proper extravillous trophoblast migration and differentiation.*** Journal of Cellular Physiology. 2020 Apr;235(4):3382-3392.
- ✓ **Reppetti J.**, Medina Y., Farina M., Damiano A.E., Martínez N.A. ***Hyperosmolarity Impairs Human Extravillous Trophoblast Differentiation by Caveolae Internalization.*** Frontiers in Physiology. 2021 Dec 6;12:760163.

### Publicaciones como co-autor durante el transcurso del doctorado:

- ✓ Szpilbarg N., Martínez N., Di Paola M., **Reppetti J.**, Medina Y., Seyahian A., Castro Parodi M., Damiano A. E., ***New insights into the role of placental aquaporins and the pathogenesis of preeclampsia.*** Frontiers in Physiology. 2018 Oct 30;9:1507.
- ✓ Scalise M.L., Amaral M.M., **Reppetti J.**, Damiano A.E., Ibarra C., Sacerdoti F. ***Cytotoxic effects of Shiga toxin-2 on human extravillous trophoblast cell lines.*** Reproduction. 2019 Mar;157(3):297-304.
- ✓ Dos Passos Junior RR, de Freitas RA, **Reppetti J.**, Medina Y, De la Justina V, Bach CW, Bomfim GF, Lima VV, Damiano AE, Giachini FR. ***High Levels of Tumor Necrosis Factor-Alpha Reduce Placental Aquaporin 3 Expression and Impair in vitro Trophoblastic Cell Migration.*** Frontiers in Physiology. 2021 Jun 29;12:696495.
- ✓ Medina Y., Acosta L., **Reppetti J.**, Corominas A., Bustamante J., Szpilbarg N., Damiano A.E. ***Lactic Acid Transport Mediated by Aquaporin-9: Implications on the Pathophysiology of Preeclampsia.*** Frontiers in Physiology. 2021 Dec 2;12:774095.

# ÍNDICE GENERAL

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS .....                                                      | 2  |
| PUBLICACIONES .....                                                        | 4  |
| ABREVIATURAS .....                                                         | 9  |
| RESUMEN .....                                                              | 13 |
| ABSTRACT .....                                                             | 15 |
| INTRODUCCIÓN .....                                                         | 17 |
| FORMACIÓN DE LA PLACENTA HUMANA .....                                      | 17 |
| Remodelación de las arterias espirales uterinas .....                      | 20 |
| DESARROLLO DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS, VASCULOGÉNESIS Y ANGIOGÉNESIS ..... | 22 |
| Distintos tipos de células endoteliales placentarias .....                 | 25 |
| Regulación de la formación y función placentaria temprana .....            | 26 |
| ACUAPORINAS .....                                                          | 27 |
| Estructura de las acuaporinas .....                                        | 28 |
| Clasificación de las acuaporinas .....                                     | 30 |
| Distribución de las acuaporinas .....                                      | 32 |
| Acuaporinas y placenta humana .....                                        | 32 |
| AQP1 y AQP4 en vasculatura placentaria .....                               | 34 |
| Acuaporinas y migración celular .....                                      | 34 |
| CAVEOLAS Y CAVEOLINA-1 .....                                               | 36 |
| Estructura de las caveolas .....                                           | 36 |
| Distribución de las caveolas .....                                         | 38 |
| Caveolinas .....                                                           | 38 |
| La biogénesis de caveola y la vía biosintética de caveolina .....          | 39 |
| Diversos roles biológicos de las caveolas .....                            | 40 |
| Caveolas y migración celular .....                                         | 42 |
| ESTRÉS CELULAR .....                                                       | 43 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....                                                | 46 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                 | 48 |
| 1. REACTIVOS .....                                                         | 48 |
| 1.1 Reactivos generales .....                                              | 48 |
| 1.2 Soluciones y medios de incubación .....                                | 49 |
| 1.3 Cultivo celular .....                                                  | 50 |
| 1.4 Kits comerciales .....                                                 | 51 |
| 1.5 Primers .....                                                          | 51 |

|       |                                                                                                                                                         |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6   | Anticuerpos.....                                                                                                                                        | 52 |
| 1.7   | ARNs de interferencia (siRNA, small interfering RNA).....                                                                                               | 52 |
| 2.    | MÉTODOS .....                                                                                                                                           | 53 |
| 2.1   | Cultivo de líneas celulares.....                                                                                                                        | 53 |
| 2.1.1 | Líneas celulares .....                                                                                                                                  | 53 |
| 2.1.2 | Mantenimiento y subcultivo de las células.....                                                                                                          | 53 |
| 2.2   | Criopreservación de líneas celulares .....                                                                                                              | 54 |
| 2.2.1 | Congelamiento de células.....                                                                                                                           | 54 |
| 2.2.2 | Descongelamiento de células .....                                                                                                                       | 55 |
| 2.3   | Cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana ( <i>human placental microvascular endothelial cells</i> - hPMEC) ..... | 55 |
| 2.3.1 | Obtención de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana (hPMEC) ..                                                                     | 55 |
| 2.4   | Ensayos de viabilidad y proliferación celular .....                                                                                                     | 56 |
| 2.4.1 | Ensayo colorimétrico de MTT .....                                                                                                                       | 56 |
| 2.4.2 | Exclusión del colorante vital Azul de Tripán .....                                                                                                      | 57 |
| 2.5   | Inhibición de la funcionalidad de AQPs y Cav-1.....                                                                                                     | 57 |
| 2.5.1 | Bloqueo farmacológico de AQPs.....                                                                                                                      | 57 |
| 2.5.2 | Silenciamiento de la expresión de AQP1 y AQP4 .....                                                                                                     | 58 |
| 2.5.3 | Disrupción de caveolas por medio de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD).....                                                                   | 59 |
| 2.5.4 | Silenciamiento de la expresión de Cav-1 .....                                                                                                           | 59 |
| 2.6   | Evaluación de la expresión de ARNm .....                                                                                                                | 60 |
| 2.6.1 | Extracción de ARN total y obtención de ADNc .....                                                                                                       | 60 |
| 2.6.2 | RT-PCR Semicuantitativa.....                                                                                                                            | 61 |
| 2.6.3 | RT-PCR cuantitativa.....                                                                                                                                | 61 |
| 2.7   | Evaluación de la expresión de proteínas .....                                                                                                           | 62 |
| 2.7.1 | Determinación de la concentración de proteínas .....                                                                                                    | 62 |
| 2.7.2 | Obtención y procesamiento de lisados celulares .....                                                                                                    | 62 |
| 2.7.3 | Acondicionamiento de muestras para SDS-PAGE.....                                                                                                        | 63 |
| 2.7.4 | SDS-PAGE .....                                                                                                                                          | 63 |
| 2.7.5 | Western blot semicuantitativo .....                                                                                                                     | 63 |
| 2.8   | Análisis <i>in silico</i> de sitios putativos de unión a Cav-1 en proteína AQP1 .....                                                                   | 64 |
| 2.9   | Ensayos de inmunofluorescencia.....                                                                                                                     | 65 |
| 2.9.1 | Inmunofluorescencia indirecta .....                                                                                                                     | 65 |
| 2.9.2 | Doble inmunofluorescencia confocal de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 .....                                                                                     | 65 |
| 2.10  | Inmunoprecipitación.....                                                                                                                                | 66 |
| 2.11  | Ensayo de migración celular .....                                                                                                                       | 67 |

|                  |                                                                                                                                                                    |     |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.12             | Ensayo de tubulogénesis o formación estructuras tipo tubular- endotelial .....                                                                                     | 68  |
| 2.13             | Medición del tamaño celular .....                                                                                                                                  | 69  |
| 2.14             | Estudio del efecto del estrés osmótico .....                                                                                                                       | 70  |
| 2.15             | Medición de la osmolaridad del medio de cultivo .....                                                                                                              | 70  |
| 2.16             | Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....                                                                                                                 | 70  |
| 2.17             | Análisis estadístico de los resultados experimentales .....                                                                                                        | 71  |
| RESULTADOS ..... |                                                                                                                                                                    | 72  |
| 1.1              | Caracterización de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                                                                                        | 72  |
|                  | Expresión y localización de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en vellosidades coriónicas de placenta humana .....                                                        | 72  |
|                  | Puesta a punto del cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana (hPMEC) .....                                                   | 74  |
|                  | Expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                                     | 76  |
| 1.2              | Interacción entre AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 .....                                                                                                                    | 78  |
|                  | Análisis <i>in silico</i> de la interacción entre AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 humanas .....                                                                            | 78  |
|                  | Co-localización de las AQPs y la Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                                                         | 80  |
|                  | Co-inmunoprecipitación de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                                              | 81  |
| 1.3              | Participación de la AQP1 y la AQP4 en los procesos de angiogénesis en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                             | 82  |
|                  | Rol de la AQP1 y la AQP4 en la funcionalidad de células endoteliales de macrovasculatura .....                                                                     | 82  |
|                  | Efecto del bloqueo de la AQP1 y la AQP4 sobre la migración de células de microvasculatura placentaria .....                                                        | 92  |
| 1.4              | Participación de las caveolas/ Caveolina-1 en los procesos de angiogénesis en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria .....                     | 102 |
|                  | Rol de la caveola/ Cav-1 en la funcionalidad de la macrovasculatura placentaria .....                                                                              | 102 |
|                  | Rol de la caveola/ Cav-1 en la funcionalidad de la microvasculatura placentaria .....                                                                              | 107 |
| 2.               | Evaluación en células EVT de la participación de la AQP1 y su interacción con la Cav-1 en la remodelación de las arterias espirales maternas .....                 | 113 |
|                  | Diferenciación del EVT endovascular .....                                                                                                                          | 113 |
| 3.               | Evaluación del efecto del estrés hiperosmolar sobre la expresión y función de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 durante la formación de la vasculatura placentaria ..... | 118 |
|                  | Efecto del estrés hiperosmolar en la macrovasculatura placentaria .....                                                                                            | 119 |
|                  | Efecto del estrés hiperosmolar en la microvasculatura placentaria .....                                                                                            | 123 |
|                  | Efecto del estrés hiperosmolar en los microdominios de caveolas y su impacto en la diferenciación de células de trofoblasto extraveloso (EVT) .....                | 129 |

DISCUSIÓN .....137

CONCLUSIONES.....150

PERSPECTIVAS.....151

BIBLIOGRAFIA.....153



## ABREVIATURAS

---

|                         |                                                                                                               |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - <b>AC</b>             | Anticuerpo                                                                                                    |
| - <b>AcM</b>            | Anticuerpo monoclonal                                                                                         |
| - <b>AcP</b>            | Anticuerpo policlonal                                                                                         |
| - <b>ADN</b>            | Ácido desoxirribonucleico                                                                                     |
| - <b>ADNc</b>           | ADN copia. También conocido como cDNA por sus siglas en inglés                                                |
| - <b>ANOVA</b>          | Análisis de la varianza de un factor                                                                          |
| - <b>AQP</b>            | Acuaporina                                                                                                    |
| - <b>Arg</b>            | Arginina                                                                                                      |
| - <b>ARN</b>            | Ácido ribonucleico                                                                                            |
| - <b>ARNm</b>           | ARN mensajero. También conocido como mRNA por sus siglas en inglés                                            |
| - <b>AVD</b>            | Disminución del volumen apoptótico                                                                            |
| - <b>BSA</b>            | Seroalbúmina bovina                                                                                           |
| - <b>Cav-1</b>          | Caveolina-1                                                                                                   |
| - <b>CE</b>             | Célula endotelial                                                                                             |
| - <b>CD31</b>           | Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas, también conocida como PECAM-1                      |
| - <b>CO<sub>2</sub></b> | Dióxido de carbono                                                                                            |
| - <b>CT</b>             | Citotrofoblasto                                                                                               |
| - <b>Cys</b>            | Cisteína                                                                                                      |
| - <b>DAPI</b>           | Marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN |
| - <b>DMEM/F-12</b>      | Medio esencial Dulbecco modificado con medio Ham F12                                                          |
| - <b>DMSO</b>           | Dimetilsulfóxido                                                                                              |
| - <b>EDTA</b>           | Ácido etilendiaminotetraacético                                                                               |
| - <b>EVT</b>            | Trofoblasto extravelloso                                                                                      |
| - <b>FGF</b>            | Factor de crecimiento de fibroblastos                                                                         |
| - <b>FGR</b>            | Restricción del crecimiento fetal                                                                             |
| - <b>hCG</b>            | Gonadotropina coriónica humana                                                                                |
| - <b>HELLP</b>          | Síndrome caracterizado por hemólisis, elevación de enzimas hepáticas, trombocitopenia                         |
| - <b>HEPES</b>          | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetano sulfónico                                                            |

|                                |                                                                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| - <b>Hg</b>                    | Símbolo del elemento químico mercurio                                             |
| - <b>His</b>                   | Histidina                                                                         |
| - <b>hPMEC</b>                 | Células endoteliales microvasculares placentarias humanas                         |
| - <b>hPL</b>                   | Lactógeno placentario humano                                                      |
| - <b>HRP</b>                   | Enzima peroxidasa de rabanito                                                     |
| - <b>HUVEC</b>                 | Células endoteliales de la vena umbilical humana                                  |
| - <b>ICAM1</b>                 | Molécula de adhesión intercelular 1                                               |
| - <b>ICQ</b>                   | Inmunocitoquímica                                                                 |
| - <b>IHQ</b>                   | Inmunohistoquímica                                                                |
| - <b>Ig</b>                    | Inmunoglobulina                                                                   |
| - <b>IP</b>                    | Inmunoprecipitación                                                               |
| - <b>kDa</b>                   | Kilodalton                                                                        |
| - <b>LDH</b>                   | Lactato Deshidrogenasa                                                            |
| - <b>L-Glu</b>                 | L-Glutamina                                                                       |
| - <b>lncARN</b>                | ARN largos no codificantes. También conocido como lncRNA por sus siglas en inglés |
| - <b>M199</b>                  | Medio 199                                                                         |
| - <b>M<math>\beta</math>CD</b> | Metil- $\beta$ -ciclodextrina                                                     |
| - <b>MCI</b>                   | Masa celular interna                                                              |
| - <b>MEC</b>                   | Matriz extracelular                                                               |
| - <b>MET</b>                   | Microscopía electrónica de transmisión                                            |
| - <b>MMLV</b>                  | Virus de la leucemia murina de Moloney                                            |
| - <b>mOsM</b>                  | Miliosmolar                                                                       |
| - <b>MSA</b>                   | Alineación de secuencias múltiples                                                |
| - <b>MTT</b>                   | Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio                     |
| - <b>MVBs</b>                  | Endosomas multivesiculares                                                        |
| - <b>NO</b>                    | Óxido nítrico                                                                     |
| - <b>NPA</b>                   | Motivos conservados de asparagina-prolina-alanina                                 |
| - <b>OD</b>                    | Dominio de oligomerización                                                        |
| - <b>PBS</b>                   | Buffer fosfato salino                                                             |
| - <b>PBST</b>                  | Buffer fosfato salino con Tween-20                                                |
| - <b>PCR</b>                   | Reacción en cadena de la polimerasa                                               |
| - <b>PE</b>                    | Preeclampsia                                                                      |

- **PECAM-1** Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas, también conocida como CD31
- **PKA** Proteína quinasa A
- **PKC** Proteína quinasa C
- **PIGF** Factor de crecimiento placentario
- **PMSF** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **pO<sub>2</sub>** Presión parcial de oxígeno
- **PSA** Persulfato de amonio. También conocido como APS por sus siglas en inglés
- **RE** Retículo endoplásmico
- **RCIU** Restricción del crecimiento intrauterino
- **RPL30** Proteína Ribosomal L30
- **RT-PCR** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
- **SCT** Sinciciotrofoblasto
- **SD** Dominio de andamiaje. También conocido como dominio *scaffold* por sus siglas en inglés
- **SDS-PAGE** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
- **SEM** Error estándar de la media
- **SFB** Suero fetal bovino
- **siCTRL-FITC** ARN de interferencia inespecífico conjugado a isotiocianato de fluoresceína
- **siRNA** ARN de interferencia
- **SRP** Partícula de reconocimiento de señal
- **TAE** Buffer Tris- Ácido Acético- EDTA
- **TBE** Buffer Tris- Ácido Bórico- EDTA
- **TBP** Proteína de unión a TATA
- **TEA** Cloruro de tetraetilamonio
- **TEMED** Etramilenetilendiamina
- **TOP1** ADN topoisomerasa 1
- **Tris** Tris(hidroximetil)aminometano
- **TRPV-1** Receptor de potencial transitorio V1
- **Tyr** Tirosina
- **UA** Unidades arbitrarias
- **UV** Ultravioleta
- **VECAM-1** Molécula de adhesión de células vasculares 1

- **VEGF** Factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGFR2** Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
- **VT** Trofoblasto vellosa
- **WB** Western blot

## RESUMEN

---

***“Formación de la vasculatura placentaria y su desregulación frente a un estrés osmótico. Participación de la acuaporina-1 y la acuaporina-4, y su interacción con caveolina-1”***

La correcta formación y desarrollo de la vasculatura placentaria, así como la adecuada remodelación de las arterias espirales uterinas son procesos críticos para garantizar una gestación saludable, ya que de ellos depende la llegada de oxígeno y nutrientes al embrión en crecimiento.

Durante la angiogénesis placentaria, se requieren de movimientos celulares rápidos y dirigidos que involucran la expansión de la membrana plasmática, la polarización de moléculas señalizadoras y la remodelación del citoesqueleto que ocurre gracias a la presencia de acuaporinas (AQPs). Estas proteínas facilitan los movimientos rápidos de agua a través de las membranas celulares en respuesta a los gradientes osmóticos. En algunos tipos celulares, estas proteínas se localizan en estructuras lipídicas de la membrana plasmática denominadas caveolas, las cuales presentan a la proteína caveolina-1 (Cav-1) como principal componente estructural. Cav-1 se utiliza como proteína marcadora de dichas estructuras y desempeña un papel clave en la señalización celular.

La hipótesis del presente trabajo es que tanto las AQPs como la Cav-1 son imprescindibles para el proceso de angiogénesis placentaria y el estrés osmolar conduce a alteraciones de este proceso. Nuestro objetivo fue estudiar tanto en la vasculatura de las vellosidades coriónicas como en el trofoblasto extraveloso la participación de AQP1, AQP4 y Cav-1 en la angiogénesis placentaria y su desregulación en condiciones de hiperosmolaridad. Observamos que tanto el bloqueo de AQP1 y AQP4 como el desensamblado de caveolas logrado por compuestos farmacológicos, como la inhibición de su expresión proteica mediada por siRNAs, alteran procesos clave para la angiogénesis como la migración celular y la tubulogénesis tanto en células de macrovasculatura como de microvasculatura placentaria y en células de trofoblasto extraveloso. Por otro lado, demostramos que la hiperosmolaridad induce la internalización de caveolas en células de trofoblasto extraveloso y disminuye la migración y la tubulogénesis de las células endoteliales placentarias.

En resumen, hemos demostrado que AQP1, AQP4 y Cav-1 son indispensables para la correcta formación de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria, como así también para la correcta remodelación de las arterias espirales uterinas llevada a cabo por el trofoblasto extraveloso. Observamos que la hiperosmolaridad produce la desregulación de las proteínas de estudio, y altera los procesos celulares relacionados con la angiogénesis placentaria, lo que podría contribuir a la fisiopatogenia de distintas patologías gestacionales como la preeclampsia y/o restricción del crecimiento intrauterino.

Palabras clave: vasculatura placentaria, acuaporina-1, acuaporina-4, caveola/caveolina-1, trofoblasto extraveloso, hiperosmolaridad.

## ABSTRACT

---

### **“Formation of the placental vasculature and its deregulation against osmotic stress. Participation of aquaporin-1 and aquaporin-4, and their interaction with caveolin-1”**

The correct formation and development of the placental vasculature, as well as the adequate remodeling of the uterine spiral arteries are critical processes to guarantee a healthy pregnancy, since the arrival of oxygen and nutrients to the growing embryo depends on them.

During placental angiogenesis, rapid and directed cell movements are required that involve the expansion of the plasma membrane, the polarization of signaling molecules, and the remodeling of the cytoskeleton that occurs due to the presence of aquaporins (AQPs). These proteins facilitate rapid movement of water across cell membranes in response to osmotic gradients. In some cell types, these proteins are located in lipid structures of the plasma membrane called caveolae, which have the protein caveolin-1 (Cav-1) as the main structural component. Cav-1 is used as a marker protein for these structures and plays a key role in cell signaling.

The hypothesis of the present work is that both AQPs and Cav-1 are essential for the process of placental angiogenesis and osmolar stress leads to alterations in this process. Our aim was to study the participation of AQP1, AQP4 and Cav-1 in placental angiogenesis and its deregulation under hyperosmolar conditions, both in the chorionic villus vasculature and in the extravillous trophoblast.

We observed that both the blockade of AQP1 and AQP4, and the disassembly of caveolae achieved by pharmacological compounds, as well as the inhibition of their protein expression mediated by siRNAs, alter key processes for angiogenesis such as cell migration and tubulogenesis both in placental macrovasculature cells and placental microvasculature and in extravillous trophoblast cells. On the other hand, we demonstrated that hyperosmolarity induces the internalization of caveolae in extravillous trophoblast cells and decreases the migration and tubulogenesis of placental endothelial cells.

In summary, we have shown that AQP1, AQP4 and Cav-1 are essential for the correct formation of the placental microvasculature and macrovasculature, as well as for the correct remodeling of the uterine spiral arteries carried out by the extravillous trophoblast. We observed that hyperosmolarity produces a deregulation of these proteins, and alters the cellular processes related to placental angiogenesis, which could contribute to the physiopathogenesis of different gestational pathologies such as preeclampsia and/or intrauterine growth restriction.

Keywords: placental vasculature, aquaporin-1, aquaporin-4, caveola/caveolin-1, extravillous trophoblast, hyperosmolarity.



# INTRODUCCIÓN

---

## FORMACIÓN DE LA PLACENTA HUMANA

El embarazo humano es un proceso complejo e irreversible que comprende eventos discretos que incluyen la implantación, la deciduización, la placentación y finalmente el nacimiento de la descendencia [1-3]. El éxito de cada evento es esencial para avanzar hacia la siguiente etapa.

Durante el desarrollo de la gestación humana, entre las etapas de la mórula y el blastocisto (días 4–5 después de la concepción), el trofoblasto es el primer linaje celular en diferenciarse [4]. Después del establecimiento de los trofoblastos, el blastocisto consiste en una masa celular interna (MCI) que está rodeada por una sola capa de trofoblastos mononucleados. La masa celular interna del blastocisto (embrioblasto) se desarrolla en el embrión y el cordón umbilical, mientras que la capa externa de blastocisto, el trofoblasto, se desarrolla en la placenta y las membranas fetales. Esta capa externa rodea no solo el embrioblasto sino también el blastocelo y la cavidad del blastocisto. Aproximadamente entre los días 6 y 7 después de la concepción, el blastocisto sale de la zona pelúcida y se adhiere al epitelio uterino y en ese momento comienza la formación de la placenta. Solo los trofoblastos que recubren la masa celular interna (denominados trofoblastos polares) conducen a la implantación del blastocisto [5].

La ventana de implantación es un período de tiempo limitado en el cual la competencia de los blastocistos se superpone al estado receptivo del útero. Los blastocistos se implantan solo cuando se transfieren al útero receptivo [6], y la adquisición de receptividad uterina se refleja en cambios celulares y ultraestructurales, dentro de los que se destacan la pérdida gradual de la polaridad de las células epiteliales uterinas y formación de microprotrusiones en la superficie apical llamadas pinopodos o uterodomes [7, 8].

El primer contacto físico y fisiológico entre un blastocisto competente para la implantación y el útero receptivo ocurre a través de los procesos de aposición, adhesión, fijación y penetración que conducen a una implantación exitosa [1]. En humanos, el proceso es intrusivo, lo que significa que las células del trofoblasto penetran a través del epitelio luminal y la lámina basal en el estroma [9].

Cabe destacar que no todos los mamíferos placentarios tienen el mismo tipo de placentación. La placenta humana es del tipo hemomonocorial en la cual una capa continua de trofoblastos placentarios está en contacto directo con la sangre materna [10].

En humanos, los blastocistos se orientan con el MCI hacia el epitelio uterino. Al acercarse la unión del blastocisto, el epitelio luminal transita de un estado de polaridad más alto a más bajo. Una comunicación bidireccional entre el blastocisto y el útero receptivo conduce a la reacción de fijación e implantación. La preparación del útero para ser receptivo y permitir la unión de los blastocistos al epitelio luminal está dotada de una expresión génica distinta y superpuesta. La unión del blastocisto con el epitelio luminal es seguida por el proceso de deciduización del estroma uterino [11]. El inicio del proceso de deciduización en humanos (predeciduización) no requiere la presencia de un blastocisto, sino que prepara al endometrio para la implantación. Durante la deciduización ocurren interacciones complejas entre factores de transcripción, morfógenos, citocinas, reguladores del ciclo celular y vías de señalización, además de endoreduplicación (replicación de ADN sin citocinesis) de las células deciduales para aumentar la síntesis de proteínas y apoyar el crecimiento embrionario.

Son numerosos los factores que regulan estrechamente la ventana de receptividad e implantación uterina y si la coordinación de todos estos procesos está desfasada, la implantación falla o se vuelve defectuosa.

Los citotrofoblastos se diferencian, a lo largo de la vía de fusión o invasión, en dos tipos celulares característicos: el citotrofoblasto veloso (CT veloso) que se fusiona dando origen al sinciotrofoblasto (SCT), y el citotrofoblasto extraveloso (EVT). Los citotrofoblastos tienen la capacidad de cambiar del estado de proliferación al estado de invasión ajustando el fenotipo de las moléculas de adhesión [12]. Ambos tipos de trofoblastos conservan su potencial generativo y la capacidad de proliferar en respuesta a factores de crecimiento [13, 14]. Los citotrofoblastos alrededor del blastocisto se fusionan en el sitio de unión uterina para formar una segunda capa de sinciotrofoblastos multinucleados, que constituyen el límite epitelial interno de las vellosidades coriónicas contra el espacio intervilloso [12, 15]. Inmediatamente después de la implantación, la primera invasión del endometrio es realizada por los sinciotrofoblastos tempranos [4, 16] (Figura 1). Una vez formados, los sinciotrofoblastos crecen mediante la incorporación constante de nuevos trofoblastos mononucleados a partir de un subconjunto proximal de células madre, que renueva los sinciotrofoblastos. El proceso de fusión integra el contenido de citoplasma, las proteínas y el ARN, así como las membranas y los

núcleos de los citotrofbastos en el sinciotrofbasto [13, 14]. La fusión sincicial depende del comienzo de la cascada apoptótica en los citotrofbastos coriónicos vellosos y en los sinciotrofbastos [12, 17]. El sincicio tiene una alta tasa de rotación y los nudos sinciales (protuberancias de la membrana apical del sinciotrofbasto) se vierten en la sangre materna. Las anomalías en la capa de sinciotrofbasto pueden impedir la función placentaria normal y pueden conducir a la restricción del crecimiento fetal [18].

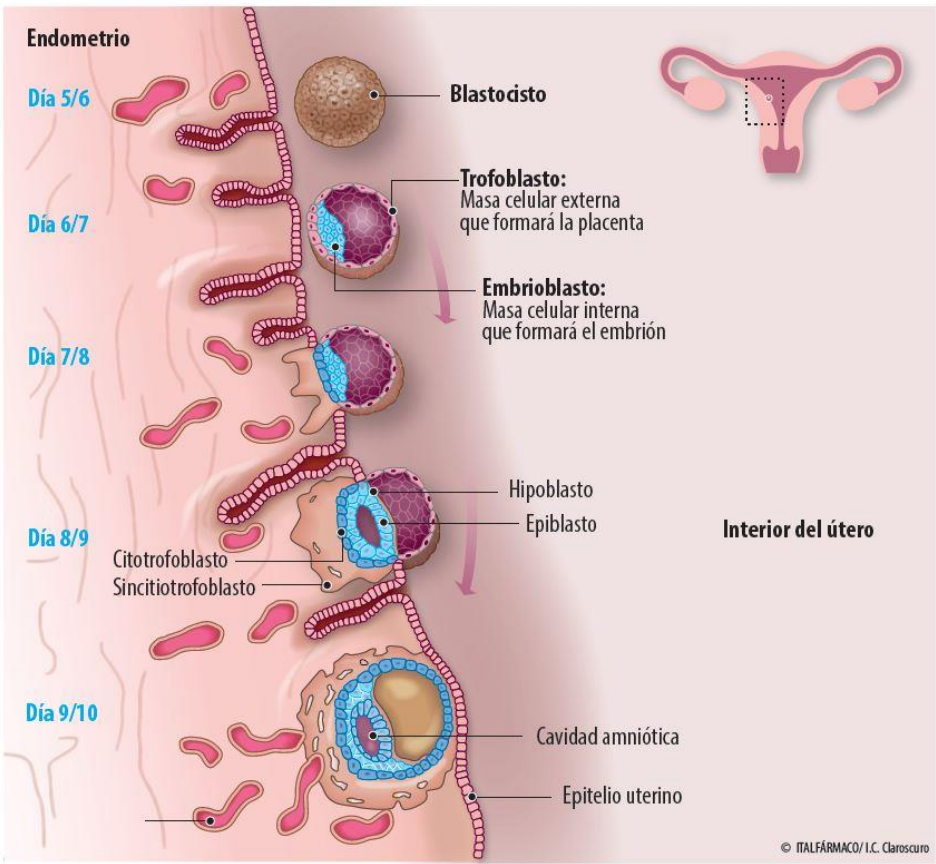


Figura 1: Representación esquemática de la interfase materno-fetal durante la implantación del blastocisto humano. Los blastocistos se orientan con el MCI hacia el epitelio uterino y la primera invasión del endometrio es realizada por los sinciotrofbastos tempranos.

En el primer trimestre, las células madre de citotrofbasto empujan a través del sinciotrofbasto y alcanzan el lado materno de la placenta. El tejido materno se reorganiza y se desarrolla en estructuras de varias capas que se convertirán en las columnas de células trofoblásticas que anclan la placenta a la pared del útero [19]. Alrededor del día 14 posterior a

la concepción, los citotrofbastos se desprenden de la columna de anclaje como citotrofbastos extravelosos (EVT) y comienzan a invadir la decidua subyacente (invasión intersticial) [20]. Los EVT se acumulan alrededor de las arterias espirales y se expanden lateralmente para formar la cubierta de citotrofbasto y luego detienen la proliferación y comienzan la invasión debido a la diferenciación trofoblástica. Esta invasión del trofbasto se inicia en el centro de la placenta y se vuelve más superficial en la periferia.

### **Remodelación de las arterias espirales uterinas**

Las arterias espirales uterinas deben ser debidamente remodeladas durante la gestación para garantizar un embarazo exitoso. Los EVT penetran e invaden la capa media de las arterias espirales en el embarazo normal. Adicionalmente, el tejido elástico y la matriz adicional se destruye enzimáticamente y son reemplazados por material fibrinoide [20]. Después de atravesar la pared arterial, los EVT migran a lo largo de las superficies lumbales internas del endotelio y coexisten transitoriamente con el endometrio en las paredes de las arterias espirales parcialmente modificadas antes de reemplazar el endotelio. La remodelación de las arterias espirales implica la apoptosis endotelial inducida por el EVT [21] (Figura 2).

La pérdida de células endoteliales de la luz de las arterias espirales uterinas es un requisito previo para un embarazo exitoso. Los trofbastos transforman su fenotipo a uno similar a las células endoteliales que reemplazan y los EVT obstruyen la luz de las arterias espirales (invasión endovascular) [20]. Distintos autores coinciden en que la obstrucción de las arterias espirales por EVT puede servir como mecanismo para proteger al feto y la placenta del estrés mediado por los radicales libres [22]. Al mismo tiempo, la obstrucción de las arterias espirales por parte del citotrofbasto crea un ambiente con poco oxígeno en el tejido placentario (menos de 20 mm Hg) hasta las 10-12 semanas de gestación, lo que favorece la proliferación celular [23].

Al final del primer trimestre, los tapones lumbales en las arterias espirales comienzan a desintegrarse [22] y se disuelven aproximadamente a las 14 semanas de gestación con un aumento de la  $pO_2$  placentaria a concentraciones superiores a 50 mm Hg [19, 24]. La remodelación arterial se extiende hasta el primer tercio del miometrio, y abarca el segmento hipercontractil de las arterias espirales en la zona de unión. En consecuencia, la remodelación tiene dos efectos principales: en primer lugar, la dilatación de la boca de la arteria reduce la

velocidad y la pulsatilidad de la entrada de sangre materna en el espacio intervelloso placentario y, en segundo lugar, la pérdida de músculo liso reduce el riesgo de vasoconstricción espontánea y genera un sistema circulatorio de baja resistencia. La remodelación de las arterias espirales normalmente ocurre durante las primeras 20 a 22 semanas de embarazo [19]. Este proceso se denomina "cambio fisiológico" y se refiere a la combinación de citotrofbastos, material fibrinoide acumulado en las paredes de las arterias espirales y pérdida de tejido musculoelástico en la capa media de las arterias espirales fetales [25].

Sin embargo, fallas en los procesos involucrados en la remodelación de las arterias espirales pueden provocar preeclampsia, restricción del crecimiento y anomalías vasculares [18, 26, 27] (Fig. X).

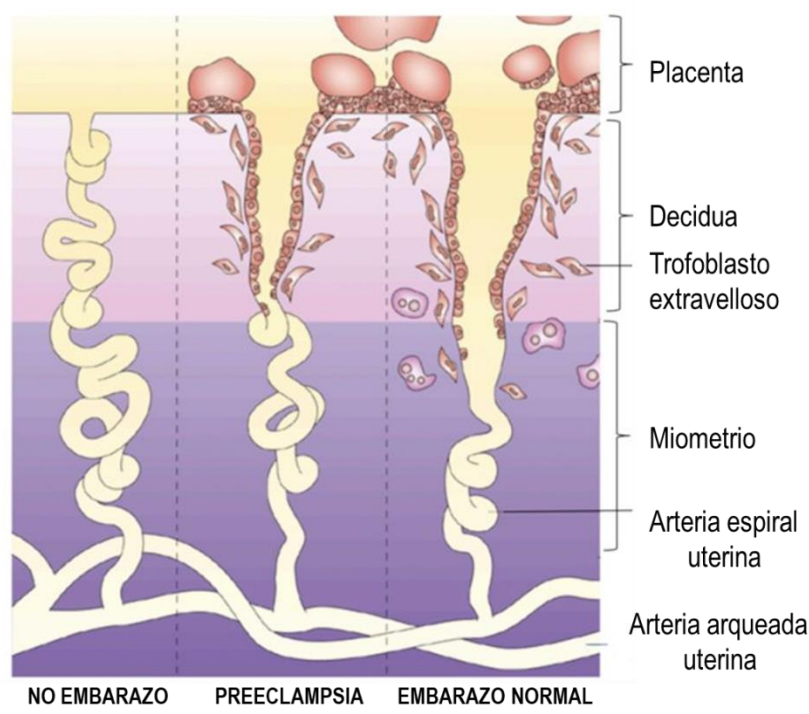


Figura 2: Esquema representativo del proceso de remodelación de las arterias espirales uterinas durante un embarazo normal y un embarazo con preeclampsia. Extraído y modificado [28].

## DESARROLLO DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS, VASCULOGÉNESIS Y ANGIOGÉNESIS

Las necesidades metabólicas del feto aumentan durante el embarazo y la placenta se ajusta a estas demandas a través del desarrollo continuo y la adaptación de la vasculatura vellosa placentaria, asegurando así un crecimiento y bienestar fetal sostenido [29]. La unidad estructural y funcional de la placenta son las vellosidades coriónicas [30]. La formación de la estructura normal de las vellosidades coriónicas, la capa de sinciotrofoblasto y la vasculatura son esenciales para la función placentaria, la producción de hormonas y la regulación del crecimiento fetal. La relación entre la circulación materna y fetal en la placenta es crucial para intercambios eficientes de oxígeno y nutrientes entre la madre y el feto y para la eliminación de productos de desecho del feto [18].

En el desarrollo placentario temprano, la vascularización de las vellosidades coriónicas está precedida por la invasión de las arterias espirales uterinas mediadas por trofoblasto, que establece un suministro de sangre materna [30, 31]. Las lagunas llenas de sangre materna luego se unen para crear espacios intervillosos, interponiendo pilares de trofoblastos, que colapsan gradualmente y permiten la entrada de sangre desde la circulación uterina [32] (Figura 3).

La formación de vellosidades coriónicas comienza aproximadamente 2 semanas después de la concepción. Los restos de los pilares trofoblásticos proliferan desde la placa coriónica hacia el espacio intervilloso, y en su camino forman las vellosidades coriónicas. Cuando las vellosidades están compuestas solo de trofoblastos, se denominan vellosidades primarias [30]. Cuando las vellosidades coriónicas primarias son invadidas por células mesenquimáticas derivadas del embrioblasto que se diferencia en células de soporte endoteliales y estromales, se transforman en vellosidades coriónicas secundarias [33]. Luego, las células mesenquimáticas comienzan a diferenciarse en células sanguíneas y pequeños vasos sanguíneos (vasculogénesis), lo que resulta en la formación de las vellosidades coriónicas terciarias. Cada vellosidad terciaria tiene un núcleo de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos fetales y numerosos macrófagos (células de Hofbauer) [30].

La vasculogénesis se define como el proceso en el que se establece una red vascular primitiva, mientras que la angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes [34]. La vasculogénesis coriónica comienza con la formación de cordones hemangioblásticos que son los primeros precursores del endotelio fetal en el estroma vellosa.

En la placenta humana, la formación de tubos endoteliales a partir de cordones hemangiogénicos comienza aproximadamente a los 21 días después de la concepción [13, 35].

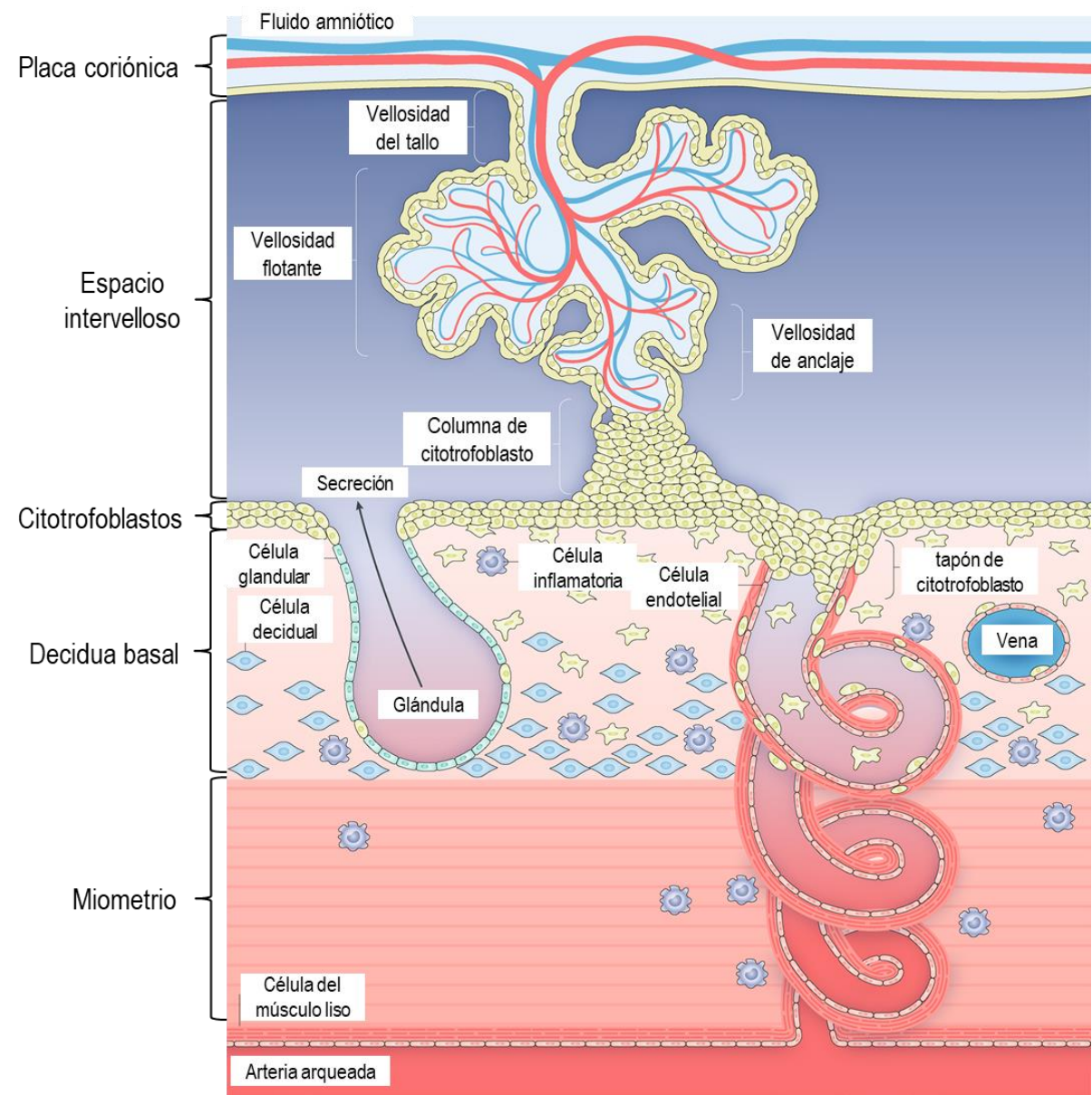


Figura 3: La placenta y el lecho placentario en el primer trimestre. La placa coriónica está en el lado fetal del espacio intervelloso. Desde la placa coriónica se proyecta la placenta vellosa, que comprende a las vellosidades coriónicas con los vasos placentarios en su interior rodeado de trofoblasto vellosa (capa externa, sinciotrofoblasto; capa interna, citotrofoblasto). En la vellosidad de anclaje, una columna de citotrofoblasto ancla la placenta en el lecho placentario decidual. La decidua contiene células deciduales (estroma residente) e inflamatorias, venas, arterias espirales y glándulas secretoras. Estas glándulas maternas secretan glucosa y glicoproteínas en el espacio intervelloso. Las arterias espirales son remodeladas por el EVT. Extraído y modificado de [36].

Para realizar las funciones de intercambio requeridas, la vasculatura placentaria experimenta distintas fases de angiogénesis. La angiogénesis alcanza su punto máximo durante la embriogénesis, mientras que, en los vasos sanguíneos maduros, las células endoteliales muestran tasas de recambio lentas [37]. En el embarazo humano normal, el crecimiento capilar es bifásico, involucrando una fase inicial de angiogénesis ramificada (formación de capilares enrollados), que aumenta dramáticamente el número de vasos sanguíneos vellosos [35], seguida de un aumento de la angiogénesis no ramificada (formación de capilares más largos) [38]. Al mismo tiempo, se pueden crear nuevas ramificaciones mediante angiogénesis de brotación (formación de capilares desde el lateral de los vasos existentes) o por angiogénesis intususceptiva (formación de pilares epiteliales transvasculares que dividen un capilar en dos o más) [38].

La formación de una red vascular capilar ocurre desde los 32 días posteriores a la concepción hasta las 25 semanas de gestación por angiogénesis ramificada, mientras que posterior a la semana 25, los patrones de crecimiento vascular de las vellosidades coriónicas cambian de angiogénesis ramificada a angiogénesis no ramificada [38].

La placenta humana experimenta un crecimiento dramático que incluye el alargamiento de las vellosidades terminales durante el segundo trimestre. Las vellosidades coriónicas sufren cambios sustanciales caracterizados por un aumento estimado de 56 veces en el volumen capilar en las vellosidades coriónicas periféricas a término, en donde ocurre el intercambio difusional entre las circulaciones materna y fetal [30, 33, 35, 39].

Por lo tanto, la adaptación de la vasculatura placentaria a las crecientes demandas fetales sigue dos estrategias principales. En primer lugar, el flujo sanguíneo per se aumenta al disminuir la impedancia vascular. La angiogénesis ramificada inicialmente crea vasos paralelos de longitud media reducida y, por lo tanto, impedancia reducida [35]. A medida que los capilares se alargan debido a la angiogénesis no ramificada, los sinusoides formados en ellos contrarrestan el efecto sobre la impedancia vascular fetoplacentaria total [40]. En segundo lugar, la velocidad de difusión a través de la placenta se mejora mediante un aumento en el área de superficie disponible y una reducción en el grosor de la membrana vellosa [40].



## Distintos tipos de células endoteliales placentarias

La angiogénesis placentaria, al igual que la angiogénesis de cualquier otro órgano, requiere de los procesos de proliferación, migración y diferenciación de células endoteliales dentro de los microvasos trofoblásticos preexistentes [35]. El endotelio no es una barrera pasiva, sino que contribuye a la homeostasis vascular al facilitar el flujo de nutrientes, moléculas de señalización y células sanguíneas. En la angiogénesis, surgen nuevos vasos de las redes vasculares existentes a través de la proliferación y migración de células endoteliales en respuesta a las necesidades metabólicas de los tejidos en desarrollo o en proceso de cicatrización de heridas [41].

A diferencia de la angiogénesis patológica, la angiogénesis placentaria es un proceso fisiológico normal que debe regularse estrictamente durante el embarazo.

La placenta humana está formada por dos tipos de células endoteliales: las células endoteliales microvasculares presentes en los capilares fetales de las vellosidades coriónicas, y las células endoteliales macrovasculares, que comprenden los grandes vasos placentarios presentes, por ejemplo, en el cordón umbilical y en la placa coriónica. Ambas difieren en su morfología y función (Figura 4).

Actualmente, gran parte de nuestro conocimiento sobre la regulación de la angiogénesis en las células endoteliales placentarias proviene particularmente de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). Estas células HUVEC, células endoteliales macrovasculares, se han utilizado como sistema modelo en muchos estudios sobre la regulación de la función de las células endoteliales y la angiogénesis [42]. Sin embargo, bajo estados fisiológicos normales, la angiogénesis *in vivo* ocurre principalmente en la microvasculatura, lo que sugiere que las células endoteliales microvasculares placentarias humanas (hPMEC) son los mejores modelos celulares para estudiar la angiogénesis placentaria [43].

Distintos estudios han demostrado que las hPMEC difieren en su fenotipo, expresión génica y fisiología de las células endoteliales macrovasculares [44, 45]. El análisis de microarrays realizado por Huang y colaboradores mostró que existen diversos genes que se expresan diferencialmente entre hPMEC y HUVEC [46]. Posiblemente, las evidencias de heterogeneidad entre hPMEC microvasculares y HUVEC macrovasculares, reflejan las diferencias significativas en las funciones que deben cumplir los dos tipos de células endoteliales.

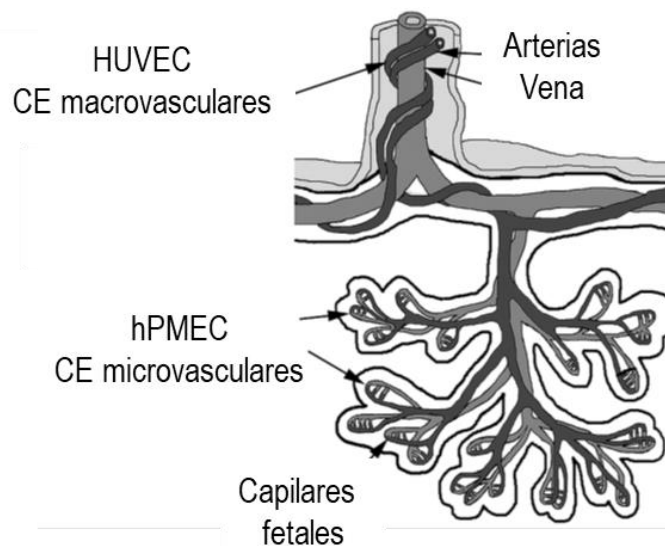


Figura 4: Diagrama de la vasculatura placentaria donde se evidencia la macrovasculatura y microvasculatura placentaria. Adaptado de [47].

### Regulación de la formación y función placentaria temprana

La invasión trofoblástica de la decidua y la vasculatura materna está regulada por factores trofoblásticos y deciduales en gestaciones normales y patológicas [30, 48].

Varias hormonas como el estrógeno, la progesterona, la gonadotropina coriónica humana (hCG), la prolactina, la leptina, el lactógeno placentario humano (hPL) y diferentes citocinas participan en la regulación de la diferenciación, proliferación e invasión del citotrofoblasto [49]. El oxígeno también es un regulador clave del desarrollo placentario. La migración del trofoblasto y la capacidad invasiva están moduladas por la tensión de oxígeno. La baja  $pO_2$  en los tejidos mantiene los trofoblastos en un estado proliferativo y no invasivo [19, 50]. La localización de las columnas celulares en el límite entre la baja tensión de oxígeno en la placenta (que promueve la proliferación) y la alta tensión de oxígeno en la decidua (que promueve la invasión) es necesaria para el cambio de la capacidad de proliferar en la parte proximal de la columna celular a la capacidad para invadir en la parte más distal [5].

Normalmente, la expresión de moléculas que median la interacción célula-célula (cadherinas, superfamilia de Ig) y moléculas que median la interacción matriz intracelular-extracelular

(como los receptores de integrina), así como las moléculas de adhesión (sincitina), se modulan ampliamente a medida que los EVT invaden la decidua y miometrio [51]. La vía invasiva de la diferenciación del trofoblasto se asocia con un cambio en el fenotipo del receptor de adhesión, dejando de expresar moléculas de adhesión del tipo de células epiteliales (integrina  $\beta 4$  y  $\beta 5$ ), y pasando a receptores de adhesión típicos para las células invasivas y endoteliales (cadherina vascular endotelial), integrina  $\beta 1$  y  $\beta 3$ , molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1), molécula de adhesión de plaquetas y células 1 (PECAM-1 o CD31) y molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM).

El desarrollo de la vasculatura coriónica en la placenta depende de las acciones de los factores de crecimiento angiogénicos y sus receptores producidos por las células y por la matriz extracelular cerca de los vasos fetales. Estos vasos carecen de inervaciones autónomas, por lo que la resistencia al flujo en la vasculatura madura debe estar regulada por efectores vasoactivos locales [34]. Es así como la angiogénesis se regula principalmente por el balance o equilibrio de factores pro- y anti-angiogénicos, la mayoría extrínsecos a las células endoteliales. La angiogénesis mejora el desarrollo de la vascularización en las vellosidades coriónicas y los principales factores que la modulan son VEGF, PlGF, FGF y la familia de proteínas angiopoyetina (Ang), así como sus receptores [52, 53].

Por último, la vascularización inadecuada en las vellosidades coriónicas puede causar un crecimiento fetal reducido, provocar desprendimiento placentario, problemas de adhesión, muerte fetal, preeclampsia, síndrome HELLP, problemas respiratorios fetales e inflamación [14, 26, 54-57].

## **ACUAPORINAS**

Una propiedad sorprendente de la mayoría de los tejidos humanos es su capacidad para el transporte de fluidos extremadamente rápido. Esto ocurre en numerosos procesos biológicos esenciales para la salud humana y dependen del transporte altamente regulado de agua a través de los tejidos [58, 59]. El flujo de agua a través de los tejidos es posible por dos vías:

- Flujo de agua transcelular a través de las membranas basales y apicales, que ocurre en respuesta a los estímulos osmóticos [60].

- Flujo paracelular a través de uniones célula-célula en espacios intercelulares, conducidos por gradientes de sal o soluto [61]. El flujo de agua paracelular juega un papel importante en los epitelios con fugas.

El flujo de agua transcelular depende de la permeabilidad de la membrana plasmática a las moléculas de agua. El movimiento del agua por ósmosis puede ser a través de la bicapa lipídica, por co-transporte pasivo con otros iones y solutos [62] o por canales de agua acuaporinas (AQP) [63].

### **Estructura de las acuaporinas**

Las acuaporinas (AQPs) son pequeñas proteínas integrales transmembrana que forman canales de agua cuya función principal es facilitar el transporte pasivo de agua a través de la membrana plasmática de la célula en respuesta a gradientes osmóticos [64]. Estas proteínas no solo aumentan la permeabilidad del agua de las membranas celulares (de 5 a 50 veces) en comparación con las membranas en las que el agua se mueve principalmente a través de la bicapa lipídica, sino que también facilitan la permeabilidad a las moléculas pequeñas no cargadas, como el glicerol, urea y amoníaco, entre otras [65-67].

Las AQPs son proteínas pequeñas con pesos moleculares entre 26 y 35 kDa que presentan similitudes estructurales y delimitan un canal de 2 nm de largo por 0,3 nm de ancho. La secuencia primaria forma dos repeticiones en tandem, cada una de las cuales tiene tres dominios de  $\alpha$ -hélices transmembranales (numerados de 1 a 6), conectados por cuatro bucles (A, B, C, D), con sus terminales amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma (Figura 5). Los bucles B (citoplásmico) y E (extracelular) contienen un motivo aminoácido distintivo y altamente conservado en la familia de las acuaporinas, formado por los aminoácidos Asn-Pro-Ala (NPA) que se embeben en la membrana y son esenciales para la permeabilidad al agua del canal y vitales en la formación del poro [68]. La estructura que resulta es una constricción angosta que se abre más ampliamente a los lados extra e intracelular de la membrana y que se llama el “modelo en reloj de arena”. En la zona más estrecha del canal existe una cisteína cuyo grupo sulfhidrilo determina la sensibilidad a los iones mercurio. En las membranas biológicas, las AQPs forman tetrámeros que contienen 4 poros acuosos independientes (Figura 5). Este

arreglo tetramérico da a cada monómero una conformación muy estable dentro del entorno lipídico de la membrana [69, 70].

Estos canales de agua son de gran importancia para el control del volumen celular y el transporte de agua transcelular. Se calcula que las AQPs son capaces de transportar 3 mil millones de moléculas de agua por segundo [71]. El movimiento del agua a través de AQPs permite una regulación más específica de la distribución del agua que el movimiento del agua a través de otras vías.

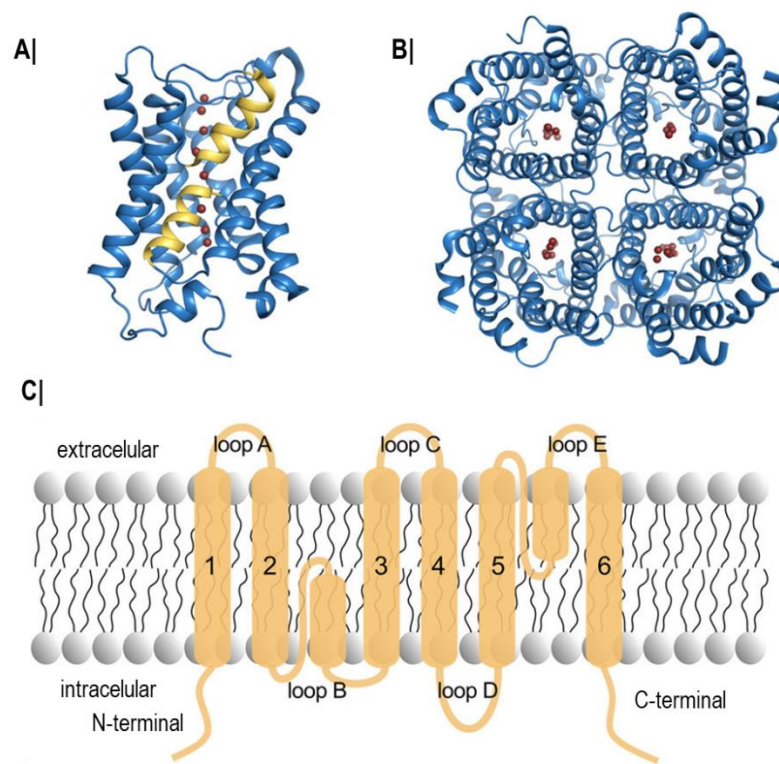


Figura 5: Estructura general de las acuaporinas. A| Vista lateral del monómero de acuaporina representado por su estructura cristalina. Las moléculas de agua en el poro conductor de agua están marcadas como esferas rojas. Las dos semihélices formadas por los bucles B y E están coloreadas de amarillo. B| El ensamblaje tetramérico desde el lado citoplásmico. C| Una representación esquemática de la topología de la acuaporina. Extraído y modificado de [72].

## Clasificación de las acuaporinas

Las AQP<sub>s</sub> se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores [64]. Se describieron por primera vez en los glóbulos rojos a fines de 1950 [73]. Luego, Agre y colaboradores identificaron a la proteína de membrana integral formadora de canales de 28 kDa (CHIP28) que más tarde se denominó acuaporina-1 (AQP1) [74]. Desde la identificación de la primer AQP en 1987, en mamíferos se han identificado hasta ahora 13 AQP<sub>s</sub> (de la 0 a la 12), que pueden clasificarse en tres subfamilias según su selectividad de sustrato y homologías de secuencias. Las subfamilias incluyen subgrupos:

- las acuaporinas clásicas o AQP<sub>s</sub> ortodoxas son permeables específicamente a agua y dentro de este grupo se encuentran la AQP0, la AQP1, la AQP2, la AQP4, la AQP5, la AQP6 y la AQP8. Se describe que estas AQP<sub>s</sub> son más selectivas para el agua, debido a su baja permeabilidad a otras moléculas pequeñas [75],
- las acuagliceroporinas, las cuales se caracterizan por un tamaño de poro más grande, lo que les permite ser permeables al glicerol, urea y otros solutos pequeños además del agua. Este grupo está conformado por la AQP3, la AQP7, la AQP9 y la AQP10, aunque la AQP9 también facilita el flujo de algunos solutos como monocarboxilatos, purinas y pirimidinas [76-78].
- las superacuaporinas, AQP<sub>s</sub> subcelulares o también llamadas “AQP<sub>s</sub> no ortodoxas” ya que poseen un motivo inusual NPA (Asn-Pro-Ala), y dentro de este grupo se encuentra la AQP11 y la AQP12. Se sugiere que estas AQP<sub>s</sub> son responsables del movimiento de agua y solutos neutros en compartimentos intracelulares [79-82].

Además del transporte de agua y glicerol, las AQP<sub>s</sub> pueden transportar gases como CO<sub>2</sub>, amoníaco y óxido nítrico (NO), así como solutos polares más grandes como azúcares, peróxido de hidrógeno e incluso algunos iones [65, 83-87].

Aun así, estas clasificaciones están algo desactualizadas, ya que se están proponiendo nuevas nomenclaturas para algunas AQP<sub>s</sub>. Por ejemplo, la AQP3, la AQP4, la AQP6, la AQP7, la AQP8 y la AQP9 también se conocen como amoníacoporinas por permitir el transporte de amoníaco, mientras que la AQP3, la AQP5, la AQP8 y la AQP9 también se las clasifica como peroxiporinas por permitir el transporte de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [88] (Figura 6).

Cada isoforma tiene una permeabilidad establecida al agua característica (permeabilidad al agua de un solo canal) que va desde  $0,25 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$  para el caso de las isoformas menos permeables como la AQP0, a  $24 \times 10^{-14} \text{ cm}^3/\text{s}$  para el caso de la AQP4 [89]. En promedio, todas las isoformas presentan una permeabilidad al agua alta, en el orden de  $3 \times 10^9$  moléculas de agua por segundo [90], y son moléculas altamente selectivas al paso del agua impidiendo incluso el paso de protones; la estructura del poro acuoso impide que el agua protonada ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) sea capaz de atravesar la barrera formada por el residuo de Arg-195, el cual está conservado en todos los miembros de la familia y ocupa una posición preponderante en el poro [71]. En general, estos canales de agua tampoco permiten el paso de otros iones porque el tamaño del poro es aproximadamente de  $2.8 \text{ \AA}$ , el cual es mucho menor que el diámetro de cualquier ion hidratado, aunque existen excepciones. La presencia de un residuo de ácido aspártico (D) cerca del segundo motivo NPA está asociado con un diámetro de poro mayor, como sucede en las acuagliceroporinas lo cual permite el paso de glicerol y urea [91].

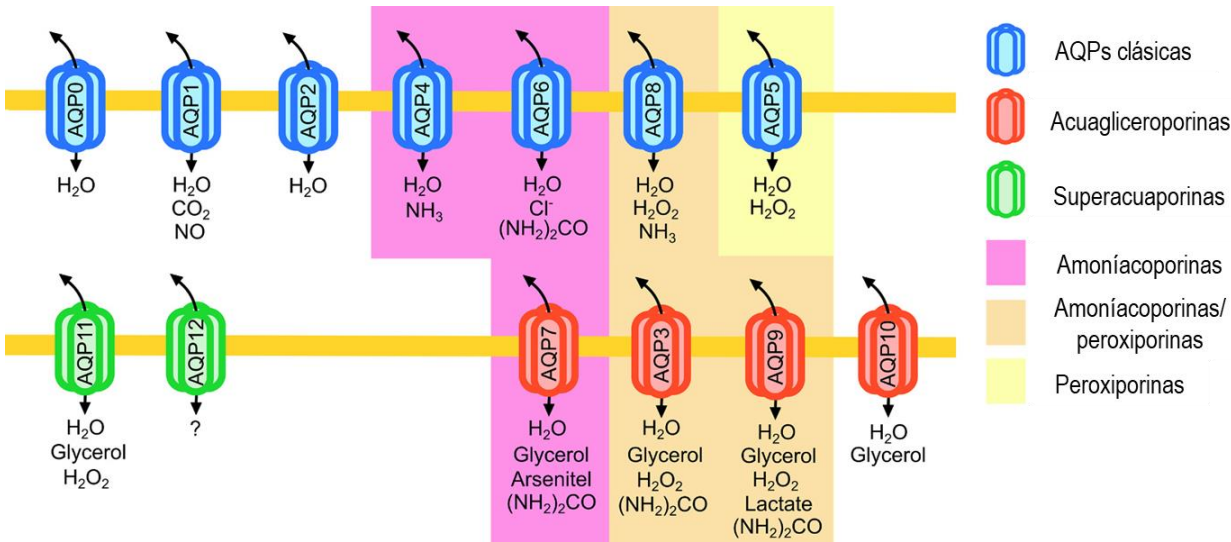


Figura 6: Clasificación de las acuaporinas en función de su homología y propiedades biofísicas. Hasta la fecha, se han identificado trece acuaporinas distintas en mamíferos (AQP0-12) y se han clasificado en tres grupos principales: acuaporinas clásicas u ortodoxas, acuagliceroporinas y superacuaporinas. Aunque existe una alta homología entre los miembros del mismo grupo, cada uno puede exhibir una especificidad diferente en su permeabilidad a los solutos. Por esa razón, algunas AQPs también se han clasificado según su permeabilidad a solutos particulares (amoniacoporinas y peroxiporinas). Extraído y modificado de [75].

El transporte de agua y solutos en las AQP es bidireccional. Está movido por la diferencia de presión osmótica e hidrostática. La permeabilidad de cada canal y su abundancia en la membrana celular también determina la intensidad del transporte los cuales pueden ser regulados por diferentes mecanismos [64].

### **Distribución de las acuaporinas**

Las AQP se expresan en numerosos tejidos, lo que les permite desempeñar un papel central en el mantenimiento del equilibrio hídrico de esos tejidos [92, 93]. Frecuentemente hay más de una AQP en los órganos típicamente diseñados para transportar grandes volúmenes de agua como el riñón. La distribución de cada AQP es muy particular: algunas son ubicuas (AQP1, AQP3, AQP8 y AQP9), mientras otras se expresan sólo en un tejido (AQP0 y AQP2). Están involucradas en una variedad de funciones fisiológicas y celulares, como diálisis peritoneal, transporte de líquido pleural, presión intraocular y producción de líquido acuoso, transporte de líquido del endotelio corneal, edema cerebral y neuroexcitación, entre otras funciones [94-97].

### **Acuaporinas y placenta humana**

La placenta es un órgano clave para el crecimiento fetal y debido a que el agua se transporta al feto desde la circulación materna (a través de la placenta y el amnios), el transporte de agua placentario es esencial para la adquisición de agua fetal [98]. A medida que avanza la gestación, los requerimientos fetales aumentan, por lo que existe una necesidad de aumentar el flujo de agua transplacentario desde la circulación materna hacia la fetal con el avance de la gestación. Es por eso que cualquier perturbación en la función placentaria puede influir en la circulación materna y viceversa [99].

La placenta y sus membranas extraembrionarias asociadas expresan AQP de manera espacial y temporal con un papel importante facilitando el movimiento del agua a través de las membranas biológicas presentes en los tejidos maternos, fetales y placentarios. Hasta el momento, los mecanismos reales de la regulación de la transferencia de agua placentaria y la



reabsorción intramembranosa son poco conocidos. Ambos fenómenos implican el flujo de agua a través de membranas biológicas, función cumplida por las AQP's [100].

En relación a la expresión de AQP's en placenta y útero durante el embarazo, se sabe que 7 AQP's de las 13 conocidas hasta el momento en mamíferos se expresan en la placenta humana (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9 y AQP11), y cada AQP puede tener una función diferente [101, 102].

En las primeras etapas del embarazo humano, Escobar y colaboradores informaron que el ARNm de las AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9 y AQP11 se expresa en las vellosidades coriónicas [103]. En este trabajo se describió una alta expresión de los ARNm de la AQP1, la AQP3, la AQP9 y la AQP11, y una expresión menor para la AQP4, la AQP5 y la AQP8. Respecto a las AQP3 y AQP9, ambas AQP's pertenecen a la familia de las acuagliceroporinas que pueden permear la urea y el glicerol, y en el caso de la AQP9 también permite el paso de monocarboxilatos, purinas y pirimidinas [77]. Los autores especularon que estas proteínas podrían tener un papel clave en el metabolismo energético fetal a lo largo de la gestación [103]. De Falco y colaboradores describieron la expresión de ARNm y proteína de la AQP4 en muestras de vellosidades coriónicas del primer trimestre y su regulación a la baja durante el avance de la gestación [104]. Asimismo, Saadoun y colaboradores informaron cambios desde niveles moderados e intensos en el segundo trimestre hasta niveles débiles o indetectables en el tercer trimestre [105].

Con respecto a la expresión de AQP's en el trofoblasto humano a término, las AQP3 y AQP9 fueron las primeras AQP's detectadas en las membranas apicales del sincitiotrofoblasto vellosito humano [106]. La AQP8 también se localizó en el trofoblasto, pero aún no se ha podido determinar la polaridad celular de esta proteína [107]. En cuanto a la AQP4 en trofoblasto humano a término, el grupo de De Falco y colaboradores informó que la expresión de esta proteína era débil en el sincitiotrofoblasto a término en contraste con una mayor expresión en las células endoteliales y el estroma de las vellosidades placentarias [104]; mientras que Saadoun y colaboradores informaron que esta proteína era casi indetectable a término [105].

De la misma manera, la expresión de AQP's en membranas fetales humanas fue ampliamente estudiada. Prat y colaboradores encontraron la expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP3, la AQP8, la AQP9 y la AQP11 en amnios y corion humanos a lo largo de la gestación humana. Estos autores también reportaron que la AQP1, la AQP3 y la AQP8 están altamente

expresadas durante el primer trimestre, mientras que la AQP9 y la AQP11 están incrementadas en el segundo trimestre [108]. En membranas fetales humanas a término, Mann y colaboradores informaron la expresión de la AQP1 y la AQP3 y también localizaron a la AQP1 en el endotelio capilar de los vasos placentarios [109]. Además, Wang y colaboradores describieron la expresión de la AQP8 y la AQP9 en las membranas corioamnióticas [107, 110], y el grupo de Prat y colaboradores demostró la expresión de la AQP11 en membranas amnióticas a término [108].

En conjunto, estos datos demuestran un perfil de expresión distinto de las AQPs placentarias en diferentes etapas de la gestación y sugieren que la regulación regional y temporal de estas proteínas juega un papel importante en el embarazo normal, el crecimiento fetal y la homeostasis del volumen de líquido amniótico.

### **AQP1 y AQP4 en vasculatura placentaria**

La AQP1 fue el primer canal de agua descubierto [74, 111, 112]. Esta proteína es un canal de agua ampliamente distribuido en el cuerpo humano [93]. La AQP1 también juega un papel importante en la angiogénesis, la migración celular y el crecimiento celular en diferentes tejidos [113, 114]. La AQP1 es la acuaporina más expresada en células endoteliales humanas [115]. En particular en placenta humana, se detectó la expresión de la AQP1 en el endotelio de los vasos sanguíneos de la placenta y en el sincitiotrofoblasto [116].

Respecto a la AQP4, ésta es una AQP predominante ubicada en el sistema nervioso central y es permeable al agua [117]. En placenta humana, el grupo de De Falco y colaboradores investigaron la localización y expresión de la AQP4 durante la gestación y encontraron que la misma se expresaba no solo en el sincitiotrofoblasto del primer al tercer trimestre de gestación, sino también en células endoteliales y estroma de vellosidades placentarias [104].

### **Acuaporinas y migración celular**

Se han reportado otros roles celulares inesperados para las AQPs, además del transporte de agua y pequeños solutos, incluida la proliferación, la apoptosis y la migración celular [118]. La migración celular dependiente de AQP, en la que la polarización de las AQPs hacia el borde de

las células migratorias facilita la entrada de agua en lamellipodios extendidos en la dirección del movimiento celular (Figura 7), es un mecanismo que se ha propuesto para facilitar la angiogénesis y metástasis tumoral dependiente de la AQP1 [119]. Además, se ha demostrado que las AQPs facilitan la proliferación de algunos tipos de células tumorales a través de mecanismos que pueden implicar vías de señalización alteradas [120-123]. Esto es importante ya que las células trofoblásticas expresan un fenotipo invasivo durante la implantación.

En lo que respecta al rol de estas proteínas en la migración celular y la placenta humana, recientemente, Reca y colaboradores detectaron la expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP3 y la AQP9 en la línea celular de EVT Swan 71 y demostraron que solo la AQP3 participa en la migración de estas células EVT [124]. Tanto el silenciamiento de la expresión génica de AQP3 como el bloqueo de su función resultaron en una migración alterada. Estos resultados proponen que una expresión anormal de esta proteína durante el primer paso de diferenciación del trofoblasto podría afectar las células EVT y conducir a una invasión superficial del trofoblasto, junto con una remodelación deficiente de las arterias espirales maternas, lo que resultaría en la aparición de trastornos del embarazo como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal [124].

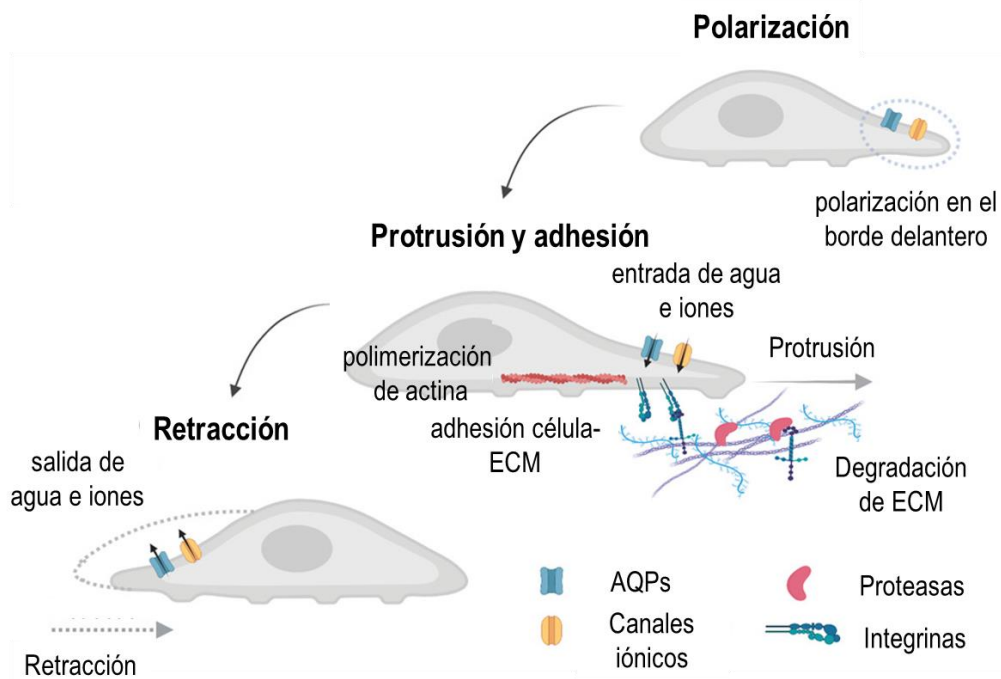


Figura 7: Esquema representativo del proceso de migración celular. Las AQPs se polarizan en el borde delantero de las células migratorias y promueven las etapas de migración celular de polarización, protrusión, adhesión y retracción. Además, mejoran la degradación de la matriz extracelular (ECM). Extraído y modificado de [125].

## CAVEOLAS Y CAVEOLINA-1

La membrana plasmática es más que una simple delimitación celular, sino que es un sistema dinámico de membrana con múltiples dominios que participa en numerosos procesos celulares. En muchos tipos de células diferentes, la membrana plasmática presenta invaginaciones que constituyen un tipo especializado de microdominio llamado caveola.

### Estructura de las caveolas

Las caveolas se definen morfológicamente como invaginaciones esféricas o en forma de matraz de la membrana plasmática de forma y tamaño sorprendentemente regulares (60–80 nm de diámetro externo promedio) que contienen caveolina oligomérica [126, 127]. Fueron descritas por primera vez en 1953 en el endotelio continuo del corazón por G.E. Palade que los llamó vesículas plasmalemmales [128]. Dos años después, E. Yamada describió estructuras similares en el epitelio de la vesícula biliar, nombrándolas caveolas intracelulares debido a su parecido con "pequeñas cuevas" [129].

Según su composición lipídica y sus características biofísicas, las caveolas se consideran subtipos de balsas lipídicas o *lipid rafts* que forman invaginaciones y son capaces de realizar endocitosis [130, 131]. Cada caveola tiene aproximadamente 140-150 moléculas de caveolina-1 (Cav-1) [132].

Recientemente ha sido descrito que para inducir la curvatura, la Cav-1 debe ensamblarse correctamente en complejos oligoméricos de tamaño 8S que experimentan interacciones adicionales de mayor orden entre sí y con las proteínas cavininas para formar caveolas maduras que tienen forma poligonal [133, 134]. La formación del complejo 8S se produce a través de un proceso cooperativo mediado por su dominio de oligomerización (OD) que se encuentra entre los residuos 61 a 101, con la ayuda de su dominio de andamiaje (SD) ubicado entre los residuos 82 a 101 y su motivo característico (SM) ubicado entre los residuos 68 a 75 [135] (Figuras 8 y 9).

En la figura 8, se muestra como en contraste con el modelo predominante que sugiere que el dominio intramembrana forma una estructura similar a una horquilla que se inserta en la membrana, creando una cuña que dobla la membrana, la estructura del complejo 8S de Cav-1

revela que el dominio intramembrana contribuye a la formación de una superficie plana orientada hacia la membrana mientras que simultáneamente estabiliza los contactos entre los protómeros. El exterior del borde exterior del complejo también es principalmente hidrofóbico, y ahí es donde se encuentra su dominio de andamiaje, favoreciendo las interacciones con otras proteínas. Juntas, estas características sugieren un modelo en el que el lado del complejo asociado a la membrana se incrusta profundamente dentro de la cara citoplasmática, interactuando con los carbonos terminales de los lípidos de la cara opuesta en lugar de insertarse en la interfaz entre los grupos de cabeza y las cadenas de acilo como típicamente se esperaba para hélices anfipáticas. Los 11 protómeros Cav-1 se organizan en un complejo en forma de disco que contiene un "borde" exterior ( $\sim 23$  Å de ancho), un "cubo" de barril  $\beta$  central ( $\sim 28$  Å de ancho) y 11 "radios"  $\alpha$  helicoidales curvos, con un diámetro de  $\sim 140$  Å y una altura de  $\sim 34$  Å [136, 137].

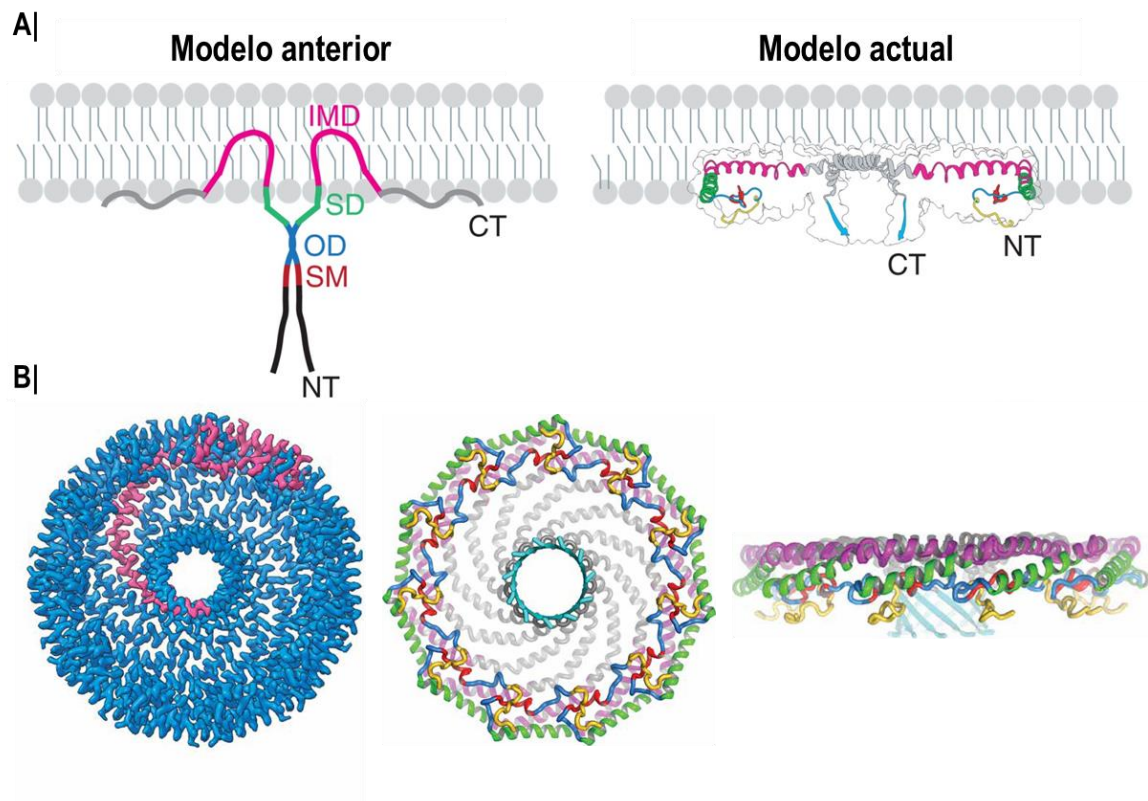


Figura 8: Ensamblado biológico de Cav-1. A| Comparación entre el modelo anterior y el modelo actual de ensamblado biológico de Cav-1. B| Crio-microscopía electrónica y modelado de estructura secundaria del complejo 8S Cav-1. El complejo ensamblado biológico de la Cav-1 es una estructura en forma de disco compuesta de  $\alpha$  hélices estrechamente empaquetadas y un barril  $\beta$  cilíndrico. CT: C terminal; NT: N terminal; SM: motivo característico (rojo); SD: dominio de andamiaje (verde); IMD, dominio intramembrana (púrpura). Extraído y modificado de [137].

Distribución de las caveolas

Las caveolas están presentes en diferentes tipos de células y están dispuestas como arreglos ordenados sobre todo el cuerpo celular, lo que sugiere un vínculo con el citoesqueleto subyacente [138, 139]. A diferencia de los hoyos cubiertos de clatrina, hay una notable variación en la densidad caveolar en diferentes tejidos. Las células endoteliales (CE) se encuentran entre las más ricas en caveolas. Los adipocitos también son muy ricos en caveolas, junto con fibroblastos, miocitos y ciertas células epiteliales. En particular en los adipocitos, se estima que el 20% de la membrana plasmática es membrana caveolar [140-142].

Caveolinas

Las caveolinas constituyen una familia de proteínas integrales de membrana que forman los principales componentes de la membrana de las caveolas y son esenciales para su formación [143-145]. La primera proteína de caveolina reportada fue Caveolina-1 (Cav-1). Luego se describieron las proteínas relacionadas Caveolina-2 (Cav-2) y Caveolina-3 (Cav-3). Las tres caveolinas de mamíferos, Cav-1, Cav-2 y Cav-3, son proteínas integrales de membrana con un dominio intramembrana incrustado dentro de la membrana y tanto el extremo amino como el carboxilo terminal están ubicados en el lado citoplasmático de la membrana (Figura 9).

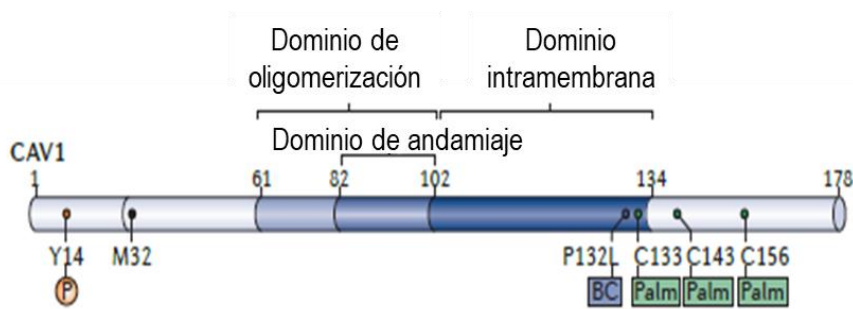


Figura 9: Representación esquemática que muestra la estructura de la Cav-1, donde se puede identificar el dominio de oligomerización (OD) que se encuentra entre los residuos 61 a 101, el dominio de andamiaje (SD) ubicado entre los residuos 82 a 101 y el dominio intramembrana ubicado entre los residuos 102 a 134. Extraído y modificado de [146].

Cav-1, el miembro de la familia mejor estudiado es una proteína de 22 kDa de unión a colesterol y ácidos grasos, que tiene dos isoformas: Cav-1 $\alpha$  contiene los residuos 1-178 y Cav-1 $\beta$  contiene los residuos 32-178. Cav-1 $\alpha$  y Cav-1 $\beta$  se traducen de ARNm diferentes [147, 148].

Cav-1 se fosforila en sitios de serina / treonina por PKC y en tirosinas (siendo el más importante Tyr14) por c-SRC y posiblemente otros no receptores tirosina quinasas [149-151] .

Una característica importante de la molécula de caveolina es el dominio *scaffold* o dominio de andamiaje, una región adyacente al dominio hidrofóbico utilizado por las caveolinas para interactuar con las moléculas de transducción de señales [135].

Las caveolinas trabajan junto con otro grupo de proteínas llamadas cavininas, proteínas citoplasmáticas con dominios en espiral amino-terminales que forman grandes complejos heteroméricos que son reclutados hacia las caveolas en células que expresan caveolinas [152].

### **La biogénesis de caveola y la vía biosintética de caveolina**

Las caveolinas se sintetizan en el retículo endoplásmico (RE) de una manera dependiente de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) como proteínas integrales de membrana, y adoptan una configuración en la que los extremos N- y C-terminales están expuestos al citoplasma [153]. La caveolina forma oligómeros de bajo peso molecular en el retículo endoplasmático y viaja al complejo de Golgi, en un proceso dependiente del complejo de proteínas de la cubierta-II (COPII), donde se somete a otra ronda de oligomerización [134, 154].

Más adelante en la vía biosintética, la caveolina se palmitoila en la región C-terminal [155, 156]. Se ha sugerido que los glucoesfingolípidos y el colesterol son factores cruciales para la gemación de estos dominios caveolares del complejo de Golgi, y se ha demostrado que el colesterol es un componente limitante para el tráfico de caveolina del complejo de Golgi a la membrana plasmática. En este sentido, se ha establecido que la salida del complejo de Golgi se acelera por la adición de colesterol y se ralentiza por el agotamiento del mismo [154].

Una vez en la membrana plasmática, las caveolas forman un dominio lipídico especializado que está enriquecido en esfingolípidos, específicamente esfingomielina y los gangliósidos de

glucosfingolípidos (GD3, GM1 y GM3), colesterol y fosfatidilinositol (4,5) -bisfosfato [157], y permanecen en estrecha asociación con microtúbulos y microfilamentos de actina [158-162].

Después del tráfico hacia la membrana plasmática, los oligómeros de caveolina se estabilizan mediante el complejo de cavina [163].

En muchas células, la formación de caveolas no termina con la formación de una invaginación simple. En este caso, las caveolas pueden organizarse en estructuras de orden superior muy características, con configuraciones complejas multilobulares denominadas rosetas o grupos caveolares.

### **Diversos roles biológicos de las caveolas**

Las funciones asociadas con las caveolas son diversas e incluyen endocitosis, regulación de lípidos, compartimentación de las vías de señalización y señalización de calcio.

La endocitosis de caveolas se define por la formación de un brote con una morfología característica y la presencia de cavininas y caveolinas; esto es distinto de la endocitosis de la caveolina no caveolar. La absorción de caveolina no caveolar puede desencadenarse por la pérdida de cavina o por la alteración experimental del colesterol y conduce a la aparición de caveolina en endosomas multivesiculares (MVBs) y su degradación acelerada. Esto requiere monoubiquitilación de caveolina y puede regular la degradación lisosómica de Cav-1 [163, 164].

La endocitosis caveolar implica una reorganización posterior del citoesqueleto de actina y parece estar mediada por dinamina, Src quinasas (que fosforilan Cav-1 en el residuo Tyr14) y proteína cinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*) [165]. En algunos tipos de células, las caveolas se fusionan con endosomas tempranos. Después de llegar al endosoma temprano, los componentes de las caveolas pueden reciclarse juntos de regreso a la superficie [131, 132, 164]. El ciclo de endocitosis y reciclaje hacia y desde el endosoma temprano mantiene una densidad caveolar constante.

Sin embargo, existen varias condiciones experimentales que pueden cambiar el equilibrio en el número de caveolas y causar la pérdida de las mismas, incluida la inhibición de la fosfatasa, el estrés hiperosmótico o la adición de lípidos entre otros [138, 157].



Se ha demostrado que las caveolas pueden detectar y responder a los cambios en la tensión de la membrana, aplanándose en respuesta al estiramiento de la membrana, proporcionándole protección física a las células contra la lisis [166, 167]. Este aplanamiento podría proporcionar una forma inmediata de prevenir la ruptura de la membrana celular al cambiar la relación volumen-superficie de la célula a medida que la membrana caveolar se libera en la membrana plasmática. En este sentido, las caveolas sirven como mecanosensores y mecanoprotectores que detectan y responden a los cambios en la tensión de la membrana en la superficie celular mediante un aplanamiento reversible [137].

Tanto las caveolinas como las cavinas tienen un papel en la mecanosensibilidad mediada por caveolas. Cav-1 se fosforila en Tyr14 en respuesta a varios estímulos mecánicos, y esta fosforilación se ha sido relacionado con la estabilidad y la dinámica de adhesión focal, la migración celular direccional, la remodelación de la matriz extracelular, la endocitosis caveolar en respuesta a estímulos específicos y la regulación de vías endocíticas no caveolares [168] (Figura 10).

Por otro lado, las integrinas son sensores clave de la matriz extracelular, y la formación y función de las caveolas está estrechamente relacionadas con las integrinas [169-172]. La integrina  $\beta 1$  regula la formación de caveola y otros aspectos de la función de caveola, incluida la fosforilación de Cav-1 en Tyr14. A su vez, las caveolas también pueden modular la señalización de integrina, la cual dicta el tráfico de caveolas [173].

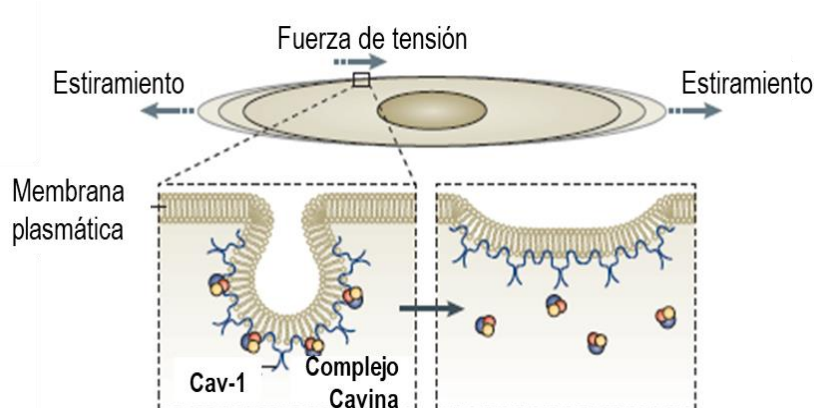


Figura 10: Mecanosensibilidad mediada por Cav-1. Luego de aplicar una fuerza de tensión (*shear stress*), las caveolas se aplanan y el complejo cavina se disocia de la caveolina-1 (Cav-1). Este proceso también puede ocurrir durante la migración celular. Extraído y modificado de [146].

Se ha propuesto que las caveolas son una plataforma para numerosas vías de señalización diferentes, en las que participan moléculas tan diversas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la pequeña GTPasa H-Ras [174]. En este modelo, la caveolina actúa como un andamio para interactuar y regular las moléculas de señalización ubicadas en las caveolas.

Numerosos estudios proponen que la caveola contiene proteínas de señalización en una forma inactiva hasta que se recibe una señal de liberación. Esta interacción inhibitoria ocurriría directamente entre el dominio de andamiaje de caveolina (aminoácidos 82-101 de Cav-1) y un motivo de polipéptido de interacción en las proteínas de señalización [175]. Un ejemplo bien caracterizado de control de señalización mediada por caveolina es el de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) la cual está regulado negativamente por caveolina tanto en células cultivadas *in vitro* como *in vivo* [176, 177]. Otras proteínas pueden interactuar directamente con la caveolina a través de mecanismos más complejos que incluyen proteínas de andamiaje de la vía de señalización  $\beta$ -adrenérgica, el receptor de insulina y las quinasas SRC [175].

Una hipótesis alternativa es que las caveolas son capaces de controlar las vías de señalización a través de la segregación espacial de componentes de señalización. En este caso, la fosforilación regulada de caveolina en respuesta a un estímulo específico puede actuar como una plataforma que secuestra las proteínas lejos de otro sitio.

Las caveolas también funcionan en la regulación de lípidos y colesterol. Como las caveolas son dominios de membrana resistentes a los detergentes, durante muchos años se planteó la hipótesis que las caveolas pueden regular el tráfico de ácidos grasos y su acumulación en las células [178].

### **Caveolas y migración celular**

La proteína Cav-1 impulsa la formación de caveolas de la membrana plasmática y las ancla al citoesqueleto de actina, modulando así la interacción celular con la matriz extracelular, uniendo y regulando diferentes moléculas de señalización y el transporte de colesterol [179, 180].

La proteína Cav-1 desempeña un papel importante en la migración celular en diferentes tejidos mediante el control de la composición y expansión de la superficie de la membrana celular, así como la polarización de las moléculas de señalización y la remodelación del citoesqueleto de actina [181].

Dentro de las proteínas importantes para la motilidad celular asociadas a las caveolas se incluyen receptores de factores de crecimiento, moduladores de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  (como la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa) y miembros de la familia de GTPasas Rho, así como las AQPs, y su correcta localización en estos microdominios es crucial para su actividad [182-185].

## **ESTRÉS CELULAR**

La supervivencia celular es proceso complejo que sustenta las funciones normales y la coexistencia con las células vecinas en términos de señalización bidireccional e integración con la fisiología total del organismo.

Son múltiples los factores que amenazan constantemente la homeostasis celular; si la amenaza es sustancial, constituye lo que se conoce como estrés celular y puede conducir a la muerte celular. Existen diferentes estresores celulares, tanto internos como externos, que van desde perturbaciones en el suministro de energía hasta traumatismos o infecciones. Los mecanismos moleculares por los cuales estos estresores son contrarrestados para restaurar la homeostasis constituyen la respuesta al estrés celular [186].

Existen sensores de estrés ubicados en la membrana celular, en el citoplasma o en los orgánulos celulares que son capaces de detectar al estresor y desencadenar una respuesta. Las respuestas de estrés están orquestadas por una variedad de mecanismos, a menudo de forma jerárquica y siempre a través de redes, algunas de las cuales todavía no se conocen con certeza. Los factores de transcripción, los microARN (miARN) y los ARN largos no codificantes (lncARN) se encuentran entre los muchos reguladores. En este sentido, un estrés celular importante cambiará o impedirá muchas funciones celulares y estimulará varias respuestas al mismo tiempo. Hay 4 resultados para una respuesta celular al estrés: El más favorable es cuando se restaura la normalidad; también puede ocurrir que la célula no se recupera y se estresa crónicamente, lo cual es característico de la senescencia; puede ocurrir que la célula

sufra muerte celular programada o, en el caso más extremo, se desintegre por el mecanismo de necrosis [186].

La evidencia experimental sugiere que la placenta puede adaptarse fenotípicamente a condiciones adversas. Sin embargo, su capacidad de adaptación es limitada, por lo que, en última instancia, puede reducirse el crecimiento fetal si el grado de estrés excede la capacidad de adaptación [187-190]. El estrés celular placentario suele evidenciarse con un aumento del infarto placentario y del depósito de fibrina, que ocurre como consecuencia de una remodelación deficiente de las arterias espirales uterinas, generando una mala perfusión placentaria. En consecuencia, hay una reducción del volumen de las vellosidades placentarias y del área de superficie para el intercambio materno-fetal, generando una gran desregulación de la expresión de genes, lo que afecta el transporte placentario, las funciones endocrinas, metabólicas e inmunitarias [191].

El estrés celular durante la gestación también puede afectar a la madre: la remodelación incompleta de las arterias espirales uterinas en el embarazo temprano puede desencadenar la liberación de mediadores por parte del STB vellosos que causan enfermedades sistémicas de la madre en el embarazo tardío, más notablemente los factores angiomoduladores que conducen a la preeclampsia [36].

Durante el embarazo, las células del trofoblasto son muy sensibles a cambios mínimos en la osmolaridad y, en algunas situaciones, la hiperosmolaridad puede actuar como un factor estresante letal [192, 193]. En este sentido, Zhong y colaboradores observaron en células madre placentarias de ratón y embriones de ratón que el estrés hiperosmolar induce la muerte celular por apoptosis de una manera dependiente de la dosis y el tiempo [194]. De acuerdo con estos resultados, recientemente reportamos en células EVT que la hiperosmolaridad (osmolaridades superiores a 450 mOsm) induce la apoptosis por un mecanismo que involucra la activación del canal TRPV-1. En estas situaciones, la hiperosmolaridad actúa como un factor de estrés letal [195].

El embarazo normalmente se asocia con un aumento fisiológico del volumen plasmático materno (hipervolemia) que ocurre a las 6–8 semanas de gestación y conduce a valores reducidos de hemoglobina, hematocrito, creatinina, ácido úrico, urea y proteínas totales maternas en comparación con los valores de no embarazadas [196]. Se cree que esta hipervolemia en el embarazo es beneficiosa tanto para el flujo sanguíneo placentario como

para el crecimiento fetal. Sin embargo, estudios previos han demostrado que las mujeres que cursan patologías gestacionales asociadas a fallas en la placentación como hipertensión en el embarazo, restricción del crecimiento fetal y preeclampsia, presentan un estado de hemoconcentración con volúmenes plasmáticos reducidos, lo que resulta en estrés hipertónico, y lo que es más importante, suele preceder a la aparición clínica de este trastorno [197-200].

Por otro lado, existen varios estudios que reportan que la hiperosmolaridad produce alteraciones de la microvasculatura de diferentes tejidos [201, 202]. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes a nivel de la vasculatura placentaria.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La placenta es un órgano transitorio, fundamental para el desarrollo de la gestación, que proporciona la interfase entre la circulación materna y fetal permitiendo de manera eficiente la transferencia de nutrientes y oxígeno hacia el feto en desarrollo. Este intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto ocurre gracias a dos eventos clave en la formación de dicho órgano:

- 1) La remodelación de las arterias espirales uterinas por parte del EVT. Para ello las células del EVT deben proliferar, migrar e invadir la decidua materna y el miometrio, remodelando dichas arterias para transformarlas en vasos de gran calibre y baja resistencia capaces de satisfacer las crecientes demandas de oxígeno y nutrientes a lo largo de la gestación.
- 2) La formación de la vasculatura vellosa placentaria donde ocurre el proceso de difusión/transporte entre la sangre materna y la fetal.

La angiogénesis es crítica para el establecimiento de la vasculatura placentaria, y en este sentido, la placenta puede actuar como un sensor de las demandas metabólicas fetales crecientes a lo largo de la gestación, induciendo cambios en su vasculatura para asegurar el crecimiento y bienestar fetal. Como sucede en otros órganos, la angiogénesis placentaria (proceso fisiológico normal estrictamente regulado durante el embarazo) requiere la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales dentro de los vasos trofoblásticos preexistentes. Estos procesos requieren de movimientos celulares rápidos y dirigidos que involucran la expansión de la membrana plasmática, cambios en el volumen celular, la polarización de moléculas señalizadoras y la remodelación del citoesqueleto. Recientemente se ha descrito que la presencia de acuaporinas (AQPs) es crucial para esos eventos. Las AQPs facilitan los movimientos rápidos de agua a través de las membranas celulares en respuesta a los gradientes osmóticos. En algunos tipos celulares, estas proteínas se localizan en estructuras lipídicas de la membrana plasmática denominadas caveolas, las cuales desempeñan un papel clave en la señalización celular.

La vasculatura placentaria involucra, la remodelación de las arterias espirales uterinas por parte del EVT y, la formación de las vellosidades placentarias. El establecimiento de un embarazo exitoso requiere el adecuado desarrollo de la vasculatura placentaria y una adecuada coordinación de los procesos vasculares.

El estrés celular durante la gestación puede afectar el normal desarrollo de la vasculatura placentaria. Particularmente, el estrés hiperosmolar, puede inducir la muerte de las células del trofoblasto ya que son muy sensibles a cambios mínimos en la osmolaridad. No existen hasta el momento reportes del efecto de la hiperosmolaridad en las células endoteliales de la vasculatura placentaria. Sin embargo, existen evidencias de alteraciones inducidas por hiperosmolaridad a nivel de la microvasculatura de diferentes tejidos.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, ***nuestra hipótesis es que la acuaporina-1 y la acuaporina-4 interactúan con las caveolas/ Caveolina-1 y esta interacción es esencial para la correcta formación de la vasculatura placentaria. Cambios en la osmolaridad producen alteraciones en la expresión y función de estas proteínas, lo que conduce a desórdenes gestacionales asociados con disfunción placentaria.***

***En esta tesis nos proponemos como objetivo general evaluar la participación de acuaporina-1 y la acuaporina-4 y su interacción con Caveolas/ Caveolina-1 en la formación de la vasculatura placentaria en condiciones fisiológicas y en condiciones de estrés osmótico.***

De esta manera, entendiendo cómo se regulan estas proteínas y cuál es su participación en la formación de la vasculatura de la placenta, podremos comprender la fisiopatogenia de los desórdenes gestacionales asociados con disfunción placentaria, con el fin de encontrar nuevas estrategias que contribuyan a mejorar el funcionamiento de este órgano y lograr una gestación exitosa.

#### Objetivos específicos:

1. Evaluar la participación de la AQP1 y la AQP4 y su interacción con la Cav-1 en la formación de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria en condiciones fisiológicas.
  - ✓ Caracterización de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria.
  - ✓ Interacción entre la AQP1 y la Cav-1 y la AQP4 y la Cav-1.
  - ✓ Participación de las AQP1 y AQP4 en los procesos de angiogénesis.
  - ✓ Participación de las caveolas/ Cav-1 en los procesos de angiogénesis.
2. Evaluar en células de EVT la participación de la AQP1 y su interacción con la Cav-1 en la remodelación de las arterias espirales maternas.
3. Evaluar el efecto del estrés hiperosmolar sobre la expresión y función de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 durante la formación de la vasculatura placentaria.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. REACTIVOS

### 1.1 Reactivos generales

Se utilizaron los reactivos cuya procedencia se describe a continuación:

- Ácido 2-[4- (2 – hidroxietil) piperazin-1- il] etanosulfónico (HEPES) (Genbiotech, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- Acrilamida, N' N' bis-metil-acrilamida, glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), tris (hidroximetil)-aminometano (Tris), azul de bromofenol y glicina (Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos; Genbiotech, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- Agarosa (Biodynamics, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Cloruro de tetraetilamonio (TEA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Cóctel inhibidor de proteasas Set III (Calbiochem-Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, Estados Unidos).
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- ECM® Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Fluoroshield™ con DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Gelatina, glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, Estados Unidos).
- Geltrex™ - Matriz de membrana basal de factor de crecimiento reducido, calificada para hESC, libre de LDEV (Gibco™- Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- HCl (Mallinkrodt Pharmaceuticals, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Hematoxilina de Mayer (Álwik, Buenos Aires, Argentina).
- Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).



- Marcadores de peso molecular y de pares de bases (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos; Dongsheng Biotech, Guangzhou, Guangdong, China).
- Membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, Estados Unidos).
- Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Microesferas magnéticas recubiertas con AC anti CD31 (Dynabeds® CD31 Endothelial Cell-Invitrogen Life Technologies (N° de catálogo 11155D, Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Mounting Medium (Immco Diagnostics, Buffalo, NY, Estados Unidos).
- Mr. Frosty Freezing Container (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- NaCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, Glucosa (Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos, Mallinkrodt Pharmaceuticals, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- PageRuler Plus (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Parafina (Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- Peróxido de hidrógeno (Laboratorios Oliveri, Quilmes, Buenos Aires, Argentina).
- Persulfato de amonio y  $\beta$ -Mercaptoetanol (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).
- Portaobjetos cargados para inmunohistoquímica (Biotraza, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- RNAzol® RT (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, Estados Unidos).
- Rojo Ponceau S, tetrametilenetilendiamina (TEMED), seroalbúmina bovina (BSA), tetra acetato de etildiamina (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Sacarosa (Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).
- Tween-20 (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).
- Xilol, etanol absoluto, metanol, formaldehído (Biopack, CABA, Buenos Aires, Argentina, Merck, Rahway, NJ, Estados Unidos).

## 1.2 Soluciones y medios de incubación

- PBS - *Buffer fosfato salino pH 7,4*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM.
- PBST - *Buffer fosfato salino – Tween 20 pH 7,4*: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, Tween 20 0,1%.

- Solución de fijación: Para-formaldehído al 4% en PBS 1M.
- Buffer Tris: Tris-HCl 100 mM, pH 7,4 o 7,6.
- Buffer de lisis HEPES con inhibidores de proteasas: NaCl 300 mM, HEPES 10 mM, EDTA 0,1 mM, Sacarosa 250 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 200X, PMSF 100X, pH 7,4.
- Buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas: NaCl 150 mM, EDTA 2mM, Tritón X-100 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1%, Tris 50mM pH 7,4, cóctel de inhibidores de proteasas 200X, PMSF 100X.
- Buffer siembra 4X: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,005% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v).
- Buffer de corrida: Tris 25 mM, glicina 150 mM, SDS 0,1%, pH 8,3.
- Buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8.
- Solución de bloqueo para Western blot y para la preparación de anticuerpos: Tris 10 mM, NaCl 0,1 M, 0,1% seroalbúmina bovina (BSA), 0,1% Tween 20, EDTA 1 mM, pH 7,5.
- Solución de bloqueo para inmunofluorescencia: Tris 20 mM, NaCl 0,63 M, 1% seroalbúmina bovina (BSA), 0,05% Tween 20, pH 8.
- Buffer de lisis/ lavado Inmunoprecipitación: Tris 25 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, glicerol al 5%, pH 7,4.
- TBE 1X- *Buffer Tris- Ácido bórico- EDTA*: Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM.
- TAE 1X- *Buffer Tris- Ácido Acético- EDTA*: Tris-acetato Tris 242 g/l, EDTA 37,2 g/l, Ácido acético glacial 57,1 ml/l; pH 8.
- HANKS: NaCl 136,9 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 mM, D-glucosa 5,6 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,2 mM, pH 7,4.

### 1.3 Cultivo celular

- Medio esencial Dulbecco modificado con medio Ham F12 DMEM/F-12 (Gibco™- Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Medio 199- M199 (Gibco™- Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Suero fetal bovino (SFB) (Laboratorio Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina).
- L-Glutamina (Serendipia Lab., Vedia, Buenos Aires, Argentina).
- Penicilina, estreptomycin y anfotericina B (Serendipia Lab., Vedia, Buenos Aires, Argentina).
- Tripsina-EDTA 0,25% (Serendipia Lab., Vedia, Buenos Aires, Argentina).

1.4 Kits comerciales

- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Kit de revelado del complejo avidina-biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos).
- Kit ECL plus de quimioluminiscencia para revelado de Western blot (Amersham, GE Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido).
- Kit UltraScience Pico Plus Western Substrate (Kit ECL de quimioluminiscencia para revelado de Western blot (GeneDirex, Bio-Helix Co.,Taipei, Taipei, Taiwan).
- Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).
- Kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems - Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos).
- Kit AzuraQuant™ Probe Fast qPCR Mix LoRox (Azura Genomics Inc., Raynham, MA, Estados Unidos).

1.5 Primers

Se utilizaron los primers que se describen a continuación:

| Gen    | Secuencia (5'-3')                     | Tamaño (pb) |
|--------|---------------------------------------|-------------|
| AQP1   | Forw: 5'-GAGTATGACCTGGATGCCGA-3'      | 163         |
|        | Rev: 5'-GGCCAGCTTGTCAGAGTGT-3'        |             |
|        | Forw: 5'- GCTATGCGTGCTGGCTACTACC-3'   | 89          |
|        | Rev: 5'- GTCCAAGGGCTACAGAGAGGC-3'     |             |
| AQP4   | Forw: 5'- GTCCTCAGATTTCTTCCACCCA-3'   | 138         |
|        | Rev: 5'- GGTTTCTTCCGTTCTCCTTTGT-3'    |             |
| Cav-1  | Forw: 5'- GCAGAACCAGAAGGGACACACA-3'   | 107         |
|        | Rev: 5'- CCAAAGAGGGCAGACAGCAAGC-3'    |             |
| VEGFR2 | Forw: 5'- CTTCGAAGCATCAGCATAAGAACT-3' | 156         |
|        | Rev: 5'- TGGTCATCAGCCCACTGGAT-3'      |             |
| RPL30  | Forw: 5'-CCGCAAAGAAGACGAAAAG-3'       | 170         |
|        | Rev: 5'-AAAGCTGGGCAGTTGTTTAGC-3'      |             |
| TBP    | Forw: 5'-CCCGAAACGCCGAATATAATCC-3'    | 80          |
|        | Rev: 5'-AATCAGTGCCGTGGTTCGTG-3'       |             |

Tabla 1: Secuencias de primers específicos utilizados para la PCR. Forw: primer forward; Rev: primer reverse; pb: pares de bases.

1.6 Anticuerpos

Se utilizaron los anticuerpos que se describen a continuación:

| Antígeno   | Tipo                         | Proveedor                 | Dilución                    |
|------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| AQP1       | Conejo AcP                   | Alpha Diagnostic          | 1/1000 (WB); 1/50 (ICQ-IHQ) |
| AQP1       | Ratón AcM                    | Santa Cruz Biotechnology  | 1/50 (ICQ)                  |
| AQP4       | Conejo AcP                   | Apha Diagnostic           | 1/1000 (WB); 1/50 (ICQ-IHQ) |
| Cav-1      | Conejo AcP                   | Santa Cruz Biotechnology  | 1/1000 (WB); 1/50 (ICQ-IHQ) |
| Cav-1      | Ratón AcM                    | Santa Cruz Biotechnology  | 1/50 (ICQ)                  |
| VEGFR2     | Conejo AcM                   | Cell Signaling Technology | 1/1000 (WB); 1/50 (ICQ)     |
| IgG conejo | Cabra AcP-HRP                | Jackson ImmunoResearch    | 1/30000 (WB)                |
| IgG ratón  | Cabra AcP-HRP                | Jackson ImmunoResearch    | 1/30000 (WB)                |
| IgG conejo | Burro AcP Alexa<br>Fluor®488 | Abcam                     | 1/1000 (ICQ-IHQ)            |
| IgG ratón  | Burro AcP Alexa<br>Fluor®647 | Abcam                     | 1/1000 (ICQ- IHQ)           |
| IgG ratón  | Cabra AcP Alexa<br>Fluor®635 | Thermo Fisher Scientific  | 1/1000 (ICQ-IHQ)            |

Tabla 2: Anticuerpos específicos utilizados en este trabajo. AcP: anticuerpo policlonal. AcM: anticuerpo monoclonal. HRP: enzima peroxidasa de rabanito. WB: Western blot. ICQ: Inmunocitoquímica. IHQ: Inmunohistoquímica.

1.7 ARNs de interferencia (siRNA, small interfering RNA)

Se utilizaron los siRNAs que se detallan a continuación:

- ARN de interferencia anti-AQP1 humana (siRNA-AQP1- N° de catálogo sc-29711, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos).
- ARN de interferencia anti- AQP4 humana (siRNA-AQP4- N° de catálogo sc-29715; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos).
- ARN de interferencia anti-Cav-1 humana (siRNA-Cav-1- N° de catálogo sc-29241; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Cultivo de líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron en estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera con 5%, CO<sub>2</sub> con cambio del medio de cultivo periódicamente.

#### 2.1.1 Líneas celulares

Para realizar los experimentos de este trabajo se emplearon distintas líneas celulares. Se trabajó con una línea celular de endotelio denominada EA.hy926 y una línea celular de citotrofoblasto extravelloso humano denominada Swan 71, las cuales se describen a continuación:

*EA.hy926*: La línea celular EA.hy926 se estableció a partir de células endoteliales aisladas de vena umbilical humana (HUVEC) de pasaje 1 por fusión con un clon resistente a la tioguanina de la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar humano (ATCC® CRL-2922). Esta línea celular presenta una morfología típicamente endotelial y su caracterización permitió determinar que conserva funciones de células endoteliales diferenciadas tales como las relacionadas a angiogénesis, homeostasis/trombosis e inflamación [203].

*Swan 71*: Esta línea celular se estableció a partir de células de trofoblasto humano de 7 semanas de gestación inmortalizadas mediante transfección con el gen de la telomerasa. Esta línea celular presenta una morfología poligonal y conserva las características de citotrofoblasto extravelloso [204].

#### 2.1.2 Mantenimiento y subcultivo de las células

Las líneas celulares con las que se trabajó se cultivaron en botellas de 25 cm<sup>2</sup> con 5 mL de medio esencial Dulbecco modificado con medio Ham F12 (DMEM/F-12) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor e irradiado conteniendo 5 mM L-Glutamina (L-Glu), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomycin y 0,25 µg/mL anfotericina B.

Para el subcultivo de las líneas celulares, luego de alcanzar un 80-90% de confluencia las células se lavaron con 5 mL de un buffer de fosfatos salino (PBS) y posteriormente, para la cosecha, se incubaron con 500 µL de una solución de tripsina al 0,25% (p/v) durante 3-5 min en estufa de cultivo a 37°C. Para detener el efecto proteolítico de la tripsina, ésta se diluyó mediante la incorporación de 1,5 mL de medio suplementado con SFB. Seguido al tratamiento con tripsina y dilución de las células en el medio, se efectuó el conteo de las mismas, colocando una gota de la suspensión obtenida, en el borde de un cubreobjeto cubriendo la cámara de Neubauer. El conteo de las células se realizó con un microscopio óptico a un aumento de 20X, considerando los cuatro cuadrados grandes de las esquinas de la cámara (cuadrados de 1mm x 1mm).

El número de células totales por mL se calculó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = N \times \frac{1}{4} \times 1000 \times 10$$

Donde N = número total de células en los cuatro cuadrantes.

El análisis del número de células viables se realizó mediante el ensayo de exclusión del colorante vital Azul de Tripán al 0,4% (p/v). La viabilidad celular de cada una de las líneas utilizadas fue mayor al 95%. El número de células empleado para cada ensayo se obtuvo realizando diluciones de las suspensiones celulares con medio completo, de manera de sembrar el número apropiado de células para alcanzar una confluencia del 80-90% en el momento deseado.

## **2.2 Criopreservación de líneas celulares**

### **2.2.1 Congelamiento de células**

Para la preservación de stocks de las líneas celulares, se prepararon suspensiones celulares de las mismas. Para evitar la lisis celular debida a la formación de masas de hielo en el citoplasma durante el congelamiento, se empleó un protocolo de congelamiento lento. Para ello, se partió de cultivos en fase exponencial de crecimiento (60- 80% de confluencia). Las células se cosecharon como se indicó previamente y una vez despegadas por la acción de la tripsina, y cuantificadas, las células se centrifugaron y resuspendieron en 90% SFB y 10% dimetilsulfóxido

(DMSO). Luego, las suspensiones celulares ( $1 \times 10^6$  células/mL) se dividieron en alícuotas de 1 mL y se colocaron en criotubos, los cuales se ubicaron en un recipiente conteniendo isopropanol (*Mr. Frosty Freezing Container*) para permitir un descenso gradual de la temperatura de aproximadamente  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , y evitar la formación de cristales de agua intracelulares. Dicho recipiente se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$  durante 24-48 horas y luego los criotubos se transfirieron a nitrógeno líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ).

### **2.2.2 Descongelamiento de células**

A diferencia del congelamiento, el descongelamiento de células debe realizarse rápidamente a causa de la toxicidad del DMSO. Una vez retirados del nitrógeno líquido, los crioviales se sumergieron parcialmente en agua a  $37^\circ\text{C}$  hasta su descongelamiento. El contenido (1 mL) fue diluido con 4 mL del correspondiente medio de cultivo completo, y centrifugado para eliminar el DMSO. Los *pellets* celulares fueron resuspendidos en medio de cultivo completo y sembrados en botellas de  $25\text{ cm}^2$  hasta alcanzar la confluencia deseada.

## **2.3 Cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana** **(human placental microvascular endothelial cells - hPMEC)**

### **2.3.1 Obtención de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana (hPMEC)**

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en la Investigación Científica del Hospital Nacional “Dr. Prof. Alejandro Posadas” y el de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA (Res (CD) N°2168/2017). Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes antes de la toma de las muestras y ninguna de las pacientes donantes sufría de embarazo anómalo.

Placentas humanas a término de embarazos normales se obtuvieron inmediatamente después del alumbramiento por parto vaginal o cesárea y se colocaron en recipientes con PBS frío para su posterior transporte al laboratorio. El tejido fue procesado en frío y en condiciones de esterilidad. Se realizaron sucesivos lavados con PBS estéril de manera de remover la sangre excedente. En primer lugar, la placenta fue separada en los diferentes cotiledones excluyendo la membrana superficial y la decidua basal. Se eligió para extraer los explantos el tejido veloso

libre de infarto, calcificación o hematoma. Utilizando pinzas, tijeras y un bisturí, se extrajeron muestras de al menos 5 cotiledones (5 a 8 g de tejido) y se lavaron repetidamente con solución de PBS estéril para eliminar toda la sangre posible del espacio intervelloso. Con ayuda de un bisturí, se disgregó la muestra en pequeños fragmentos, tratando de enriquecerla con tejido con presencia de vasos. Luego, la muestra fue centrifugada a 400 x g y el pellet fue resuspendido en buffer colagenasa 1% e incubado durante 2 horas a 37°C en agitación (600 rpm aproximadamente). Finalizado el tiempo de incubación, la colagenasa fue inactivada con 10 mL de solución HANKS suplementada con SFB al 1%. Se realizaron dos centrifugaciones sucesivas a 400 x g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 5 mL de medio 199 completo suplementado con 30% SFB, 5 mM L-Glutamina (L-Glu), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 0,25 µg/mL anfotericina B, y sembrado en botellas T25 gelatinizadas. 24 horas posteriores al aislamiento, se realizó un cambio de medio con medio 199 completo suplementado con 30% SFB, y posteriormente 2 veces por semana. El crecimiento de las células fue controlado periódicamente. Una vez que las mismas alcanzaron el 90% de confluencia, se procedió a su tripsinización, utilizando para ello tripsina/EDTA 0,25% durante 3 a 5 min a 37°C. Seguido a eso, se realizó la inmunoselección positiva utilizando microesferas magnéticas (Dynabeds®) recubiertas con el anticuerpo anti-CD31. Para ello se realizó una suspensión de  $48 \times 10^3$  de microesferas/mL de suspensión celular, durante 20 min a 4°C. Finalizado ese tiempo, se realizaron 3 lavados de las microesferas magnéticas con las células endoteliales adheridas con solución HANKS-SFB 10% a 37°C y las mismas fueron resuspendidas en medio completo 199 suplementado con 30% de SFB y cultivadas en condiciones estándar hasta confluencia.

## **2.4 Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

### **2.4.1 Ensayo colorimétrico de MTT**

El ensayo de MTT es un método colorimétrico que se utiliza para evaluar el número de células viables en proliferación o en ensayos de citotoxicidad permitiendo determinar el efecto de un agente citotóxico o condición de cultivo que pudiera restringir la viabilidad celular. Este ensayo se basa en la reducción del compuesto MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenil tetrazolio) por las deshidrogenasas presentes en células que se encuentran metabólicamente activas. El



producto generado se denomina formazán, el cual es coloreado y soluble en etanol (20 mg/mL), facilitando la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

Para este ensayo se sembraron  $7 \times 10^3$  células/pocillo (sobre placas de 96 pocillos), en 100  $\mu$ L de medio completo suplementado con 10% SFB. Al día siguiente, las células se cultivaron *overnight* en medio de arresto (medio basal suplementado con 5 mM L-Glu, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina, 0,25  $\mu$ g/mL anfotericina B y 0,5% SFB para Swan 71 y hPMEC ó 0,2% SFB para EA.hy926) para la sincronización del ciclo celular. Posteriormente, las células se sometieron al tratamiento correspondiente y una vez finalizado el mismo se realizó el ensayo. Se removió el medio de cultivo con mucho cuidado y se lo reemplazó por 100  $\mu$ L de MTT (20  $\mu$ L de Solución MTT (5 mg/mL) + 80  $\mu$ L medio de cultivo basal). Se incubó la placa en estufa durante 2 horas y finalizado ese tiempo, se agregaron 100  $\mu$ L de etanol absoluto para disolver los cristales de formazán formados y se mantuvo en agitación cubriéndolo de la luz durante 15 min. La densidad óptica debida a la formación de cristales de formazán se evaluó a 540 nm en un lector de placas (RT-6000 Microplate Reader) y los resultados se expresaron como relaciones porcentuales de viabilidad celular respecto a los controles de cada caso.

#### **2.4.2 Exclusión del colorante vital Azul de Tripán**

Luego de la cosecha, la viabilidad de las células se analizó mediante el recuento por exclusión del colorante vital Azul de Tripán al 0,4% (p/v). La viabilidad celular obtenida para cada una de las líneas utilizadas fue mayor al 95%.

### **2.5 Inhibición de la funcionalidad de AQPs y Cav-1**

#### **2.5.1 Bloqueo farmacológico de AQPs**

En el presente trabajo se realizó el bloqueo farmacológico de las AQPs como herramienta para evaluar su contribución en los diferentes experimentos realizados por medio de los siguientes tratamientos:

- a) 35  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> durante 30 min (bloqueo no selectivo de AQPs). Los compuestos mercuriales son capaces de inhibir a la mayoría de las AQPs (excepto AQP4 y AQP7) debido a la

elevada afinidad del  $\text{Hg}^{2+}$  a la Cys189 presente en el poro del canal, generando un bloqueo estérico del flujo de agua a través del canal [112, 205].

b) 100  $\mu\text{M}$  Cloruro de Tetraetilamonio (TEA) durante 24 horas (bloqueo selectivo de AQP1 y AQP4). Previamente descrito como un agente bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$ , presenta un efecto inhibitorio reversible sobre AQP1 (y adicionalmente sobre AQP2 y AQP4) por unión a la Tyr186 presente en el bucle-E del canal que se establece de forma reversible y dosis dependiente y con la misma eficiencia que los compuestos de mercurio [206] .

### 2.5.2 Silenciamiento de la expresión de AQP1 y AQP4

Con el fin de obtener cultivos celulares con 70-80% de confluencia se sembraron  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^4$  células en placas de 6, 24 y 96 pocillos respectivamente, y se incubaron durante 24 horas en el medio de cultivo correspondiente (DMEM/F-12 para células Swan 71 y EA.hy926, y M199 para células hPMEC) suplementado con 10% SFB para células Swan 71 y EA.hy926 y 30% SFB para células hPMEC en ausencia de antibióticos. A fin de determinar la eficiencia de la transfección se utilizó un ARN de interferencia inespecífico conjugado a isotiocianato de fluoresceína (siCTRL-FITC; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) el cual consiste en una secuencia control que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de transfección, las células se transfectaron con un ARN de interferencia anti-AQP1 humana (siRNA-AQP1; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) y anti-AQP4 humana (siRNA-AQP4; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), los cuales consisten en 3 secuencias de ARN de 19-25 nucleótidos diseñados específicamente para silenciar la expresión de AQP1 y AQP4 respectivamente. Como control se utilizó un ARN de interferencia inespecífico (siRNA-CTRL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), el cual consiste en una secuencia control que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido.

Cada  $1 \times 10^4$  células, se preparó una solución que requirió 1,6  $\mu\text{L}$  del correspondiente ARN de interferencia (10  $\mu\text{M}$ ) diluido en 50  $\mu\text{L}$  de medio de transfección (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) y otra solución, con 1,2  $\mu\text{L}$  de reactivo de transfección para células Swan 71 y EA.hy926 y 1,6  $\mu\text{L}$  de reactivo de transfección para células hPMEC (Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) diluido en 50  $\mu$ L de medio de transfección. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se mezcló el contenido de ambas soluciones y se incubó 30 min adicionales para favorecer la formación de los complejos. Finalmente se realizó una dilución al medio con medio de transfección, y se agregaron 200  $\mu$ L de la solución con los complejos en cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Luego de 5 horas de transfección los complejos remanentes se retiraron, y las células se mantuvieron en medio de crecimiento por 48 horas para evaluar el silenciamiento máximo de AQP1 y AQP4.

### **2.5.3 Disrupción de caveolas por medio de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD)**

Con el fin de evaluar la participación de Cav-1 en los distintos experimentos, se realizó una disrupción de las caveolas (por depleción del contenido de colesterol) en presencia de 5 mM metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) durante 30 min a 37°C. Este compuesto altamente soluble en agua actúa estrictamente a nivel superficial y presenta una alta capacidad para unirse al colesterol, es capaz de remover rápida y selectivamente colesterol de la membrana plasmática y ha sido ampliamente utilizado para manipular los niveles de colesterol en células y lograr la disrupción de lipid rafts [207, 208].

### **2.5.4 Silenciamiento de la expresión de Cav-1**

Se procedió según el ítem 2.5.2 para generar el silenciamiento génico. En este caso, las células se transfectaron con un ARN de interferencia anti-Cav-1 humana (siRNA-Cav-1; Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos), el cual consiste en una única secuencia de ARN de 19-25 nucleótidos diseñada específicamente para silenciar la expresión de Cav-1. Como control se utilizó un ARN de interferencia inespecífico (siRNA-CTRL; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), el cual consiste en una secuencia control que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido.

## 2.6 Evaluación de la expresión de ARNm

### 2.6.1 Extracción de ARN total y obtención de ADNc

El ARN total se aisló empleando el reactivo RNAzol® RT y siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente,  $1 \times 10^6$  células cultivadas en monocapa se lisaron mediante la adición de 1 mL de reactivo RNAzol® RT. Luego se añadieron 0,4 mL de agua libre de RNasas al mL de lisado celular, se agitó la mezcla empleando un agitador vortex durante 15 segundos y se la dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Cumplido ese tiempo, las muestras se centrifugaron en una microcentrífuga a 12000 g durante 15 min. Después de la centrifugación, el ADN, las proteínas y la mayoría de los polisacáridos formaron un sedimento semisólido en el fondo del tubo, mientras que el ARN permaneció soluble en el sobrenadante. Se transfirió 1 mL del sobrenadante (75% del volumen total del sobrenadante) a un nuevo tubo, dejando una capa del sobrenadante por encima del sedimento de ADN y proteínas. Luego de recuperar el sobrenadante, se precipitó el ARN total mezclando 1 mL del sobrenadante con 1 mL de isopropanol. Las muestras se almacenaron durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugaron a 12000 g durante 10 min. El ARN precipitado se lavó dos veces con 0,5 mL de etanol 75% (v/v) y se centrifugó a 6000 g durante 3 min. Finalmente, el pellet de ARN fue disuelto, sin secar, en 25  $\mu$ L de agua libre de RNasas. Para la solubilización en agua, el pellet de ARN se agitó en agitador vórtex a temperatura ambiente durante 2 a 5 min.

En el caso de muestras de vellosidades coriónicas, se tomó 1 mL de reactivo RNAzol® RT por cada 80- 100 mg de tejido y las muestras se lisaron utilizando un homogeneizador manual. La pureza fue estimada por espectrofotometría a partir de las absorbancias relativas a 260 y 280 nm. El ratio A260/A280 fue del orden de 2,0. El ARN se conservó a -70°C hasta ser utilizado.

La obtención del ADNc se realizó a partir de 1,8  $\mu$ g de ARN total utilizando una secuencia sintética de ADN compuesta por 15 nucleótidos con base timina (Oligo dT; Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) que actúa como primer universal para la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV; Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos). El apareamiento del Oligo dT se realizó a 70°C durante 10 min y la reacción de transcripción reversa a 42°C durante 1 h, utilizando un termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos). El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta ser utilizado.

### 2.6.2 RT-PCR Semicuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo durante 28-32 ciclos utilizando un termociclador (Px2 Thermal Cycler, Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos) empleando la enzima ADN polimerasa (ADN GoTaq®, Promega, Madison, WI, Estados Unidos); y para cada secuencia de interés se usaron juegos de primers específicos (Tabla 1). Los primers para el gen de la proteína ribosomal humana RPL30 fueron utilizados para corroborar la integridad del ADNc y como control de carga. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2-3% (p/v) en buffer TBE utilizando el mismo buffer para la corrida. La visualización de los productos de amplificación se logró por agregado de un compuesto fluorescente capaz de unirse a los ácidos nucleicos (Gel Red 10000x, Biotium, CA, Estados Unidos) y posterior análisis bajo exposición a luz UV (GBox Chemi, Syngene, Cambridge, Reino Unido). Como control positivo se utilizó trofoblasto de tercer trimestre. Todas las bandas se cuantificaron por densitometría empleando el software ImageJ®.

### 2.6.3 RT-PCR cuantitativa

Los niveles del ARN mensajero de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 fueron analizados por la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), mediante el método de SYBR Green y TaqMan. Para el caso de SYBR Green, se empleó el kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix de Applied Biosystems, mientras que para el caso de TaqMan, se utilizó el AzuraQuant™Probe Fast qPCR Mix LoRox. Las sondas TaqMan fueron específicas para cada gen de interés y se eligieron secuencias que detectaban todas las variantes transcripcionales: AQP1 (Ref Seq # NM\_198098, exones: 5-7), AQP4 (Ref Seq # NM\_004028, exones: 2-3), Cav-1 (Ref Seq # NM\_001753, exones 0-0). También se incluyó un ensayo prediseñado con la sonda del gen RPP30 (Ref Seq # NM\_001104546, exones: 1-2) como normalizador. Para todos los casos se emplearon sondas pre-diseñadas con conjugados 56-FAM/ZEN/3IABkFQ (IDT Technologies, Coralville, IA, Estados Unidos).

La técnica de qPCR se realizó a partir de 50 ng de ADNc en un ciclador (QuantStudio 5 de Applied Biosystems), utilizando una Master Mix y primers específicos para los genes a estudiar (Tabla 1). Las condiciones de la PCR, en todos los casos, se iniciaron con un paso de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de un máximo de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1

min a 60°C. El nivel de ARNm de cada gen estudiando se corrigió al nivel de un gen normalizador (TBP o RPP30) y la expresión relativa se calculó usando el método  $2^{-\Delta Ct}$ , o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .  $\Delta Ct$  (umbral de ciclo, del inglés *cycle threshold*) se calcula como:  $\Delta Ct = Ct \text{ (gen de interés)} - Ct \text{ (gen normalizador)}$ . El número total de ciclos ejecutados (40 ciclos) se asignó para calcular el límite de detección en aquellas muestras con amplificación indetectable. En todos los casos se incluyó un control negativo (sin templado).

## 2.7 Evaluación de la expresión de proteínas

### 2.7.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales de los lisados celulares se determinó según el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit comercial BCA Protein Assay kit. Brevemente, se prepararon diluciones al quinto de las muestras y luego se incubaron en placas de 96 pocillos con fondo plano 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra diluida con 200  $\mu\text{L}$  del reactivo A+B a 37°C por 30 min. La absorbancia a 540 nm se determinó en un lector de placas (RT-6000 Microplate Reader, Rayto, Shenzhen, China) y se calculó la concentración de proteínas procesando en paralelo una curva de calibración de seroalbúmina bovina (BSA) provista por el fabricante, en un rango de concentraciones de 20-2000  $\mu\text{g/mL}$ .

### 2.7.2 Obtención y procesamiento de lisados celulares

Para evaluar la expresión de las proteínas de interés, monocapas subconfluentes de células se lavaron con PBS frío y luego se lisaron en Buffer RIPA con inhibidores de proteasas. El lisado obtenido se centrifugó durante 5 min a 10000 g a 4°C en una microcentrífuga (Z-216MK Refrigerated Centrifuge, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania). Se recolectaron los sobrenadantes y el contenido de proteínas totales se determinó mediante el método de BCA. Como control positivo, se utilizaron muestras de VC humanas obtenidas por punción abdominal entre las semanas 12-14 de gestación.

### 2.7.3 Acondicionamiento de muestras para SDS-PAGE

Alícuotas de cada muestra conteniendo 30-80 µg de proteínas totales se diluyeron con buffer de siembra 4x y se desnaturalizaron mediante incubación a 90°C durante 5 min. Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 1 min (Z-216MK Refrigerated Centrifuge, Hermle Labortechnik, Wehingen, Alemania) y se conservaron a -20°C hasta su uso.

### 2.7.4 SDS-PAGE

En los ensayos de Western blot, las proteínas se resolvieron mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS) con sistema discontinuo [209]. Los geles se polimerizaron sobre placas de vidrio de 10 x 10 cm con separadores de 2 mm. El gel separador consistió en: acrilamida/bisacrilamida 12,5% (p/v), SDS 0,1% (p/v), persulfato de amonio (PSA) 0,1% (p/v) y tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,1% v/v, 1,5 M Tris-Cl [pH 8,8]. El gel concentrador consistió en: acrilamida/bisacrilamida 4% (p/v), SDS 0,1% (p/v), PSA 0,15% (p/v) y TEMED 0,13% (v/v), 0,5 M Tris-Cl [pH 6,8]. Cada corrida electroforética fue llevada a cabo en buffer de corrida y se adicionó una muestra de proteínas marcadoras de peso molecular (Full Range Amersham Rainbow Marker, GE Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). La corrida electroforética se desarrolló a temperatura ambiente, aplicando un voltaje constante de 100 Volts (V) durante aproximadamente 30 min, hasta que las proteínas alcanzaran el gel separador, y luego se incrementó el voltaje a 150 V para el resto de la corrida.

### 2.7.5 Western blot semicuantitativo

Luego de la electroforesis, el gel conteniendo las proteínas fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó utilizando un buffer de transferencia y aplicando un amperaje constante de 220 mA durante 45 min. Para visualizar las proteínas transferidas, las membranas se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau-S 0,5% (p/v) en ácido acético 1% (v/v), durante 1 min a temperatura ambiente. Luego del lavado, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo para WB durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. A

continuación, se prepararon las diluciones de los anticuerpos primarios específicos y se procedió a la incubación de las membranas con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2) diluídos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación, las membranas se lavaron con PBST y luego se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación.

La presencia de las proteínas de interés en las membranas de nitrocelulosa se evidenció a través del revelado mediante quimioluminiscencia empleando un sistema comercial (ECL plus) el cual se basa en la generación de quimioluminiscencia por reacción del luminol con la peroxidasa que puede ser detectada y registrada utilizando un lector de geles (GBox Chemi, Syngene, Cambridge, Reino Unido).

Para poder realizar la semicuantificación, se relativizó la expresión de la proteína de interés respecto a la cantidad de proteínas totales. Para eso, se realizó la tinción del total de proteínas con Rojo Ponceau en cada membrana, y la misma fue empleada como control de carga (cita paper que compara ponceau con b actina). Todas las bandas se cuantificaron por densitometría empleando el software ImageJ® (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos; <https://imagej.nih.gov/ij/>) y los resultados se expresaron como cantidad de cada proteína/ Rojo Ponceau.

## **2.8 Análisis *in silico* de sitios putativos de unión a Cav-1 en proteína AQP1**

Para investigar los sitios putativos de unión a Cav-1 en la proteína AQP1, se llevó a cabo la alineación de secuencias múltiples (MSA) usando el software ClustalW y la configuración de los parámetros predeterminada. El formato FASTA de las proteínas se tomó del recurso universal de proteínas (<http://www.uniprot.org>).

Se utilizó la alineación de estructuras por pares del Banco de datos de proteínas RCSB (<https://www.rcsb.org>) para la alineación de AQP1 humana (ID de entrada 4CSK) y Cav-1 humana (ID de entrada 7SC0) y para la representación de los sitios de acoplamiento de proteínas en la estructura 3D.



También se realizó el alineamiento estructural de AQP4 humana (ID de entrada 3GD8) y Cav-1 humana (ID de entrada 7SC0).

## **2.9 Ensayos de inmunofluorescencia**

### **2.9.1 Inmunofluorescencia indirecta**

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares (12 cm<sup>2</sup>) dispuestos en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzada una confluencia del 70-90% las células se lavaron con PBS y a continuación, se fijaron con una solución de para-formaldehído 3% (p/v) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS durante 10 min cada uno, se procedió a la permeabilización de las células mediante la incubación con Tritón X-100 0,1% (v/v) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. En los casos donde se evaluó la localización de proteínas asociadas a membrana las células no fueron permeabilizadas. Se realizaron dos nuevos lavados con PBS y seguidamente, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con solución de bloqueo para inmunofluorescencia durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue retirada y, sin lavar, se realizó la marcación con una dilución 1/50 del anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno y se incubó con el anticuerpo secundario (1/1000 anti-IgG de conejo- H&L; Alexa Fluor® 488; Abcam, MA, Estados Unidos) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de tres lavados con PBS de 5 min cada uno, se realizó el montaje de los cubreobjetos en medio de montaje con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para el teñido de los núcleos celulares (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio epifluorescente (Nikon Eclipse E200, Nikon Instruments Inc., Estados Unidos).

### **2.9.2 Doble inmunofluorescencia confocal de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1**

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos circulares (12 cm<sup>2</sup>) dispuestos en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzada una confluencia del 70- 90% las células se lavaron con PBS. A continuación, se fijaron con una solución de para-formaldehído 3% (p/v) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. Luego de tres lavados con PBS durante 10 min cada uno, se procedió a la permeabilización de las células mediante la incubación con Tritón X-100 0,1%

(v/v) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos nuevos lavados con PBS y seguidamente, los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con solución de bloqueo para inmunofluorescencia durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo fue retirada y, sin lavar, se incubó con una mezcla de anticuerpos primarios anti-Cav-1 (1/50 en solución de bloqueo) y anticuerpo anti-AQP1 (1/50 en solución de bloqueo) o anticuerpos primarios anti-Cav-1 (1/50 en solución de bloqueo) y anticuerpo anti-AQP4 (1/50 en solución de bloqueo) durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C. A continuación se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno, y se incubó con una mezcla de ACs secundarios (anti-IgG de conejo- H&L en dilución 1/1000; Alexa Fluor® 488; Abcam, MA, Estados Unidos) y anti-IgG de ratón - H&L en dilución 1/1000; Alexa Fluor® 635; Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Estados Unidos) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de tres lavados con PBS de 5 min cada uno, se realizó el montaje de los cubreobjetos en medio de montaje con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para el teñido de los núcleos celulares (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Olympus Fluoview 1100. Los controles negativos se realizaron utilizando anticuerpos anti Cav-1, AQP1 y AQP4 preadsorbidos con los péptidos específicos.

## 2.10 Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación (IP) se realizó utilizando un kit comercial (Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit) siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, monocapas subconfluentes de células se lavaron con PBS frío y luego se lisaron en un buffer de lisis/ lavado del kit de IP en presencia de inhibidores de proteasas. Los lisados celulares se centrifugaron a 10000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo para la determinación y normalización de la concentración de proteínas. Paralelamente, el anticuerpo Cav-1 se inmovilizó covalentemente en las columnas de IP usando el kit de inmunoprecipitación Crosslink Pierce®. Luego, los lisados se incubaron en una columna de agarosa con proteína-A/G previamente tratada con el anticuerpo anti-Cav-1 a 4°C durante toda la noche en agitación. Cumplido el tiempo de incubación, se procedió a la elución de las proteínas que interaccionaron con el anticuerpo anti-Cav-1 unido a la resina. Para corroborar la interacción entre Cav-1 y AQP1 y entre Cav-1 y AQP4, el eluato obtenido fue sometido a la técnica de Western blot utilizando un anticuerpo anti-AQP1 y anti-AQP4 respectivamente para el revelado de la membrana.

### 2.11 Ensayo de migración celular

Se procedió al estudio de la migración celular colectiva mediante una combinación de métricas: por un lado se midió el área de la herida (área libre de células), valor con el que se calculó el porcentaje de cierre de la herida, mientras que la medición del ancho de la herida, permitió calcular la velocidad de migración.

Monocapas confluentes de células se arrestaron durante la noche en medio basal suplementado con 0,2% SFB para células EA.hy926 y 0,5% SFB para células Swan 71 y células hPMEC para lograr la sincronización del ciclo celular. Las células se sometieron a los siguientes tratamientos:

- a) Bloqueo farmacológico no selectivo de AQPs (mediado por  $\text{HgCl}_2$ ),
- b) Bloqueo farmacológico selectivo de AQP1 y AQP4 (mediado por TEA). En este caso las células fueron expuestas al reactivo durante la migración debido a la reversibilidad de su efecto,
- c) Silenciamiento de la expresión de AQP1 y AQP4 (mediado por siRNA). Luego de la transfección las células se mantuvieron 24 horas en medio de crecimiento, previamente a la realización de la herida,
- d) Disrupción de caveolas (mediado por M $\beta$ CD),
- e) Silenciamiento de la expresión de Cav-1 (mediado por siRNA). Luego de la transfección las células se mantuvieron 24 horas en medio de crecimiento, previamente a la realización de la herida.
- f) Tratamiento de hiperosmolaridad

Finalizado cada tratamiento, sobre las monocapas confluentes se realizó manualmente una herida en el centro de los pocillos con un tip de 200  $\mu\text{L}$ , lavándose posteriormente con PBS para remover las células no adheridas. Durante la migración, las células se mantuvieron en medio basal suplementado con 0,2% SFB para el caso de las células EA.hy926 y 0,5% para las células de trofoblasto extraveloso y las hPMEC. Las monocapas heridas se examinaron a las 0, 18 y 24 horas y se fotografiaron usando un microscopio invertido equipado con una cámara fotográfica (Nikon Eclipse E: 200, Nikon Instruments Inc., Estados Unidos). Se usó el paquete de

software ImageJ 1.51r® (Bethesda, MD) para cuantificar la tasa de migración celular. La tasa de migración celular se cuantificó utilizando una combinación de métricas. Por un lado, se calculó el área de la herida para cada fotografía y se expresó la tasa de migración como el porcentaje de cierre de la herida. La distancia de cierre de herida a las 0 horas se consideró como 0% de la cicatrización de heridas. Para cuantificar el cierre de la herida se empleó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de cierre de herida} = \frac{\text{Área } t \text{ } 0h - \text{Área } t \text{ } Xh}{\text{Área } t \text{ } 0h} \times 100$$

Donde (t Xh) corresponde a los distintos tiempos de incubación.

También se midió el ancho de la herida como la distancia promedio entre los bordes de la zona libre de células de cada fotografía (medida en píxeles), y con este valor se calculó la velocidad de migración en cada momento [210]. Para cuantificar la velocidad de migración se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Velocidad de migración} = \frac{\text{Ancho herida promedio } t \text{ } 0h - \text{Ancho herida promedio } t \text{ } Xh}{t \text{ } Xh}$$

Donde (t Xh) corresponde a los distintos tiempos de incubación.

Para cada uno de los tratamientos, se analizaron las heridas correspondientes de por lo menos tres monocapas y se realizaron tres ensayos independientes en cada caso.

## 2.12 Ensayo de tubulogénesis o formación estructuras tipo tubular- endotelial

Para explorar la respuesta angiogénica de las células después de los respectivos tratamientos, se realizó el ensayo de formación de estructuras tipo tubo. Este ensayo facilita el estudio de la angiogénesis que no puede medirse fácilmente *in vivo*.

La matriz extracelular (MEC) reducida en factores de crecimiento se descongeló en hielo durante la noche debido a que es muy importante que su descongelamiento sea de manera gradual. Para el caso de las células de trofoblasto extravelloso Swan 71, se trabajó con la MEC de Sigma-Aldrich, mientras que para el caso de las células endoteliales, se trabajó con la matriz extracelular Geltrex™ de Gibco. A la mañana siguiente, se colocaron 50 µL de MEC pura (9,3 mg/mL) en los pocillos necesarios de una placa de 96 pocillos y la placa fue incubada a 37°C

durante 30 min para permitir la gelificación de la MEC de Sigma *ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*.

Paralelamente, las células se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% SFB para el caso de las células EA.hy926 y células Swan 71, y medio M199 suplementado con 30% SFB para las células hPMEC. Luego de la sincronización, monocapas subconfluentes se lavaron con PBS y se sometieron a los tratamientos correspondientes. Finalizados los tratamientos, las células se cosecharon como se indicó previamente y una vez despegadas por la acción de la tripsina, y cuantificadas, las células fueron centrifugadas y se resuspendieron en 100  $\mu$ L del medio de cultivo correspondiente. Cada suspensión se cargó por triplicado en placas de 96 pocillos previamente tratadas con 50  $\mu$ L de MEC pura. Se sacaron fotografías a tiempo 0, 2, 4, 6 y 8 horas y en cada caso, se obtuvieron por lo menos 3 imágenes representativas por pocillo utilizando un microscopio invertido equipado con una cámara fotográfica (*Nikon TMS Inverted Microscope*, Nikon Instruments Inc., Estados Unidos). Las imágenes se procesaron utilizando el plugin *Angiogenesis Analyzer* del software *ImageJ*®. Se realizaron tres ensayos independientes.

### 2.13 Medición del tamaño celular

Para este ensayo se sembraron  $7 \times 10^3$  células en cada pocillo de placas de 96 pocillos, en 100  $\mu$ L de medio completo suplementado con 10% SFB. Una vez alcanzada la confluencia, las células se sometieron a una solución hipoosmolar (150 mOsm) y se tomaron fotografías en contraste de fase a tiempos cortos durante los primeros 5 minutos. Luego, las células se sometieron a los siguientes tratamientos:

- a) Bloqueo farmacológico no selectivo de AQPs (mediado por  $\text{HgCl}_2$ ),
- b) Bloqueo farmacológico selectivo de AQP1 (mediado por TEA),

y se tomaron varias fotografías en contraste de fase sobre los distintos wells.

Se procedió a la medición del tamaño celular empleando el software de procesamiento de imágenes *ImageJ*. Se seleccionó al azar un mínimo de 10 células de cada imagen. Se determinó el tamaño celular de cada célula y se calculó y comparó el tamaño celular promedio de 3 imágenes.

## **2.14 Estudio del efecto del estrés osmótico**

Teniendo en cuenta que el transporte de agua a través de las membranas celulares es dirigido por un gradiente osmótico generado por las diferencias en la osmolaridad entre el medio intracelular y extracelular, las células Swan 71, células EA.hy926 y células hPMEC crecidas hasta un 80% de confluencia en condiciones estándar (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C) se arrestaron y cultivaron durante 24 horas en las siguientes condiciones:

- condición de isoosmolaridad (condición control: 300 mOsM).
- condiciones de hiperosmolaridad (400 mOsM para células Swan 71 y 450 mOsM para células EA.hy926 y hPMEC) para lo cual se adicionó una solución de sacarosa (solución madre 1,25 M) al medio estándar.

## **2.15 Medición de la osmolaridad del medio de cultivo**

Para asegurar que las condiciones de hiperosmolaridad se cumplen en los cultivos celulares, se procedió a medir la osmolaridad de los medios de cultivo utilizados en los distintos tratamientos. Se realizaron 3 condiciones de hiperosmolaridad, por el agregado de 50, 100 y 150 mM de sacarosa al medio de cultivo, para llevar a una hiperosmolaridad teórica de 350, 400 y 400 mOsM respectivamente. Las osmolaridades se midieron en un osmómetro de presión a vapor VAPRO™ (Wescor Inc., Logan, UT, Estados Unidos) para compararlas con las osmolaridades teóricas.

## **2.16 Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Para evaluar la ultraestructura de las células Swan71 en condición hiperosmolar se realizó una microscopía electrónica de transmisión. Para eso, células Swan 71 tratadas con sacarosa 100 mM (condición de hiperosmolaridad) o sin tratar (control) se retiraron de las placas de cultivo con un raspador de células, se lavaron con buffer fosfato o PBS 0,1 M, pH 7,4 y se fijaron en la solución de fijación de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 4 horas a 4°C. A continuación, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato o PBS 0,1 M, pH 7,4, y se fijaron de nuevo en tetróxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0,1 M durante 60 minutos a

4°C. Posteriormente, el material se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O bidestilada, y se deshidrató en alcoholes ascendentes (50°, 70°, 96°, 100°), dos cambios de cada uno durante 15 minutos y, finalmente, dos cambios de acetona durante 10 minutos. El material fue incluido en resina epoxi "Durcupan", la cual polimerizó a 60°C durante 72 horas. Una vez polimerizado, se realizaron cortes semifinos de 0,5 µm utilizando un Ultramicrotomo (Reichert Jung Ultracut E) con un cuchillo de vidrio. Las secciones se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina para su observación al microscopio óptico. Para observar las muestras bajo el microscopio electrónico de transmisión, se realizaron cortes ultrafinos de 70-90 nm de espesor en el mismo Ultramicrotomo, los cortes se montaron sobre rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (método de Reynodls). Las muestras se observaron bajo un microscopio electrónico de transmisión MET Zeiss 109 equipado con una cámara digital Gatan 1000W.

#### **2.17 Análisis estadístico de los resultados experimentales**

El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa estadístico GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA). En todos los casos, se realizaron como mínimo tres ensayos independientes. Todos los valores se expresaron como medias  $\pm$  SEM. La significancia de los resultados se analizó mediante la prueba T de Student para la comparación de 2 muestras o mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de las pruebas post-hoc de Tukey. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

---

El primer objetivo de este trabajo de tesis, fue evaluar la participación de la AQP1 y la AQP4 y su interacción con la Cav-1 en la formación de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria.

### **1.1 Caracterización de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria**

En la placenta humana existen dos tipos de células endoteliales: las células endoteliales microvasculares placentarias humanas (hPMEC) que se encuentran en las vellosidades coriónicas, y las células endoteliales macrovasculares que se encuentran en los grandes vasos de la placa coriónica y del cordón umbilical. Estas células no solo difieren en morfología, sino también en expresión génica y funcionalidad, y es por eso que se las debe estudiar de manera independiente.

#### **Expresión y localización de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en vellosidades coriónicas de placenta humana**

Se comenzó estudiando las proteínas de interés en muestras de vellosidades coriónicas de placentas a término enriquecidas en microvasculatura. Este enriquecimiento se logró eliminando mediante el empleo de tijera y bisturí el tejido trofoblástico de las vellosidades placentarias, como se muestra en la Figura 11.

Se realizó una inmunofluorescencia para AQP1, AQP4 y Cav-1 en las muestras de vellosidades placentarias enriquecidas en microvasculatura. Como se puede evidenciar en la Figura 12, las proteínas AQP1 y Cav-1 se expresan fuertemente en los vasos placentarios (flechas blancas), mientras que la expresión de AQP4 si bien se evidencia en vasos placentarios, la misma es menor en comparación a AQP1 y Cav-1.



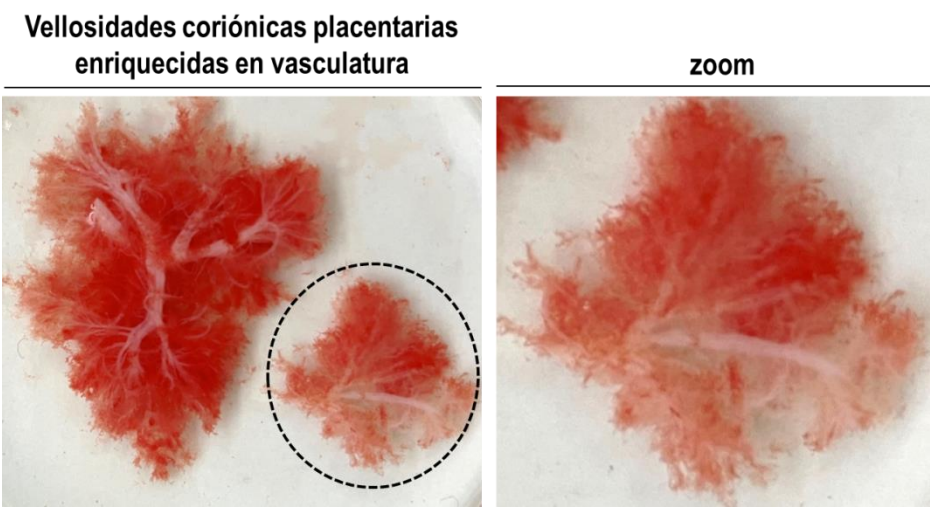


Figura 11: Fotografía representativa de las vellosidades coriónicas de placentas a término enriquecidas en vasculatura placentaria. Se muestra la zona del zoom con un círculo negro.  
*Magnificación: 10x.*

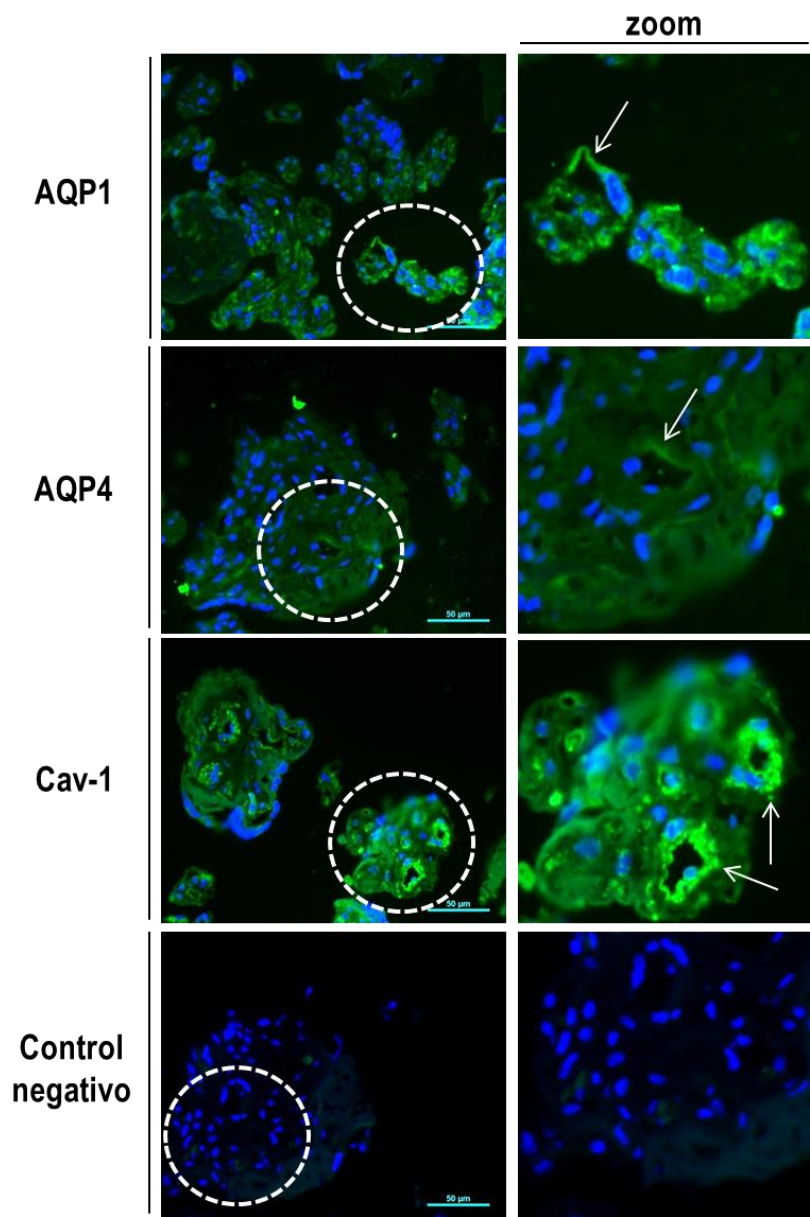


Figura 12: Inmunofluorescencia de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en muestras de vellosidades placentarias de placentas a término enriquecidas en microvasculatura. Se utilizaron anticuerpos primarios anti-AQP1 (1:50), anti-AQP4 (1:50), y anti-Cav-1 (1:50). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo H&L (Alexa Fluor® 488). En las fotografías se muestra la región del zoom con un círculo blanco.

**Puesta a punto del cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura de placenta humana (hPMEC)**

Como se mencionó anteriormente, bajo estados fisiológicos normales, la angiogénesis *in vivo* ocurre principalmente en la microvasculatura y es por eso que las células endoteliales

microvasculares placentarias son el mejor modelo para estudiar la angiogénesis placentaria *in vitro*.

El cultivo primario de células endoteliales microvasculares de placenta humana (hPMEC) se obtuvo a partir de placentas humanas a término provenientes de embarazos normales inmediatamente después del alumbramiento por parto vaginal o cesárea. El material de partida fueron las vellosidades coriónicas, las cuales luego de sucesivos lavados, y digestión mecánica y enzimática, se sembraron en placa con gelatina. Se controló periódicamente el crecimiento de las células y una vez que las mismas alcanzaron el 90% de confluencia, aproximadamente a las 4 semanas, se realizó la inmunoselección positiva con microperlas magnéticas que presentaban unido el anticuerpo anti-CD31. Las células unidas a microperlas recubiertas con CD31 se resuspendieron en M199 con 20% de SFB y se cultivaron en condiciones estándar (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) hasta confluencia. Se realizó la caracterización morfológica del cultivo de hPMEC antes y después de la selección, y en la figura 13 se muestran fotografías representativas del proceso.

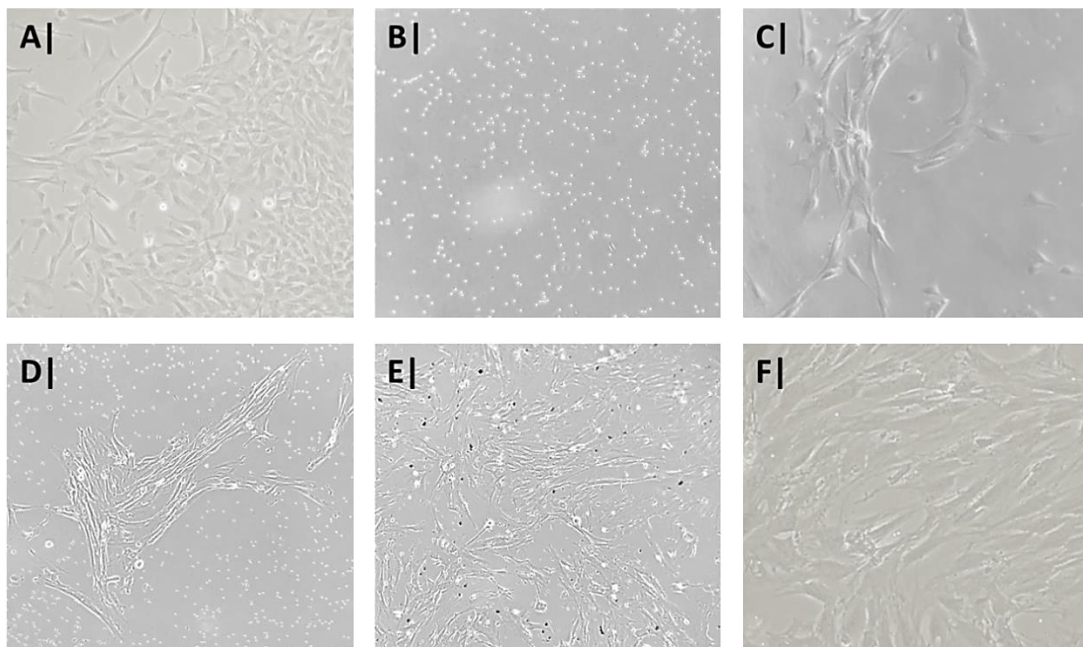


Figura 13: Morfología del cultivo primario de células endoteliales microvasculares de placenta humana (hPMEC). A| - F| Fotografías representativas de la morfología celular del cultivo de hPMEC. A| Cultivo de hPMEC anterior a la selección. B| Cultivo de hPMEC en el día de la inmunoselección. C| Cultivo de hPMEC 2 días posteriores a la inmunoselección. D| Cultivo de hPMEC 3 días posteriores a la inmunoselección. E| Cultivo de hPMEC 6 días posteriores a la inmunoselección. F| Cultivo de hPMEC en confluencia 10 días posteriores a la inmunoselección. (*Magnificación 200X*).

Para confirmar que se trataba de un cultivo de células endoteliales, se procedió a estudiar la expresión del receptor tipo 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2). El receptor VEGFR2 es un receptor de tirosina quinasa de tipo V que se expresa principalmente en las células endoteliales vasculares y que está codificado por el gen KDR. Este receptor responde a la señal de unión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que inicia una cascada de fosforilación que finalmente resulta en un aumento de la proliferación y migración endotelial [211].

Se evaluó la expresión génica y proteica de VEGFR2 en las células hPMEC (Figura 14).

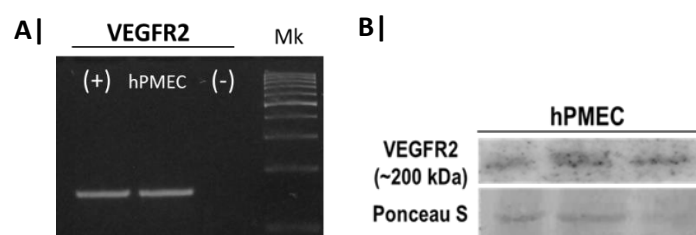


Figura 14: Expresión génica y proteica de VEGFR2 en células hPMEC.

Se evaluó la expresión génica (A|) y proteica (B|) de VEGFR2 en células hPMEC empleando la técnica RT-PCR y WB respectivamente, y se determinó que VEGFR2 se expresa en estas células endoteliales (n=3). La secuencia de los primers de VEGFR2 empleada fue: Forw: 5'-CTTCGAAGCATCAGCATAAGAACT-3', Rev: 5'-TGGTCATCAGCCCACTGGAT-3'. (+): Trofoblasto del tercer trimestre utilizado como control positivo; Mk: marcador de pares de bases (100 pb ladder); hPMEC: células hPMEC; (-): Control negativo.

### Expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria

Se evaluaron las expresiones de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 a nivel génico mediante RT-qPCR y a nivel proteico mediante la técnica de Western blot en el cultivo primario de células de microvasculatura placentaria hPMEC y en las células de macrovasculatura EA.hy926. Al analizar la expresión génica, se observó que los niveles de ARNm de la AQP4 y la Cav-1 fueron significativamente menores en las células de microvasculatura hPMEC en comparación con las células de macrovasculatura EA.hy926 (Ct promedio de AQP4 =  $31,76 \pm 0,54$  en EA.hy926 vs.  $34,04 \pm 0,31$  en hPMEC; Ct promedio de Cav-1 =  $16,10 \pm 0,18$  en EA.hy926 vs.  $18,55 \pm 0,31$  en

hPMEC) mientras que los niveles de expresión génica de AQP1 fueron similares en ambas células endoteliales (Ct promedio AQP1 = 31,01 ± 0,31 en EA.hy926 vs. 30,1 ± 0,27 en hPMEC). Sin embargo, es importante aclarar que si compramos los Ct promedios para ambas AQPs, la expresión génica de la AQP1 parecería ser mayor a la de la AQP4 en ambos tipos celulares. Al analizar la expresión proteica se observaron bandas que coincidían con el PM reportado para AQP1 (32-37 kDa para la forma glicosilada), AQP4 (35-37 kDa) y Cav-1 (22 kDa) (Figura 15).

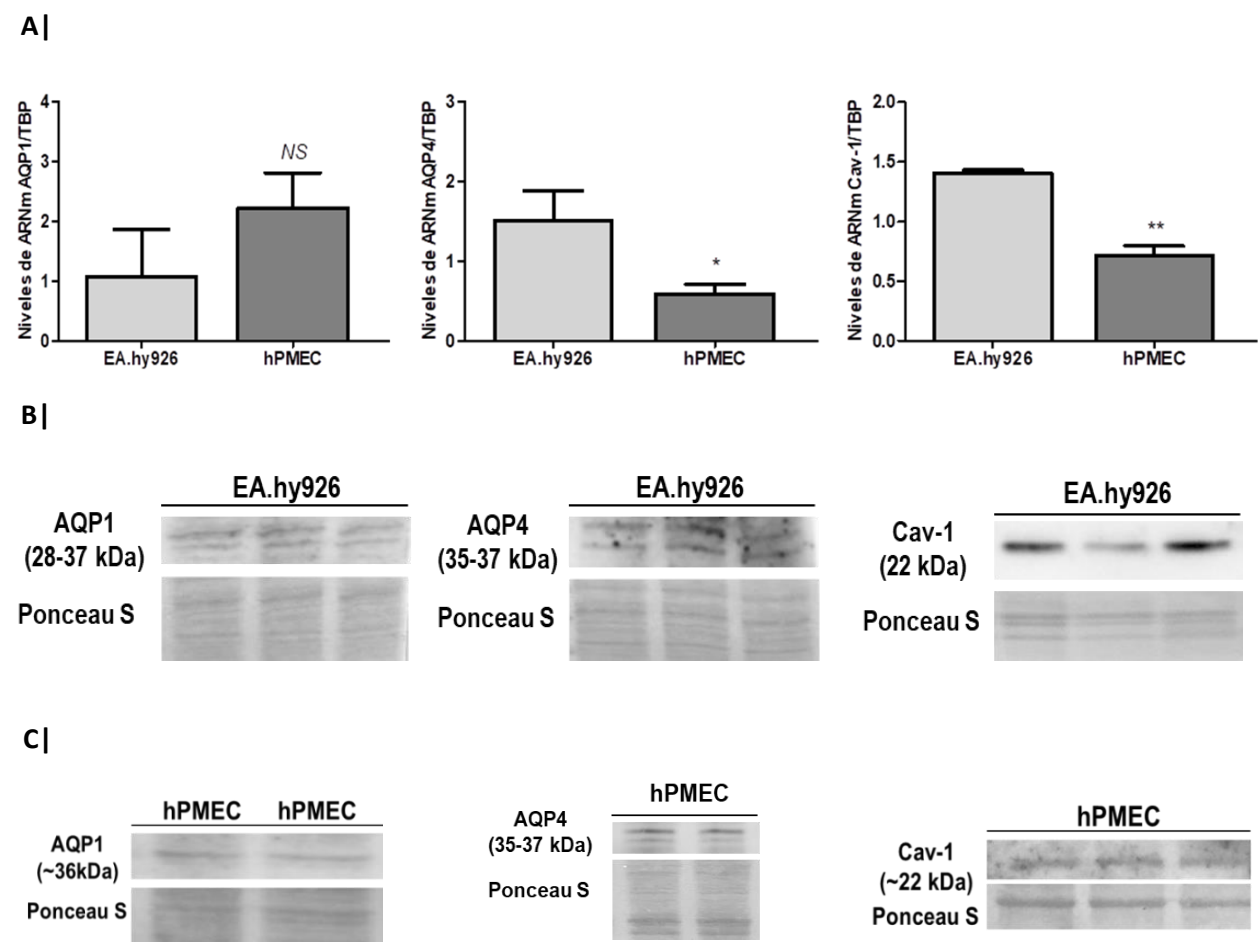


Figura 15: Expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en células EA.hy926 y hPMEC.

A| La expresión génica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 se evaluó en células EA.hy926 y hPMEC por la técnica de RT-qPCR. Las secuencias de los primers fueron: AQP1 humano (Forw: 5'-GCTGATGGTGTGAAGTCTGGG-3', Rev: 5'-GCCAGTGTAGTCAATAGCCAGGA-3'); AQP4 humano (Forw: 5'-GTCCTCAGATTTCTTCCACCCA-3', Rev: 5'-GGTTTCTTCCGTTCTCCTTTGT-3'); Cav-1 (Forw: 5'-GCAGAACGAGAAGGGACACA-3', Rev: 5'-CCAAAGAGGGGCAGAGCAAGC-3'); TBP (Forw: 5'-CCCGAAACGCCGAATATAATCC-3', Rev: 5'-AATCAGTGCCGTGGTTCGTG-3'). (NS: no significativo, \*p<0,05; \*\*p<0,01; n=3). Las barras de error corresponden al SEM.

B| y C| La expresión proteica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 se evaluó en células EA.hy926 y hPMEC por la técnica de Western blot. Se utilizó un anticuerpo primario anti-AQP1 (1:1000), anti-AQP4 (1:1000) o anti-Cav-1 (1:1000) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (1:30000). Se detectaron dos bandas de 28 y 35 kDa correspondientes a la forma no glicosilada y glicosilada de AQP1, dos bandas de 35- 37 kDa correspondientes a AQP4 y una banda de 22 kDa correspondiente a Cav-1 en las células endoteliales de macrovasculatura EA.hy926 (n=3).

## **1.2 Interacción entre AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1**

### **Análisis *in silico* de la interacción entre AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 humanas**

Con el objetivo de evaluar si las proteínas AQP1 y AQP4 humanas interactuaban con Cav-1, se realizó un análisis bioinformático de las secuencias peptídicas de estas proteínas. En este análisis se examinó la estructura primaria de las proteínas AQP1 y AQP4 para identificar los supuestos sitios de unión a Cav-1 siguiendo el motivo consenso en Cav-1 previamente informado (IFWVGPF:  $\Theta X \Theta X X X \Theta$  o  $\Theta X X \Theta X X X \Theta$ , donde  $\Theta$  es fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W) y X es cualquier residuo aminoacídico) [135, 175].

El análisis del alineamiento estructural de la proteína AQP1 humana y el motivo consenso de unión a Cav-1 permitió identificar un sitio putativo de unión a Cav-1 en la proteína AQP1 humana formado por los aminoácidos WIFWVGPF, entre los residuos de aminoácidos 233 a 240 en la estructura 3D cristalizada, similar al informado previamente por Jablonski et. al para AQP1 de rata [182] (Figura 16). Se realizó el mismo análisis para la proteína AQP4 humana y se observó que AQP4 también presenta el motivo consenso de unión a Cav-1 y que éste es muy similar al de AQP1. El dominio está formado por los aminoácidos WIYWVGPI y se encuentra entre los residuos 200 y 207 en la estructura 3D cristalizada (Figura 16).

También se realizó el modelado estructural en 3 dimensiones (3D) de los monómeros y tetrámeros de AQP1 y AQP4 humanas y fue posible visualizar el sitio de unión a Cav-1. Es importante recordar que, en la membrana plasmática, cuatro moléculas de AQPs se ensamblan en tetrámeros formados por monómeros de aproximadamente 30 kDa y las moléculas de H<sub>2</sub>O pasan de a una por cada uno de los monómeros. Respecto al ensamblado biológico de Cav-1, 11 monómeros de Cav-1 se organizan en un complejo en forma de disco, denominado complejo 8S, el cual presenta el dominio de andamiaje (dominio *scaffold*) en el borde exterior



y eso favorece las interacciones con otras proteínas. El modelado estructural permitió afirmar que el sitio de unión a Cav-1 no involucra aminoácidos que están implicados en la formación del poro de agua, sino que comprende distintos aminoácidos que se encuentran en el exterior del tetrámetro (Figura 16).

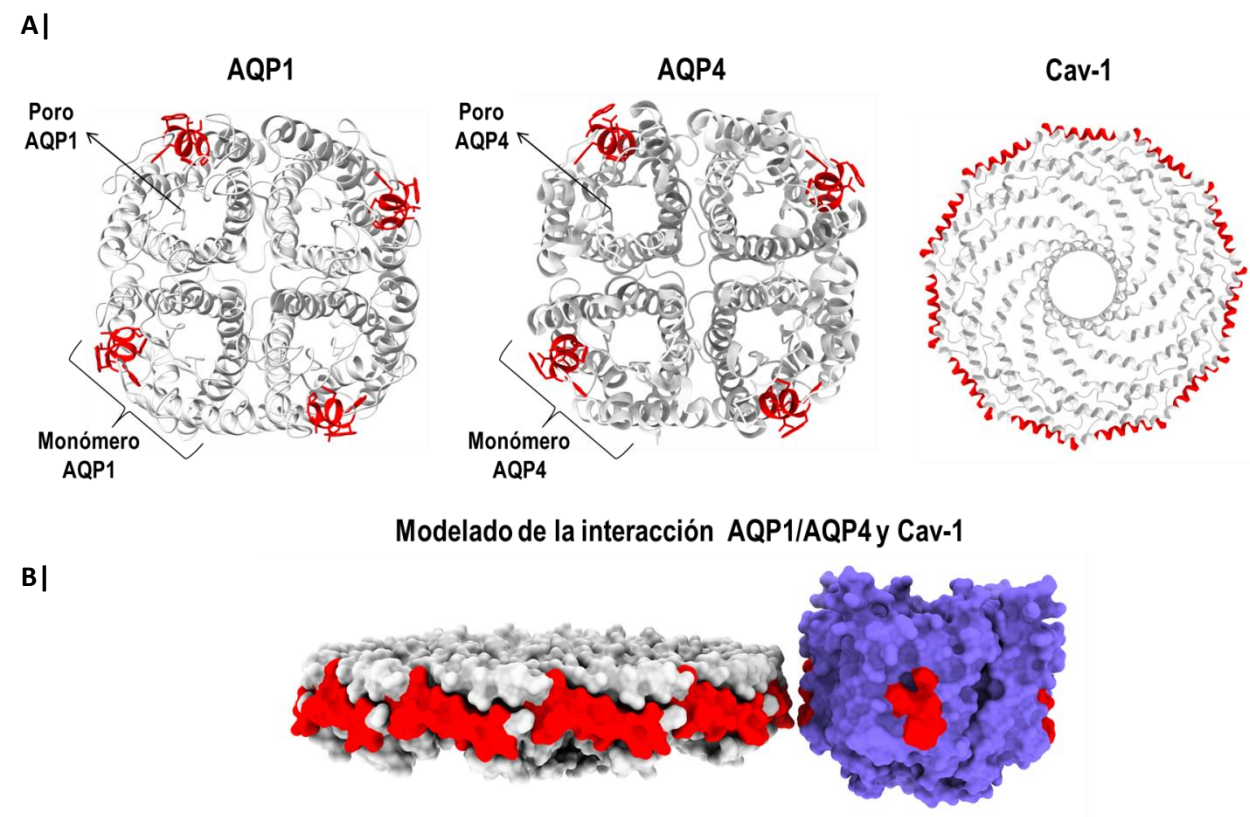


Figura 16: Análisis *in silico* de supuestos motivos de unión a Cav-1 en las proteínas AQP1 y AQP4 humanas. El análisis *in silico* de la estructura primaria de las proteínas AQP1 y AQP4 humanas reveló una coincidencia muy estrecha con el sitio putativo de unión a Cav-1 (WIYWVGPI).

A| Estructura tetramérica de la AQP1 y AQP4 humanas, y ensamblado biológico de Cav-1 humana. La región de unión a Cav-1 en AQP1 y AQP4, así como el dominio de andamiaje (dominio *scaffold*) se representó en rojo.

B| Modelado de la interacción entre AQP1 o AQP4 humanas y Cav-1. La región putativa de unión a Cav-1 en las proteínas AQP1 y AQP4, así como el dominio *scaffold* de Cav-1 se representó en rojo.

## Co-localización de las AQPs y la Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria

Para confirmar los resultados *in silico*, se realizaron experimentos *in vitro* para explorar la probable asociación entre AQP1 y Cav-1 y AQP4 y Cav-1. Por medio de una doble inmunofluorescencia confocal fue posible corroborar la co-localización de AQP1 y Cav-1 y de AQP4 y Cav-1 en la línea celular EA.hy926 (Figura 17) y en las células hPMEC (Figura 18).

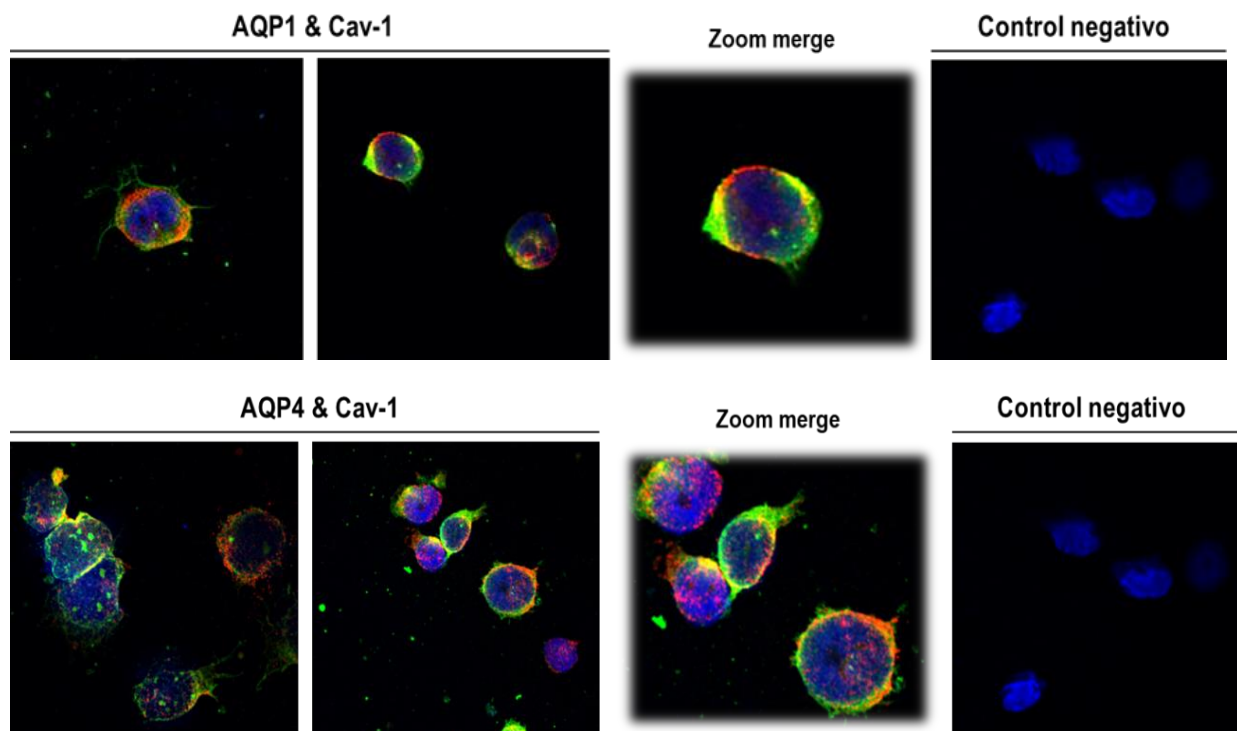


Figura 17: Ensayo de inmunofluorescencia confocal de la AQP1 y Cav-1 y la AQP4 y Cav-1 en células EA.hy926.

Se utilizó un anticuerpo primario anti-AQP1 (1:50), anti-AQP4 (1:50) y un anticuerpo anti-Cav-1 (1:50). Como anticuerpos secundarios se utilizó una mezcla de anti-IgG de conejo H&L (Alexa Fluor® 488) y anti-IgG de ratón H&L (Alexa Fluor® 647). La marca verde corresponde a AQP1 y AQP4 respectivamente, la roja a Cav-1 y en azul se ven los núcleos. Se muestran fotografías representativas de tres ensayos independientes (*Magnificación 1200X*).



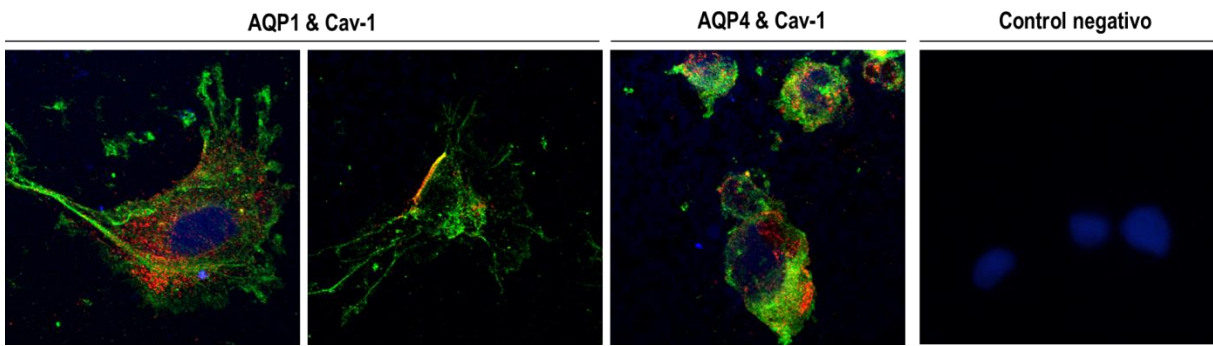


Figura 18: Ensayo de inmunofluorescencia confocal de la AQP1 y Cav-1 y la AQP4 y Cav-1 en células hPMEC.

Se utilizaron anticuerpos primarios anti-AQP1 (1:50), anti-AQP4 (1:50), y anti-Cav-1 (1:50). Como anticuerpos secundarios se utilizó una mezcla de anti-IgG de conejo H&L (Alexa Fluor® 488) y anti-IgG de ratón H&L (Alexa Fluor® 647). La marca verde corresponde a AQP1 y AQP4, la roja a Cav-1, en azul se ven los núcleos. Se muestran fotografías representativas de tres ensayos independientes (*Magnificación 1200X*).

**Co-inmunoprecipitación de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria**

Para corroborar los resultados obtenidos previamente, se realizó el ensayo de inmunoprecipitación a partir de lisados de células hPMEC y EA.hy926 cargando a la resina el anticuerpo anti-Cav-1. Se observó que las proteínas AQP1 y Cav-1 co-inmunoprecipitaban, al igual que las proteínas AQP4 y Cav-1 tanto en las células de macrovasculatura EA.hy926 como en las células de microvasculatura placentaria hPMEC, dado que se detectó la presencia de la AQP1 y la AQP4 en los eluidos correspondientes (Figuras 19 y 20).

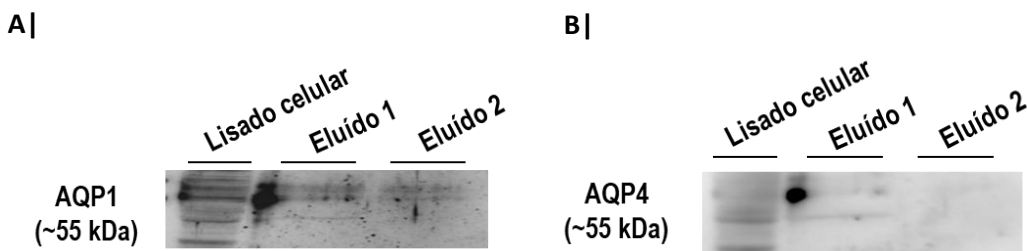


Figura 19: Co-inmunoprecipitación de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 en células EA.hy926.

Lisados de células EA.hy926 se incubaron en una columna de agarosa con proteína-A/G unida a un anticuerpo anti-Cav-1. Los inmunoprecipitados se resolvieron por Western blot y se revelaron con un

anticuerpo anti-AQP1 (1:1000) (A|) y anti AQP4 (1:1000) (B|). Se observó que las proteínas AQP1 y AQP4 co-inmunoprecipitaban con Cav-1 (n=3).

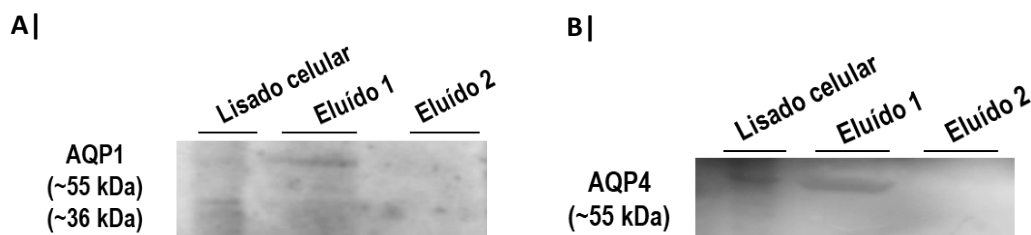


Figura 20: Co-inmunoprecipitación de AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 en células hPMEC.

Lisados de células hPMEC se incubaron en una columna de agarosa con proteína A/G unida a un anticuerpo anti-Cav-1. Los inmunoprecipitados se resolvieron por Western blot y se revelaron con un anticuerpo anti-AQP1 (1:1000) (A|) y anti AQP4 (1:1000) (B|). Se observó que las proteínas AQP1 y AQP4 co-inmunoprecipitaban con Cav-1 (n=3).

**1.3 Participación de la AQP1 y la AQP4 en los procesos de angiogénesis en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria**

**Rol de la AQP1 y la AQP4 en la funcionalidad de células endoteliales de macrovasculatura**

Con el fin de evaluar el rol de la AQP1 y la AQP4 en la funcionalidad de la macrovasculatura placentaria se llevaron a cabo diferentes ensayos. Por un lado, se evaluó el rol de estas proteínas en las diferentes funciones llevadas a cabo por las células endoteliales (proliferación, migración celular, formación de túbulos, etc.) empleando para ello inhibidores farmacológicos que por impedimento estérico bloquean el poro de agua haciendo que la proteína no sea funcional y silenciamiento génico mediado por ARN de interferencia.

Se utilizó cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) como inhibidor de AQP1 y cloruro de tetraetilamonio (TEA) como inhibidor de AQP1 y AQP4 [212]. Cabe mencionar que si bien el HgCl<sub>2</sub> es un inhibidor no selectivo de AQPs, en nuestro caso sólo bloquea a la AQP1 dado que la AQP4 es insensible a este compuesto [213]. El compuesto TEA interactúa reversiblemente con un residuo de tirosina localizado cerca del poro de agua en las AQP1 y AQP4 por lo que este compuesto bloquea funcionalmente a ambas isoformas.

Con el fin de corroborar que el efecto obtenido no se debía a citotoxicidad del tratamiento, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular luego del tratamiento con  $\text{HgCl}_2$  y TEA. Se determinó que las concentraciones a utilizar serían de  $35\ \mu\text{M}$  para  $\text{HgCl}_2$  y  $100\ \mu\text{M}$  para TEA (Figura 21).

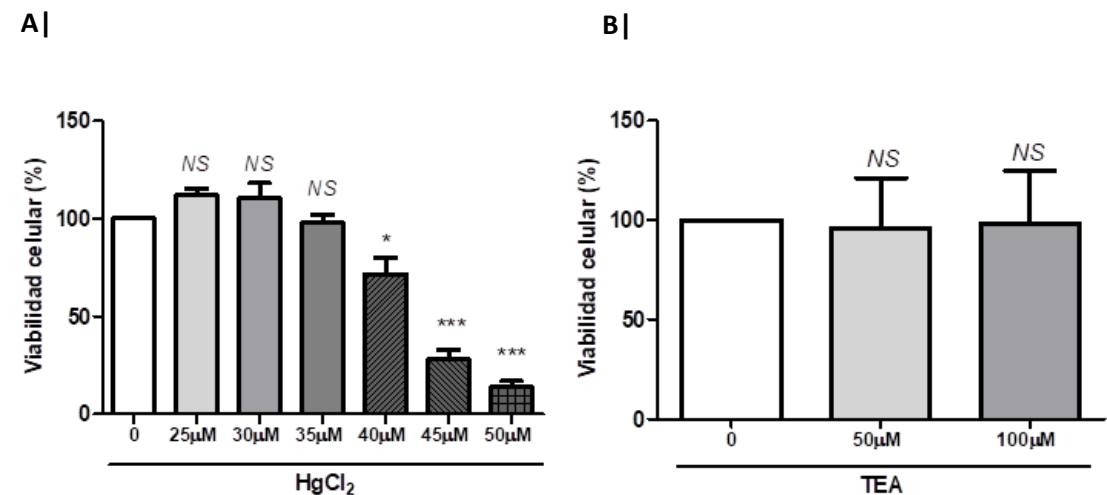


Figura 21: La viabilidad celular luego del tratamiento con diferentes concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  (A|) y TEA (B|) se evaluó mediante el ensayo MTT en células EA.hy926. Se determinó que se utilizaría  $\text{HgCl}_2$   $35\ \mu\text{M}$  y TEA  $100\ \mu\text{M}$  (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 5$  para  $\text{HgCl}_2$ ;  $n = 3$  para TEA). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Para corroborar la eficiencia del tratamiento con  $\text{HgCl}_2$  y TEA en la inhibición de las AQPs, se realizó un experimento de *cell swelling* o hinchamiento celular. Las células endoteliales EA.hy926 se cultivaron en hipoosmolaridad (generada por dilución al medio del medio de cultivo basal) en presencia y ausencia de los inhibidores y se registraron los cambios en el tamaño celular en las distintas condiciones experimentales. En la condición hipoosmolar se evidenció un aumento significativo en el tamaño celular en comparación al control isoosmolar. Con el agregado de  $100\ \mu\text{M}$  de TEA al medio hipoosmolar, no se observaron diferencias significativas en el tamaño celular en comparación al control isoosmolar, sugiriendo que esta concentración de TEA lograba reducir significativamente el hinchamiento celular. Cuando al medio hipoosmolar se le agregó  $35\ \mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$ , se observó una disminución significativa en el tamaño celular en comparación al medio hipoosmolar sin inhibidores. Sin embargo, dicho tratamiento no logró inhibir el hinchamiento celular con la misma eficacia que el TEA, dado que al comparar el tamaño celular de la condición hipoosmolar con el agregado de  $\text{HgCl}_2$  con el

control isoosmolar, se evidenciaron diferencias significativas en el tamaño celular entre ambas condiciones (Figura 22).

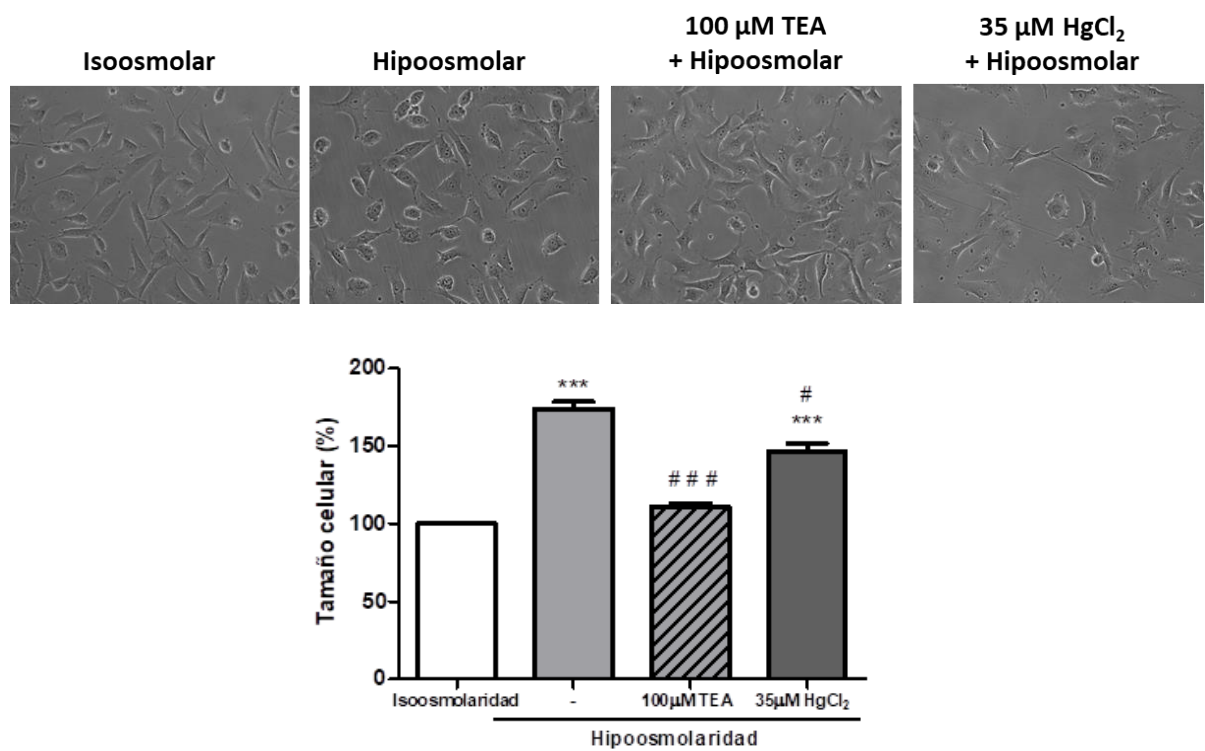


Figura 22: Efecto del bloqueo de AQP1 y AQP4 con inhibidores farmacológicos en el tamaño de células EA.hy926. Se cuantificaron los cambios en el tamaño celular luego del tratamiento con el medio hipoosmolar y con el medio hipoosmolar suplementado con TEA y HgCl<sub>2</sub> (\*p<0,05, \*\*\*p<0,001 vs. Isoosmolaridad; ### p<0,001 vs. Hipoosmolaridad; n=3). *Magnificación 200X*. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Se evaluó la capacidad migratoria de células endoteliales EA.hy926 tratadas con HgCl<sub>2</sub> y con TEA como inhibidores farmacológicos de AQP1 y AQP4. Cuando se bloqueó a las AQPs con HgCl<sub>2</sub>, no se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de cierre de herida entre el tratamiento y el control, y solo se evidenció una disminución significativa en la velocidad de migración a las 24 horas. En cambio, cuando se trató a las células con TEA, se evidenció una disminución significativa en el porcentaje de cierre de herida como en la velocidad de migración a las 18 y 24 horas entre células tratadas con TEA y células control (Figura 23).

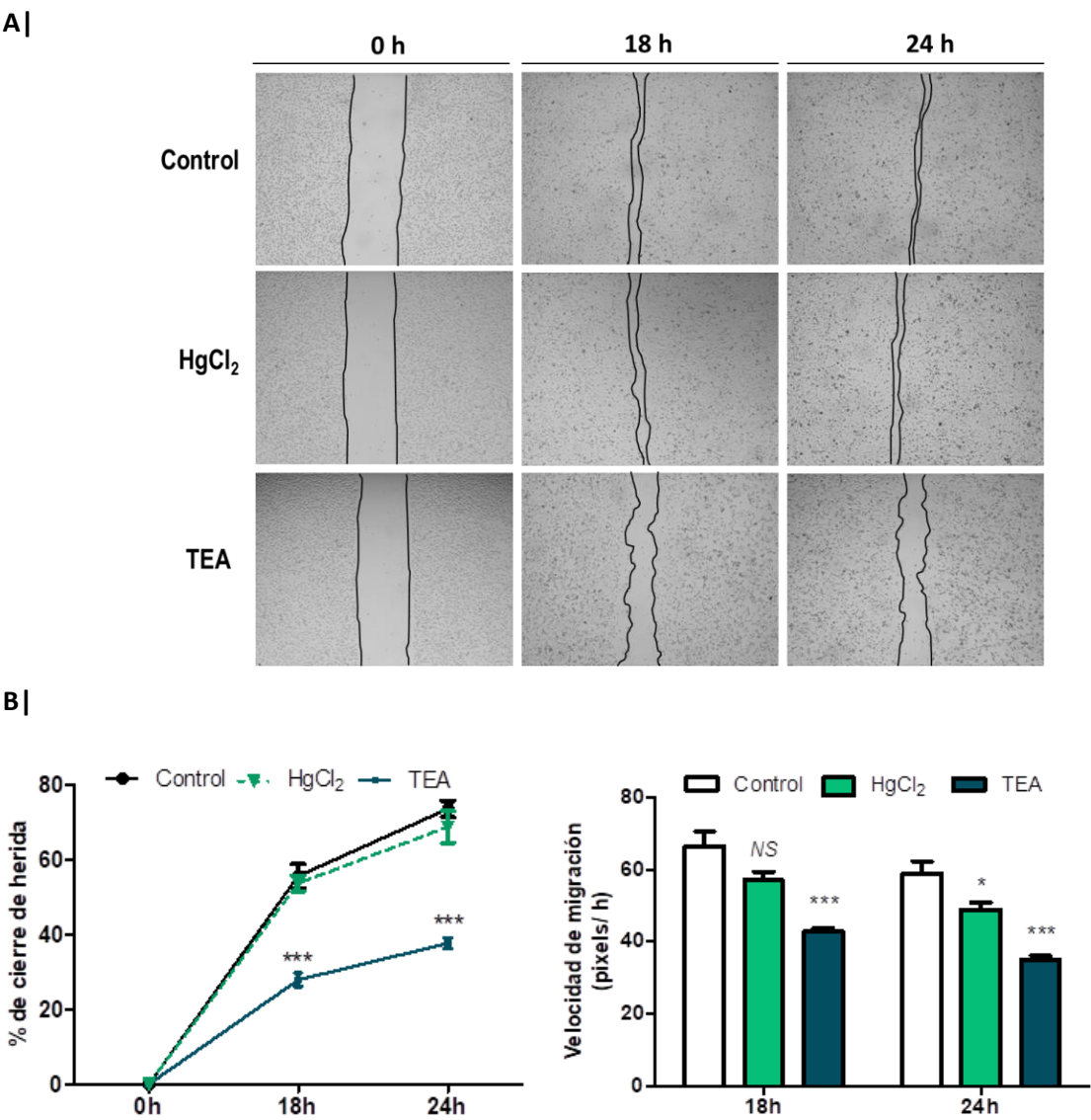


Figura 23: Efecto del bloqueo farmacológico de AQP1 y AQP4 con HgCl<sub>2</sub> y TEA sobre la migración de células EA.hy926.

A| Fotografías representativas de la migración de células EA.hy926 control y tratadas con 35  $\mu$ M HgCl<sub>2</sub> y 100  $\mu$ M TEA a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X*.

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente después del bloqueo de AQP1 y AQP4 con TEA a las 18 y 24 horas en comparación al control, mientras que el bloqueo con HgCl<sub>2</sub> no alteró el porcentaje de cierre de herida en comparación al control y sólo se evidenció una disminución significativa en la velocidad de migración a las 24 horas respecto al control (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 4$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Para confirmar los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos, se empleó la estrategia de silenciamiento génico mediada por RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) específicos para AQP1 y AQP4. La técnica de ARN de interferencia involucra un mecanismo celular endógeno mediante el cual los ARNm extraños son clivados impidiendo su traducción. Los ARN de doble cadena son procesados en citoplasma por la enzima Dicer, que los cliva dando origen a pequeños fragmentos de ARN doble cadena de 21 pb, denominados siRNAs (*small interfering RNAs*). Las hebras de sentido 3'-5' (llamadas *sense strands*) son incorporadas al complejo proteico formado por la enzima RISC, que las emplea como molde para el clivaje específico de ARN mensajeros blanco que contengan dicha secuencia [214].

Lo primero que se evaluó fue la citotoxicidad del agente de transfección en las células EA.hy926 dentro del rango de concentraciones de uso recomendadas por el fabricante (0,4 – 1,6 µL de reactivo de transfección por cada 5 x 10<sup>4</sup> células). Luego de 5 horas de incubación con el reactivo, las células fueron incubadas durante 24 horas en DMEM/F-12 suplementado con 10% SFB. Finalizada la incubación se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

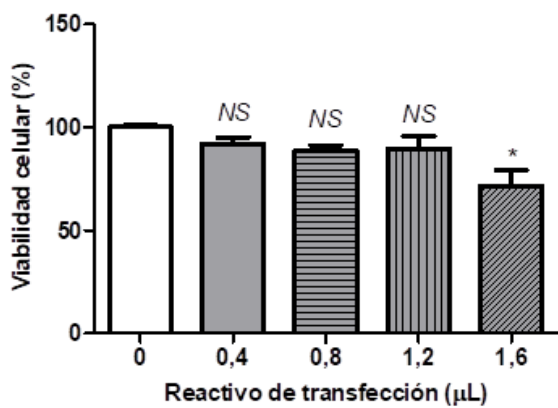


Figura 24: Viabilidad celular luego del tratamiento con concentraciones crecientes de reactivo de transfección en células EA.hy926. La viabilidad celular disminuyó significativamente luego del tratamiento con 1,6 µL de reactivo de transfección en células EA.hy926 (NS: no significativo, \*p<0,05; n=3).

Una vez determinadas las concentraciones de reactivo de transfección que no eran citotóxicas para las células EA.hy926, se procedió a evaluar la eficiencia de la transfección a fin de determinar la relación óptima siRNA/ reactivo de transfección. Para eso se empleó un siRNA control conjugado con fluoresceína, el cual contiene una secuencia codificada que no conduce a la degradación específica de ningún ARNm celular conocido. Para el caso de las células EA.hy926, si bien con 0,8  $\mu\text{L}$  de reactivo de transfección ya se evidenciaban complejos fluorescentes en el citoplasma celular, se decidió seleccionar la relación 1,6  $\mu\text{L}$  siRNA/1,2  $\mu\text{L}$  reactivo de transfección ya que fue la máxima concentración de reactivo de transfección que no generaba muerte celular y donde se evidenciaron los complejos fluorescentes en el citoplasma celular (Figura 25).

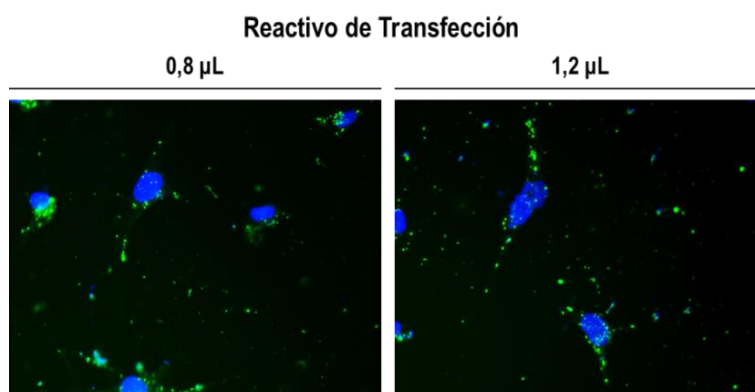


Figura 25: Eficiencia de la transfección en células EA.hy926. Con 0,8  $\mu\text{L}$  y 1,2  $\mu\text{L}$  de reactivo de transfección se evidencia el complejo fluorescente en el citoplasma celular ( $n=3$ ). *Magnificación 400x*.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la transfección, se realizó el silenciamiento de AQP1 y AQP4 en células EA.hy926 empleando un pool de 3 siRNAs específicos para cada gen disponibles comercialmente (siRNA-AQP1 y siRNA-AQP4, Santa Cruz Biotechnology). En primer lugar, se confirmó la efectividad del silenciamiento mediante la técnica de Western blot (Figura 26), y posteriormente se realizó el ensayo de *wound healing* o cicatrización de herida.

Seguidamente se procedió a evaluar la capacidad migratoria en células EA.hy926 silenciadas para AQP1. Se observó una disminución significativa en el porcentaje de cierre de herida entre células tratadas con siRNA-AQP1 y células control a las 24 horas y una disminución significativa

en la velocidad de migración a las 18 horas y 24 horas entre células tratadas con siRNA-AQP1 y células control (Figura 27).

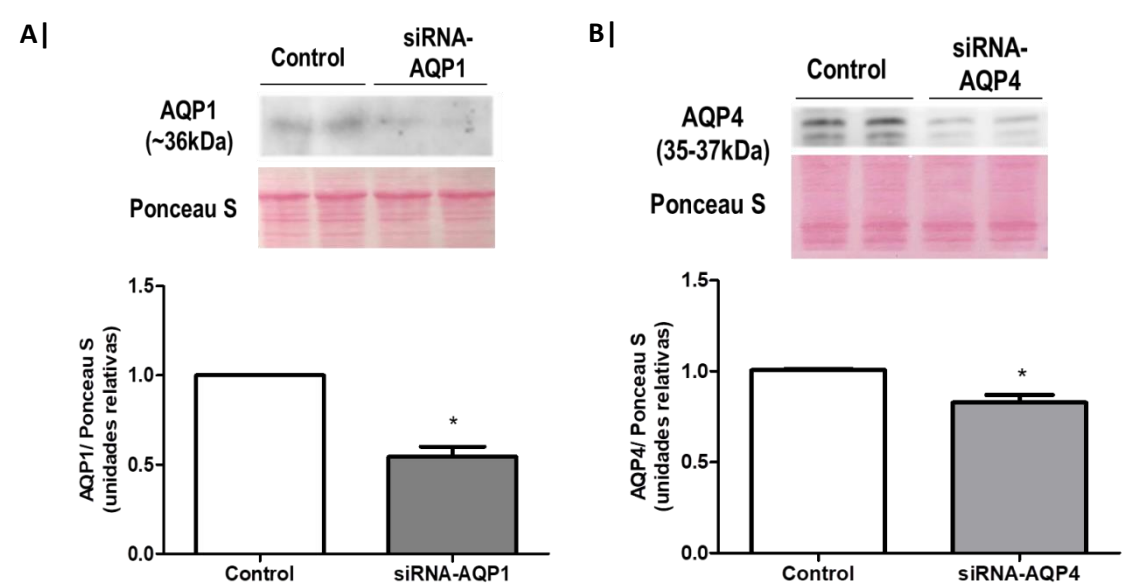


Figura 26: Eficiencia del silenciamiento de AQP1 y AQP4 en células EA.hy926 mediante la técnica de Western blot. Western blot representativo de AQP1 (A) y AQP4 (B) luego del silenciamiento mediado por siRNAs específicos y su correspondiente cuantificación relativa. La abundancia relativa de las proteínas AQP1 y AQP4 disminuyó significativamente después del silenciamiento en comparación al control (\*p<0,05; n=3). Las barras de error corresponden al SEM.



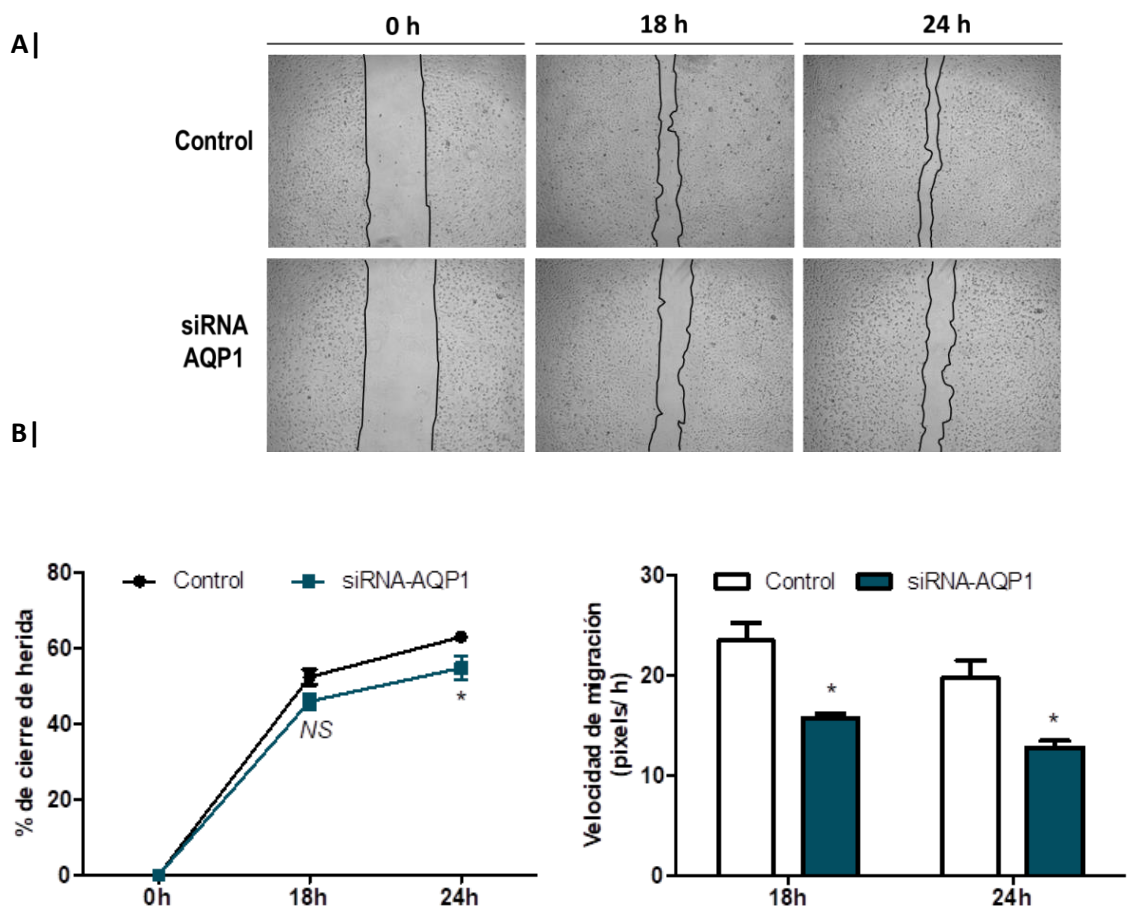


Figura 27: Efecto del silenciamiento de AQP1 sobre la migración de células EA.hy926.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. Magnificación 40X.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. El porcentaje de cierre de herida disminuyó significativamente a las 24 horas cuando las células fueron silenciadas de AQP1 en comparación al control. También se cuantificó la velocidad de migración y se observó que la misma fue significativamente menor cuando las células EA.hy926 fueron silenciadas para AQP1 en comparación al control a las 18 y 24 horas (NS: no significativo, \*p<0,05; n=3). Los valores se presentan como medias ± SEM.

Posteriormente, se evaluó el rol de AQP4 en la migración de estas células endoteliales macrovasculares. Para eso, se silenció la expresión génica de AQP4 mediante un siRNA específico para esta AQP y se evaluó la capacidad migratoria de las células endoteliales macrovasculares EA.hy926. Sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas en la migración celular cuando las células EA.hy926 fueron silenciadas para AQP4 (Figura 28).

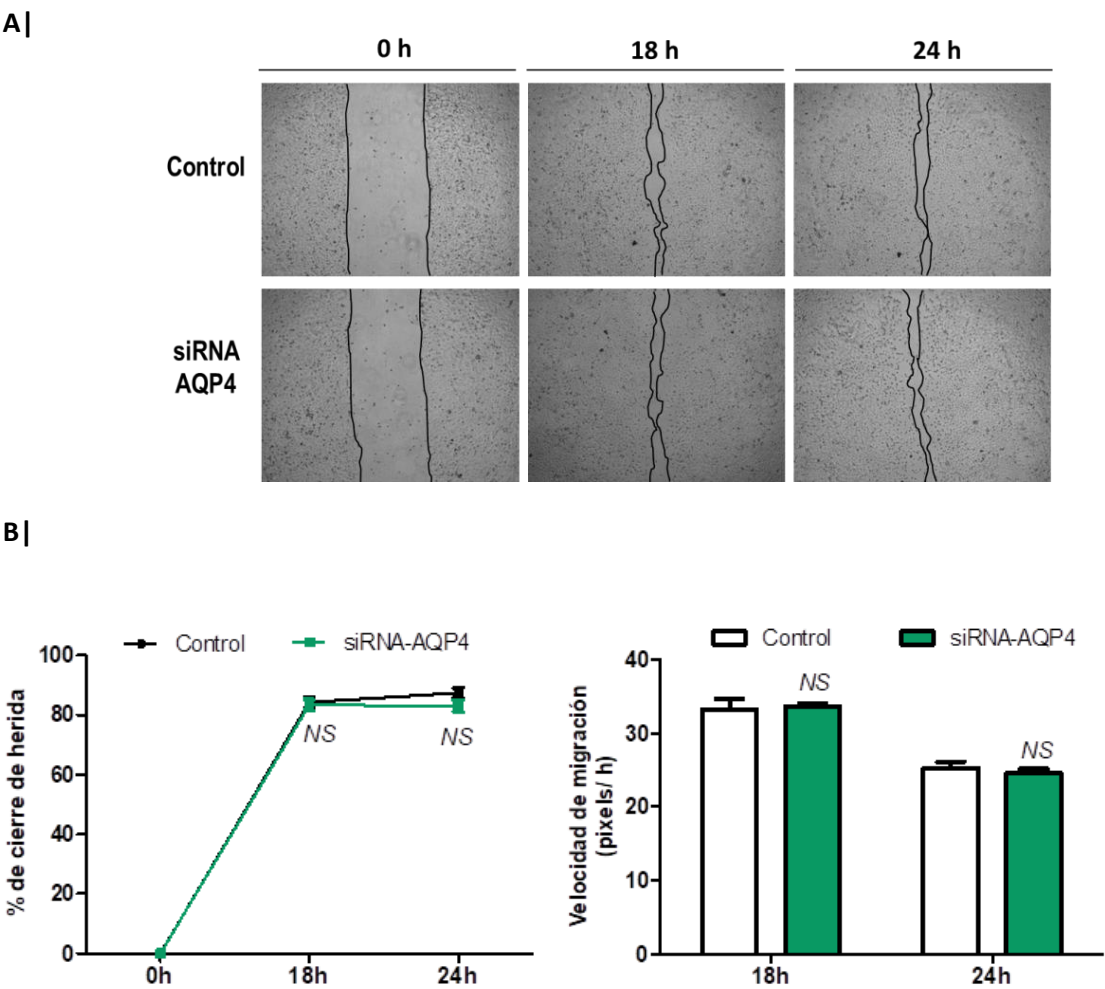


Figura 28: Efecto del silenciamiento de AQP4 sobre la migración de células EA.hy926.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el porcentaje de cierre de la herida y la velocidad de migración. No se encontraron diferencias significativas entre el silenciamiento de AQP4 y el control en ninguno de los tiempos estudiados. (NS: no significativo; n=3). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Se continuó estudiando la participación de AQP1 y AQP4 en la angiogénesis de las células endoteliales macrovasculares para lo cual se realizó el ensayo de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial sobre matriz extracelular. Para eso, células silenciadas para AQP1 (siRNA-AQP1), AQP4 (siRNA-AQP4) o células control fueron cultivadas sobre una matriz extracelular comercial y se cuantificaron diferentes parámetros de la red tubular como el área total de mallas, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de los segmentos. Se observó que tanto el área total de mallas como la longitud total de los segmentos

disminuyeron significativamente cuando la AQP1 estaba silenciada en comparación al control (Figura 29), mientras que en el caso de células en las que se silenció la AQP4, sólo se observó una disminución significativa en el área total de mallas en comparación al control (Figura 30).

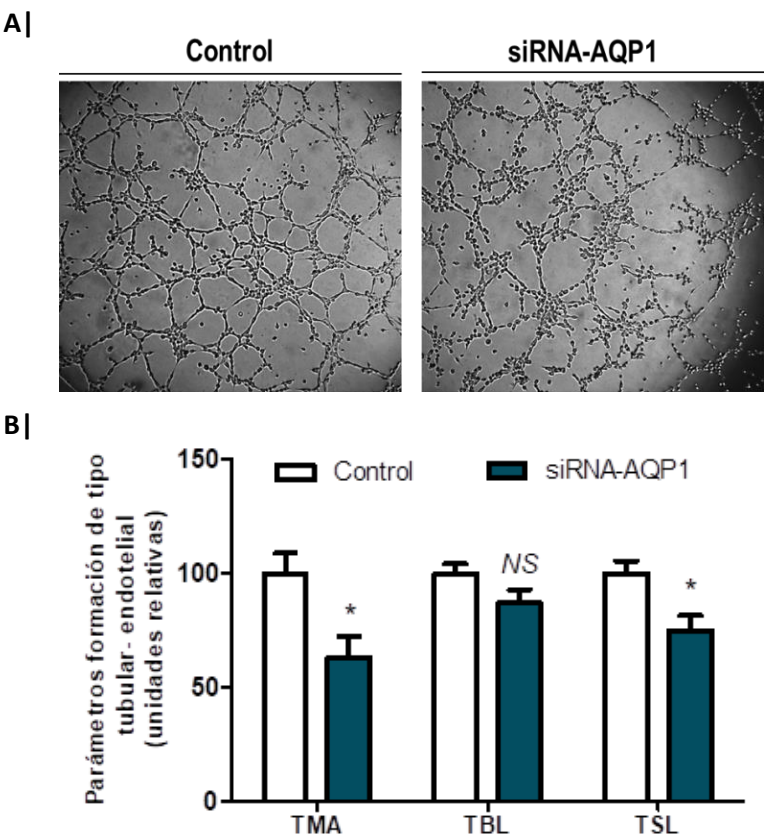


Figura 29: Efecto del silenciamiento de AQP1 sobre la formación de estructuras tubulares de las células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de AQP1 a las 8 horas. *Magnificación 40X*.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r<sup>®</sup> con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células EA.hy926. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Luego del silenciamiento de AQP1, el área total de mallas y la longitud total de los segmentos disminuyeron significativamente en comparación al control (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ ;  $n = 4$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

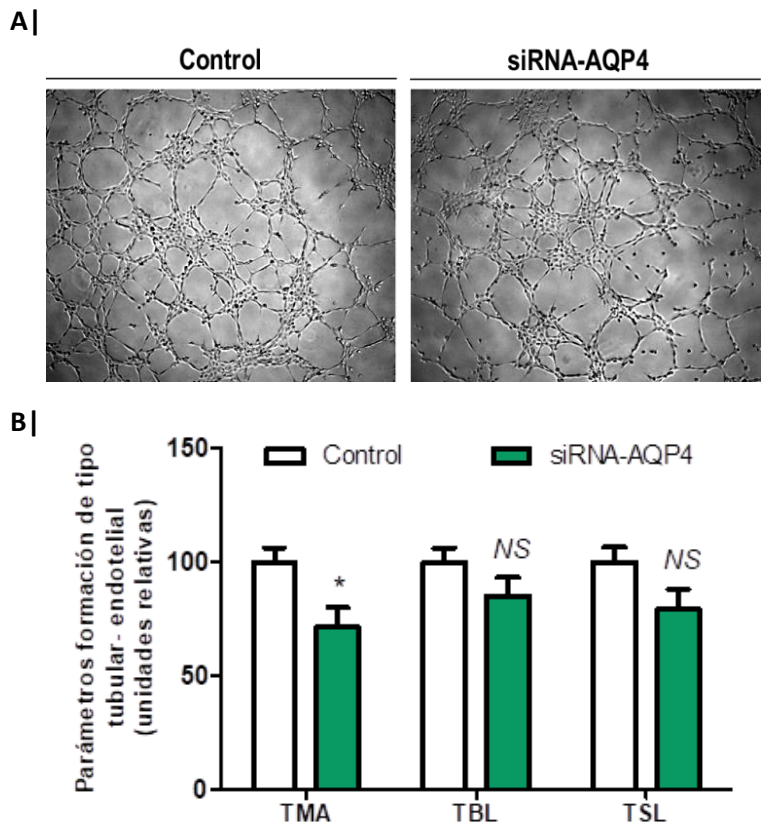


Figura 30: Efecto del silenciamiento de AQP4 sobre la formación de estructuras tubulares de las células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de AQP4 a las 8 horas. *Magnificación 40X*.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células EA.hy926. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en tres experimentos independientes. Luego del silenciamiento de AQP4, el área total de mallas disminuyó significativamente en comparación al control (NS: no significativo, \* $p<0,05$ ;  $n=3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

**Efecto del bloqueo de la AQP1 y la AQP4 sobre la migración de células de microvasculatura placentaria**

Con el fin de evaluar la participación de las AQP1 y AQP4 sobre la migración y tubulogénesis de células endoteliales microvasculares, monocapas confluentes de células hPMEC se sometieron al bloqueo farmacológico de las AQPs. De la misma manera que con las células EA.hy926, se utilizó cloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) como inhibidor no selectivo de AQPs y cloruro de tetraetilamonio (TEA) como inhibidor de AQP1 y AQP4.

Lo primero que se realizó fue la evaluación de la viabilidad celular para determinar las concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  y TEA a emplear y se determinó que al igual que con las células de macrovasculatura, serían 35  $\mu\text{M}$  para  $\text{HgCl}_2$  y 100  $\mu\text{M}$  para TEA (Figura 31).

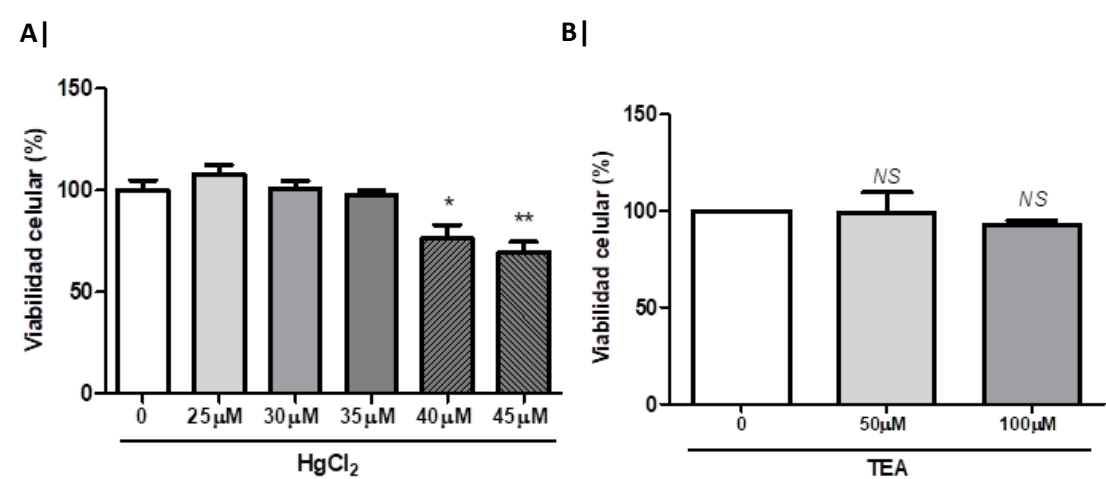


Figura 31: La viabilidad de células hPMEC tratadas con concentraciones crecientes de  $\text{HgCl}_2$  (A) y TEA (B) se evaluó mediante el ensayo MTT. Se determinó que se utilizaría  $\text{HgCl}_2$  35  $\mu\text{M}$  y TEA 100  $\mu\text{M}$  (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 5$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Se realizó además el experimento de *cell swelling* o hinchamiento celular para corroborar la eficiencia del tratamiento con  $\text{HgCl}_2$  y TEA en las células hPMEC. Las células endoteliales se cultivaron en hipoosmolaridad en presencia y ausencia de los inhibidores y se registraron los cambios en el tamaño celular en las distintas condiciones experimentales. En la condición hipoosmolar se evidenció un aumento significativo en el tamaño celular en comparación al control isoosmolar. Con el agregado de 100  $\mu\text{M}$  de TEA y 35  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  al medio hipoosmolar, no se observaron diferencias significativas en el tamaño celular en comparación al control isoosmolar, sugiriendo que estas concentraciones empleadas lograban prevenir el hinchamiento celular (Figura 32).

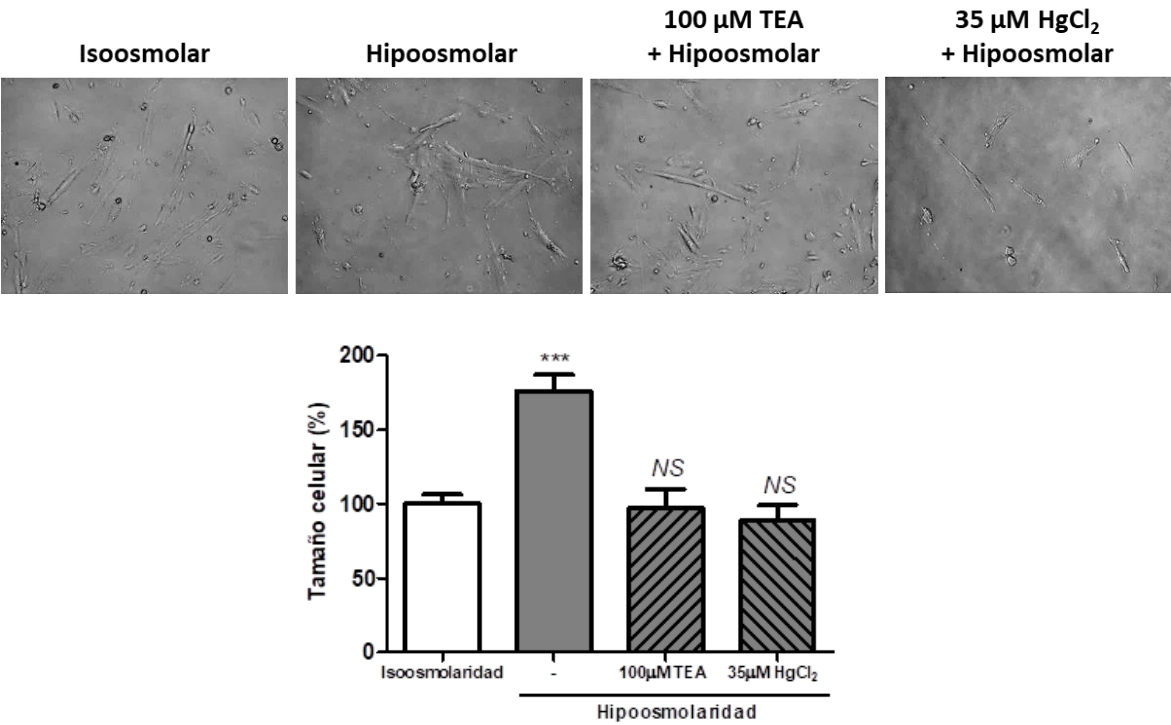


Figura 32: Efecto del bloqueo de AQP1 y AQP4 con inhibidores farmacológicos en el volumen de células hPMEC. Se cuantificaron los cambios en el tamaño celular luego del tratamiento con el medio hipoosmolar y con el medio hipoosmolar suplementado con TEA y HgCl<sub>2</sub> (\*\*\*p<0,001 vs. Isoosmolaridad; n=4). *Magnificación 200X*. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Evaluamos la participación de AQP1 y AQP4 en la migración de células endoteliales microvasculares placentarias hPMEC (Figura 33). El análisis de las fotografías obtenidas a los distintos tiempos arrojó que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración a las 18 y 24 horas disminuyeron significativamente cuando las células se trataron con TEA y con HgCl<sub>2</sub> en comparación al control (Figura 33).

Para confirmar los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos en las células hPMEC, se empleó, al igual que en las células EA.hy926, la estrategia de silenciamiento génico mediada por RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) específicos para AQP1 y AQP4. Se realizó el silenciamiento génico y posteriormente, se cuantificó la capacidad migratoria de células hPMEC silenciadas para AQP1 y AQP4.



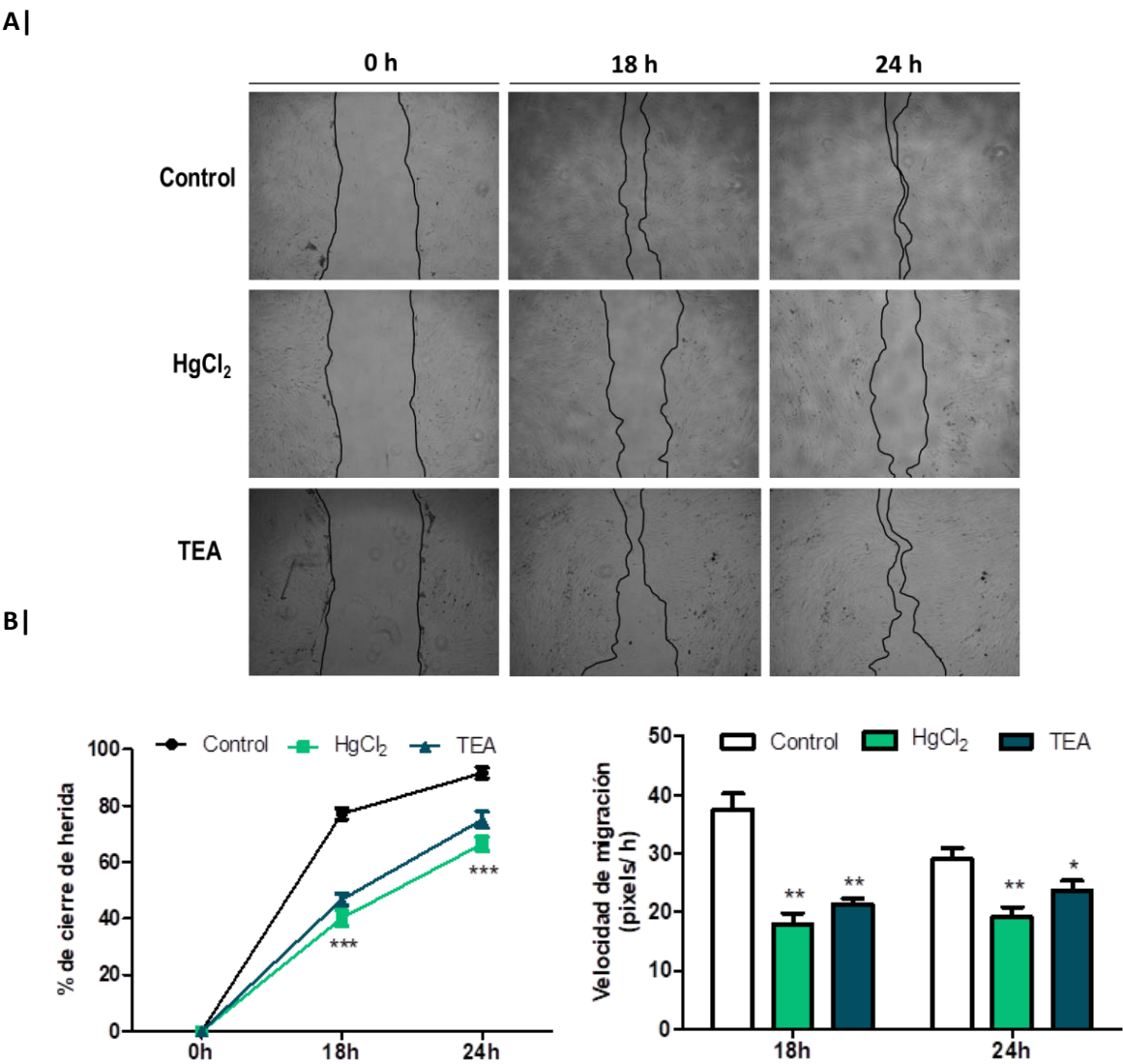


Figura 33: Efecto del bloqueo farmacológico de AQP1 y AQP4 en la migración de células hPMEC.

A | Fotografías representativas de la migración de células hPMEC tratadas con 35  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub> y 100  $\mu$ M TEA a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B | El ensayo de cicatrización de heridas mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente luego del bloqueo de AQP1 con HgCl<sub>2</sub> y TEA en las células hPMEC (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Se evaluó la citotoxicidad del agente de transfección dentro del rango de concentraciones de uso recomendadas por el fabricante (0,4 – 1,6  $\mu$ L de reactivo de transfección por cada  $5 \times 10^4$  células) en las células hPMEC. Luego de 5 horas de incubación con el reactivo, las células fueron incubadas durante 24 horas en medio M199 suplementado con SFB. Finalizada la incubación se evaluó la viabilidad celular por medio del ensayo de MTT (Figura 34).

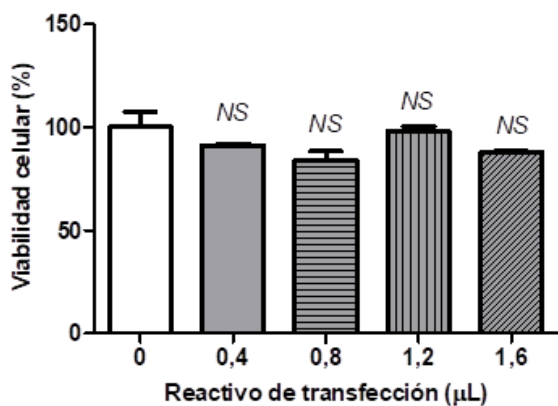


Figura 34: Viabilidad celular luego del tratamiento con concentraciones crecientes de reactivo de transfección en células hPMEC. No se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular luego del tratamiento con las diferentes concentraciones del reactivo de transfección en células hPMEC (NS: no significativo, n=3).

También se evaluó la eficiencia de la transfección a fin de determinar la relación óptima siRNA/ reactivo de transfección a emplear en las células hPMEC. Para eso se empleó un siRNA control conjugado con fluoresceína, y en el caso de las células hPMEC, si bien con 1,2 µL de reactivo de transfección ya se evidenciaban complejos fluorescentes en el citoplasma celular, se decidió seleccionar la relación 1,6 µL siRNA/1,6 µL reactivo de transfección ya que fue la máxima concentración donde se evidenciaron los complejos fluorescentes en el citoplasma celular y no generaba muerte celular (Figura 35).

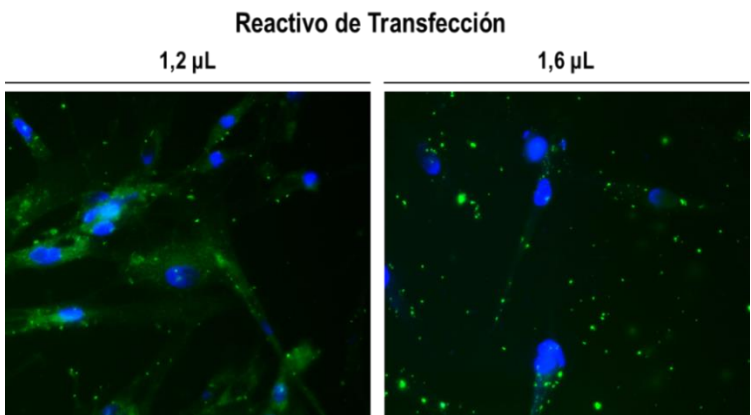


Figura 35: Eficiencia de la transfección en células hPMEC. Con 1,2 µL y 1,6 µL de reactivo de transfección se evidencia el complejo fluorescente en el citoplasma celular (n=3). *Magnificación 400X.*



Se confirmó la efectividad del silenciamiento génico de AQP1 y AQP4 en células hPMEC mediante la técnica de Western blot (Figura 36).

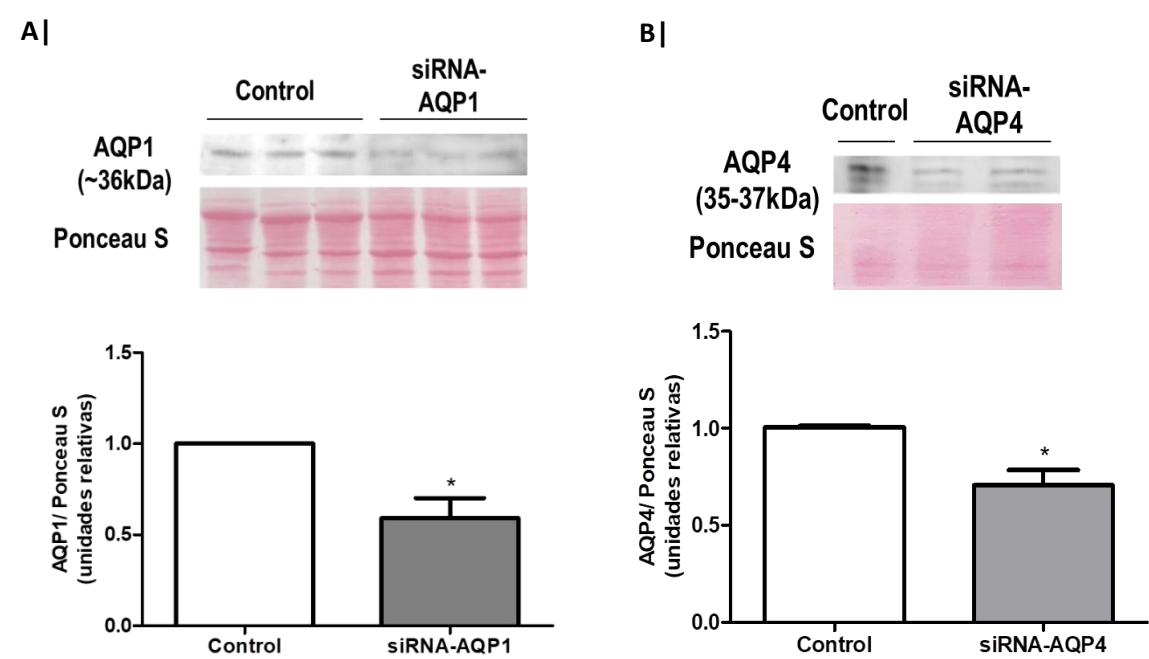


Figura 36: Eficiencia del silenciamiento génico de AQP1 y AQP4 en células hPMEC mediante la técnica de Western blot. Western-blot representativo de AQP1 (A|) y AQP4 (B|) luego del silenciamiento mediado por siRNAs específicos y su correspondiente cuantificación relativa. La abundancia relativa de las proteínas AQP1 y AQP4 disminuyó significativamente después del silenciamiento en comparación al control en células hPMEC (\* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Cuando las células de microvasculatura placentaria hPMEC fueron silenciadas para AQP1, tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente en comparación al control (Figura 37), mientras que al silenciar la AQP4 en células hPMEC, no se observaron diferencias significativas en la migración celular de células hPMEC (Figura 38).

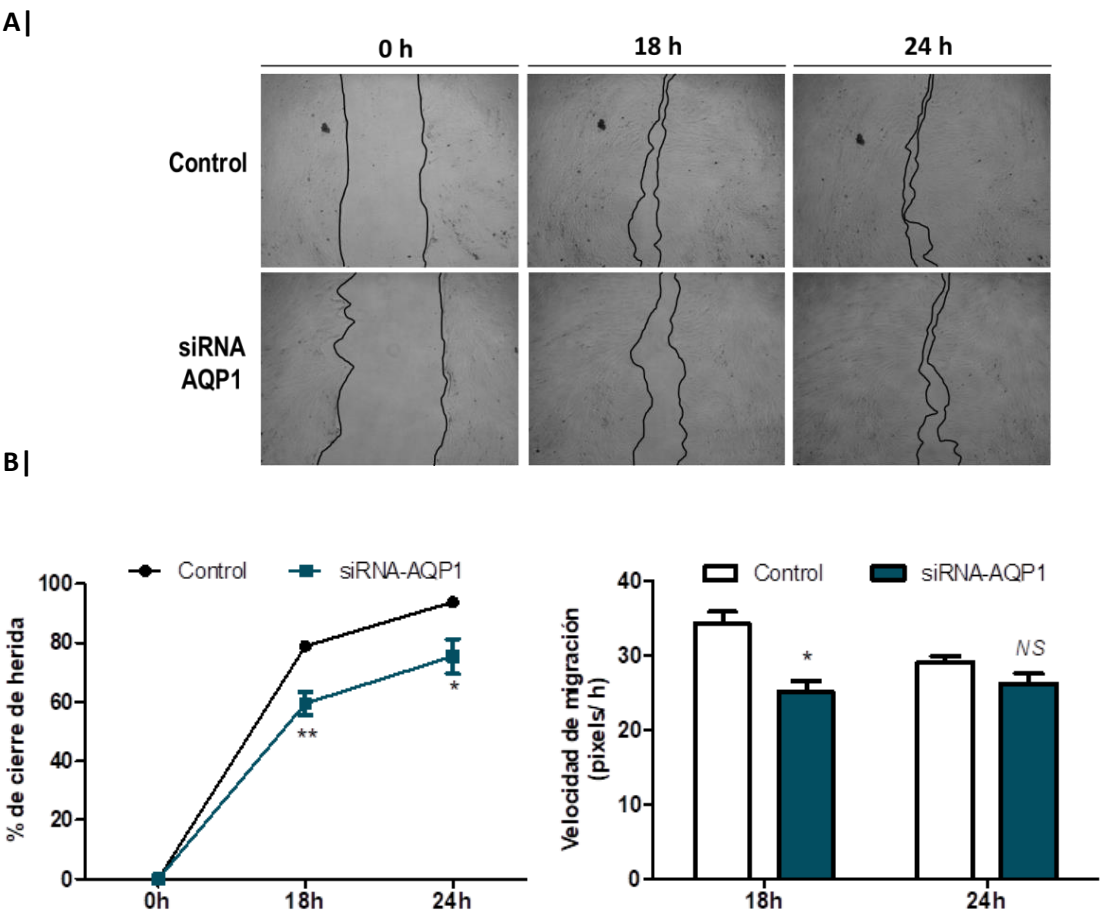


Figura 37: Efecto del silenciamiento de AQP1 sobre la migración de células hPMEC.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. Magnificación 40X.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. También se midió el área de la herida y se calculó la velocidad de migración. Se encontró que el porcentaje de cierre de herida disminuyó significativamente luego del silenciamiento de AQP1 en comparación al control a las 18 y 24 horas. Respecto a la velocidad de migración, se observó que la misma fue significativamente menor cuando las células hPMEC fueron silenciadas para AQP1 en comparación al control a las 18 y 24 horas (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

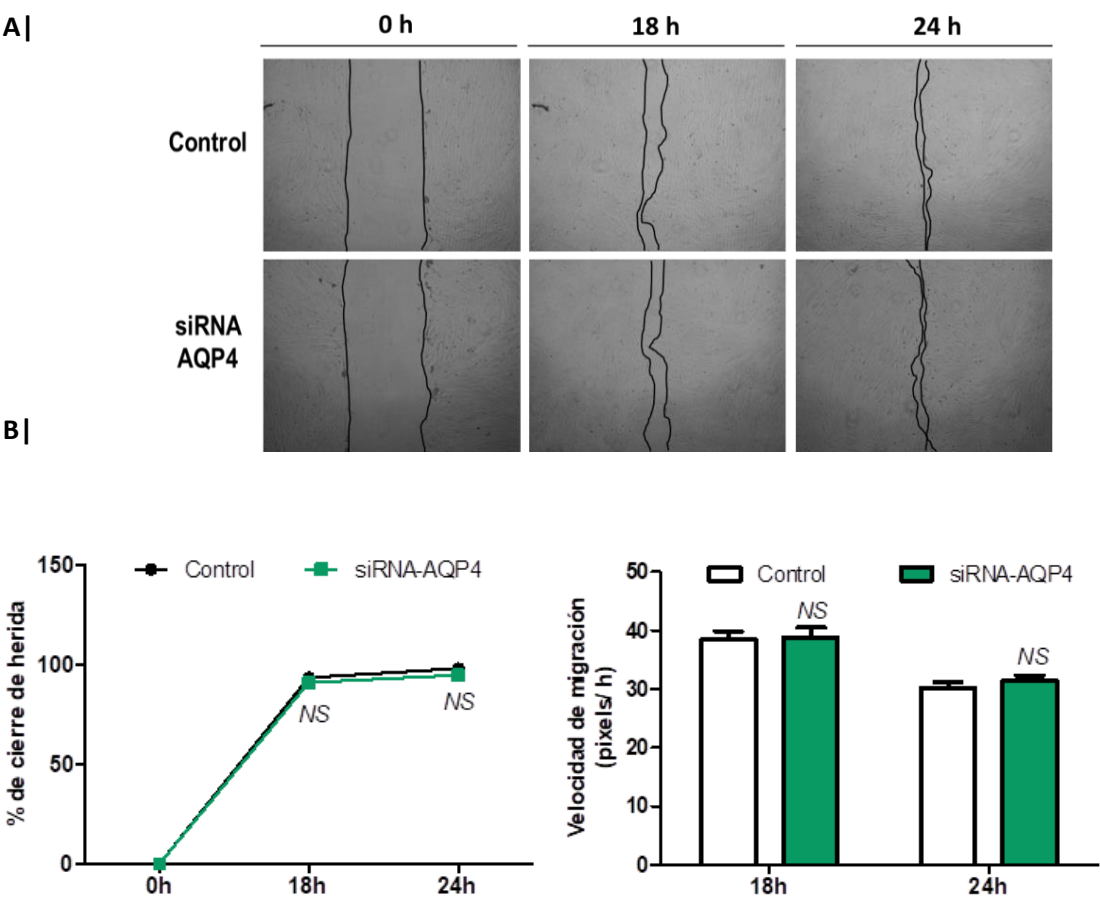


Figura 38: Efecto del silenciamiento de AQP4 sobre la migración de células hPMEC.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de cierre de herida luego del silenciamiento de AQP4 en comparación al control a las 18 y 24 horas. También se cuantificó la velocidad de migración y no se observaron diferencias significativas cuando las células hPMEC fueron silenciadas para AQP1 en comparación al control a las 18 y 24 horas (NS: no significativo; n=3). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Luego se estudió la participación de AQP1 y AQP4 en la angiogénesis de las células endoteliales microvasculares para lo cual se realizó el ensayo de formación de estructuras de tipo tubular-endotelial sobre matriz extracelular. Para eso, células en las cuales se silenció la AQP1 (siRNA-AQP1), AQP4 (siRNA-AQP4) o células control se cultivaron sobre la matriz extracelular comercial Geltrex (Gibco) y se cuantificaron diferentes parámetros de la red tubular como área

total de mallas, longitud total de las ramificaciones y longitud total de los segmentos. Se observó que tanto el área total de mallas como la longitud total de los segmentos disminuyeron significativamente cuando la AQP1 estaba silenciada en comparación al control (Figura 39), mientras que en el caso de células en las que la AQP4 estaba silenciada, sólo se observó una disminución significativa en el área total de mallas en comparación al control (Figura 40).

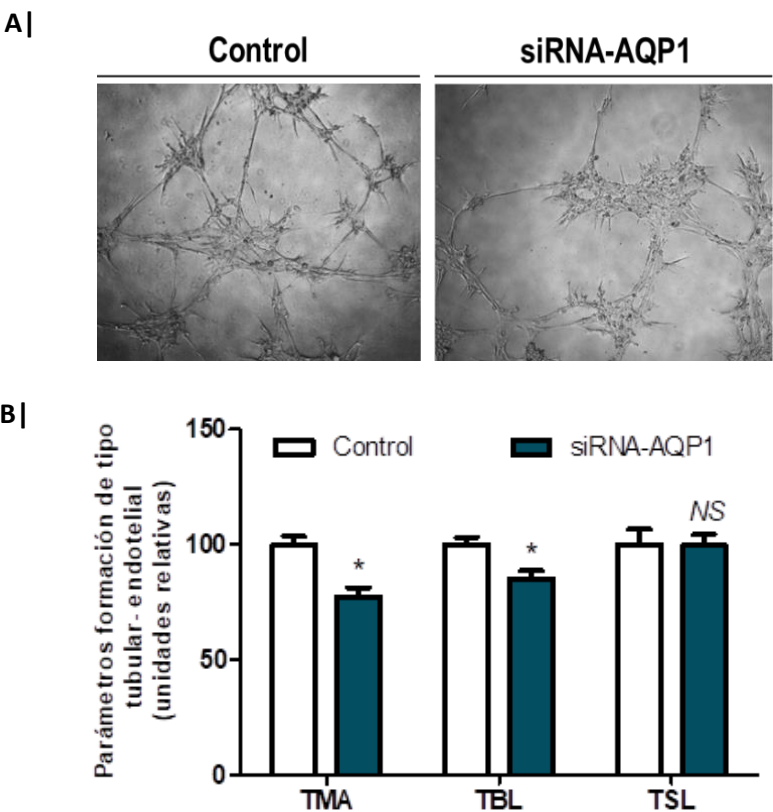


Figura 39: Efecto del silenciamiento de AQP1 sobre la formación de estructuras de tipo tubular/ endotelial en las células hPMEC. *Magnificación 40X.*

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de AQP1 a las 4 horas.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células hPMEC. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Luego del silenciamiento de AQP1, el área total de mallas y la longitud total de los segmentos disminuyeron significativamente en comparación al control (NS: no significativo, \* $p<0,05$ ;  $n=4$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

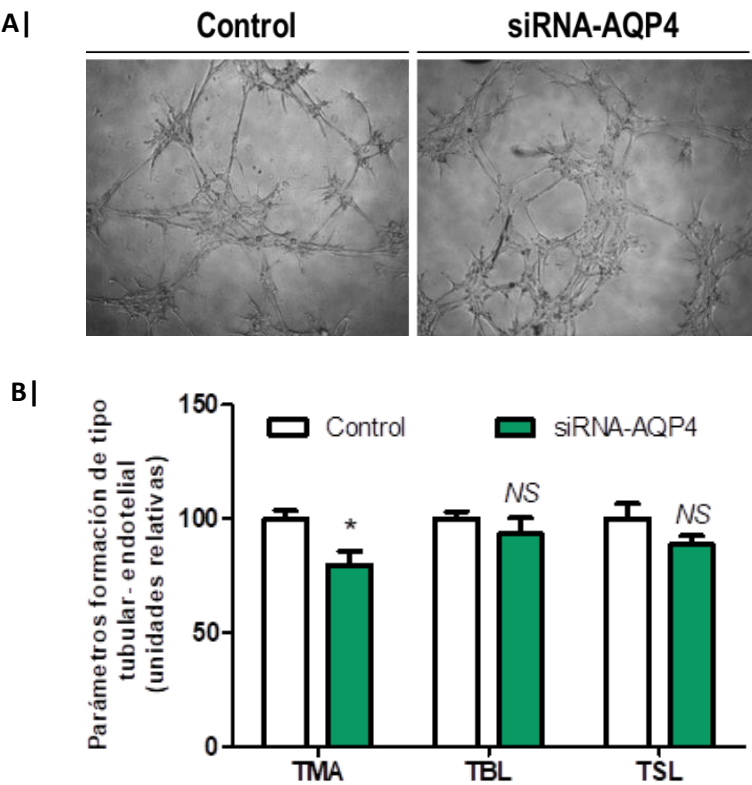


Figura 40: Efecto del silenciamiento de AQP4 sobre la formación de estructuras de tipo tubular/ endotelial en las células hPMEC.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de AQP4 a las 4 horas. *Magnificación 40X*.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células hPMEC. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Luego del silenciamiento de AQP4, el área total de mallas disminuyó significativamente en comparación al control (NS: no significativo, \* $p<0,05$ ;  $n=4$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

**1.4 Participación de las caveolas/ Caveolina-1 en los procesos de angiogénesis en células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria**

Para estudiar la contribución de las caveolas/ Cav-1 en la migración de las células endoteliales, se empleó el compuesto M $\beta$ CD, el cual genera el desensamblado caveolar por depleción de colesterol.

El colesterol es un componente esencial de las células de mamíferos. En la membrana plasmática, el colesterol desempeña papeles físicos críticos en el mantenimiento de la fluidez de la membrana y la permeabilidad de la membrana. También es importante para el tráfico de membrana, la señalización celular y la clasificación de lípidos y proteínas. El colesterol es esencial para la formación de dominios de membrana conocidos como *lipid rafts*. La depleción de colesterol mediada por M $\beta$ CD es el método más ampliamente utilizado para la disrupción de estos dominios de membrana y para el estudio de su participación en diversos procesos celulares como la migración celular [215] .

**Rol de la caveola/ Cav-1 en la funcionalidad de la macrovasculatura placentaria**

Para corroborar la eficiencia del tratamiento con M $\beta$ CD en células EA.hy926, se analizó la localización subcelular de Cav-1 por inmunofluorescencia indirecta. En la situación control se observa una marca intensa en la membrana citoplasmática, y dicha marca se internalizó luego de la depleción del colesterol por el compuesto M $\beta$ CD (Figura 41).

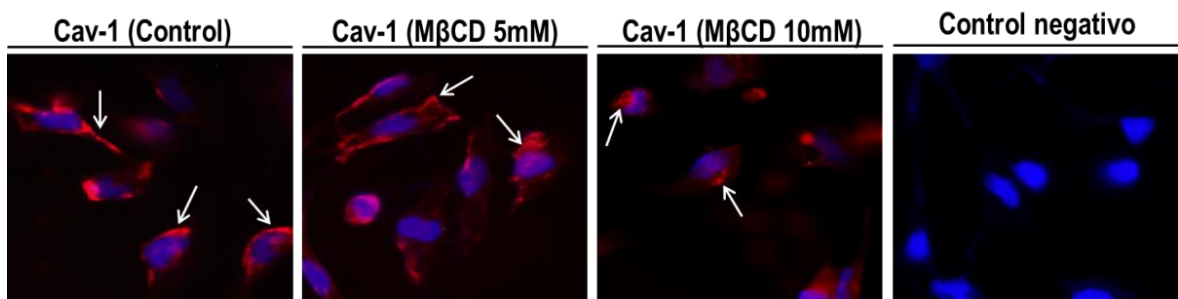


Figura 41: Inmunofluorescencia de Cav-1 en células EA.hy926 en condición control y luego del tratamiento con M $\beta$ CD 5 mM y 10 mM. Se muestran fotografías representativas de tres ensayos independientes. *Magnificación 400X.*

Con el fin de corroborar que el efecto obtenido no se debía a citotoxicidad del tratamiento, se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular luego de la disrupción de las caveolas con el compuesto M $\beta$ CD. Se observó que concentraciones de M $\beta$ CD superiores a 10 mM afectaron la viabilidad celular, por lo que se continuó trabajando con M $\beta$ CD 5 mM (Figura 42).

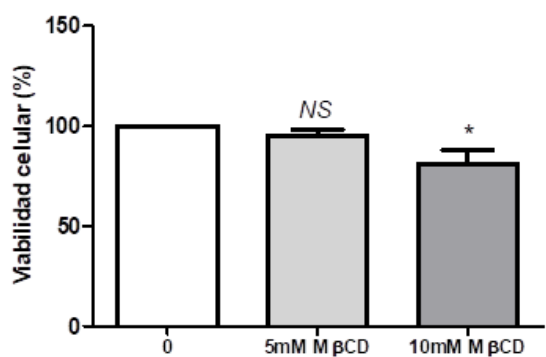


Figura 42: La viabilidad celular luego del tratamiento con 5 mM y 10 mM de M $\beta$ CD se evaluó mediante el ensayo MTT en células EA.hy926. No se observaron cambios en la viabilidad celular cuando las células se trataron con 5 mM de M $\beta$ CD, mientras que el tratamiento con 10 mM de M $\beta$ CD alteró la viabilidad celular (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ).

Una vez comprobado que la concentración de M $\beta$ CD utilizada no producía la muerte celular, se evaluó la migración celular de las células macrovasculares en condición control y luego del tratamiento con M $\beta$ CD.

Observamos que la disrupción de caveolas mediada por el secuestro del colesterol perjudicó el proceso de reparación de heridas a las 18 y 24 horas en las células EA.hy926.

En el grupo control, las células en el borde de la herida inmediatamente comenzaron a migrar hacia el centro de la herida, lo que resultó en una disminución del área libre de células con el tiempo. El porcentaje de cierre de la herida, así como la velocidad de migración disminuyó significativamente a las 18 y 24 horas en las células EA.hy926 tratadas con 5 mM M $\beta$ CD en comparación al control (Figura 43).

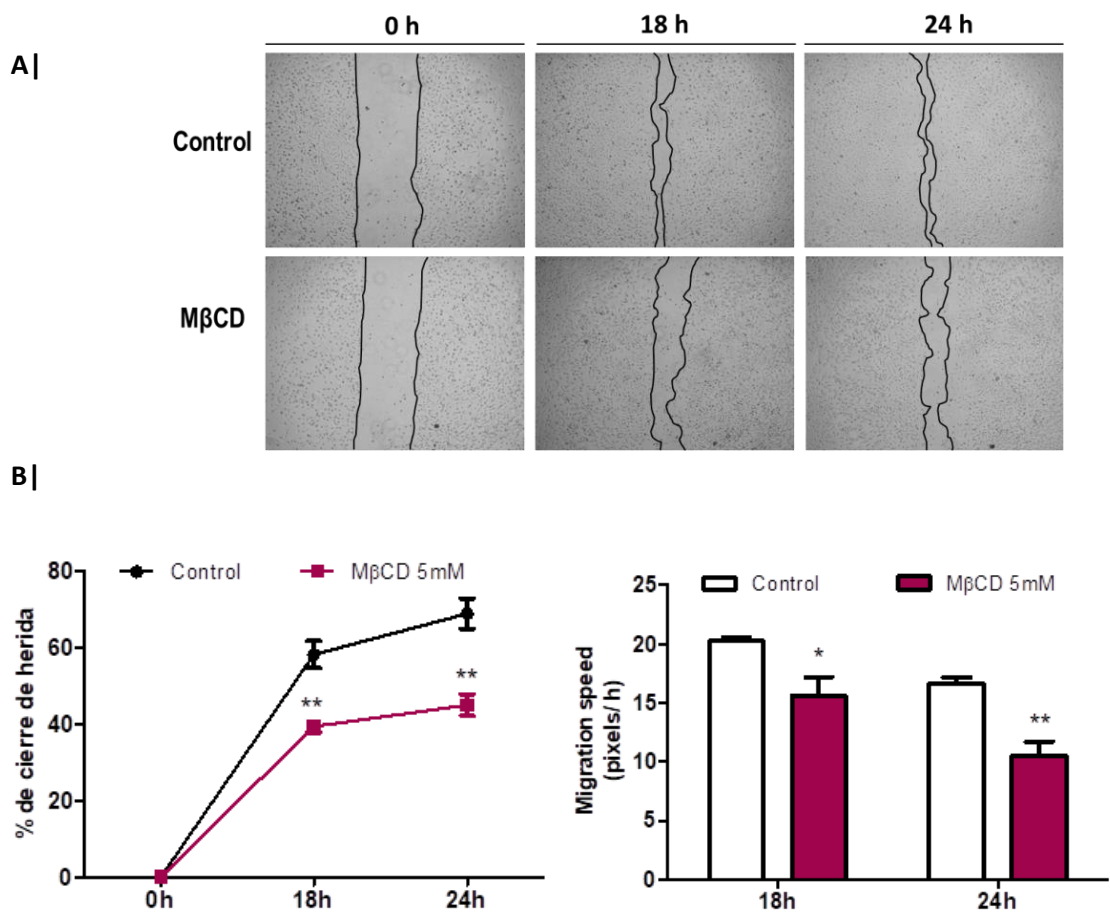


Figura 43: Efecto de la disrupción de caveolas con MβCD sobre la migración de células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la migración de células EA.hy926 tratadas con 5 mM MβCD a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X*.

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente luego del tratamiento con MβCD 5 mM a las 18 y 24 horas en comparación al control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 5$ ). Se aplicó la prueba T de Student. Las barras de error corresponden al SEM.

Para confirmar los resultados obtenidos con el compuesto farmacológico, se realizó el silenciamiento génico empleando un siRNA específico para Cav-1 y posteriormente se evaluó la capacidad migratoria de las células macrovasculares. Al igual que con los otros siRNAs empleados, se evaluó la efectividad del silenciamiento mediante la técnica de Western blot (Figura 44).



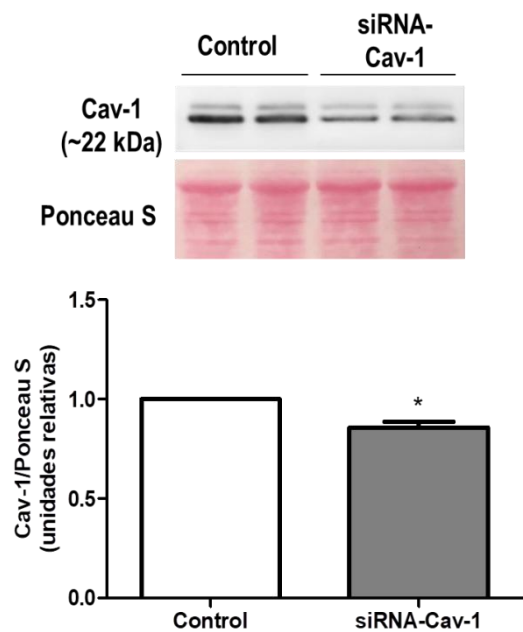


Figura 44: Eficiencia del silenciamiento de Cav-1 en células EA.hy926 mediante la técnica de Western blot. Western-blot representativo de Cav-1 luego del silenciamiento mediado por un siRNA específico y su correspondiente cuantificación relativa. La abundancia relativa de Cav-1 disminuyó significativamente después del silenciamiento en comparación al control (\* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Cuando las células EA.hy926 fueron silenciadas para Cav-1 tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente en comparación al control. En la Figura 45 se muestran los resultados de dichas cuantificaciones.

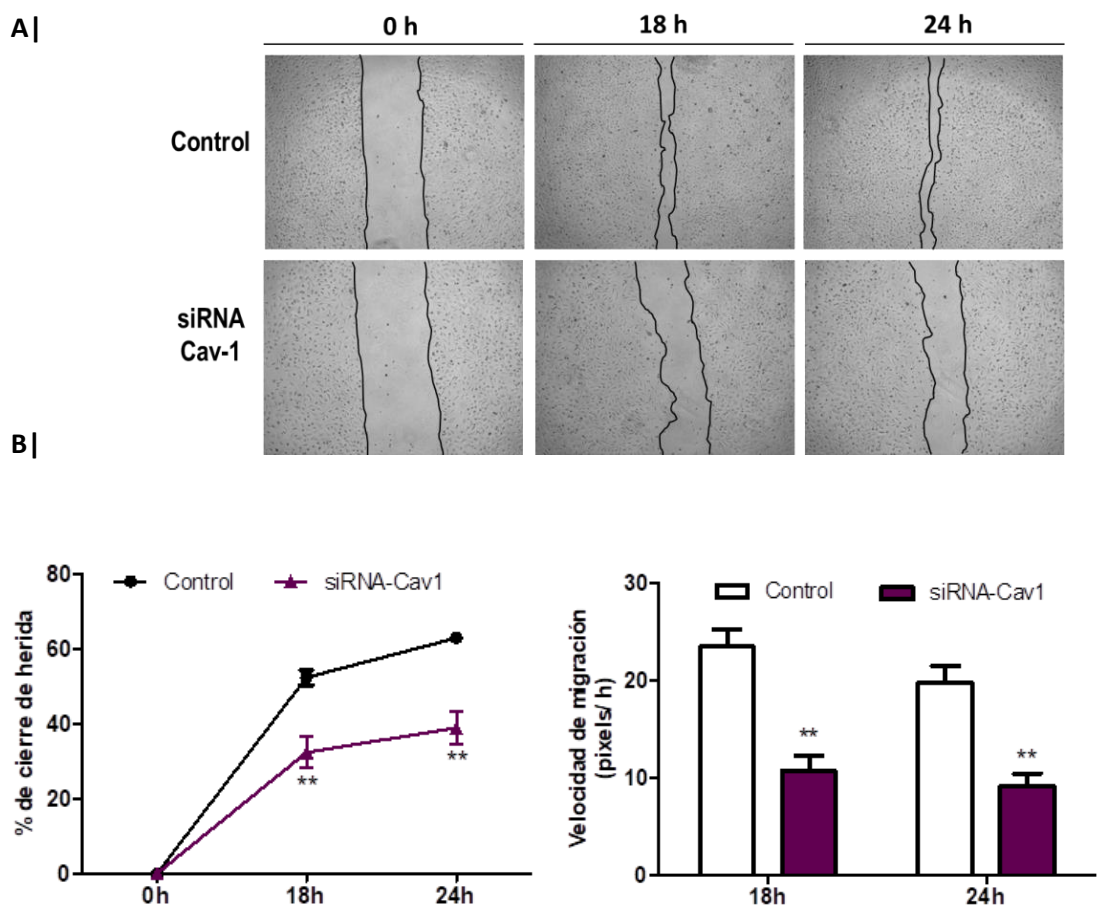


Figura 45: Efecto del silenciamiento de Cav-1 sobre la migración de células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la migración de células EA.hy926 tratadas con siRNA-Cav-1 y siRNA-Control a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X*.

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente después del silenciamiento de Cav-1 a las 18 y 24 horas en comparación al control (\*\*p <0,01; n=3). Se aplicó la prueba T de Student. Las barras de error corresponden al SEM.

Seguidamente, se realizó el ensayo de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial sobre matriz extracelular para evaluar la participación de Cav-1 en la angiogénesis de las células endoteliales EA.hy926. Para ello, células en las cuales Cav-1 estaba silenciada (siRNA-Cav-1) o células se cultivaron sobre la matriz extracelular comercial Geltrex (Gibco) y se cuantificaron diferentes parámetros de la red tubular como el área total de mallas, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de los segmentos. Se observó que tanto el área total de mallas como la longitud total de los segmentos y la longitud total de las ramificaciones disminuyeron significativamente cuando la Cav-1 estaba silenciada en comparación al control (Figura 46).

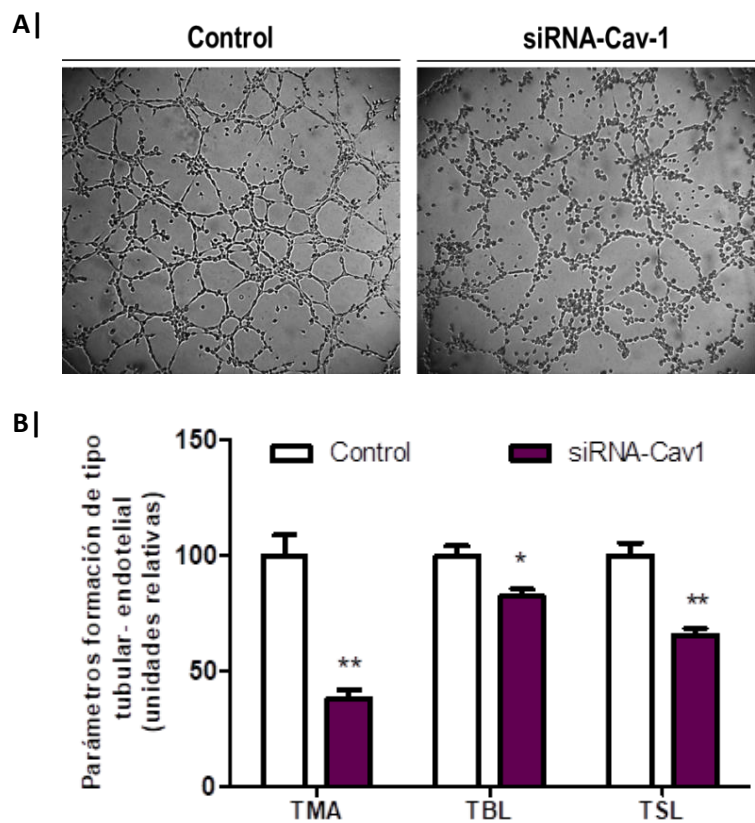


Figura 46: Efecto del silenciamiento de Cav-1 sobre la formación de estructuras de tipo tubular/ endotelial en las células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de Cav-1 a las 8 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r<sup>®</sup> con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células EA.hy926. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Luego del silenciamiento de Cav-1, el área total de mallas, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de segmentos disminuyeron significativamente en comparación al control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

**Rol de la caveola/ Cav-1 en la funcionalidad de la microvasculatura placentaria**

Se estudió la contribución de las caveolas/ Cav-1 en la migración de las células endoteliales microvasculares placentarias hPMEC. Para eso, se empleó el compuesto MβCD y siRNA-Cav-1 y se cuantificó la capacidad migratoria de células microvasculares hPMEC en las distintas condiciones.

Al igual que con células EA.hy926, se corroboró que el efecto obtenido no se debía a citotoxicidad del tratamiento. Para eso se realizó un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular luego de la disrupción de las caveolas con el compuesto M $\beta$ CD en células hPMEC. Se observó que al igual que en las células macrovasculares EA.hy926, concentraciones de M $\beta$ CD superiores a 10 mM afectaron la viabilidad celular, por lo que se continuó trabajando con M $\beta$ CD 5 mM (Figura 47).

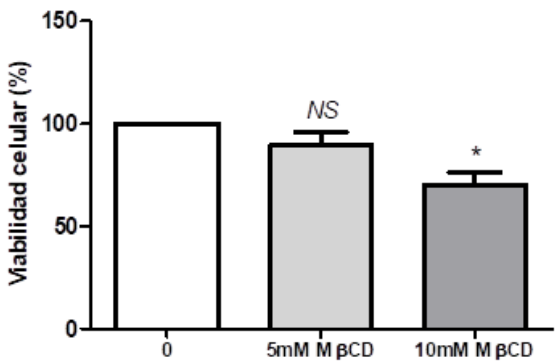


Figura 47: Viabilidad de células hPMEC luego del tratamiento con 5 mM y 10 mM de M $\beta$ CD evaluada por medio del ensayo de MTT. No se observaron cambios con 5 mM de M $\beta$ CD, mientras que el tratamiento con 10 mM de M $\beta$ CD redujo significativamente la viabilidad celular. (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

Una vez comprobado que la concentración de M $\beta$ CD utilizada no producía la muerte celular, se evaluó la migración de las células microvasculares en condición control y luego del tratamiento con M $\beta$ CD.

Observamos que la disrupción de caveolas mediada por el secuestro del colesterol alteró el proceso de reparación de heridas a las 18 y 24 horas en las células microvasculares hPMEC.

En el grupo control, las células en el borde de la herida inmediatamente comenzaron a migrar hacia el centro de la herida, lo que resultó en una disminución del área libre de células con el tiempo. El porcentaje de cierre de la herida en las células hPMEC tratadas con M $\beta$ CD fue significativamente menor que en los grupos de control, al igual que la velocidad de migración (Figura 48).

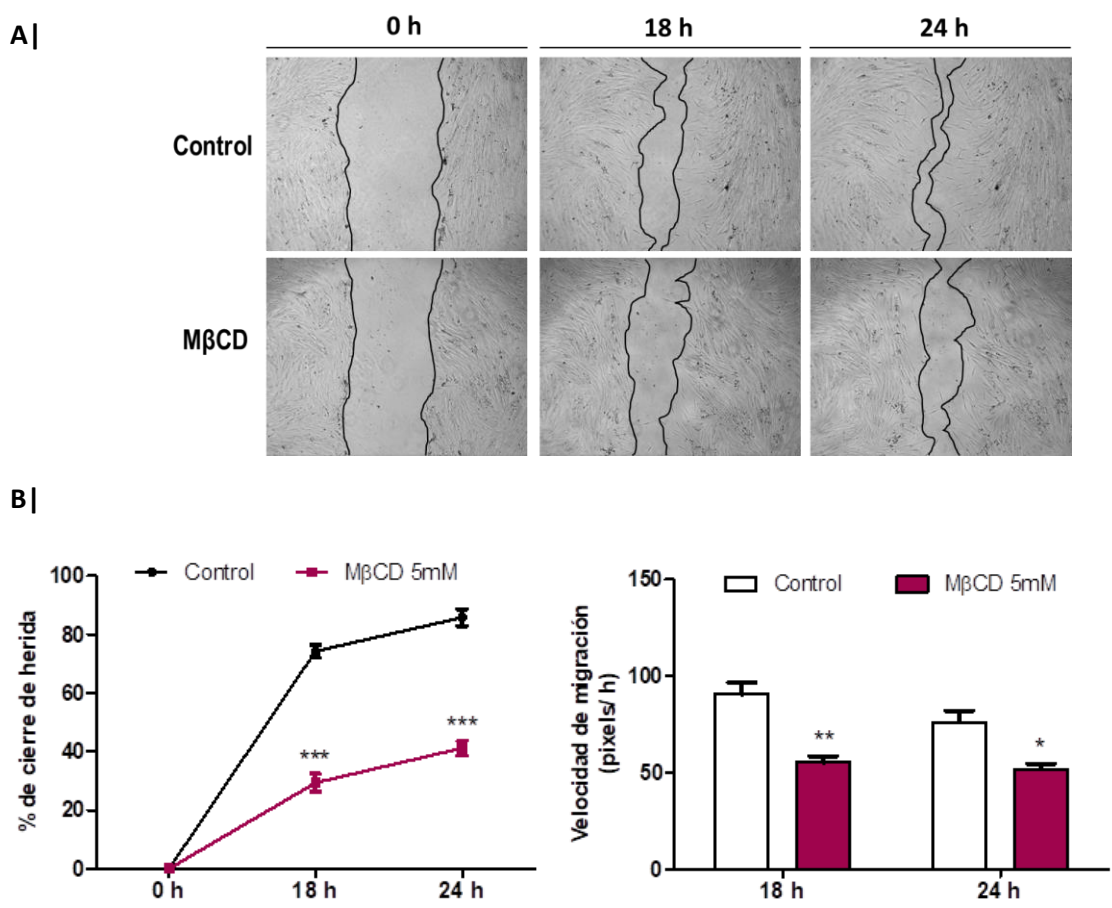


Figura 48: Efecto de la disrupción de caveolas en la migración de células hPMEC.

A| Imágenes representativas de la migración celular de células hPMEC tratadas con MβCD 5 mM a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente después del tratamiento con MβCD 5 mM a las 18 y 24 horas en comparación al control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 4$ ). Se aplicó la prueba T de Student. Las barras de error corresponden al SEM.

Para confirmar los resultados obtenidos con el compuesto farmacológico, se realizó un siRNA específico para Cav-1. Se confirmó la efectividad del silenciamiento de Cav-1 mediante la técnica de Western blot (Figura 49), y posteriormente se evaluó la capacidad migratoria de las células microvasculares hPMEC.

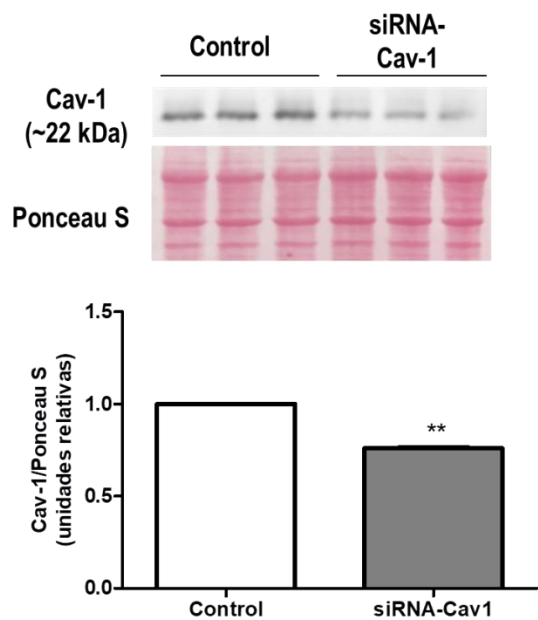


Figura 49: Eficiencia del silenciamiento de Cav-1 en células hPMEC mediante la técnica de Western blot. Western-blot representativo de Cav-1 luego del silenciamiento mediado por un siRNA específico y su correspondiente cuantificación relativa. La abundancia relativa de Cav-1 disminuyó significativamente después del silenciamiento en comparación al control (\* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Cuando las células hPMEC fueron silenciadas para Cav-1 tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente a las 18 y 24 horas en comparación al control (Figura 50).

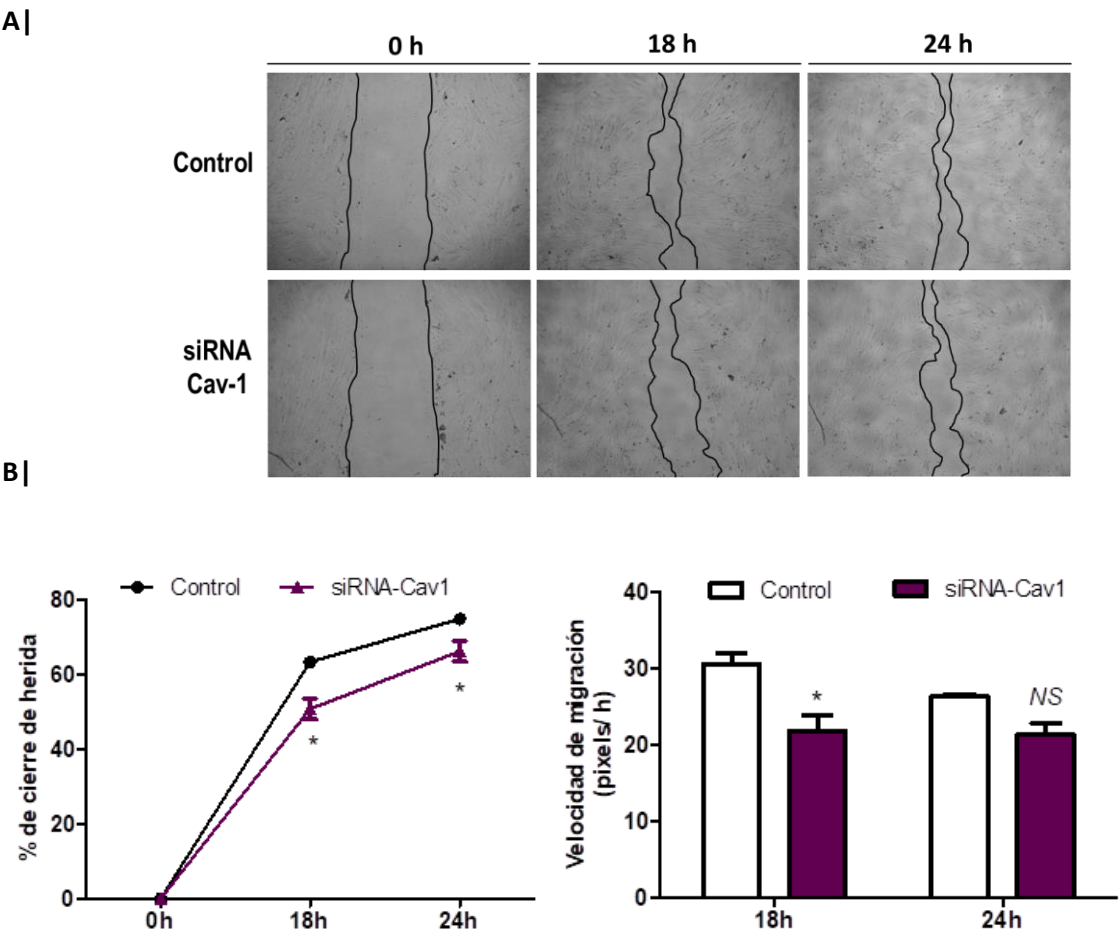


Figura 50: Efecto del silenciamiento de Cav-1 sobre la migración de células hPMEC.

A| Imágenes representativas de la migración de células hPMEC tratadas con siRNA-Cav-1 y control (vehículo) a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X*.

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente después del silenciamiento de Cav-1 a las 18 y 24 horas en comparación al control (NS: no significativo, \* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Se aplicó la prueba T de Student. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Por último, se realizó el ensayo de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial sobre matriz extracelular para evaluar la participación de Cav-1 en la angiogénesis de las células endoteliales microvasculares hPMEC. Para ello, células en las que la Cav-1 (siRNA-Cav-1) estaba silenciada o células control se cultivaron sobre la matriz extracelular comercial Geltrex (Gibco) y se cuantificaron diferentes parámetros de la red tubular como el área total de mallas, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de los segmentos. Se observó que tanto el área total de mallas como la longitud total de los segmentos disminuyeron

significativamente cuando en las células hPMEC la Cav-1 estaba silenciada en comparación al control (Figura 51).

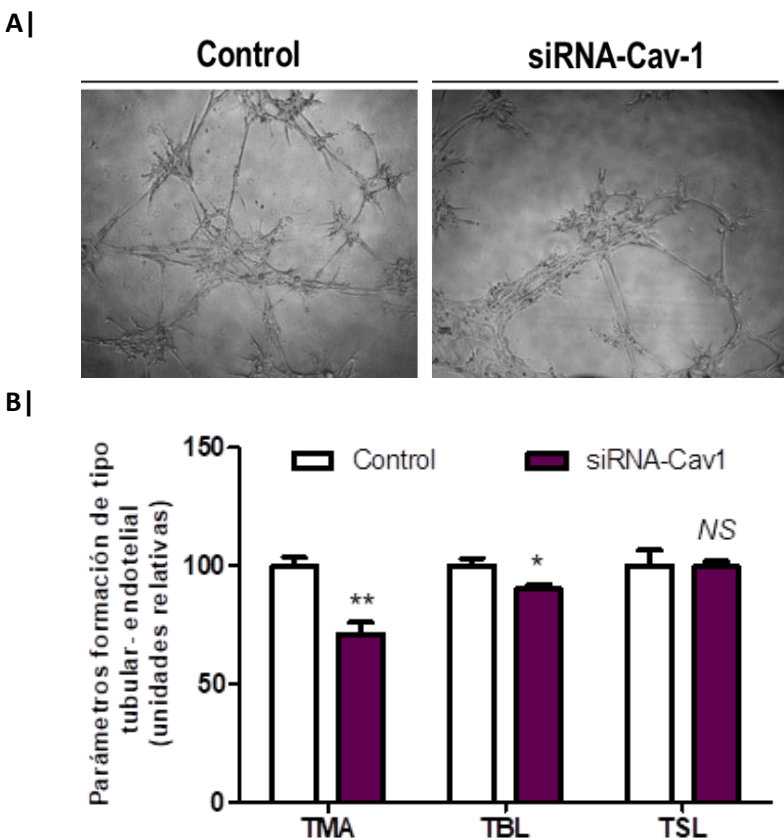


Figura 51: Efecto del silenciamiento de Cav-1 sobre la formación de estructuras de tipo tubular/ endotelial en las células hPMEC.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del silenciamiento de AQP4 a las 4 horas. *Magnificación 40X*.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento *Angiogenesis Analyzer* para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células hPMEC. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Luego del silenciamiento de Cav-1, el área total de mallas y la longitud total de las ramificaciones disminuyeron significativamente en comparación al control (NS: no significativo, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ;  $n=4$ ). Las barras de error corresponden al SEM.



## **2. Evaluación en células EVT de la participación de la AQP1 y su interacción con la Cav-1 en la remodelación de las arterias espirales maternas**

Nuestro segundo objetivo fue evaluar la participación de la AQP1 y su interacción con Cav-1 presentes en células de EVT en la remodelación de las arterias espirales maternas en condiciones fisiológicas.

### **Diferenciación del EVT endovascular**

Las células de trofoblasto extraveloso son capaces de diferenciarse a un fenotipo endovascular permitiendo la remodelación de las arterias espirales uterinas maternas. Este proceso permite que las arterias espirales maternas adquieran gran calibre y baja resistencia y en consecuencia se pueda dar un crecimiento y desarrollo normal del feto [21, 35].

Al igual que lo previamente reportado por Reca y colaboradores, identificamos la expresión de AQP1, AQP3, AQP9 y Cav-1 en las células Swan 71. La AQP3 y la AQP9 pertenecen a la subfamilia de las acuagliceroporinas mientras que la AQP1 es una AQP clásica [124].

En estudios previos reportamos en células Swan71 que el bloqueo de la AQP3 altera el proceso de migración celular del EVT [124].

En este trabajo nos enfocamos en dilucidar el rol de la única AQP clásica que expresan estas células de EVT: La AQP1. Esta AQP a su vez es la de mayor expresión en vasculatura placentaria. Fue por eso que evaluamos su rol en la diferenciación del trofoblasto extraveloso a un fenotipo endovascular. Para eso, se empleó un ARN pequeño de interferencia (siRNA-AQP1) para silenciar la expresión génica, y se realizó la "prueba de raspado *in vitro*" para estudiar la capacidad migratoria de las células Swan 71 (Figura 52). Al igual que con el bloqueo farmacológico de AQP1 observado por Reca [124], su silenciamiento no produjo cambios en la capacidad migratoria evaluada por el porcentaje de cierre de herida y velocidad de migración de las células Swan 71.

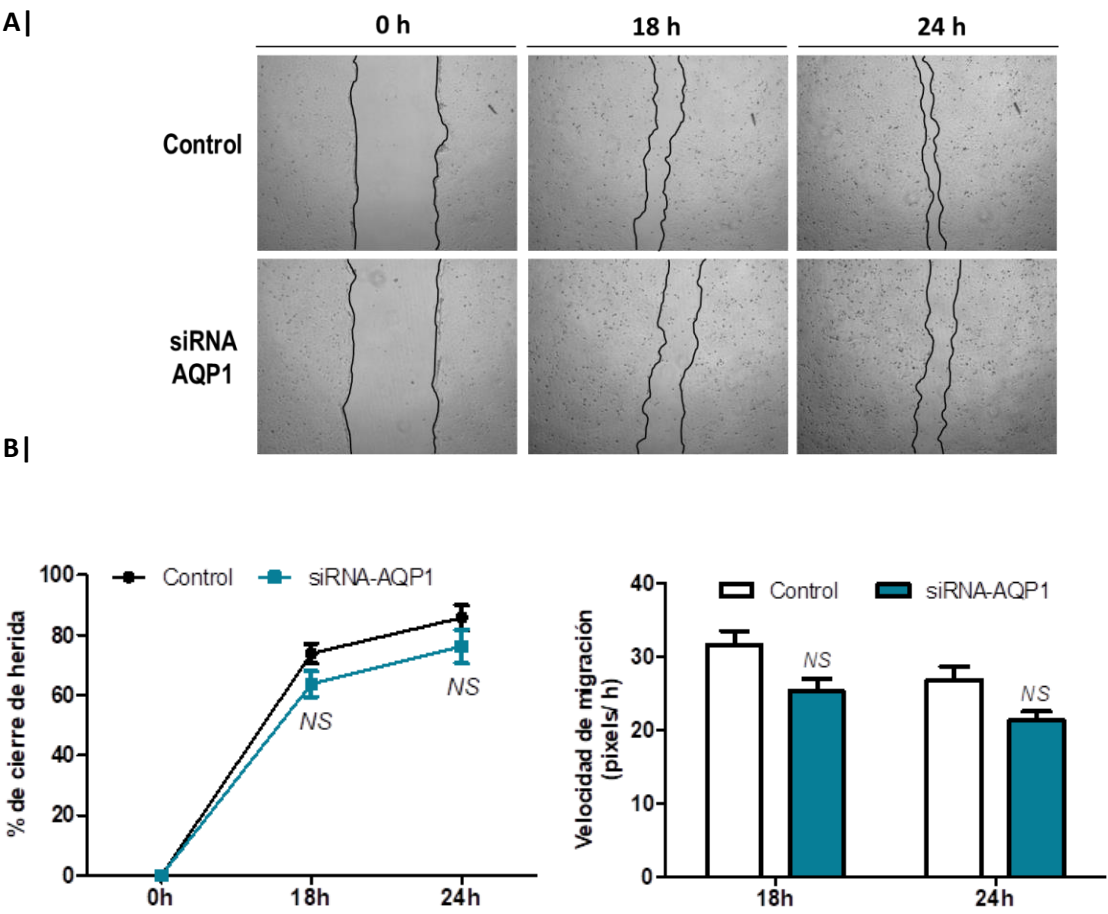


Figura 52: Efecto del silenciamiento de la AQP1 sobre la migración de células Swan 71.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. Magnificación 40X.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. No se encontraron diferencias significativas entre el silenciamiento de AQP1 y el control en ninguno de los tiempos estudiados. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM (NS: no significativo, n=3). Se cuantificó la velocidad de migración y no se encontraron diferencias significativas entre el silenciamiento de la AQP1 y el control en ninguno de los tiempos estudiados (NS: no significativo; n=3). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Para evaluar el rol de la caveola/ Cav-1 en el proceso de diferenciación endovascular, se empleó para ello en primera instancia el compuesto metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) que genera el desensamblado de estructuras caveolares por secuestro de colesterol, y se evaluó la capacidad migratoria de las células de EVT en estas condiciones. Se observó que cuando las células Swan 71 carecen de la estructura caveolar por acción de M $\beta$ CD, la migración celular

evaluada tanto por el porcentaje de cierre de herida como por la velocidad de migración disminuye significativamente en comparación al control (Figura 53).

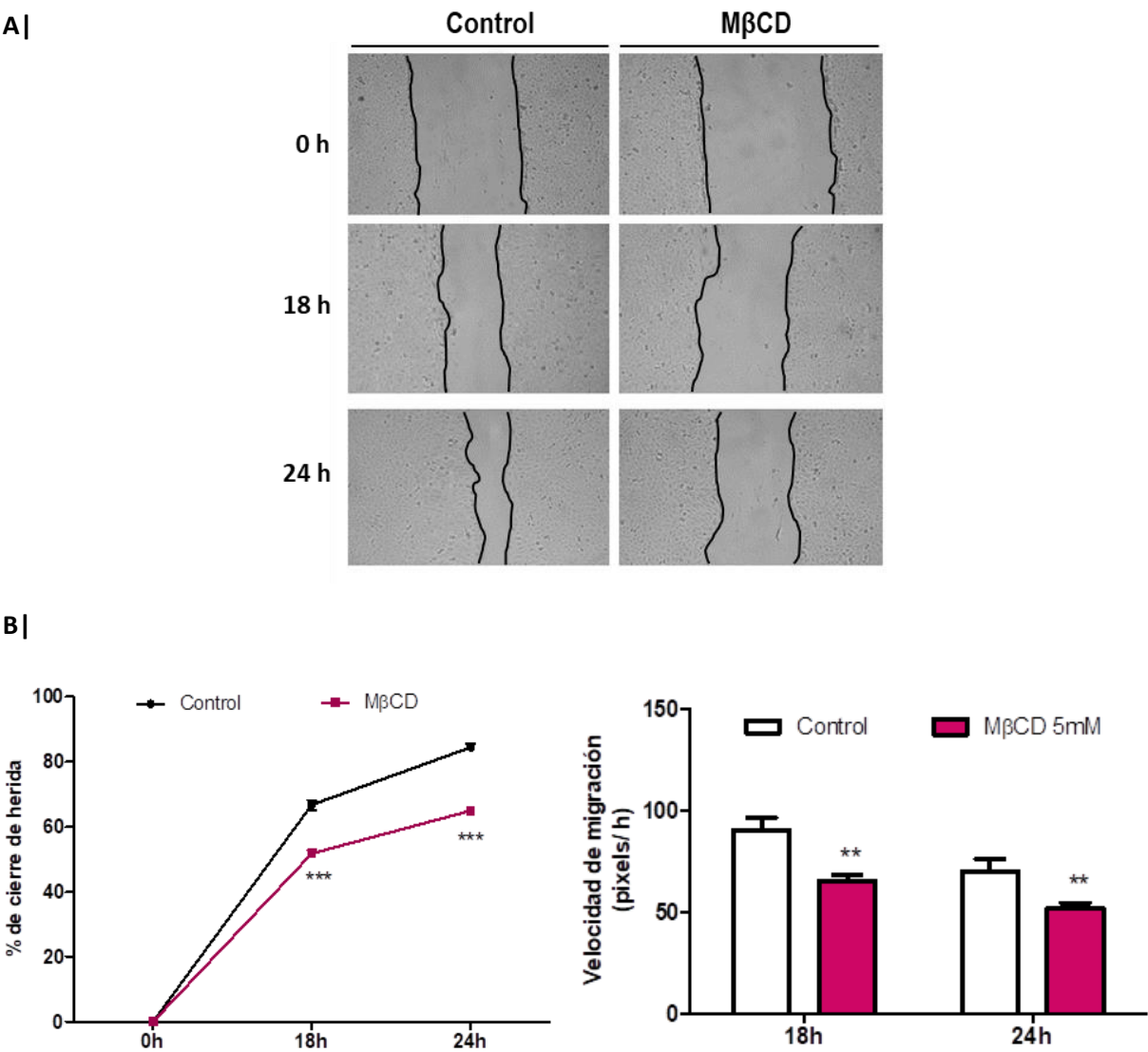


Figura 53: Efecto de la disrupción de caveolas en la migración de células Swan 71.

A| Imágenes representativas de la migración celular de células Swan 71 tratadas con M $\beta$ CD 5 mM a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| El ensayo de migración celular mostró que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente después del tratamiento con M $\beta$ CD 5 mM a las 18 y 24 horas en comparación al control (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 5$ ). Se aplicó la prueba T de Student. Las barras de error corresponden al SEM.

Para confirmar el rol específico de las caveolas/ Cav-1 en el proceso de diferenciación endovascular de las células Swan 71, se empleó un ARN pequeño de interferencia para silenciar la expresión génica de Cav-1 (siRNA-Cav-1) y se evaluó la capacidad migratoria de las células de EVT, observándose una disminución significativa en el porcentaje de cierre de herida y la velocidad de migración cuando las células Swan 71 son silenciadas para Cav-1 (Figura 54).

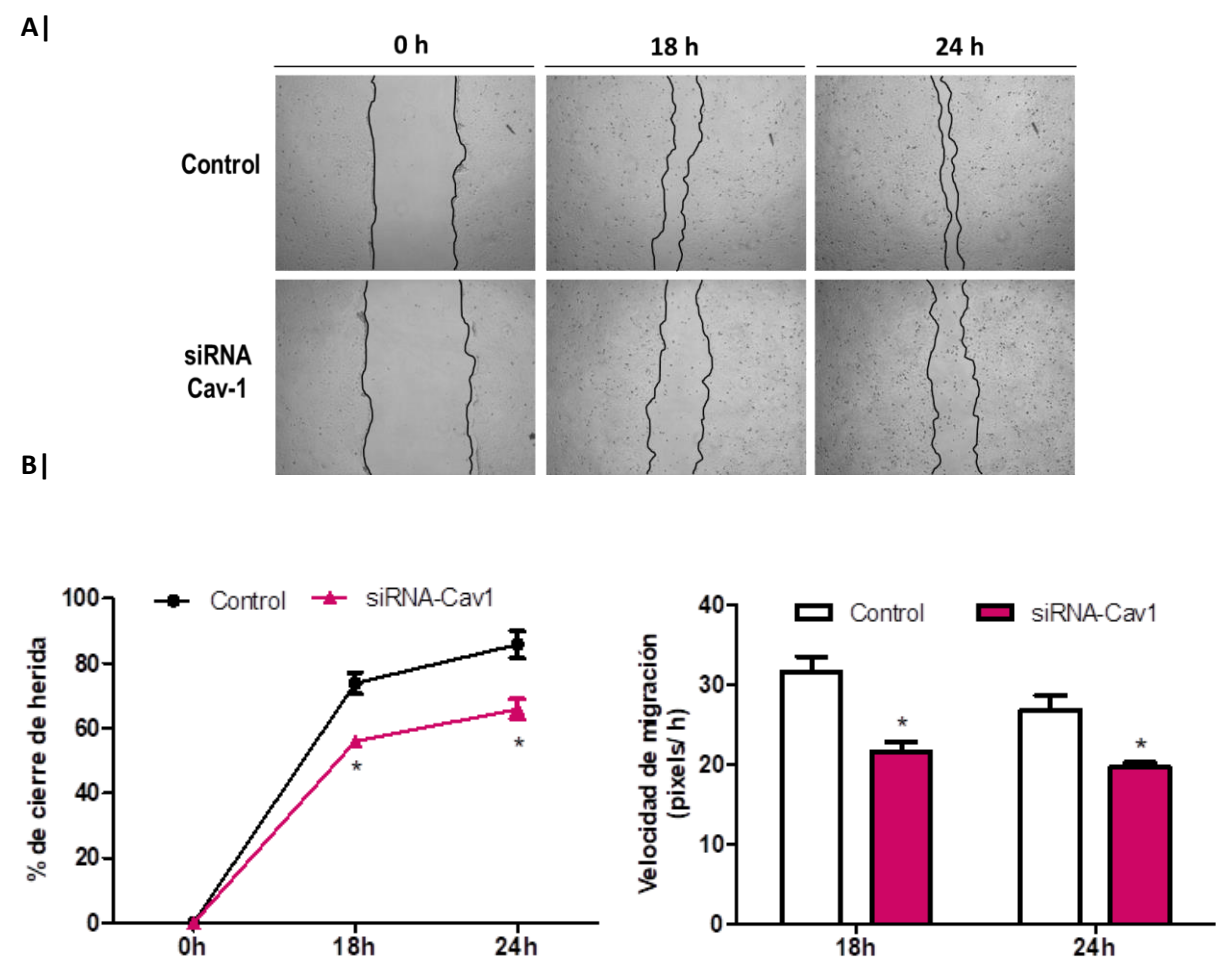


Figura 54: Efecto del silenciamiento de Cav-1 sobre la migración de células Swan 71.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se cuantificó el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. El porcentaje de cierre de la herida fue significativamente menor cuando las células se silenciaron para Cav-1 en comparación al grupo control tanto a las 18 como a las 24 horas. Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Se cuantificó además la velocidad de migración de las células Swan 71 luego del tratamiento con siRNA-Cav-1. Encontramos que luego del silenciamiento de Cav-1, la velocidad de migración disminuyó significativamente en comparación con el control a las 18 y 24 horas (\* $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Se evaluó la participación de las caveolas/ Cav-1 en el proceso de diferenciación endovascular de las células Swan 71. Para ello, células Swan 71 se trataron con M $\beta$ CD y luego se cultivaron sobre matriz extracelular (*ECM Gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma*). Se midieron diferentes parámetros representativos de la formación de tipo tubular endotelial, y luego del desensamblado caveolar mediado por M $\beta$ CD, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de segmentos aumentaron significativamente en comparación al control (Figura 55).

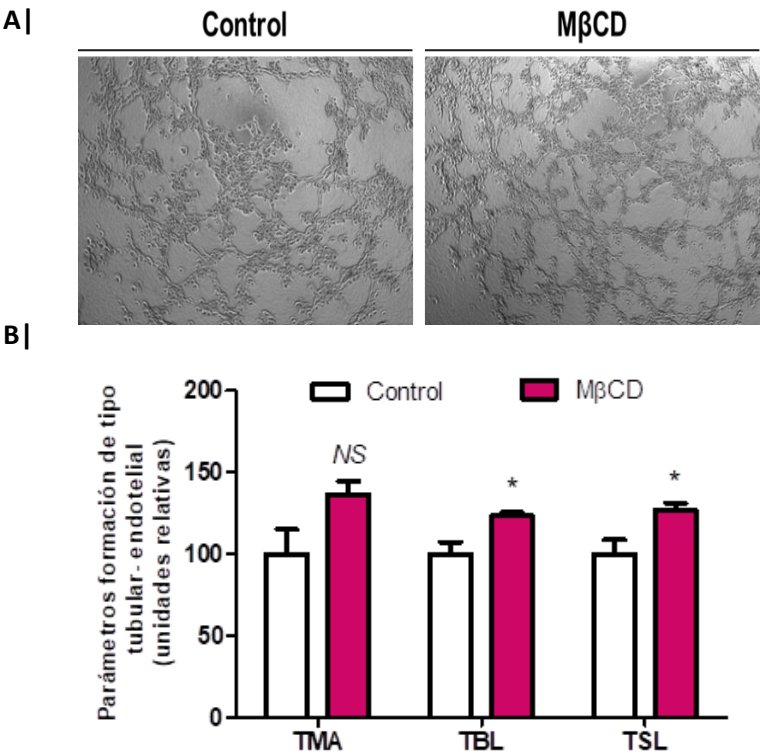


Figura 55: Efecto de la disrupción de caveolas con M $\beta$ CD sobre la diferenciación endovascular de las células Swan 71.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y luego del tratamiento con M $\beta$ CD (5 mM) a las 6 horas. *Magnificación 40X*.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r<sup>®</sup> con el complemento Angiogenesis Analyzer para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células Swan 71. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Se encontró que luego del desensamblado caveolar mediado por M $\beta$ CD, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de segmentos disminuyeron significativamente en comparación al control (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ;  $n = 4$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

3. Evaluación del efecto del estrés hiperosmolar sobre la expresión y función de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 durante la formación de la vasculatura placentaria

Una vez establecida la participación de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en el proceso de formación de la vasculatura placentaria, en el último objetivo de esta tesis nos enfocamos a estudiar las consecuencias de un estrés hiperosmolar sobre la expresión y función de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 durante este proceso.

Para asegurarnos que al cultivar células se las estaba sometiendo a un estrés osmótico, se procedió a la medición de las osmolaridades generadas por la adición de sacarosa 50 mM, 100 mM y 150 mM y se las comparó con los valores de osmolaridad teórica.

En la Tabla 3 se observan los valores de osmolaridad medidos empleando un osmómetro de presión a vapor VAPRO™. Se observa que, si bien los valores medidos de osmolaridad no son iguales a los de la osmolaridad teórica se encuentran dentro del rango esperado. Este resultado confirma que en todos los casos el agregado de sacarosa da como resultado una solución hiperosmolar.

| Sacarosa (mM) | Osmolaridad teórica (mOsM) | Osmolaridad experimental (mOsM) |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|
| 0             | 300 mOsM                   | 299 ± 2 mOsM                    |
| 50            | 350 mOsM                   | 341 ± 7 mOsM                    |
| 100           | 400 mOsM                   | 378 ± 10 mOsM                   |
| 150           | 450 mOsM                   | 424 ± 12 mOsM                   |

Tabla 3: Osmolaridad teórica y resultados obtenidos de la medición de la osmolaridad de los medios cultivo utilizados.

Efecto del estrés hiperosmolar en la macrovasculatura placentaria

Con el objetivo de evaluar si la hiperosmolaridad generaba un efecto sobre la migración de las células endoteliales, células EA.hy926 se cultivaron en medio isoosmolar (0 mM de sacarosa) y medio hiperosmolar generado por el agregado de sacarosa al medio de cultivo basal.

Se analizó la viabilidad celular mediante la incorporación de MTT, una medida de la actividad enzimática de la deshidrogenasa mitocondrial. Se observó que la adición de sacarosa 150 mM no modificó la viabilidad celular en comparación con el control isoosmolar, por lo que se continuó trabajando con esa concentración (Figura 56).

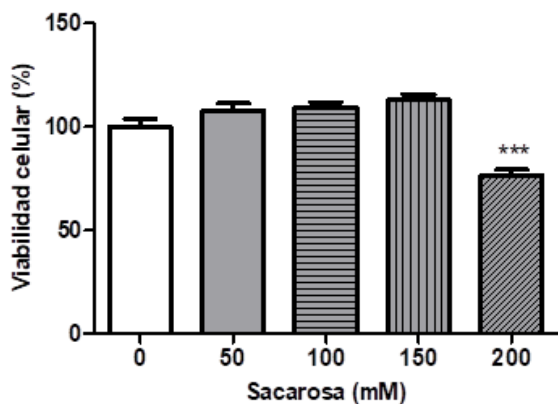


Figura 56: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la viabilidad de las células EA.hy926. Se cultivaron células EA.hy926 con diferentes concentraciones de sacarosa durante 24 horas y se realizó el ensayo MTT. La hiperosmolaridad de 150 mM de sacarosa no modificó la viabilidad de las células EA.hy926, por lo que se continuó utilizando esta concentración para los subsiguientes experimentos (\*\*p<0,001; n=6). Los valores se presentan como medias ± SEM.

Una vez determinada la concentración de sacarosa que no era citotóxica para las células EA.hy926, se realizó la migración celular en medio isoosmolar y medio hiperosmolar generado por la adición de sacarosa 150 mM, y se cuantificó el porcentaje de cierre de herida y la velocidad de migración bajo el tratamiento hiperosmolar. Se observó que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente en la condición hiperosmolar (150 mM de sacarosa) en comparación al control isoosmolar (0 mM de sacarosa) (Figura 57).

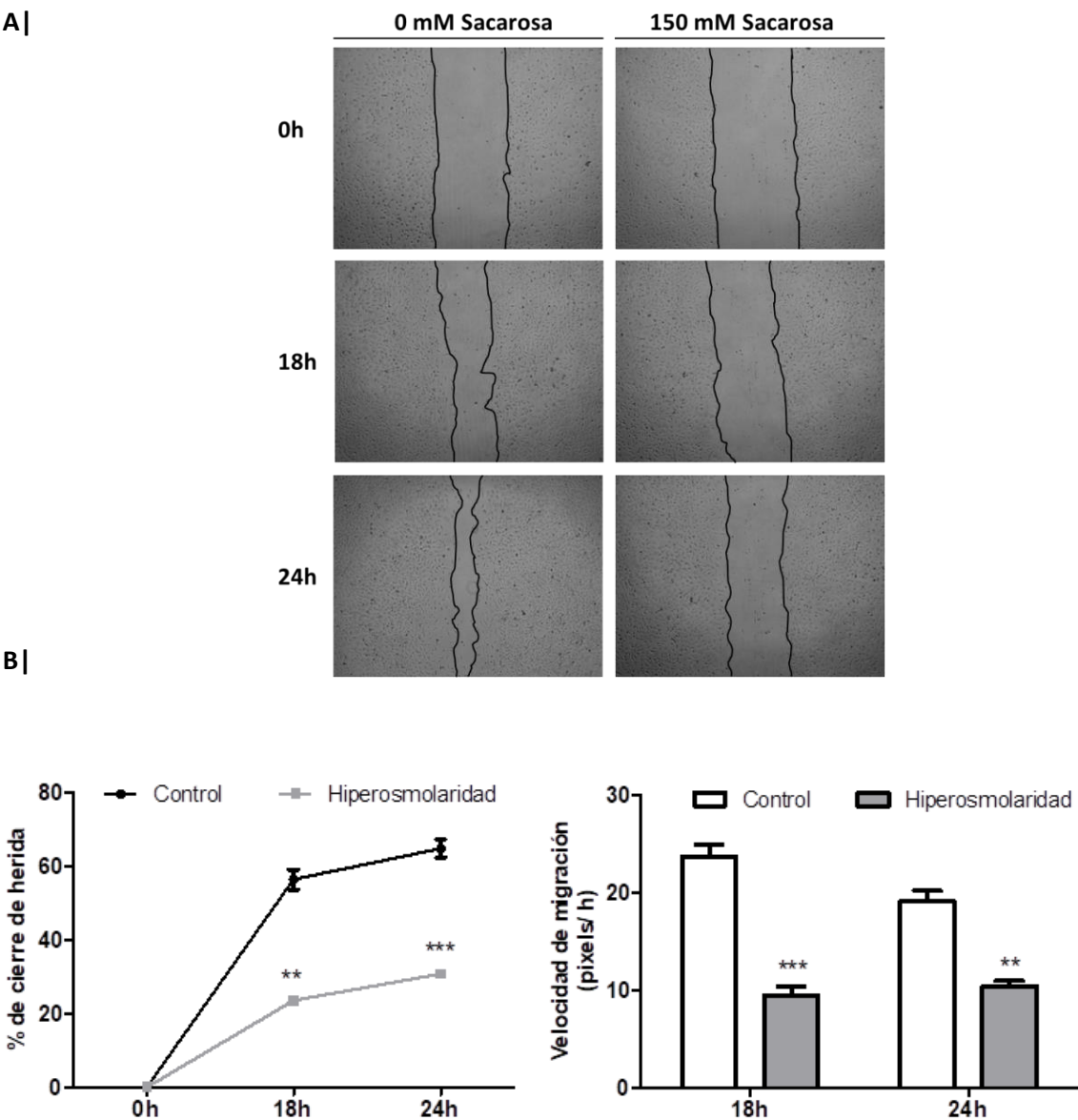


Figura 57: Efecto de la hiperosmolaridad (150 mM sacarosa) sobre la migración de células EA.hy926.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. Magnificación 40X.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el porcentaje de cierre de herida y la velocidad de migración de células EA.hy926 cultivadas en hiperosmolaridad. El porcentaje de cierre de la herida fue significativamente menor en hiperosmolaridad respecto al grupo control a las 18 y 24 horas. Respecto a la velocidad de migración, en la condición hiperosmolar la misma disminuyó significativamente en comparación con el control a las 18 y 24 horas (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; n=4). Los valores se presentan como medias ± SEM.

Se evaluó el proceso de tubulogénesis en células EA.hy926 cultivadas en hiperosmolaridad, y se observó que la misma se alteraba significativamente cuando las células eran cultivadas en hiperosmolaridad en comparación al control isoosmolar (Figura 58).



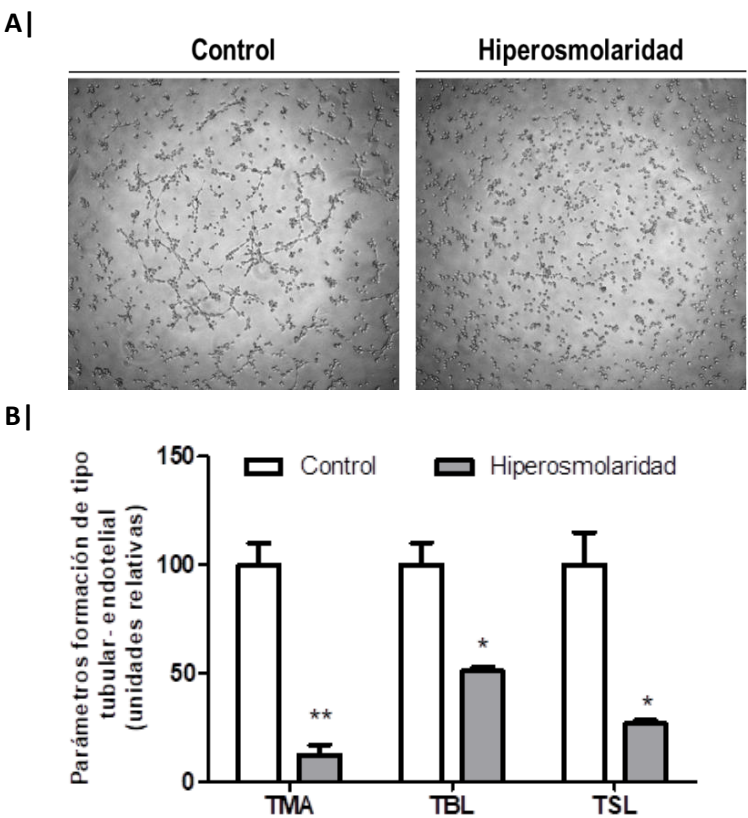


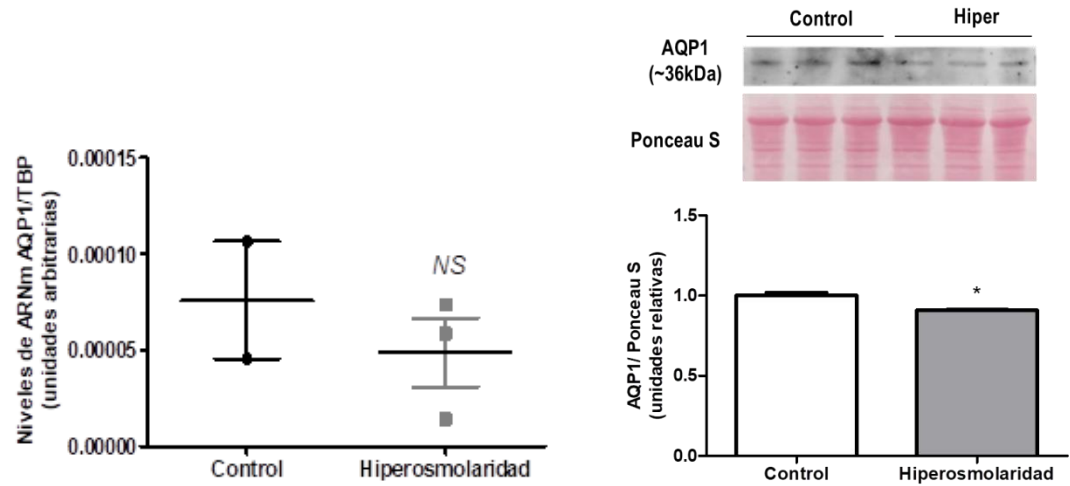
Figura 58: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la tubulogénesis de las células EA.hy926.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y después del tratamiento de hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa) a las 8 horas. *Magnificación 40X*.

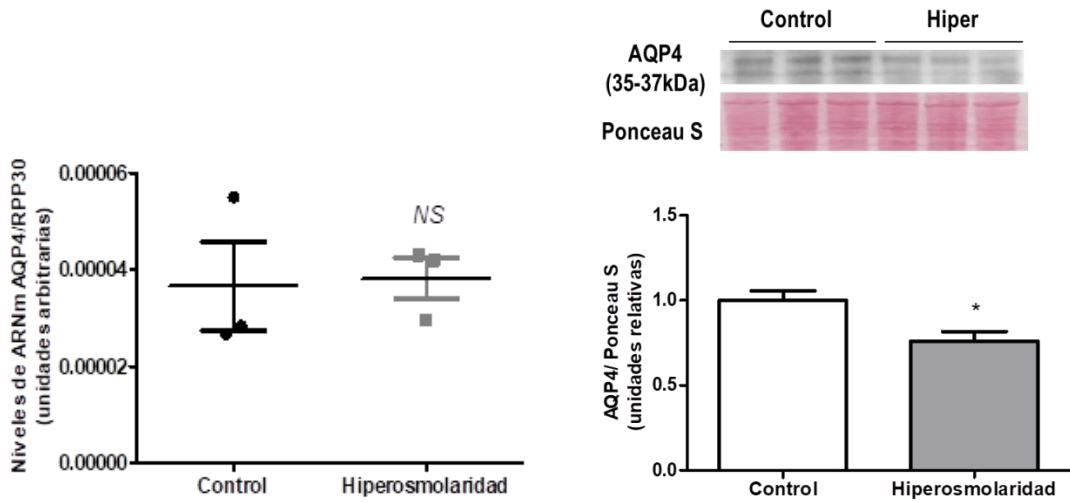
B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento Angiogenesis Analyzer para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células EA.hy926. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en tres experimentos independientes. Encontramos que después de la hiperosmolaridad, los parámetros analizados disminuyeron significativamente en comparación al control (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ ;  $n=3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Se evaluaron los niveles de ARNm, así como la abundancia relativa de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en las células EA.hy926 cultivadas en medio control o isoosmolar y medio hiperosmolar generado por la adición de 150 mM de sacarosa. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de la AQP1 y la AQP4 luego del tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar, mientras que la abundancia relativa de la AQP1 y la AQP4 disminuyó significativamente cuando las células se cultivaron en condición hiperosmolar. Con respecto a la Cav-1, tanto los niveles de ARNm como su abundancia relativa aumentó significativamente cuando las células se cultivaron en medio hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (Figura 59).

A|



B|



C|

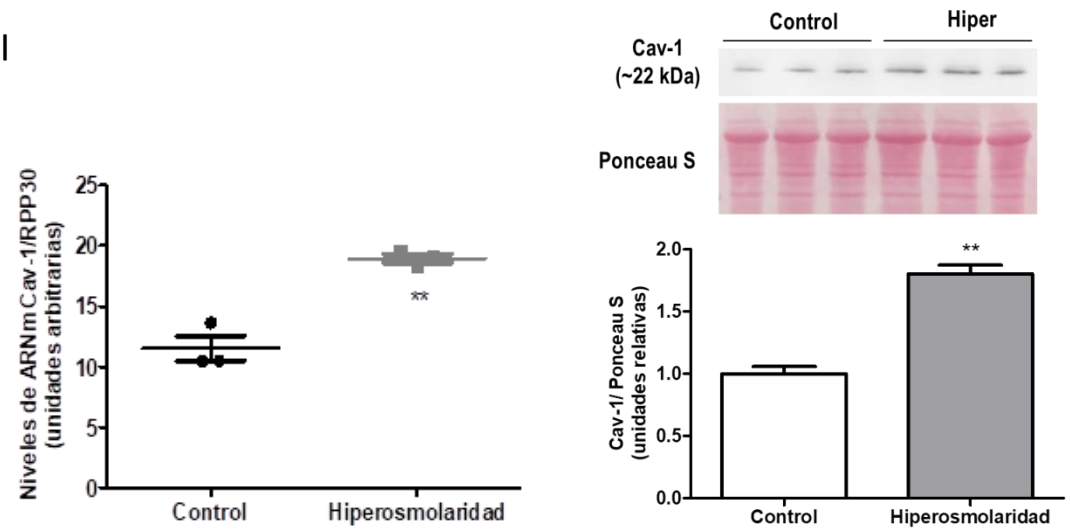


Figura 59: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión génica y proteica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en células EA.hy926.

A| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la AQP1 en células EA.hy926 cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de la AQP1 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (NS: no significativo;  $n=3$ ), mientras que la abundancia relativa de la proteína AQP1 disminuyó significativamente después de la hiperosmolaridad en comparación al control ( $*p<0,05$ ;  $n=3$ ).

B| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la AQP4 en células EA.hy926 cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de la AQP4 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (NS: no significativo;  $n=3$ ), mientras que la abundancia relativa de la proteína AQP4 disminuyó significativamente después de la hiperosmolaridad en comparación al control ( $*p<0,05$ ;  $n=3$ ).

C| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la Cav-1 en células EA.hy926 cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). Tanto los niveles de ARNm de la Cav-1, como su abundancia relativa aumentaron significativamente después de la hiperosmolaridad en comparación al control ( $**p<0,01$ ;  $n=3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

### **Efecto del estrés hiperosmolar en la microvasculatura placentaria**

Con el objetivo de evaluar si la hiperosmolaridad generaba un efecto sobre la migración de las células endoteliales microvasculares, células hPMEC se cultivaron en medio isoosmolar (0 mM de sacarosa) y medio hiperosmolar generado por el agregado de sacarosa al medio de cultivo basal.

Se analizó la viabilidad celular mediante la incorporación de MTT, una medida de la actividad enzimática de la deshidrogenasa mitocondrial. Se observó que la adición de sacarosa hasta 200 mM no modificó la viabilidad celular en comparación con el control isoosmolar, por lo que se continuó trabajando con la concentración de 150 mM al igual que en las células EA.hy926 (Figura 60).

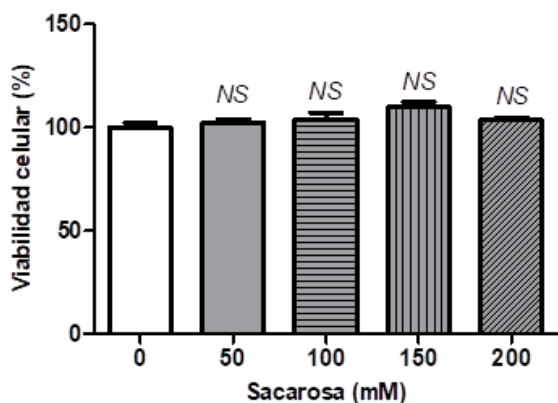


Figura 60: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la viabilidad de las células hPMEC. Se cultivaron células hPMEC con diferentes concentraciones de sacarosa durante 24 horas y se realizó el ensayo MTT. No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de las células hPMEC sometidas a hiperosmolaridad, por lo que se continuó utilizando la concentración de 150 mM para los subsiguientes experimentos (NS: no significativo, n=5). Las barras de error corresponden al SEM.

Una vez determinada la concentración de sacarosa que no era citotóxica para las células hPMEC, se realizaron los ensayos de migración celular en medio isoosmolar y medio hiperosmolar generado por la adición de sacarosa 150 mM, y se cuantificó el porcentaje de cierre de herida y la velocidad de migración en ambas condiciones experimentales. Se observó que tanto el porcentaje de cierre de herida como la velocidad de migración disminuyeron significativamente en la condición hiperosmolar (150 mM de sacarosa) en comparación al control isoosmolar (0 mM de sacarosa) (Figura 61).

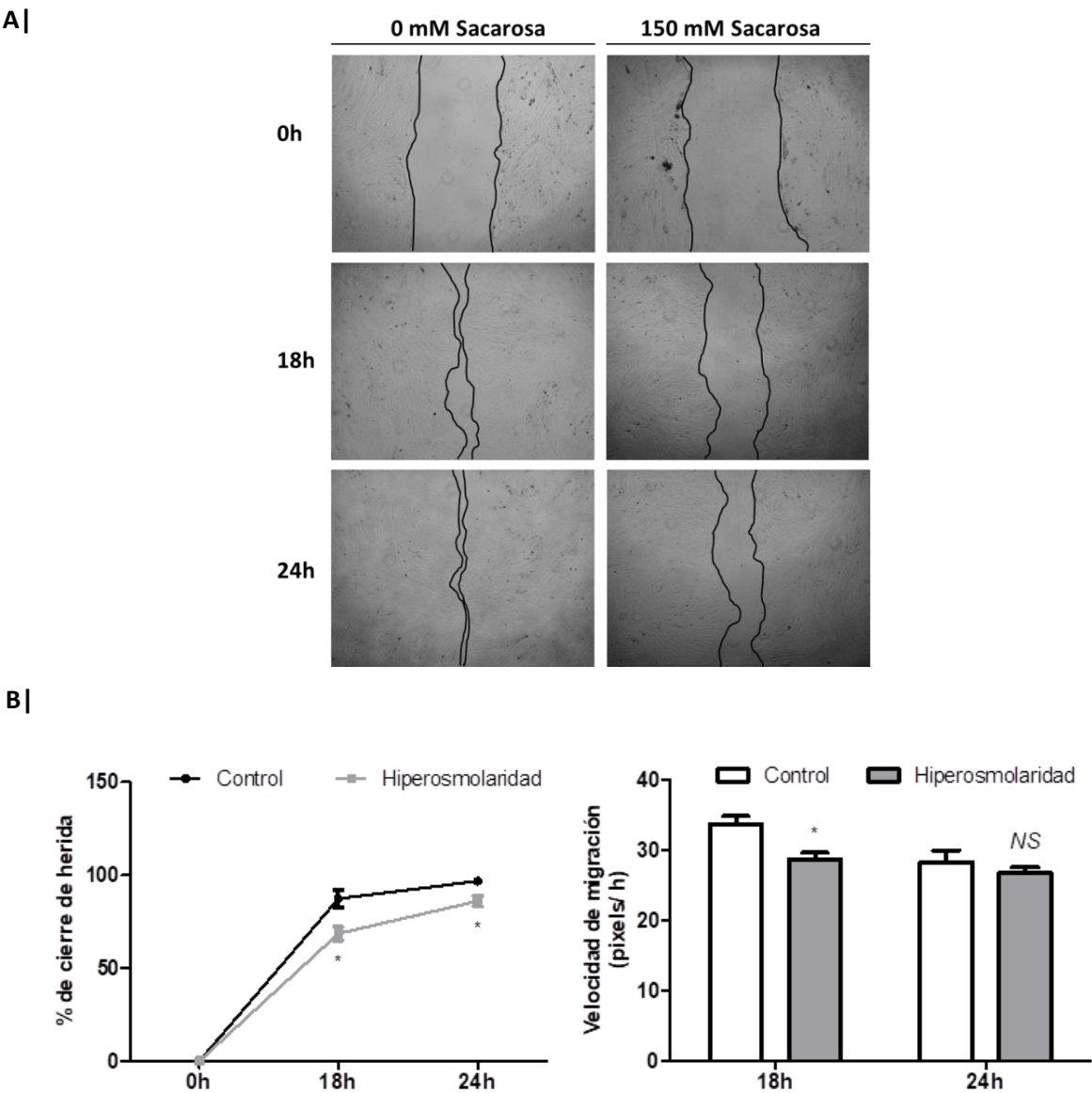


Figura 61: Efecto de la hiperosmolaridad (150 mM sacarosa) sobre la migración de células hPMEC.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 18 y 24 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el porcentaje de cierre de herida y la velocidad de migración de células hPMEC cultivadas en hiperosmolaridad. El porcentaje de cierre de la herida fue significativamente menor en hiperosmolaridad respecto al grupo control a las 18 y 24 horas. Respecto a la velocidad de migración, en la condición hiperosmolar la misma disminuyó significativamente en comparación con el control a las 18 horas (NS: no significativo, \*p <0,05, n=4). Los valores se presentan como medias ± SEM.

Se evaluó el proceso de tubulogénesis en células hPMEC cultivadas en hiperosmolaridad, encontrándose que la formación tubular medida por el área total de mallas, la longitud total de

las ramificaciones y la longitud total de los segmentos disminuía significativamente luego del tratamiento hiperosmolar en las células de microvasculatura placentaria hPMEC (Figura 62).

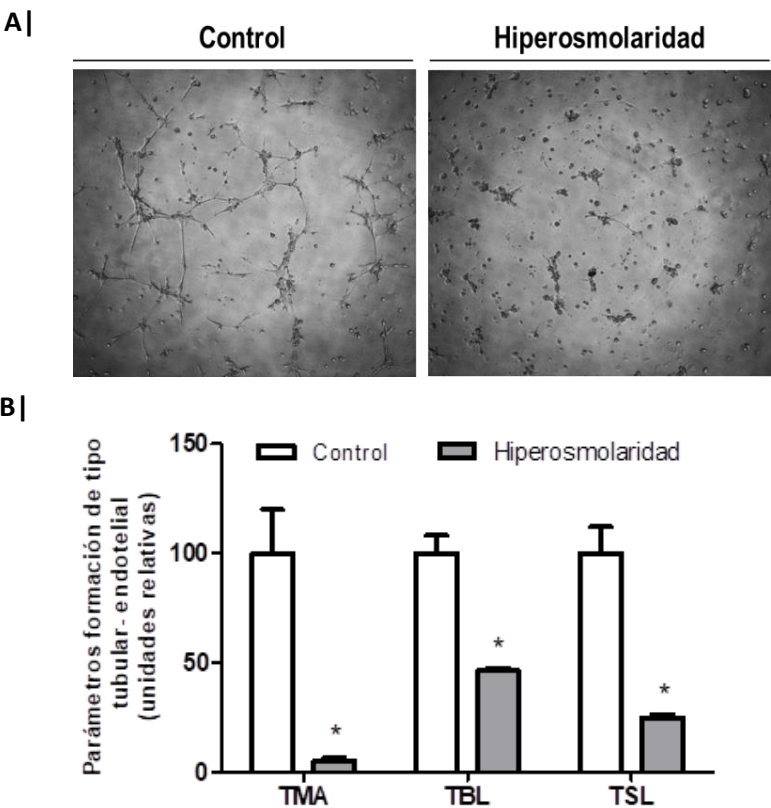


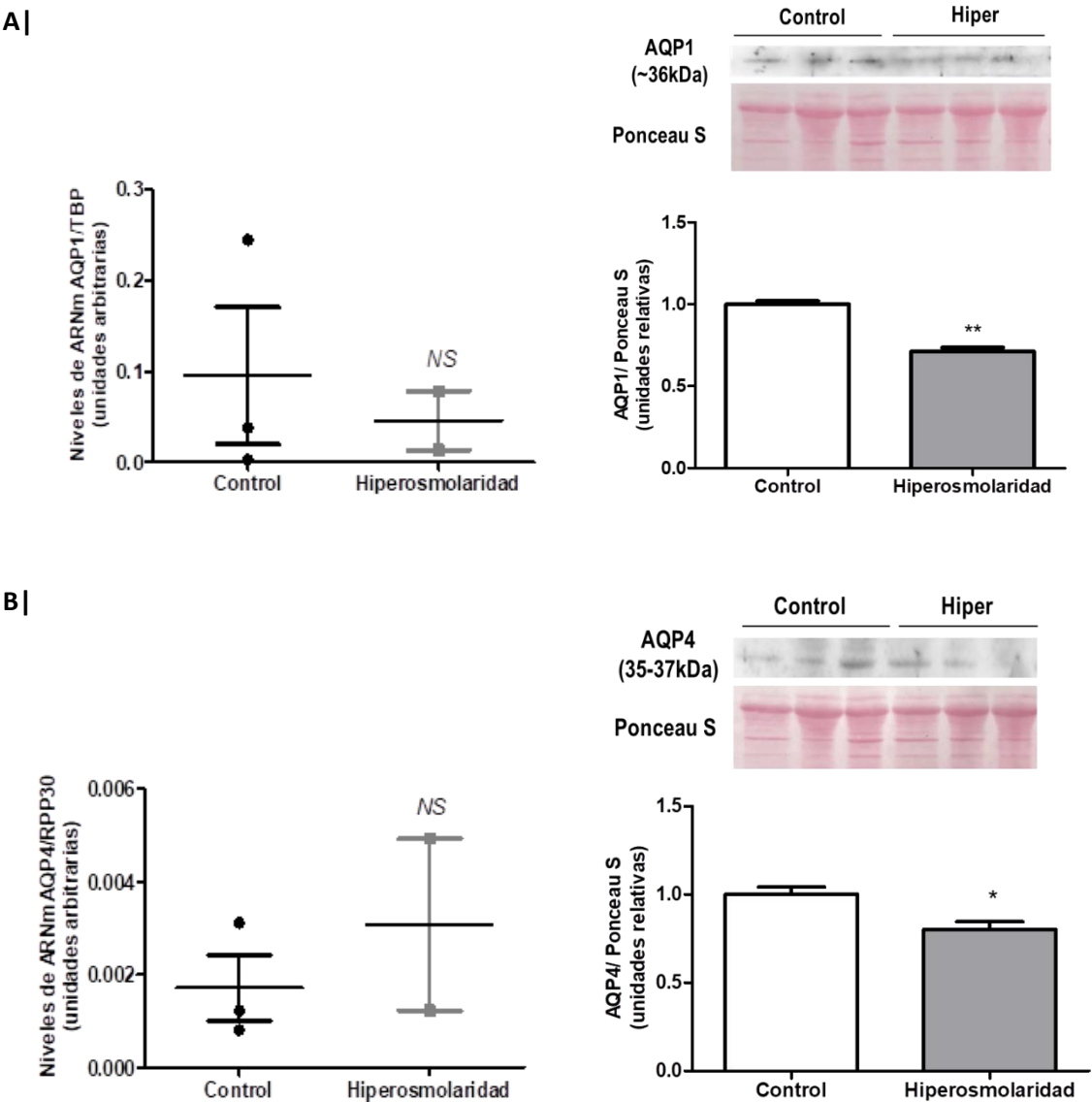
Figura 62: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la tubulogénesis de las células hPMEC.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y después del tratamiento de hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa) a las 6 horas. *Magnificación 40X*.

B| El paquete de software ImageJ 1.51r ® con el complemento Angiogenesis Analyzer se utilizó para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células hPMEC. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en tres experimentos independientes. Encontramos que después de la hiperosmolaridad, los parámetros analizados disminuyeron significativamente en comparación al control (\* $p<0,05$ ,  $n=3$ ). Las barras de error corresponden al SEM.

Se evaluó la abundancia relativa de las proteínas de interés y los niveles de expresión génica de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en las células hPMEC cultivadas en medio control o isoosmolar y medio hiperosmolar generado por la adición de 150 mM de sacarosa. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de la AQP1 y de la AQP4 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar, mientras que los niveles de ARNm de la

Cav-1 disminuyeron significativamente luego del tratamiento hiperosmolar en comparación al control. Respecto a los niveles proteicos, se observó que la abundancia relativa de las tres proteínas estudiadas (AQP1, AQP4 y Cav-1) disminuyó significativamente cuando las células se cultivaron en condición hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (Figura 63).



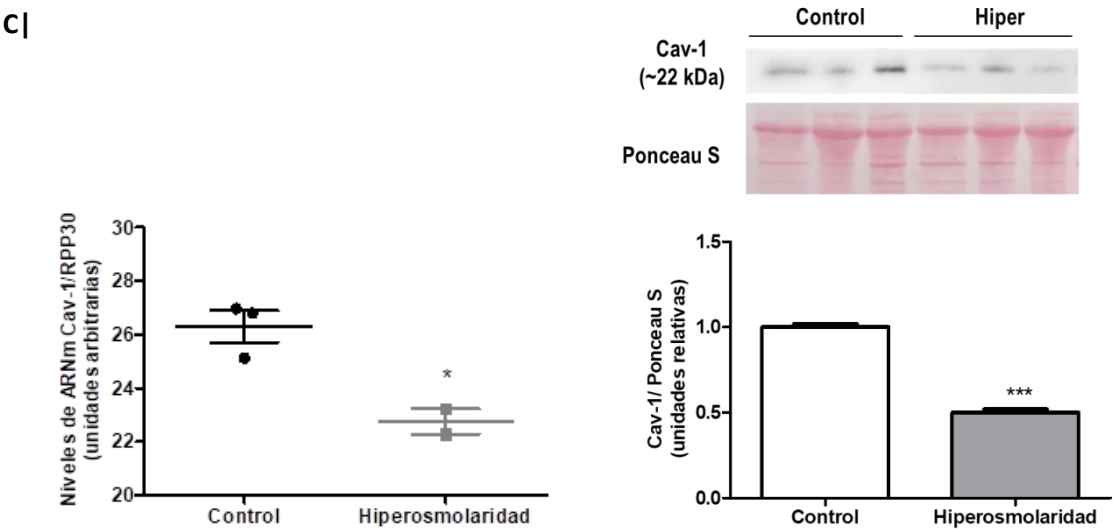


Figura 63: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en células hPMEC.

A| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la AQP1 en células hPMEC cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de AQP1 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (NS: no significativo; n=3), mientras que la abundancia relativa de la proteína AQP1 disminuyó significativamente en la condición de hiperosmolaridad en comparación al control (\*\*p<0,01; n=3).

B| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la AQP4 en células hPMEC cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ARNm de AQP4 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (NS: no significativo; n=3), mientras que la abundancia relativa de la proteína AQP4 disminuyó significativamente en hiperosmolaridad en comparación al control (\*p<0,05; n=3).

C| Niveles de ARNm (izquierda) y Western blot representativo con su correspondiente cuantificación relativa (derecha) de la Cav-1 en células EA.hy926 cultivadas en isoosmolaridad (control, 0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (150 mM de sacarosa). Se observó una disminución significativa en los niveles de ARNm de Cav-1 y en la abundancia relativa de la proteína Cav-1 en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001; n=3). Las barras de error corresponden al SEM.



**Efecto del estrés hiperosmolar en los microdominios de caveolas y su impacto en la diferenciación de células de trofoblasto extravelloso (EVT)**

*Existen numerosos trabajos que demuestran que alteraciones en la osmolaridad del medio de cultivo inducen cambios en las estructuras caveolares (cita). Teniendo en cuenta que las caveolas/ Cav-1 están involucradas en el proceso de diferenciación del trofoblasto, nos propusimos estudiar el efecto de la hiperosmolaridad sobre estas estructuras de membrana y su relación con la diferenciación del trofoblasto extravelloso.*

Con el objetivo de evaluar si la hiperosmolaridad alteraba la diferenciación de células de trofoblasto extravelloso, células Swan 71 se cultivaron en medio isoosmolar (0 mM de sacarosa) y medio hiperosmolar generado por el agregado de 100 mM de sacarosa al medio de cultivo basal.

Se analizó la viabilidad celular mediante la incorporación de MTT, una medida de la actividad enzimática de la deshidrogenasa mitocondrial. Se observó que la adición de sacarosa 100 mM no modificó la viabilidad celular en comparación con el control isoosmolar ( $p=0,0643$ ,  $n=8$ ) (Figura 64).

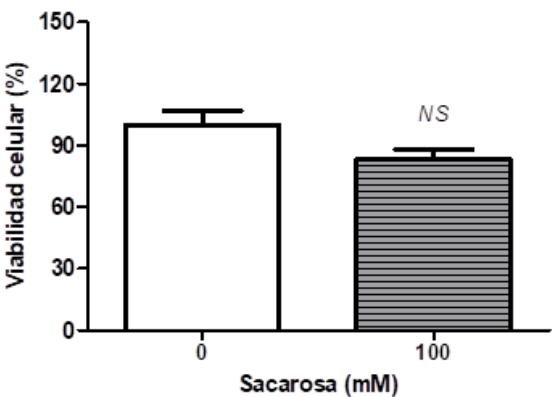


Figura 64: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la viabilidad de las células Swan 71.

Se cultivaron células Swan 71 en isoosmolaridad (0 mM de sacarosa) e hiperosmolaridad (100 mM de sacarosa) durante 24 horas y se realizó el ensayo MTT. La hiperosmolaridad (100 mM de sacarosa) no modificó la viabilidad de las células Swan 71 (NS: no significativo,  $n=8$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Se evaluó el efecto de la hiperosmolaridad sobre la migración de las células EVT. Se realizó la "prueba de raspado *in vitro*" para estudiar la migración celular y evaluar el efecto de la sacarosa en la reparación de heridas producidas en monocapas de células Swan 71. Del análisis de las fotografías obtenidas a los distintos tiempos se observó que la hiperosmolaridad afectaba el proceso de migración celular. Respecto al porcentaje de cierre de la herida tanto a las 6 como a las 24 horas, el mismo fue significativamente menor en hiperosmolaridad en comparación al grupo control. En cuanto a la velocidad de migración, se observó que la misma disminuyó significativamente en la condición hiperosmolar respecto al control a las 6 y 24 horas (Figura 65).

Para explorar la respuesta angiogénica de las células Swan 71 después del tratamiento hiperosmolar, se realizó un ensayo de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial. Del análisis de las fotografías obtenidas, se encontró que la hiperosmolaridad (100 mM de sacarosa) redujo el proceso de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial medido por el área total de mallas ( $p < 0,01$ ,  $n=4$ ), la longitud total de las ramificaciones ( $p < 0,05$ ,  $n=4$ ) y la longitud total de segmentos ( $p < 0,05$ ,  $n=4$ ) a las 4 y 6 horas en comparación al control isoosmolar (Figura 66).

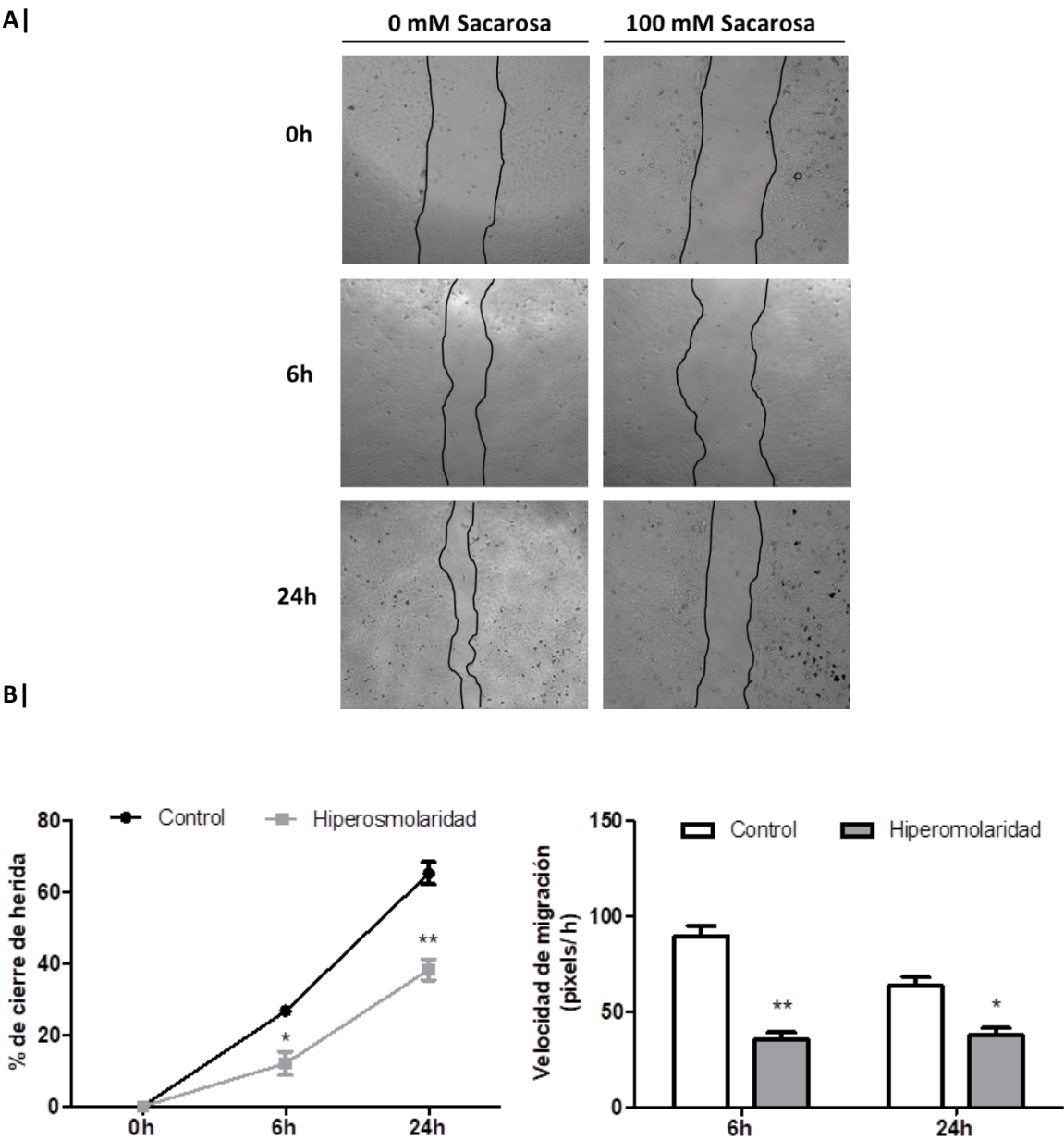


Figura 65: Efecto de la hiperosmolaridad (100 mM Sacarosa) en la migración de células Swan 71.

A| Fotografías representativas de las heridas realizadas en la monocapa celular a las 0, 6 y 24 horas. Magnificación 40X.

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r® para cuantificar el área de la herida y los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida en comparación con el tiempo 0 horas. El porcentaje de cierre de la herida fue significativamente menor en hiperosmolaridad que en el grupo control a las 6 y 24 horas. Respecto a la velocidad de migración, en la condición hiperosmolar la misma disminuyó significativamente en comparación con el control a las 6 y 24 horas (\*p<0,05, \*\*p <0,01; n=3). Los valores se presentan como medias ± SEM.

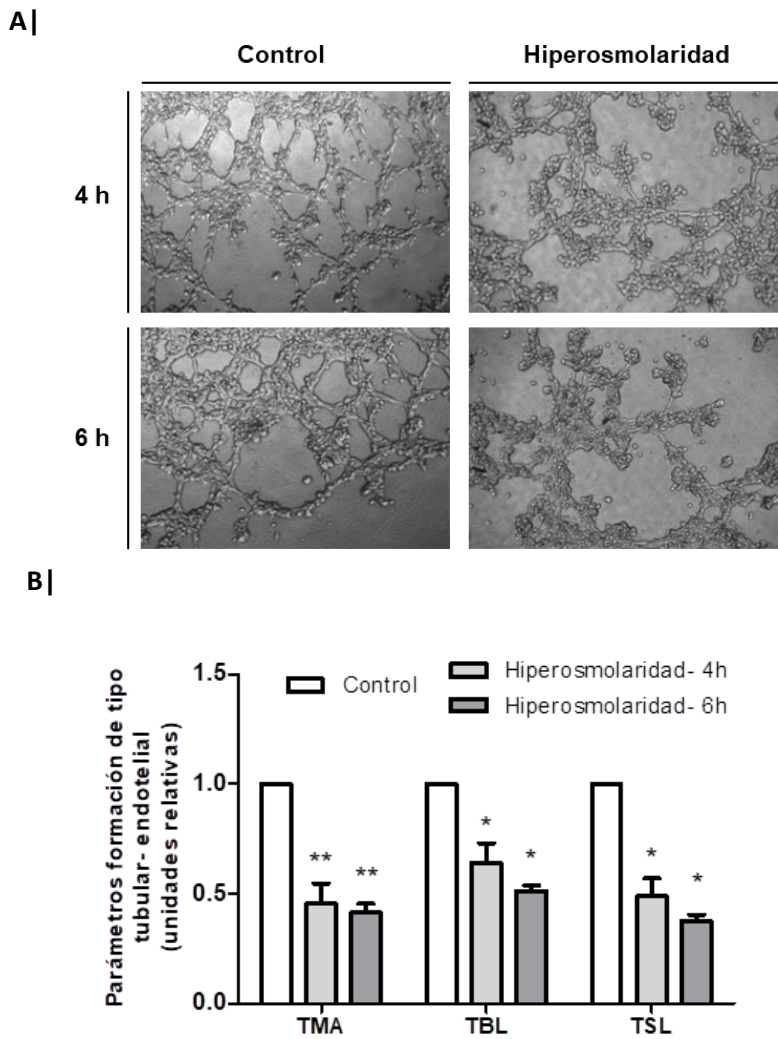


Figura 66: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la diferenciación endovascular de las células Swan 71.

A| Imágenes representativas de la formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en el control y después del tratamiento de hiperosmolaridad (100 mM de sacarosa) a las 4 y 6 horas. *Magnificación 40X.*

B| Se utilizó el paquete de software ImageJ 1.51r<sup>®</sup> con el complemento Angiogenesis Analyzer para analizar diferentes parámetros de la formación de tipo tubular- endotelial en células Swan 71. TMA: área total de mallas, TBL: longitud total de las ramificaciones y TSL: longitud total de los segmentos. Los valores se calcularon en cuatro experimentos independientes. Encontramos que después de la hiperosmolaridad, los parámetros analizados disminuyeron significativamente en comparación al control (\*p<0,05, \*\*p<0,01; n=4). Los valores se presentan como medias ± SEM.

Se evaluó la expresión génica y proteica de la AQP1 y la Cav-1 en células Swan 71 cultivadas en medio control o isoosmolar (0 mM de sacarosa) y medio hiperosmolar (100 mM de sacarosa). El análisis de la expresión génica se realizó mediante RT-qPCR empleando una sonda TaqMan™ específica para la AQP1 y la Cav-1, en la cual se observó un aumento significativo de la síntesis génica de la AQP1 y la Cav-1 luego del tratamiento hiperosmolar en comparación al control (Figura 67, A y Figura 68, A). Por otro lado, el análisis del Western blot mostró una banda de 36 kDa para AQP1 y de 22 kDa correspondiente a la Cav-1. Sin embargo, la abundancia relativa de las proteínas AQP1 y Cav-1 disminuyó significativamente después del tratamiento hiperosmolar en comparación con el control (\* $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ) (Figura 67, B y Figura 68, B).

En experimentos posteriores, se evaluó si la vía proteolítica dependiente del proteasoma o la vía de degradación lisosomal estaban implicadas en la reducción de la expresión de la proteína Cav-1 en la condición hiperosmolar. Para eso, se cultivaron células Swan 71 en condición isoosmolar e hiperosmolar, en presencia y en ausencia de MG-132, un inhibidor del proteasoma 26S, y del inhibidor lisosomal  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , respectivamente. Se encontró que la adición del inhibidor del proteasoma no modificó la disminución inducida por la condición hiperosmolar en la expresión de la proteína Cav-1. La adición del inhibidor del lisosoma evitó la degradación proteica de Cav-1 (Figura 68, C).

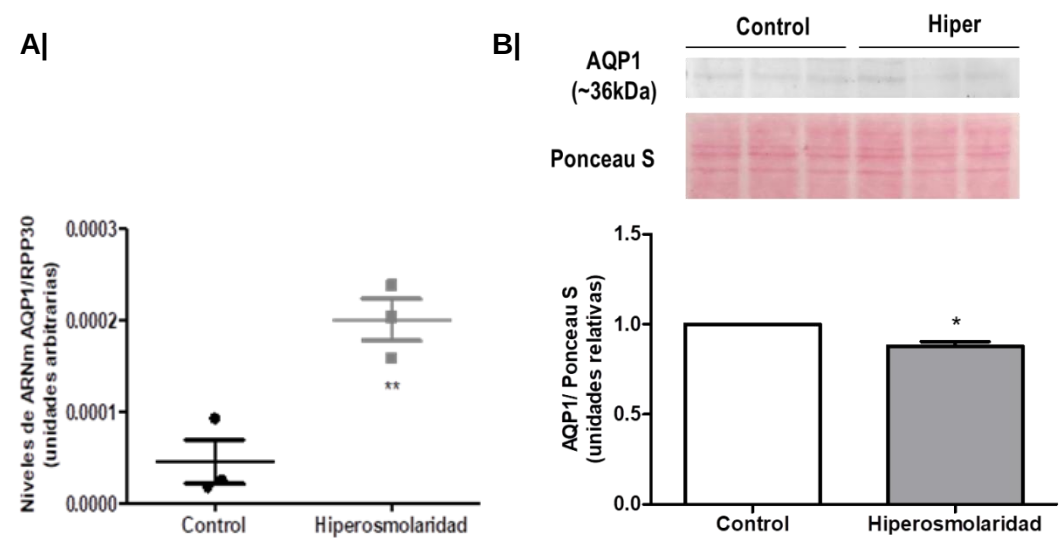


Figura 67: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión génica y la abundancia relativa de la AQP1 en células Swan 71.

A| Los niveles de ARNm de la AQP1 cuantificados mediante RT-qPCR en células Swan 71 fueron significativamente mayores en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar. La

expresión relativa se definió como  $2^{-\Delta Ct}$ , y  $\Delta Ct$  se calculó como:  $\Delta Ct = Ct (AQP1) - Ct (RPP30)$ . ( $p < 0,01$ ;  $n = 3$ ).

B| Western-blot representativo de la AQP1 en células Swan 71 cultivadas en control (C: 0 mM de sacarosa) o hiperosmolaridad (H: 100 mM de sacarosa). La semicuantificación de la AQP1 se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el paquete de software ImageJ 1.51r®. El análisis mostró una banda de 36 kDa correspondiente a la AQP1. Sin embargo, la abundancia relativa de la proteína AQP1 disminuyó significativamente después de la hiperosmolaridad en comparación con el control ( $*p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

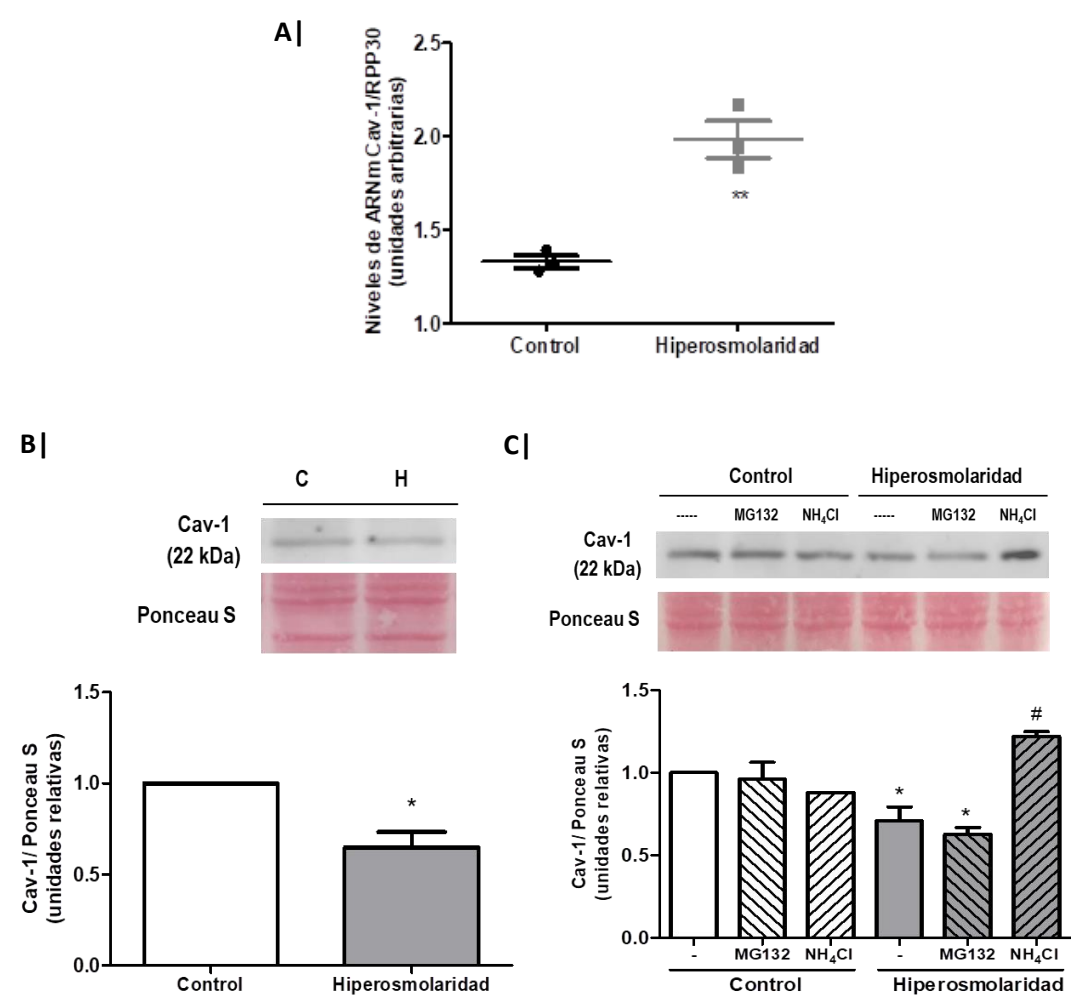


Figura 68: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la expresión génica y proteica de la Cav-1 en células Swan 71.

A| Expresión relativa de la Cav-1 mediante RT-qPCR en células Swan 71 cultivadas en control (isoosmolaridad) e hiperosmolaridad. Los niveles de ARNm de la Cav-1 en células Swan 71 fueron significativamente mayores en el tratamiento hiperosmolar en comparación al control isoosmolar. La

expresión relativa se definió como  $2^{-\Delta Ct}$ , y  $\Delta Ct$  se calculó como:  $\Delta Ct = Ct (Cav-1) - Ct (RPP30)$ . ( $p < 0,01$ ;  $n=3$ ).

B| Western-blot representativo de la Cav-1 en células Swan 71 cultivadas en control (C: 0 mM de sacarosa) o hiperosmolaridad (H: 100 mM de sacarosa). La semicuantificación de la Cav-1 se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el paquete de software ImageJ 1.51r®. El análisis mostró una banda esperada de 22 kDa correspondiente a la Cav-1. Sin embargo, la abundancia relativa de la proteína Cav-1 disminuyó significativamente después de la hiperosmolaridad en comparación con el control (\* $p < 0,05$  frente al control,  $n=3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

C| Western-blot representativo de la Cav-1 en células Swan 71 en condición control o hiperosmolar (100 mM de sacarosa) en presencia y ausencia de MG-132 y  $NH_4Cl$ . La semicuantificación mostró una banda esperada de 22 kDa correspondiente a la Cav-1. No se encontraron diferencias significativas entre los controles (medio isoosmolar suplementado con MG-132,  $NH_4Cl$  o PBS utilizado como vehículo). Se encontró que la adición de MG-132 para bloquear la actividad proteosómica no previno la degradación de Cav-1 cuando las células se cultivaron en condición de hiperosmolaridad. Sin embargo, la adición de  $NH_4Cl$  para inhibir la vía lisosomal evitó la degradación de Cav-1. (\* $p < 0,05$  frente a control, # $p < 0,01$  frente a hiperosmolaridad;  $n=3$ ). Los valores se presentan como medias  $\pm$  SEM.

Por último, se analizó la ultraestructura de las células Swan 71 expuestas a estrés osmótico mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes de la TEM mostraron que la hiperosmolaridad producía la internalización de estructuras compatibles con caveolas (flechas rojas) y un mayor número de vacuolas citoplasmáticas (asteriscos azules) en comparación con el control isoosmolar (Figura 69).

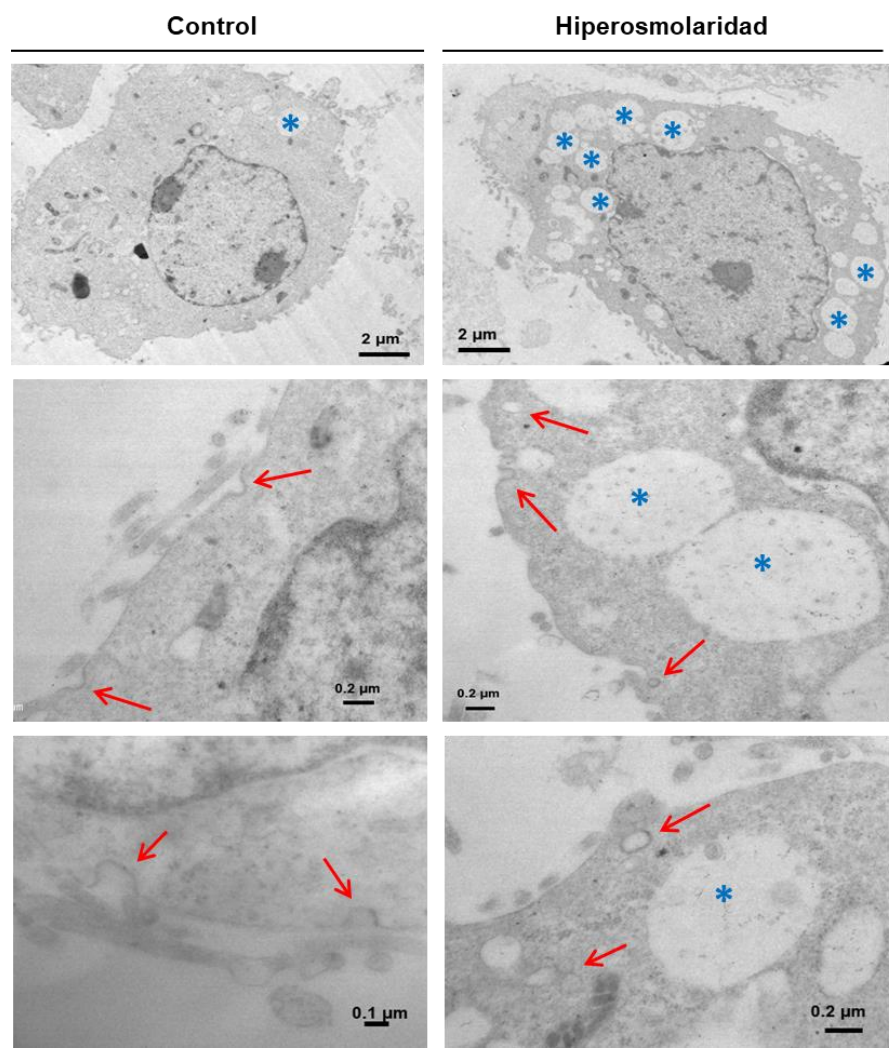


Figura 69: Efecto de la hiperosmolaridad sobre la ultraestructura de las células Swan71. Se utilizó un microscopio electrónico de transmisión para observar los cambios ultraestructurales en las células del trofoblasto Swan 71 cultivadas en isoosmolaridad (control) o hiperosmolaridad (100 mM de sacarosa). Se observó la presencia de un gran número de vacuolas en las células cultivadas en hiperosmolaridad respecto al control (asteriscos azules), y también se encontró que la hiperosmolaridad producía la internalización de estructuras consistentes por tamaño y estructura con caveolas (flechas rojas).



## DISCUSIÓN

---

El desarrollo y crecimiento del sistema vascular de la placenta desempeña un papel crucial en el establecimiento de la perfusión placentaria. El componente vascular placentario está formado por la vasculatura de las vellosidades coriónicas y por las arterias espirales uterinas que experimentan un proceso de remodelación inducido por las células de trofoblasto extraveloso (EVT). En este proceso, las células de EVT deben migrar e invadir correctamente la decidua y el miometrio materno, adquiriendo un fenotipo endovascular para remodelar los vasos maternos [216].

A través del proceso de angiogénesis, la vasculatura de la placenta se expande a lo largo de toda la gestación, adquiriendo una arquitectura altamente vascularizada durante las etapas tardías de la gestación. Esto permite adaptarse a las demandas metabólicas crecientes del feto y garantizar un adecuado crecimiento y desarrollo fetal [29]. Durante la angiogénesis, las células endoteliales experimentan cambios en su fenotipo que les permiten proliferar, invadir, migrar y formar estructuras tubulares, lo que da lugar a la formación del árbol vellositario. Todos estos eventos están regulados por múltiples factores, incluyendo factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PLGF), angiopoyetinas entre otras [217, 218].

Se han identificado dos tipos de células endoteliales placentarias con funciones distintas: las que forman parte de la macrovasculatura, presentes en los grandes vasos del cordón umbilical, y las que componen la microvasculatura de los cotiledones placentarios [45]. Aunque gran parte de nuestro conocimiento se basa en el uso de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), utilizado como modelo por excelencia, la angiogénesis *in vivo* ocurre principalmente en la microvasculatura. Por lo tanto, las células endoteliales de la microvasculatura placentaria (hPMEC) son el modelo celular adecuado para estudiar la angiogénesis placentaria. Estas células difieren en fenotipo, expresión génica y fisiología de las células endoteliales macrovasculares [43-45]. Sin embargo, hay muy pocos estudios realizados en células de microvasculatura, siendo que estas células tienen un rol importante en el establecimiento de trastornos gestacionales placentarios como la preeclampsia o la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU). En estos desórdenes, los cambios estructurales vasculares que afectan el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto ocurren en la microvasculatura de las vellosidades terminales [219, 220]. En un artículo de revisión, Murthi y

colaboradores concluyen que el estudio de las células de la microvasculatura aisladas de la vellosidad coriónica presenta ventajas como modelo para investigar el desarrollo vascular placentario en comparación con las células HUVEC [221]. Es por ello que hemos optado por utilizar la microvasculatura placentaria como modelo de estudio. Con éxito, logramos establecer el cultivo primario de las hPMEC y llevamos a cabo un estudio comparativo en cuanto a la expresión y funcionalidad de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en dichas células endoteliales microvasculares y las comparamos con las células EA.hy926, un modelo de células HUVEC ampliamente documentado en la literatura [222, 223].

*Comprender la regulación del crecimiento vascular en la placenta nos proporcionará información necesaria sobre las insuficiencias vasculares relacionadas con diferentes patologías placentarias.*

En nuestro laboratorio hemos descripto y estudiado la función de acuaporinas en la placenta humana, encontrando importantes alteraciones de las mismas en células de trofoblasto de mujeres con preeclampsia [224-226]. Estas proteínas de membrana que facilitan el transporte de agua transcelular, juegan un papel crucial en muchos procesos biológicos, incluida la formación y función de la vasculatura. En cuanto al papel de las acuaporinas (AQPs) en el endotelio, la mayoría de los estudios hasta la fecha se han centrado en la AQP1. Estos estudios han demostrado que la AQP1 desempeña un papel importante en el control de la permeabilidad vascular y la supervivencia de las células endoteliales, promoviendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos [227, 228]. La ausencia de AQP1 se ha asociado con disfunción endotelial. En este sentido, Saadoun y colaboradores demostraron en cultivos primarios de células endoteliales de aorta provenientes de ratones knockout para AQP1, que la migración celular y la formación de vasos *in vitro* estaban alteradas [92, 228, 229].

En lo que respecta a la AQP4, existe poca información en la literatura sobre la expresión de esta proteína en células endoteliales. Entre ellos, los estudios han informado su localización en la zona perivascular del cerebro, pero no está completamente claro si se encuentra localizada a nivel del endotelio [230]. Otros autores, han descripto que la AQP4 se expresa en células endoteliales del sistema nervioso donde modularía la permeabilidad vascular afectando la extravasación de líquidos y solutos en los tejidos y tendría implicancias en la angiogénesis [231].

Otras estructuras ampliamente distribuidas en las células endoteliales son las caveolas, microdominios de membrana cuyo principal componente proteico es la caveolina-1 (Cav-1) [232]. Una característica importante de la proteína Cav-1 es el dominio *scaffold* o dominio de andamiaje, una región adyacente al dominio hidrofóbico utilizado por las caveolinas para interactuar con otras proteínas y regular las moléculas de señalización ubicadas en las caveolas incluidos receptores, canales y transductores de señales, entre otros [135, 175, 233, 234]. Es debido a su dominio de andamiaje que las caveolas pueden actuar como una plataforma crítica para la organización y sincronización de diferentes moléculas de señalización relacionadas con procesos celulares como la migración celular, la invasión y la diferenciación celular [175].

Basados en estas evidencias, el **objetivo general** de esta tesis fue ***evaluar la participación de la acuaporina-1 y la acuaporina-4 y su interacción con Caveolas/ Caveolina-1 en la formación de la vasculatura placentaria en condiciones fisiológicas y en condiciones de estrés osmótico.***

En primer lugar, se evaluó ***la participación de la AQP1 y la AQP4 y su interacción con la Cav-1 en la formación de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria en condiciones fisiológicas.*** Este análisis incluyó la caracterización de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria, en donde demostramos que la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 se expresan en las células macrovasculares EA.hy926 y en las células microvasculares hPMEC.

Con respecto a las células de macrovasculatura EA.hy926, nuestros resultados son la primera evidencia de que estas células expresan AQP4. En cuanto a la expresión de AQP1 y Cav-1, nuestros hallazgos concuerdan con lo descrito previamente [235]. En lo referente a la microvasculatura placentaria, si bien la expresión de acuaporinas y Cav-1 no fue descrita en células aisladas (hPMEC), los resultados que obtuvimos fortalecen los hallazgos previos informados por Zhu y colaboradores donde observaron que la AQP1 se expresa en el endotelio de los vasos placentarios, así como lo reportado por De Falco y colaboradores, quienes demostraron que la AQP4 se localiza no solo en el sinciotrofoblasto, sino también en células endoteliales y estroma de vellosidades placentarias [104, 236]. Por otro lado, la identificación de Cav-1 en células hPMEC coincide con la localización de Cav-1 que previamente describimos en vellosidades coriónicas [237].

Cuando comparamos los niveles de expresión génica de estas proteínas en microvasculatura y macrovasculatura, no encontramos diferencias significativas en la expresión de la AQP1. Sin embargo, los niveles de expresión de la AQP4 y la Cav-1 fueron significativamente menores en

las células microvasculares hPMEC en comparación con las células de macrovasculatura EA.hy926. Estos resultados, junto con los de Huang y col, muestran que existen diferencias significativas en los transcriptomas celulares entre las células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria, lo que nos permite inferir que estas células también podrían presentar diferentes respuestas a ciertos estímulos [46, 221].

Existen muchas evidencias que indican que la Cav-1 y la AQP1 pueden regularse mutuamente a nivel de expresión y localización. Algunos estudios sugieren que la presencia de la Cav-1 puede influir en la localización y estabilidad de la AQP1 en las caveolas, mientras que la presencia de la AQP1 puede afectar la localización y función de la Cav-1 [238]. Por otro lado, no se ha establecido una interacción directa entre la AQP4 y la Cav-1 en ningún tipo celular. Aunque la AQP4 y la Cav-1 pueden coexistir en ciertos tipos celulares, como en los astrocitos, no se ha demostrado una interacción directa entre ambas proteínas [239].

La mayoría de las proteínas que están asociadas con caveolas/Cav-1 contienen secuencias consenso que interaccionan con el dominio *scaffold* de Cav-1. Ese motivo consenso está formado por 8 o 9 aminoácidos y debe tener la siguiente secuencia:  $\Theta X \Theta X X X X \Theta$  o  $\Theta X X \Theta X X X X \Theta$ , donde  $\Theta$  es fenilalanina (F), tirosina (Y) o triptófano (W) y X es cualquier residuo aminoacídico [175, 240]. Seguidamente, se demostró por ensayos de modelado *in silico* que la AQP1 y la AQP4 presentan sitios putativos de unión a la Cav-1 en su secuencia aminoacídica. El análisis de la estructura primaria de la AQP1 nos permitió identificar un sitio putativo de unión a Cav-1 en la proteína AQP1 humana formado por los aminoácidos WIFWVGPF, entre los residuos de aminoácidos 233 a 240 en la estructura 3D cristalizada. Se realizó el mismo análisis sobre la estructura primaria de la AQP4, y se demostró que la misma también presenta el motivo consenso de unión a Cav-1 y que éste es muy similar al de la AQP1. Para el caso de la AQP4, el dominio está formado por los aminoácidos WIYWVGPI y se encuentra entre los residuos 200 y 207 en la estructura 3D cristalizada. Por tanto, estos hallazgos *in silico* sugieren una interacción directa entre Cav-1 y las acuaporinas AQP1 y AQP4.

Cuando realizamos la modelización de los homotetrámeros de estas AQPs, observamos que el sitio de unión a Cav-1 se encuentra en el exterior del tetrámetro y no involucra aminoácidos que están implicados en la formación del poro de agua.

Dado que los métodos *in silico* sólo predicen la interacción de ambas proteínas, se realizó la confirmación experimental de este análisis. En ese sentido, se realizaron experimentos de

doble inmunofluorescencia confocal y ensayos de inmunoprecipitación a partir de los cuales demostramos que tanto en macrovasculatura como en microvasculatura placentaria, la Cav-1 co-localiza con la AQP1 y con la AQP4, sugiriendo la existencia de una interacción física y funcional entre ambas proteínas.

Posteriormente, ***evaluamos la participación de la AQP1 y la AQP4 en los procesos de angiogénesis*** tanto en células de microvasculatura como de macrovasculatura.

Comenzamos evaluando la migración celular mediante el ensayo de cicatrización de herida. Este ensayo ha sido ampliamente utilizado debido a su bajo costo y complejidad. La migración celular implica cambios estrictamente coordinados por el citoesqueleto de actina, así como una regulación fina del volumen celular. Está bien documentado que los canales iónicos y de agua (AQPs) desempeñan un papel fundamental en la regulación del volumen celular [119, 241-243].

Inhibimos farmacológicamente a la AQP1 mediante el uso de  $\text{HgCl}_2$  y a las AQP1 y AQP4 mediante cloruro de tetraetilamonio (TEA) y silenciamos la expresión de ambas proteínas mediante un siRNA específico. Los compuestos mercuriales fueron los primeros en ser descritos como bloqueantes no selectivos de las AQPs, al corroborarse que el flujo de agua mediado por AQP1 en ovocitos de *Xenopus laevis* era sensible a  $\text{HgCl}_2$  y la inhibición se debía a la elevada afinidad del  $\text{Hg}^{2+}$  por la Cys189 presente en el poro del canal, generando un bloqueo estérico del mismo [112, 244]. Sin embargo, la AQP4 es insensible a la inhibición con este compuesto, ya que carece del residuo de Cys reactivo [213]. Respecto al TEA, a altas concentraciones (10 mM) se describió como un agente bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$ , pero en concentraciones 100 veces más bajas (100  $\mu\text{M}$ ) presenta un efecto inhibitorio sobre la AQP1 y la AQP4 por unirse a la Tyr186 presente en el bucle-E del canal [212].

En el caso de las células de macrovasculatura EA.hy926, el bloqueo generado por  $\text{HgCl}_2$  no produjo cambios significativos en la capacidad migratoria en comparación a la condición control, mientras que el bloqueo generado por TEA, el cual inhibe la funcionalidad de ambas AQPs (AQP1 y AQP4), produjo una disminución significativa del porcentaje de cierre de herida y de la velocidad de migración evaluada a las 18 y 24 horas en comparación al control. Sin embargo, solo el silenciamiento de la expresión génica de AQP1, produjo una disminución significativa en la capacidad migratoria en estas células.

En el caso de las células de microvasculatura hPMEC, tanto el bloqueo de la AQP1 dado por  $\text{HgCl}_2$ , como el bloqueo de ambas AQPs (AQP1 y AQP4) por TEA, generaron una disminución significativa de la migración celular. Nuevamente, en estas células solo se observó una reducción en la migración celular cuando se silenció la expresión génica de AQP1.

Por tanto, estos resultados nos sugieren que, en ambos tipos celulares, tanto la AQP1 como la AQP4 participan en la migración celular. Sin embargo, la AQP1 parecería tener un papel crucial en este proceso, ya que el bloqueo o silenciamiento de la misma no puede ser compensado por la AQP4. En este punto, es importante destacar que nuestros resultados mostraron que la abundancia de la AQP1 en ambos tipos celulares es mayor al de la AQP4.

A continuación evaluamos la participación de la AQP1 y la AQP4 en el proceso de tubulogénesis o formación de estructuras de tipo tubular- endotelial en células de macrovasculatura EA.hy926 y microvasculatura hPMEC.

La migración y la tubulogénesis son procesos biológicos diferentes. La migración celular se produce en superficies bidimensionales en ausencia de cualquier tipo de matriz fibrosa. Por otro lado, la tubulogénesis requiere la coordinación de múltiples vías moleculares, incluidas los receptores de la superficie celular, la matriz extracelular, las moléculas de adhesión, el citoesqueleto y el transporte vesicular [245].

Para el caso de las células EA.hy926, la formación de túbulos se alcanzó a las 8 horas, mientras que en las células hPMEC, la formación fue mucho más rápida y a las 4 horas se logró identificar las estructuras tubulares- endoteliales sobre la matriz extracelular. En este caso, la formación de túbulos medida por el área total de mallas, la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de los segmentos se vio mayormente afectada cuando la AQP1 estaba silenciada tanto en células de macrovasculatura como en las células de microvasculatura, mientras que el silenciamiento de la AQP4 sólo alteró el área total de mallas en ambas células. Estos resultados nos indican que tanto la AQP1 como la AQP4 son indispensables para la correcta tubulogénesis de las células endoteliales.

*Posiblemente, las evidencias de heterogeneidad entre las células hPMEC microvasculares y las células EA.hy926 macrovasculares, reflejan las diferencias en las funciones que deben cumplir estos tipos de células endoteliales.*

Existen evidencias que demuestran, en modelos de ratones knockout para Cav-1, que células endoteliales deficientes en Cav-1 tienen una respuesta disminuida a los factores de crecimiento angiogénicos y respaldan la idea de que la pérdida de Cav-1 puede retardar el crecimiento tumoral a través de una respuesta angiogénica disminuida [246].

A continuación, evaluamos la **participación de las caveolas/ Cav-1 en los procesos de angiogénesis**. Para esto, se empleó el compuesto metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) el cual genera la depleción de colesterol de la membrana plasmática produciendo la disrupción de las caveolas. Esta es una estrategia farmacológica útil y ampliamente utilizada para estudiar el papel de las caveolas en diversos procesos celulares [215].

Se estudió la capacidad migratoria en células de macrovasculatura EA.hy926 y células de microvasculatura placentaria hPMEC tratadas con M $\beta$ CD. En ambos casos, se confirmó que, luego del tratamiento, la expresión de Cav-1 disminuyó drásticamente. Al igual que lo observado por Woodman y colaboradores [246], en ambos tipos de células endoteliales la disrupción de caveolas mediada por el secuestro del colesterol alteró el proceso de reparación de heridas. Tanto el porcentaje de cierre de la herida, como la velocidad de migración fueron significativamente menores a las 18 y 24 horas luego del tratamiento con M $\beta$ CD en comparación al control. El silenciamiento de la expresión de Cav-1 confirmó estos resultados.

Luego se investigó, el rol de la Cav-1 en el proceso de formación de túbulos. Se observó que tanto el área total de mallas como la longitud total de los segmentos y la longitud total de las ramificaciones disminuyeron significativamente luego de silenciamiento de la expresión génica de la Cav-1 en células EA.hy926 y hPMEC.

Estos resultados proponen que la Cav-1 y, en consecuencia, una caveola intacta, son indispensables para la correcta tubulogénesis de las células endoteliales de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria.

Nuestro siguiente objetivo fue **evaluar en células de EVT la participación de la AQP1 y su interacción con la Cav-1 en la remodelación de las arterias espirales maternas**.

Como se describió previamente, la migración de las células del EVT constituye un fenómeno crucial en el desarrollo temprano de la placenta. Las células de EVT son capaces de diferenciarse a un fenotipo endovascular y este proceso permite una remodelación exhaustiva de las arterias espirales maternas haciendo que las mismas adquieran gran calibre y baja

resistencia y en consecuencia se pueda dar un crecimiento y desarrollo normal del feto [21, 35].

Los estudios que requieren citotrofoblasto de primer trimestre pueden encontrarse limitados por la falta de acceso a las muestras y/o al número de células requerido para desarrollar los ensayos. Adicionalmente, los cultivos primarios de células trofoblásticas presentan una duración limitada [247]. Con el objetivo de superar estas limitaciones se decidió utilizar la línea celular establecida Swan 71, como un modelo representativo del EVT [204]. Estas células solo expresan la AQP1, la AQP3 y la AQP9 [124].

En este trabajo nos enfocamos en dilucidar el rol de la AQP1, única AQP clásica reportada en este modelo de estudio, y a su vez, es la AQP de mayor expresión en vasculatura placentaria. En este sentido, estudiamos la migración celular luego del silenciamiento génico de AQP1. Al igual que con el bloqueo farmacológico de la AQP1 observado previamente en nuestro laboratorio [124], su silenciamiento no produjo cambios en la capacidad migratoria de las células Swan 71, evaluada por el porcentaje de cierre de herida y velocidad de migración. Estos resultados confirman que esta AQP no sería relevante en la migración de estas células.

Cuando evaluamos la participación de las caveolas/ Cav-1 en el proceso de migración de las células Swan71, nuestros hallazgos mostraron que la migración de estas células disminuyó significativamente luego de la disrupción de las caveolas con M $\beta$ CD o con el silenciamiento de Cav-1.

Finalmente, mediante un ensayo de formación de estructuras de tipo tubular- endotelial evaluamos la capacidad de diferenciación de las células Swan 71 en EVT endovascular asumiendo un fenotipo angiogénico [20]. Distintos autores observaron esta capacidad de formación de estructuras similares a túbulos en células EVT aisladas de placenta de primer trimestre y en líneas celulares inmortalizadas como HTR8/SVneo [248-250]. Damsky y colaboradores demostraron que este fenómeno está regulado por la presencia de laminina y colágeno tipo IV en el Matrigel<sup>TM</sup> [251] y refleja la angiogénesis placentaria, la diferenciación endovascular y la adquisición del fenotipo endotelial por parte del trofoblasto [250]. En este trabajo de tesis, demostramos que las células Swan 71 podían formar estas estructuras tubulares e inesperadamente, la disrupción o desensamblaje de las caveolas aumentó la formación de túbulos, evaluada por la longitud total de las ramificaciones y la longitud total de segmentos. El mecanismo de este hallazgo no se investigó en el presente trabajo de tesis, sin



embargo, se ha reportado que la depleción de colesterol puede facilitar la liberación de vesículas extracelulares [252, 253]. Estas vesículas extracelulares son de tamaño nanométrico y se cree que están involucradas en la comunicación celular [254, 255]. Teniendo en cuenta que los componentes de estas vesículas extracelulares reflejan la célula desde donde fueron liberados [256], y que las caveolas son plataformas de señalización, es posible que la disrupción de las caveolas induzca el desprendimiento de vesículas “cargadas de moléculas” capaces de activar vías de transducción de señales que pueden promover la diferenciación endovascular en forma paracrina.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran que en las células EVT, el desensamblado de las caveolas puede tener un efecto dual que atenúa la migración celular y mejora la diferenciación endovascular. Estos resultados sugieren un papel clave para las caveolas/ Cav-1 durante la remodelación de las arterias espirales y la formación de la vasculatura placentaria.

El último objetivo de esta tesis fue ***evaluar el efecto del estrés hiperosmolar sobre la expresión y función de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 durante la formación de la vasculatura placentaria.***

Existe evidencia experimental que sugiere que si bien la placenta tiene la capacidad de adaptarse fenotípicamente a condiciones adversas, su capacidad de adaptación es limitada, por lo que, en última instancia, puede reducirse el crecimiento fetal si el grado de estrés excede la capacidad de adaptación [187-190].

Durante el embarazo, las células del trofoblasto son muy sensibles a cambios mínimos en la osmolaridad y, en algunas situaciones, la hiperosmolaridad puede actuar como un factor estresante letal [192, 193]. En este sentido, recientemente informamos que osmolaridades superiores a 450 mOsm inducen la muerte celular por un mecanismo que implica la activación del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV-1) en las células EVT [195]. Por otro lado, existen varios estudios que reportan que la hiperosmolaridad produce alteraciones de la microvasculatura de diferentes tejidos [201, 202]. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de lo que ocurre en la vasculatura placentaria frente a cambios en la osmolaridad del entorno. Estudios previos han demostrado que patologías gestacionales asociadas a fallas en la placentación como hipertensión en el embarazo, restricción del crecimiento fetal y preeclampsia, tienen un estado de hemoconcentración con volúmenes plasmáticos reducidos, lo que resulta en estrés hipertónico [197, 198]. Además, anteriormente informamos una

expresión reducida de Cav-1 en las células trofoblásticas de placentas preeclámpticas asociadas con alteraciones en la composición lipídica de la membrana que afecta la formación normal de caveolas y la inserción de Cav-1 en la membrana plasmática [237].

En este trabajo de tesis, estudiamos el efecto de la hiperosmolaridad subletal sobre la formación de la vasculatura placentaria y el rol de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en este proceso. En primer lugar, evaluamos el efecto de la osmolaridad sobre la expresión de la AQP1, AQP4 y Cav-1 en las células de macrovasculatura y microvasculatura placentaria.

Está bien documentado que estas AQPs se regulan positivamente frente a un estrés hiperosmótico por un mecanismo mediado por el factor de transcripción activado en respuesta a la hipertonicidad, tonEBP [257, 258]. Este factor de transcripción induce la expresión de numerosas moléculas involucradas en el transporte de solutos orgánicos con la finalidad de mantener la homeostasis celular frente a un entorno hiperosmótico. TonEBP se expresa abundantemente en el trofoblasto vellosos, trofoblasto extraveloso, células endoteliales y en el amnios [259-261]. Se ha reportado también, que en placentas preeclámpticas y en placentas de embarazos complicados con RCIU, la expresión del tonEBP se encuentra aumentada [262]. La expresión de AQP1 aumenta en placentas preeclámpticas [263], mientras que la expresión de la AQP4 en estas placentas está disminuida [226], sugiriendo que en la regulación de estas proteínas podrían estar involucrados diferentes estímulos.

Contrario a lo esperado, nuestros hallazgos muestran que la hiperosmolaridad no modifica la expresión génica de estas AQPs. Por el contrario, encontramos que la expresión proteica de las mismas disminuyó significativamente en las células endoteliales de macrovasculatura y microvasculatura frente a un estrés hiperosmótico. Una explicación a nuestros resultados es que como ocurre en células cardíacas la osmolaridad a la cual inducimos el estrés osmótico, sea leve o moderada y no alcance a modificar la expresión génica de estas AQPs en estas células vasculares [264]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el estrés osmótico leve deforma las caveolas y altera las interacciones entre las caveolas y las proteínas que se localizan en estos dominios de membrana [265, 266]. Podríamos inferir que una interacción Cav-1/AQPs alterada podría afectar la expresión y función de estas proteínas. Sin embargo, el mecanismo por el cual estas acuaporinas no responden al estrés osmótico en estas células de vasculatura placentaria, requerirá posteriores estudios.

Con respecto a la caveolina-1, la literatura que relaciona el estrés hiperosmótico con las caveolas es limitada. Kang y colaboradores informaron que el estrés hiperosmótico de 30 minutos con sorbitol induce la internalización de Cav-1 [267]. Sumado a estas evidencias, distintos autores describieron que la exposición de los cardiomiocitos y fibroblastos a la hiperosmolaridad induce la internalización de la caveola en el citosol [268]. Por otro lado, está bien establecido que las caveolas son estructuras estables que presentan un recambio lento que se produce por endocitosis y mecanismos de reciclaje, manteniendo una densidad constante de estas estructuras en la membrana celular [131, 269]. Por tanto, en condiciones fisiológicas, Cav-1 es una proteína de larga vida. Sin embargo, cuando la estabilidad de las caveolas se ve alterada por diferentes condiciones como la hiperosmolaridad [138], el recambio de Cav-1 se acelera drásticamente [134, 270, 271]. En concordancia con estos hallazgos, en células de microvasculatura observamos que la hiperosmolaridad indujo una disminución de la Cav-1. Sin embargo, en estas condiciones en las células de macrovasculatura encontramos un aumento de esta proteína. Si bien desconocemos el motivo por el cual ante el mismo estrés la expresión de Cav-1 es diferente en estas células endoteliales, es posible que ciertas características como la composición lipídica de la membrana plasmática o el estado de oxidación de los lípidos que la constituyen induzcan estas diferencias. Un resultado similar se observó en un estudio en ratas expuestas a deshidratación por restricción de agua. En ese trabajo, los autores observaron que los endotelios de los diferentes tejidos presentaban diferentes mecanismos de regulación, que de manera específica modificaban la expresión de la Cav-1 con el fin de modular los cambios en los parámetros hemodinámicos como respuesta al estrés osmótico. Estos autores concluyeron que los cambios en la expresión de Cav-1 como respuesta al estrés osmótico dependían de las características del endotelio [272].

Al evaluar la migración celular y la tubulogénesis de las células de macrovasculatura EA.hy926 en condición hiperosmolar, observamos que ambos procesos se ven significativamente alterados en comparación al control. Resultados similares se obtuvieron en las células de microvasculatura placentaria hPMEC, en las cuales el estrés hiperosmolar generó una disminución significativa de la capacidad migratoria y del proceso de tubulogénesis en comparación al control. Esta reducción puede ser explicada por la disminución de las expresiones de la AQP1, la AQP4 y la Cav-1 en microvasculatura en estas condiciones. Sin embargo, en las células de macrovasculatura, el aumento de la Cav-1 no fue suficiente para contrarrestar las alteraciones en la migración y formación de túbulos, sugiriendo que no solo una estructura caveolar intacta con una expresión de Cav-1 adecuada son necesarias en estos

procesos, sino que los mismos requieren una apropiada expresión de AQPs. Esta hipótesis se ve reforzada con el resultado donde evidenciamos que el silenciamiento de AQP1 también indujo una reducción de la migración en las células de la vasculatura placentaria.

Como explicamos previamente, la formación de la vasculatura placentaria involucra un proceso de transformación de las arterias espirales mediado por el EVT. En este sentido, estudiamos cómo la hiperosmolaridad afecta la expresión de Cav-1 en estas células. Observamos que a pesar del aumento de la expresión génica inducido por hiperosmolaridad, la proteína Cav-1 se encuentra significativamente disminuida. Una posible explicación es que la hiperosmolaridad estuviera exacerbando la degradación proteica de Cav-1. Para confirmar esta hipótesis, se bloqueó la vía de degradación proteasomal con MG-132 (inhibidor proteasomal) y la vía de degradación lisosomal con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (el cual modifica el pH del lisosoma afectando su función), encontrando que en hiperosmolaridad la vía lisosomal era la responsable de la disminución de Cav-1. Este mecanismo de degradación involucra una invaginación de las estructuras caveolares, que se deben fusionar con el lisosoma para que tenga lugar el proceso proteolítico. Este resultado coincide con el modelo de desensamblado caveolar propuesto por Hayer y colaboradores [134] quienes sugieren un desensamblado caveolar por endocitosis de esta estructura con posterior degradación lisosomal de Cav-1, proceso que se ve dramáticamente acelerado por situaciones de estrés que alteren la estabilidad caveolar.

Confirmando este resultado, los experimentos de microscopia electrónica nos muestran un aumento significativo muy importante en número y tamaño de vacuolas citoplasmáticas en hiperosmolaridad, que pueden corresponder a vacuolas autofágicas donde puede estar ocurriendo proteólisis lisosomal de Cav-1. Estos resultados coinciden con lo observado en las células epiteliales de la córnea humana [273], y soportan la hipótesis que la hiperosmolaridad produce una desestabilización de las caveolas induciendo la internalización citoplasmática de las mismas propuesta por algunos autores [268].

Los experimentos de migración celular también muestran una disminución en la capacidad migratoria de estas células cultivadas en hiperosmolaridad, presentando un comportamiento similar a lo descrito en otros tipos celulares [274]. Además, cuando evaluamos la capacidad de diferenciación de las células Swan 71 en EVT endovascular, observamos también que la hiperosmolaridad disminuyó significativamente la formación de estructuras de tipo tubular-endotelial. Si bien muchos autores han mostrado evidencias que cambios en la osmolaridad podría ser un mecanismo de diferenciación celular [192, 275-277], estos eventos no están

completamente dilucidados en placenta humana. Nuestros hallazgos sugieren que un estrés osmótico puede alterar la capacidad las células trofoblásticas para diferenciarse y esto tendría relevancia durante los eventos de implantación y formación de la placenta.

En condiciones fisiológicas, la gestación se asocia con un aumento del volumen plasmático materno (alrededor de las 6 a 8 semanas gestación) y conduce a valores reducidos de hemoglobina, hematocrito, creatinina, ácido úrico, urea y proteínas totales en comparación con los valores de no embarazadas, sin embargo parecería que en gestaciones que cursan con preeclampsia, hipertensión o restricción del crecimiento intrauterino, existiría un inadecuado aumento del volumen plasmático materno, acompañado por un aumento de todos estos indicadores [196, 198, 199]. Más aún, en patologías como la preeclampsia, los vasos linfáticos, encargados de controlar la osmolaridad del medio, también están afectados por el desbalance entre factores pro y antiangiogénicos [278], y esto podría conducir a un estrés osmótico que resultaría en una malformación de la vasculatura placentaria. Sin embargo, más estudios son necesarios para poder establecer los mecanismos moleculares involucrados en estos eventos.

En resumen, nuestros hallazgos muestran nueva evidencia de que la hiperosmolaridad subletal puede producir la internalización de los dominios caveolares en las células EVT, lo que lleva a una disminución de la proteína Cav-1 por proteólisis lisosomal. Por lo tanto, la perturbación de esta plataforma de andamiaje, donde se ubican muchas vías de señalización relacionadas con la modulación de la diferenciación de EVT, puede conducir a una placentación anormal. Una mejor comprensión de los procesos moleculares y las vías de señalización ubicadas en las caveolas que regulan la diferenciación del trofoblasto en la gestación temprana mejorará nuestro conocimiento del papel de esta plataforma en el desarrollo normal de la placenta. Por lo tanto, las alteraciones en la estructura de la caveola inducidas por la hiperosmolaridad podrían dar lugar a patologías asociadas con la remodelación incompleta de las arterias espirales, como la preeclampsia y la restricción del crecimiento fetal.

## CONCLUSIONES

---

En este trabajo de tesis demostramos que:

- ✓ Las células de macrovasculatura EA.hy926 expresan la AQP4. Confirmamos además la expresión de la AQP1 y la Cav-1.
- ✓ Las células de microvasculatura hPMEC expresan la AQP1, la AQP4 y la Cav-1.
- ✓ Existe una co-localización e interacción directa entre AQP1/Cav-1 y AQP4/Cav-1 en células endoteliales de placenta humana.
- ✓ Tanto la AQP1 como la AQP4 participan en la migración de las células macrovasculares EA.hy926 y microvasculares hPMEC. Sin embargo, la AQP1 parecería tener un papel más importante en comparación a la AQP4 en este proceso. En el caso de la tubulogénesis, ambas AQPs (AQP1 y AQP4) son indispensables para la correcta angiogénesis de estas células.
- ✓ La Cav-1 y en consecuencia, una caveola intacta, son indispensables para la correcta migración y tubulogénesis de las células endoteliales de la macrovasculatura y microvasculatura placentaria, así como de las células de EVT que se diferencian a un fenotipo endovascular.
- ✓ La migración celular y la tubulogénesis de las células de macrovasculatura EA.hy926 y microvasculatura hPMEC se altera en la condición de hiperosmolaridad subletal, sugiriendo que no solo una estructura caveolar intacta con una expresión de Cav-1 adecuada son necesarias en estos procesos, sino que los mismos requieren una apropiada expresión de AQPs.
- ✓ La hiperosmolaridad subletal puede producir la internalización de los dominios caveolares en las células EVT, lo que lleva a una disminución de la proteína Cav-1 por proteólisis lisosomal.

La hiperosmolaridad induciría alteraciones en la estructura de la caveola y en consecuencia diferentes proteínas que interaccionan con el dominio de andamiaje de la Cav-1, entre las que se encuentran las AQPs, presentarían afectada su función.

Una mejor comprensión de los procesos moleculares y las vías de señalización ubicadas en las caveolas que regulan la diferenciación del trofoblasto en la gestación temprana mejorará nuestro conocimiento del papel de esta plataforma en el desarrollo normal de la placenta.

## **PERSPECTIVAS**

---

El éxito del embarazo se asocia con una correcta placentación y formación de la vasculatura placentaria, esencial para el crecimiento y desarrollo fetal.

En este trabajo de tesis pudimos evidenciar la importancia de la interacción entre Cav-1 y las acuaporinas en la vasculatura placentaria para los procesos de angiogénesis, sin embargo, existe una expresión diferencial de estas proteínas en células de macrovasculatura y microvasculatura, por lo que será de interés profundizar el estudio de las funciones que estas proteínas cumplen en cada tipo celular.

Por otro lado, vimos que la hiperosmolaridad, condición que estaría presente en gestaciones patológicas, produce alteraciones en la expresión y función de estas proteínas en las células endoteliales de vasculatura placentaria. Sería relevante estudiar cómo se encuentran estas proteínas en la macrovasculatura y la microvasculatura placentaria. En este sentido, nos queda pendiente evaluar las vías de señalización involucradas en la regulación de expresión génica de la AQP1, AQP4 y Cav-1 en células de vasculatura placentaria en condición de hiperosmolaridad.

En este estudio, demostramos que la hiperosmolaridad subletal afecta la diferenciación y la funcionalidad de células de trofoblasto extraveloso (EVT), induciendo la internalización y posterior degradación lisosomal de Caveolina-1 (Cav-1), principal proteína estructural de las caveolas, microdominios especializados de membrana que cumple múltiples funciones celulares, entre ellas transporte vesicular, traducción de señales, migración celular. Las alteraciones en la diferenciación y funcionalidad de las células de trofoblasto conducen a insuficiencia placentaria tal y como se observa en preeclampsia. Por otro lado, se ha observado que el estrés hiperosmolar induce la senescencia prematura de las células [279]. En placentas preeclámpticas se ha evidenciado un aumento prematuro de la senescencia comprometiendo las funciones llevadas a cabo por células de trofoblasto [280].

En diferentes tipos celulares, una disminución en la expresión de Cav-1 induce senescencia [281, 282]. Nosotros evidenciamos que esta proteína se encuentra disminuida en el trofoblasto de placentas preeclápticas [237]. Otros autores también observaron esta disminución en preeclampsia y hallaron una correlación entre estos niveles alterados de Cav-1 y la inducción de la senescencia [283]. Será de particular interés estudiar si la hiperosmolaridad subletal induce la senescencia de las células de EVT y la participación de Cav-1 en este proceso.



## BIBLIOGRAFIA

---

1. Dey, S., et al., *Molecular cues to implantation*. Endocrine reviews, 2004. **25**(3): p. 341-373.
2. Wang, H. and S.K. Dey, *Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models*. Nature Reviews Genetics, 2006. **7**(3): p. 185-199.
3. Carson, D.D., et al., *Embryo implantation*. Developmental biology, 2000. **223**(2): p. 217-237.
4. Carter, A.M., A.C. Enders, and R. Pijnenborg, *The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2015. **370**(1663): p. 20140070.
5. Huppertz, B. and M. Borges, *Placenta trophoblast fusion*. Cell Fusion: Overviews and Methods, 2008: p. 135-147.
6. PSychoyos, A., *Endocrine control of egg implantation*. Handbook of physiology, 1973. **2**: p. 187-215.
7. Daikoku, T., et al., *Conditional deletion of Msx homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity*. Developmental cell, 2011. **21**(6): p. 1014-1025.
8. Nikas, G. and A. Psychoyos, *Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1997. **816**: p. 129-142.
9. Schlafke, S. and A.C. Enders, *Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation*. Biology of reproduction, 1975. **12**(1): p. 41-65.
10. Enders, A.C., *A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas*. American Journal of Anatomy, 1965. **116**(1): p. 29-67.
11. Okada, H., T. Tsuzuki, and H. Murata, *Decidualization of the human endometrium*. Reproductive medicine and biology, 2018. **17**(3): p. 220-227.
12. Pötgens, A., et al., *Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action*. Human reproduction update, 2004. **10**(6): p. 487-496.
13. Cartwright, J., et al., *Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model*. Placenta, 2002. **23**(2-3): p. 232-235.
14. Murtha, A.P. and R. Menon, *Regulation of fetal membrane inflammation: a critical step in reducing adverse pregnancy outcome*. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2015. **213**(4): p. 447-448.
15. Bischof, P. and I. Irminger-Finger, *The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2005. **37**(1): p. 1-16.
16. Pantham, P., K. Askelund, and L. Chamley, *Trophoblast deportation part II: a review of the maternal consequences of trophoblast deportation*. Placenta, 2011. **32**(10): p. 724-731.
17. Huppertz, B., et al., *Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta*. Histochemistry and cell biology, 1998. **110**(5): p. 495-508.
18. Pardi, G., A.M. Marconi, and I. Cetin, *Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review*. Placenta, 2002. **23**: p. S136-S141.
19. Huppertz, B., et al., *Oxygen as modulator of trophoblast invasion*. Journal of anatomy, 2009. **215**(1): p. 14-20.
20. Zhou, Y., et al., *Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?* The Journal of clinical investigation, 1997. **99**(9): p. 2139-2151.
21. Ashton, S.V., et al., *Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2005. **25**(1): p. 102-108.
22. Pijnenborg, R., L. Vercruysse, and M. Hanssens, *The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies*. Placenta, 2006. **27**(9-10): p. 939-958.
23. Burton, G.J., J. Hempstock, and E. Jauniaux, *Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies*. Reproductive biomedicine online, 2003. **6**(1): p. 84-96.
24. Jauniaux, E., B. Gulbis, and G.J. Burton, *Physiological implications of the materno-fetal oxygen gradient in human early pregnancy*. Reproductive biomedicine online, 2003. **7**(2): p. 250-253.

25. Konje, J.C., et al., *3-dimensional colour power angiography for staging human placental development*. The Lancet, 2003. **362**(9391): p. 1199-1201.
26. Redline, R.W., *Severe fetal placental vascular lesions in term infants with neurologic impairment*. American journal of obstetrics and gynecology, 2005. **192**(2): p. 452-457.
27. Wisner, K., *Gestational hypertension and preeclampsia*. MCN: The American Journal of Maternal/Child Nursing, 2019. **44**(3): p. 170.
28. Bell, E., *A bad combination*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(12): p. 927-927.
29. Chaddha, V., et al. *Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency*. in *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 2004. Elsevier.
30. Kingdom, J., et al., *Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2000. **92**(1): p. 35-43.
31. Jaffe, R., E. Jauniaux, and J. Hustin, *Maternal circulation in the first-trimester human placenta—myth or reality?* American journal of obstetrics and gynecology, 1997. **176**(3): p. 695-705.
32. Lyall, F., *Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy—a review*. Placenta, 2005. **26**: p. S31-S36.
33. Charnock-Jones, D., P. Kaufmann, and T. Mayhew, *Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation*. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 103-113.
34. Goldman-Wohl, D.S., et al., *Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal–maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling*. Molecular human reproduction, 2000. **6**(1): p. 81-87.
35. Kaufmann, P., T. Mayhew, and D. Charnock-Jones, *Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy*. Placenta, 2004. **25**(2-3): p. 114-126.
36. Aplin, J.D., et al., *Tracking placental development in health and disease*. Nature Reviews Endocrinology, 2020. **16**(9): p. 479-494.
37. Hobson, B. and J. Denekamp, *Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies*. British journal of cancer, 1984. **49**(4): p. 405-413.
38. Brosens, I., et al., *The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation*. American journal of obstetrics and gynecology, 2011. **204**(3): p. 193-201.
39. Mayhew, T.M., *Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells*. Placenta, 2002. **23**(10): p. 742-750.
40. Charnock-Jones, D.S., *Soluble flt-1 and the angiopoietins in the development and regulation of placental vasculature*. Journal of Anatomy, 2002. **200**(6): p. 607-615.
41. Beck Jr, L. and P.A. D'Amore, *Vascular development: cellular and molecular regulation*. The FASEB journal, 1997. **11**(5): p. 365-373.
42. Park, H.-J., et al., *Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and angiogenesis*. Stem cell reviews, 2006. **2**(2): p. 93-101.
43. Sobrevia, L., et al., *Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes*. Placenta, 2011. **32**: p. S159-S164.
44. Lang, I., et al., *Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity*. Cell proliferation, 2001. **34**(3): p. 143-155.
45. Lang, I., et al., *Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells*. European journal of cell biology, 2003. **82**(4): p. 163-173.
46. Huang, X., et al., *Diversity in human placental microvascular endothelial cells and macrovascular endothelial cells*. Cytokine, 2018. **111**: p. 287-294.
47. Murthi, P., et al., *Novel homeobox genes are differentially expressed in placental microvascular endothelial cells compared with macrovascular cells*. Placenta, 2008. **29**(7): p. 624-630.
48. Regnault, T., et al., *Placental development in normal and compromised pregnancies—a review*. Placenta, 2002. **23**: p. S119-S129.

49. Torry, D.S., M. Hinrichs, and R.J. Torry, *Determinants of placental vascularity*. American journal of reproductive immunology, 2004. **51**(4): p. 257-268.
50. Caniggia, I., et al., *Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF $\beta$  3*. The Journal of clinical investigation, 2000. **105**(5): p. 577-587.
51. Chen, C.P., et al., *Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia*. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2006. **113**(2): p. 152-158.
52. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, *Angiogenesis in the placenta*. Biology of reproduction, 2001. **64**(4): p. 1033-1040.
53. Ahmed, A., et al., *Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen—a review*. Placenta, 2000. **21**: p. S16-S24.
54. Mlynarczyk, M., et al., *The clinical significance of an estimated fetal weight below the 10th percentile: a comparison of outcomes of < 5th vs 5th–9th percentile*. American journal of obstetrics and gynecology, 2017. **217**(2): p. 198. e1-198. e11.
55. Woodring, T.C., et al., *Prediction of placenta accreta by ultrasonography and color Doppler imaging*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2011. **24**(1): p. 118-121.
56. Muraskas, J., et al., *The role of fetal inflammatory response syndrome and fetal anemia in nonpreventable term neonatal encephalopathy*. Journal of Perinatology, 2016. **36**(5): p. 362-365.
57. Magann, E.F., et al., *Use of antenatal corticosteroids in special circumstances: a comprehensive review*. Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica, 2017. **96**(4): p. 395-409.
58. Zeuthen, T., *Water-transporting proteins*. Journal of Membrane Biology, 2010. **234**: p. 57-73.
59. Tripathi, S. and E.L. Boulpaep, *Mechanisms of water transport by epithelial cells*. Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration, 1989. **74**(4): p. 385-417.
60. Zeuthen, T., *General models for water transport across leaky epithelia*. International review of cytology, 2002. **215**: p. 285-317.
61. O'Donnell, M. and S. Maddrell, *Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia*. Journal of Experimental Biology, 1983. **106**(1): p. 231-253.
62. Loo, D.D., et al., *Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(23): p. 13367-13370.
63. Nielsen, S., et al., *CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron*. The Journal of cell biology, 1993. **120**(2): p. 371-383.
64. Carbrej, J.M. and P. Agre, *Discovery of the aquaporins and development of the field*. Aquaporins, 2009: p. 3-28.
65. Fu, D., et al., *Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity*. science, 2000. **290**(5491): p. 481-486.
66. Jelen, S., et al., *Aquaporin-9 and urea transporter-A gene deletions affect urea transmembrane passage in murine hepatocytes*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2012. **303**(11): p. G1279-G1287.
67. Musa-Aziz, R., et al., *Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of Aqp1, Aqp4, Aqp5, Amtb, and Rhag*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(13): p. 5406-5411.
68. de Groot, B.L., A. Engel, and H. Grubmüller, *A refined structure of human aquaporin-1*. Febs Letters, 2001. **504**(3): p. 206-211.
69. Walz, T., et al., *The three-dimensional structure of aquaporin-1*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 624-627.
70. Agre, P., *The aquaporin water channels*. Proceedings of the American Thoracic Society, 2006. **3**(1): p. 5-13.
71. de Groot, B.L. and H. Grubmüller, *Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF*. Science, 2001. **294**(5550): p. 2353-2357.
72. Nesverova, V. and S. Törnroth-Horsefield, *Phosphorylation-dependent regulation of mammalian aquaporins*. Cells, 2019. **8**(2): p. 82.

73. Paganelli, C.V. and A. Solomon, *The rate of exchange of tritiated water across the human red cell membrane*. The Journal of general physiology, 1957. **41**(2): p. 259-277.
74. Denker, B.M., et al., *Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(30): p. 15634-15642.
75. Ribeiro, J.C., et al., *Aquaporins and (in) fertility: More than just water transport*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2021. **1867**(3): p. 166039.
76. Ishibashi, K., S. Hara, and S. Kondo, *Aquaporin water channels in mammals*. Clinical and experimental nephrology, 2009. **13**: p. 107-117.
77. Tsukaguchi, H., et al., *Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1999. **277**(5): p. F685-F696.
78. Sales, A., et al., *Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation*. Genet Mol Res, 2013. **12**(4): p. 6718-6732.
79. Magni, F., et al., *Proteomic knowledge of human aquaporins*. Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5637-5649.
80. Benga, G., *Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future*. IUBMB life, 2009. **61**(2): p. 112-133.
81. Benga, G., *On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives)*. Molecular aspects of medicine, 2012. **33**(5-6): p. 514-517.
82. Ishibashi, K., Y. Tanaka, and Y. Morishita, *The role of mammalian superaquaporins inside the cell*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1840**(5): p. 1507-1512.
83. Bienert, G.P., et al., *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(2): p. 1183-1192.
84. Hara-Chikuma, M., et al., *Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(10): p. 1743-1752.
85. Herrera, M., N.J. Hong, and J.L. Garvin, *Aquaporin-1 transports NO across cell membranes*. Hypertension, 2006. **48**(1): p. 157-164.
86. Geyer, R.R., et al., *Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of mammalian aquaporins 0–9*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2013. **304**(10): p. C985-C994.
87. Herrera, M. and J.L. Garvin, *Aquaporins as gas channels*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2011. **462**: p. 623-630.
88. Tesse, A., et al., *Aquaporins as targets of dietary bioactive phytochemicals*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2018. **5**: p. 30.
89. Salman, M.M., et al., *Recent breakthroughs and future directions in drugging aquaporins*. Trends in Pharmacological Sciences, 2022. **43**(1): p. 30-42.
90. Zeidel, M.L., et al., *Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin CHIP in proteoliposomes*. Biochemistry, 1994. **33**(6): p. 1606-1615.
91. Ishibashi, K., et al., *The evolutionary aspects of aquaporin family*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2011. **300**(3): p. R566-R576.
92. Verkman, A., *Aquaporin water channels and endothelial cell function*. Journal of anatomy, 2002. **200**(6): p. 617-627.
93. Day, R.E., et al., *Human aquaporins: regulators of transcellular water flow*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2014. **1840**(5): p. 1492-1506.
94. Ni, J., et al., *Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis*. Kidney international, 2006. **69**(9): p. 1518-1525.
95. Song, Y., et al., *Role of aquaporin water channels in pleural fluid dynamics*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2000. **279**(6): p. C1744-C1750.
96. Zhang, D., L. Vetrivel, and A. Verkman, *Aquaporin deletion in mice reduces intraocular pressure and aqueous fluid production*. The Journal of general physiology, 2002. **119**(6): p. 561-569.
97. Kuang, K., et al., *Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice*. Experimental eye research, 2004. **78**(4): p. 791-798.

98. Pérez-Pérez, A., et al., *Aquaporins and placenta*. Vitamins and Hormones, 2020. **112**: p. 311-326.
99. Damiano, A.E., *Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes*. Placenta, 2011. **32**: p. S207-S211.
100. Beall, M., et al., *Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition*. Placenta, 2007. **28**(5-6): p. 421-428.
101. Damiano, A.E., *Aquaporins during pregnancy*, in *Vitamins and Hormones*. 2020, Elsevier. p. 327-355.
102. Martínez, N. and A.E. Damiano, *Aquaporins in fetal development*. Aquaporins, 2017: p. 199-212.
103. Escobar, J., et al., *Expression of aquaporins early in human pregnancy*. Early human development, 2012. **88**(8): p. 589-594.
104. De Falco, M., et al., *Down-regulation of aquaporin 4 in human placenta throughout pregnancy*. In Vivo, 2007. **21**(5): p. 813-817.
105. Saadoun, S., et al., *Neuromyelitis optica IgG causes placental inflammation and fetal death*. The Journal of Immunology, 2013. **191**(6): p. 2999-3005.
106. Damiano, A., et al., *Water channel proteins AQP3 and AQP9 are present in syncytiotrophoblast of human term placenta*. Placenta, 2001. **22**(8-9): p. 776-781.
107. Wang, S., et al., *Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption*. American journal of obstetrics and gynecology, 2001. **185**(5): p. 1226-1231.
108. Prat, C., et al., *Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes*. Biology of reproduction, 2012. **86**(2): p. 48, 1-8.
109. Mann, S.E., et al., *Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes*. American journal of obstetrics and gynecology, 2002. **187**(4): p. 902-907.
110. Wang, S., et al., *Expression of aquaporin 9 in human chorioamniotic membranes and placenta*. American journal of obstetrics and gynecology, 2004. **191**(6): p. 2160-2167.
111. Preston, G.M. and P. Agre, *Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(24): p. 11110-11114.
112. Preston, G.M., et al., *Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein*. Science, 1992. **256**(5055): p. 385-387.
113. Nico, B. and D. Ribatti, *Aquaporins in tumor growth and angiogenesis*. Cancer letters, 2010. **294**(2): p. 135-138.
114. Bin, K. and Z. Shi-Peng, *Acetazolamide inhibits aquaporin-1 expression and colon cancer xenograft tumor growth*. Hepato-gastroenterology, 2011. **58**(110-111): p. 1502-1506.
115. Verkman, A., *Aquaporins in endothelia*. Kidney international, 2006. **69**(7): p. 1120-1123.
116. Stulc, J., *Placental transfer of inorganic ions and water*. Physiological reviews, 1997. **77**(3): p. 805-836.
117. Yang, B., T. Ma, and A. Verkman, *cDNA Cloning, Gene Organization, and Chromosomal Localization of a Human Mercurial Insensitive Water Channel: EVIDENCE FOR DISTINCT TRANSCRIPTIONAL UNITS (\*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(39): p. 22907-22913.
118. Verkman, A.S., *Aquaporins at a glance*. Journal of cell science, 2011. **124**(13): p. 2107-2112.
119. Papadopoulos, M., S. Saadoun, and A. Verkman, *Aquaporins and cell migration*. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology, 2008. **456**(4): p. 693-700.
120. Di Giusto, G., et al., *Aquaporin 2-increased renal cell proliferation is associated with cell volume regulation*. Journal of cellular biochemistry, 2012. **113**(12): p. 3721-3729.
121. Hara-Chikuma, M. and A. Verkman, *Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing*. Journal of Molecular Medicine, 2008. **86**(2): p. 221-231.
122. Jung, H.J., et al., *Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells*. PloS one, 2011. **6**(12): p. e28492.
123. Zhang, Z., et al., *Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer*. The Journal of pathology, 2010. **221**(2): p. 210-220.

124. Alejandra, R. and S. Natalia, *The blocking of aquaporin-3 (AQP3) impairs extravillous trophoblast cell migration*. Biochemical and biophysical research communications, 2018. **499**(2): p. 227-232.
125. Wagner, K., et al., *Signaling mechanisms and pharmacological modulators governing diverse aquaporin functions in human health and disease*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(3): p. 1388.
126. Palade, G. and R. Bruns, *Structural modulations of plasmalemmal vesicles*. The Journal of cell biology, 1968. **37**(3): p. 633-649.
127. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(3): p. 185-194.
128. Palade, G.E., *Fine structure of blood capillaries*. J Appl Physics, 1953. **24**: p. 1424-1448.
129. Yamada, E., *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. The Journal of biophysical and biochemical cytology, 1955. **1**(5): p. 445.
130. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nature reviews Molecular cell biology, 2000. **1**(1): p. 31-39.
131. Pelkmans, L., et al., *Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic*. Cell, 2004. **118**(6): p. 767-780.
132. Pelkmans, L. and M. Zerial, *Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae*. Nature, 2005. **436**(7047): p. 128-133.
133. Kirkham, M., et al., *Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis*. Journal of cell science, 2008. **121**(12): p. 2075-2086.
134. Hayer, A., et al., *Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes*. Traffic, 2010. **11**(3): p. 361-382.
135. Sargiacomo, M., et al., *Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(20): p. 9407-9411.
136. Root, K.T., J.A. Julien, and K.J. Glover, *Secondary structure of caveolins: a mini review*. Biochemical Society transactions, 2019. **47**(5): p. 1489-1498.
137. Porta, J.C., et al., *Molecular architecture of the human caveolin-1 complex*. Science Advances, 2022. **8**(19): p. eabn7232.
138. Parton, R.G., B. Joggerst, and K. Simons, *Regulated internalization of caveolae*. The Journal of cell biology, 1994. **127**(5): p. 1199-1215.
139. Fujimoto, T., et al., *Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure*. Journal of cell science, 2000. **113**(19): p. 3509-3517.
140. Williamson, J.R., *Adipose tissue: Morphological changes associated with lipid mobilization*. The Journal of Cell Biology, 1964. **20**(1): p. 57-74.
141. Scherer, P.E., et al., *Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2: caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(46): p. 29337-29346.
142. Kurzchalia, T.V., P. Dupree, and S. Monier, *VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae*. FEBS letters, 1994. **346**(1): p. 88-91.
143. Drab, M., et al., *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. science, 2001. **293**(5539): p. 2449-2452.
144. Fra, A.M., et al., *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(19): p. 8655-8659.
145. Razani, B. and M.P. Lisanti, *Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease*. The Journal of clinical investigation, 2001. **108**(11): p. 1553-1561.
146. Parton, R.G. and M.A. Del Pozo, *Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers*. Nature reviews Molecular cell biology, 2013. **14**(2): p. 98-112.
147. Kogo, H., T. Aiba, and T. Fujimoto, *Cell type-specific occurrence of caveolin-1 $\alpha$  and-1 $\beta$  in the lung caused by expression of distinct mRNAs*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(24): p. 25574-25581.
148. Kogo, H. and T. Fujimoto, *Caveolin-1 isoforms are encoded by distinct mRNAs: identification of mouse caveolin-1 mRNA variants caused by alternative transcription initiation and splicing*. FEBS letters, 2000. **465**(2-3): p. 119-123.

149. Mineo, C., et al., *Targeting of protein kinase C $\alpha$  to caveolae*. The Journal of cell biology, 1998. **141**(3): p. 601-610.
150. Li, S., R. Seitz, and M.P. Lisanti, *Phosphorylation of Caveolin by Src Tyrosine Kinases: THE  $\alpha$ -ISOFORM OF CAVEOLIN IS SELECTIVELY PHOSPHORYLATED BY v-Src IN VIVO (\*)*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(7): p. 3863-3868.
151. Volonté, D., et al., *Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr14) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase: evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(11): p. 8094-8103.
152. Bastiani, M., et al., *MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes*. Journal of Cell Biology, 2009. **185**(7): p. 1259-1273.
153. Monier, S., et al., *VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro*. Molecular biology of the cell, 1995. **6**(7): p. 911-927.
154. Pol, A., et al., *Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies*. Molecular biology of the cell, 2005. **16**(4): p. 2091-2105.
155. Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin Is Palmitoylated on Multiple Cysteine Residues: PALMITOYLATION IS NOT NECESSARY FOR LOCALIZATION OF CAVEOLIN TO CAVEOLAE (\*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(12): p. 6838-6842.
156. Parat, M.-O. and P.L. Fox, *Palmitoylation of caveolin-1 in endothelial cells is post-translational but irreversible*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(19): p. 15776-15782.
157. Sharma, D.K., et al., *Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol*. Molecular biology of the cell, 2004. **15**(7): p. 3114-3122.
158. Fujimoto, T., et al., *Crosslinked plasmalemmal cholesterol is sequestered to caveolae: analysis with a new cytochemical probe*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1997. **45**(9): p. 1197-1205.
159. Fujita, A., et al., *A distinct pool of phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(23): p. 9256-9261.
160. Örtengren, U., et al., *Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes*. European journal of biochemistry, 2004. **271**(10): p. 2028-2036.
161. Pitto, M., et al., *Use of a photoactivable GM1 ganglioside analogue to assess lipid distribution in caveolae bilayer*. Glycoconjugate journal, 2000. **17**: p. 215-222.
162. Richter, T., et al., *High-resolution 3D quantitative analysis of caveolar ultrastructure and caveola-cytoskeleton interactions*. Traffic, 2008. **9**(6): p. 893-909.
163. Hill, M.M., et al., *PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function*. Cell, 2008. **132**(1): p. 113-124.
164. Hayer, A., et al., *Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation*. The Journal of cell biology, 2010. **191**(3): p. 615-629.
165. Mayor, S. and R.E. Pagano, *Pathways of clathrin-independent endocytosis*. Nature reviews Molecular cell biology, 2007. **8**(8): p. 603-612.
166. Dulhunty, A.F. and C. Franzini-Armstrong, *The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths*. The Journal of physiology, 1975. **250**(3): p. 513-539.
167. Lee, J. and G.W. Schmid-Schönbein, *Biomechanics of skeletal muscle capillaries: hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation*. Annals of biomedical engineering, 1995. **23**: p. 226-246.
168. Zhang, B., et al., *Caveolin-1 phosphorylation is required for stretch-induced EGFR and Akt activation in mesangial cells*. Cellular signalling, 2007. **19**(8): p. 1690-1700.
169. del Pozo, M.A., et al., *Phospho-caveolin-1 mediates integrin-regulated membrane domain internalization*. Nature cell biology, 2005. **7**(9): p. 901-908.
170. Wickström, S.A., et al., *Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae*. Developmental cell, 2010. **19**(4): p. 574-588.

171. Goetz, J.G., et al., *Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis*. Cell, 2011. **146**(1): p. 148-163.
172. Borza, C.M., et al., *Integrin  $\alpha 161$  promotes caveolin-1 dephosphorylation by activating T cell protein-tyrosine phosphatase*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(51): p. 40114-40124.
173. Singh, R.D., et al., *Gangliosides and  $\beta 1$ -integrin are required for caveolae and membrane domains*. Traffic, 2010. **11**(3): p. 348-360.
174. Patel, H., F. Murray, and P. Insel, *G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains*. Protein-Protein Interactions as New Drug Targets, 2008: p. 167-184.
175. Okamoto, T., et al., *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(10): p. 5419-5422.
176. García-Cardena, G., et al., *Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin: Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(41): p. 25437-25440.
177. Bucci, M., et al., *In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation*. Nature medicine, 2000. **6**(12): p. 1362-1367.
178. Pilch, P.F., et al., *Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae*. Journal of lipid research, 2007. **48**(10): p. 2103-2111.
179. Shaul, P.W. and R.G. Anderson, *Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 1998. **275**(5): p. L843-L851.
180. Wary, K.K., et al., *A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth*. Cell, 1998. **94**(5): p. 625-634.
181. Isshiki, M., et al., *Sites of  $Ca^{2+}$  wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells*. Journal of Cell Science, 2002. **115**(3): p. 475-484.
182. Jablonski, E.M. and F.M. Hughes Jr, *The potential role of caveolin-1 in inhibition of aquaporins during the AVD*. Biology of the Cell, 2006. **98**(1): p. 33-42.
183. Katsuno-Kambe, H., et al., *Caveolin-1 influences epithelial collective cell migration via FMNL2 formin*. Biology of the Cell, 2021. **113**(2): p. 107-117.
184. Goedicke-Fritz, S., et al., *Evidence for functional and dynamic microcompartmentation of Cav-1/TRPV4/KCa in caveolae of endothelial cells*. European journal of cell biology, 2015. **94**(7-9): p. 391-400.
185. Navarro, A., B. Anand-Apte, and M.-O. Parat, *A role for caveolae in cell migration*. The FASEB Journal, 2004. **18**(15): p. 1801-1811.
186. Redman, C.W., A.C. Staff, and J.M. Roberts, *Syncytiotrophoblast stress in preeclampsia: the convergence point for multiple pathways*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2021.
187. Constância, M., et al., *Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(52): p. 19219-19224.
188. Belkacemi, L., et al., *Maternal undernutrition influences placental-fetal development*. Biology of reproduction, 2010. **83**(3): p. 325-331.
189. Desforges, M., et al., *The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. **398**(1): p. 130-134.
190. Gaccioli, F. and S. Lager, *Placental nutrient transport and intrauterine growth restriction*. Frontiers in physiology, 2016. **7**: p. 40.
191. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction*. American journal of obstetrics and gynecology, 2018. **218**(2): p. S745-S761.
192. Liu, J., et al., *Hyperosmolar stress induces global mRNA responses in placental trophoblast stem cells that emulate early post-implantation differentiation*. Placenta, 2009. **30**(1): p. 66-73.
193. Pribenszky, C., et al., *Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology*. Biology of reproduction, 2010. **83**(5): p. 690-697.



194. Zhong, W., et al., *Use of hyperosmolar stress to measure stress-activated protein kinase activation and function in human HTR cells and mouse trophoblast stem cells*. Reproductive Sciences, 2007. **14**(6): p. 534-547.
195. Reppetti, J., et al., *Osmotic stress induces apoptosis in extravillous trophoblast cells. Role of TRPV-1*. Biochemical and biophysical research communications, 2019. **514**(1): p. 58-63.
196. Hytten, F. and I. Leitch, *The volume and composition of the blood*, in *The physiology of human pregnancy*. 1971, Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 1-55.
197. Huisman, A. and J.G. Aarnoudse, *Increased 2nd trimester hemoglobin concentration in pregnancies later complicated by hypertension and growth retardation: early evidence of a reduced plasma volume*. Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica, 1986. **65**(6): p. 605-608.
198. Mello, G., et al., *Individual longitudinal patterns in biochemical and hematological markers for the early prediction of pre-eclampsia*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2002. **11**(2): p. 93-99.
199. Soffronoff, E.C., B.M. Kaufmann, and J.F. Connaughton, *Intravascular volume determinations and fetal outcome in hypertensive diseases of pregnancy*. American journal of obstetrics and gynecology, 1977. **127**(1): p. 4-9.
200. Goodlin, R., M. Quaife, and J. Dirksen, *The significance, diagnosis, and treatment of maternal hypovolemia as associated with fetal/maternal illness*. Obstetrical & Gynecological Survey, 1981. **36**(10): p. 541-542.
201. Banerjee, A., et al., *Hyperosmolarity attenuates TNF $\alpha$ -mediated pro-inflammatory activation of human pulmonary microvascular endothelial cells*. Shock (Augusta, Ga.), 2013. **39**(4): p. 366.
202. Hess, D.C., et al., *Hypertonic mannitol loading of NF- $\kappa$ B transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1*. Stroke, 2000. **31**(5): p. 1179-1186.
203. Edgell, C.-J., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983. **80**(12): p. 3734-3737.
204. Straszewski-Chavez, S.L., et al., *The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71*. Placenta, 2009. **30**(11): p. 939-948.
205. Smith, B.L. and P. Agre, *Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(10): p. 6407-6415.
206. Brooks, H.L., J.W. Regan, and A.J. Yool, *Inhibition of aquaporin-1 water permeability by tetraethylammonium: involvement of the loop E pore region*. Molecular pharmacology, 2000. **57**(5): p. 1021-1026.
207. Christian, A., et al., *Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content*. Journal of lipid research, 1997. **38**(11): p. 2264-2272.
208. Owen, D.M., *Methods in membrane lipids*. Vol. 1232. 2015: Springer.
209. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
210. Grada, A., et al., *Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay*. Journal of Investigative Dermatology, 2017. **137**(2): p. e11-e16.
211. Smith, N.R., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Receptors VEGFR-2 and VEGFR-3 Are Localized Primarily to the Vasculature in Human Primary Solid Cancers VEGFR-2 and VEGFR-3 Status of Human Solid Tumors*. Clinical Cancer Research, 2010. **16**(14): p. 3548-3561.
212. Detmers, F.J., et al., *Quaternary ammonium compounds as water channel blockers: specificity, potency, and site of action*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(20): p. 14207-14214.
213. Hasegawa, H., et al., *Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(8): p. 5497-5500.
214. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-655.
215. Mahammad, S. and I. Parmryd, *Cholesterol depletion using methyl- $\beta$ -cyclodextrin*. Methods in membrane lipids, 2015: p. 91-102.

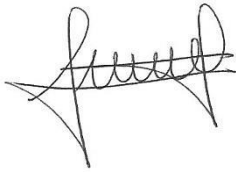
216. E. Davies, J., et al., *Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation*. Cell adhesion & migration, 2016. **10**(3): p. 310-321.
217. Ferrara, N., *Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001. **280**(6): p. C1358-C1366.
218. Flamme, I., G. Breier, and W. Risau, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo*. Developmental biology, 1995. **169**(2): p. 699-712.
219. Dye, J.F., et al., *Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells*. The FASEB Journal, 2004. **18**(1): p. 125-127.
220. Wang, X., N. Athayde, and B. Trudinger, *Microvascular endothelial cell activation is present in the umbilical placental microcirculation in fetal placental vascular disease*. American journal of obstetrics and gynecology, 2004. **190**(3): p. 596-601.
221. Murthi, P., M. Abumaree, and B. Kalionis, *Analysis of homeobox gene action may reveal novel angiogenic pathways in normal placental vasculature and in clinical pregnancy disorders associated with abnormal placental angiogenesis*. Frontiers in pharmacology, 2014. **5**: p. 133.
222. Chen, Z., et al., *In vitro angiogenesis by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced by three-dimensional co-culture with glioblastoma cells*. Journal of neuro-oncology, 2009. **92**: p. 121-128.
223. Cao, Y., et al., *The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review*. Journal of Applied Toxicology, 2017. **37**(12): p. 1359-1369.
224. Medina, Y., et al., *Lactic acid transport mediated by aquaporin-9: Implications on the pathophysiology of preeclampsia*. Frontiers in Physiology, 2021. **12**: p. 774095.
225. Szpilbarg, N., et al., *New insights into the role of placental aquaporins and the pathogenesis of preeclampsia*. Frontiers in Physiology, 2018. **9**: p. 1507.
226. Szpilbarg, N., et al., *Oxygen regulation of aquaporin-4 in human placenta*. Reproductive Biomedicine Online, 2018. **37**(5): p. 601-612.
227. Wang, W., et al., *Mifepristone increases AQP1 mRNA expression, angiogenesis, and cell permeability through the ERK MAPK pathway*. Molecular Biology Reports, 2023. **50**(2): p. 1069-1077.
228. Saadoun, S., et al., *Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption*. Nature, 2005. **434**(7034): p. 786-792.
229. Da Silva, I.V., et al., *Endothelial aquaporins and hypomethylation: Potential implications for atherosclerosis and cardiovascular disease*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(1): p. 130.
230. Leitão, R.A., et al., *Aquaporin-4 as a new target against methamphetamine-induced brain alterations: focus on the neuroglivascular unit and motivational behavior*. Molecular neurobiology, 2018. **55**: p. 2056-2069.
231. Liu, J., M. Miao, and F. Wei, *Angelicin Alleviates Maternal Isoflurane Exposure-Induced Offspring Cognitive Defects Through the Carbonic Anhydrase 4/Aquaporin-4 Pathway*. Molecular Biotechnology, 2023: p. 1-10.
232. Schnitzer, J.E., et al., *Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules*. The Journal of cell biology, 1994. **127**(5): p. 1217-1232.
233. Couet, J., et al., *Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities*. Trends in cardiovascular medicine, 1997. **7**(4): p. 103-110.
234. Fridolfsson, H.N., et al., *Regulation of intracellular signaling and function by caveolin*. The FASEB Journal, 2014. **28**(9): p. 3823-3831.
235. Kawauchi, S., et al., *A novel in vitro co-culture model to examine contact formation between astrocytic processes and cerebral vessels*. Experimental Cell Research, 2019. **374**(2): p. 333-341.
236. Zhu, X., et al., *Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios*. Placenta, 2009. **30**(8): p. 670-676.

237. Levi, L., et al., *The unfavorable lipid environment reduced caveolin-1 expression in apical membranes from human preeclamptic placentas*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(9): p. 2171-80.
238. Chen, C.-Y., et al., *Inhaled gold nanoparticles cause cerebral edema and upregulate endothelial aquaporin 1 expression, involving caveolin 1 dependent repression of extracellular regulated protein kinase activity*. Particle and Fibre Toxicology, 2019. **16**(1): p. 1-14.
239. Filchenko, I., et al., *Caveolin-1 regulates perivascular aquaporin-4 expression after cerebral ischemia*. Frontiers in cell and developmental biology, 2020. **8**: p. 371.
240. Lisanti, M.P., et al., *Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis*. Trends in cell biology, 1994. **4**(7): p. 231-235.
241. Pedersen, S.F., E.K. Hoffmann, and I. Novak, *Cell volume regulation in epithelial physiology and cancer*. Frontiers in physiology, 2013. **4**: p. 233.
242. Song, M. and S.P. Yu, *Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke*. Translational stroke research, 2014. **5**(1): p. 17-27.
243. Vicente-Manzanares, M., D.J. Webb, and A.R. Horwitz, *Cell migration at a glance*. Journal of cell science, 2005. **118**(21): p. 4917-4919.
244. Savage, D.F. and R.M. Stroud, *Structural basis of aquaporin inhibition by mercury*. Journal of molecular biology, 2007. **368**(3): p. 607-617.
245. Iruela-Arispe, M.L. and G.J. Beitel, *Tubulogenesis*. Development, 2013. **140**(14): p. 2851-2855.
246. Woodman, S.E., et al., *Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli*. The American journal of pathology, 2003. **162**(6): p. 2059-2068.
247. Manyonda, I., G.S.J. Whitley, and J. Cartwright, *Trophoblast Cell Lines: a response to the Workshop Report by King et al*. Placenta, 2001. **2**(22): p. 262-263.
248. Dokras, A., et al., *Regulation of human cytotrophoblast morphogenesis by hepatocyte growth factor/scatter factor*. Biology of reproduction, 2001. **65**(4): p. 1278-1288.
249. Highet, A., et al., *Use of Matrigel in culture affects cell phenotype and gene expression in the first trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo*. Placenta, 2012. **33**(7): p. 586-588.
250. Highet, A.R., et al., *First trimester trophoblasts forming endothelial-like tubes in vitro emulate a 'blood vessel development' gene expression profile*. Gene expression patterns, 2016. **21**(2): p. 103-110.
251. Damsky, C.H., et al., *Integrin switching regulates normal trophoblast invasion*. Development, 1994. **120**(12): p. 3657-3666.
252. Chen, F.W., C. Li, and Y.A. Ioannou, *Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e15054.
253. Gioia, M., et al., *Membrane cholesterol modulates LOX-1 shedding in endothelial cells*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141270.
254. Février, B. and G. Raposo, *Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages*. Current opinion in cell biology, 2004. **16**(4): p. 415-421.
255. Mathivanan, S., H. Ji, and R.J. Simpson, *Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication*. Journal of proteomics, 2010. **73**(10): p. 1907-1920.
256. Théry, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. Nature reviews immunology, 2002. **2**(8): p. 569-579.
257. Snuggs, J., et al., *TonEBP regulates the hyperosmotic expression of aquaporin 1 and 5 in the intervertebral disc*. Scientific Reports, 2021. **11**(1): p. 1-12.
258. Hasler, U., *Interplay between TonEBP and calcineurin-NFATc signaling pathways: a means of optimizing water reabsorption? Focus on "Calcineurin-NFATc signaling pathway regulates AQP2 expression in response to calcium signals and osmotic stress"*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007. **292**(5): p. C1581-C1582.
259. Shin, J.-A., et al., *TonEBP and SMIT expression in human placenta*. Anatomy & Cell Biology, 2012. **45**(3): p. 155-159.
260. Arroyo, J.A., et al., *Determination of the NFAT5/TonEBP transcription factor in the human and ovine placenta*. Systems biology in reproductive medicine, 2009. **55**(4): p. 164-170.
261. Li, H., et al., *Identification of early responsive genes in human amnion epithelial FL cells induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine using oligonucleotide microarray and quantitative*

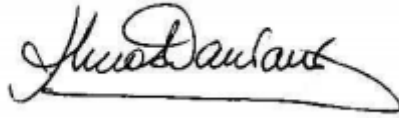
- real-time RT-PCR approaches*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2008. **644**(1-2): p. 1-10.
262. Lee, G., et al., *Increased trophoblast expression of NFAT5/TonEBP in pre-eclamptic placentas and hyperosmolar-treated BeWo cells*. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2014. **183**: p. 37-43.
  263. Ding, H., et al., *Correlation of amniotic fluid index and placental aquaporin 1 levels in terms of preeclampsia*. Placenta, 2022. **117**: p. 169-178.
  264. Rutkovskiy, A., et al., *Transient hyperosmolality modulates expression of cardiac aquaporins*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. **425**(1): p. 70-75.
  265. Yang, L. and S. Scarlata, *Super-resolution visualization of caveola deformation in response to osmotic stress*. Journal of Biological Chemistry, 2017. **292**(9): p. 3779-3788.
  266. Guo, Y., et al., *Osmotic stress reduces Ca<sup>2+</sup> signals through deformation of caveolae*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(27): p. 16698-16707.
  267. Kang, Y.-S., Y.-G. Ko, and J.-S. Seo, *Caveolin internalization by heat shock or hyperosmotic shock*. Experimental cell research, 2000. **255**(2): p. 221-228.
  268. Page, E., et al., *Water channel proteins in rat cardiac myocyte caveolae: osmolarity-dependent reversible internalization*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1998. **274**(6): p. H1988-H2000.
  269. Tagawa, A., et al., *Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters*. The Journal of cell biology, 2005. **170**(5): p. 769-779.
  270. Thomsen, P., et al., *Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(1): p. 238-250.
  271. Vassilieva, E.V., A.I. Ivanov, and A. Nusrat, *Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **379**(2): p. 460-465.
  272. Netti, V.A., et al., *Dehydration affects cardiovascular nitric oxide synthases and caveolins in growing rats*. European journal of nutrition, 2016. **55**: p. 33-43.
  273. Wang, B., et al., *Induction of DDIT4 impairs autophagy through oxidative stress in dry eye*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2019. **60**(8): p. 2836-2847.
  274. Miermont, A., et al., *Quantitative screening of the effects of hyper-osmotic stress on cancer cells cultured in 2-or 3-dimensional settings*. Scientific reports, 2019. **9**(1): p. 1-10.
  275. Palacio-Mancheno, P.E., et al., *Hyperosmolarity induces notochordal cell differentiation with aquaporin3 upregulation and reduced N-cadherin expression*. Journal of Orthopaedic Research®, 2018. **36**(2): p. 788-798.
  276. Zhang, Y., et al., *Osmolarity controls the differentiation of adipose-derived stem cells into nucleus pulposus cells via histone demethylase KDM4B*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2020. **472**: p. 157-171.
  277. Bertram, K.L. and R.J. Krawetz, *Osmolarity regulates chondrogenic differentiation potential of synovial fluid derived mesenchymal progenitor cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2012. **422**(3): p. 455-461.
  278. Liu, H., et al., *The defect of both angiogenesis and lymphangiogenesis is involved in preeclampsia*. Placenta, 2015. **36**(3): p. 279-286.
  279. Xu, J., et al., *Hyper-osmolarity environment-induced oxidative stress injury promotes nucleus pulposus cell senescence in vitro*. Bioscience Reports, 2019. **39**(9).
  280. Farfán-Labonne, B., et al., *Cellular senescence in normal and adverse pregnancy*. Reproductive Biology, 2023. **23**(1): p. 100734.
  281. Yu, D.M., et al., *Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction*. Aging cell, 2017. **16**(4): p. 773-784.
  282. Mercier, I., et al., *Human breast cancer-associated fibroblasts (CAFs) show caveolin-1 down-regulation and RB tumor suppressor functional inactivation: implications for the response to hormonal therapy*. Cancer biology & therapy, 2008. **7**(8): p. 1212-1225.
  283. Lee, S., et al., *Decreased expression of caveolin-1 have relevance to promoted senescence in preeclamptic placenta*. Pregnancy Hypertension, 2022. **30**: p. 59-67.

*La presente tesis titulada “Formación de la vasculatura placentaria y su desregulación frente a un estrés osmótico. Participación de la acuaporina-1 y la acuaporina-4, y su interacción con caveolina-1” fue realizada por la estudiante de doctorado Julieta Reppetti en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, de acuerdo con la reglamentación pertinente.*

*Dicho trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Alicia E. Damiano y Dra. Nora A. Martínez.*



**Lic. Julieta Reppetti**  
Tesisista



**Dra. Alicia E. Damiano**  
Directora de tesis



**Dra. Nora A. Martínez**  
Directora adjunta