



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
Cátedra de Inmunología – Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral
(IDEHU-CONICET)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

PARTICIPACIÓN DEL ACIDO HIALURÓNICO
EN ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

Bioq. Marilina Mascaró

Director: Dra. Silvia E. Hajos

2015

Coloco este manuscrito sobre su escritorio,
y puedo sentir e imaginar su orgullo y su emoción.

A la estrella que me guía y me cuida,
a mi abuelo Jaime.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Que difícil intentar resumir todas las gracias de todos estos años. De golpe vienen muchísimos recuerdos a mi mente. Todos me hicieron crecer por sobre todo en lo personal.

A la Dra Hajos. Silvia, gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Por darme la libertad para elegir, ir y venir, y buscar lo que me interesaba y necesitaba. Gracias también por todos los consejos y las sugerencias.

A la Dra Alvarez. Gracias Eli por tus consejos y sugerencias. Por esa templanza que transmitís cuando las cosas se ponían difíciles a veces. Por el apoyo para poder asistir al congreso en Chicago que tanto anhelaba.

A la Dra Bianconi. Maria Inés, gracias por trasmitirme con tanta pasión tus conocimientos sobre ETG y por dejarme aprender un poco. Gracias también al Dr Jankilevich y a la Dra Otero.

A Néstor Lago y Dra Zotta. Gracias por dejarme aprender un poco sobre patología. Por esa paciencia cuando me veían llegar con mi cajita llena de vidrios y sentarse conmigo al microscopio.

A Mati, mi amigo “el artista” y uno de los artesanos del LIT. Gracias por confiar en mí y dejarme aprender una y otra vez. ¡Gracias por tanta diversión para trabajar seriamente!

A mis compañeros del LIT. A los de ahora y a los que pasaron: Silvi, Mati, Mariángeles, Rosalía, Carlos, Dani P, Tomás, Dani U, Susana, Josefina, Tania, Glenda, Cintia. Gracias por aconsejarme en mis comienzos, por enseñarme un poco de mesada y permitirme tener mi lugarcito en el laboratorio. He aprendido mucho de cada uno.

A Pablito (Good Morning!), Juli (Hallo!!), Marcos (Hello!), Sofi (Eh vo!), Sole (mi gurú de la PCR), Lucho y Nati (mis gurús de las bacterias y los plásmidos), Andre, Chechi, Eli, Belu A, Belu S, Pri, Guido, Ceci V, Adri, Ailu. ¡Que sería de mí sin ustedes! Gracias por su amistad y franqueza. Gracias por acobijarme en “nuestros” laboratorios y por estar siempre que los necesité.

A los becarios de mis comienzos: Meli, Vir, Romi, Cora, Andre B, Marina, Santi. Gracias por dejarme ser parte de esos buenos momentos.

Gracias Marian por cederme un poco de tu tiempo para leer parte de esta tesis con compromiso. Gracias por tus críticas y sugerencias. Gracias por tus consejos en la mesada.

A Fla, gracias por tu amistad. Gracias por todas las charlas, los consejos y por hacerme el aguante con el microscopio tantas veces. Y también a Adriana y Martita.

A Ale Reca, ¡gracias por salvarme las horas con el T-scratch!

A Fede, Ali y Abril. Que siempre me recibieron bien en su laboratorio, me enseñaron y me ayudaron cuando lo necesité.

A Marisa F y Emilio por todos sus consejos para mi primer viaje al exterior.

Gracias a todos y cada uno de los integrantes del IDEHU. Siempre recuerdo cuando entré por primera vez y al instante me sentí cómoda. Gracias por que a su tiempo y a su modo, cada uno me ayudó para que hoy haya llegado hasta acá.

A Pradeep, que me ayudó muchísimo durante mi estadía en Baltimore y aún hoy siempre está.

A mis amigos de “fuego loco”, mi familia del Jueves Gourmet: Diego, Lau, Mau, Seba, Clari, Juli, Vir, Euge, Martin, Checho, Pablo, Pascual. Gracias por tanta tanta tanta amistad sana y risas de... nada!!!

A mis amigas “de la uni”: Nati y Dani. ¡Gracias por estar siempre!

A Tito y Agustín, que siempre me alientan.

Una vez leí que los mejores regalos que se le pueden ofrecer a los hijos son RAÍCES para crecer y ALAS para volar. Papá, Mamá. ¡Gracias! ¡Una y otra vez!

A Eva y Juan, mis mejores hermanos del mundo, de quienes aprendo siempre y a quienes adoro. Y a Sergio, mi cuñado. Y a Chiqui, mi cuña. Gracias por todas las veces que con la palabra justa me ayudan a esclarecer mis dudas y seguir adelante.

Gracias tía Lore por hacerme un lugarcito en tu casa y compartirla conmigo durante mi primer tiempo en BA.

Gracias a toda mi familia, que siempre está.

Al Dr Shih (Johns Hopkins University, MD, EEUU) por permitirme realizar la pasantía en su laboratorio. A Elisabetta y Bin por dedicarme un poco de su tiempo en la mesada. A la UICC, que me otorgó la beca con la que pude realizar esa experiencia tan valiosa para mí.

A CONICET que me otorgó las becas para poder empezar con este trabajo de tesis. A la UBA que me permitió desarrollarla en sus instalaciones.

¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!

RESUMEN

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) comprende un grupo heterogéneo de entidades interrelacionadas y asociadas al trofoblasto con características clínicas, morfológicas y patogenia específicas. Algunas de ellas representan lesiones benignas, como mola hidatiforme completa (MHC); mientras que otras son neoplasias como coriocarcinoma (CC) y tumor trofoblástico de sitio placentario (TTSP). Es interesante destacar que todas las variantes de ETG difieren genéticamente de la madre y por lo tanto constituyen un aloinjerto. El ácido hialurónico (AH) es el principal glicosaminoglicano lineal presente en la matriz extracelular. Está compuesto por unidades disacarídicas de ácido-D-glucurónico y N-acetilglucosamina. Los principales receptores con los cuáles interactúa y modula procesos biológicos en neoplasias son CD44 y RHAMM. Dichos procesos son proliferación, diferenciación, adhesión, migración, invasión, resistencia a multidroga, senescencia. Ha sido ampliamente estudiada la participación del AH en la progresión de varios tumores sólidos y en nuestro laboratorio en particular, en enfermedades oncohematológicas. Sin embargo, su participación en neoplasias asociadas a trastornos gestacionales es prácticamente desconocida. El objetivo general de este trabajo de Tesis fue dilucidar la implicancia del AH en el proceso fisiopatológico de ETG.

En este trabajo de Tesis se demostró que existe una expresión diferencial de AH y sus receptores, CD44 y RHAMM, en las poblaciones trofoblásticas de MHC, CC y TTSP así como también en placenta de primer trimestre empleando muestras de tejidos. Los resultados demostrados en el Primer Capítulo sugieren que el AH, CD44 y RHAMM participan tanto del proceso fisiológico de implantación y placentación así como del proceso fisiopatológico asociado a cada una de las entidades de ETG estudiadas.

Para dilucidar esto último en el Segundo Capítulo se caracterizaron tres líneas celulares de CC humano ya que hasta el momento no existen modelos disponibles para el estudio de MHC y TTSP. En concordancia con los resultados hallados en muestras de pacientes con CC, donde demostramos expresión de AH en el estroma tumoral y expresión de RHAMM en la superficie de las células tumorales, encontramos que la línea celular JEG-3 constituiría el mejor modelo para estudiar la implicancia de AH en esta entidad. Esta línea expresa RHAMM en su superficie celular, no expresa CD44 y no secreta AH al medio extracelular. Posteriormente, en el Tercer Capítulo de este trabajo evaluamos el efecto del AH de diverso peso molecular en los procesos de migración, proliferación y diferenciación de células JEG-3 y los mecanismos subyacentes.

Demostramos que el AH-BPM, pero no el AH-APM, es capaz de inducir migración celular sin afectar la proliferación. También, que tanto AH-BPM como AH-APM inducen una modulación de algunos marcadores trofoblásticos del linaje extraveloso (con capacidad de

invasión celular): aumento en la expresión de HLA-G, disminución de hCG y de sincitina-2. Estos resultados sugieren que en un entorno donde co-existen fragmentos de AH de diverso peso molecular ambos tipos de AH podrían actuar de modo concertado favoreciendo la diferenciación hacia un fenotipo extravelloso y la migración de las células JEG-3 hacia AH-BPM.

Del estudio de los mecanismos moleculares que subyacen al efecto del AH-BPM sobre la migración celular demostramos que este efecto depende del nivel endógeno de hCG en el medio extracelular ya que la capacidad de migración disminuye cuando se bloquea hCG. También demostramos que el AH-BPM induce la fosforilación de ERK. Esta activación es modulada de modo temporal por las quinasas MEK y PI3K indicando que existe un *crosstalk* entre ambas vías. Sin embargo, la migración frente a AH-BPM depende de la quinasa PI3K pero no de MEK. Finalmente, también demostramos que la migración en estas condiciones depende de la interacción con el receptor RHAMM.

En resumen, demostramos que la línea celular de coriocarcinoma humano JEG-3 es un modelo adecuado para estudiar el efecto del AH sobre la biología de estas células. En este modelo, demostramos que el AH-APM y –BPM inducen la diferenciación bioquímica de las células JEG-3 hacia un fenotipo extravelloso. Sin embargo, el AH-BPM, pero no el AH-APM, es capaz de inducir migración celular sin afectar la proliferación y que dicho efecto depende del nivel de hCG endógena. Asimismo, este efecto del AH sobre la migración de las células JEG-3 involucra un aumento en la fosforilación de ERK el cual depende de la participación de la quinasa PI3K y es mediado por el receptor RHAMM.

Esta Tesis representa un importante aporte al campo de las ciencias del AH ya que su participación en procesos neoplásicos asociados a la gestación ha sido poco estudiada. La importancia del conocimiento del diálogo entre el estroma y este tumor radica en la posibilidad de generar nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad en aquellos casos donde fracase la quimioterapia convencional y se presente recidiva y quimioresistencia.

Parte del trabajo realizado durante esta tesis doctoral ha sido publicado en revistas internacionales con referato y/o ha sido presentado a congresos relacionados:

“Differential expression of receptor hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in trophoblast subpopulations”

Mascaró M, Zotta E, Lago N, Bianconi MI, Lompardía S, Alvarez E, Hajos SE.
Short Communication. Enviado a Placenta.

“Hyaluronan induces JEG-3 choriocarcinoma cell migration through receptor-hyaluronan mediated motility (RHAMM) and PI3K and MAPK signaling pathways”

Mascaró M, Pibuel M, Díaz M, Lompardía S, Alvarez E, Hajos S.
VI SLIMP - V LASRI. Abril 2015. Resumen en Placenta 36 (2015) 469-521

“Expression pattern of hyaluronan and its receptors, CD44 and RHAMM, in gestational trophoblastic disease (GTD)”.

Mascaró M, Zotta E, Bianconi MI, Otero S, Lago N, Lompardía S, Alvarez E, Jankilevich G, Hajos SE.

ISSTD World Congress XVII. Chicago, USA. Del 20 al 23 de septiembre de 2013.
Resumen en Libro de Resúmenes, p92.

“Human cell line JEG-3 as a model to study the involvement of Hyaluronan-RHAMM interaction in pathophysiology of choriocarcinoma”.

Mascaró M, Lompardía S, Bianconi MI, Lago N, Otero S, Jankilevich G, Alvarez E, Zotta E, Hajos SE.

Hyaluronan 2013 Conference. Oklahoma City, USA. Del 2 al 7 de junio de 2013.
Resumen en Libro de Resúmenes, p61.

“Expresión de CD44 y RHAMM en pacientes con Enfermedad Trofoblástica Gestacional (ETG)”.

Mascaró M, Zotta E, Bianconi MI, Lago N, Lompardía S, Otero S, Alvarez E, Jankilevich G, Hajos SE.

LVII Reunión Científica Anual de SAIC.
Mar del Plata, Argentina. Del 14 al 17 de noviembre de 2012.
Abstract en Medicina, Vol 72 (Supl II) p228, 2012.

“Evaluación de ácido hialurónico (AH) en pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional (ETG)”.

Mascaró M, Ernst G, Lago N, Modenutti C, Lompardía S, Otero S, Alvarez E, Bianconi MI, Hajos SE.

LVI Reunión Científica Anual de SAIC.
Mar del Plata, Argentina. Del 16 al 19 de noviembre 2011.
Abstract en Medicina, Vol 71 (Supl III) p272, 2011.

INDICE

Abreviaturas.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
¿Qué es la Enfermedad Trofoblástica Gestacional?.....	2
Epidemiología.....	3
Resumen del proceso de fecundación, placentación e implantación normal.....	4
Aspectos generales de la diferenciación del trofoblasto.....	6
Mola hidatiforme.....	8
Histología.....	9
P57kip2.....	10
Manejo terapéutico.....	12
Cáncer.....	13
Neoplasia trofoblástica gestacional.....	14
Coriocarcinoma.....	16
Tumor trofoblástico de sitio placentario.....	17
Histología.....	18
Manejo terapéutico.....	20
Marcadores trofoblásticos.....	22
Gonadotropina coriónica humana.....	22
Implicancia en la biología de las células trofoblásticas.....	22
Utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con ETG.....	23
HLA-G.....	23
Sincitina-2.....	25
Microambiente tumoral.....	26
Acido hialurónico: estructura simple, función compleja.....	26
Metabolismo del ácido hialurónico.....	27
Biosíntesis mediada por HAS.....	27
Catabolismo del AH.....	29

Hialadherinas.....	30
CD44.....	30
RHAMM.....	32
Vías de señalización.....	34
Ras-ERK.....	34
PI3K/Akt.....	34
Papel del AH en la migración celular. Mecanismos de acción.	36
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
MATERIALES Y METODOS.....	40
Material clínico.	41
Inmunohistoquímica para p57kip2.....	41
Histoquímica para AH.....	41
Inmunohistoquímica para CD44 y RHAMM.	42
Líneas celulares. Condiciones de cultivo.	42
Reconstitución de las drogas	43
Preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico (oAH)	43
Cuantificación de AH mediante ensayo tipo ELISA	43
Análisis cualitativo de la expresión de ARNm de HAS y Hyals por RT-PCR.....	44
Extracción de ARN.....	44
RT-PCR.....	44
Análisis de expresión proteica.....	45
Inmunofluorescencia indirecta.....	45
Preparación de los extractos celulares	45
Electroforesis en geles de poliacrilamida y western blot.	46
Análisis de la migración celular.	47
Wound assay.	47
Cámara transwell.	47
Proliferación celular.	48
Cuantificación de hCG total	48
Análisis estadístico.	49

RESULTADOS.....	50
------------------------	-----------

Capítulo I

Expresión de ácido hialurónico, CD44 y RHAMM, en muestras de pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional.	51
Expresión de p57kip2.....	51
Expresión y localización de AH	53
Expresión y localización de CD44.....	55
Expresión y localización de RHAMM.....	57
Conclusiones parciales.....	60

Capítulo II

Estudio del AH, su metabolismo y receptores en líneas celulares de coriocarcinoma humano.	61
Evaluación de la síntesis de AH <i>in vitro</i>	61
Análisis de la secreción de AH.....	61
Evaluación de la expresión de ARNm de HAS y Hyals.....	62
Evaluación de la expresión de receptores de AH.....	63
Análisis de la expresión de CD44.....	63
Análisis de la expresión de RHAMM	64
Conclusiones parciales.....	66

Capítulo III

Primera parte: Evaluación del efecto del AH en los procesos de migración, proliferación y diferenciación sobre la línea celular de coriocarcinoma humano JEG- 3	
Efecto de AH sobre la migración celular.....	67
Efecto de AH sobre la proliferación celular	70
Efecto de AH sobre la expresión de marcadores trofoblásticos.....	72
HLA-G	72
Syncitina-2.....	73
Gonadotropina coriónica humana (hCG)	74
Conclusiones parciales.....	75

Segunda parte: Evaluación de los mecanismos involucrados en el efecto del AH sobre la migración celular.....	76
Implicancia de hCG endógena	76
Evaluación de la participación de las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/Akt mediante inhibidores farmacológicos.	77
Evaluación de la expresión de los índices pERK/ERK y pAkt/Akt.....	78
Evaluación de la participación de los receptores CD44 y RHAMM	80
Evaluación de la participación de las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/Akt sobre la migración inducida por la interacción AH-RHAMM.	81
Conclusiones parciales.....	82
DISCUSIÓN.....	83
Capítulo I.....	84
Capítulo II.....	91
Capítulo III. Primera parte.	94
Capítulo III. Segunda parte.	96
CONSIDERACIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ABREVIATURAS

ETG: enfermedad trofoblástica gestacional

MH: mola hidatiforme

MHC: mola hidatiforme completa

MHP: mola hidatiforme parcial

NTG: neoplasia trofoblástica gestacional

CT: citotrofoblasto

ST: sincitiotrofoblasto

TI: trofoblasto intermedio

TEV: trofoblasto extravelloso

CC: coriocarcinoma

TTSP: tumor trofoblástico de sitio
placentario

hCG: gonadotropina coriónica humana

AH: ácido hialurónico

HAS: sintetasa de AH

Hyal: hialuronidasa

AH-APM: AH de alto peso molecular

AH-BPM: AH de bajo peso molecular

oHA: oligosacáridos de AH

RHAMM: receptor-hyaluronan mediated
motility

HABPb: proteína de unión a AH biotinilada

SFB: suero fetal bovino

ARNm: mensajero del ácido ribonucleico

cDNA: copia del ácido desoxirribonucleico

kDa: kilodalton

MAPK: proteínas kinasas activadas por
mitógenos

MEC: matriz extracelular

h: hora/s

min: minuto/s

TA: temperatura ambiente

INTRODUCCIÓN

¿Qué es la Enfermedad Trofoblástica Gestacional?

La enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) comprende un grupo heterogéneo de entidades interrelacionadas y asociadas al trofoblasto con características clínicas, morfológicas y patogenia específicas. *Algunas de ellas representan lesiones benignas mientras que otras son neoplasias.* Es interesante destacar que todas las variantes de ETG difieren genéticamente de la madre y por lo tanto constituyen un aloinjerto.

Si bien existen múltiples clasificaciones de este grupo de enfermedades, la siguiente, propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se enfoca desde el punto de vista histopatológico (Shih 2007; Cheung et al. 2009). Así, la ETG está compuesta por:

- *Mola hidatiforme (MH)*, la cual puede ser parcial o completa.
- *Neoplasia trofoblástica gestacional (NTG)*, compuesta a su vez por entidades como coriocarcinoma (CC), tumor trofoblástico de sitio placentario (TTSP) y tumor trofoblástico epitelioide (TTE); y
- Lesiones benignas, como sitio placentar exagerado y nódulo de sitio placentar.

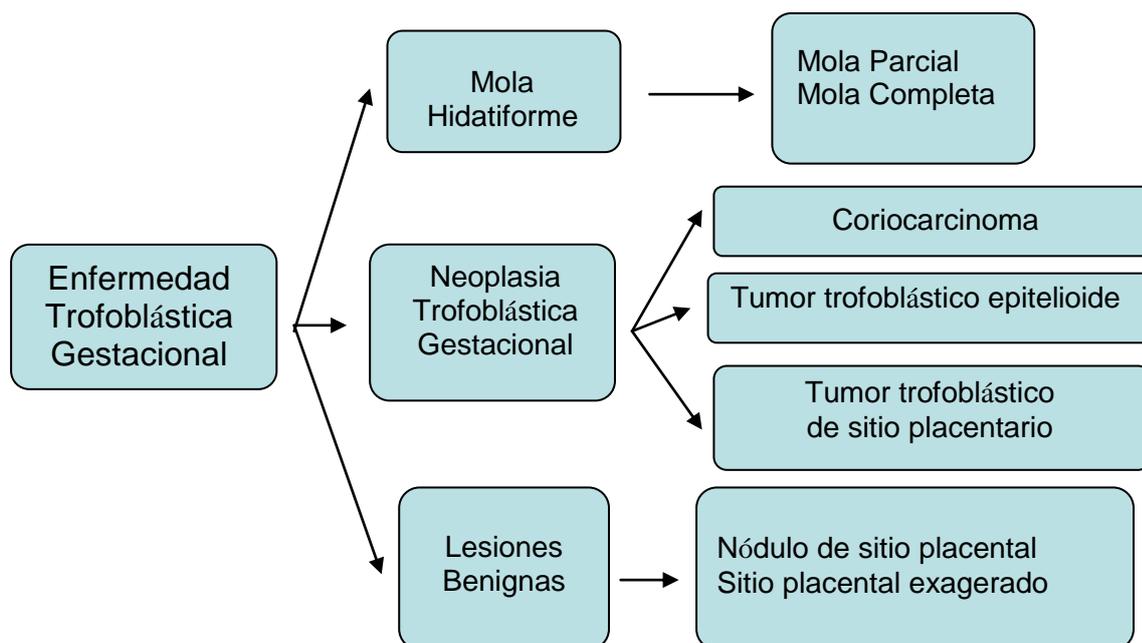


Figura 1. Clasificación de ETG desde el punto de vista histopatológico. (Modificada de (Shih 2007)).

Epidemiología

Los estudios epidemiológicos en ETG son escasos y están limitados principalmente debido a: la definición de la entidad (tipo de gesta ó tumor), detección del caso (ausencia de confirmación histopatológica) y el empleo de un denominador común (embarazo, parto, nacidos vivos) para calcular la incidencia de casos.

La estimación de la incidencia de ETG varía según la región geográfica. La incidencia de MH es entre 1,5 - 6 de 1.000 embarazos en Sudamérica mientras que la presentación de CC sería de entre 2 – 7 de 100.000 embarazos y la frecuencia de TTSP fue estimada de 0,2% de todos los casos de ETG (Mangili et al. 2014).

Entre los factores de riesgo de ETG se enumeran:

- la edad materna, ha sido identificada un importante factor ya que los casos de MH se incrementan en los extremos de la edad reproductiva (menor de 15 ó mayor de 40 años).
- la etnicidad, varios estudios han reportado una alta incidencia de ETG en mujeres de origen asiático.
- historia obstétrica, enfermedad molar repetida incrementa el riesgo de desarrollar NTG.
- nutrición, asociado a el estado socioeconómico y localización geográfica, se hipotetiza que una dieta pobre en caroteno y proteínas y abundante en grasas podría constituir un factor de riesgo.

En este trabajo de tesis, se ahondará sobre mola hidatiforme, coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario.

Previamente al desarrollo del tema, se procederá a exponer brevemente el proceso de placentación normal.

Resumen del proceso de fecundación, implantación y placentación normal

En un proceso de fertilización normal, un óvulo (cuya carga genética es 23X) es fecundado por un espermatozoide (cuya carga genética puede ser 23X ó 23Y) en la trompa de Falopio dentro de las 24-48 horas luego de la ovulación. Este producto de concepción denominado *cigoto* continúa su desarrollo hasta convertirse en una masa de 12 a 16 células (*mórula*) en su recorrido hacia la cavidad uterina luego de 2 ó 3 días de la fertilización. Posteriormente, la presencia de una cavidad interior líquida en la masa celular interna indica la transición al estadio *blastocisto* y es acompañada por la diferenciación de las células de la superficie que se transforman en trofoectodermo (dando origen a las estructuras extraembrionarias, incluida la placenta), y la masa celular interna (que dará origen al embrión) (Figura 2 A). Para garantizar el éxito de la implantación, aunque espacialmente separadas, las etapas iniciales del desarrollo embrionario y uterino deben estar temporalmente coordinadas. La implantación ocurre aproximadamente 6 ó 7 días luego de la fertilización y depende de la diferenciación del trofoblasto. El trofoblasto deriva del trofoectodermo y puede diferenciarse en: citotrofoblasto (CT), sincitiotrofoblasto (ST) y trofoblasto intermedio (TI). En la primer etapa de la implantación ocurre la adhesión inicial del blastocisto a la pared uterina, llamada aposición, la cual es inestable. Luego hay una estabilización de dicha adhesión, caracterizada por la interacción física entre el blastocisto y el epitelio uterino. Posteriormente, ocurre la invasión, donde el ST penetra en el epitelio uterino. Al décimo día de la fertilización, el blastocisto está completamente embebido en el tejido estromal del útero, el epitelio uterino se restablece, cubre el sitio de implantación y el TI protruye de la capa trofoblástica. Eventualmente, el TI infiltra la decidua y el miometrio e invade y reemplaza las arterias espiraladas del sitio de implantación para establecer la circulación materno-fetal colocando al trofoblasto en contacto directo con la sangre materna (Norwitz et al. 2001; Red-Horse 2004) (Figura 2 B).

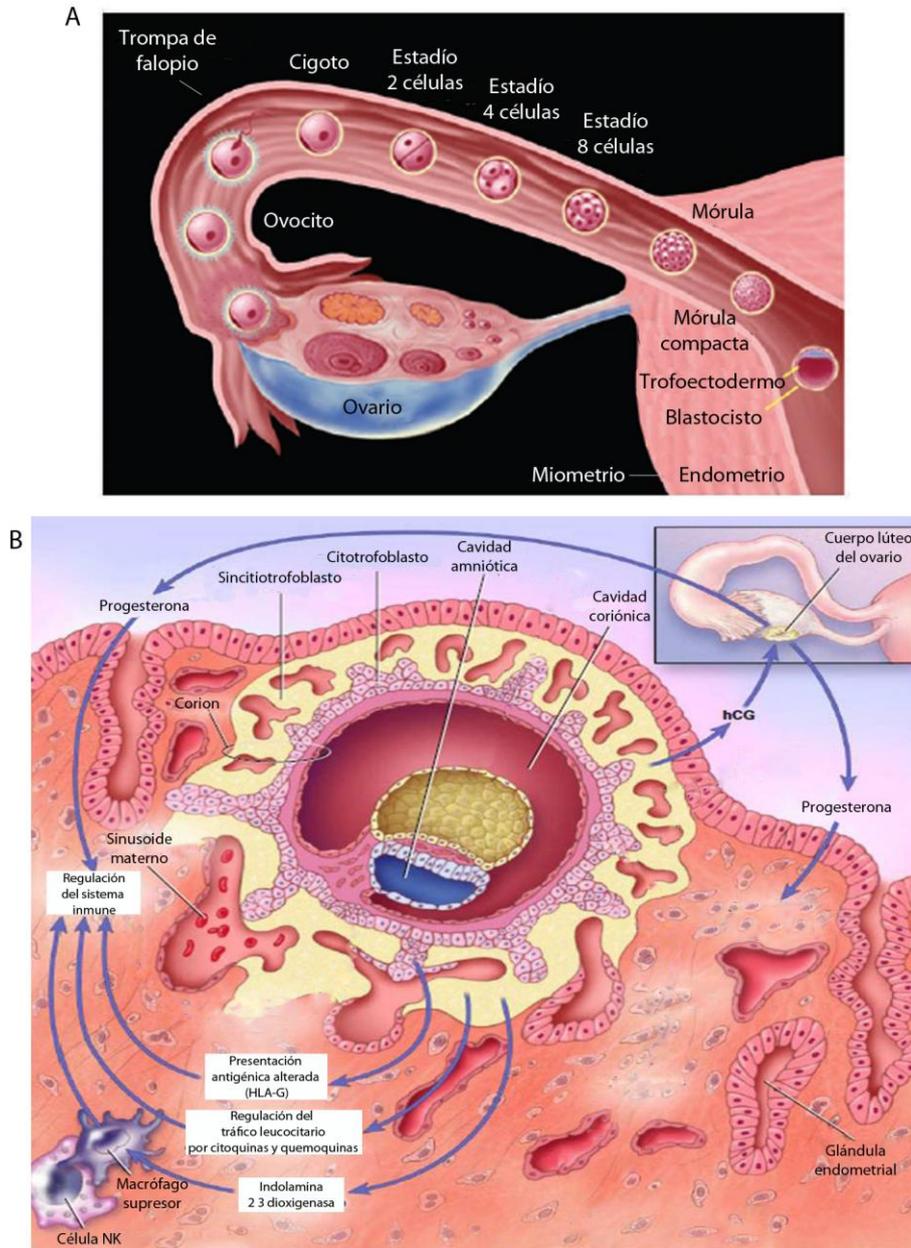


Figura 2. (A) Etapa temprana del desarrollo embrionario humano desde la fertilización hasta la formación del blastocisto (adaptado de (Red-Horse 2004)). **(B)** Blastocisto implantado en el endometrio materno (adaptado de Norwitz, Schust et al. 2001).

Aspectos generales de la diferenciación del trofoblasto

En la placentación normal, el trofoblasto que crece asociado a la vellosidad coriónica es denominado trofoblasto *velloso*, mientras que el trofoblasto en otras localizaciones es conocido como trofoblasto *extravelloso*.

El trofoblasto *velloso* está compuesto, en su mayoría, de CT y ST y en menor proporción de TI. CT es el trofoblasto stem cell de la superficie vellosa y demuestra actividad proliferativa durante el primer trimestre de gestación. Conformar una capa continua interna sobre la superficie de la vellosidad coriónica. Sobre ésta, se fusiona diferenciándose a ST. Esta diferenciación está acompañada de la pérdida completa de la actividad proliferativa. A medida que la gestación progresa, dicha actividad de CT disminuye y hay un incremento en el número relativo de ST respecto de CT. ST media con la circulación materna y produce la mayoría de las hormonas de la placenta.

En contraste, el trofoblasto *extravelloso* que infiltra decidua, miometrio y arterias espiraladas del sitio placentario está compuesto de TI. Esta subpoblación comparte características morfológicas y funcionales de CT y ST. La denominación de TI en la literatura resulta muchas veces confusa. Esta población es heterogénea y depende del sitio de localización anatómica. La vía de diferenciación a trofoblasto extravelloso ocurre en el extremo de la vellosidad que hace contacto con el lecho placentario. También conocida como vellosidad de anclaje, exhibe un espectro morfológico de diferenciación donde el trofoblasto emerge imperceptiblemente en TI dentro de esas columnas trofoblásticas. Estas células son denominadas, *TI velloso*. La actividad proliferativa de las mismas disminuye a medida que se alejan de la vellosidad. En la base de las columnas trofoblásticas, en la unión con el endometrio, TI infiltra la decidua y el miometrio e invade y reemplaza las arterias espiraladas del sitio de implantación para establecer la circulación materno-fetal. Esta subpoblación es denominada *TI de sitio de implantación*. En contraste, TI alejado del sitio de implantación se denomina *TI tipo coriónico* (Figura 3). (Kurman et al. 2011))

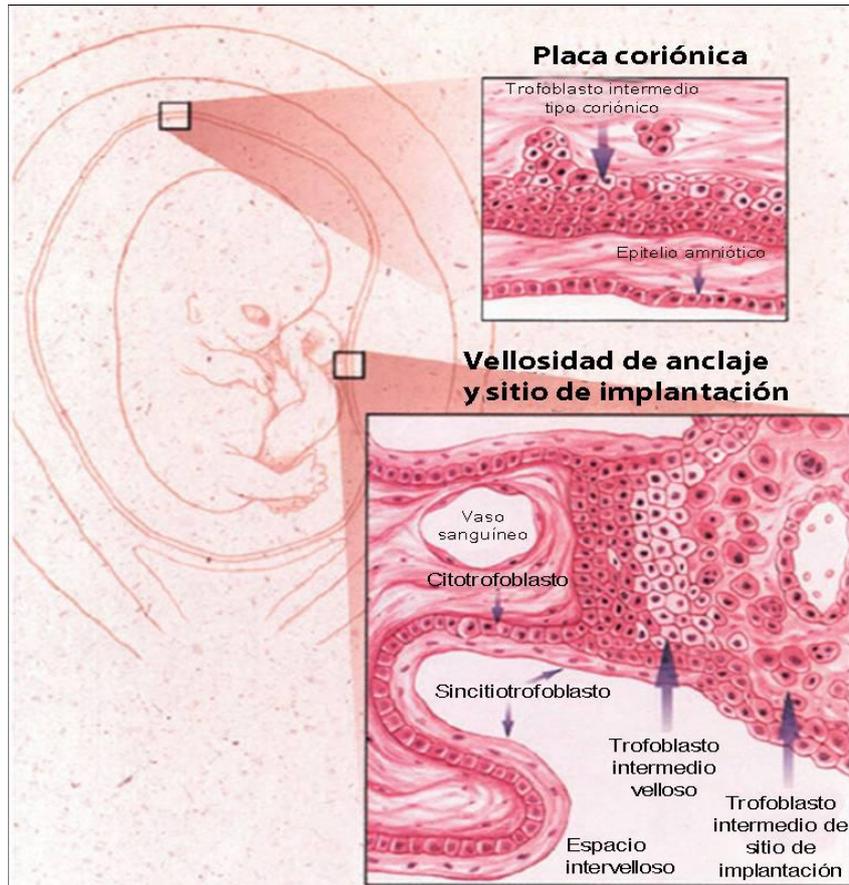


Figura 3. Representación esquemática de las subpoblaciones trofoblásticas en la placenta. (Adaptado de Kurman et al. 2011)

MOLA HIDATIFORME

La mola hidatiforme (MH), o embarazo molar, es un evento gestacional en el cual la placenta se desarrolla de modo anormal si bien no se trata de un tumor. Puede ser parcial o completa tratándose de dos entidades diferentes e independientes entre sí. Cada una de estas entidades posee características citogenéticas diferentes que derivan en hallazgos clínicos e histopatológicos propios.

Según la hipótesis más aceptada, ya que no se conoce exactamente el mecanismo, la MH se produce luego de la fertilización de un óvulo por uno o dos espermatozoides (Figura 4).

En la *MH Parcial* (MHP), el óvulo con carga genética haploide es fertilizado por un espermatozoide que luego endoduplica, ó por dos espermatozoides, pudiendo ser el cariotipo del producto triploide XXX, XYY ó XYY. Así, MHP contiene material genético tanto materno como paterno.

En cambio, en *MH Completa* (MHC), el óvulo carece de material genético y es fertilizado por un espermatozoide que luego endoduplica, ó por dos espermatozoides, siendo el cariotipo del producto diploide pudiendo ser XX ó XY. El producto YY no es viable (Cheung et al. 2009).

En determinados casos la MH puede coexistir con el embrión y concluir en un parto a término bajo seguimiento médico. Este tipo de embarazos se denomina gemelar (MH + embarazo normal) (Sebire 2010).

La importancia en el diagnóstico y diferenciación de ambas entidades radica en el riesgo aumentado de desarrollar posteriormente NTG (Sun et al. 2015).

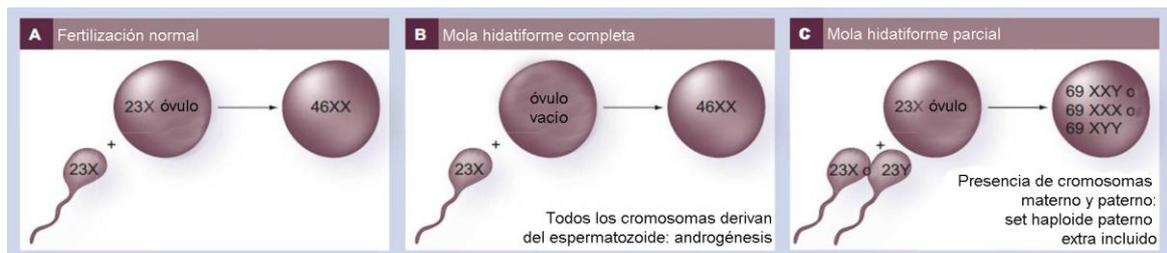


Figura 4. Génesis de MH parcial y completa. (Adaptado de (Cheung et al. 2009)).

Histología

MHC es caracterizada por edema de la mayoría de las vellosidades (Figura 5D versus 5A) y un grado variable de proliferación trofoblástica y atipia (Figura 5E versus 5B). En cambio en la MHP coexisten dos tipos de vellosidades: aquellas edematosas de gran tamaño y otras de tamaño normal, las cuales pueden presentar fibrosis. La proliferación trofoblástica es focal y menos marcada (Kurman et al. 2011).

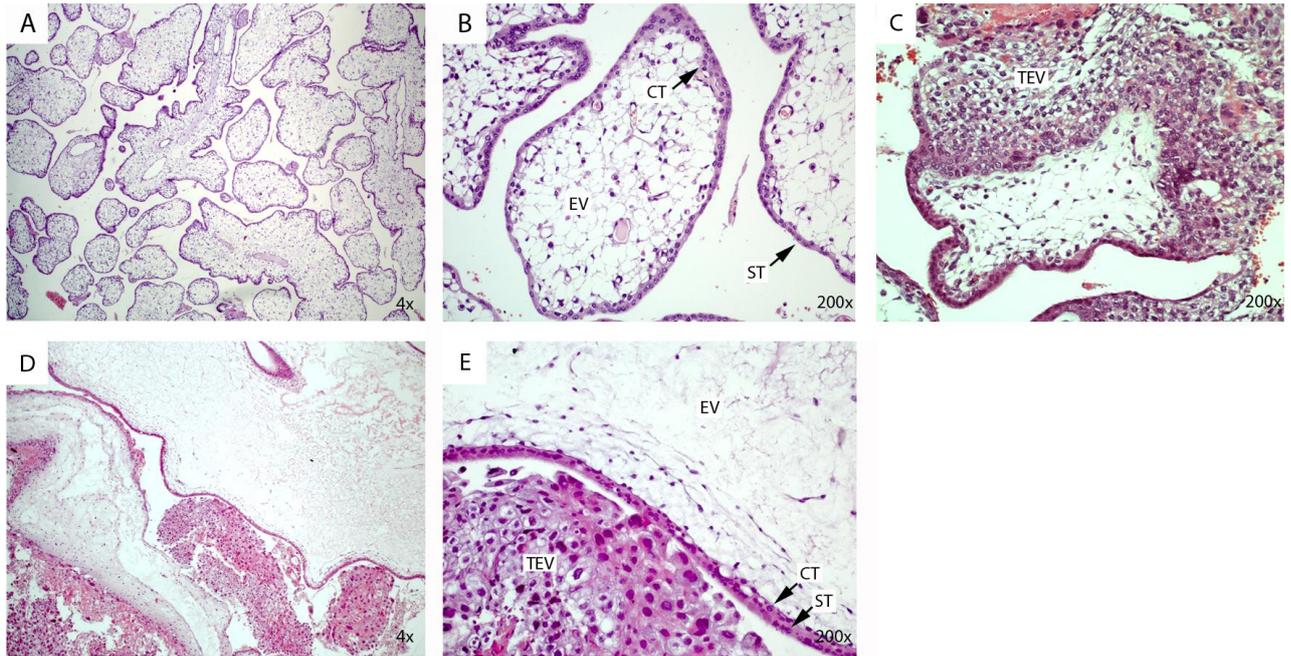


Figura 5. Trofoblasto en placenta de primer trimestre (A-C) y en MH (D, E). CT: citotrofoblasto, ST: sincitiotrofoblasto, TEV: trofoblasto extraveloso, EV: estroma veloso. Magnificación original 40X (A y D) y 200X (B, C y E).

p57kip2

Aunque MHP y MHC son fácilmente distinguibles en el examen histológico, el uso rutinario de técnicas de ultrasonido en el control del embarazo ha llevado a un diagnóstico clínico y evacuación más temprano en la gestación, frecuentemente en las primeras semanas. Como resultado, las características clásicas observadas en edad gestacional más avanzada no alcanzan a desarrollarse y el diagnóstico histopatológico se ha hecho más dificultoso. El empleo de la tinción para p57kip2 constituye una herramienta útil y contribuye a la clasificación de MHC aunque no es ampliamente usada en la clínica.

p57kip2 es una proteína producto del gen CDKN1C (cyclin-dependet kinase inhibitor 1C) y participa en la regulación del ciclo celular.

Durante la gametogénesis algunos genes sufren modificaciones epigenéticas que conllevan a su silenciamiento o impronta genética. Estos genes son transcritos solamente desde un alelo heredado (el otro alelo está silenciado) ya sea materno o paterno. Este fenómeno subyace en la patología anormal vista en MH. CDKN1C es uno de los genes silenciados en el alelo materno.

Varios trabajos empleando inmunohistoquímica han demostrado que p57kip2 se encuentra expresado en el núcleo de las células del mesenquima veloso y de la capa citotrofoblástica en placenta humana y se ha demostrado su utilidad en la discriminación de MHC versus embarazos no molares ya que en MHC la expresión de p57kip2 en estas células es nula (porque no hay aporte genético materno). La exactitud de la tinción de p57kip2 en el diagnóstico de MHC ha sido validado con estudios genéticos moleculares (Kipp et al. 2010; Sarmadi et al. 2011).

Las características de ambas entidades se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Características patológicas de MHC y MHP.

Características	MHC	MHP
Cariotipo	46 XX, 46 XY	69XXY, 69XXX
Embrión/Feto	Ausente	Presente
Contorno de la vellosidad	Redondo	Festoneado
Hinchazón hidrópica	Marcada; presencia de cisternas. Todas las vellosidades involucradas	Menos pronunciada y focal. Cisternas menos prominentes.
Proliferación trofoblástica	Circunferencial. Variable, puede ser marcada.	Focal y mínima
Atipia trofoblástica	Frecuentemente presente	Ausente
Expresión de p57kip2	Negativa	Positiva en núcleo de células mesenquimales y citotrofoblasto vellosos.
Comportamiento	17-20% desarrollan ETG maligna	<4% desarrolla ETG maligna

Adaptada de (Adaptado de Kurman et al. 2011).

Manejo terapéutico

A pesar de las diferencias entre MHP y MHC mencionadas, ambas entidades tienen un manejo clínico similar.

El diagnóstico de este tipo de gestas, denominadas ETG benigna desde el punto de vista clínico, se basa en el examen ecográfico y en la cuantificación de la subunidad beta (β) de hCG sérica cuyo nivel, en estos casos, es muy superior comparado con la edad gestacional de un embarazo normal.

Una vez hecho el diagnóstico, se procede a la evacuación de la mola, si no es que ya ocurrió una evacuación espontánea, y se remite el material para su estudio anatomopatológico y confirmación del diagnóstico.

Posteriormente, durante el período de vigilancia (que dura seis meses) se debe mantener una anticoncepción estricta ya que un eventual nuevo embarazo podría enmascarar un aumento de hCG producida por la enfermedad. Esto es muy importante, porque la vigilancia se realiza monitoreando el nivel de β hCG semanalmente y la conducta terapéutica adoptada dependerá del comportamiento de este marcador. Si el nivel de β hCG desciende gradualmente hasta negativizar se tratará de una ETG benigna. Por el contrario, el aumento o plateau del nivel de β hCG indica malignización y la paciente entra en un nuevo protocolo diagnóstico para NTG (Hancock BW et al. 2009).

CÁNCER

A lo largo de los años el concepto de *cáncer* ha progresado desde la definición del mismo como una masa de células transformadas (debido a alteraciones genéticas) que proliferan de modo descontrolado hasta definirlo como “tejidos complejos” e incluso “órganos”. Estos últimos, compuestos por diversos tipos celulares que interactúan entre ellos contribuyendo a que la biología tumoral ya no sea entendida simplemente por las características propias de las células tumorales en sí, sino también por la contribución del microambiente que lo rodea (Egeblad et al. 2010; Marongiu et al. 2012).

Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011) proponen algunas capacidades distintivas y complementarias que permiten el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica:

1. Angiogénesis sostenida,
2. Evasión a la muerte celular,
3. Autosuficiencia en señales de crecimiento,
4. Insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento,
5. Invasión de tejidos y metástasis,
6. Ilimitado potencial replicativo,
7. Evasión de la destrucción mediada por la respuesta inmune,
8. Desregulación del metabolismo celular.

Las células trofoblásticas que componen la placenta humana comparten ciertas características con las células tumorales en relación a su capacidad proliferativa, de migración e invasión, activación de vías de señalización, entre otras. Es por ello que se han definido como células “pseudo-malignas”.

La comparación e identificación de moléculas que participan en determinados eventos en ambos procesos, gestacional y tumoral, es de suma importancia ya que puede proveer nuevos blancos para el diagnóstico y tratamiento tanto de patologías oncológicas como gestacionales (Ferretti et al. 2007; Holtan et al. 2009).

NEOPLASIA TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

Este subgrupo de enfermedades también denominado Tumores Trofoblásticos Gestacionales (TTG) puede derivar de cualquier evento gestacional que ha concluido como ser: embarazo molar, normal a término, ectópico, muerte fetal o aborto de causa conocida o no (Figura 6).

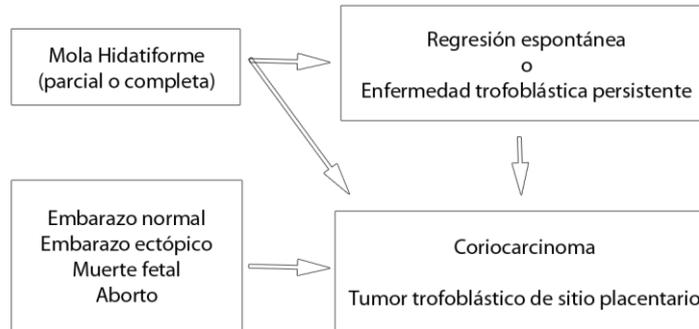


Figura 6. Interrelación entre diversos eventos gestacionales en relación a ETG (Adaptada de Hancock BW et al 2009).

Mientras la MHC es la entidad que comprende el mayor riesgo de derivar en CC (Cheung et al. 2009; Sebire and Lindsay 2010), en la mayoría de los casos de TTSP estudiados hasta el momento el antecedente gestacional más frecuente es embarazo normal a término (Sebire and Lindsay 2010).

Aunque la patogenia de NTG no ha sido completamente dilucidada, mediante análisis clinicopatológicos y moleculares de muestras de placenta de primer trimestre y tumores trofoblásticos se ha demostrado que el CC está compuesto por tres tipos de trofoblasto, tal como el blastocisto en el desarrollo placentario normal. Esto, sumado a que existen casos mixtos de CC/TTSP y CC/TTE ha llevado a proponer que el CC es el tumor primitivo y que las distintas NTG derivan de la transformación neoplásica de una determinada célula stem citotrofooblástica programada para diferenciarse dando origen así a un tipo determinado de tumor (Figura 7) (Mao et al. 2007; Shih 2007).

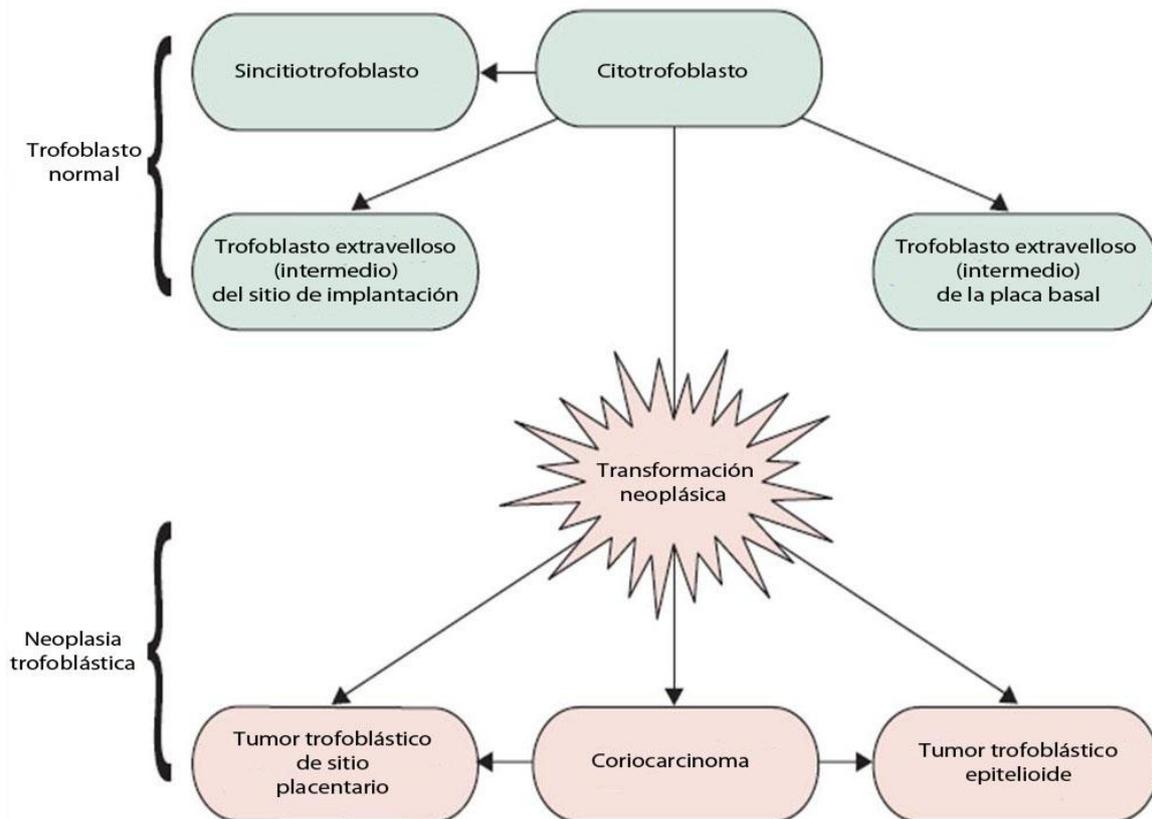


Figura 7. Patogénesis de ETG. Adaptado de (Shih 2007)

Coriocarcinoma

El CC es un tumor epitelial altamente maligno. Se trata de la entidad más frecuentemente observada entre las NTG. El CC es capaz de invadir múltiples órganos como pulmón, vagina, bazo, riñón, sistema gastrointestinal, hígado y cerebro.

El marcador tumoral por excelencia es la subunidad β hCG sérica el cual se detecta en niveles muy altos. Se lo utiliza tanto para definir el diagnóstico como para el seguimiento de la enfermedad ya que correlaciona directamente con la masa tumoral.

La presentación clínica de esta enfermedad es variable y depende del estadio en que se detecte. Aunque la mayoría de los casos de CC se desarrollan poco tiempo después de la gestación, cuanto mayor sea la latencia entre ese desarrollo y el diagnóstico, la presentación de la enfermedad estará relacionada a los sitios de metástasis.

El sangrado uterino anormal y el compromiso vaginal son las presentaciones más frecuentes así como también las metástasis en pulmón. Incluso pueden detectarse las metástasis en ausencia del tumor primario probablemente porque éste haya regresionado.

Las metástasis en hígado y cerebro son de mal pronóstico, y en aquellos casos que además presentan multiquimioresistencia es donde puede verse comprometida la vida de la paciente.

Las causas de muerte por CC se deben a hemorragias, fallas respiratorias y/o multiorgánicas por diseminación de la enfermedad con multiquimioresistencia. En los casos no tratados, puede ocurrir hemorragia fatal o insuficiencia pulmonar, la cual puede ser debido al tumor o a los efectos de irradiación y quimioterapia citotóxica (Neubauer et al. 2015; Savage et al. 2015).

Llamativamente, a pesar del origen de este tumor y de su alta capacidad de proliferación e invasión, bajo tratamiento y seguimiento médico adecuado, la sobrevida de CC es aproximadamente 100%. La mayoría de las pacientes conservan su capacidad reproductiva y pueden sostener a futuro un embarazo normal a término sin verse comprometida la vida del neonato (Sebire and Lindsay 2010) (Hancock BW et al 2009, Kurman RJ et al 2011).

Tumor trofoblástico de sitio placentario

EL TTSP es una entidad sumamente infrecuente y existen alrededor de 118 casos en todo el mundo*.

La presentación clínica más frecuente de TTSP es el sangrado vaginal irregular con o sin amenorrea. Puede llegar a manifestarse varios años después de la gestación precedente. La mayoría de los TTSP estudiados son autolimitados al útero. El tumor invade miometrio hacia la serosa y puede causar perforación. No obstante, algunos TTSP pueden ser clínicamente malignos y metastatizar a pulmón, hígado, cavidad abdominal y cerebro. Los TTSP con múltiples metástasis tienen mal pronóstico y las pacientes pueden morir a pesar de la multiqumioterapia.

Tanto el comportamiento como la quimiosensibilidad de esta patología es variable y difícil de predecir.

En TTSP los niveles de beta hCG permanecen bajos y no correlacionan con la masa tumoral (Sebire and Lindsay 2010) (Hancock BW et al 2009, Kurman RJ et al 2011).

*Las muestras de TTSP son nucleadas en una base de datos mundial para su estudio (en inglés, The International Society for the Study of Trophoblastic Diseases (ISSTD) global Placental Site Trophoblastic Tumour database).

Las características clínicas de CC y TTSP se resumen en la Tabla II.

Características	CC	TTSP
Presentación clínica	Luego de MH	Embarazo a término
Tiempo desde la última gestación conocida o ETG	meses	Variable, pueden ser años
Antecedente molar	~ 50% de los casos	~ 10-50% de los casos
Beta-hCG sérica	Alta (>10000 UI/ml)	Baja (<2000 UI/ml)
Comportamiento	Agresivo si no es tratado. Curable en la mayoría de los casos luego de tratamiento.	Autolimitada, persistente ó agresivo.
Respuesta a quimioterapia	Excelente	Variable
Tratamiento primario	Quimioterapia	Histerectomía o resección local / multiqumioterapia.

Tabla II. Adaptada de (Kurman RJ et al 2011)

Histología

El CC no posee vellosidades coriónicas sino que consiste predominantemente en una proliferación bifásica de trofoblastos mononucleares (constituido por una mezcla íntima de CT y TI) y ST.

Una característica única de CC es la pérdida de la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) en el centro del tumor. En su lugar ocurre lo que se denomina “mimetismo vasculogénico” donde las células trofoblásticas reemplazan a las células endoteliales (Shih 2011).

Esto conlleva a la carencia de soporte estromal adecuado y contribuye a la hemorragia central y necrosis quedando tumor viable en la periferia, lo que también es propio de CC. Puede existir una considerable atipia citológica en el trofoblasto con núcleo pleomórfico alargados, figuras mitóticas anormales y configuraciones celulares aberrantes. La cromatina nuclear es toscamente granular con una distribución desigual y el nucleolo puede estar presente (Figura 8 A). Las proporciones de estas poblaciones son altamente variables (Hancock BW et al 2009, Kurman RJ et al 2011). Frente a un diagnóstico diferencial pueden ser identificadas con inmunotinción para β hCG en el caso de ST y HLA-G y MelCAM en el caso de TI. Se han descrito casos mixtos de CC con diferenciación focal hacia TTSP y/o ETT los cuales son de importancia reportar ya que permitirá adoptar la conducta terapéutica más adecuada (Singer et al. 2002; Mao et al. 2007).

El TTSP no posee vellosidades coriónicas y se pierde el patrón bifásico observado en CC. El TTSP está compuesto por TI de implantación neoplásico que recuerda al infiltrante en endometriometrio y miometriometrio durante la gestación temprana.

Las células son grandes, poligonales, con núcleo hipercromático e irregular y densa eosinofilia citoplasmática (Figura 8 B). También contiene TI multinucleadas que no deben ser confundidas con ST.

Las células tumorales frecuentemente se agregan en láminas confluentes pero en la periferia del tumor invaden solitariamente o en cordones de modo característico separando fibras musculares individuales y grupos de fibras.

El tumor presenta abundante deposición de material fibrinoide eosinofílico. Y además, los vasos sanguíneos son reemplazados por TI y material fibrinoide (Hancock BW et al 2009, Kurman RJ et al 2011).

TTSP es inmunoreactivo a marcadores expresados en TI como por ejemplo, lactógeno placentario humano (hPL), CD146 y HLA-G (Singer et al. 2002; Mao et al. 2007).

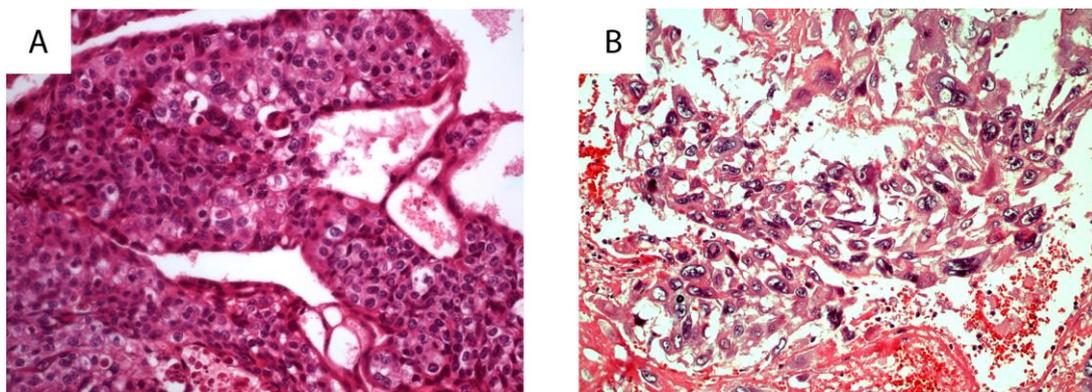


Figura 8. (A) Coriocarcinoma.(B) TTSP. Magnificación original 200X.

Manejo terapéutico

En NTG el diagnóstico se basa en la sospecha por la presentación clínica sumado al dosaje de β hCG. Dicha presentación es más importante que el diagnóstico histológico e incluso, en ocasiones, el tratamiento es llevado a cabo sin el mismo.

La paciente puede presentar una alteración en la curva de regresión (cuando se trata de una paciente en seguimiento con antecedente de embarazo molar), sangrado irregular, quistes tecaluteínicos, alta hCG, agrandamiento uterino, metástasis con hCG elevada, abdomen agudo ginecológico.

Una vez confirmado el diagnóstico se aplica la Clasificación FIGO + Score de la OMS 2000/02:

ESTADIO I: Enfermedad limitada al útero

ESTADIO II: Enfermedad extendida a los órganos pelvianos

ESTADIO III: Enfermedad Extendida a pulmón

ESTADIO IV: Enfermedad a distancia

+ SCORE
2000/02

SCORE

FACTORES PRONOSTICO	0	1	2	4
EDAD	Hasta 39 a.	> 40 a.	-	-
ANTECEDENTE DE EMBARAZO	Mola hidatiforme	aborto	Término	-
INTERVALO DESDE FIN DE GESTA HASTA INICIO DE QUIMIOTERAPIA	4 meses	4 – 6 meses	7 – 12 meses	>12 meses
VALOR DE HCG SUB B AL INICIO DEL TRATAMIENTO	10^3	10^3 - 10^4	10^4 - 10^5	$> 10^5$
TAMAÑO TUMORAL INCLUYENDO EL TUMOR UTERINO		3 a 5 cm.	> 5 cm.	-
Nº de METASTASIS	-	1 - 4	4 – 8	>8
LUGAR DE METASTASIS	Pulmón Vagina	Riñón Bazo	Gastro intestinal	Cerebro Hígado
QUIMIOTERAPIA PREVIA	-	-	simple droga	dos o más drogas

El cálculo del score según los datos clínicos del paciente permite agrupar en:

- BAJO RIESGO: 0-6
- ALTO RIESGO: ≥ 7
- ULTRA ALTO RIESGO: ≥ 13

Este score permite adoptar una conducta terapéutica y pronosticar el riesgo del fracaso de la monoquimioterapia (metotrexato para los casos de bajo riesgo) y poliquimioterapia (EMA/CO: etopósido, metotrexato, actinomicina/ciclofosfamida y vincristina; para alto y ultra alto riesgo).

El monitoreo del tratamiento se realiza empleando el marcador tumoral por excelencia, hCG, hasta la negativización (Hancock BW et al 2009) .

MARCADORES TROFOBLÁSTICOS

El proceso de diferenciación trofoblástica tanto hacia sincitiotrofoblasto como a trofoblasto extraveloso va acompañado del cambio en el patrón de expresión de determinadas proteínas como las que se detallan a continuación:

Gonadotropina coriónica humana

hCG es una proteína heterodimérica con un grado variable de glicosilación. Está conformada por una subunidad alfa de 92 aminoácidos, codificada por un único gen y común a las gonadotropinas pituitarias LH, FSH y TSH; y por una subunidad beta de 145 aminoácidos, que le confiere actividad biológica específica. Existen seis genes que codifican para la subunidad beta de los cuales *CG β 5* es expresado predominantemente en la placenta.

Tanto la variabilidad en el grado de glicosilación, ya sea debido a la cantidad de cadenas laterales o tipo de unión N- u O-; como la combinación de subunidades, libres o degradadas, confieren a esta hormona una significativa heterogeneidad en la estructura, y como consecuencia, a su función (Cole 2010).

Entre las moléculas clínicamente importantes se encuentran la hCG intacta (o regular) y hCG hiperglicosilada (hCG-H) (Cole et al. 2006; Cole and Butler 2012).

Implicancia en la biología de las células trofoblásticas

hCG es sintetizada por el sincitiotrofoblasto luego de la implantación del blastocisto. Es la primer señal que deriva del trofoblasto y puede ser detectada en la sangre materna en la primer semana de gestación (Kovalevskaya et al. 2002; Guibourdenche et al. 2010). hCG evita la regresión del cuerpo lúteo en el ovario y estimula la producción de progesterona favoreciendo el mantenimiento del embarazo. Además, está involucrada en la angiogénesis y diferenciación trofoblástica. hCG no sólo actúa de modo endócrino sino también de modo autócrino favoreciendo su propia síntesis a través del receptor LH/CG (Fournier et al. 2015).

En cambio, hCG-H (denominada también antígeno trofoblástico invasivo) es sintetizada por el TEV y promueve la invasión trofoblástica de modo autócrino independientemente del receptor LH/CG (Kovalevskaya et al. 2002; Guibourdenche et al. 2010; Lee et al. 2013).

Utilidad en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con ETG

En ETG el nivel de hCG en circulación es de suma importancia para el diagnóstico, junto con otros parámetros clínicos, vigilancia y decisión de la conducta terapéutica de la enfermedad constituyendo el marcador tumoral por excelencia. Tanto en MH como en CC el nivel de hCG correlaciona directamente con la masa de tejido mientras que en TTSP los niveles de hCG se mantienen relativamente bajos.

HLA-G

El antígeno leucocitario humano G (en inglés, HLA-G) es una molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. Se define “no clásica” debido al bajo polimorfismo comparado con las moléculas clásicas del CMH de clase I (HLA-A y -B). La estructura del gen de HLA-G es homóloga a otros genes CMH de clase I pero el transcrito primario genera 7 ARNm alternativos que codifican para las isoformas proteicas unidas a membrana (HLA-G1, G2, G3, G4) y solubles (HLA-G5, G6, G7).

La expresión de HLA-G así como la producción de isoformas truncadas y solubles, derivadas de splicing alternativo, es limitada y dependiente del contexto y el tipo celular.

HLA-G forma parte de un circuito molecular compartido entre células trofoblásticas y tumorales constituyendo un factor beneficioso para el desarrollo de la gestación como el proceso tumoral, aunque perjudicial para el paciente en este último caso.

HLA-G puede interactuar con células B, T, NK y células presentadoras de antígenos (CPAs). Esta interacción se produce mediante su unión a los receptores: ILT-2 y -4, que desencadenan señales inhibitorias; y a KIR2DL4, que es capaz de enviar tanto señales inhibitorias como activadoras. Mientras ILT-2 se expresa en células B y en algunas células T y NK, ILT-4 se expresa solamente en CPAs y la expresión de KIR2DL4 está restringida al subconjunto de células NK CD56^{bright} el cual constituye la mayoría de las células NK uterinas. Desde el punto de vista inmunológico, HLA-G desempeña un importante papel ya que las células que lo expresan pueden protegerse del ataque del sistema inmune (Carosella et al. 2008).

HLA-G se expresa en células de citotrofoblasto veloso y extraveloso y es una importante molécula tolerogénica natural en el contexto de la interfase materno-fetal (Kovats et al. 1990). Sin embargo, también puede expresarse en algunos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias (Shih 2007).

Por otro lado, la expresión de HLA-G en la población trofoblástica con capacidad invasiva correlaciona con la importancia de esta molécula en dicho evento. HLA-G no sólo induce un aumento en la invasión de células JEG-3 (un modelo *in vitro* de CC) sino que también induce el aumento de uPA y MMPs (Guo et al. 2013; Liu et al. 2013) mientras que la disminución en la expresión de HLA-G produce el efecto contrario (Liu et al. 2013).

HLA-G también se expresa en el trofoblasto extraveloso de embarazos molares, donde se reportó un incremento en comparación con placenta de primer trimestre, (Rabreau et al. 2000; Goldman-Wohl 2001) y en tumores trofoblásticos compuestos por dicha población trofoblástica como son CC, TTSP y TTE (Singer et al. 2002).

Estudios de otros autores demuestran que la expresión de HLA-G en trofoblasto extraveloso no es regulada por el ambiente celular circundante (Goldman-Wohl et al. 2000) pero es influenciada positivamente tanto por componentes de la MEC como laminina y aquellos que componen el matrigel (Zdravkovic et al. 1999; Kilburn et al. 2000) como también por algunos factores como progesterona, LIF y leptina (Bamberger et al. 2000; Yie 2005; Barrientos et al. 2015). Por el contrario, en condiciones hipóxicas se induce una disminución de la expresión de HLA-G tanto en trofoblasto extraveloso como en células JEG-3 (Kilburn et al. 2000; Mouillot et al. 2007).

Sincitina-2

El genoma humano contiene una fracción de elementos de origen retroviral producto de infecciones por retrovirus activos en la línea germinal ancestral que luego fue transmitida de modo mendeliano. La mayoría de estos elementos son no codificantes debido a mutaciones, deleciones y/o truncamientos.

Sincitina-2 es una proteína codificada por un gen de la familia FRD de retrovirus endógenos humanos (human endogenous retroviruses - HERV) cuyo gen también es denominado sincitina-2 o HERV-FRD (Tristem 2000; Blaise et al. 2003).

Tanto sincitina-2 como su receptor específico, MFSD2 (*major facilitator superfamily domain containing 2*), se expresan específicamente en la placenta humana (Blaise et al. 2003; Esnault et al. 2008). Sincitina-2 se expresa en citotrofoblasto vellosos mientras que el receptor MFSD2 se expresa en sincitiotrofoblasto, lo que llevó a proponer la participación de estas proteínas en la fusión célula-célula y como consecuencia en la morfología placentaria (Esnault, Priet et al. 2008; (Malassine et al. 2007; Vargas et al. 2009). Esto fue demostrado tanto en células de citotrofoblasto vellosos primario como empleando la línea celular BeWo donde se observó que el aumento en la expresión ARNm y proteína para sincitina-2 correlaciona directamente con la sincitización (Vargas et al. 2009; Delidakis et al. 2011). Por otro lado también es interesante destacar que sincitina-2 tiene actividad inmunosupresora in vivo. Esta función se demostró mediante la sobreexpresión de sincitina-2 en células tumorales alogeneicas murinas (Mangeney et al. 2007).

MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral está compuesto por células estromales, tales como fibroblastos, células endoteliales e infiltrado de células inmunes, además de las células tumorales, y de compartimentos no celulares que incluyen factores solubles y otros componentes estructurales propios de la *matriz extracelular (MEC)*.

Las células tumorales sensan las señales del microambiente y se comunican bilateralmente con las células estromales del sitio. Durante la progresión tumoral, este diálogo celular se altera dramáticamente influenciado por los cambios en la composición celular y molecular del microambiente a fin de sostener la proliferación, migración, invasión y metástasis (Itano et al. 2008; Hanahan and Weinberg 2011).

ÁCIDO HIALURÓNICO: estructura simple, función compleja.

El ácido hialurónico (AH) es el glicosaminoglicano (GAG) mayoritario en la MEC. Está compuesto por unidades disacarídicas repetitivas de N-acetil-glucosamina y ácido glucurónico: $[(\beta 1,3)\text{-GlcUA}-(\beta 1,4)\text{-GlcNAc}]_n$ (Figura 9). Su estructura es lineal y está cargado negativamente. A diferencia de otros GAGs no está modificado químicamente (por ejemplo: acetilación, sulfatación) ni está unido covalentemente a un núcleo (core) proteico. Su peso molecular varía entre $10^5\text{--}10^7$ Da (Monslow et al. 2015).

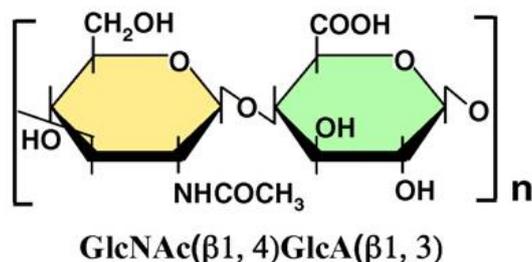


Figura 9. Estructura disacarídica del AH (Tomado de (Itano and Kimata 2008).

El AH se halla distribuido de modo ubicuo en los tejidos de mamíferos aunque en mayores concentraciones en el cordón umbilical, líquido sinovial, dermis de la piel, humor vítreo y en menor concentración en el suero (Cowman et al. 2015).

Fisiológicamente, se lo encuentra como AH de alto peso molecular. En estas condiciones, debido a su carga negativa y la capacidad de formar redes, es altamente higroscópico lo que deriva en una mayor hidratación, viscosidad y elasticidad. Estas mismas propiedades biofísicas y mecánicas han conducido a su empleo en el área oftalmológica, cosmetológica, dermatológica, en medicina regenerativa y en el tratamiento de lesiones articulares (Tamer 2013). Además, por ser un compuesto no inmunogénico se lo está estudiando como

transportador de drogas principalmente para el tratamiento oncológico (Karbownik and Nowak 2013; Dicker et al. 2014).

En condiciones patológicas, como el cáncer, el AH es capaz de modular diversos procesos celulares como la proliferación celular, apoptosis, adhesión, migración, invasión, angiogénesis, resistencia a multidroga y senescencia (Alaniz 2006; Itano and Kimata 2008; Cordo-Russo et al. 2010; Jiang et al. 2011; Sironen et al. 2011; Lompardía et al. 2013).

Las funciones del AH son pleiotrópicas y dependen de su tamaño y concentración las cuales son reguladas de modo complejo a través de su metabolismo, unión a otras moléculas extracelulares y activación de vías de señalización.

Metabolismo de AH

El recambio dinámico de AH se lleva a cabo a través de la modulación de su metabolismo. Mientras su síntesis está regulada por sintasas de hialurónico (HAS), el catabolismo del AH está regulado por degradación enzimática a cargo de hialuronidasas (Hyal) y/o estrés oxidativo y es mediante estos procesos por los cuales se ejerce el mayor control sobre el depósito de AH.

Biosíntesis mediada por HAS

Las sintasas de hialurónico (HAS) son proteínas integrales de membrana encargadas de sintetizar AH empleando como sustratos UDP-GlcUA y UDP-GlcNAc presentes en el citosol. Los sitios activos de estas enzimas están localizados en la cara interna de la membrana celular y el polímero es extruído hacia la superficie celular a través de un poro central a medida que es sintetizado e incluso puede permanecer allí retenido por la sintasa (Figura 10) (Itano and Kimata 2008).

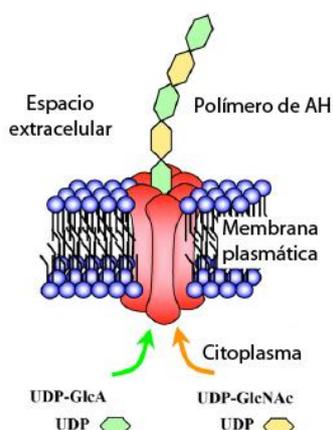


Figura 10. Modelo de síntesis de HA por acción de HAS (Tomado de (Itano and Kimata 2008)).

Existen tres isoformas de sintasas denominadas HAS1, HAS2 y HAS3. En humanos residen en 3 cromosomas distintos, HAS1 se localiza en el cromosoma 19atq13.3–13.4, HAS2 en el cromosoma 8 atq24.12 y HAS3 en el cromosoma 16atq22.1. De ellas, la deficiencia de HAS2 es letal durante el desarrollo fetal (Weigel and DeAngelis 2007).

A pesar de que comparten una alta homología en su secuencia aminoacídica y similares características hidrofóbicas, las distintas HAS difieren en localización subcelular y actividad enzimática (Tabla III). Se ha demostrado recientemente que la actividad puede ser controlada por fosforilación directa, glicosilación y ubiquitinación. La expresión de las HAS es regulada a nivel transcripcional por la acción de varias citoquinas y factores de crecimiento (Monslow et al. 2015). Recientemente se ha demostrado que las 3 isoenzimas forman complejos homo- u hetero-diméricos y que existe una cooperación funcional entre las mismas (Bart et al 2015).

Propiedades enzimáticas	HAS1	HAS2	HAS3
Tasa de elongación de AH	alta	alta	baja
Actividad enzimática	inestable	estable	estable
Longitud de AH (Da)	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$	$2 \times 10^6 <$	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$
Formación de matriz AH	baja	alta	alta
Localización subcelular	Principalmente citoplasmática	Principalmente membrana	Principalmente membrana

Tabla III. Adaptado de (Itano 2008)

Catabolismo del AH

Una vez sintetizado, la localización del AH puede ser extracelular, pericelular (particularmente en estadios de proliferación y migración) ó encontrarse en el interior celular (Toole 2002).

Posteriormente, el catabolismo del AH puede ocurrir localmente (*in situ*) y/o luego del drenaje por el sistema linfático en los ganglios linfáticos regionales. Los vasos linfáticos drenan una considerable cantidad de AH a través de su unión a los receptores HARE (HA receptor for endocytosis) o LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial receptor-1) y posteriormente es removido en el hígado aunque también una pequeña porción puede ser eliminado a través de los riñones (~10%) y excretado en la orina (1-2%) (Monslow et al. 2015).

En los sitios donde la concentración de AH es muy elevada, el catabolismo *in situ* involucra el clivaje enzimático mediado por Hyals e internalización vía el receptor CD44.

En mamíferos fueron reportados al menos seis genes que codifican para hialuronidasas: HYAL1, HYAL2 y HYAL3 en el cromosoma humano 3p21, y HYAL4, PH20/SPAM1 y HYALP1 en el cromosoma humano 7q31 (Csoka et al. 2001). De ellos, HYALP1 no codifica ninguna proteína y Hyal3 no cataboliza AH .

HYAL1 y -2 son las principales hialuronidasas en tejidos somáticos mientras que PH20 es esencial para la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida.

Mientras HYAL1 es una enzima lisosomal con pH óptimo ácido que cliva el AH en oligosacáridos, HYAL2 se encuentra anclada a través de una unión glicosilfosfatidilinositol (GPI-) a la superficie de la membrana plasmática y es capaz de degradar AH-APM a unidades intermedias de 20KDa (Stern and Jedrzejewski 2006). Ambas enzimas pueden actuar de forma secuencial para la degradación del AH-APM y posterior internalización vía CD44 (Harada and Takahashi 2006).

También hay que considerar que el AH puede ser clivado por especies reactivas del oxígeno y/o nitrógeno en un proceso no selectivo generando como producto fragmentos de diversos tamaños (Monzon et al. 2010).

HYALADHERINAS

Así como la interacción de AH con otras moléculas extracelulares (proteoglicanos) es crucial para el ensamblaje y mantenimiento de las matrices peri y extracelulares, el AH es capaz de interactuar directamente con las células a través de la interacción con hialadherinas. Estas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas cuya característica en común es la habilidad de unir AH: CD44, RHAMM, LYVE-1, HARE, TSG-6 y TLRs. De este modo el AH es capaz de influenciar el comportamiento celular modulando vías de señalización intracelulares.

Incluso las interacciones intracelulares AH-hialadherinas con importantes quinasas llevan a la modulación de la actividad de HAS, ciclo celular, migración y diferenciación (Toole 2004; Jiang et al. 2011).

Entre ellas, CD44 y RHAMM son los principales receptores de AH involucrados en procesos neoplásicos.

CD44

CD44 es una proteína integral de membrana cuyo principal ligando es AH. Como la mayoría de las hialadherinas, es capaz de unir AH mediante una secuencia de 100 aminoácidos conocida como “link module”. La isoforma estándar de CD44 ronda los 85KDa aunque puede ser mayor ya que CD44 está sujeto a modificación por splicing de 10 exones alternativos insertados en diferentes combinaciones entre dos regiones constantes (Figura 11). La multifuncionalidad de CD44 se encontraría asociada a su naturaleza multiestructural así como a la lista de ligandos conocidos. De esta forma, mediante interacciones célula-célula y célula –matriz, CD44 participa en la migración y en la transmisión de señales desde el exterior hacia el interior celular que pueden conducir hacia la muerte celular programada o a la supervivencia celular y proliferación (Orian-Rousseau 2010; Misra et al. 2015).

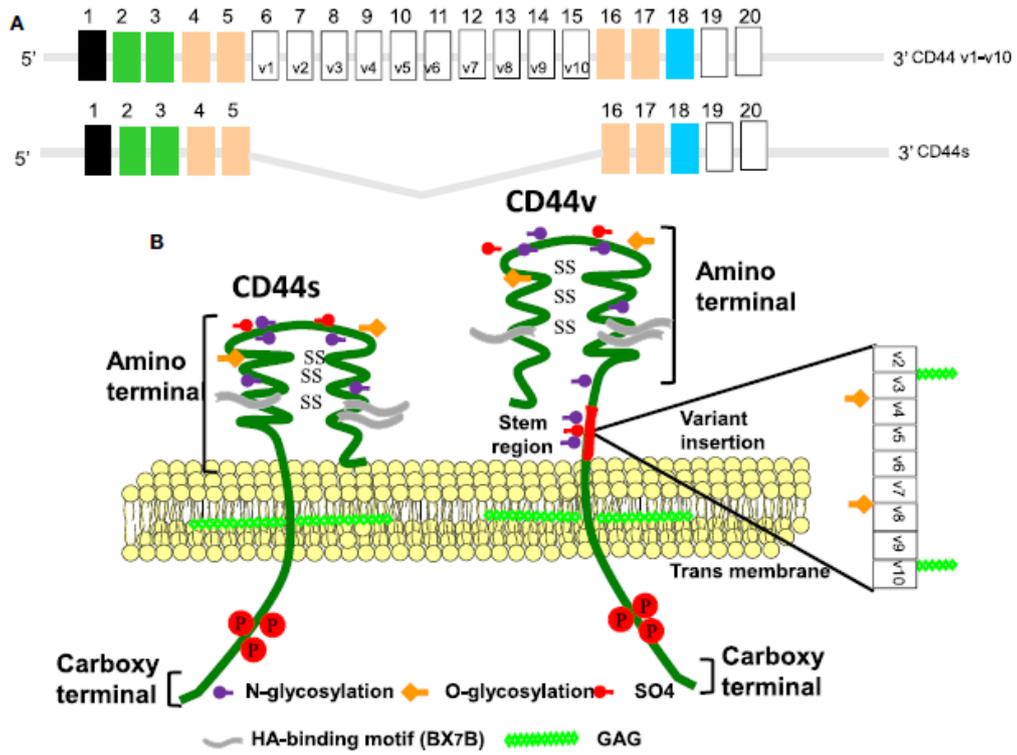


Figura 11. (A) Modelo de estructura génica de CD44 estándar y sus variantes. (B) Modelo estructural proteico de CD44 estándar y sus variantes. (Tomado de (Misra et al. 2015))

Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM)

RHAMM fue descrito por primera vez en 1992 (Hardwick et al. 1992). Su estructura es super enrollada (Figura 12-I), pierde el péptido señal de exportación en su paso por el retículo endoplásmico/ aparato de Golgi y no contiene fragmento transmembrana. Sin embargo, exhibe múltiples funciones intra y extracelulares algunas de las cuales no pueden predecirse en base a su estructura.

A diferencia de CD44, es capaz de unir AH mediante una secuencia de 9-11 aminoácidos conteniendo múltiples aminoácidos básicos (Yang et al. 1993; Yang et al. 1994).

La forma de mayor tamaño ronda los 85 Kda aunque puede ser menor ya que está sujeto a modificación por splicing alternativo de su ARNm dando origen a 3 isoformas (Figura 12-II). Originalmente RHAMM fue descubierto en sobrenadante de cultivo (Hardwick et al. 1992) y también fue descrita su localización en el citoplasma (Assmann et al. 1998; Wang et al. 1998), núcleo (Wang et al. 1998; Assmann et al. 1999) y en la superficie celular (Zhang et al. 1998).

Se postula que RHAMM podría ser secretado como producto de muerte celular programada o por algún otro mecanismo no convencional aún desconocido (Maxwell et al. 2008). Dado que RHAMM pierde la secuencia hidrofóbica típicamente encontrada en proteínas transmembrana se cree que puede unirse a la membrana plasmática mediante una unión GPI o mediante una proteína adaptadora. Se ha descrito que se asocia con receptores transmembrana como CD44 (Hamilton et al. 2007), CD44/EGFR (Hatano et al. 2010), PDGFR (Zhang et al. 1998), TGF β R-1 (Park et al. 2012), bFGFR (Savani et al. 2001), RON (Manzanares et al. 2007). De este modo RHAMM puede modular las vías de señalización asociadas a los receptores a los cuales se acopla y controlar la expresión de genes asociados al ciclo celular, pudiendo influenciar incluso la proliferación (Twarock et al. 2010) y migración celular (Savani et al. 2001; Twarock et al. 2010; Tolg et al. 2012). Además, entre sus funciones intracelulares RHAMM participa en la formación e integridad del centrosoma y del huso mitótico (Assmann et al. 1999).

Las múltiples funciones intra y extracelulares de RHAMM tienen como característica común la regulación de ERK (quinasa regulada por señales extracelulares. En inglés, *extracellular signal-regulated kinase*) a quien se une directamente a través de varios dominios que forman parte de su estructura. El control de la regulación de ERK puede verse afectada frente al estímulo con AH. (Figura 12-III)

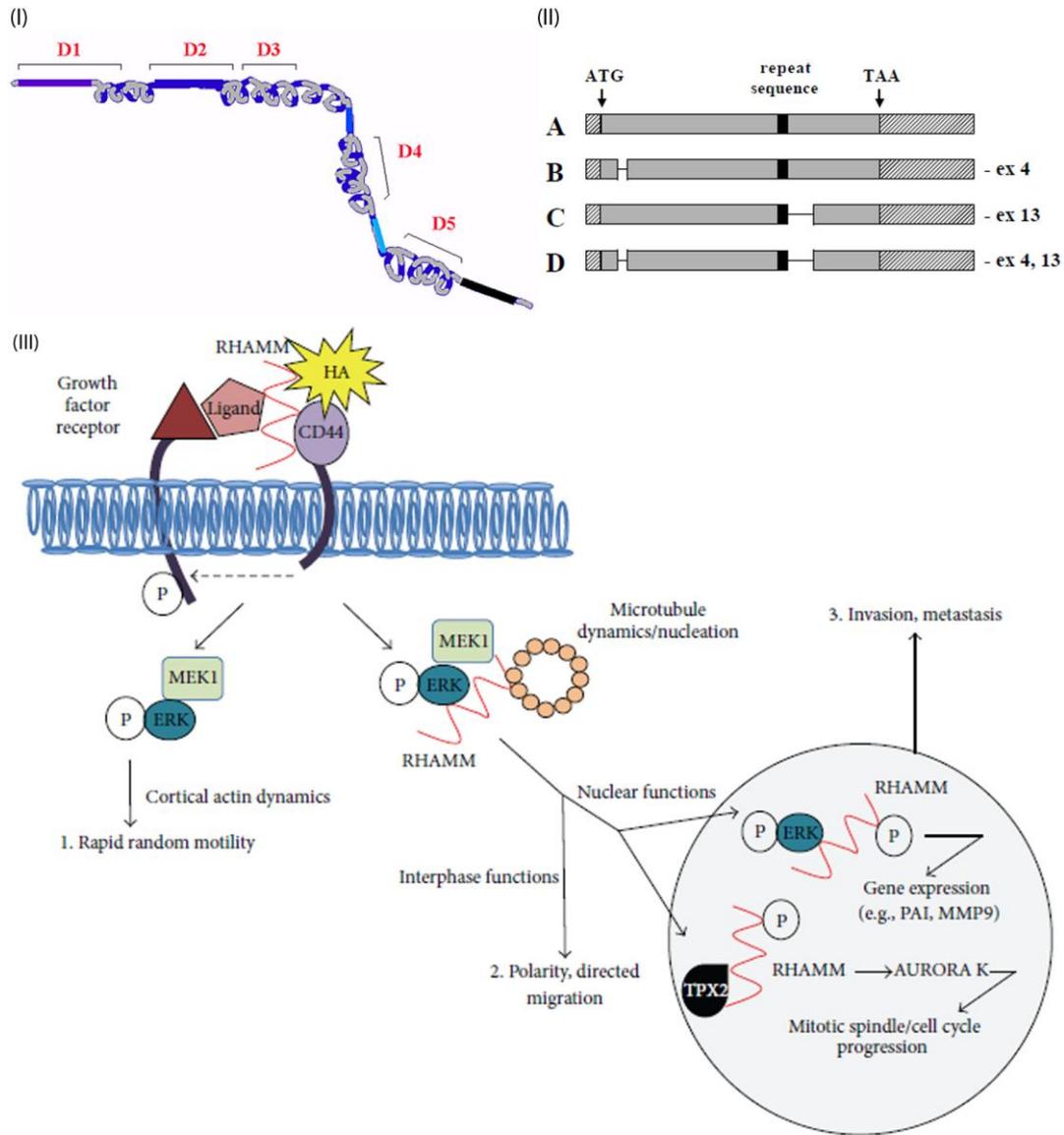


Figura 12. (I) Estructura secundaria y dominios de RHAMM. D1 codifica un dominio proteico que regula negativamente la habilidad de RHAMM de promover la fosforilación de ERK1; D2 codifica un *leucine zipper* imperfecto requerido para mediar la motilidad mediada por RHAMM y la formación de podosomas; D3 es requerido para la interacción de RHAMM intracelular con MEK1; D4 contribuye a la unión de ERK1 a RHAMM intracelular; D5 codifica el motivo de unión a AH responsable de la interacción de AH con RHAMM extracelular y la unión de ERK1 a RHAMM intracelular. (II) Representación esquemática de las isoformas de RHAMM. Las secuencias deletionadas en las isoformas B, C y D (indicadas con línea negra) corresponden a los exones 4 (en D1), 13 y 4+13, respectivamente. Adaptado de (Assmann et al. 1999; Turley and Harrison 1999).

(III) Modelo de señalización mediada por RHAMM. En la superficie celular RHAMM interactúa con CD44, AH y factores de crecimiento y a través de receptores tirosina quinasas activa ERK. Esta señalización puede afectar la migración celular independientemente de RHAMM intracelular. Además, RHAMM intracelular se une a varias proteínas intracelulares y regula la dinámica de microtúbulos, función y estructura de centrosomas y expresión génica (ejemplo, PAI-1 y MMP9) contribuyendo a la progresión del ciclo celular, polaridad y migración celular e integridad del polo mitótico (Tomado de (Tolg et al. 2014)).

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

La transducción de señales a través de etapas secuenciales de fosforilación representa el mecanismo de control más común de la función celular. Múltiples estímulos como factores de crecimiento, hormonas, citoquinas o contacto célula-matriz inician la señalización como producto de la interacción con determinados receptores. Las vías de señalización de Ras-ERK y PI3K-Akt constituyen los principales mecanismos para el control de la supervivencia celular, diferenciación, proliferación, metabolismo y motilidad en respuesta a estímulos extracelulares (Mendoza et al. 2011).

Vía Ras-ERK

ERK es una MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos. En inglés, mitogen-activated protein kinase) y el principal efector de la oncoproteína Ras. Las vías MAPK están compuestas por una quinasa regulada por una GTPasa inicial (MAPKKK), la cual fosforila y activa a una quinasa intermedia (MAPKK), la que a su vez fosforila y activa a una quinasa efectora (MAPK). En la vía ERK-MAPK, esos componentes son Ras GTPasa y las proteínas Raf, MEK y ERK. Una vez que ERK está activada, fosforila proteínas de señalización citoplasmáticas y efectores de punto final como son los factores de transcripción (Mendoza et al. 2011) (Figura 13 A).

Vía PI3K/Akt

Akt, de la cual existen tres isoenzimas, es una serina/treonina quinasa y el nodo central de la vía de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*). La activación de receptores tirosina quinasa (siglas en inglés, RTK) ó acoplados a proteínas G (siglas en inglés, GPCRs) por unión a su ligando inducen el reclutamiento en la membrana y activación de las subunidades de PI3K p85 y p110, respectivamente. PI3K activa y fosforila el sustrato PIP2 y lo convierte en PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5 tri-phosphate*). El aumento en los niveles de PIP3 induce el reclutamiento de Akt en la membrana y posterior activación de la misma por PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase 1*). Como consecuencia, se desencadena la fosforilación secuencial de un amplio rango de proteínas “río abajo” (Figura 13 B) (Manning and Cantley 2007; Knofler 2010; Mendoza et al. 2011).

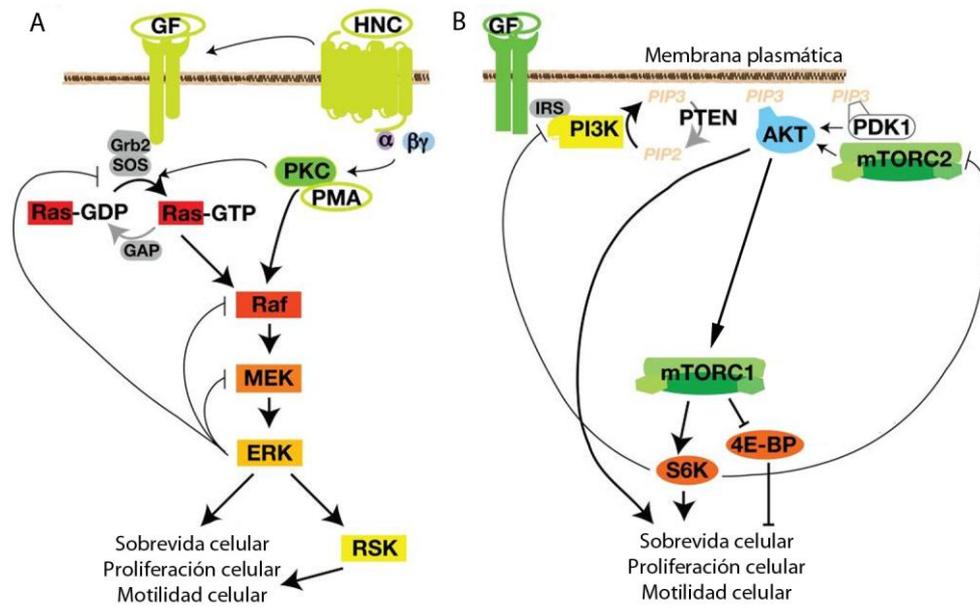


Figura 13. componentes principales de las vías Ras-ERK (a) y PI3K/Akt (b). Adaptado de (Mendoza et al. 2011)

Varios factores afectan la dinámica de las vías de señalización. No sólo dependen de la intensidad y duración de la activación sino que también están reguladas por la fuerza del estímulo y los circuitos de retroalimentación. Incluso, algunos agonistas involucrados en la activación de una de las vías puede superponerse parcialmente con la otra. Además, el grado de activación de las vías depende de la disponibilidad de sustrato, la expresión y localización en la superficie celular de los receptores y la expresión de varias proteínas adaptadoras.

La participación de las vías de Ras-ERK y PI3K/Akt en el control de la migración e invasión se ha descrito en diferentes modelos de trofoblasto humano normal.

La estimulación por diversos factores no sólo inducen la motilidad del trofoblasto a través del aumento en la fosforilación de ERK, como se demostró tras la inhibición de MEK, sino que también algunos de ellos, como EGF (en inglés, *epidermal growth factor*) y hCG, regulan la inducción de MMP-2 y MMP-9, cruciales para la invasión trofoblástica.

La vía de PI3K/Akt también estaría involucrada en el control de la migración y la expresión de MMPs estaría inducida por EGF y hCG. Sin embargo, esta vía ha sido menos estudiada y aunque se ha demostrado que las 3 isoformas de Akt se expresan en el modelo de trofoblasto SGHPL-5, sólo las isoformas 1 y 3 estarían involucradas en la migración basal e inducida por EGF (Qiu 2004; Prast et al. 2008; Knofler 2010; Haslinger et al. 2013).

Papel del AH en la migración celular. Mecanismos de acción.

La migración es un prerequisite indispensable para el establecimiento de las metástasis tumorales. La aparición de éstas empeora el pronóstico de supervivencia del paciente. En determinados casos las metástasis aparecen luego de la remoción quirúrgica del tumor primario e incluso pueden subsistir luego de la regresión espontánea del mismo.

Las matrices extracelulares enriquecidas en AH, al encontrarse altamente hidratadas, son matrices maleables y permiten un comportamiento celular dinámico ya que las células pueden cambiar de forma durante la mitosis y penetrar tejidos durante la migración (Toole 2002).

A través de su interacción con CD44 y RHAMM, el AH promueve la migración e invasión celular. Estos receptores pueden actuar asociados o independientemente uno del otro. Como producto de esta interacción, pueden activarse diversas quinasas entre las que se encuentran PI3K y MAPK. Este mecanismo se ha descrito en células de cáncer de mama, pulmón, esófago, fibrosarcoma y también en células de músculo liso vascular (Goueffic et al. 2006; Twarock et al. 2010; Nikitovic et al. 2013; Li et al. 2015)

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la interacción AH-CD44 induce migración en dos modelos de células linfoides murinas (Alaniz et al. 2004; Cordo-Russo et al. 2010). En el modelo resistente a multidrogas, este efecto depende de PI3K denotando incluso la importancia entre la migración y la quimioresistencia (Cordo-Russo et al. 2010).

Además, hay que destacar que el peso molecular del AH influye en la interacción con estos receptores y como consecuencia en la intensidad de la señal que será traducida y el proceso celular que desencadenará. Se ha reportado que oligosacáridos de AH (oAH), pero no AH de alto peso molecular (-APM), promueve la migración celular a través de RHAMM (Tolg et al. 2014).

Otro evento que promueve la migración es el clivaje de CD44 de la superficie celular facilitando así su de-adhesión del AH durante la migración. Dicho clivaje es mediado por la proteasa asociada a membrana, MT1-MMP. Producto de este clivaje, la región intracelular de CD44 se dirige al núcleo y activa la transcripción de varios genes, incluido aquél que codifica para CD44. Este clivaje requiere la actividad de PI3K (Toole 2004).

Recientemente se reportó que el AH induce proliferación e invasión en células de trofoblasto primario humano, con características de TEV, a través de MAPK y PI3K (Zhu et al. 2013). También, empleando un modelo *in vitro*, se ha reportado que la interacción AH-CD44 subyace al proceso de invasión (Takahashi H et al. 2014). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes sobre la participación de estas moléculas en CC.

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La mayoría de las pacientes con NTG pueden ser curadas con quimioterapia adecuada bajo supervisión médica experta. Sin embargo, algunas pueden presentar recidiva y quimioresistencia. En aquellas pacientes con NTG de alto y ultra alto riesgo, la poliquimioterapia tiene como efecto adverso a largo plazo la inducción de un segundo tumor. En base a esto, y considerando que el AH es capaz de modular varios aspectos de la progresión tumoral como se mencionó previamente, hipotetizamos que un desbalance en la calidad y cantidad del AH podría contribuir a la fisiopatología de ETG. Este conocimiento contribuirá a futuro al desarrollo de nuevos tratamientos ya que hasta el momento el mismo ha sido empírico. Esto se debe a que la biología de ETG no ha sido completamente dilucidada debido a la falta de modelos de estudio.

OBJETIVO GENERAL

El **Objetivo general** de esta tesis consiste en estudiar el papel del ácido hialurónico y sus receptores en los procesos de proliferación, migración y diferenciación celular así como las vías de señalización involucradas, las que podrían ser utilizadas como blancos terapéuticos para el tratamiento de la neoplasia trofoblástica gestacional (NTG).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I. Expresión de AH y sus receptores, CD44 y RHAMM, en muestras de pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional.

- Evaluar la expresión de p57kip2 a fin de caracterizar las MH como completas o no.
- Evaluar la expresión y localización de AH y sus receptores CD44 y RHAMM en muestras de pacientes con ETG (MH, CC y TTSP) respecto de placentas de primer trimestre.

Capítulo II. Estudio del AH, su metabolismo y receptores *In Vitro*

En las líneas celulares de coriocarcinoma humano (JAR, JEG-3 y BeWo) así como en una línea de trofoblasto humano inmortalizado (Swan71):

- Estudiar la expresión de AH y las enzimas encargadas de su metabolismo HAS y Hyals.
- Estudiar la expresión de los receptores para AH: CD44 y RHAMM.

Capítulo III.

Empleando la línea celular de CC humano JEG-3 como modelo *In vitro*.

Parte I. Evaluación del efecto de AH en los procesos de migración, proliferación y diferenciación.

- Evaluar la participación de ácido hialurónico en el proceso de migración celular.
- Evaluar la participación de ácido hialurónico en el proceso de proliferación celular.
- Evaluar el efecto de AH sobre la expresión de los marcadores trofoblásticos: hCG, HLA-G y sincitina-2.

Parte II. Evaluación de los mecanismos involucrados en el efecto del AH sobre la migración celular.

- Evaluar la participación de hCG endógena.
- Evaluar la participación de las vías PI3K/Akt y MAPK mediante el empleo de inhibidores farmacológicos.
- Evaluar la expresión de pERK//ERK y pAkt/Akt
- Evaluar la implicancia de los receptores de AH, CD44 y RHAMM
- Evaluar la expresión de pERK/ERK y pAkt/Akt en el proceso de migración celular inducido por AH a través del receptor involucrado.

MATERIALES Y METODOS

Material Clínico

Los tejidos embebidos en parafina de mola hidatiforme (MH, n=9), coriocarcinoma (CC, n=2), tumor trofoblástico de sitio placentario (TTSP, n=2) y placenta de primer trimestre (PPT, n=4) fueron colectados del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General de Agudos Carlos G Durand, Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron previamente teñidas con hematoxilina y eosina, revisadas y seleccionadas para inmunohistoquímica.

El diagnóstico de MH fue establecido previo al tiempo de evacuación de acuerdo a parámetros bioquímicos (valor de gonadotropina coriónica humana –hCG), ecográficos y clínicos, y confirmado posteriormente por evaluación histológica.

Las muestra de tejido e y la información clínica fueron colectadas con la correspondiente aprobación del Comité de Bioética del Hospital General de Agudos Carlos G Durand.

Inmunohistoquímica para p57kip2

Luego de desparafinar, se realizó recuperación antigénica por calor. Para ello, las muestras se incubaron en buffer citrato de sodio pH 6 durante 30 minutos a 95°C. Posteriormente, para bloquear la actividad peroxidásica endógena, fueron incubadas en 3% H₂O₂ en metanol durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y para bloquear los sitios de unión inespecífica, fueron incubadas con 10% suero fetal bovino (SFB) en PBS durante 30 min a TA. Luego, las muestras fueron incubadas con anti-p57kip2 monoclonal, dilución 1:50 (Kp10, Cell Marque, Rocklin, CA, USA) durante 1 h a 4°C y se lavó dos veces con PBS durante 5 min. Posteriormente, se empleó un sistema biotina-estreptavidina (Vector Laboratories Inc., CA), se lavó y el producto de reacción fue visualizado luego del agregado de diaminobencidina (DAB) (Vector, Peterborough, UK) seguido de una contracoloración con hematoxilina. Como control negativo, se omitió el agregado del anticuerpo primario. Como control positivo interno, se evaluó la tinción nuclear en células de citotrofoblasto extravelloso tal como describe el fabricante. La ausencia de tinción nuclear en células citotrofoblásticas o estromales permite inferir el diagnóstico de mola hidatiforme completa.

Histoquímica para ácido hialurónico

La tinción para AH fue realizada con ligeras modificaciones a como se describiera previamente (Cordo Russo et al. 2009). Posteriormente a la desparafinización, se bloqueó la actividad peroxidásica endógena y los sitios de unión inespecífica tal como se describió anteriormente. Además, se emplearon soluciones bloqueantes para avidina y biotina endógenas (Vector, Peterborough, UK). Luego de lavar, se incubó

con 2 µg/ml de la proteína de unión a hialurónico biotinilada (HABPb) (Calbiochem, Darmstadt, Germany) diluida en PBS con 1% BSA y se incubó toda la noche. Como sistema de amplificación y revelado, se empleó un complejo avidina-peroxidasa (Vector, Peterborough, UK) cuya dilución fue 1: 2500 en PBS y se incubó durante 30 min. El producto de reacción fue visualizado tal como se describió en el párrafo anterior. Para evaluar los sitios de unión inespecífica se realizaron dos tratamientos distintos cuyo resultado fue similar: algunas muestras fueron pretratadas con 50 U/ml hialuronidasa de testículo bovino (Sigma, USA) en PBS a 4°C toda la noche ó, por otro lado, se omitió el agregado de HABPb.

Inmunohistoquímica para CD44 y RHAMM

Las etapas de desparafinización, recuperación antigénica y bloqueo fueron realizadas tal como se describió anteriormente para la inmunohistoquímica para p57kip2. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios para CD44, dilución 1:25, (monoclonal, IM7, ATCC, USA) y para RHAMM, dilución 1:50, (policlonal, E-19, sc-16170, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) toda la noche a 4°C. Las muestras fueron lavadas e incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos conjugados con peroxidasa: anti-rata F(ab)₂ y anti-cabra IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) toda la noche a 4°C y 2 h a TA, respectivamente. Luego, se lavaron nuevamente y se visualizó el producto de reacción tal como se describió para la inmunohistoquímica para p57kip2. Como control negativo, se omitió el agregado de anticuerpos primarios. Como control positivo, se emplearon tejidos de cáncer colorectal y de próstata para CD44 y RHAMM, respectivamente (Gust et al. 2009; Lugli et al. 2010).

Líneas celulares. Condiciones de cultivo.

Se emplearon las líneas celulares de coriocarcinoma humano BeWo, JEG-3 y JAR (gentilmente donadas por la Dra Susana Genti Raimondi, Córdoba, Argentina) y la línea celular de trofoblasto humano inmortalizado, Swan71 (gentilmente donada por la Dra Leonor Roguin, Buenos Aires, Argentina). JEG-3 y JAR fueron cultivadas a 37°C en 5% CO₂ en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 2mM glutamina y 100U/ml penicilina y estreptomina. En iguales condiciones, BeWo fue mantenida en medio de cultivo Ham y Swan71 fue cultivada en medio DMEM/Ham.

Reconstitución de las drogas

El AH de alto peso molecular (AH-APM, $1.3-1.8 \times 10^6$ Da) y el de bajo peso molecular (AH-BPM, $2,5-4,5 \times 10^5$ Da), donados por Farmatrade Argentina (CPN spol.s.r.o República Checa), fueron reconstituidos en solución fisiológica a una concentración de 5mg/ml. Los inhibidores de MEK y PI3K: UO y Ly294002 (Sigma-Aldrich, USA), respectivamente, se reconstituyeron en DMSO.

Preparación de oligosacáridos de ácido hialurónico (o-AH)

La preparación de o-AH se realizó según lo descrito anteriormente (Alaniz et al. 2006; Lompardía et al. 2013). Brevemente, AH-BPM (5mg/ml) fue digerido enzimáticamente con hialuronidasa de testículo bovino (Sigma, USA) empleando 500U/mg AH a 37°C durante 24 h. La Hyal cliva la unión N-acetil-D-glucosamina β (1 \rightarrow 4) D-ácido glucurónico. La reacción se detuvo por calentamiento a 100°C durante 5 min. Se obtuvo una mezcla de o-AH de entre 4 y 14 unidades disacarídicas determinada por cromatografía de intercambio aniónico de alta performance con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Para separar los oAH de la Hyal desnaturalizada se utilizó Centricon® de 10KDa de poro dado que la Hyal presenta un peso molecular de 60 KDa y los oAH de 830-2900 Da.

Cuantificación de AH mediante ensayo tipo ELISA

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta obtener una confluencia igual a 50%. Se recolectó el sobrenadante y se centrifugó. La cantidad de AH se cuantificó mediante un ensayo tipo ELISA competitivo similar a como se describiera previamente (Lompardía SL et al 2013). Brevemente, placas de 96 pocillos fueron cubiertas con 100ug/ml AH-APM y se incubaron toda la noche a 4°C. Las muestras y las diluciones estándar de AH-APM fueron incubadas con 0,5ug/ml de HABPb toda la noche a 37°C. Luego, se bloqueó la placa con 3% BSA, se sembraron las muestras y se incubaron durante 4 hs a 37°C. La unión de HABPb a la placa se determinó empleando un sistema avidina-peroxidasa. Las concentraciones de las muestras fueron calculadas de una curva estándar.

Análisis cualitativo de la expresión de ARNm de CD44, RHAMM, HAS, Hyals, HLA-G y syncitin-2 por RT-PCR

Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó en las líneas celulares utilizando TRIzol (Invitrogen, USA) según las indicaciones del fabricante. El ARN fue disuelto en agua libre de ARNasas y analizado espectrofotométricamente para determinar la concentración de ARN y pureza ($DO_{260/280} = 1,7-2$). Se realizó la transcripción reversa del ARNm (1ug) utilizando la enzima M-MLV RT, hexámeros al azar, inhibidor de ARNasa, 2,5mM MgCl₂ y 1mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP (Promega, USA) durante 1h a 37°C y luego 5min a 55°C para inactivar la enzima.

Las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231, y queratinocitos humano, HaCat, sólo fueron empleadas para extraer ARNm como control positivo en el análisis de la expresión de las enzimas que participan del metabolismo del ácido hialurónico (Udabage 2005; Averbek et al. 2006).

RT-PCR

La amplificación de los genes de interés se realizó con la enzima Taq-ADN polimerasa (Promega, USA) utilizando primers específicos (ver tabla i) en un termociclador Perkin-Elmer 480. El gen beta-actina se utilizó como control de la amplificación. Luego de una desnaturalización inicial de 5min a 94°C, se realizaron 35 ciclos de PCR: 30seg a 94°C, 30seg a la temperatura de annealing (Ta) que depende de la composición de bases de los primers y 30seg a 72°C, seguido de la extensión final de 5min a 72°C. Los amplicones obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (2,5%) teñidos con Gel Red (Biotium) y fueron visualizados en un transiluminador con luz UV (Cole Permer Instrumental Co., USA).

Tabla i. Secuencia de primers empleados en RT-PCR.

	Secuencia Sentido (5´-3´)	Secuencia Antisentido (3´-5´)	Tm	bp
CD44	AAGACATCTACCCAGCAAC	CCAAGATGATCAGCCATTCTGG	52	324
RHAMM	TCCTAAGGCGCCCTTGAAAC	TGCAGCATTTAGCCTTGCTT		v1 361 v2 358 v3 313
HAS2	GCCGGTCGTCTCAAATC	TCTCACAATGCATCTTGTTTCAGC	55	133
HAS3	CTCTACTCCCTCCTCTATATGTC	AACTGCCACCCAGATGGA	50.7	150
Hyal1	AAGCCCTCCTCCTTAACC	AGCCAGGGTAGCATCGAC	55	141
Hyal2	TTGTGAGCTTCCGTGTTTCAG	GTCTCCGTGCTTGTGGTGTA	53.3	217
HLA-G	GCTACTCTCAGGCTGCAATGTGAA	CACAGGGGTGGGCTGGTCTCT	57	115
Sincitina-2	ATCCAGCCTCGCCAGAGAATGG	GCTTGGGCGTCCCTGGCAAAA	58	422
Beta actina	AGCCTCGCCTTTGCCGATCC	ACCATCACGCCCTGGTGCCT	60	185

Análisis de expresión proteica

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares hasta obtener una confluencia aproximada de 50%. Luego de desechar el sobrenadante, se lavó 2v con PBS 1X y se fijó con 4% paraformaldehído en PBS durante 15 min a TA. Luego, se bloqueó con una solución de SFB al 10% en PBS durante 15min. Se incubó con el anticuerpo específico para RHAMM, dilución 1:50, (policlonal, E-19, sc-16170, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) durante 30min a TA en cámara húmeda. Se lavó 3 veces con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con fluorocromo: anti-cabra IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) durante 30min a TA en cámara húmeda. Finalmente, se lavó, incubó con 1ug/ml de DAPI durante 15min a TA, se realizó el montaje en portaobjeto con el medio de montaje para fluorescencia Mowiol (Sigma, USA) y se dejó secar hasta el día siguiente a TA. La especificidad de la tinción fue evaluada mediante los controles de autofluorescencia (sin anticuerpos) y control de conjugado (sin agregado de anticuerpo primario). Las células fueron analizadas utilizando microscopía de epifluorescencia en un microscopio Olympus BX51 (America Inc.).

Preparación de los extractos celulares

Para analizar la expresión de las diferentes proteínas, las células fueron sembradas y cultivadas en placas de 100mm hasta aproximadamente 50% de confluencia y luego fueron tratadas o no con 500ug/ml AH-APM, AH-BPM, UO (4uM), LY294007 (10uM) o

sus combinatorias durante 2 y 24 h a 37°C en una atmósfera de 5%CO₂.

Posteriormente fueron cosechadas empleando scraper y lisadas con buffer hipotónico (20mM tris pH 8.0, 150mM NaCl, 100mM NaF, 1mM ortovanadato de sodio pH 10.0, 10% glicerol, 1%nonidet P-40, 1mM PMSF y 20ug/ml aprotinina) durante toda la noche a -40°C. Luego de centrifugar a 13000 rpm durante 15 min a 4°C, se colectaron los sobrenadantes, cuantificaron mediante la técnica de Bradford, alicuotaron y conservaron a -40°C.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y western blot.

Los extractos se mezclaron con buffer de siembra con 2% β-mercaptoetanol y se sembraron en geles de SDS-poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Osmonics Inc., Gloucester, MA) que se bloqueó con 3% leche descremada durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar, se incubaron con anticuerpos específicos para las diferentes proteínas (ver tabla ii) en TBS con 1% leche descremada durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se lavaron las membranas y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con peroxidasa (ver tabla) en TBS con 1% leche descremada durante 2 h a 37°C. Luego, las membranas se lavaron y las proteínas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, SCBT, USA) por exposición a las placas de autoradiografía. Las placas fueron fotografiadas y se realizó el análisis densitométrico utilizando el programa Scion Image (Scion Corporation) de modo que el área de cada pico fue proporcional a la cantidad de proteína presente.

Tabla ii. Anticuerpos empleados en técnica Inmunoblotting.

Proteína	Fuente	Anticuerpo primario		Anticuerpo conjugado	
		Dilución de trabajo	Nro catálogo /Empresa	Dilución de trabajo	Empresa
blanco					
CD44	Rata	1/500		1/1000	SCBT
pERK	Conejo	1/500	SC-16170 SCBT	1/10000	Sigma
ERK	Conejo	1/500	SC-16170 SCBT	1/10000	Sigma
pAkt	Conejo	1/500	SC-16646 SCBT	1/10000	Sigma
Akt	Conejo	1/500	SC-8312 SCBT	1/10000	Sigma
B-actina	Cabra	1/800	SC-1615 SCBT	1/5000	SCBT

Análisis de la migración celular

Ensayo de la herida.

Células JEG-3 se sembraron en placas de 24 pocillos hasta obtener una monocapa de células. Luego se realizó una herida a lo largo de la línea media en el fondo del pocillo con un tip estéril de 200 μ l. Las células se lavaron con PBS estéril y se trataron con diluciones seriadas de AH de distinto peso molecular (62,5 – 500 μ g/ml) o con medio de cultivo (control), durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Las diluciones se realizaron en RPMI 10% SFB. Las monocapas se fotografiaron a tiempo 0 h y 24 h post estímulo con una cámara fotográfica adosada a un microscopio. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa T-scratch (Gebäck et al. 2009). Se calculó el porcentaje del área libre de células y se expresó el resultado como índice de migración respecto del control:

$$\text{Índice} = \frac{[(100 - \% \text{ área})_{t=24\text{hs}} - (100 - \% \text{ área})_{t=0\text{hs}}]_{\text{tto}}}{[(100 - \% \text{ área})_{t=24\text{hs}} - (100 - \% \text{ área})_{t=0\text{hs}}]_{\text{basal}}}$$

Cada ensayo se realizó por duplicado y de cada pocillo se tomaron al menos 3 fotografías.

Migración a través de filtros Transwell.

Para evaluar la migración de células JEG-3 hacia un gradiente de concentración se emplearon filtros tipo Transwell. Para ello se sembraron 1×10^5 células en un volumen de 100 μ l en el compartimento superior de filtros de membrana de policarbonato (BD) con tamaño de poro 8 μ m en una placa de 24 pocillos (Costar). En el compartimento inferior de cada pocillo se agregó un volumen de 500 μ l de medio con 500 μ g/ml AH-APM, 250 - 500 μ g/ml AH-BPM ó RPMI 10% SFB (control). Los filtros se incubaron durante 24 h para permitir la migración. Finalizada la incubación se lavo el compartimento superior de la membrana, y con un hisopo se eliminaron las células que no migraron. Las células adheridas a la cara inferior del filtro se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a TA. Luego los filtros se lavaron PBS y los núcleos de las células se tiñeron con X de DAPI durante 15 min a TA. Para calcular el porcentaje de células que migraron se tomaron fotografías de los filtros (al menos 10 campos), se contaron las células y se calculó el porcentaje de migración respecto del control:

$$\% \text{ migración} = \frac{100\% \times \text{promedio}_{\text{tto}}}{\text{promedio}_{\text{basal}}}$$

Para evaluar el rol de hCG en la migración hacia 500ug/ml AH-APM, las células fueron tratadas con AcMo anti hCG (10 - 20ug/ml) o con IgG murina (control de isotipo) durante 30 min a 4°C antes del ensayo de migración.

Para evaluar el rol de CD44 y RHAMM en la migración hacia 500ug/ml AH-APM, las células fueron tratadas con anti CD44 (Km81, 10ug/ml), anti RHAMM (E-19, 10ug/ml) o con IgG de cabra (control de isotipo) con durante 30 min a 4°C antes del ensayo de migración.

Para evaluar el rol de MEK y PI3K en la migración hacia 500ug/ml AH-APM, las células fueron tratadas con los respectivos inhibidores UO126 (4uM), Ly249002 (10uM) ó DMSO (control) durante 30 min a 4°C antes del ensayo de migración.

Proliferación celular

La proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de [3H]-t imidina siguiendo el protocolo previamente descrito con ligeras modificaciones (Lompardía et al. 2013). Para ello se sembraron 5x10³ células/pocillo en una placa de 96 pocillos en medio RPMI1640 con 10% SFB. Algunos pocillos se estimularon con distintas concentraciones (62,5 – 500ug/ml) de AH de distinto peso molecular (AH-APM, -BPM, o-AH) mientras que a otros pocillos se agregó solo medio de cultivo como control de la proliferación basal. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 48 y 72 horas. Seis horas antes de finalizar el ensayo se agregó a todos los pocillos 1uCi [3H]-timidina. Finalizada la incubación las células fueron cosechadas, lisadas y la radioactividad se midió empleando un contador de centello líquido (Beckman, MD). Los tratamienos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se expresaron como el promedio de las cuentas por minuto (cpm) de [3H]-timidina incorporada por las células para cada tratamiento. Las células sin tratar representan el 100%.

Cuantificación de hCG total

Se evaluó el efecto de AH sobre la secreción de hCG por células JEG-3. Para ello se sembraron 150.000 células en placas de 6 pocillos y se incubaron hasta alcanzar el 50% de confluencia aproximadamente. Luego, las células fueron tratadas con 500 µg/ml de AH-APM, -BPM u oAH, o se dejaron sin estimular (control) durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Finalizada la incubación los sobrenadantes se cosecharon, se centrifugaron para eliminar restos celulares y se conservaron a -40°C para la posterior cuantificación de hCG. Por otro lado, las células se lisaron con TRizol (Invitrogen, USA), y el ADN se extrajo siguiendo las indicaciones del fabricante.

El ADN se disolvió en buffer TE pH 8 y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro para determinar la concentración y pureza ($DO_{260/280} = 1,7-2$). Para cuantificar hCG se empleó el inmunoensayo electroquimioluminiscente (ECLIA) Elecsys hCG+ β en el inmunoanalizador cobas e 411 (Roche). Este método permite detectar hCG, hCG hiperglicosilada, hCG hiperglicosilada nicked y β -hCG (Cole et al. 2011). Brevemente, la muestra se incubó con un Ac monoclonal biotinilado anti-hCG y un Ac monoclonal anti-hCG marcado con quelato de rutenio. Una vez formados los complejo inmune se agregaron micropartículas recubiertas de estreptavidina, y el complejo formado se fijo a una fase sólida por interacción entre biotina-estreptavidina. Posteriormente se aplicó una corriente eléctrica definida que produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión se mide en un fotomultiplicador. Los resultados se obtuvieron mediante el empleo de una curva de calibración de concentraciones conocidas de hCG.

Los ensayos se realizaron por duplicado y la cantidad de hCG se relativizó al contenido de ADN en cada pocillo. Los resultados se expresaron como mUI hCG/ ug ADN.

Análisis estadístico

La significancia estadística entre grupos fue evaluada empleando one way-ANOVA y las medias fueron comparadas mediante el test de Dunnett (ensayo de la herida y proliferación celular) o el test de Bonferroni (ELISA, ensayo transwell y análisis densitométrico). Las diferencias entre grupos fueron considerados significativos cuando $p < 0,05$. El análisis se realizó empleando el programa Prism 4 (Graph Pad, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

CAPITULO I

EXPRESIÓN DE ACIDO HIALURONICO, CD44 Y RHAMM EN MUESTRAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

Existen escasos precedentes sobre la evaluación de la expresión de AH y sus receptores en muestras de tejido de entidades de ETG.

En esta primera etapa del trabajo se evaluó la expresión y localización de AH y sus receptores, CD44 y RHAMM, en muestras de tejido de pacientes con mola hidatiforme, coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario empleando como contraparte muestras de tejido de placenta de primer trimestre.

Expresión de p57kip2

En primer lugar, se evaluó la expresión de p57kip2 en MH mediante inmunohistoquímica a fin de clasificarlas en mola completa o parcial. Tal como puede observarse en la figura 14A, se encontró expresión nuclear en las células stem citotrofoblásticas así como en las células estromales en las muestras analizadas de placenta de primer trimestre. Por otro lado, como puede observarse en la figura 14B, se encontró que ninguna de las muestras de MH analizadas presentó tinción nuclear en células citotrofoblásticas ni en células estromales.

Dicho resultado permitió clasificar tales muestras como MH completas.

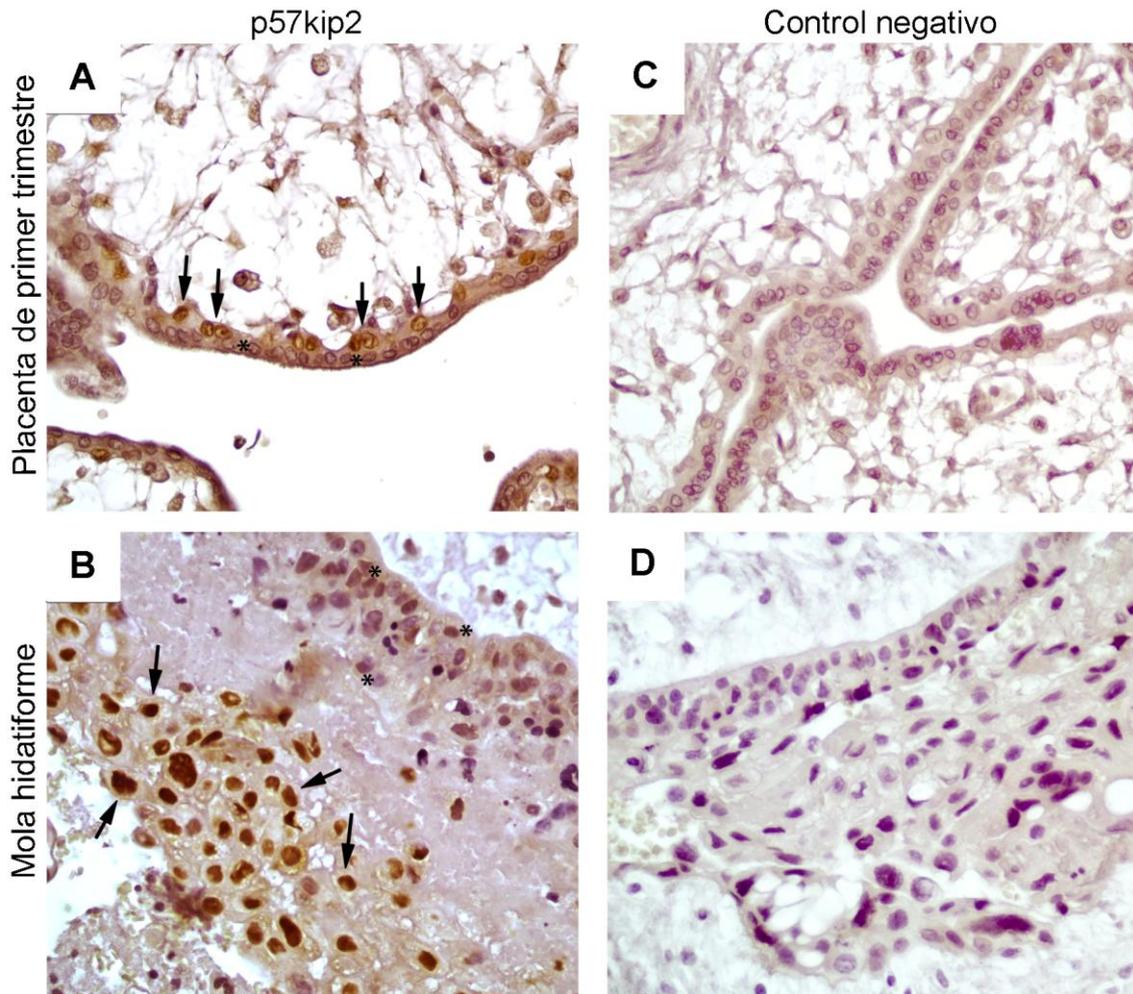


Figura 14. Inmunolocalización de p57kip2. (A) Placenta de primer trimestre. Se observa expresión nuclear positiva en citotrofoblasto (CT) (flecha). En contraste, sincitiotrofoblasto (ST) es negativo (asterisco). (B) MHC. Se observa expresión negativa en CT y ST (asterisco). Como control positivo interno se evaluó la expresión nuclear de TEV (flecha). (C, D) Respectivos controles negativos. Magnificación 400X.

Expresión y localización de AH

La presencia y localización de AH se evaluó mediante histoquímica. Como se observa en la Figura 15, se encontró expresión de AH en todas las muestras analizadas. Tanto en placenta de primer trimestre como en MHC se detectó tinción positiva en el estroma veloso (Figuras 15A y 15B). Dicha tinción mostró una apariencia fibrilar compacta en MHC diferente al observado en placenta de primer trimestre. Además, se halló expresión de AH en la membrana apical y basal de las vellosidades en MHC (Figura 15B, recuadro) siendo simultánea en algunas áreas del tejido. Por el contrario, no se halló tinción en las membranas velositarias de placenta de primer trimestre (Figura 15A, recuadro).

En tumores trofoblásticos, se encontró intensa tinción positiva para AH en el estroma tumoral mientras que no se halló tinción en las células tumorales ni de CC ni de TTSP (Figuras 15C y 15D, respectivamente). Como control positivo se empleó la expresión de AH en el estroma de vellosidades de primer trimestre previamente reportado por otros autores.

Estos resultados se resumen en la Tabla IV.

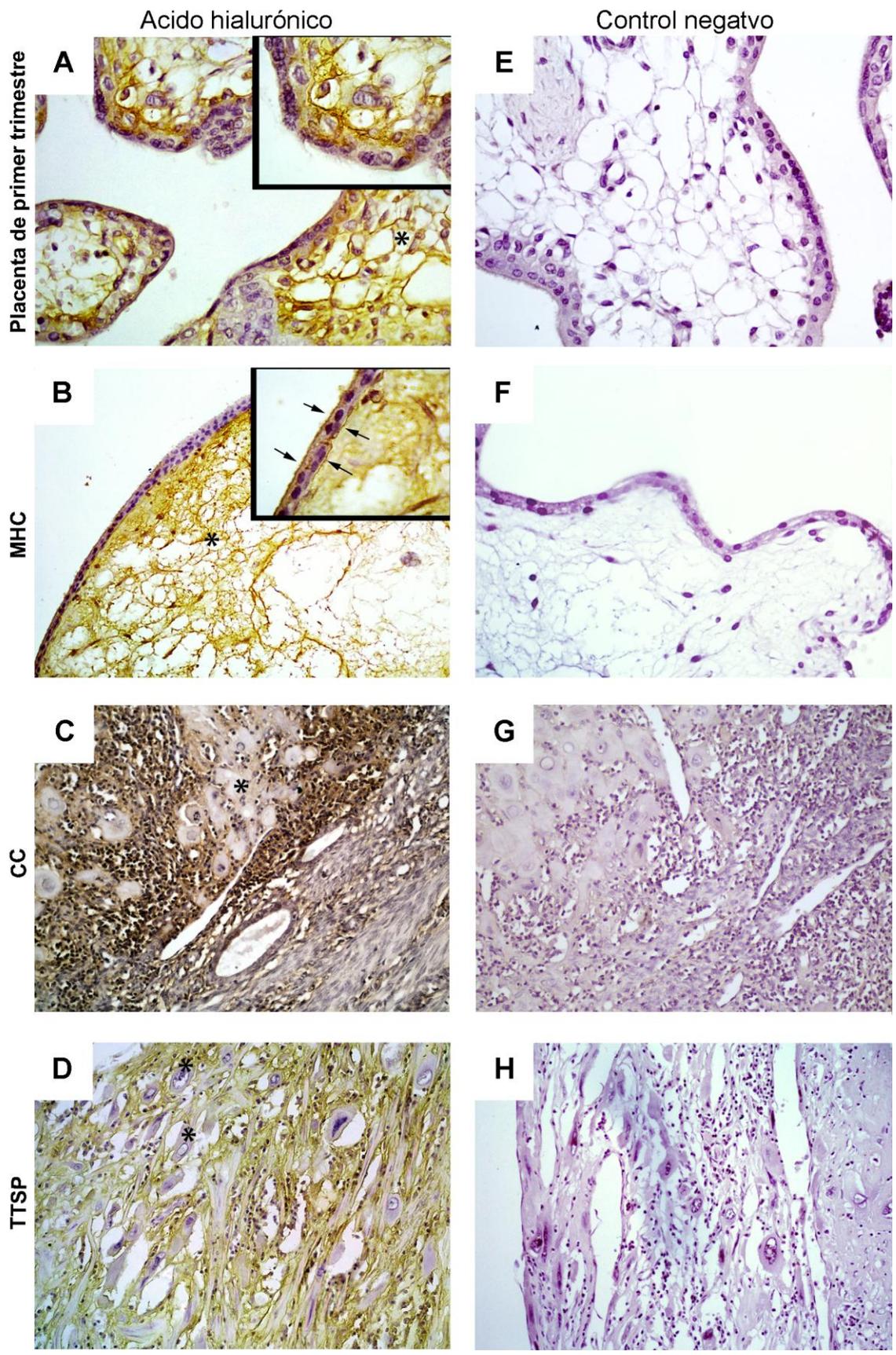


Figura 15. Localización de AH. (A) Placenta de primer trimestre. Se encontró expresión positiva en estroma veloso (asterisco). (B) MHC. Se halló expresión positiva en estroma veloso (asterisco) así como en las membranas apical y basal de vellosidades (flechas, recuadro). (C) CC y (D) TTSP: Se observó tinción positiva en el estroma tumoral mientras que las células tumorales no expresaron AH (asterisco). (E, F, G, H) Respectivos controles negativos. Magnificación 200X (recuadro 1000X).

Tabla IV. Localización de AH en placenta de primer trimestre y entidades de ETG.

	Célula Trofoblástica	Membrana vellositaria	Estroma veloso	Estroma no veloso
Placenta de Primer Trimestre	-	-	+	-
MHC	-	+	+	
CC	-			+
TTSP	-			+

MHC: mola hidatiforme completa, CC: coriocarcinoma, TTSP: tumor trofoblástico de sitio placentario. + Presente, - Ausente. *: algunas zonas muestran localización simultánea en membrana apical y basal.

Expresión y localización de CD44

La presencia y localización de CD44 se evaluó mediante inmunohistoquímica. Se halló tinción positiva para el receptor CD44 en el estroma tumoral en muestras de CC (Figura 16C) pero no en las células tumorales. En MHC se halló expresión débil de CD44 en el estroma (Figura 16B) pero no en las células trofoblásticas. Por otro lado, no se encontró expresión de dicha proteína en el estroma ni en células trofoblásticas de placenta de primer trimestre ni TTSP (Figura 16A y 16D). Como control positivo se emplearon muestras de adenocarcinoma de colon cuyas células tumorales mostraron expresión de CD44 en la membrana celular.

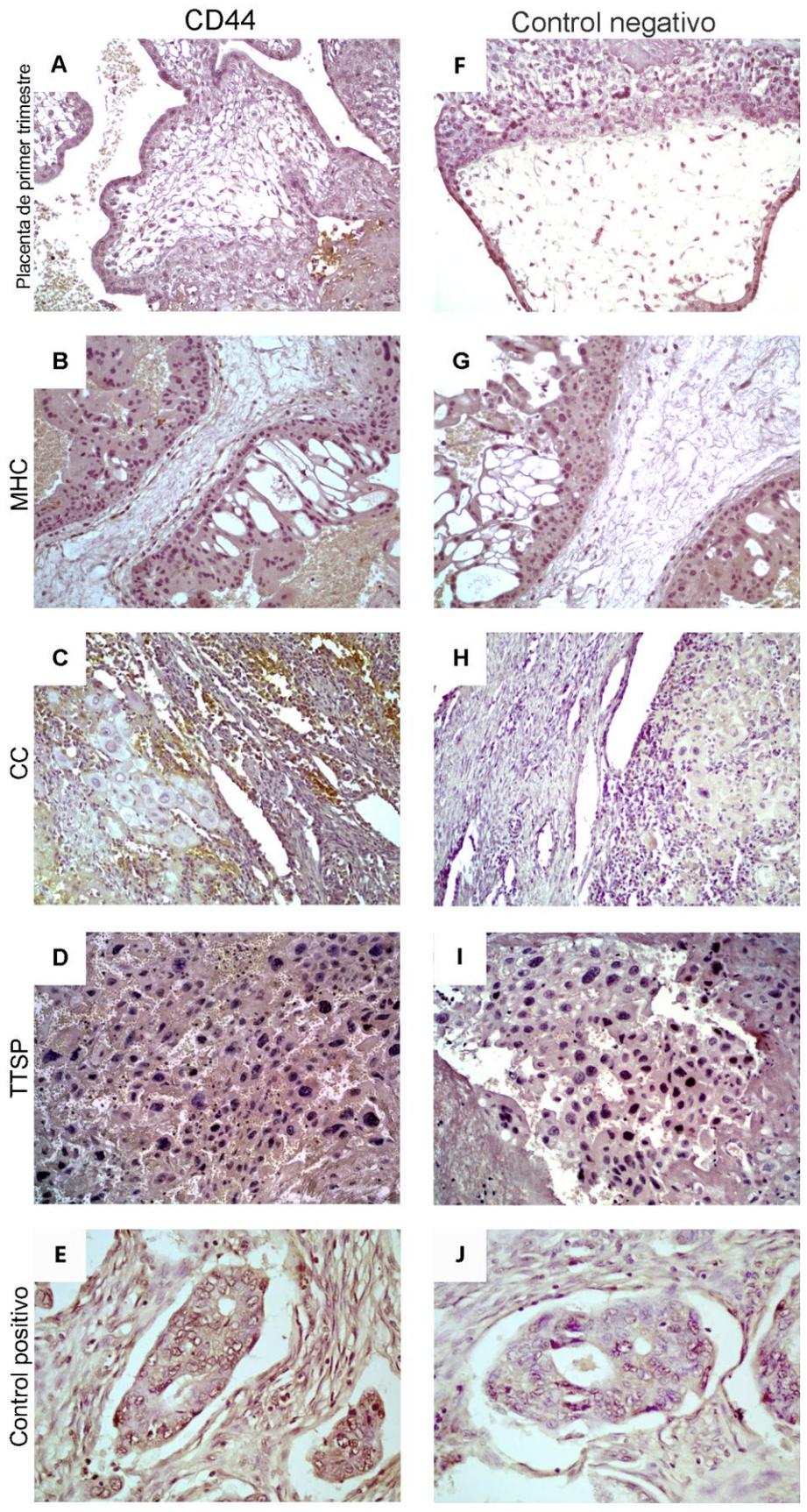


Figura 16. Localización de CD44. En: (A) placenta de primer trimestre y (D) TTSP: no se halló expresión de CD44. (B) MHC. Se encontró débil expresión en el estroma. (C) CC. Se encontró expresión de CD44 en el estroma tumoral. (E) Adenocarcinoma de colon como control positivo. (F, G, H, I, J) Respectivos controles negativos. Magnificación 200X.

Expresión y localización de RHAMM

La localización de RHAMM se evaluó mediante inmunohistoquímica. Se halló tinción positiva en el citoplasma de células stem citotrofoblasto vellosos y en la membrana celular de trofoblasto extraveloso tanto en placenta de primer trimestre (Figura 17A y 17B) como en MHC (Figura 17C). Es interesante destacar que algunas células citotrofoblásticas también presentaron expresión de RHAMM en membrana en MHC a diferencia de las muestras de placenta de primer trimestre donde sólo se encontró tinción citoplasmática.

En tumores trofoblásticos, se encontró tinción positiva para RHAMM en la superficie celular en muestras de coriocarcinoma (Figura 17D) y en el núcleo de algunas células en muestras de TTSP (Figura 17E).

Estos resultados se resumen en la Tabla V.

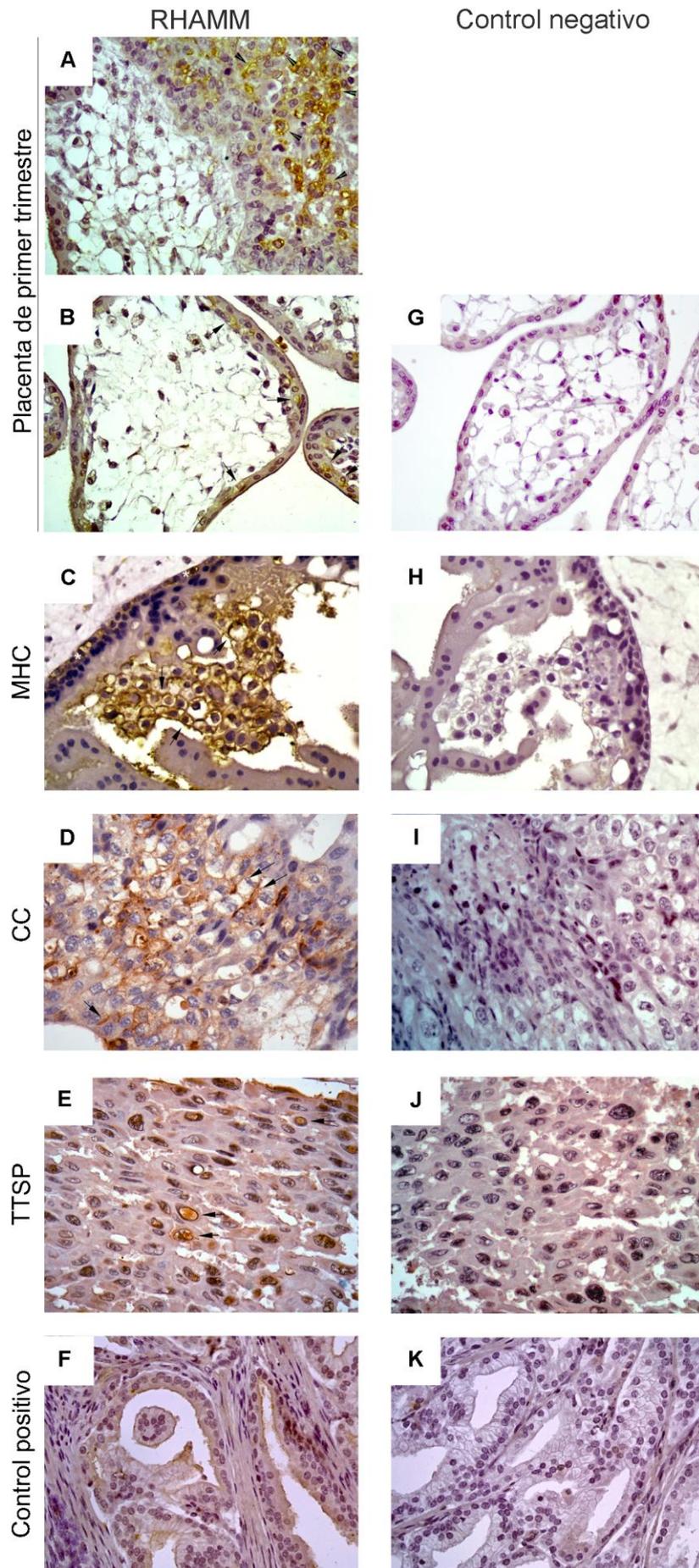


Figura 17. Inmunolocalización de RHAMM. Placenta de primer trimestre. (A) Se halló expresión de RHAMM en membrana celular de TEV (punta de flecha) y (B) en citoplasma de CT (flecha). (C) MHC. Se observó expresión de RHAMM en membrana celular de TEV (flecha) y citoplasma de CT (asterisco blanco). (D) CC. Se halló expresión de RHAMM en la membrana de células tumorales (flecha). (E) TTSP. Se halló expresión nuclear en algunas células tumorales (flecha). (F) Cáncer de próstata como control positivo. (G, H, I, J, K, L) Respectivos controles negativos. Magnificación 400X.

Tabla V. Localización de RHAMM en placenta de primer trimestre y entidades de ETG.

	Subpoblación de trofoblasto	Patrón de expresión			
		Membrana	Citoplasma	Núcleo	Células estromales
Placenta de Primer trimestre	CT	-	+	-	-
	TEV*	+	+	-	
	ST	-	-	-	
MHC	CT*	+	+	-	+
	TEV	+	-	-	
	ST	-	-	-	
CC	TEV	+	-	-	
	ST	-	-	-	
TTSP		-	-	+	

CT: citotrofoblasto, TEV: trofoblasto extraveloso, ST: sincitiotrofoblasto, MHC: mola hidatiforme completa, CC: coriocarcinoma, TTSP: tumor trofoblástico de sitio placentario. +, Presente, -, Ausente. *: algunas células muestran localización simultánea.

Conclusiones parciales

Los resultados demostrados en este Primer Capítulo nos permiten concluir que existe una expresión diferencial de AH, CD44 y RHAMM en las distintas subpoblaciones trofoblásticas así como en las entidades de ETG estudiadas.

- Tanto en Placenta de Primer Trimestre como en MHC se observa expresión de AH en el estroma veloso. Sin embargo en MHC, además, se observa expresión de AH en las membranas apical y basal de las vellosidades. Por otro lado, sólo se observa expresión de CD44 en células estromales en MHC. En cambio, se observa expresión de RHAMM en el citoplasma de la capa stem citotrofoblástica y en membrana en células TEV en ambas entidades. Llamativamente en algunas células de la capa CT en MHC también se observa expresión en membrana.
- En CC se observa expresión de AH y CD44 en estroma pero no hay expresión de dichas moléculas en las células tumorales donde en cambio hay expresión superficial de RHAMM.
- En TTSP se observa expresión de AH en el estroma pero no se observa expresión de AH ni CD44 en las células tumorales. En cambio, hay tinción positiva para RHAMM en el núcleo de algunas células.

Es decir, existe una localización diferencial de RHAMM en las células tumorales de las distintas entidades neoplásicas.

En resumen, si bien es necesario estudiar un número mayor de casos, nuestros resultados sugieren que tanto el AH como sus receptores, CD44 y RHAMM, podrían participar en el proceso de placentación así como también en los procesos fisiopatológicos, tanto en MH como en CC y TTSP.

CAPITULO II

ESTUDIO DEL ACIDO HIALURONICO, SU METABOLISMO Y RECEPTORES EN LINEAS CELULARES DE CORIOCARCINOMA HUMANO

Los resultados descritos en el Capítulo I de esta tesis nos condujeron a analizar la implicancia del AH en la biología de las células de coriocarcinoma.

En primer lugar, se caracterizó la expresión de AH y su metabolismo así como los receptores de AH, CD44 y RHAMM, en líneas celulares de coriocarcinoma humano JEG-3, JAR y BeWo, y en la línea celular de trofoblasto humano inmortalizado Swan71.

Evaluación de la síntesis de AH *in vitro*

Análisis de la secreción de AH

El ácido hialurónico una vez sintetizado puede ser liberado al medio extracelular o retenido en la cara externa de la membrana celular. Para determinar si las células secretan AH al medio extracelular se evaluaron los sobrenadantes de cultivo de las células mencionadas anteriormente por un ensayo ELISA tipo competitivo.

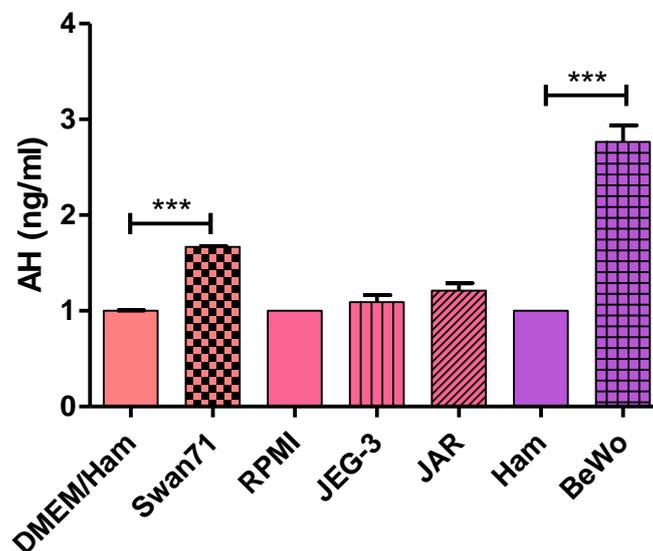


Figura 18. Secreción de AH en el sobrenadante de líneas celulares. Las barras representan la media del índice respecto a sus respectivos controles +/- SEM (Swan71 vs DMEM/Ham, JAR y JEG-3 vs RPMI, BeWo vs Ham) (n=3 por grupo). *** P<0,001.

Tal como se observa en la Figura 18, entre las líneas de CC estudiadas, la línea celular BeWo secreta AH (257 +/- 129 ug/ml, p<0,001) al medio extracelular mientras

que JAR y JEG-3 (101 +/- 19 ug/ml y 142 +/- 21 ug/ml, respectivamente. $p > 0,05$) no presentan cambios en la concentración de AH respecto de su control. Además, también se encontró AH en el sobrenadante de la línea celular Swan71 (388 +/- 159 ug/ml, $p < 0,001$) significativamente mayor a su respectivo control.

Evaluación de la expresión de ARNm de HAS y Hyals

Posteriormente, se decidió evaluar cualitativamente el perfil de expresión de ARNm de las enzimas encargadas de la síntesis (HAS) y degradación (Hyals) del AH en dichas líneas celulares.

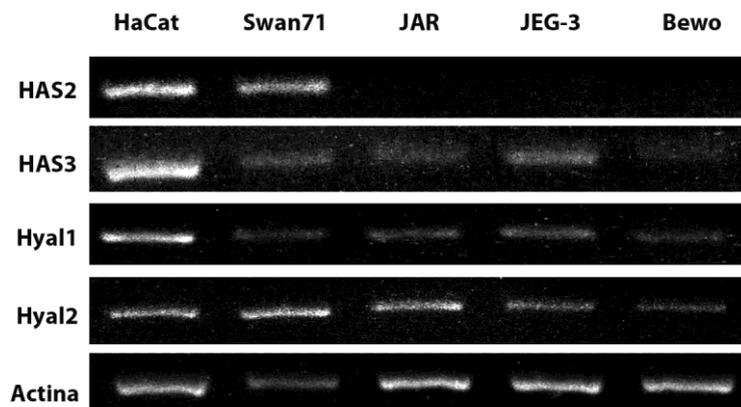


Figura 19. A) Expresión de ARNm de HAS y Hyals por RT-PCR. β -actina fue empleado como control de amplificación. Como control positivo se empleó la línea celular de queratinocitos humanos HaCat.

Como se observa en la figura 19, tanto la línea celular de trofoblasto inmortalizado Swan71 como las líneas celulares de CC expresan ARNm para HAS3, Hyal1 y Hyal2. En tanto que el ARNm para HAS2 es expresado en Swan71 pero no en las líneas de CC.

Este resultado en conjunto con el hallado previamente por ELISA nos permite sugerir que no existe correlación entre el nivel de ARNm de HAS y Hyals y la secreción de AH en las líneas de CC.

Evaluación de la expresión de receptores de AH

Luego, evaluamos la expresión de los principales receptores para ácido hialurónico asociados a neoplasias, CD44 y RHAMM.

Análisis de la expresión de CD44

CD44 es el principal receptor para ácido hialurónico. La expresión proteica de CD44 se analizó en las tres líneas de coriocarcinoma humano: JAR, JEG-3 y BeWo; y en la línea de trofoblasto humano inmortalizado, Swan17.

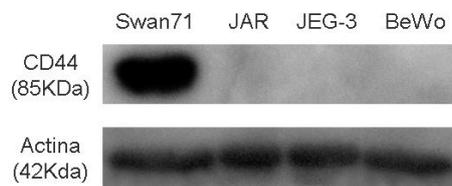


Figura 20. Expresión de CD44. La expresión de CD44 fue evaluada por western blot en extractos totales. La expresión de actina fue utilizada como control de carga. Como control positivo se empleó la línea murina LBR-. Resultados similares fueron obtenidos en tres experimentos independientes.

Tal como puede observarse en la figura 20, la línea celular Swan71 expresa CD44 mientras que dicha expresión es negativa en las líneas celulares de CC.

Para corroborar este resultado evaluamos la expresión de ARNm de CD44 en dichas líneas. Para ello, se extrajo el ARN total, se realizó la retrotranscripción y posterior PCR con primers específicos para CD44.

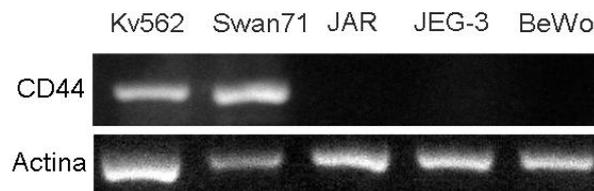


Figura 21. Expresión de ARNm de CD44. La expresión de ARNm fue evaluada empleando RT-PCR. La expresión de actina fue utilizada como control de amplificación. La expresión de K562 fue empleada como control positivo. Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

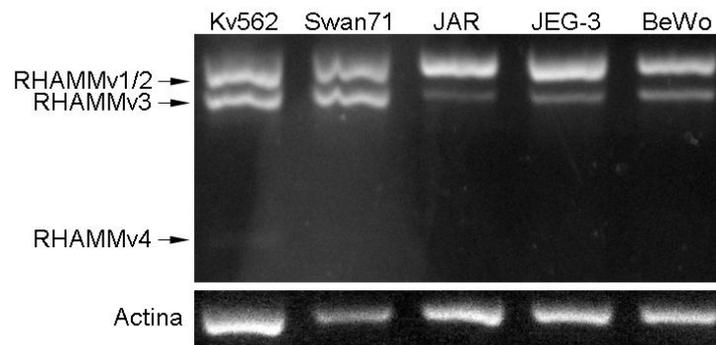
Como se observa en la figura 21, en la línea Swan71 se detectó la expresión de ARNm para CD44 siendo negativa dicha expresión en las líneas de coriocarcinoma.

Estos resultados avalan los anteriormente obtenidos para la expresión proteica de CD44 demostrando que ninguna de las líneas de coriocarcinoma expresa dicha proteína.

Análisis de la expresión de RHAMM

Para el estudio de RHAMM en primer lugar evaluamos la expresión del ARNm por RT-PCR. Para ello, se alinearon las 4 secuencias de ARNm de las distintas variantes de RHAMM y se diseñó un par de primers capaz de detectar las mismas.

A



B

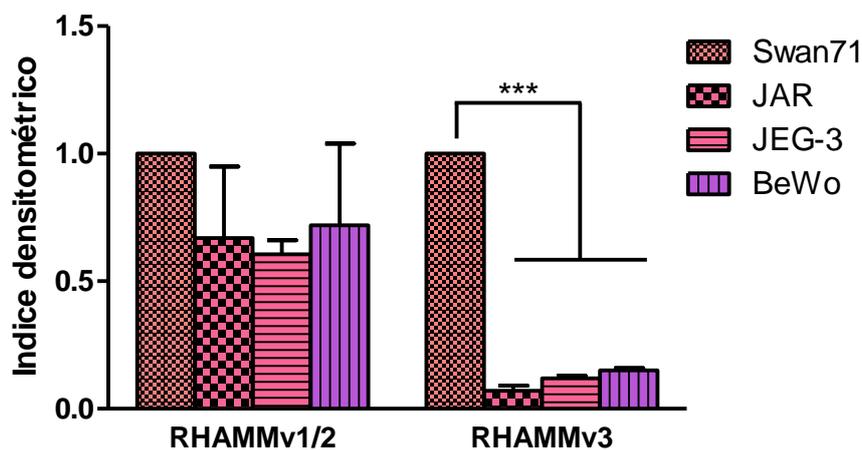


Figura 22. A) Expresión de ARNm de RHAMM por RT-PCR. Las variantes 1 y 2 se localizan a 361 y 358 bp, la variante 3 a 313bp y la variante 4 a 134bp. β -actina fue empleado como control de amplificación. Como control positivo se empleó la línea celular K562. Resultados similares fueron obtenidos en dos experimentos independientes. B) Análisis densitométrico de las bandas observadas en A). Los resultados se expresan como índice densitométrico (RHAMMv1/2, v3/ actina). Las barras representan la media \pm SEM.

Como se observa en la Figura 22, la línea celular Swan71 expresa al menos dos variantes para RHAMM, en forma similar a las líneas celulares de CC. Sin embargo, como se desprende del análisis estadístico de la densitometría, la expresión de la variante 3 para RHAMM en Swan71 es mayor que en las líneas de CC ($p < 0,001$).

También se estudió la expresión proteica de RHAMM por IFI. Las células se cultivaron en cubreobjetos hasta subconfluencia y se evaluó su expresión extracelular.

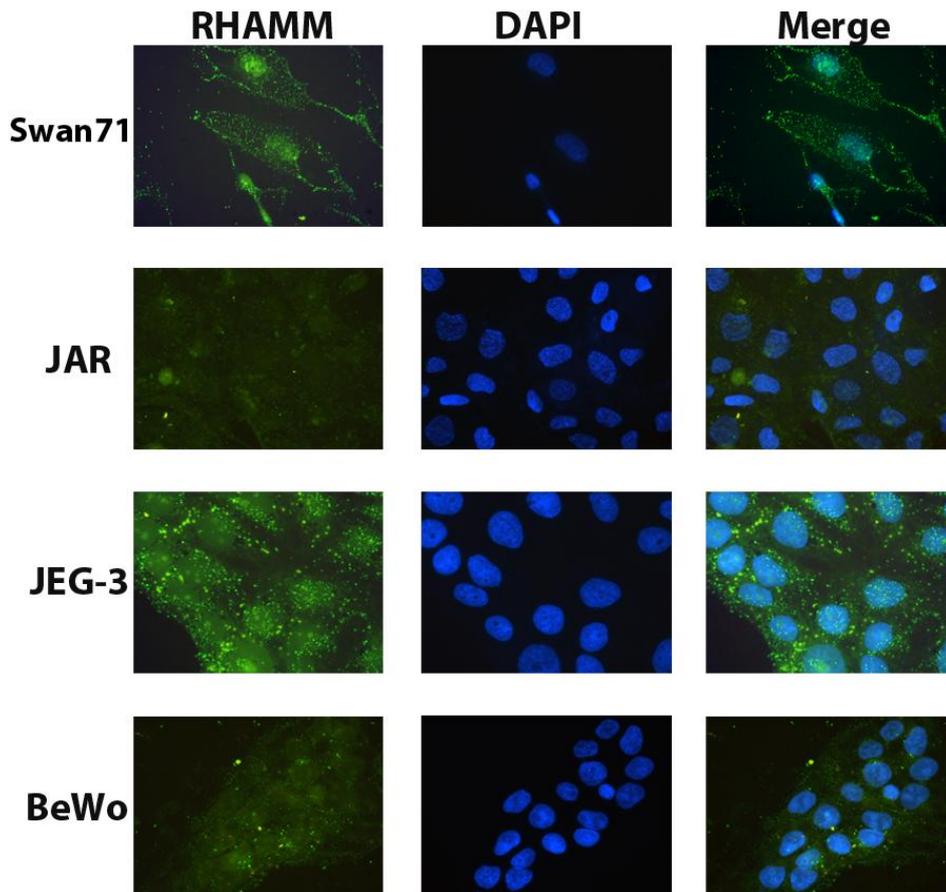


Figura 23. Expresión de RHAMM por IFI. Se muestra una imagen representativa de al menos tres experimentos independientes. Magnificación original 400x.

Como se observa en la Figura 23, tanto la línea celular Swan71 como JEG-3 presentan expresión de RHAMM en su superficie celular mientras que la expresión en BeWo es débil, y nula o indetectable en JAR.

Este resultado sugiere que la expresión de ARNm para RHAMM encontrada en BeWo y JAR podría corresponder a expresión proteica en el interior celular, ya sea en el citoplasma o en el núcleo.

Conclusiones parciales

De los resultados obtenidos en la Primera Parte de este Segundo Capítulo podemos concluir que:

- La línea de trofoblasto inmortalizado Swan71 y la línea de CC BeWo secretan AH al medio, no así las líneas de CC JAR y JEG-3. Además, todas las líneas expresan ARNm para las enzimas HAS3 y Hyal1 y -2 mientras que HAS2 sólo se expresa en Swan71.
- La línea Swan71 expresa CD44 mientras que ninguna de las líneas de CC expresa dicha proteína correlacionando así la expresión proteica con la expresión de ARNm.
- Tanto la línea Swan71 como las líneas de CC expresan al menos dos isoformas del ARNm que codifican para el receptor RHAMM. Sin embargo, dicha expresión no correlacionaría con la expresión proteica en la superficie celular evaluada por IFI donde puede observarse mayor expresión de RHAMM en JEG-3 que en BeWo y JAR.

En resumen, de las conclusiones del análisis del perfil de expresión de de AH, CD44 y RHAMM en las líneas celulares de coriocarcinoma descritas arriba así como de los resultados obtenidos en muestras de pacientes descritos en el Primer Capítulo de esta Tesis nos llevan a sugerir que la línea JEG-3 es el modelo más apropiado para continuar con el estudio de la implicancia del ácido hialurónico en la biología de las células de coriocarcinoma, dado que tanto en las muestras de tumor primario como en dicha línea celular se encontró expresión de RHAMM pero no expresión de CD44 ni secreción de AH al medio extracelular.

CAPITULO III

Primera Parte

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACIDO HIALURONICO EN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE CORIOCARCINOMA HUMANO JEG-3

El efecto del AH sobre algunos procesos celulares varía según su peso molecular, es por ello que en esta Primera Parte evaluamos la participación de AH de distinto peso molecular en los procesos de migración, proliferación y diferenciación.

Efecto de AH sobre la migración de la línea celular de coriocarcinoma humano, JEG-3.

Para evaluar si el AH es capaz de inducir la migración de las células JEG-3, se llevó a cabo el ensayo de cierre de la herida. Se evaluaron distintas concentraciones de AH de diverso peso molecular (APM, BPM y oligosacáridos) a 24 horas.

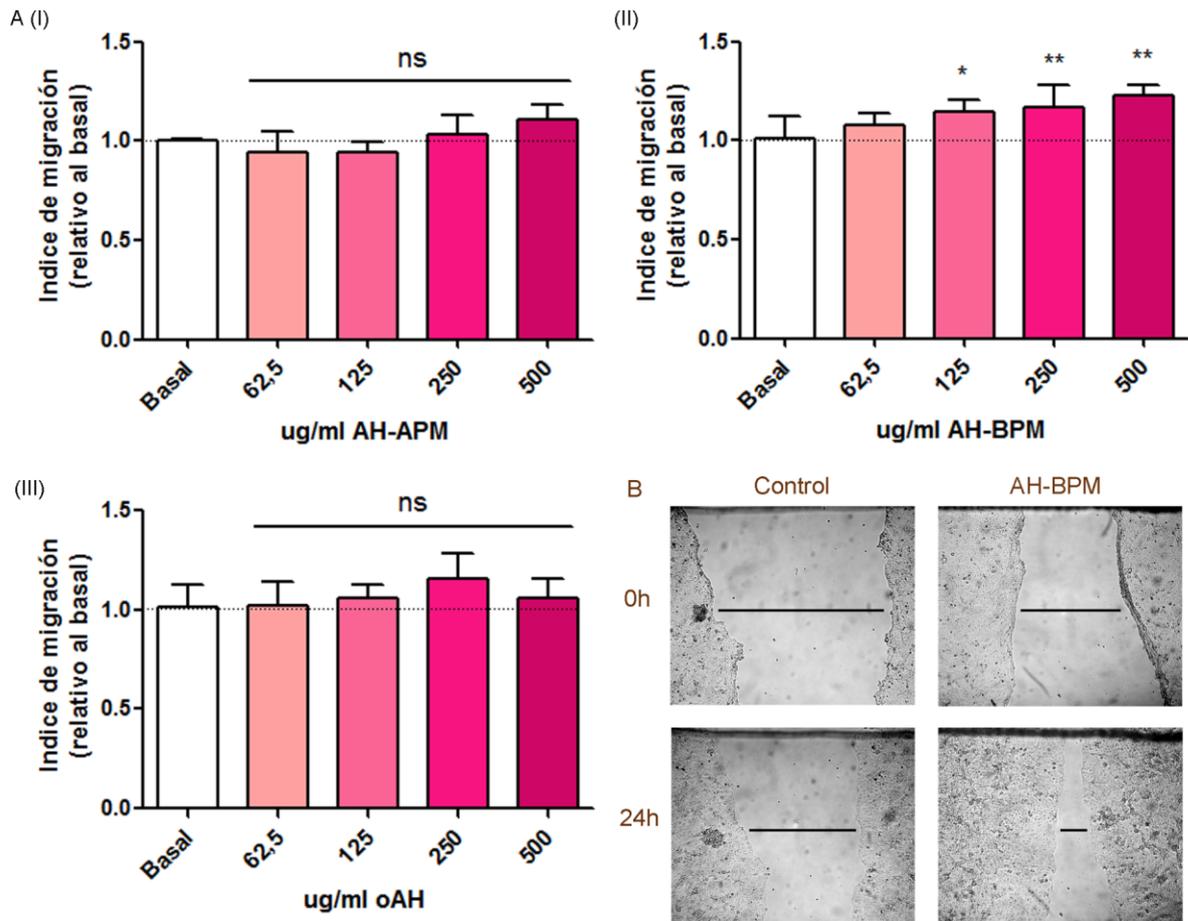


Figura 24. Efecto de AH sobre la migración celular evaluado por ensayo de la herida.

A) Células JEG-3 tratadas con distintas concentraciones de AH (62,5 a 500 $\mu\text{g/ml}$) de diverso peso molecular (AH-APM, -BPM y oAH) durante 24 hs. Las células sin tratamiento representan el grupo control. Los resultados están expresados en índice de migración relativo al control. Las barras representan la media \pm DES de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0,05$. B) Microfotografías representativas de una herida realizada en una monocapa de células JEG-3 al inicio (0h) y 24 horas en condición control y tratamiento con 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM.

Como se observa en la figura 24, el tratamiento con AH-BPM produjo un aumento significativo y dosis dependiente en el índice de migración de las células. Mientras que el tratamiento con oAH no produjo variación en los índice de migración a ninguna de las dosis ensayadas. Si bien se observa una tendencia hacia un aumento en el tratamiento con AH-APM a medida que aumenta su concentración, el test estadístico no arrojó diferencias significativas.

Posteriormente, para corroborar el resultado obtenido en el ensayo de la herida se evaluó la capacidad migratoria de las células JEG-3 hacia 250 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$ AH de bajo peso molecular con cámara Transwell durante 24 horas.

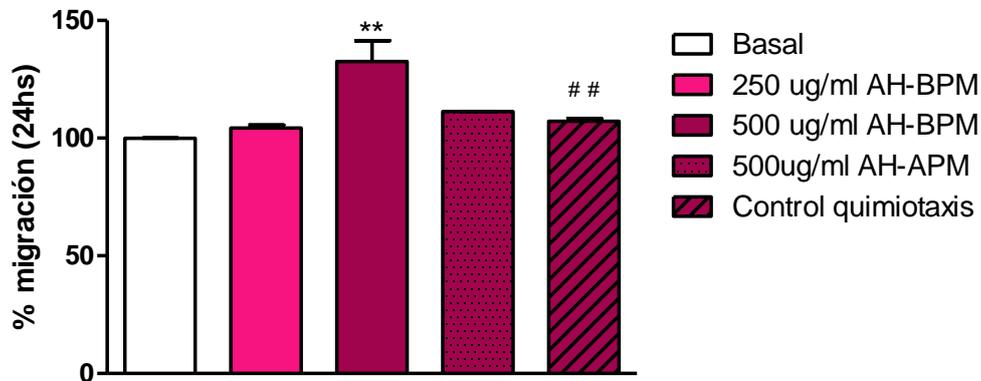


Figura 25. Efecto de AH sobre la migración celular evaluado por transwell. A) Células JEG-3 se sembraron en la cara superior de insertos con poros de 8 μm . En los pocillos respectivos se agregó medio de cultivo con 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-APM, 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM o no (control) y se incubaron durante 24 hs. El control de quimiotaxis se llevó a cabo agregando 500 $\mu\text{g/ml}$ AH en los compartimentos inferior y superior del transwell. Los resultados están expresados en porcentaje respecto del control. Las barras representan la media \pm DES de diez campos microscópicos. * $P < 0,01$. B) Microfotografías representativas de células que atravesaron el inserto.

Tal como se observa en la figura 25, el tratamiento con 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM ($p < 0,01$) aumentó significativamente el número de células que migraron desde el compartimiento superior del Transwell al compartimiento inferior. Mientras que ni el tratamiento con 250 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM ni con 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-APM indujeron cambios en la migración.

Efecto de AH sobre la proliferación celular de la línea celular de coriocarcinoma humano, JEG-3

Teniendo en cuenta que algunos tipos celulares proliferan frente a un estímulo con AH se evaluó la capacidad de AH de diferentes pesos moleculares para inducir la proliferación de las células JEG-3. Para ello se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular con timidina tritiada a 48 y 72 horas. Las células JEG-3 se incubaron con distintas concentraciones de AH de distinto peso molecular y como control de la proliferación basal algunas células se cultivaron en medio de cultivo RPMI con 10% SFB sin AH.

Tal como se observa en la figura 26, a 48 horas no se observan cambios en la proliferación celular frente a AH independientemente de su peso molecular y concentración. Sin embargo, a 72 horas se observó que las dosis de 62,5 a 250 $\mu\text{g/ml}$ de AH-BPM ($p < 0,05$) inducen una disminución significativa en la proliferación así como también la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de oAH ($p < 0,01$). La dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM no induce cambios en el índice de proliferación de las células JEG-3 a ninguno de los tiempos ensayados.

Estos resultados demuestran que la dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ AH-BPM es capaz de inducir migración de las células JEG-3 sin afectar la proliferación de dichas células.

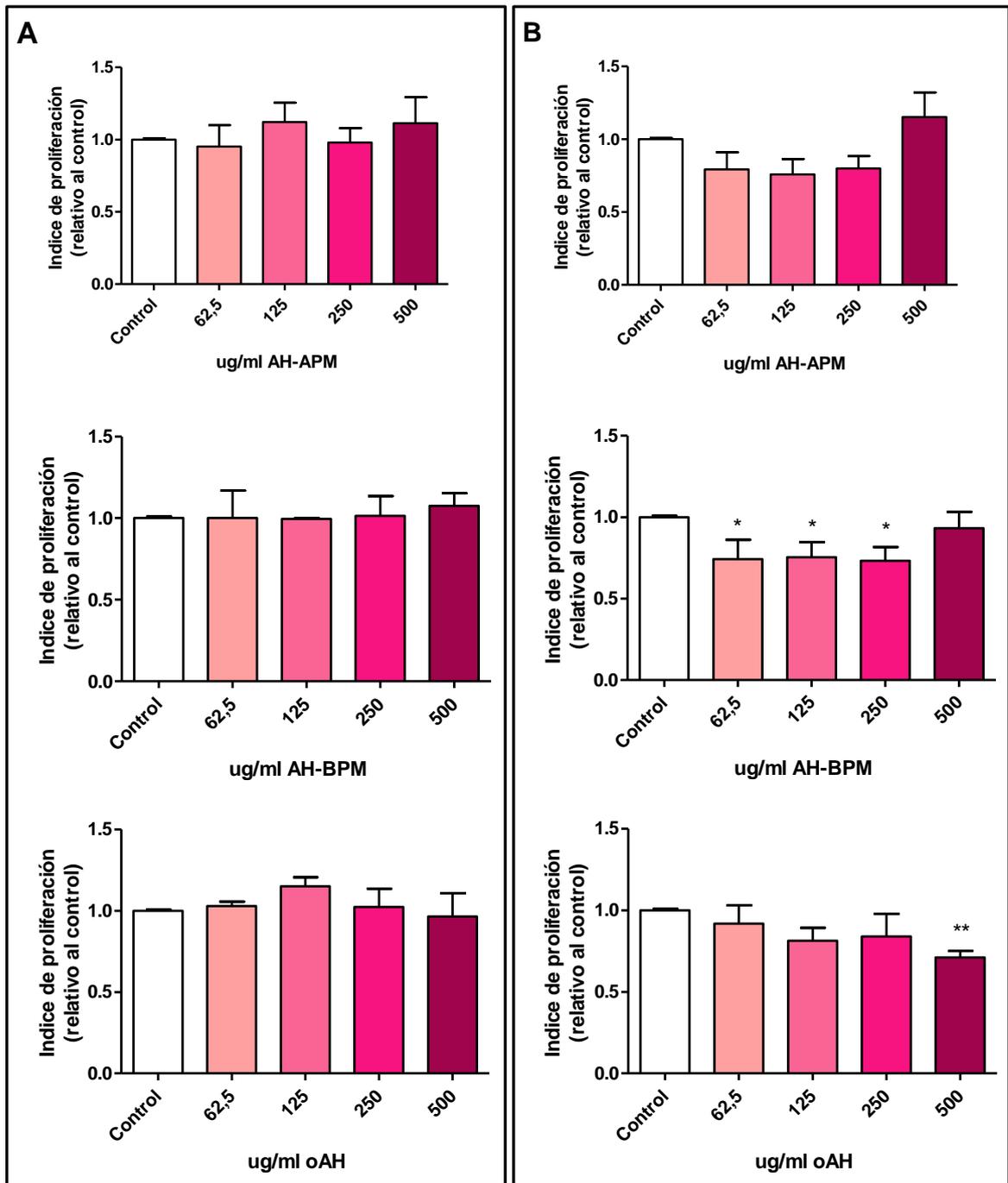


Figura 26. Efecto de AH de diferente peso molecular sobre la proliferación celular. Células JEG-3 fueron tratadas con distintas concentraciones de AH (62,5 a 500 $\mu\text{g/ml}$) de diverso peso molecular (AH-APM, -BPM y oAH) a (A) 48hs y (B) 72 hs. Las células sin tratamiento representan el grupo control. Los resultados están expresados en índice de proliferación relativo al basal. Las barras representan la media \pm DES de al menos cuatro experimentos independientes. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

Efecto de AH sobre la expresión de marcadores trofoblásticos

Como se describió en la introducción de esta tesis, el coriocarcinoma recuerda la población trofoblástica del blastocisto donde coexisten tres subtipos de trofoblasto: stem citotrofoblasto, sincitiotrofoblasto (aumento de secreción de hCG, aumento de expresión de sincitina-2) y trofoblasto extraveloso (aumento de expresión de HLA-G). Es por ello que evaluamos la capacidad del AH de modular la expresión de las proteínas HLA-G, sincitina-2 y hCG en las células JEG-3.

HLA-G

La expresión del ARNm para HLA-G fue evaluada mediante RT-PCR semicuantitativa luego del estímulo de células JEG-3 con AH de alto y bajo peso molecular así como de oAH a una concentración de 500µg/ml.

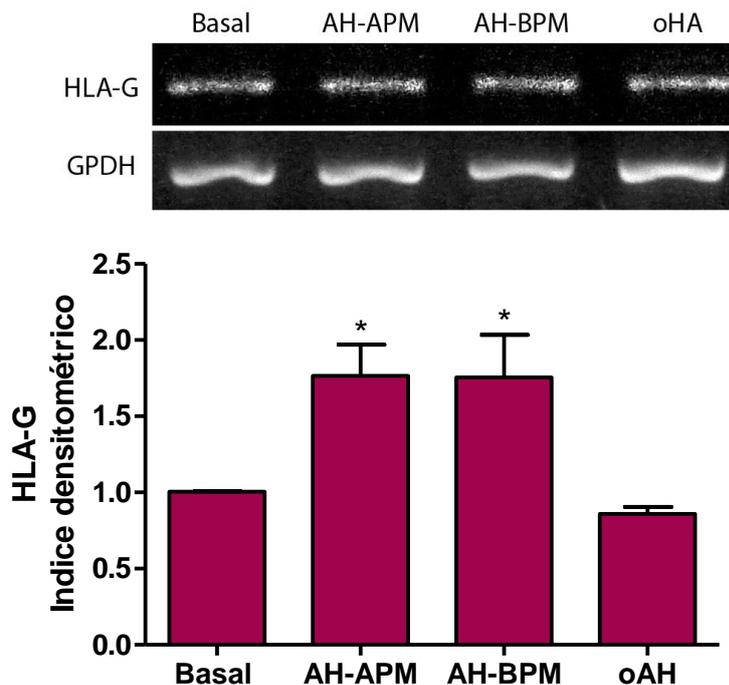


Figura 27. Expresión de ARNm para HLA-G. (A) Expresión de ARNm para HLA-G en células JEG-3 luego del tratamiento con 500µg/ml de AH distinto PM durante 24hs. GPDH fue utilizado como control de amplificación. (B) Análisis densitométrico de las bandas observadas en (A). Los resultados se expresan como índice densitométrico $(\text{HLA-G/GPDH})_{\text{tto}} / (\text{HLA-G/GPDH})_{\text{basal}}$. Las barras representan la media \pm DES. * $P < 0,01$.

Tal como se observa en la Figura 27, la expresión de ARNm para HLA-G aumentó luego del tratamiento con AH-APM así como con AH-BPM respecto del basal. Mientras

que no hubo diferencias significativas luego del tratamiento con oAH en la expresión de dicha molécula en las condiciones empleadas.

Sincitina-2

La expresión del ARNm para sincitina-2 fue evaluada mediante RT-PCR semicuantitativa luego del estímulo de células JEG-3 con AH de alto y bajo peso molecular así como de oAH a una concentración de 500µg/ml.

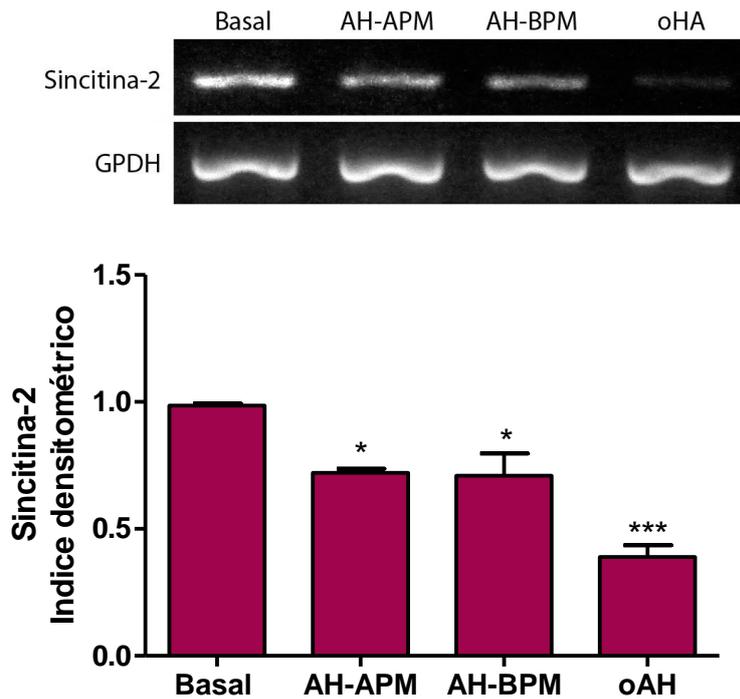


Figura 28. Expresión de ARNm para sincitina-2. (A) Expresión de ARNm para sincitina-2 en células JEG-3 luego del tratamiento con 500µg/ml de AH distinto PM durante 24hs. GPDH fue utilizado como control de amplificación. (B) Análisis densitométrico de las bandas observadas en (A). Los resultados se expresan como índice densitométrico $(\text{sincitina-2/GPDH})_{\text{tto}} / (\text{sincitina-2/GPDH})_{\text{basal}}$. Las barras representan la media +/- DES. *P<0,01, ***P<0,001.

Tal como se observa en la Figura 28, el tratamiento con los diferentes tipos de AH indujo una disminución significativa de la expresión de ARNm para sincitina-2 respecto del basal en las condiciones empleadas.

hCG

Dado el importante rol que cumple la hormona hCG en la biología del trofoblasto y coriocarcinoma así como su utilidad clínica en casos de ETG, nos planteamos evaluar el efecto de AH en la secreción de dicha hormona.

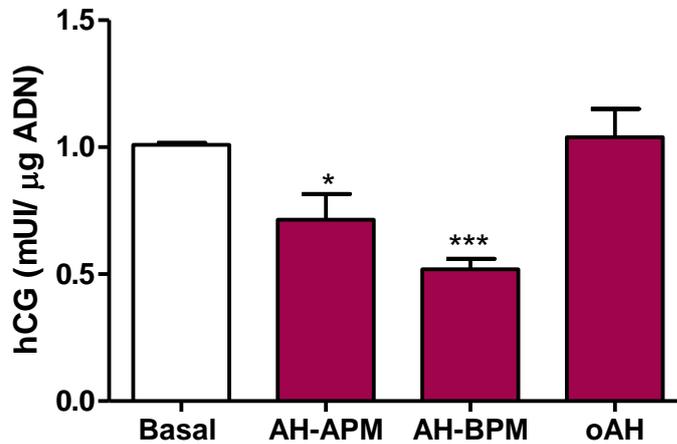


Figura 29. Efecto de AH sobre la secreción de hCG. Células JEG-3 se trataron con 500 μ g/ml de AH de distinto PM durante 24hs. Se cuantificó el nivel de hCG en sobrenadante por ECLIA y se relativizó a μ g ADN. Los resultados se expresan como índice hCG_{tto} / hCG_{basal} . Las barras representan la media \pm DES.

En la figura 29 puede observarse una disminución significativa en la secreción de hCG luego de los tratamientos con 500 μ g/ml AH-APM y -BPM durante 24hs. En iguales condiciones, el tratamiento con 500 μ g/ml oAH no arrojó diferencias significativas respecto del basal.

Conclusiones parciales

De los resultados obtenidos en la Primera Parte de este Tercer Capítulo podemos concluir que tanto la calidad como la concentración de AH en el medio extracelular influye sobre la biología de las células JEG-3 del siguiente modo:

- El tratamiento con AH-APM no induce cambios en la migración celular así como tampoco en la proliferación.
- El tratamiento con AH-BPM induce migración celular a una dosis de 500µg/ml sin verse afectada la proliferación celular. En cambio, a dosis menores de 500µg/ml no se observan cambios en la migración pero sí una disminución en el índice de proliferación celular.
- El tratamiento con oAH no induce cambios en la migración celular mientras que sólo con la dosis de 500µg/ml se observa una reducción en el índice de proliferación celular.
- El tratamiento con la dosis de 500µg/ml tanto de AH-APM como de AH-BPM induce un aumento en la expresión del ARNm de HLA-G. En cambio, el tratamiento con la misma concentración de oAH no arroja cambios en la expresión de dicha molécula.
- El tratamiento con la dosis de 500µg/ml de AH, independientemente de su peso molecular, induce una reducción en la expresión de sincitina-2.
- El tratamiento con una dosis de 500µg/ml tanto de AH-APM como de AH-BPM indujo una disminución en la secreción de hCG al medio extracelular. El tratamiento con la misma concentración de oAH no modificó la secreción de hCG respecto del basal.

En resumen, teniendo en cuenta que en el entorno tumoral pueden coexistir AH de diversos pesos moleculares, lo expuesto anteriormente nos permite sugerir que tanto AH-APM como AH-BPM contribuyen a la diferenciación bioquímica hacia el fenotipo extravelloso (aumento de HLA-G, disminución de sincitina-2). Además, este resultado se complementa con el hecho de que el AH-BPM, pero no el AH-APM, es capaz de inducir la migración celular en las condiciones estudiadas.

CAPITULO III

Segunda Parte

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO DEL ACIDO HIALURONICO SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

Los resultados obtenidos en la Primera Parte de este Tercer Capítulo nos condujeron a profundizar sobre los mecanismos de acción subyacentes al efecto del AH-BPM sobre la migración celular.

Implicancia de hCG endógena

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis la hCG es capaz de inducir la migración de las células trofoblásticas. Teniendo esto en cuenta, estudiamos la implicancia de la hCG endógena en el proceso de migración inducido por AH-BPM.

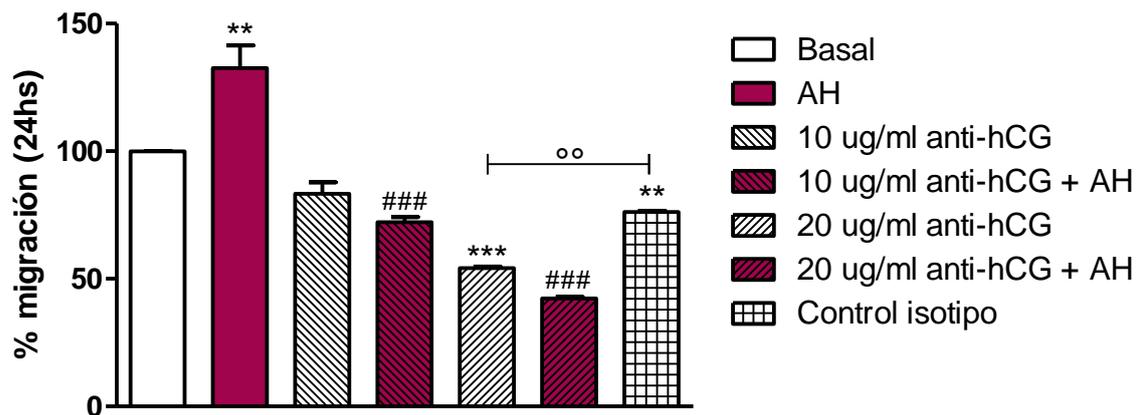


Figura 30. Implicancia de hCG endógena en la migración inducida por AH. La migración fue realizada hacia 500µg/ml AH-BPM o RPMI 1640 (control) previo tratamiento de las células con anti-hCG o no. Los resultados se expresan como la media del % de migración +/- SEM. ** P<0,01 y *** P<0,001 vs basal, ### P<0,001 vs AH, °° P<0,01 vs control isotipo. AH corresponde a AH-BPM.

Como se observa en la figura 30, el bloqueo de hCG endógena con 20µg/ml de anti-hCG indujo una disminución en el porcentaje de migración ($p < 0,001$ vs basal) la cual no pudo ser revertida por el co-tratamiento con AH-BPM ($p < 0,001$ vs AH). Esto sugiere que la migración inducida por el AH-BPM depende del nivel de hCG en el medio.

Evaluación de la modulación de la migración hacia AH-BPM mediante inhibidores farmacológicos de MEK y PI3K.

Para evaluar sobre las vías de señalización involucradas en el estímulo del AH-BPM sobre la migración celular, estudiamos dicho proceso en presencia de los inhibidores farmacológicos, U0126 y Ly249002. Estos inhiben a las quinasas MEK y PI3K, respectivamente.

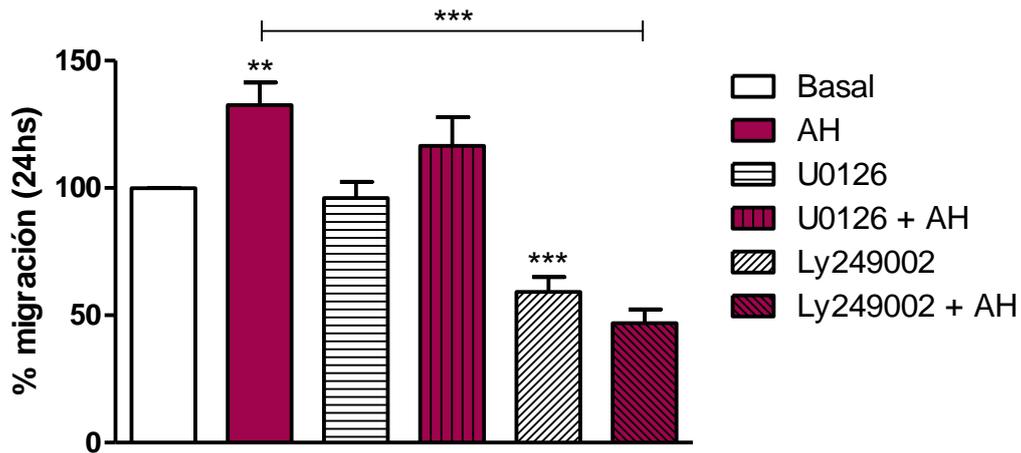


Figura 31. Implicancia de MEK y PI3K en la migración inducida por AH-BPM a 24hs. Las barras representan el % de migración. Los resultados se presentan como la media +/- SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. AH corresponde a AH-BPM.

En la figura 31 puede observarse que el tratamiento con Ly249002, inhibidor de PI3K, afecta la capacidad de migración de las células JEG-3 ($p < 0,001$) y que la misma no puede ser revertida ante el agregado de AH-BPM, indicando que el efecto del AH-BPM depende de la vía PI3K ($p < 0,001$). Además, se observa que el tratamiento con U0126, inhibidor de MEK, no afecta la migración de las células JEG-3 en las condiciones analizadas.

Evaluación de la expresión de los índices pERK/ERK y pAkt/Akt

Para profundizar sobre la participación de las vías de señalización en la migración inducida por el AH-BPM, se evaluó la expresión de las relaciones pERK/ERK y pAkt/Akt mediante western blot.

En primer lugar, se evaluó la expresión basal de las proteínas mencionadas.

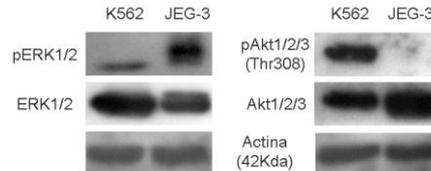


Figura 32. Expresión basal de pERK, ERK, pAkt y Akt en JEG-3. La expresión de pERK, ERK, pAkt y Akt fue evaluada mediante western blot a partir de extractos proteicos totales en condiciones basales. La línea K562 fue empleada como control positivo. La expresión de actina fue utilizada como control de carga.

Como puede observarse en la figura 32, se encontró expresión basal de pERK en la línea JEG-3 pero no se encontró expresión basal de pAkt (Thr308).

Posteriormente, se evaluó la expresión de los índices pERK/ERK y pAkt/Akt frente al tratamiento de las células JEG-3 con AH, U0126, Ly249002 y sus combinatorias con AH-BPM luego de un tiempo de incubación de 2 y 24hs. Como resultado se halló que no había expresión basal de pAkt ni modificación de la misma bajo ningún tratamiento (no se muestra). En cambio, se encontró que existía *crosstalk* en la expresión de pERK/ERK bajo el tratamiento con el inhibidor de PI3K, Ly249002, y su combinatoria con AH-BPM (Figura 33A).

En la figura 33 (A) se observa que a las 2hs hay un aumento en la desfosforilación de pERK inducido por AH-BPM comparado con el basal. Además, el tratamiento con U0126 inhibió la fosforilación de ERK al igual que el tratamiento con Ly249002 demostrando el *crosstalk* entre ambas vías mencionado anteriormente. Sin embargo, el co-tratamiento de los inhibidores con AH-BPM respecto de AH-BPM no afectó significativamente el índice de pERK/ERK a pesar de que el perfil de expresión sugiere una disminución en dicho índice.

A 24hs, como se observa en la figura 33 (B), se encuentra un aumento en la fosforilación de ERK luego del tratamiento con AH-BPM respecto del basal. Sin embargo, en presencia de los inhibidores U0126 y Ly249002, el co-tratamiento con AH-BPM no induce el aumento de fosforilación de ERK sugiriendo la relevancia en la participación de las quinasas MEK y PI3K, respectivamente, en la fosforilación de ERK causada por el AH.

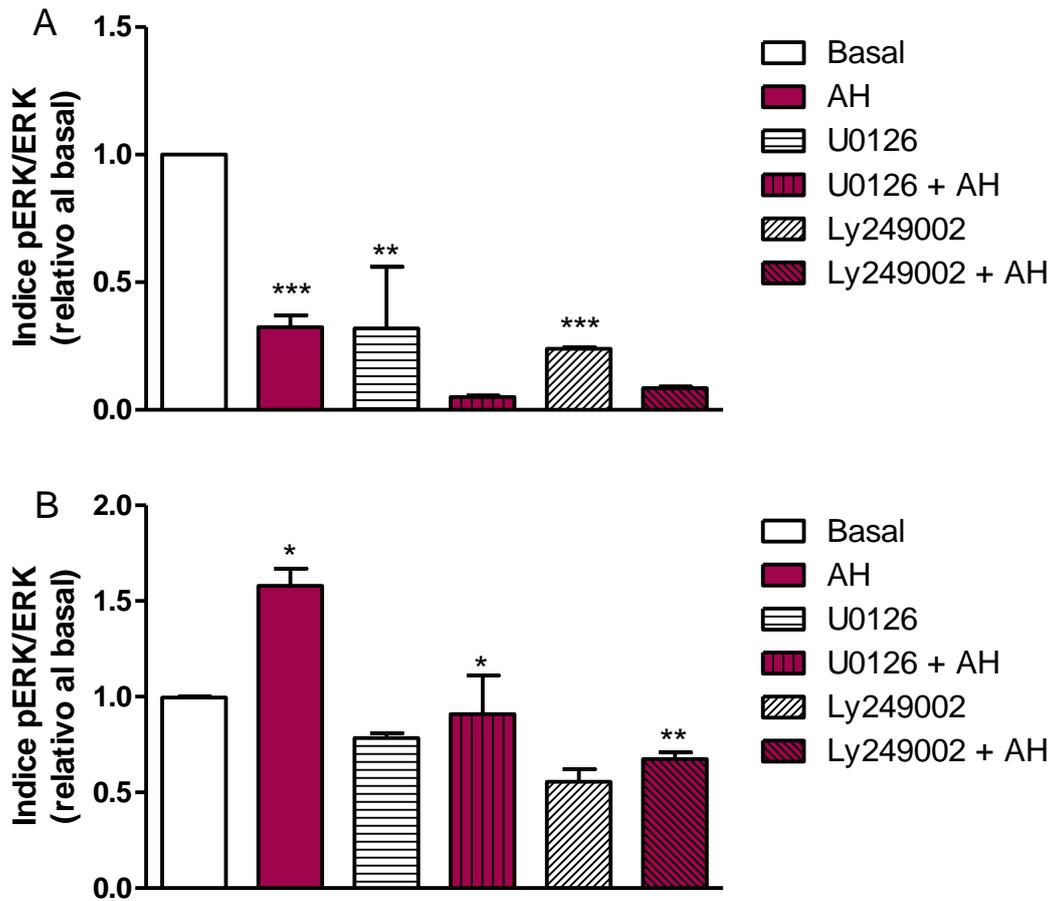


Figura 33. Análisis densitométrico de pERK/ERK luego de 2hs (A) y 24hs (B). Los resultados se expresan como índice densitométrico $(pERK/ERK)_{tto} / (pERK/ERK)_{basal}$. Las barras representan la media \pm DES de al menos 3 experimentos independientes. **P<0,01, ***P<0,001. AH corresponde a AH-BPM.

Evaluación de la capacidad de los receptores de AH, CD44 y RHAMM, de modular la migración inducida por AH

Teniendo en cuenta los resultados anteriores sobre la expresión de los receptores para AH tanto en muestras de pacientes como en la línea JEG-3 obtenidas en este trabajo así como antecedentes de otros autores sobre el papel de estas moléculas en la migración, se decidió evaluar la capacidad migratoria de las células JEG-3. Para ello primero se trataron las células con un anticuerpo bloqueante para RHAMM y luego se realizó el ensayo de migración en presencia o no de 500µg/ml AH-BPM. De modo similar, también se evaluó el efecto sobre la migración luego del tratamiento con un anticuerpo bloqueante para CD44.

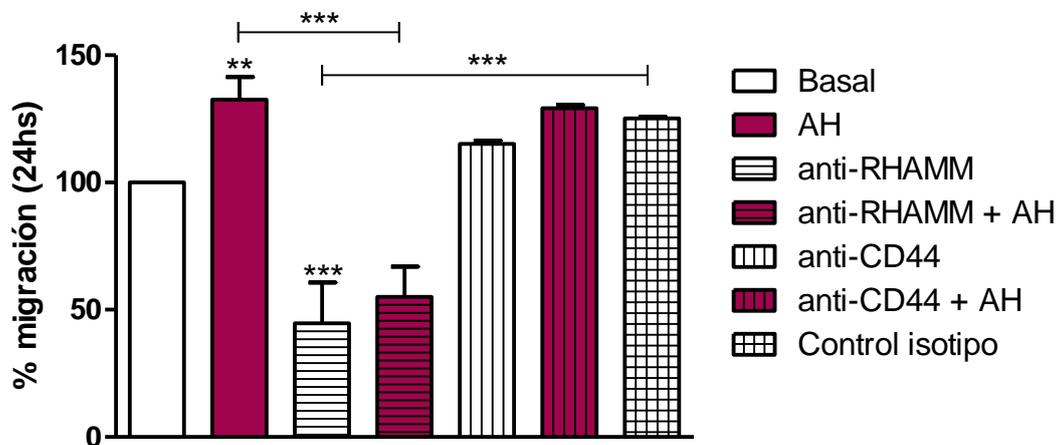


Figura 34. Implicancia de CD44 y RHAMM en la migración inducida por AH. Las barras representan la media de el % migración. Los resultados se presentan como la media +/- SEM. ** P<0,01; *** P<0,001. AH corresponde a AH-BPM.

Tal como se observa en la figura 34, el bloqueo de RHAMM afectó negativamente la capacidad migratoria de las células ($p < 0,001$ vs basal) lo que no pudo ser revertido luego del agregado de AH-BPM ($p < 0,001$ vs AH). El hecho de que la inhibición de la migración no fuera total nos sugiere que otros receptores podrían estar colaborando en el efecto de AH-BPM sobre la migración de estas células. Tal como se esperaba, el bloqueo de CD44 no indujo cambios en el porcentaje de migración en presencia de AH-BPM.

Evaluación de la participación de las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/Akt sobre la migración inducida por AH mediada por RHAMM.

Para evaluar la implicancia de las vías de señalización mencionadas anteriormente en el proceso de migración inducido por la interacción AH-RHAMM, se analizaron las relaciones pAkt/Akt y pERK/ERK en extractos proteicos obtenidos de células JEG-3 incubadas bajo los distintos tratamientos (AH, RHAMM y su combinatoria) en comparación con las células sin tratar (basal) durante 24 hs.

Bajo estas condiciones no se detectó expresión basal de pAkt/Akt ni tampoco frente a los tratamientos (no se muestra).

Tal como se muestra en la figura 35, el bloqueo de RHAMM con su anticuerpo específico impidió el aumento en la fosforilación de ERK frente al agregado de AH-BPM. Esto sugiere que ERK está involucrado en el efecto observado sobre la migración celular mediado por la interacción AH-RHAMM.

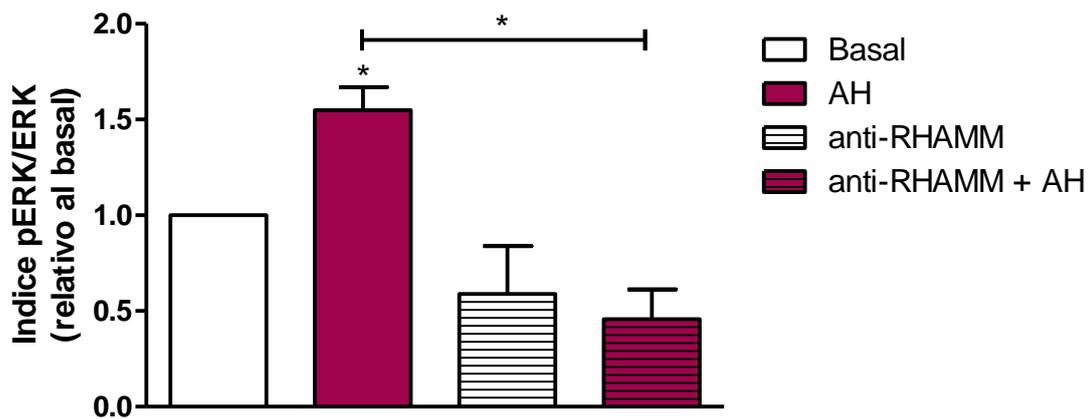


Figura 35. Análisis densitométrico de pERK/ERK luego de 24hs. Los resultados se expresan como índice densitométrico $(pERK/ERK)_{tto} / (pERK/ERK)_{basal}$. Las barras representan la media +/- DES de al menos 3 experimentos independientes. **P<0,01, ***P<0,001. AH corresponde a AH-BPM.

Conclusiones parciales

De los resultados obtenidos en la Segunda Parte del Tercer Capítulo de esta Tesis podemos concluir que el proceso de migración inducido por AH-BPM:

- Depende del nivel de hCG endógeno en el medio extracelular.
- Depende de PI3K tal como se observa luego del co-tratamiento con el inhibidor farmacológico específico, involucrando una disminución en el índice pERK/ERK como producto de crosstalk entre las vías PI3K/Akt y MAPK.
- Es mediado por el receptor RHAMM a través de la vía MAPK, tal como se desprende de la disminución de la relación pERK/ERK. Además, CD44 no está involucrado en este proceso.

En resumen, el efecto del AH-BPM sobre la migración de células JEG-3 depende del nivel endógeno de hCG en el medio extracelular y es mediado principalmente por el receptor RHAMM a través de fosforilación de ERK. Además, los resultados descritos en esta parte de la Tesis sugieren que otra vía de señalización u otras kinasas podrían estar involucradas en el estímulo del AH-BPM sobre la migración de estas células.

DISCUSIÓN

CAPITULO I

EXPRESIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO, CD44 Y RHAMM EN MUESTRAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL

El estudio histopatológico ofrece la posibilidad de observar la localización *in situ* de una determinada molécula. Esto representa una herramienta muy importante para el conocimiento y entendimiento tanto de los procesos fisiológicos como de los procesos patológicos. Mas aún, los cambios de expresión proteica en un determinado tipo de célula entre ambas condiciones (normal y patológico), en ciertas ocasiones, permiten clasificar, pronosticar el comportamiento y con ello adecuar el seguimiento y las medidas terapéuticas.

En particular en el área de estudio de ETG, además de la escasa casuística, el estudio histopatológico es de sustancial interés dado que hasta el momento no existen modelos *in vitro* ni *in vivo* para el estudio de los mecanismos moleculares de mola hidatiforme. Además, es limitado el número de muestras frescas que pueden obtenerse debido al peligro subyacente para la paciente tanto en la examen clínico como en el procedimiento quirúrgico, particularmente en los casos de tumores trofoblásticos. Aunque para estos últimos, existen algunas líneas celulares disponibles, los modelos *in vivo* son limitados. Como ventaja, además, la observación *in situ* permite reforzar el empleo de modelos *in vitro*.

Como se mencionara al comienzo de esta Tesis, el comportamiento celular no depende solamente de las características de la célula en cuestión sino también del entorno que la rodea. Este microambiente se encuentra constituido por células endoteliales, inflamatorias, fibroblastos y matriz extracelular (constituida por proteoglicanos y glicosaminoglicanos) donde además se disuelven y almacenan factores de crecimiento, citoquinas, etc. El diálogo entre las células y su microambiente, en el desarrollo de múltiples procesos celulares, es de gran importancia.

En el Primer Capítulo de este trabajo, evaluamos la expresión y distribución del principal glicosaminoglicano que compone la matriz extracelular, AH, y de sus receptores, CD44 y RHAMM, en muestras de tejidos de pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional respecto de muestras de placenta de primer trimestre.

Placenta de primer trimestre y MHC.

Dado que las MH se clasifican en parcial y completa, y dado que ambas entidades tienen asociado un comportamiento patológico diferente, en primer lugar evaluamos la expresión de p57kip2. Mediante inmunohistoquímica demostramos que todas las muestras analizadas en esta Tesis corresponden a MHC, entidad que presenta un riesgo de malignidad intrínseco mayor que MHP.

En este trabajo hemos demostrado que el AH se halla expresado en el estroma veloso tanto en placenta de primer trimestre como en MHC.

Nuestros resultados en la expresión de este GAG en placenta de primer trimestre concuerdan con los reportados previamente por otros autores (Goshen et al. 1996; Marzioni et al. 2001). La importancia en la localización del AH en el estroma veloso radica en su participación en la formación del árbol velositario (Castellucci et al. 2000; Marzioni et al. 2001). La expresión de AH con intensidad variable también fue reportada en la membrana apical de la velosidad y en el citoplasma del trofoblasto de primer trimestre (Marzioni et al. 2001; Zhu et al. 2013). Sin embargo en este trabajo no encontramos dicha expresión, lo cual podría deberse a diferencias en la calidad y concentración de la proteína de unión a AH empleada.

A la fecha solamente Goshen y colaboradores han estudiado la expresión de AH en algunas entidades de ETG, entre ellas MHC (Goshen et al. 1996). En dicho trabajo se reportó una expresión aumentada de AH respecto de placenta de primer trimestre. En concordancia con este antecedente, hemos demostrado que el AH se expresa en el estroma veloso de MHC.

MHC se caracteriza por un crecimiento exacerbado del árbol velositario. La conservación del patrón de expresión de AH en el estroma veloso en esta entidad concuerda con esta característica.

Además, el embarazo molar se caracteriza por presentar velosidades edematosas. Dado que el AH es un compuesto altamente hidrofílico hipotetizamos que podría estar contribuyendo a dicho edema.

En este trabajo, y a diferencia de Goshen y col, también demostramos expresión de AH en las membranas basal y apical de MHC respecto a placenta de primer trimestre. Este resultado nos permite sugerir que existiría un metabolismo alterado del AH en el sincitiotrofoblasto en MHC respecto de placenta de primer trimestre.

El sincitiotrofoblasto constituye la barrera placentaria donde se lleva a cabo el intercambio de gases y nutrientes. En este sentido, nuestros resultados nos permiten hipotetizar que el AH podría estar contribuyendo a este proceso.

Ciertas moléculas se disuelven fácilmente en AH debido a las características de este GAG y permiten emplearlo como reservorio y transportador de dichas moléculas. Esta ventaja está siendo estudiada a fin de contribuir a mejorar la quimioterapia en algunos tumores (Karbownik and Nowak 2013). Aunque MH constituye el grupo de ETG benigna tanto MHP como MHC tienen asociado un riesgo potencial intrínseco desarrollar una NTG.

Posteriormente, evaluamos la expresión de algunas hialadherinas como CD44 y RHAMM. Estas proteínas son los principales receptores para AH asociados a procesos neoplásicos.

Hemos demostrado que CD44 se expresa débilmente en el estroma veloso de MHC pero no se expresa en ninguna población trofoblástica de placenta de primer trimestre ni de MHC.

Los reportes de otros autores sobre la expresión de CD44 en placenta de primer trimestre resultan contradictorios. Mientras algunos describen una expresión débil en el estroma (Goshen et al. 1996; Marzioni et al. 2001), otros reportaron una expresión intensa en el estroma veloso (St-Jacques et al. 1994). En cambio, Balaram y colaboradores reportaron expresión de CD44 en el citoplasma del trofoblasto pero no en el estroma (Balaram et al. 2004).

En MHC los datos también son controvertidos, mientras algunos autores describieron sólo expresión de CD44 en el citoplasma del trofoblasto (Balaram et al. 2004), otros reportaron además expresión de CD44 en el estroma veloso (Goshen et al. 1996). En este trabajo, no encontramos expresión de CD44 en las células trofoblásticas ni de placenta de primer trimestre ni de MHC.

Aunque no existe consenso en la localización de CD44 en los tejidos analizados, algunos autores han encontrado una disminución en la expresión tanto del ARNm como de expresión proteica en MHC respecto de placenta de primer trimestre (Kato et al. 2002; Balaram et al. 2004). Incluso los análisis sobre el riesgo de desarrollar NTG luego de una MHC de primer o segundo trimestre indican que CD44 no es un factor de importancia (Balaram et al. 2004; Reynolds et al. 2007).

En este trabajo hemos demostrado la expresión y localización de RHAMM en distintas poblaciones trofoblásticas tanto en placenta de primer trimestre como en MHC.

Encontramos que en placenta de primer trimestre RHAMM se localiza en el citoplasma de las células citotrofoblásticas mientras que en las células del TEV observamos expresión tanto en citoplasma como en membrana celular.

En MHC, demostramos expresión de RHAMM en el citoplasma de las células citotrofoblásticas que componen la capa stem cell y, en algunas, también en la membrana celular. En las células del TEV también encontramos expresión en la membrana celular.

Además, encontramos expresión de RHAMM en el citoplasma de las células estromales en MHC, pero no en placenta de primer trimestre.

La localización de RHAMM en cada subpoblación concuerda tanto con las funciones descritas hasta el momento para dicha proteína como con la función del tipo de trofoblasto.

La expresión de RHAMM en el citoplasma de las poblaciones celulares mencionadas anteriormente sugiere que podría estar participando en la formación del huso mitótico y/o mediando señales intracelulares. Por otro lado, la expresión de RHAMM en la membrana celular del trofoblasto extraveloso sugiere que podría estar involucrado en la migración e invasión hacia el tejido materno. Además, postulamos que aquellas células localizadas en la capa stem citotrofoblástica, y que expresan RHAMM en la membrana celular, serían las que se diferenciarían hacia trofoblasto extraveloso. Es decir, RHAMM, podría estar involucrado en la regulación del programa de diferenciación trofoblástica.

Mas aún, aunque en este trabajo no ahondamos sobre las isoformas de RHAMM presentes en MHC, los resultados demostrados también sugieren que diferentes isoformas podrían estar expresándose en las distintas subpoblaciones trofoblásticas.

Hasta el momento **este es el primer reporte** sobre la expresión y localización de RHAMM en tejidos de placenta de primer trimestre y MHC. Otros autores han demostrado la expresión de ARNm para RHAMM en placenta y su sobreexpresión en MHC respecto de vellosidades normales de primer trimestre (Greiner et al. 2002; Kato et al. 2002). La sobreexpresión de RHAMM también fue descrita en células de trofoectodermo humano durante la ventana de implantación, lo que sugiere una expresión modulada temporalmente de dicha proteína (Haouzi et al. 2011). Además, RHAMM ha sido hallado tanto en embriones humanos como murinos y se ha

demostrado que la atenuación en su expresión conduce a la reducción de la pluripotencialidad de las células madres embrionarias. Aunque con discrepancia respecto de si RHAMM se localiza en membrana o citoplasma, tal silencimiento promovería la diferenciación celular hacia diferentes linajes, entre ellos el trofoectodermo (Choudhary et al. 2007; Jiang et al. 2013). Este hallazgo es interesante ya que el tejido placentario deriva de dicho linaje.

Nuestros resultados sobre la expresión de RHAMM en placenta de primer trimestre y MHC, junto con el de los autores mencionados, avalan la hipótesis de que es necesario un determinado nivel de expresión de RHAMM y no su reducción total para inducir la diferenciación de las células madre embrionarias hacia el linaje placentario.

Todo lo expuesto anteriormente, nos permite postular:

1º) que el AH podría influenciar el crecimiento del árbol vellositario y que la expresión de RHAMM en células estromales podría contribuir a dicho evento en MHC. Hasta el momento, no existen reportes sobre estudios *in vitro* de la participación de ambas moléculas en la formación de las vellosidades placentarias.

2º) que el AH en la membrana del sincitiotrofoblasto en MHC no estaría unido a través de CD44 ni de RHAMM sino que estaría interviniendo otro receptor. Un recambio y síntesis activa del AH podría estar llevándose a cabo a fin de contribuir al almacenamiento de nutrientes o, también, el AH podría estar siendo secretado al medio extracelular.

3º) RHAMM podría estar participando en la diferenciación del trofoblasto hacia el fenotipo extravelloso. Estudios *in vitro* son necesarios para evaluar esta hipótesis así como para evaluar la participación del AH en dicho evento. En este trabajo se demostró expresión de AH en la membrana basal de la vellosidad. Aunque no demostramos qué tipo celular es el encargado de su síntesis, la localización del AH cercana a la capa citotrofoblástica podría estar influenciando el comportamiento de dicha población.

Tumores trofoblásticos

Como se mencionara en la Introducción, tanto un embarazo molar como normal a término o un aborto de cualquier causa puede ser un antecedente para el desarrollo de una NTG como son coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario.

En este trabajo, hemos demostrado que en coriocarcinoma hay expresión de AH y CD44 en el estroma pero no en la célula tumoral. Además, encontramos que RHAMM está expresado en la superficie celular de las células malignas. Sin embargo, el patrón de tinción punteado (comparado con el observado en el trofoblasto extravellado de MHC) podría sugerir que RHAMM esté siendo secretado.

En tumor trofoblástico de sitio placentario demostramos que AH se expresa en el estroma tumoral pero no encontramos expresión de CD44 dicho compartimento. Las células tumorales tampoco expresan ninguna de estas moléculas. En cambio RHAMM se expresa en el núcleo de algunas células tumorales.

Nuestros resultados sobre la expresión de AH y CD44 en CC concuerdan con los reportados por Goshen y colaboradores quienes hasta el momento fueron los únicos que estudiaron la expresión de estas moléculas en algunas entidades de ETG (Goshen et al. 1996).

El estroma está compuesto por diferentes tipos de células tales como fibroblastos, células inmunes y endoteliales.

Ha sido demostrado que la hCG producida tanto por células trofoblásticas como por células de coriocarcinoma es capaz de atraer linfocitos T reguladores al sitio (Schumacher et al. 2009). Nagymanyoky y col han estudiado el perfil inmune en MHC y CC postmolar encontrando reclutamiento de linfocitos T reguladores y citotóxicos así como células natural killer en los sitios de infiltración (Nagymanyoki et al. 2007; Nagymanyoki et al. 2008). Otros trabajos han reportado que AH se une a CD44 activando a linfocitos T reguladores humanos y estimulando su capacidad supresora a través de la producción de citoquinas reguladoras (Bollyky et al. 2007; Bollyky et al. 2009).

El AH expresado en el estroma estaría siendo sintetizado por los fibroblastos y/o células inflamatorias que conforman el compartimento, como sucede en el caso de CC. Mientras que en el caso de TTSP, el AH formaría parte de los tejidos que son blanco de invasión del tumor, por ejemplo endometrio y/o miometrio (Edelstam et al. 1991; Salamonsen et al. 2001).

Nuestros resultados sugieren que tanto el AH como CD44 presentes en el estroma estarían participando en la fisiopatología de los tumores trofoblásticos.

En este trabajo se describe **por primera vez** la expresión de RHAMM en tumores trofoblásticos, cuya localización concuerda con el comportamiento patológico de estas entidades.

CC se caracteriza por ser una neoplasia capaz de metastatizar en sitios anatómicos distantes como ser cerebro, hígado, riñón, entre otros. Algunas pacientes, incluso, debutan con algún síntoma relacionado a dichas metástasis. En este caso, la expresión de RHAMM en la superficie celular en CC sugiere su participación en el proceso de migración e invasión tumoral. La expresión de AH en el estroma, descrito en los resultados, nos lleva a postular que podría estar contribuyendo a dichos eventos.

El TTSP se presenta con mayor frecuencia como una enfermedad limitada al útero y raramente las pacientes debutan con metástasis pero pueden desarrollarlas varios años después. Sin embargo, esta entidad es altamente quimiorresistente en comparación con CC, que a pesar de metastatizar fácilmente, tiene una alta sensibilidad a la quimioterapia. En TTSP encontramos RHAMM en el núcleo de algunas células tumorales. Esto nos lleva a sugerir que RHAMM podría estar contribuyendo a la inestabilidad genómica de esta entidad en pos de su quimioresistencia. Además, es posible que en este caso sus funciones sean independientes de AH.

Como mencionáramos anteriormente, estos resultados nos llevan a sugerir además que distintas variantes de RHAMM podrían estar expresándose en estos tejidos.

En resumen, en este Capítulo demostramos que la expresión tanto de AH como de CD44 predomina en el estroma de los tejidos analizados mientras que la expresión de RHAMM predomina en las células. Demostramos que existe un patrón de expresión diferente entre las poblaciones trofoblásticas, que se correlacionaría con las funciones esperadas de dichos linajes celulares e incluso con el comportamiento de cada entidad en particular. Así, éstas moléculas estarían contribuyendo a la fisiopatología de las entidades de ETG estudiadas.

CAPITULO II

ESTUDIO DEL ACIDO HIALURONICO, SU METABOLISMO Y RECEPTORES EN LINEAS CELULARES DE CORIOCARCINOMA HUMANO

Los resultados demostrados en el Capítulo I de esta Tesis nos brindaron la posibilidad de continuar con el estudio *in vitro* del AH, CD44 y RHAMM a fin de comprender las bases moleculares que subyacen particularmente en coriocarcinoma. Como mencionáramos anteriormente, es limitado el número de modelos *in vitro* que representen las entidades que comprenden la ETG.

En la segunda parte (Capítulo II) de esta Tesis procedimos a caracterizar algunas líneas celulares de coriocarcinoma humano. Si bien existen numerosas líneas celulares empleadas como modelos de CC, en este trabajo utilizamos JAR, JEG-3 y BeWo, las cuales se generaron espontáneamente (Patillo and Gey 1968), y como contraparte normal empleamos la línea de trofoblasto extravelloso humano inmortalizado Swan71 (Straszewski-Chavez et al. 2009).

Demostramos que tanto la línea Swan71 como la línea BeWo secretan cantidades significativas de AH al medio extracelular a diferencia de las líneas JAR y JEG-3. Este hallazgo en la línea Swan71, aunque discordante con la ausencia de tinción para AH en el trofoblasto extravelloso en muestras de placenta de primer trimestre, podría deberse a diferencias en la edad gestacional entre las muestras o sensibilidad de la técnica histoquímica para detectar dicha expresión. La secreción de AH por trofoblasto extravelloso de primer trimestre fue reportada por Zhu y colaboradores quienes emplearon placenta de primer trimestre (Zhu et al. 2013).

Por otro lado, las diferencias en la secreción de AH entre las líneas de CC podrían deberse a cambios en el fenotipo de las células durante el proceso de selección. La línea BeWo fue establecida en el pasaje número 308 y deriva de una metástasis cerebral que fue mantenida en hámster durante 8 años, mientras que JEG-3 deriva del pasaje número 374 de mismo tumor. En tanto JAR, fue establecida a partir de un tumor localizado en la placenta.

El resultado demostrado para JAR y JEG-3 concuerda con las muestras de pacientes analizadas donde no se observó expresión de AH en las células tumorales. Si bien en este trabajo no se analizaron sitios de metástasis de CC, el resultado hallado en BeWo sugiere que al menos algunas poblaciones seleccionadas del sitio primario que

metastatizan a cerebro podrían adquirir como estrategia la capacidad fenotípica de secretar AH.

Posteriormente, evaluamos el metabolismo de AH. Demostramos **por primera vez** que existe una expresión diferencial de HAS y Hyals entre Swan71 y las líneas de CC. Mientras que en Swan71 encontramos expresión de ARNm de todas las enzimas estudiadas, en las líneas de CC se expresa ARNm para HAS3, Hyal1 y Hyal2 pero no para HAS2.

En placenta de primer trimestre ha sido reportado que se expresa ARNm para HAS2 pero no hay expresión de HAS1 y HAS3 (Zhu et al. 2013). En este trabajo demostramos una débil expresión de ARNm para HAS3 en Swan71. Esta diferencia podría deberse a múltiples variaciones ya sea tanto relacionadas a la muestra como a los reactivos empleados en la técnica de PCR.

Como se mencionara al principio de esta Tesis, las HAS tienen la capacidad de sintetizar AH de diferente peso molecular y distinta actividad. Este resultado nos sugiere que el AH detectado en Swan71 y BeWo podría corresponder a diferente peso molecular de acuerdo con el perfil de expresión hallado. Mientras que HAS3 sintetiza predominantemente AH-BPM, HAS2 sintetiza productos de mayor tamaño.

El estudio de la expresión proteica tanto de HAS como de Hyals contribuiría a aclarar y/o consolidar esta hipótesis ya que por otro lado si bien hay expresión de HAS3 en JAR y JEG-3, no se detectan niveles significativos en el sobrenadante. Esto podría deberse también a una actividad enzimática de Hyal elevada que degrade y/o internalice el AH ya sea a niveles indetectables para la técnica de cuantificación empleada o a que la expresión de ARNm no correlacione con la expresión proteica de las enzimas metabolizantes de AH.

También demostramos que, tanto a nivel de ARNm como proteico, CD44 se expresa en Swan71 pero no en las líneas de CC.

Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por Takahashi y colaboradores a pesar de que emplearon otra línea de trofoblasto extraveloso de primer trimestre, HTR-8/Svneo (Takahashi H et al. 2014). Aunque este resultado parece en discordancia con lo demostrado por nosotros en muestras de pacientes, hay que tener en cuenta que en este trabajo no se pudo evaluar decidua, donde estos autores describen expresión de CD44 en células trofoblásticas HLA-G+ que corresponderían a trofoblasto extraveloso.

Por otro lado, se ha reportado que el promotor de CD44 se encuentra hipermetilado en las líneas de CC (Novakovic et al. 2008; Takahashi H et al. 2014). Esto se correlaciona

con nuestros resultados tanto en las líneas como en las muestras de tejido de CC, y con el de otros autores ya que la hipermetilación es un evento que está íntimamente relacionado con la disminución en la expresión de genes y la posterior leve o nula expresión proteica.

En este trabajo demostramos **por primera vez** la expresión de RHAMM tanto a nivel de ARNm como proteico en la línea Swan71 así como en las líneas de CC.

Como se mencionara en la Introducción de esta Tesis, existen al menos 3 variantes para RHAMM descritas hasta el momento. Aunque es necesario un estudio más profundo para caracterizar cada una de ellas, la estrategia empleada en este trabajo nos permite asegurar que en las líneas estudiadas se expresan al menos dos variantes a nivel de ARNm. Incluso el análisis densitométrico muestra que la expresión de la variante 3 es significativamente menor en las líneas de CC respecto de la línea Swan71.

Demostramos también que RHAMM se expresa a nivel proteico en la línea Swan71 en tanto que en las líneas de CC existen diferencias entre ellas. Demostramos que existe expresión de RHAMM en JEG-3 y BeWo mientras que en JAR la expresión es muy leve o nula. La expresión en todos los casos fue de localización extracelular tal como lo describieran Hardwick y colaboradores (Hardwick et al. 1992). Estos resultados concuerdan con los demostrados previamente en el Capítulo I tanto en muestras de placenta de primer trimestre como en CC donde también se observó expresión de RHAMM de localización extracelular.

Además, estos resultados nos sugieren que podrían existir clones de células malignas cuya tumorigenicidad es independiente de RHAMM, como sucede en el caso de JAR donde no existe correlación entre la expresión de ARNm y proteína, y otros clones RHAMM positivos. La expresión de RHAMM en BeWo, que como mencionamos previamente deriva de una metástasis cerebral, nos abre el interrogante sobre si la capacidad fenotípica de expresar RHAMM podría ser otra estrategia desarrollada por las células malignas para migrar e invadir sitios anatómicos lejanos.

Finalmente, los resultados demuestran que la línea celular JEG-3 expresa RHAMM en su superficie celular pero no secreta AH ni expresa CD44, en concordancia con los resultados previamente demostrados en muestras de pacientes de CC en el Capítulo I de esta Tesis. Esto nos permite concluir que JEG-3 es el mejor modelo *in vitro* para estudiar el efecto de la interacción AH-RHAMM.

CAPITULO III

Primera Parte

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACIDO HIALURONICO EN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE CORIOCARCINOMA HUMANO JEG-3

Como mencionamos en la introducción de esta Tesis, el CC tienen una gran capacidad de metastatizar en diversos órganos en sitios lejanos como son: cerebro, hígado, bazo, sistema gastrointestinal, riñón, pulmón. Considerando también que el AH se encuentra implicado en el proceso de migración celular, y teniendo en cuenta que como producto del metabolismo del AH de alto peso molecular, ya sea por desbalance de las enzimas HAS y/o Hyals o por la acción de radicales libres, sería factible encontrar fragmentos de diversos pesos moleculares de AH en el estroma, se evaluó en primer lugar la participación de AH-APM, -BPM y oAH en la migración de las células JEG-3.

Demostramos que el AH-BPM, pero no el de AH-APM ni oAH, es capaz de inducir migración de las células JEG-3 en una concentración de 500µg/ml a 24 hs. Este resultado obtenido empleando el ensayo de la herida fue corroborado por otro ensayo empleando cámaras Transwell y se complementa con lo reportado por Takahashi y colaboradores quienes demostraron que concentraciones menores de 500µg/ml de AH-BPM no inducen invasión de células JEG-3 (Takahashi H et al. 2014). La participación de los oHA en el proceso de migración ha sido descrito en cicatrización dérmica donde evaluaron fragmentos de peso molecular definido (Tolg et al. 2012; Tolg et al. 2014). Hay que destacar que en este trabajo se empleó una mezcla heterogénea conformada por glicoconjugados entre 4 y 14 unidades disacarídicas tal como se detalló en la sección de materiales y métodos. Teniendo en cuenta que en el contexto de un determinado proceso co-existe una mezcla heterogénea este reactivo podría resultar más representativo que una preparación definida.

Dado que un estímulo en la proliferación celular podría enmascarar el efecto observado en la migración, evaluamos la incorporación de timidina tritiada en células JEG-3 frente al tratamiento con AH de diferentes pesos moleculares. Por un lado, demostramos que 500µg/ml de AH-BPM no induce proliferación celular. Esto indica que el efecto del AH-BPM sobre la migración no es enmascarado por la proliferación celular.

Por otro lado, demostramos que ninguna dosis de AH-APM induce efecto alguno sobre la proliferación. En cambio dosis menores a 500µg/ml de AH-BPM inducen una disminución en la proliferación luego de 72hs de tratamiento. Un resultado similar se obtuvo con 500µg/ml de oHA. Estos resultados nos lleva a cuestionarnos sobre el efecto de la relación del peso molecular y la concentración de fragmentos sobre la inducción de muerte celular. Esta cuestión está siendo profundizada en el laboratorio.

También se ha reportado que el AH induce diferenciación celular en algunos modelos *in vitro* de piel, cartílago y hueso (Huang et al 2003; Sato et al 2014; (Meran et al. 2007). Como mencionamos anteriormente el CC es un tumor heterogéneo. Este rememora la población celular que se halla en el blastocisto compuesto por citotrofoblasto, trofoblasto extraveloso y sincitiotrofoblasto. Esto nos llevó a estudiar si AH de diversos pesos moleculares en el entorno tumoral es capaz de influenciar la diferenciación hacia algún subtipo en particular. Para dilucidar esto evaluamos la expresión de algunos marcadores trofoblásticos como hCG y sincitina-2 (sincitiotrofoblasto), y HLA-G (trofoblasto extraveloso).

Demostramos **por primera vez** que tanto el AH-APM como el AH-BPM, en una concentración de 500µg/ml, inducen un aumento en la expresión de ARNm para HLA-G y una disminución tanto en la expresión de ARNm para sincitina-2 como en la secreción de hCG al medio extracelular. La modulación encontrada de estos marcadores sugiere que tanto el AH-APM como el AH-BPM inducen una diferenciación hacia el fenotipo extraveloso.

Por otro lado, se encontró que los oHA no inducen cambios significativos en la expresión de HLA-G ni en la secreción de hCG mientras que la expresión de sincitina-2 disminuye luego del tratamiento con estos fragmentos. Sin embargo, estos resultados no permiten concluir sobre el efecto de los oHA sobre la diferenciación celular.

En conjunto, los resultados demostrados nos permiten hipotetizar sobre el efecto concertado entre el AH-APM el cual induce diferenciación hacia el fenotipo extraveloso, y el AH-BPM, que además de inducir el mismo efecto, estimula la migración de células JEG-3 sin afectar la proliferación celular. Esto también abre el interrogante sobre el papel que podrían estar desempeñando ya sea hialuronidasas u otras moléculas a fin de favorecer el clivaje del AH-APM para generar AH-BPM e

inducir su migración e invasión celular (Figura 36). En la actualidad el papel de las hialuronidasas está siendo estudiado en el laboratorio.

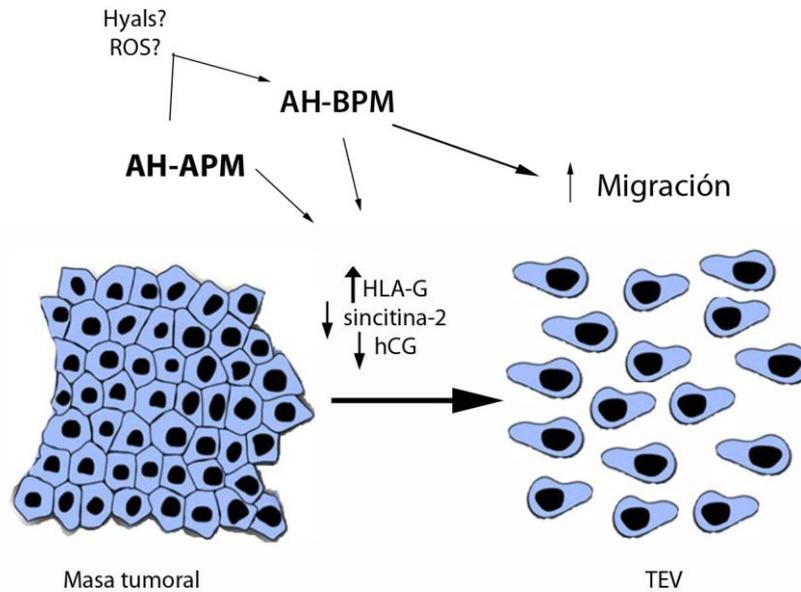


Figura 36. Modelo propuesto del efecto de AH-APM y AH-BPM sobre la migración y diferenciación celular.

Segunda Parte

EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO DEL ACIDO HIALURONICO SOBRE LA MIGRACIÓN CELULAR

En base a los resultados obtenidos en la Primera Parte de este Tercer Capítulo, se profundizó el estudio sobre los mecanismos moleculares que subyacen a la inducción de la migración ejercida por el AH-BPM.

Teniendo en cuenta que hCG es una glicoproteína de radical importancia tanto en el establecimiento de la gestación como en ETG, y que constituye un factor autocrino/paracrino en la migración e invasión celular, se evaluó su implicancia en la migración inducida por AH-BPM. Además, dado que aún se discute cuál es la isoforma de hCG predominante en CC, en lugar de co-tratar las células con AH-BPM y diferentes dosis de hCG, como estrategia para este estudio se empleó un anticuerpo monoclonal específico para hCG a fin de bloquear la hCG endógena.

Demostramos que el bloqueo de hCG disminuye la capacidad de migración tanto basal, tal como se esperaba, como en presencia de AH-BPM sugiriendo que dicho proceso depende del nivel de hCG en el medio extracelular.

Este resultado parece contraponerse al demostrado previamente donde el tratamiento con AH-BPM tiende a inducir una disminución en el nivel de hCG. Sin embargo, es interesante destacar que el método empleado para cuantificar hCG detecta varias isoformas de hCG las cuales participan en diferentes procesos biológicos. Entre ellas se encuentra la variante hiperglicosilada. Algunos estudios indican que esta isoforma es secretada en las primeras semanas de gestación por el trofoblasto extraveloso, responsable de la invasión celular, así como por células de coriocarcinoma. Mientras algunos autores reportan que las células JEG-3 secretan únicamente esta isoforma, otros autores reportan que JEG-3 secreta otras isoformas de hCG además de la hiperglicosilada (Hands Schuh, K., et al. 2007; Lee, CL., et al. 2013).

Los resultados obtenidos hasta aquí nos conducen a hipotetizar que el tratamiento con AH-BPM podría inducir un aumento en la variante hiperglicosilada. Sin embargo, es necesario un estudio exhaustivo para determinar la relación entre ambas variantes, hiperglicosilada y regular, luego del tratamiento con AH-BPM y su comparación con el basal.

Posteriormente, se evaluó la implicancia de las vías de señalización intracelular MEK-ERK y PI3K/Akt en la migración inducida por AH-BPM.

Demostramos que el tratamiento con el inhibidor farmacológico, Ly249002, el cual es específico para PI3K reduce la capacidad de migración tanto basal como post-estímulo con AH-BPM. En cambio, la inhibición de MEK con U0126 no afecta la migración celular en dichas condiciones.

Para profundizar este resultado se evaluó la fosforilación de ERK como Akt y se demostró que en las condiciones de estudio el AH-BPM induce una modulación de ERK que es regulada tanto por MEK como por PI3K de modo temporal. Esto puede evidenciarse en el tratamiento a corto plazo (2 hs) donde frente al agregado de AH-BPM se produce un aumento en la desfosforilación independiente de estas quinasas y luego en el tratamiento a largo plazo (24 hs) donde la fosforilación de ERK aumenta por encima del basal dependiendo tanto de MEK como de PI3K. Sin embargo, hay que destacar que la inhibición de MEK no es suficiente para inhibir la migración celular como mencionamos previamente. Además, si bien el nivel de fosforilación de ERK cuando se inhibe PI3K es similar al tratamiento con el inhibidor de MEK, la inhibición de PI3K sí afecta la migración celular. De estos resultados también se desprende que existe un crosstalk entre las vías de MEK-ERK y PI3K/Akt.

En estas condiciones de estudio no se encontró actividad basal de Akt ni tampoco frente a los diferentes tratamientos. Esto sugiere que la activación de la vía PI3K podría ocurrir a muy corto plazo luego del estímulo con AH-BPM.

En resumen, demostramos **por primera vez** que el tratamiento con AH-BPM induce la migración celular a través de un aumento en la fosforilación de ERK el cual depende de la participación de la quinasa PI3K (Figura 37).

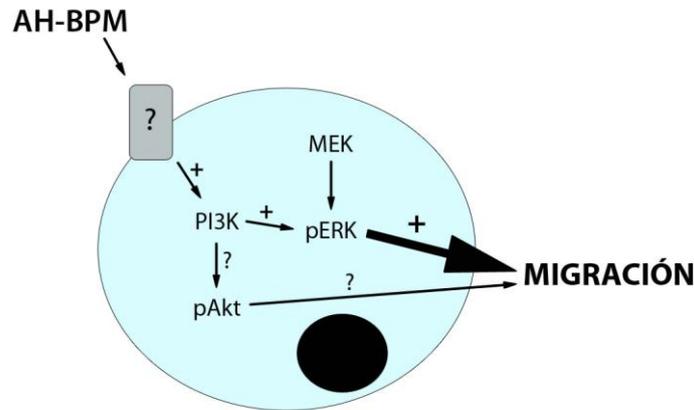


Figura 37. Participación de las vías de señalización en la migración de células JEG-3 la inducida por AH-BPM.

Posteriormente se evaluó la implicancia de los principales receptores para AH asociados a neoplasias, CD44 y RHAMM, en el efecto del AH-BPM sobre la migración de las células JEG-3. Para esto se emplearon anticuerpos bloqueantes específicos para dichos receptores y se evaluó la capacidad de afectar la migración celular de cada uno por separado en presencia o no de AH-BPM.

Demostramos **por primera vez** que el bloqueo de RHAMM reduce la capacidad migratoria tanto basal como frente al estímulo con AH-BPM. Esto indica que RHAMM es capaz de mediar el efecto del AH-BPM sobre la migración celular. Además, tal como se esperaba, el bloqueo de CD44 no ejerció ningún efecto en dicho proceso. Esto último concuerda con la ausencia de expresión de dicha proteína tanto en las muestras de pacientes como en las líneas celulares demostrada anteriormente.

Para profundizar el mecanismo de acción subyacente a la interacción AH-RHAMM sobre la migración, se evaluaron las vías de señalización MEK-ERK y PI3K/Akt. Para ello se trataron las células con el anticuerpo bloqueante para RHAMM en presencia o no de AH-BPM y se evaluaron las actividades de ERK y Akt.

Demostramos que el bloqueo de RHAMM en presencia de AH-BPM induce una disminución en la fosforilación de ERK. Esto sugiere que la interacción AH-RHAMM modula la migración a través de esta quinasa.

En estas condiciones no se observó actividad basal de Akt y tampoco cambios frente a los tratamientos. Como mencionamos anteriormente, es posible que Akt se active en períodos más cortos de los estudiados luego del estímulo con AH-BPM. Esta cuestión está siendo estudiada en el laboratorio.

Teniendo en cuenta lo demostrado anteriormente, este resultado sugiere que la interacción AH-RHAMM induce la fosforilación de ERK a través de PI3K. La activación de PI3K producto de dicha interacción ha sido reportada en la migración de células de músculo liso vascular (Goueffic et al. 2006) y en la proliferación de células leucémicas (Lompardía et al. 2013).

Como se mencionó en la Introducción, cuando RHAMM se encuentra en la superficie celular, dado que no posee fragmento transmembrana, está asociado a otro receptor. Hasta el momento se ha descrito su asociación a CD44 y a algunos receptores de factores de crecimiento. En este trabajo demostramos que CD44 no está involucrado. Es interesante destacar entonces que RHAMM podría estar contribuyendo en la migración, y a otros procesos celulares que no han sido estudiados en esta tesis, en conjunto con algún factor de crecimiento asociándose al receptor del factor en cuestión. En células JEG-3 otros autores han reportado que EGFR, PDGFR y TGF β R-1 participan en el proceso de migración (Holmgren et al. 1993; Li 2012; Massimiani et al 2015). Asimismo, lo demostrado en este Capítulo también nos permite hipotetizar que otras vías de señalización podrían activarse y contribuir al efecto del AH-BPM sobre la migración celular.

En función de todo lo expuesto en este Tercer Capítulo, los resultados nos permiten concluir que el AH-APM y el AH-BPM inducen una modulación en la expresión de los marcadores trofoblásticos que se asocia a un perfil de trofoblasto extraveloso, subtipo de trofoblasto con capacidad migratoria. Sin embargo, mientras el AH-BPM induce un aumento en la migración; el AH-APM no afecta dicho proceso. Este efecto observado del AH-BPM sobre la migración depende del nivel de hCG endógena en el medio extracelular. Y además, involucra un aumento en la fosforilación de ERK el cual depende de la participación de la quinasa PI3K y es mediado por el receptor RHAMM.

CONSIDERACIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El objetivo principal de esta Tesis doctoral fue estudiar la implicancia del AH en los procesos fisiopatológicos asociados a la Enfermedad Trofoblástica Gestacional. Mediante el análisis de muestras de tejidos de pacientes con ETG en este trabajo de Tesis se demostró que existe una expresión diferencial de AH y sus receptores, CD44 y RHAMM, en las poblaciones trofoblásticas de algunas entidades de Enfermedad Trofoblástica Gestacional como también en placenta de primer trimestre. Específicamente, tales entidades de ETG son mola hidatiforme completa, coriocarcinoma y tumor trofoblástico de sitio placentario. Los resultados demostrados sugieren que el AH, CD44 y RHAMM participan tanto del proceso fisiológico de implantación y placentación así como del proceso fisiopatológico asociado a cada una de las entidades de ETG estudiadas. Posteriormente para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes al papel del AH en la biología del coriocarcinoma empleamos la línea celular de coriocarcinoma humano JEG-3. Demostramos que es un modelo *in vitro* adecuado para estudiar este efecto ya que expresa RHAMM en su superficie celular pero no expresa CD44 y tampoco secreta AH al medio extracelular. En este modelo, demostramos que el AH-APM y –BPM inducen la diferenciación bioquímica de las células JEG-3 hacia un fenotipo extravelloso a través de un aumento en la expresión de HLA-G, disminución de hCG y de sincitina-2. Sin embargo, el AH-BPM, pero no el AH-APM, es capaz de inducir migración celular sin afectar la proliferación. Además dicho efecto depende del nivel de hCG endógena. Asimismo, este efecto del AH sobre la migración de las células JEG-3 involucra un aumento en la fosforilación de ERK el cual depende de la participación de la quinasa PI3K, demostrando la existencia de un crosstalk entre las vías PI3K y MAPK, y es mediado por el receptor RHAMM (Figura 38).

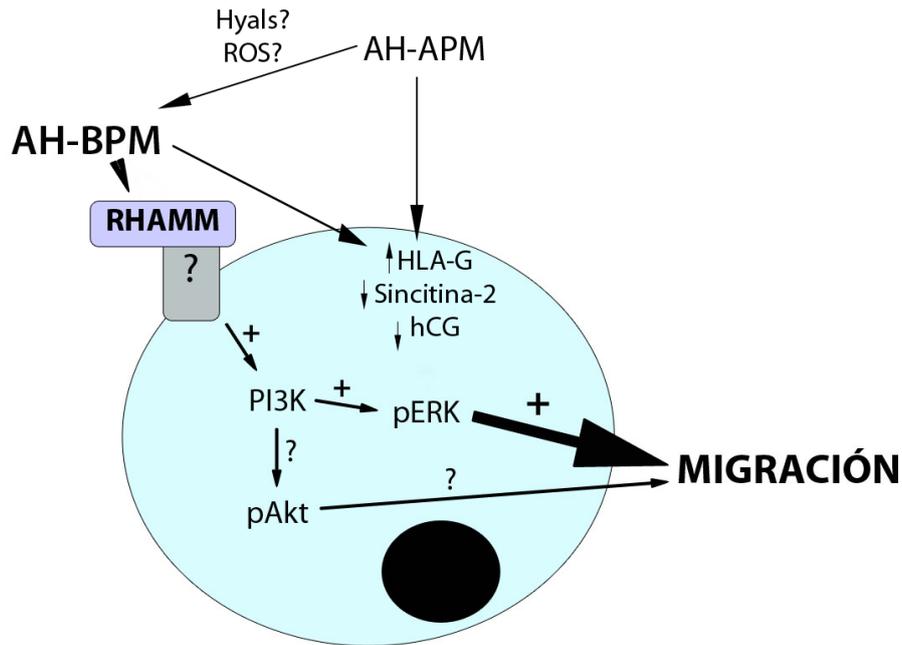


Figura 38. Modelo propuesto del mecanismo de acción del AH sobre la progresión de coriocarcinoma. En esta tesis se demuestra que el AH-APm y AH-BPM inducen la diferenciación bioquímica hacia un fenotipo extraveloso el cual es pro-migratorio. Además, la interacción entre AH-BPM y RHAMM induce la migración celular a través de la fosforilación de ERK el cual depende de la participación de la quinasa PI3K.

Esta Tesis representa una importante contribución en el campo de las ciencias del AH ya que su participación en procesos neoplásicos asociados a la gestación y otros trastornos gestacionales ha sido poco estudiada. Asimismo, los resultados demostrados en este trabajo dieron origen a nuevos interrogantes que están siendo objeto de estudio en el laboratorio.

La importancia del conocimiento de algunos mecanismos celulares y moleculares relacionados al efecto del AH, componente de la MEC, en coriocarcinoma radica en la posibilidad de generar nuevas estrategias terapéuticas para esta enfermedad en aquellos casos donde fracase la quimioterapia convencional y se presente recidiva y quimioresistencia. En estos casos las pacientes presentan metástasis en cerebro e hígado las cuales constituyen un mal pronóstico para la vida de la paciente. En concordancia con esto, el estudio de la participación de RHAMM en la migración e invasión de células de coriocarcinoma así como los mecanismos subyacentes están siendo profundizados.

Además, la expresión de AH, CD44 y RHAMM será estudiado en una mayor cantidad de muestras de molas hidatiformes a fin de poder evaluar su utilidad como potencial marcador diferencial y/o pronóstico hacia una neoplasia trofoblástica gestacional. Es importante recordar y destacar lo primordial de un diagnóstico temprano y adecuado en ETG, al igual que en otras patologías. Esto favorece en primer lugar la calidad de vida del paciente y en última instancia también permite la optimización de los recursos de un sistema de salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaniz, L. (2006). "Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF- B transcription factor." *Glycobiology* **16**(5): 359-367.
- Alaniz, L., M. García, et al. (2004). "Modulation of matrix metalloproteinase-9 activity by hyaluronan is dependent on NF-κB activity in lymphoma cell lines with dissimilar invasive behavior." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**(2): 736-743.
- Alaniz, L., M. G. García, et al. (2006). "Hyaluronan oligosaccharides induce cell death through PI3-K/Akt pathway independently of NF- B transcription factor." *Glycobiology* **16**(5): 359-367.
- Assmann, V., D. Jenkinson, et al. (1999). "The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments." *Journal of Cell Science* (112): 3943-3954.
- Assmann, V., J. F. Marshall, et al. (1998). "The human hyaluronan receptor RHAMM is expressed as an intracellular protein in breast cancer cells." *Journal of Cell Science* (111): 1685-1694.
- Averbeck, M., C. A. Gebhardt, et al. (2006). "Differential Regulation of Hyaluronan Metabolism in the Epidermal and Dermal Compartments of Human Skin by UVB Irradiation." *Journal of Investigative Dermatology* **127**(3): 687-697.
- Balaram, P., S. Alex, et al. (2004). "Adhesion-related proteins E-cadherin, P-cadherin, CD44, and CD44v6, and antimetastatic protein nm23H1 in complete hydatidiform moles in relation to invasion potential." *Int J Gynecol Cancer* **14**(3): 532-539.
- Bamberger, A., S. Jenatschke, et al. (2000). "Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG-3 choriocarcinoma cells " *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**(10): 3932-3936.
- Barrientos, G., A. Toro, et al. (2015). "Leptin promotes HLA-G expression on placental trophoblasts via the MEK/Erk and PI3K signaling pathways." *Placenta* **36**(4): 419-426.
- Bart G, NO Vico, et al. (2015). "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assays reveal functionally relevant homo- and heteromeric complexes among hyaluronan synthases HAS1, HAS2, and HAS3." *The Journal of Biological Chemistry* **290**(18):11479-11490.
- Blaise, S., N. de Parseval, et al. (2003). "Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(22): 13013-13018.
- Bollyky, P. L., B. A. Falk, et al. (2009). "CD44 Costimulation Promotes FoxP3+ Regulatory T Cell Persistence and Function via Production of IL-2, IL-10, and TGF- " *The Journal of Immunology* **183**(4): 2232-2241.
- Bollyky, P. L., J. D. Lord, et al. (2007). "Cutting Edge: High Molecular Weight Hyaluronan Promotes the Suppressive Effects of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells." *The Journal of Immunology* **179**(2): 744–747.
- Carosella, E. D., B. Favier, et al. (2008). "Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule." *Blood* **111**(10): 4862-4870.
- Castellucci, M., G. Kosanke, et al. (2000). "Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development." *Hum Reprod Update* **6**(5): 485-494.
- Cole, L. A. (2010). "Biological functions of hCG and hCG-related molecules." *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**(102).
- Cole, L. A. and S. Butler (2012). "Hyperglycosylated hCG, hCGβ and Hyperglycosylated hCGβ: Interchangeable cancer promoters." *Molecular and Cellular Endocrinology* **349**(2): 232-238.
- Cole, L. A., S. A. Butler, et al. (2006). "Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia." *Gynecologic Oncology* **102**(2): 151-159.

- Cole, L. A., S. DuToit, et al. (2011). "Total hCG tests." Clinica Chimica Acta **412**(23-24): 2216-2222.
- Cordo-Russo, R. I., L. D. Alaniz, et al. (2010). "Hyaluronan induces migration of multidrug-resistant lymphoma cell lines in vitro through Tiam1 activation by a PI3K-dependent mechanism." Leukemia Research **34**(11): 1525-1532.
- Cordo Russo, R., M. Garcia, et al. (2009). "Murine Abortion is Associated with Enhanced Hyaluronan Expression and Abnormal Localization at the Fetomaternal Interface." Placenta **30**(1): 88-95.
- Cowman, M. K., H.-G. Lee, et al. (2015). "The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues." Frontiers in Immunology **6**.
- Csoka, A. B., G. I. Frost, et al. (2001). "The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes." Matrix Biology **20**: 499-508.
- Cheung, A., H. Zhang, et al. (2009). "Pathogenesis of choriocarcinoma: clinical, genetic and stem cell perspectives." Future Oncol **5**(2): 217-231.
- Choudhary, M., X. Zhang, et al. (2007). "Putative Role of Hyaluronan and Its Related Genes, HAS2 and RHAMM, in Human Early Preimplantation Embryogenesis and Embryonic Stem Cell Characterization." Stem Cells **25**(12): 3045-3057.
- Delidakis, M., M. Gu, et al. (2011). "Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line." Molecular and Cellular Endocrinology **332**: 213–220.
- Dicker, K. T., L. A. Gurski, et al. (2014). "Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions." Acta Biomaterialia **10**(4): 1558-1570.
- Edelstam, G. A., O. E. Lundkvist, et al. (1991). "Localization of hyaluronan in regions of the human female reproductive tract." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **39**(8): 1131-1135.
- Egeblad, M., E. S. Nakasone, et al. (2010). "Tumors as Organs: Complex Tissues that Interface with the Entire Organism." Developmental Cell **18**(6): 884-901.
- Esnault, C., S. Priet, et al. (2008). "A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(45): 17532-17537.
- Ferretti, C., L. Bruni, et al. (2007). "Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts." Human Reproduction Update **13**(2): 121-141.
- Fournier, T., J. Guibourdenche, et al. (2015). "Review: hCGs: Different sources of production, different glycoforms and functions." Placenta **36**, Supplement 1, Trophoblast Research **29**: 60-65.
- Gebäck, T., M. M. Peter Schulz, et al. (2009). "TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays." BioTechniques **96**(4): 265-279.
- Goldman-Wohl, D. (2001). "A study of human leukocyte antigen G expression in hydatidiform moles." American Journal of Obstetrics and Gynecology **185**(2): 476-480.
- Goldman-Wohl, D., I. Ariel, et al. (2000). "HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies." Molecular Human Reproduction **6**(6): 535-540.
- Goshen, R., I. Ariel, et al. (1996). "Hyaluronan, CD44 and its variant exons in human trophoblast invasion and placental angiogenesis." Mol Hum Reprod **2**(9): 685-691.
- Goueffic, Y., C. Guilluy, et al. (2006). "Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation." Cardiovascular Research **72**(2): 339-348.
- Greiner, J., M. Ringhoffer, et al. (2002). "Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia." Experimental Hematology **30**(9): 1029–1035.

- Guibourdenche, J., K. Handschuh, et al. (2010). "Hyperglycosylated hCG Is a Marker of Early Human Trophoblast Invasion." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **95**(10): E240-E244.
- Guo, Y., C.-L. Lee, et al. (2013). "Soluble Human Leukocyte Antigen-G5 Activates Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signaling and Stimulates Trophoblast Invasion." PLoS One **8**(10): e76023.
- Gust, K. M., M. D. Hofer, et al. (2009). "RHAMM (CD168) is overexpressed at the protein level and may constitute an immunogenic antigen in advanced prostate cancer disease." Neoplasia **11**(9): 956-963.
- Hamilton, S. R., S. F. Fard, et al. (2007). "The Hyaluronan Receptors CD44 and Rhamm (CD168) Form Complexes with ERK1,2 That Sustain High Basal Motility in Breast Cancer Cells." Journal of Biological Chemistry **282**(22): 16667-16680.
- Hanahan, D. and Robert A. Weinberg (2011). "Hallmarks of Cancer: The Next Generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hancock BW. (2009) Gestational trophoblastic disease. Chapters: 4,5,7,8,9,10 and 17. 3rd edition. www.isstd.org
- Haouzi, D., H. Dechaud, et al. (2011). "Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophoblast and endometrial cells during the implantation period." Human Reproduction **26**(6): 1440-1449.
- Harada, H. and M. Takahashi (2006). "CD44-dependent Intracellular and Extracellular Catabolism of Hyaluronic Acid by Hyaluronidase-1 and -2." Journal of Biological Chemistry **282**(8): 5597-5607.
- Hardwick, C., K. Hoare, et al. (1992). "Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility." J Cell Biol **117**(6): 1343-1350.
- Haslinger, P., S. Haider, et al. (2013). "AKT Isoforms 1 and 3 Regulate Basal and Epidermal Growth Factor-Stimulated SGHPL-5 Trophoblast Cell Migration in Humans." Biology of Reproduction **88**(3): 54-54.
- Hatano, H., H. Shigeishi, et al. (2010). "RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroblast cells through a mechanism based on the CD44-EGFR." Laboratory Investigation **91**(3): 379-391.
- Holmgren, L., P. Flam, et al. (1993). "Successive activation of the platelet-derived growth factor beta receptor and platelet-derived growth factor B genes correlates with the genesis of human choriocarcinoma." Cancer Research **53**: 2927-2931.
- Holtan, S. G., D. J. Crendon, et al. (2009). "Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents." Mayo Clin Proc. **84**(11): 985-1000.
- Huang, L., Cheng YY et al. (2003). "The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures." J Biomed Mater Res A **66**(4):880-4.
- Itano, N. (2008). "Simple Primary Structure, Complex Turnover Regulation and Multiple Roles of Hyaluronan." Journal of Biochemistry **144**(2): 131-137.
- Itano, N. and K. Kimata (2008). "Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression." Seminars in Cancer Biology **18**(4): 268-274.
- Itano, N., L. Zhuo, et al. (2008). "Impact of the hyaluronan-rich tumor microenvironment on cancer initiation and progression." Cancer Science **99**(9): 1720-1725.
- Jiang, D., J. Liang, et al. (2011). "Hyaluronan as an immune regulator in human diseases." Physiological Reviews **91**: 221-264.
- Jiang, J., P. Mohan, et al. (2013). "The cytoskeletal protein RHAMM and ERK1/2 activity maintain the pluripotency of murine embryonic stem cells." PLoS One **8**(9): e73548.
- Karbownik, M. and J. Nowak (2013). "Hyaluronan: Towards novel anti-cancer therapeutics." Pharmacological Reports **65**: 1056-1074.

- Kato, H. D., Y. Terao, et al. (2002). "Growth-associated Gene Expression Profiles by Microarray Analysis of Trophoblast of Molar Pregnancies and Normal Villi." International Journal of Gynecological Pathology **21**(3): 255–260.
- Kilburn, B., J. Wang, et al. (2000). "Extracellular Matrix Composition and Hypoxia Regulate the Expression of HLA-G and Integrins in a Human Trophoblast Cell Line." Biology of reproduction **62**: 739-747.
- Kipp, B. R., R. P. Ketterling, et al. (2010). "Comparison of Fluorescence In Situ Hybridization, p57 Immunostaining, Flow Cytometry, and Digital Image Analysis for Diagnosing Molar and Nonmolar Products of Conception." American Journal of Clinical Pathology **133**(2): 196-204.
- Knofler, M. (2010). "Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion." The International Journal of Developmental Biology **54**(2-3): 269-280.
- Kovalevskaya, G., O. Genbacev, et al. (2002). "Trophoblast origin of hCG isoforms: cytotrophoblasts are the primary source of choriocarcinoma-like hCG." Molecular and Cellular Endocrinology **194** 147-155.
- Kovats, S., E. Main, et al. (1990). "A Class I Antigen, HLA-G, Expressed in Human Trophoblasts." Science **248**: 220-223.
- Kurman RJ et al. (2011) Blaustein's pathology of female genital tract. 6th edition. Springer
- Lee, C.-L., P. C. N. Chiu, et al. (2013). "Human chorionic gonadotropin and its free β -subunit stimulate trophoblast invasion independent of LH/hCG receptor." Molecular and Cellular Endocrinology **375**(1-2): 43-52.
- Li, L., L. Qi, et al. (2015). "Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells." International Journal of Molecular Medicine.
- Li, Y. (2012). "The impact of TGF- β 1 on the mRNA expression of T β R I, T β R II, Smad4 and the invasiveness of the JEG-3 placental choriocarcinoma cell line." Oncology Letters.
- Liu, H., X. Liu, et al. (2013). "Proteomic analysis of knock-down HLA-G in invasion of human trophoblast cell line JEG-3." Int J Clin Exp Pathol **6**(11): 2451-2459.
- Liu, X., W. Gua, et al. (2013). "HLA-G regulates the invasive properties of JEG-3 choriocarcinoma cells by controlling STAT3 activation." Placenta **34**: 1044-1052.
- Lomparđía, S. L., D. L. Papademetrio, et al. (2013). "Human leukemic cell lines synthesize hyaluronan to avoid senescence and resist chemotherapy." Glycobiology **23**(12): 1463-1476.
- Lugli, A., G. Iezzi, et al. (2010). "Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer." British Journal of Cancer **103**(3): 382-390.
- Malassine, A., S. Blaise, et al. (2007). "Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (Syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells." Placenta **28**: 185-191.
- Mangeney, M., M. Renard, et al. (2007). "Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(51): 20534-20539.
- Mangili, G., D. Lorusso, et al. (2014). "Trophoblastic Disease Review for Diagnosis and Management." Int J Gynecol Cancer **24**: S109YS116.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.
- Manzanares, D., M. E. Monzon, et al. (2007). "Apical Oxidative Hyaluronan Degradation Stimulates Airway Ciliary Beating via RHAMM and RON." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **37**(2): 160-168.

- Mao, T.-L., R. J. Kurman, et al. (2007). "Immunohistochemistry of choriocarcinoma: an aid in differential diagnosis and in elucidating pathogenesis." Am J Surg Pathol **31**(11): 1726-1732.
- Marongiu, F., S. Doratiotto, et al. (2012). "Cancer as a disease of tissue pattern formation." Progress in Histochemistry and Cytochemistry **47**: 175-207.
- Marzioni, D., C. Crescimanno, et al. (2001). "Hyaluronate and CD44 expression patterns in the human placenta throughout pregnancy." Eur J Histochem **45**(2): 131-140.
- Massimiani, M., L. Vecchione, et al. (2015). "Epidermal growth factor-like domain 7 promotes migration and invasion of human trophoblast cells through activation of MAPK, PI3K and NOTCH signaling pathways." Mol Hum Reprod (5):435-51.
- Maxwell, C. A., J. McCarthy, et al. (2008). "Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions?" Journal of Cell Science **121**(7): 925-932.
- Mendoza, M. C., E. E. Er, et al. (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends in Biochemical Sciences **36**(6): 320-328.
- Meran, S., D. Thomas, et al. (2007). "Involvement of Hyaluronan in Regulation of Fibroblast Phenotype." Journal of Biological Chemistry **282**(35): 25687-25697.
- Misra, S., V. C. Hascall, et al. (2015). "Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer." Frontiers in Immunology **6**.
- Monslow, J., P. Govindaraju, et al. (2015). "Hyaluronan – A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment." Frontiers in Immunology **6**.
- Monzon, M. E., N. Fregien, et al. (2010). "Reactive Oxygen Species and Hyaluronidase 2 Regulate Airway Epithelial Hyaluronan Fragmentation." Journal of Biological Chemistry **285**(34): 26126-26134.
- Mouillot, G., C. Marcou, et al. (2007). "Hypoxia modulates HLA-G gene expression in tumor cells." Human Immunology **68**: 277-285.
- Nagymanyoki, Z., M. Callahan, et al. (2007). "Immune cell profiling in normal pregnancy, partial and complete molar pregnancy." Gynecologic Oncology **107**(2): 292-297.
- Nagymanyoki, Z., M. J. Callahan, et al. (2008). "Immune Cell Profiling in Intraplacental and Postmolar Choriocarcinomas." The Journal of Reproductive Medicine **53**(8): 558-564.
- Neubauer, N., A. Strohl, et al. (2015). "Fatal gestational trophoblastic neoplasia: An analysis of treatment failures at the Brewer Trophoblastic Disease Center from 1979–2012 compared to 1962–1978." Gynecology Oncology **138**(2): 339-342.
- Nikitovic, D., K. Kouvidi, et al. (2013). "The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression." BioMed Research International **2013**: 1-12.
- Norwitz, E., D. Schust, et al. (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." The New England Journal of Medicine **345**(19): 1400-1408.
- Novakovic, B., V. Rakyán, et al. (2008). "Specific tumour-associated methylation in normal human term placenta and first-trimester cytotrophoblasts." Molecular Human Reproduction **14**(9): 547-554.
- Orian-Rousseau, V. (2010). "CD44, a therapeutic target for metastasising tumours." European Journal of Cancer **46**(7): 1271-1277.
- Park, D., Y. Kim, et al. (2012). "Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGF β receptor interaction via CD44-PKC δ ." Molecules and Cells **33**(6): 563-574.
- Patillo, R. and G. Gey (1968). "The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblast cells in vitro." Cancer Research **28** 1231-1236.
- Prast, J., L. Saleh, et al. (2008). "Human Chorionic Gonadotropin Stimulates Trophoblast Invasion through Extracellularly Regulated Kinase and AKT Signaling." Endocrinology **149**(3): 979-987.

- Qiu, Q. (2004). "Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration." Molecular Human Reproduction **10**(9): 677-684.
- Rabreau, M., N. Rouas-Freiss, et al. (2000). "HLA-G Expression in Trophoblast Cells Is Independent of Embryonic Development." Human Immunology **61**: 1108–1112.
- Red-Horse, K. (2004). "Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface." Journal of Clinical Investigation **114**(6): 744-754.
- Reynolds, E., B. Dubeshter, et al. (2007). "Expression of CD44, E-cadherin, and antimetastatic protein nm23-H1 in complete hydatidiform moles." Gynecologic Oncology **104**(2): 451-454.
- Salamonsen, L., S. Shuster, et al. (2001). "Distribution of hyaluronan in human endometrium across the menstrual cycle." Cell and Tissue Research **306**(2): 335-340.
- Sarmadi, S., N. Izadi-Mood, et al. (2011). "p57KIP2 immunohistochemical expression: a useful diagnostic tool in discrimination between complete hydatidiform mole and its mimics." Archives of Gynecology and Obstetrics **283**(4): 743-748.
- Savage, P., I. Kelpandides, et al. (2015). "Brain metastases in gestational trophoblast neoplasia: An update on incidence, management and outcome." Gynecologic Oncology **137**: 73-76.
- Savani, R. C., G. Cao, et al. (2001). "Differential Involvement of the Hyaluronan (HA) Receptors CD44 and Receptor for HA-mediated Motility in Endothelial Cell Function and Angiogenesis." Journal of Biological Chemistry **276**(39): 36770-36778.
- Sato, E., T. et al. (2014). "High molecular weight hyaluronic acid increases the differentiation potential of the murine chondrocytic ATDC5 cell line." J Orthop Res **32**(12):1619-27.
- Schumacher, A., N. Brachwitz, et al. (2009). "Human Chorionic Gonadotropin Attracts Regulatory T Cells into the Fetal-Maternal Interface during Early Human Pregnancy." The Journal of Immunology **182**(9): 5488-5497.
- Sebire, N. (2010). "Histopathological Diagnosis of hydatiform mole: Contemporary Features and Clinical Implications." Fetal & Pediatric Pathology **29** (1): 1–16.
- Sebire, N. J. and I. Lindsay (2010). "Current Issues in the Histopathology of Gestational Trophoblastic Tumors." Fetal & Pediatric Pathology **29**(1): 30-44.
- Shih, I.-M. (2007). "Gestational trophoblastic neoplasia—pathogenesis and potential therapeutic targets." The Lancet Oncology **8**(7): 642-650.
- Shih, I.-M. (2011). "Trophoblastic vasculogenic mimicry in gestational choriocarcinoma." Modern Pathology **24**(5): 646-652.
- Shih, I. (2007). "Application of Human Leukocyte Antigen–G Expression in the Diagnosis of Human Cancer." Human Immunology **68**(4): 272-276.
- Singer, G., R. J. Kurman, et al. (2002). "HLA-G Immunoreactivity Is Specific for Intermediate Trophoblast in Gestational Trophoblastic Disease and Can Serve as a Useful Marker in Differential Diagnosis." The American Journal of Surgical Pathology **7** (26): 914–920.
- Sironen, R. K., M. Tammi, et al. (2011). "Hyaluronan in human malignancies." Experimental Cell Research **317**(4): 383-391.
- St-Jacques, S., M. Forte, et al. (1994). "Localization of Endoglin, a Transforming Growth Factor- β Binding Protein, and of CD44 and Integrins in Placenta during the First Trimester of Pregnancy." Biology of Reproduction **51**: 405-413.
- Stern, R. and M. Jedrzejewski (2006). "Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action." Chemical Reviews **106**(3): 818-839.
- Straszewski-Chavez, S. L., V. M. Abrahams, et al. (2009). "The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71." Placenta **30**(11): 939-948.

- Sun, S., A. Melamed, et al. (2015). "Changing presentation of complete hydatidiform mole at the New England Trophoblastic Disease Center over the past three decades: Does early diagnosis alter risk for gestational trophoblastic neoplasia?" Gynecologic Oncology **138**: 46-49.
- Takahashi H, Takizawa T, et al. (2014). "Extravillous trophoblast cell invasion is promoted by the CD44-hyaluronic acid interaction." Placenta (35): 163-170.
- Tamer, T. M. (2013). "Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing." Interdisciplinary Toxicology **6**(3).
- Tolg, C., S. R. Hamilton, et al. (2012). "A RHAMM Mimetic Peptide Blocks Hyaluronan Signaling and Reduces Inflammation and Fibrogenesis in Excisional Skin Wounds." The American Journal of Pathology **181**(4): 1250-1270.
- Tolg, C., J. B. McCarthy, et al. (2014). "Hyaluronan and RHAMM in Wound Repair and the "Cancerization" of Stromal Tissues." BioMed Research International 1-18.
- Tolg, C., P. Telmer, et al. (2014). "Specific Sizes of Hyaluronan Oligosaccharides Stimulate Fibroblast Migration and Excisional Wound Repair." PLoS One **9**(2): e88479.
- Toole, B. P. (2002). "MINI REVIEW: Hyaluronan promotes the malignant phenotype." Glycobiology **12**(3): 37R-42R.
- Toole, B. P. (2004). "Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue." Nature Reviews Cancer **4**(7): 528-539.
- Tristem, M. (2000). "Identification and Characterization of Novel Human Endogenous Retrovirus Families by Phylogenetic Screening of the Human Genome Mapping Project Database." Journal of virology **74**(8): 3715–3730.
- Turley, E. and R. Harrison (1999). "RHAMM, a member of the hyaladherins." Glycoforum.
- Twarock, S., M. I. Tammi, et al. (2010). "Hyaluronan Stabilizes Focal Adhesions, Filopodia, and the Proliferative Phenotype in Esophageal Squamous Carcinoma Cells." Journal of Biological Chemistry **285**(30): 23276-23284.
- Udabage, L. (2005). "Antisense-Mediated Suppression of Hyaluronan Synthase 2 Inhibits the Tumorigenesis and Progression of Breast Cancer." Cancer Research **65**(14): 6139-6150.
- Vargas, A., J. Moreau, et al. (2009). "Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells." Journal of Molecular Biology **392**: 301-318.
- Wang, C., A. Thor, et al. (1998). "The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression." Clinical Cancer Research **4**(3): 567-576.
- Weigel, P. H. and P. L. DeAngelis (2007). "Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases." The Journal of Biological Chemistry **282**(51): 36777-36781.
- Yang, B., B. Yang, et al. (1994). "Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein." The EMBO Journal **13**(2): 286-296.
- Yang, B., L. Zhang, et al. (1993). "Identification of Two Hyaluronan-binding Domains in the Hyaluronan Receptor RHAMM" The Journal of Biological Chemistry **268**(12): 8617-8623.
- Yie, S. m. (2005). "Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells and human cytotrophoblasts in vitro." Human Reproduction **21**(1): 46-51.
- Zdravkovic, M., G. Aboagye-Mathiesen, et al. (1999). "Susceptibility of MHC Class I Expressing Extravillous Trophoblast Cell Lines to Killing by Natural Killer Cells." Placenta **20**: 431-440.
- Zhang, S., M. Chang, et al. (1998). "The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase." The Journal of Biological Chemistry **273**(18): 11342-11348.

Zhu, R., Y. H. Huang, et al. (2013). "Hyaluronan up-regulates growth and invasion of trophoblasts in an autocrine manner via PI3K/AKT and MAPK/ERK1/2 pathways in early human pregnancy." Placenta **34**(9): 784-791.