



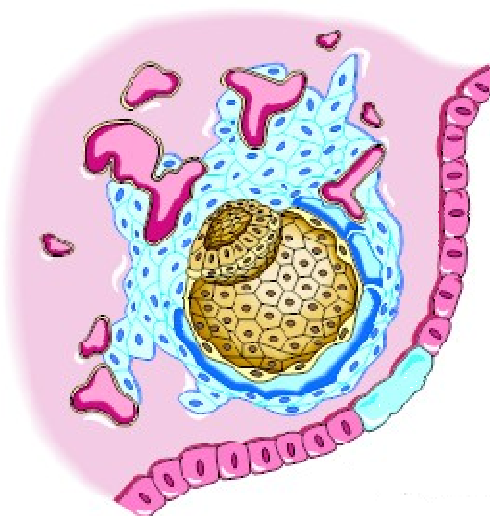
Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Departamento de Química Biológica



*Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas "Dr. Alejandro C. Paladini"*

*Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

## **Mecanismo de acción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en células trofoblásticas humanas**



**Autor: Bioq. Verónica Alejandra Furmento**

**Director: Dra. Leonor Patricia Roguin**

**Director Adjunto: Dra. Verónica Julieta Marino**

*A mis abuelos*

*"El arte de la ciencia: repasar el camino, mirar lo que otros miraron y ver lo que otros no vieron"*

*Ralph W. Emerson.  
Escritor, filósofo y poeta estadounidense (1803-1882)*

## **Agradecimientos**

A la Dra. Leonor P. Roguin, directora de esta Tesis, por haberme dado la posibilidad de emprender este camino bajo su dirección. Por haberme enseñado, apoyado y corregido en mi labor científica. Por la confianza depositada en mí.

A la Dra. Julieta Marino, directora adjunta de esta Tesis, por haberme enseñado a dar los primeros pasos en este camino. Por su constante acompañamiento y dedicación. Por su amistad.

A la Dra. Viviana C. Blank por haberme asistido en este camino. Por sus consejos y puntos de vista. Al Dr. Mariano G. Cárdenas por haberme introducido en el campo de las ciencias. A ambos, por los buenos momentos compartidos y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio Nicolás y Yanina, por el día a día, por las experiencias compartidas. A Maite, José Luis, Mariel, Josefina y Valentina, por los almuerzos de todos los días.

A mis compañeros del Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas "*Dr. Alejandro C. Paladini*" por hacer del instituto un lugar de trabajo agradable. A Susana, Nicolás y Mirta por facilitar mis tareas en el cuarto de cultivo celular.

Al Dr. R. Claudio Aguilar por haber avalado mi estadía en la Universidad de Purdue, West Lafayette, Estados Unidos. A Claudia Hanna, Kayalvizhi Madhivanan y Vidya por hacer muy grata mi estadía en Purdue. A la Dra. Graciela Cremaschi y a la Lic. Florencia Cayrol, de la Universidad Católica Argentina, por su colaboración en los ensayos de citometría de flujo.

A mi familia. A mis padres, Silvia y Horacio, por los valores inculcados y por el apoyo brindado. A mis hermanos Cintia, Andrés e Ignacio, por su cariño. En especial, a mi hermana Cintia, por creer siempre en mí y apoyar mis elecciones.

A mis amigos, Malena y Matías, por estar cuando los necesité. Por compartir la carrera científica y entenderme.

Por último, pero sin duda no menos, a Ismael, mi compañero de vida, por haber estado siempre a mi lado, por apoyarme incondicionalmente en este largo camino. Por su infinita paciencia y comprensión.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

**Furmento V.A.**, Marino J.V., Blank V.C., Roguin L.P. (2014) The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-and vascular endothelial growth factor through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells. *Placenta* 35, 937-946.

**Furmento V.A.**, Marino V.J., Blank V.C., Cayrol M.F., Cremaschi G., Aguilar R.C. Roguin L.P. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) upregulates integrin  $\beta$ 1 and increases migration of human trophoblast Swan 71 cells via PI3K/Akt and MAPK activation. *Manuscrito en preparación.*

Asimismo, durante el periodo de la Tesis se publicaron los siguientes trabajos:

Marino V.J., **Furmento V.A.**, Zotta E., Roguin L.P. (2009) Peritumoral administration of granulocyte colony-stimulating factor induces an apoptotic response on a murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 8, 1737-1743.

Blank V.C., Bertucci L., **Furmento V.A.**, Peña C., Marino V.J., Roguin L.P. (2013) A chimeric cyclic interferon- $\alpha$ 2b peptide induces apoptosis by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C $\delta$  and p38 MAP kinase. *Experimental Cell Research* 319, 1471-1481.

Marino V.J., García Vior M.C., **Furmento V.A.**, Blank V.C., Awruch J., Roguin L.P. (2013) Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates Zinc (II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45, 2553-2562.

## ***Abreviaturas y símbolos***

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
Akt	Proteína quinasa B
ARN	Ácido ribonucleico
Bay 11-7082	(E)-3-[(4-metilfenilsulfonil)-2-propenenitrilo
BSA	Seroalbúmina bovina
CRH	Región homóloga de receptores de citoquinas
CSF	Factor estimulante de colonias
Da	Dalton
DABCO	1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
D-MEM/F-12	Mezcla de Medio Eagle Modificación Dubelco y Medio Ham-F12
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Enzimoimmunoensayo
Epo	Eritropoyetina
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ES	Error estándar
FAK	Quinasa de adhesión focal
FERM	Dominio comprendido por las proteínas banda 4.1, ezrina, radixina y moesina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FnIII	Fibronectina tipo III
Fn	Fibronectina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
G-CSFR	Receptor para G-CSF
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

Hepes	Buffer ácido [N-(2-hidroxi-etil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico]
Höescht 33258	Bisbencimida
Ig	Inmunoglobulina
IκB	Inhibidor κB
IKK	Quinasa de IκB
IL	Interleuquina
JAK	Quinasa Janus
JH	Dominio con homología a JAK
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
kDa	Kilodalton
LM	Laminina
Ly 294002	2-morpholin-4-il-8-fenilcromen-4-ona
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKK	Quinasa de MAPK
MAPKKK	Quinasa de MAPKK
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteasa
MT-MMP	MMP de membrana
MTS	Sal interna de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio]
NF-κB	Factor nuclear κB
PBS	Buffer fosfato de sodio 0,01 M, cloruro de sodio 0,15 M, pH 7,4
PBS-TX	Tritón X-100 0,2% (v/v) en PBS
PD 98059	2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona
PdtIns(4,5)P <sub>2</sub> o PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PdtIns(3,4,5)P <sub>3</sub> o PIP <sub>3</sub>	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PdtIns(3,4)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 3,4 bifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa

PKC	Proteína quinasa C
PMA	Acetato de forbol miristato
proMMP	Forma latente de MMP
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
rhG-CSF	G-CSF humano recombinante
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SB 203580	4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero fetal bovino
SH	Dominio con homología a Src
STAT	Transductores de señal y activadores de la transcripción
TBS	Buffer Tris-HCl 0,01 M, cloruro de sodio 0,13M, pH 7,4
TBS-T	Tween-20 0,05% (v/v) en TBS
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento tumoral- $\beta$
TIMP	Inhibidor tisular de MMP
TK	Tirosina quinasa
Tris	Tris[hidroximetil]aminometano
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor para VEGF
WB	Western blot



## ***Código de aminoácidos***

<b>Código de una letra</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Aminoácido</b>
<b>A</b>	Ala	Alanina
<b>R</b>	Arg	Arginina
<b>N</b>	Asn	Asparagina
<b>D</b>	Asp	Ácido aspártico
<b>C</b>	Cys	Cisteína
<b>Q</b>	Gln	Glutamina
<b>E</b>	Glu	Ácido glutámico
<b>G</b>	Gly	Glicina
<b>H</b>	His	Histidina
<b>I</b>	Ile	Isoleucina
<b>L</b>	Leu	Leucina
<b>K</b>	Lys	Lisina
<b>M</b>	Met	Metionina
<b>F</b>	Phe	Fenilalanina
<b>P</b>	Pro	Prolina
<b>S</b>	Ser	Serina
<b>T</b>	Thr	Treonina
<b>W</b>	Trp	Triptofano
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina
<b>V</b>	Val	Valina

# Índice

## Capítulo 1. Introducción

1.1. Citoquinas .....	1
1.1.1. Citoquinas que regulan la hematopoyesis .....	2
1.2. Factor estimulante de colonias de granulocitos .....	2
1.2.1. Características estructurales .....	3
1.2.2. Función y producción endógena .....	4
1.2.3. Propiedades biológicas .....	5
1.2.4. Usos terapéuticos .....	6
1.3. Receptor para G-CSF .....	7
1.3.1. Superfamilia de receptores de citoquinas hematopoyéticas ...	8
1.3.2. Estructura y distribución del receptor para G-CSF .....	8
1.3.3. Interacción del G-CSF con su receptor .....	11
1.3.4. Señales de transducción activadas por G-CSF .....	12
1.3.4.1. Familia de las Janus quinasas .....	13
1.3.4.2. Familia de las proteína quinasas Src .....	14
1.3.4.3. Cascadas de señalización activadas por G-CSF .....	16
1.3.4.3.1. Vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa .....	16
1.3.4.3.2. Vía de las MAPKs .....	18
1.3.4.3.2.1. Vía de las MAPKs ERK1/2 .....	21
1.3.4.3.2.2. Vía de la MAPK p38 .....	23
1.3.4.3.3. Vía del factor nuclear $\kappa$ B .....	25
1.4. Placenta .....	30
1.4.1. Implantación embrionaria .....	31
1.4.2. Mediadores .....	33
1.4.2.1. Metaloproteinasas .....	35
1.4.2.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular .....	42
1.4.2.3. Integrinas .....	47
1.5. Migración celular .....	52
<b>Objetivos</b> .....	<b>55</b>

## Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales .....	57
2.1.1. Reactivos .....	57
2.1.2. Citoquinas .....	58
2.1.3. Línea celular .....	58
2.2. Métodos .....	58
2.2.1. Ensayos de proliferación .....	58
2.2.2. Inmunocitoquímica .....	59
2.2.2.1. Detección del receptor para G-CSF .....	59
2.2.2.2. Detección de MT1-MMP .....	60
2.2.2.3. Visualización del citoesqueleto de actina .....	60
2.2.2.4. Detección de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo .....	61
2.2.3. Efecto del G-CSF sobre la expresión de mediadores involucrados en la invasión trofoblástica .....	62
2.2.3.1. Determinación de la expresión de MMP-2, VEGF .....	62
2.2.3.1.1. Zimografía .....	62
2.2.3.1.2. Ensayo de ELISA para VEGF .....	63
2.2.3.2. Evaluación de la expresión de integrinas por citometría de flujo .....	63
2.2.4. Determinación de la concentración de proteínas .....	64
2.2.5. Ensayos de transfección .....	64
2.2.6. Ensayos de Western blot .....	65
2.2.6.1. Detección del receptor de G-CSF .....	65
2.2.6.2. Niveles de expresión de MMP-2 y VEGF .....	66
2.2.6.3. Niveles de expresión de integrina $\beta$ 1 .....	66
2.2.6.4. Activación de Akt, Erk1/2 y p38 .....	67
2.2.6.5. Niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$ .....	68
2.2.6.6. Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo .....	68
2.2.7. Ensayos de migración .....	69
2.2.7.1. Migración en cámaras "transwell" .....	69
2.2.7.2. Ensayo de la herida ("wound healing assay" o "scratch") .....	70
2.2.8. Métodos estadísticos .....	71

### **Capítulo 3. Acciones biológicas promovidas por el G-CSF**

3.1. Detección del receptor para G-CSF .....	72
3.2. Efecto del G-CSF sobre la proliferación y la supervivencia de células Swan 71 .....	74
3.3. Efecto del G-CSF sobre la actividad y la expresión de MMP-2 .....	75
3.4. Efecto del G-CSF sobre la expresión de MT1-MMP .....	79
3.5. Efecto del G-CSF sobre la expresión de VEGF .....	80
3.6. Efecto del G-CSF sobre la expresión de integrinas .....	82
3.7. Efecto del G-CSF sobre el citoesqueleto de actina .....	84
3.8. Efecto del G-CSF sobre la migración .....	85
3.9. Discusión .....	86

### **Capítulo 4. Participación de las vías de señalización en las acciones mediadas por el G-CSF**

4.1. Activación de las vías de MAPKs ERK1/2 y p38, y PI3k/Akt .....	95
4.2. Activación de la vía del factor nuclear $\kappa$ B .....	97
4.3. Participación de las vías de transducción en las acciones biológicas inducidas por el G-CSF .....	100
4.3.1. Inhibidores farmacológicos .....	101
4.3.1.1. Evaluación de la toxicidad de los inhibidores farmacológicos .....	101
4.3.1.2. Efectividad de los inhibidores farmacológicos .....	103
4.3.2. Mutantes dominantes negativas .....	106
4.3.2.1. Efectividad de las mutantes dominantes negativas .....	106
4.3.3. Efecto de los inhibidores farmacológicos y/o mutantes dominantes negativas sobre las acciones biológicas inducidas por el G-CSF .....	108
4.4. Intercomunicación ("cross-talk") de vías de señalización .....	113
4.5. Discusión .....	116
<b>Resumen</b> .....	121

<b>Bibliografía .....</b>	<b>124</b>
---------------------------	------------

***Capítulo 1***  
***Introducción***

## 1. Introducción

### 1.1. Citoquinas

Las citoquinas son un grupo diverso de proteínas pequeñas y/o polipéptidos que, en su mayoría, no exceden los 30 kDa. A diferencia de las hormonas, que son secretadas por un tipo especializado de células, las citoquinas pueden ser producidas por una amplia variedad de tipos celulares. Son activas en concentraciones desde picomolares a nanomolares y afectan numerosas funciones celulares de manera autocrina, paracrina y/o endocrina a través de la unión a un receptor específico. Cada citoquina posee un receptor de membrana específico, expresado en un número bajo por célula, mediante el cual transmiten las señales hacia el interior celular. Además, muchas citoquinas, a pesar de tener distinta estructura, exhiben redundancia en sus roles biológicos por lo que presentan características pleiotrópicas o polifuncionales (Lunney J.K., 1998; Metcalf D., 2008).

En la Tabla 1.1 se numeran los principales tipos de citoquinas y sus acciones biológicas más destacadas (Tisoncik J.R. y col., 2012).

**Tabla 1.1.**  
**Clasificación de citoquinas**

<b>Tipo</b>	<b>Acciones biológicas</b>
<b>Interferones</b>	Regulación de la inmunidad innata. Propiedades antivirales. Efectos antiproliferativos.
<b>Interleuquinas</b>	Proliferación y diferenciación de leucocitos. Efectos proinflamatorios.
<b>Quemoquinas</b>	Control de quimotaxis. Reclutamiento de leucocitos. Efectos proinflamatorios.
<b>Factores estimulantes de colonias</b>	Estimulación de la proliferación y diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas.
<b>Factor de necrosis tumoral</b>	Efecto proinflamatorio. Activación de linfocitos T citotóxicos.

### **1.1.1. Citoquinas que regulan la hematopoyesis**

La producción de células hematopoyéticas está bajo el control estricto de un grupo de proteínas denominadas citoquinas hematopoyéticas que incluyen interleuquinas (IL), factores estimulantes de colonias (CSF), interferones (IFN), eritropoyetina (Epo) y trombopoyetina (TPO) (Robb L., 2007). Cada una de estas citoquinas posee múltiples acciones mediadas por un receptor cuya porción citoplasmática contiene regiones especializadas que inician diversas respuestas biológicas, tales como proliferación, supervivencia, diferenciación, maduración y activación funcional. Así, este sistema no sólo está preparado para mantener la hematopoyesis basal, sino también, para responder ante situaciones de estrés fisiológico, como el sangrado o las infecciones (Robb L., 2007; Metcalf D., 2008). Cada una de estas citoquinas puede ser linaje específico, o bien ejercer su acción sobre múltiples linajes celulares (Figura 1.1). Asimismo, algunos tipos celulares requieren de la participación de más de una de ellas para promover la proliferación.

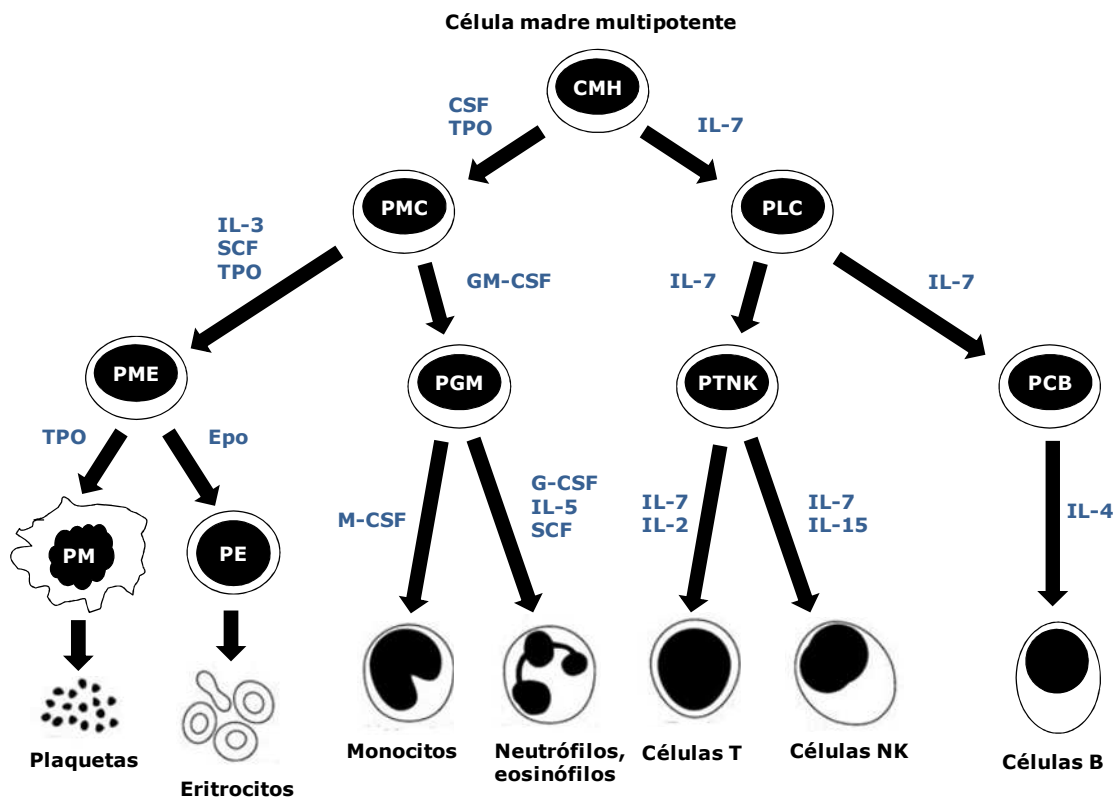
Las citoquinas hematopoyéticas con mayor relevancia médica en los últimos años son la Epo, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Metcalf D., 2008).

### **1.2. Factor estimulante de colonias de granulocitos**

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es la principal citoquina que regula la granulopoyesis, proceso que permite la generación de neutrófilos -conocidos como granulocitos por la presencia de gránulos con tinción característica con colorantes. Dentro de los granulocitos, la población mayoritaria son los neutrófilos, linaje celular esencial para el sistema inmune innato, cuya principal función es el despliegue de una defensa multifacética para combatir los microbios a través de la liberación de proteasas, DNAsas y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Zhu Q.S. y col., 2006). En otras palabras, estas células contribuyen a la eliminación o "*clearance*" de



patógenos, rol crítico en la inmunidad, ya que pacientes con neutropenia o bajo número de neutrófilos circulantes presentan una severa inmunodeficiencia (Panapoulos A.D. y Watowich S.S., 2008).

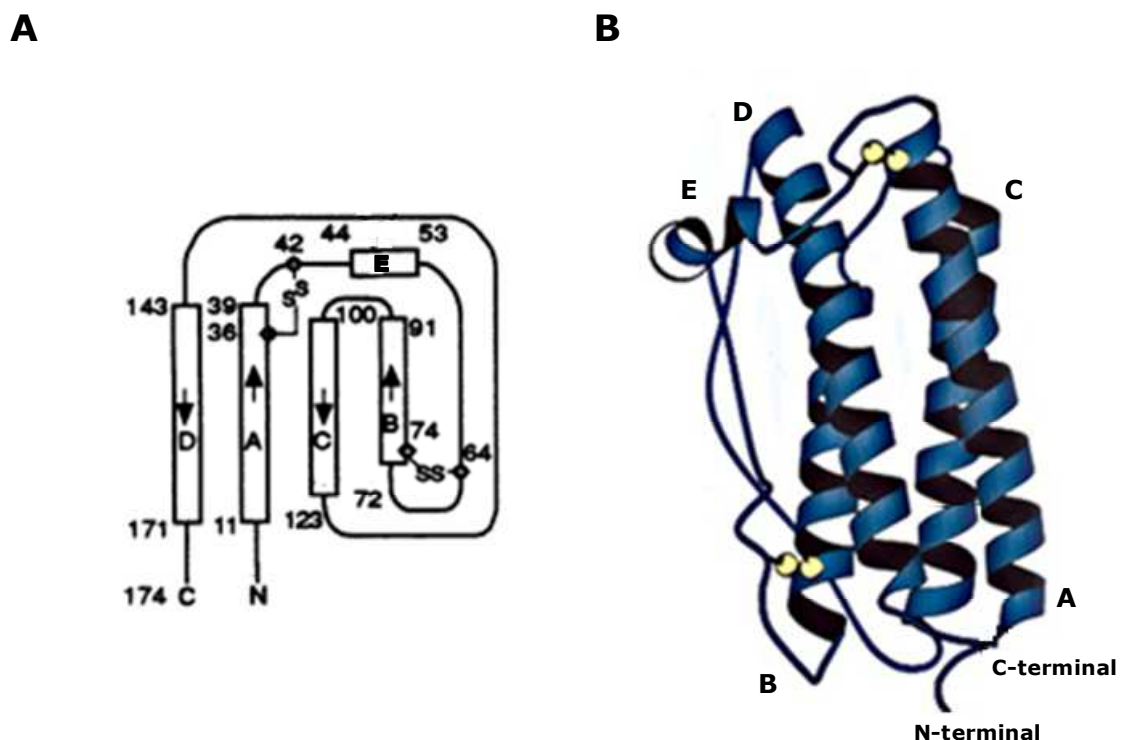


**Figura 1.1. Citoquinas hematopoyéticas.** Las células madres hematopoyéticas tienen un alto potencial regenerativo, pero en cada generación de células, la descendencia adquiere características específicas del linaje celular y una capacidad proliferativa menor. Las citoquinas hematopoyéticas actúan tanto sobre los progenitores multipotentes como en la descendencia. CMH: célula madre hematopoyética; PMC: progenitor mieloide común; PLC: progenitor linfocítico común; PME: progenitor megacariocito-eritroide; PGM: progenitor granulocito-macrófago; PTNK: progenitor de células T y NK; PCB: progenitor de células B; PM: progenitor de megacariocitos; PE: progenitor de eritrocitos. Figura adaptada de Robb L., 2007.

### 1.2.1. Características estructurales

El G-CSF es una glicoproteína de 19,6 kDa formada por 174 residuos de aminoácidos. Esta citoquina pertenece a un grupo de factores de crecimiento que, a pesar de presentar una baja homología en sus secuencias, comparten el motivo estructural de cuatro hélices  $\alpha$ , convencionalmente denominadas A-D

desde el N-terminal con una conectividad anti-paralela (arriba-arriba-abajo-abajo) (Hill C.P. y col., 1993; Layton J.E. y col., 1999). El G-CSF además, presenta una hélice de tipo  $3_{10}$  en el bucle A-B, denominada E. Los dos enlaces disulfuro, ubicados en los extremos del "loop" A-B, Cys36-Cys42 y Cys64-Cys74, son necesarios para la actividad biológica (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Estructura del G-CSF.** (A) Se muestran las cuatro hélices  $\alpha$  (A, B, C y D) con una conectividad anti-paralela y la hélice de tipo  $3_{10}$  (E) en el "loop" A-B. Se indican los residuos al inicio y al final de cada hélice y los enlaces disulfuro, como -SS-. El tamaño de las estructuras secundarias está esquematizado en proporción al número de residuos de aminoácidos. (B) Diagrama de cintas del G-CSF. Los enlaces disulfuro están esquematizados como círculos. Figura adaptada de Hill C.P. y col., 1993.

### 1.2.2. Función y producción endógena

Los individuos sanos expresan bajos niveles de G-CSF en suero (<30-163 pg/ml), mientras que durante una infección estos niveles aumentan significativamente (30-3.199 pg/ml) (Panapoulos A.D. y Watowich S.S., 2008).

El receptor para G-CSF se expresa en precursores granulocíticos y en neutrófilos maduros, teniendo mayores niveles de expresión en los últimos estados madurativos. Debido a esto, la inducción de G-CSF durante una infección promueve directamente la proliferación y la diferenciación de los progenitores granulocíticos (Panapoulos A.D. y Watowich S.S., 2008). Además, el G-CSF es requerido para la sobrevivencia de las células del linaje granulocítico.

### **1.2.3. Propiedades biológicas**

El G-CSF es indispensable para la granulopoyesis *in vivo*, ya que estimula la proliferación de colonias de granulocitos en la médula ósea, la diferenciación de células progenitoras hacia el linaje neutrófilo, y la maduración de los neutrófilos. En otras palabras, incrementa el número de neutrófilos capaces de responder frente a una infección (Hauke R.J. y Tarantolo S.R., 2000). En este sentido, fue informado que ratones que carecen de G-CSF endógeno presentan un número de neutrófilos circulantes disminuido (neutropenia crónica), una pobre movilización de los mismos hacia la sangre, poca respuesta ante una infección y en consecuencia, una menor sobrevivencia (Welte K. y col., 1996; Metcalf D., 2008).

Asimismo, el G-CSF promueve la activación de las funciones efectoras de neutrófilos maduros, así como también su sobrevivencia. En relación a esto, el G-CSF estimula la quimiotaxis de neutrófilos, la producción de anión superóxido en respuesta a quemoattractantes (Welte K. y col., 1996), la liberación de ácido araquidónico y la producción de fosfatasa alcalina leucocitaria y mieloperoxidasa (Avalos B.R., 1996).

Por otro lado, en los últimos años fueron reportadas nuevas funciones para el G-CSF en tejidos no hematopoyéticos. Por ejemplo, el G-CSF promueve la proliferación y la migración de células endoteliales vasculares humanas (Bussolino F. y col., 1991), la sobrevivencia de cardiomiocitos (Harada M. y col., 2005), y la neurogénesis (Schneider A. y col., 2005). También fue descrita su acción en diferentes tumores. Así, el G-CSF estimula la proliferación y la migración de células de carcinoma de colon (Morris K.T. y col., 2014), el

crecimiento y la supervivencia de células de cáncer de vejiga (Chakraborty A. y Guha S., 2007), y la proliferación, la migración y la invasión de células de gliomas (Wang J. y col., 2012), entre otras.

#### **1.2.4. Usos terapéuticos**

El clonado molecular y la purificación del G-CSF humano recombinante (rhG-CSF), conocido comercialmente como Filgrastim, Lenograstim (variante glicosilada) o Pegfilgrastim (variante peguilada), entre otros, se produjeron durante 1984 y 1986, mientras que la aprobación de su uso clínico fue obtenida en los Estados Unidos en 1991. Inicialmente, el rhG-CSF fue utilizado en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia para disminuir la duración de la neutropenia, principal efecto secundario de esa terapia (Welte K. y col., 1996). Actualmente, el Filgrastim está indicado para pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresiva, pacientes con leucemia mielocítica aguda tratados con quimioterapia de inducción o consolidación, pacientes que son sometidos a trasplante de médula ósea, pacientes sujetos a la recolección de progenitores de médula ósea periféricos y pacientes con neutropenia crónica severa.

El rhG-CSF en sus formas de Filgrastim, Lenograstim o Pegfilgrastim, está recomendado en Europa como tratamiento profiláctico para disminuir la incidencia de infección en pacientes con neoplasias no mielógenas sometidas a tratamiento quimioterápico con una elevada incidencia de neutropenia severa asociada a fiebre (neutropenia febril) (Aapro M.S. y col., 2011).

Asimismo, el rhG-CSF disminuye el tiempo de recuperación de los neutrófilos y la duración de la fiebre luego de la quimioterapia de inducción o consolidación en el tratamiento de los pacientes adultos con leucemia mielocítica aguda. Si bien esta indicación es objeto de controversia, ya que fue informado que el G-CSF estimula la proliferación de células mieloides *in vitro*, algunos estudios han concluido que el G-CSF no promueve el crecimiento de células madre *in vivo* (Usuki K. y col., 1998; Asano Y. y col., 2003).

El rhG-CSF también moviliza las células progenitoras de la médula ósea hacia sangre periférica, las cuales son recolectadas mediante leucaféresis. El G-CSF produce un aumento en el número absoluto de células madre hematopoyéticas en sangre periférica, proceso conocido como "movilización de células madre".

Otro importante uso terapéutico del rhG-CSF es el tratamiento de la neutropenia severa crónica, cíclica o idiopática. Este desorden congénito es causado, en general, por mutaciones en el gen *ELA2* que codifica para la enzima "elastasa", que se expresa en los neutrófilos (Donini M. y col., 2007). El G-CSF logra normalizar los niveles de neutrófilos circulantes en sangre, así como reducir las consecuencias de la neutropenia severa (Welte K. y col., 1997). Sin embargo, como no corrige la deficiencia funcional de los neutrófilos en la defensa contra los microorganismos, los pacientes aún tienen un elevado riesgo de sucumbir ante una sepsis (Donini M. y col., 2007).

El Filgrastim también está indicado en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) que presentan neutropenia asociada a esta patología o causada por infecciones oportunistas (como el citomegalovirus o la *Pseudomonas aeruginosa*), o bien por el empleo de agentes antirretrovirales (como la zidovudina, el ganciclovir o el trimetoprim/sulfametoxazol o cotrimoxazol) (Hengge U.R. y col., 1992; Kuritzkes D.R., 2000).

### **1.3. Receptor para G-CSF**

Las actividades biológicas del G-CSF están mediadas por receptores específicos en la superficie de las células. El receptor para G-CSF (G-CSFR) pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas hematopoyéticas y tiene una masa molecular aparente de 130.000-150.000 Da (Avalos B.R., 1996).

### 1.3.1. Superfamilia de receptores de citoquinas hematopoyéticas

Muchas interleuquinas, hormonas y factores de crecimiento ejercen sus funciones biológicas a través de la interacción con receptores que pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquinas hematopoyéticas o de clase I (Soede-Bobok A.A. y Touw I.P., 1997). Entre éstos se encuentran los receptores para IL-2 $\alpha$ , IL-2 $\beta$ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, Epo, G-CSF, GM-CSF, hormona de crecimiento y prolactina (Kaczmariski R.S. y Mufti G.J., 1991). Los ligandos de estos receptores presentan un motivo estructural similar, caracterizado por cuatro hélices  $\alpha$ .

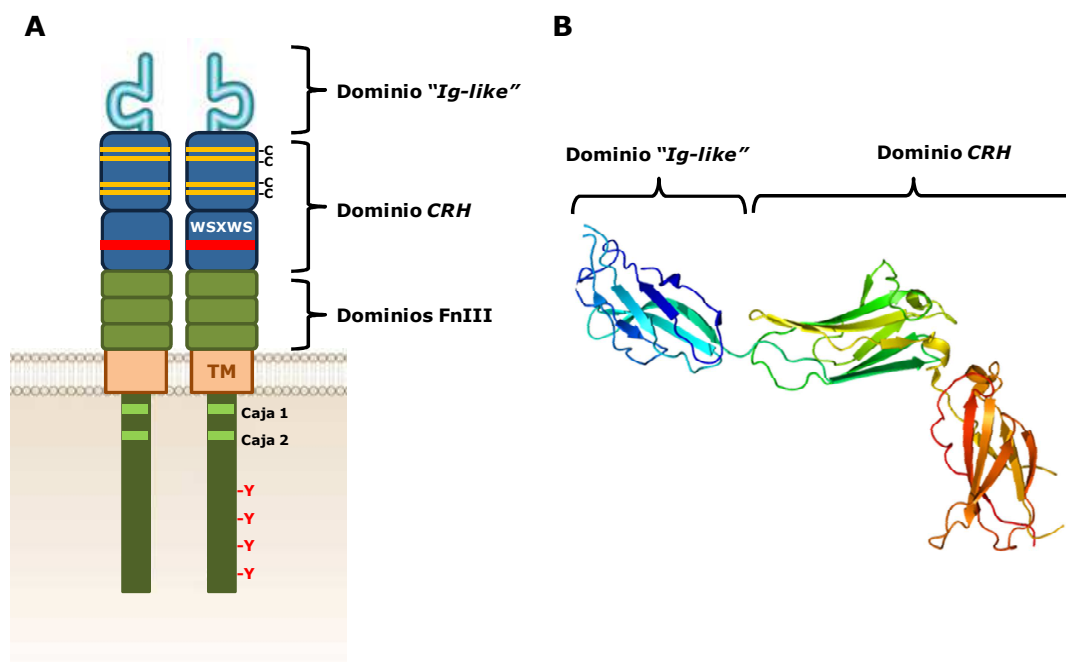
Los receptores que pertenecen a esta superfamilia son proteínas transmembrana de 257-856 aminoácidos. Estructuralmente, están formados por tres regiones: i) un dominio extracelular N-terminal de unión al ligando, que contiene cuatro residuos de cisteínas conservados y el motivo Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), ii) un único dominio transmembrana con estructura  $\alpha$ -hélice, y iii) un dominio intracelular C-terminal sin caracterización estructural (Figura 1.3) (Kaczmariski R.S. y Mufti G.J., 1991; Dagil R. y col., 2012). Estos receptores carecen de dominios catalíticos, pero están asociados, a través de su dominio citoplasmático, a tirosina quinasas citosólicas, que inducen la fosforilación de Tyr del receptor luego de la unión al ligando (Ilhe J.N. y col., 1994).

### 1.3.2. Estructura y distribución del receptor para G-CSF

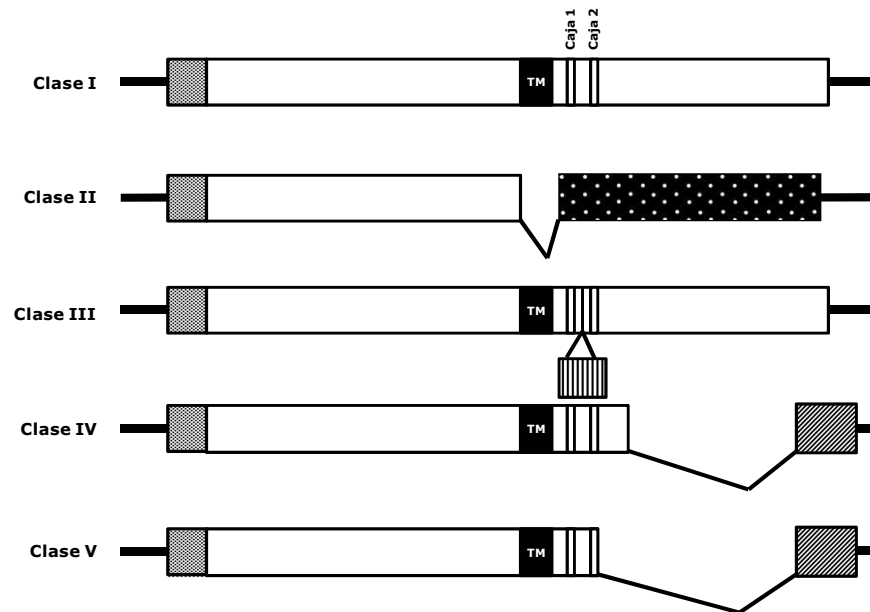
El receptor para G-CSF es una proteína transmembrana cuya región extracelular posee seis dominios estructurales: un dominio N-terminal análogo a inmunoglobulina ("*Ig-like*"), seguido de cinco dominios de tipo fibronectina III (FnIII) (Figura 1.3). Los primeros dos dominios FnIII forman el módulo de homología entre receptores de citoquinas (CRH, por las siglas en inglés "*Cytokine Receptor Homology*"), que contiene los cuatro residuos de cisteínas y el motivo WSXWS (Layton J.E. y col., 2001). Además, posee una región transmembrana y un dominio intracelular sin actividad quinasa intrínseca

(Layton J.E. y Hall N.E., 2006). La región citoplasmática contiene algunas secuencias de aminoácidos que se encuentran conservadas entre los receptores de citoquinas, denominadas "Caja 1" y "Caja 2", relacionadas con la transducción de señales mitogénicas (Avalos B.R., 1996).

Existen cinco ARN mensajeros (ARNm) diferentes del G-CSFR, generados por el corte y empalme ("*splicing*") alternativo, que codifican para cinco isoformas o clases de G-CSFR. Además de la forma silvestre o "*wild type*" del receptor (clase I), conformada por 183 aminoácidos, existe una isoforma soluble (clase II) caracterizada por la delección de la región transmembrana. La clase III tiene una inserción de 27 aminoácidos en la región citoplasmática, mientras que la clase IV posee una región citoplasmática más corta y distinta a la de la clase I. Por último, la clase V posee una región citoplasmática que, aunque es similar a la de la clase IV, está truncada (Figura 1.4) (Avalos B.R., 1996; Akbarzadeh S. y Layton J.E., 2001).



**Figura 1.3. Esquema de la estructura del receptor para G-CSF. (A)** La región extracelular del G-CSFR posee un dominio N-terminal "*Ig-like*", un dominio CRH que contiene los cuatro residuos de Cys (C) y el motivo WSXWS, y tres dominios FnIII. En la región citoplasmática posee dos regiones denominadas "Caja 1" y "Caja 2", así como residuos de Tyr (Y), que participan en la transducción de señales. TM: región transmembrana. **(B)** Diagrama de cintas de la región de unión del G-CSFR al G-CSF basada en la representación del Protein Data Bank de 2d9q (Tamada T. y col., 2006).



**Figura 1.4. Diagramas de las cinco clases de G-CSFR.** El receptor "wild type" (clase I) está formado por 183 aminoácidos. La isoforma soluble (clase II) se caracteriza por una delección de la región transmembrana (TM). La clase III tiene una inserción de 27 aminoácidos en la región citoplasmática, mientras que la clase IV posee una región citoplasmática más corta y distinta a la de la clase I. Por último, la región citoplasmática de la clase V, si bien es similar a la de la clase IV, está troncada. Figura adaptada de Avalos B. R., 1996.

El G-CSFR se expresa en células progenitoras mieloides, células de leucemia mieloide, neutrófilos maduros, plaquetas, monocitos y algunas líneas celulares leucémicas y linfoides de tipo T y B (Avalos B.R., 1996). Adicionalmente, el receptor para G-CSF fue identificado en tejidos no hematopoyéticos como células endoteliales (Bussolino F. y col., 1991; Fusté B. y col., 2004), cardiomiocitos (Harada M. y col., 2005), células neuronales (Schneider A. y col., 2005; Jung K.H. y col., 2006), carcinomas gástricos y de colon (Morris K.T. y col., 2014), células de cáncer colorrectal (Yang X. y col., 2005), células de cáncer de vejiga (Tachibana M. y col., 1997; Chakraborty A. y Guha S., 2007), células de cáncer de ovario (Kumar J. y col., 2014), células trofoblásticas y células de tejido placentario (Uzumaki H. y col., 1989; Shorter S.C. y col., 1992; McCracken S.A. y col., 1996 y 1999; Marino V.J. y col., 2001; Marino V.J. y Roguin L.P., 2008).

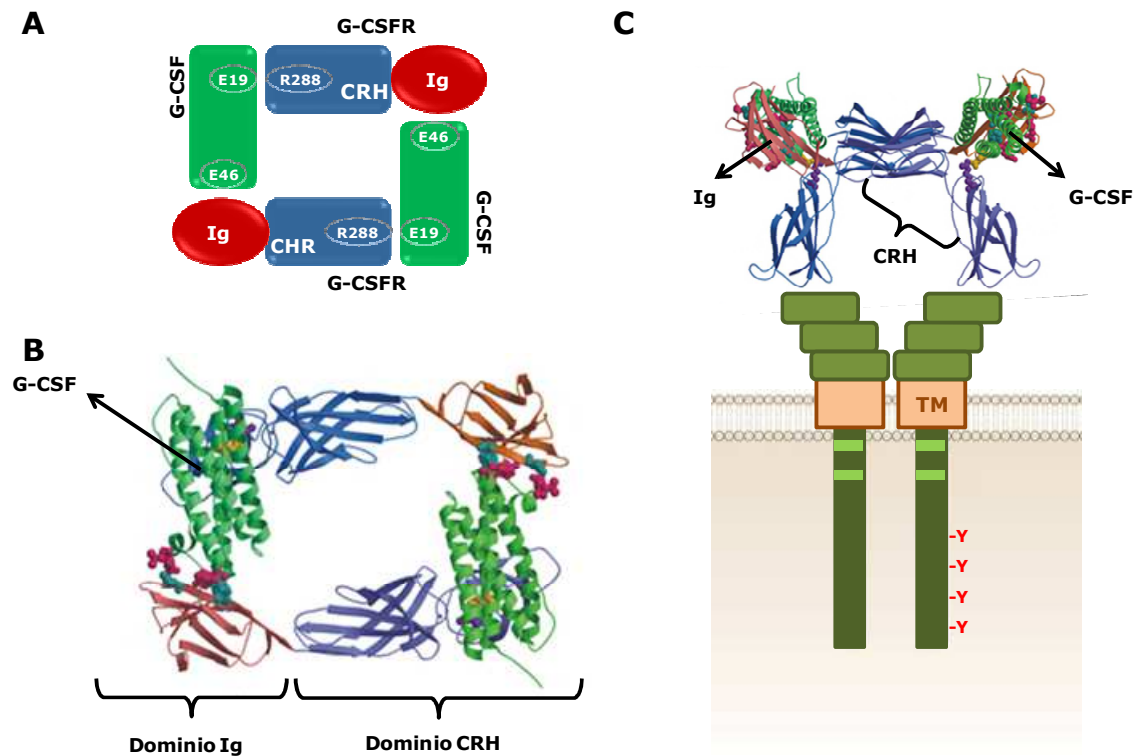


En cuanto a las isoformas del receptor, la clase I se expresa en neutrófilos maduros, células de médula ósea, placenta, y las líneas celulares HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) y U937 (células de leucemia monocítica humana). La forma soluble del receptor (clase II) sólo fue identificada en la línea celular U937. La placenta humana y las células HL-60 también expresan la clase III, mientras que las isoformas IV y V se encuentran en menor porcentaje en granulocitos humanos. La clase IV también se detecta en la placenta humana (Avalos B.R., 1996).

### **1.3.3. Interacción del G-CSF con su receptor**

El G-CSF forma un complejo tetramérico, de estequiometría 2:2, con el G-CSFR (Figura 1.5) (Layton J.E. y col., 1999; Layton J.E. y Hall N.E., 2006). Según este modelo, una molécula de G-CSF, a través de un primer sitio, se uniría con el módulo CRH de una molécula de receptor, estableciendo un complejo 1:1. Luego, el G-CSF, a través de un segundo sitio de unión, interaccionaría con el dominio análogo a Ig de otra molécula de receptor, favoreciendo la dimerización. En otras palabras, el complejo tetramérico final estaría formado por dos complejos 1:1 con un entrecruzamiento entre el dominio análogo de Ig y el G-CSF (Layton J.E. y col., 2001; Layton J.E. y Hall N.E., 2006; Tamada T. y col., 2006).

Diversos estudios señalan que los residuos más importantes del G-CSF para la unión al receptor son Glu19, Lys23, Lys40, Glu46, Asp112, Phe144 (Reidhaar-Olson J.F. y col., 1996; Young D.C. y col., 1997; Layton J.E. y col., 1999). Dentro de estos residuos fue demostrada la relevancia del residuo Glu19 del G-CSF, que interacciona mediante uniones electrostáticas con el residuo Arg288 del dominio CRH del receptor, así como también la importancia del residuo Glu46 del ligando, que se une al dominio análogo de Ig del G-CSFR (Layton J.E. y col., 1999; Layton J.E. y Hall N.E., 2006).



**Figura 1.5. Representación esquemática de la interacción G-CSF:G-CSFR.** **(A)** Complejo tetramérico de estequiometría 2:2 del G-CSF (verde) con el dominio Ig (rojo) y la región CRH (azul) del receptor. Se muestran los residuos más importantes para la interacción ligando:receptor, E19 y E46 para el G-CSF y R288 para el G-CSFR. **(B)** Diagrama de cintas que muestra la interacción del G-CSF:G-CSFR vista desde arriba. Se mantienen los colores del ítem anterior para designar al ligando y al receptor. **(C)** Representación esquemática del complejo tetramérico. Figura adaptada de Layton J. E. y Hall N. E., 2006.

#### 1.3.4. Señales de transducción activadas por G-CSF

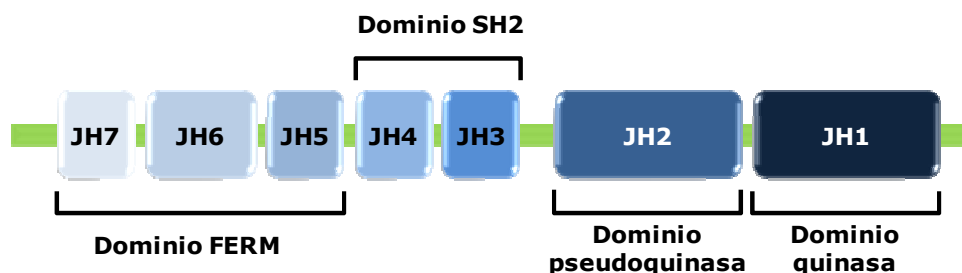
Los miembros de la superfamilia de receptores de citoquinas hematopoyéticas no poseen actividad enzimática intrínseca y por lo tanto necesitan reclutar tirosina quinasas (TK) citosólicas para la transducción de señales (Baker S.J. y col., 1997). Las TKs tienen en su extremo N-terminal señales de localización para la membrana plasmática que les permiten estar físicamente cercanas al receptor, y de esa manera, poder asociarse a éstos. Entre las TKs descritas para el receptor de G-CSF están las de la familia de

las Janus quinasas (JAK) y las de la familia de las quinasas Src, que se asocian al G-CSFR a través de su dominio proximal a la membrana plasmática (Sampson M. y col., 2007).

#### 1.3.4.1. Familia de las Janus quinasas

Las tirosina quinasas JAK poseen una estructura única -en comparación con otras proteínas- compuesta por siete dominios: los dominios N-terminal JH7-JH5 (por las siglas en inglés "*JAK Homology*") tienen homología al dominio FERM (comprendido por las proteínas conocidas como banda 4.1, ezrina, radixina y moesina), los dominios JH4-JH3 forman la región SH2 (por sus siglas en inglés "*Src Homology 2*"), el dominio JH2 es una pseudo tirosina quinasa y el dominio C-terminal JH1 tiene actividad tirosina quinasa (Figura 1.6) (O'Shea J.J. y col., 2004).

Los dominios JH4-JH3, a pesar de su homología con el dominio SH2, no unen residuos de fosfotirosinas sino que funcionan como sitio de andamiaje o "*scaffold*" (Jatiani S.S. y col., 2010), mientras que el dominio FERM regula la actividad catalítica y la unión a receptores y proteínas. Por otra parte, el dominio JH2, si bien no tiene actividad quinasa, regula negativamente la actividad tirosina quinasa del dominio JH1 (O'Shea J.J. y col., 2004; Jatiani S.S. y col., 2010). En los mamíferos, la familia de las Janus quinasas está compuesta por cuatro miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2.



**Figura 1.6. Estructura de las quinasas JAK.** Estas quinasas están formadas por un dominio FERM, seguido de un dominio SH2, un dominio pseudoquinasa (JH2) y un dominio catalítico con actividad tirosina quinasa (JH1). Si bien el dominio JH2 no posee actividad catalítica, regula negativamente al dominio JH1. Adaptado de O'Shea J.J. y col., 2004.

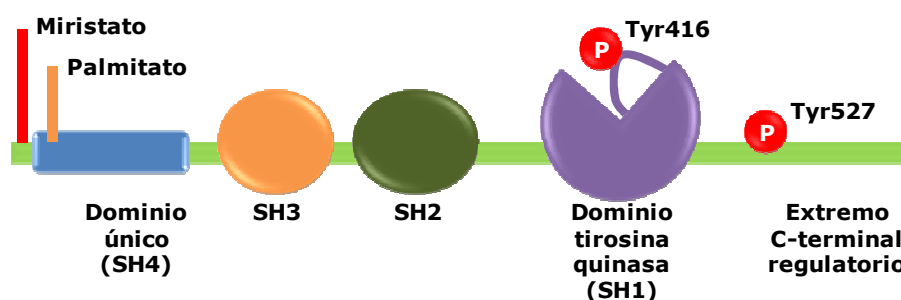
La unión del ligando al receptor resulta en la yuxtaposición y fosforilación de dos tirosinas ubicadas en el "loop" de activación del dominio JH1 (mediante autofosforilación o transfosforilación). Las JAKs activadas pueden entonces fosforilar tirosinas en el receptor, que funcionarán como sitios de anclaje para otras proteínas que posean dominios SH2, como las quinasas Src, la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) o las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc, o sus blancos predominantes: las proteínas de la familia STAT (por las siglas en inglés "*Signal Transducers and Activators of Transcription*") (Rawlings J.S. y col., 2004; Jatiani S.S. y col., 2010). Estas proteínas STAT -de las cuales en mamíferos se han descrito siete isoformas- tras su activación dimerizan y translocan al núcleo donde se unen a los promotores de genes blanco (Akira S., 1999). En el caso del G-CSFR, luego de la unión del G-CSF, se activan JAK1 y JAK2, así como las proteínas STAT1, STAT3 y STAT5 (Tian S.S. y col., 1996).

#### **1.3.4.2. Familia de las proteína quinasas Src**

La familia de las proteína quinasas Src está compuesta por proto-oncogenes que regulan numerosas funciones celulares, tales como la proliferación, la sobrevivencia, la muerte celular programada y ciertas funciones especiales, como la respuesta inmune, la motilidad y la morfología celular, y la endocitosis (Roskoski R.Jr., 2004; Okada M., 2012). Hasta el momento, se han descrito once miembros: Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Frk (también conocida como Rak), Fgr, Hck, Lck, Srm y Lyn (Sen B. y Johnson F.M., 2011). Estructuralmente, poseen un grupo miristilo y un grupo palmitoil (excepto Src y Blk) en el extremo N-terminal, seguido de un segmento único (SH4), un dominio SH3, un dominio SH2, un dominio tirosina quinasa (SH1) y una pequeña cola regulatoria en el extremo C-terminal (Figura 1.7) (Boggon T.J. y Eck M.J., 2004; Roskoski R.Jr., 2004; Okada M., 2012). La miristilación y la palmitoilación permiten la asociación a la superficie interna de la membrana celular (Sen B. y Johnson F.M., 2011; Okada M., 2012). Del mismo modo, los dominios SH2 y SH3 median las interacciones proteína-proteína con secuencias que poseen abundantes tirosinas fosforiladas y motivos ricos en prolina

(Parsons S.J. y Parsons J.T., 2004). Por otro lado, en células en reposo, la mayoría de las proteína quinasas Src tienen fosforilada la Tyr527 en la porción C-terminal. Esto lleva a la unión de esta región con el dominio SH2, y a la posterior unión del dominio SH2 con el dominio SH3, lo que deriva en una conformación cerrada o inactiva de la enzima. La desfosforilación de la Tyr527 produce un cambio conformacional que activa a la enzima, la cual puede entonces fosforilar a la Tyr416 en el bucle del dominio catalítico, abriendo el sitio activo y permitiendo la entrada de los sustratos (Sen B. y Johnson F.M., 2011; Okada M., 2012).

Las quinasas Src interactúan a través de sus dominios SH2 y SH3 con diferentes proteínas, entre las que se encuentran las proteínas adaptadoras para Ras y PI3K (Grb2, Gab2, Shc y Cb1), proteínas del citoesqueleto (paxilina, CAS, WASp, HS-1), proteínas nucleares (Sam68 y STAT3) y otras enzimas (RTK, Abl, FAK, SHIP y Shc-2). Esta variedad de proteínas río abajo o "downstream" refleja el amplio rango de funciones celulares en las que participan estas quinasas (Sampson M. y col., 2007). En particular, para el G-CSFR, fue propuesto que tras la unión del ligando, Lyn formaría un complejo con Gab2 que a su vez reclutaría a SHP2, una tirosina fosfatasa, para que esta última desfosforile a Lyn en la Tyr507 y la active (Futami M. y col., 2011). Dado que Lyn es la tirosina quinasa predominante en las células mieloides, es también la más estudiada. Asimismo, el G-CSF activa la quinasa Hck, filogenéticamente relacionada con Lyn (Sampson M. y col., 2007).



**Figura 1.7. Estructura de las proteínas quinasas Src.** Estas quinasas tienen un sitio de miristilación y palmitoilación en el extremo N-terminal, seguido de un segmento único, un dominio SH3, un dominio SH2, un dominio tirosina quinasa y una pequeña cola regulatoria en el extremo C-terminal. Para la mayoría de las quinasas Src, los sitios de fosforilación en las Tyr416 y Tyr527 son importantes para la regulación de la actividad de la enzima.

### 1.3.4.3. Cascadas de señalización activadas por G-CSF

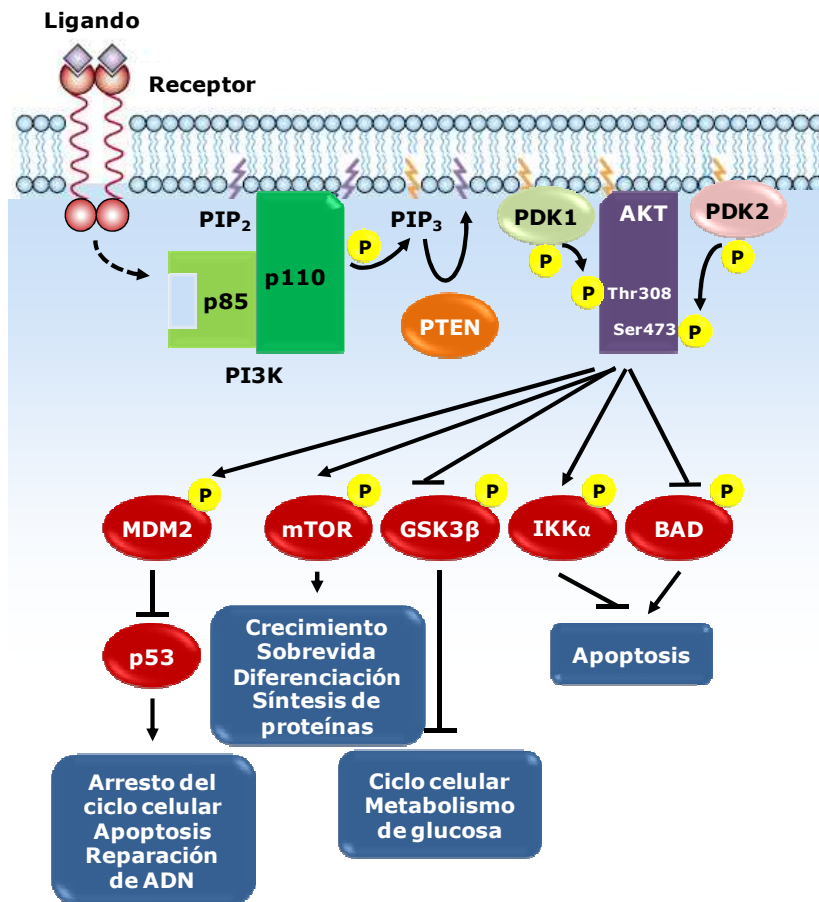
Además de las quinasas JAK y Src, el G-CSF es capaz de estimular diferentes cascadas de señalización, como la vía de PI3K (Nakamae-Akahori M. y col., 2006; Zhu Q.S. y col., 2006), y la de las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), entre las cuales se encuentran las quinasas de regulación extracelular (ERK) (Kamezaki K. y col., 2005; Geest C.R. y col., 2009), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Kim S.O. y col., 2006) y p38 (Rausch O. y Marshall C.J., 1999). Esta citoquina también puede activar la vía del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Jiang H. y col., 2010).

#### 1.3.4.3.1. Vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa

La cascada de señalización de PI3K/Akt está altamente conservada a través de la evolución y su activación comprende múltiples pasos estrictamente controlados. Las PI3Ks clase I, generalmente acopladas a estímulos extracelulares, están formadas por una subunidad catalítica p110, que comprende las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , y una subunidad regulatoria, con tres isoformas (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ) (Cantrell D.A., 2001). En el modelo tradicional, PI3K es directamente activada a través de su subunidad regulatoria p85, que interactúa con un receptor con actividad tirosina quinasa (Vivanco I. y Sawyers C.L., 2002; Hemmings B.A. y Restuccia D.F., 2012). Sin embargo, en células estimuladas por citoquinas hematopoyéticas (como sería el caso del G-CSF) la activación de PI3K ocurre a través de moléculas adaptadoras (Shc, Grb2, Gab2) o de tirosinas quinasas citosólicas (quinasas de las familias JAK o Src) acopladas a los receptores (Gu H. y col., 2000; Cantrell D.A., 2001; Sampson M. y col., 2007). El principal sustrato de las PI3Ks de clase I son los lípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5) $P_2$  o PIP2) y en consecuencia, el fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5) $P_3$  o PIP3) es el producto más abundante. Pero además, este último es metabolizado por fosfatasas en fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4) $P_2$ ) (Cantrell D.A., 2001; Vivanco I. y Sawyers C.L., 2002). Estos fosfolípidos resultantes sirven

como sitios de anclaje a la membrana plasmática para proteínas que poseen dominios de homología a plestrina (PH), como las proteínas quinasas Btk, Akt,  $\beta$ ark y la quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK-1, por sus siglas en inglés "*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1*"); la fosfolipasa C; y las proteínas que actúan como GTP-asas pequeñas o intercambiadores de factores, como Ras-GRF, Ras-GAP, Tiam-1 y SOS (Rameh L.E. y col., 1997).

La proteína quinasa B o Akt es activada principalmente por PI3K (Figura 1.8). En mamíferos, cada miembro de la familia de Akt (PKB $\alpha$  o Akt1, PKB $\beta$  o Akt2 y PKB $\gamma$  o Akt3) contiene un dominio PH en la porción N-terminal, seguido de un dominio quinasa en la porción central y un dominio regulatorio en la porción C-terminal (Nicholson K.M. y Anderson N.G., 2002; Liao Y. y Hung M. C., 2010). Akt se une a través de dominios PH a los fosfoinosítidos de membrana y es fosforilada en el residuo Thr308 por PDK-1. Posteriormente, la fosforilación en el residuo de Ser473 por otra quinasa resulta en la completa activación de Akt (Hemmings B.A. y Restuccia D.F., 2012). Akt participa en numerosas funciones biológicas y modula diferentes blancos asociados a la supervivencia (FOXO1/3/4, MDM2, p53, GSK-3, BAD), el crecimiento (mTOR, TSC2, PRAS40), la proliferación (p27, GSK-3, TSC2, PRAS40), la angiogénesis (eNOS, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ ), el metabolismo y la migración. Asimismo, Akt puede interaccionar con otras cascadas de señalización, por ejemplo, con la vía del factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), al fosforilar a la subunidad  $\alpha$  de la quinasa del inhibidor  $\kappa$ B (IKK $\alpha$ ). También, con la vía de la MAPK ERK, al fosforilar directamente a c-Raf, o bien, con las MAPKs JNK y p38, al fosforilar a la quinasa ASK1 (Manning B.D. y Cantley L.C., 2007).



**Figura 1.8. Vía de activación de PI3K/Akt.** La activación de PI3K de clase I ocurre a través del estímulo de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, o bien receptores acoplados a tirosina quinasas citosólicas, lo que permite la unión de la subunidad reguladora p85 a la subunidad catalítica (p110). Estos complejos se localizan cercanos a la membrana donde PI3K cataliza la conversión de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub>. Este fosfolípido permite no sólo el anclaje de Akt a través de un dominio plectrina, sino además la activación de esta quinasa por proteínas quinasas ancladas también a la membrana y que fosforilan Akt en los residuos Thr308 y Ser473. Posteriormente, Akt media la activación o inhibición de numerosas proteínas blanco implicadas en diversas funciones celulares. PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa; PDK1/2: quinasas dependientes de fosfoinosítidos; MDM2: de las siglas en inglés "murine double minute 2"; mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero; GSK3β: quinasa de la glucógeno sintasa; IKKα: quinasa del inhibidor del factor nuclear κB; BAD: proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2. Figura adaptada de Vivanco I. y Sawyers C.L., 2002.

#### 1.3.4.3.2. Vía de las MAPKs

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, de las siglas en inglés "Mitogen-Activated Protein Kinase") son expresadas ubicuamente en las



células y regulan diversos procesos celulares, tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la morfología celular y el metabolismo (Qi M. y Elion E.A., 2005; Cuevas B.D. y col., 2007). Además, estas quinasas son activadas por numerosos estímulos, como factores de crecimiento, citoquinas, estrés (toxinas, drogas, cambios en la adhesión celular, osmolaridad, ROS, luz ultravioleta y temperatura) (Cuevas B.D. y col., 2007). Es por esta razón, que la alteración de estas proteínas está relacionada con una gran variedad de patologías.

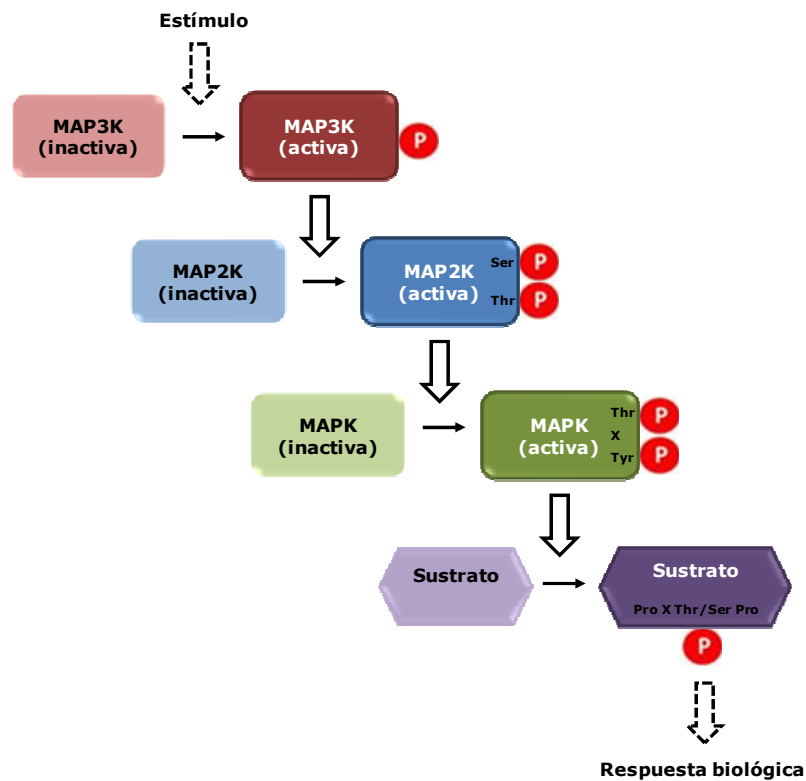
Cada vía de MAPKs está formada por una cascada de tres componentes: una quinasa quinasa de MAPK (MAPKKK o MAP3K o MEKK), una quinasa de MAPK (MAPKK o MAP2K o MEK) y una MAPK (Figura 1.9). Frecuentemente, suele haber además una quinasa de MAP3K (MAPKKKK o MAP4K). Tanto MAP4K como MAP3K pueden interactuar con la membrana plasmática a través de pequeñas GTPasas y/o lípidos y/o ser fosforiladas por proteínas asociadas a receptores de membrana (Morrison D.K., 2012). A su vez, las MAPKs fosforilan diversos sustratos, tales como fosfolipasas, factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y otras quinasas denominadas MKs (por las siglas en inglés "*MAPK-activated protein Kinases*"), como las quinasas ribosomales S6 o RKSs, las MNKs ("*MAPK interacting Kinases*") y las MSKs ("*Mitogen- and Stress-activated Kinases*"), las cuales amplifican aún más la cascada. Esta diversidad de sustratos participan en la regulación de un amplio rango de funciones biológicas (Roux P.P. y Blenis J., 2004).

Existen numerosas MAP3K que incluyen las isoformas de Raf, MEKK1-4, MLKs (de las siglas en inglés "*Mixed Lineage Kinases*"), proteínas Tao (de las siglas en inglés "*Thousand-And-One amino acid*") y Mos. Estas serina/treonina quinasas tienen grandes dominios regulatorios que interactúan con proteínas río arriba o "*upstream*", como las pequeñas GTPasas Rho y Ras, y son activadas por diversos mecanismos, tales como la interacción con una MAP4K, la autofosforilación (MEKK1 y Ssk2), la dimerización y posterior autofosforilación (ASK1 y MLK3), los cambios conformacionales que las liberan de la autoinhibición, y la fosforilación de residuos conservados en el bucle de

activación (MEKK1, Ssk2, TAK1) (Luciano B.S. y col., 2004; Roux P.P. y Blenis J., 2004; Qi M. y Elion E.A., 2005).

Asimismo, las MAP2K tienen dominios regulatorios más pequeños y son activadas por la fosforilación dual de residuos de serina y treonina en el motivo Ser-X-Ala-X-Ser/Thr, que se encuentra en el bucle de activación del dominio catalítico (Figura 1.9) (Wortzel I. y Seger R., 2011). Si bien exhiben alta especificidad para las MAP3K, pueden ser reguladas por diversas MAP3K.

Las MAPKs también son activadas por la fosforilación dual de residuos de treonina y tirosina en el "loop" de activación (Thr-X-Tyr) y fosforilan a sus blancos en residuos de serina y treonina en secuencias que poseen el motivo



**Figura 1.9. Cascada de activación de MAPK.** Las MAP3K son activadas por diversos mecanismos: interacción con una MAP4K, autofosforilación, dimerización y posterior autofosforilación, cambios conformacionales que las liberan de la autoinhibición, y fosforilación en residuos conservados en el bucle de activación. Por otro lado, las MAP2K son activadas por distintas MAP3K mediante la fosforilación dual en residuos de Ser y Thr, que se encuentran en el bucle de activación en el dominio catalítico. Las MAPKs también son activadas por la fosforilación dual de residuos de Thr y Tyr en el bucle de activación (T-X-Y) y fosforilan a sus blancos en residuos de Ser y Thr en secuencias que poseen el motivo PXT/SP (X depende de la MAPK).

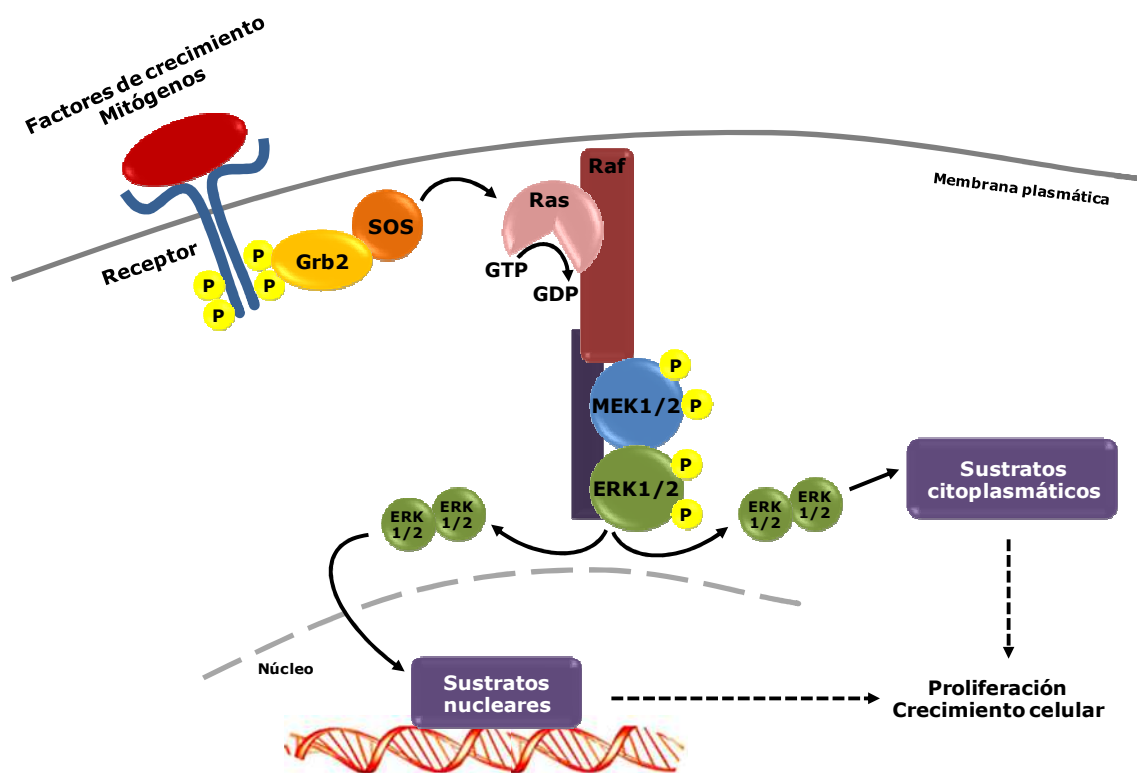
PXT/SP (X depende de la MAPK) (Figura 1.9) (Qi M. y Elion E.A., 2005). Estas serina/treonina quinasas pueden ser agrupadas en tres familias. En mamíferos, se encuentran las proteínas ERK (de las siglas en inglés "*Extracellular-signal-Regulated Kinases*"), JNK ("*Jun amino-terminal Kinases*") y p38/SAPKs ("*Stress-Activated Protein Kinases*"). Mientras que las cascadas de ERK transmiten, en su mayoría, señales mitogénicas, las vías de JNK y p38 se relacionan con señales de estrés (Wortzel I. y Seger R., 2011).

#### **1.3.4.3.2.1. Vía de las MAPKs ERK1/2**

Los miembros de la familia ERK poseen en el segmento de activación el motivo Thr-Glu-Tyr y se subdividen en dos grupos: las proteínas ERK clásicas (ERK1 y ERK2, también conocidas como p42 y p44, respectivamente), que consisten mayoritariamente en un dominio quinasa, y las proteínas ERK más grandes que tienen además una región extensa en su extremo C-terminal (ERK5) (Seger R. y Krebs E.C., 1995; Morrison D.K., 2012).

La cascada clásica de ERK1/2 responde principalmente a factores de crecimiento y mitógenos para inducir la proliferación y el crecimiento celular (Figura 1.10). La activación de esta vía es generalmente iniciada por receptores en la membrana plasmática, como aquellos con actividad tirosina quinasa o asociados a TKs citosólicas, receptores acoplados a proteínas G, canales iónicos u otros. Estos receptores transmiten la señal al reclutar proteínas adaptadoras (Grb2) y factores intercambiadores de nucleótidos (SOS), que luego activan a las proteínas Ras en la membrana plasmática (Wortzel I. y Seger R., 2011). La señal después es transferida a miembros de la familia de las MAP3Ks (Raf, Mos y Tpl2 -de las siglas en inglés "*Tumor Progression Loci 2*"-) y posteriormente a MEK1/2 (MAP2Ks), que consecuentemente fosforilan y activan a ERK1/2. Entre los múltiples sustratos descritos para ERK1/2 se encuentran numerosas proteínas de todos los compartimentos celulares, como proteínas de membranas (CD120a, Syk y calnexina), fosfolipasas citoplasmáticas (PLA2), factores de transcripción (SRC-1, Pax-6, NF-AT, MEF2, c-Fos, c-Myc, Elk1 y STAT3), proteínas del

citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) y varias quinasas de las familias de RSKs, MSKs y MNKs (Roux P.P. y Blenis J., 2004; Wortzel I. y Seger R., 2011). Recientemente, fue descubierta la señal para la translocación nuclear de estas MAPKs, lo que explicaría la activación de algunos sustratos nucleares (Chuderland D. y col., 2008).



**Figura 1.10. Cascada clásica de activación de MAPK ERK1/2.** La cascada clásica de ERK1/2 responde principalmente a factores de crecimiento y mitógenos para inducir la proliferación y el crecimiento celular. La activación de esta vía es generalmente iniciada por receptores en la membrana plasmática que transmiten la señal al reclutar proteínas adaptadoras (Grb2) y factores intercambiadores de nucleótidos (SOS), que luego activan a las proteínas Ras en la membrana plasmática. La señal es posteriormente transferida a las MAP3K (en este caso, Raf) y posteriormente a las MAP2K (MEK1/2), que consecuentemente fosforilan y activan a ERK1/2. Entre los sustratos descritos para ERK1/2 se encuentran numerosas proteínas de todos los compartimentos celulares.

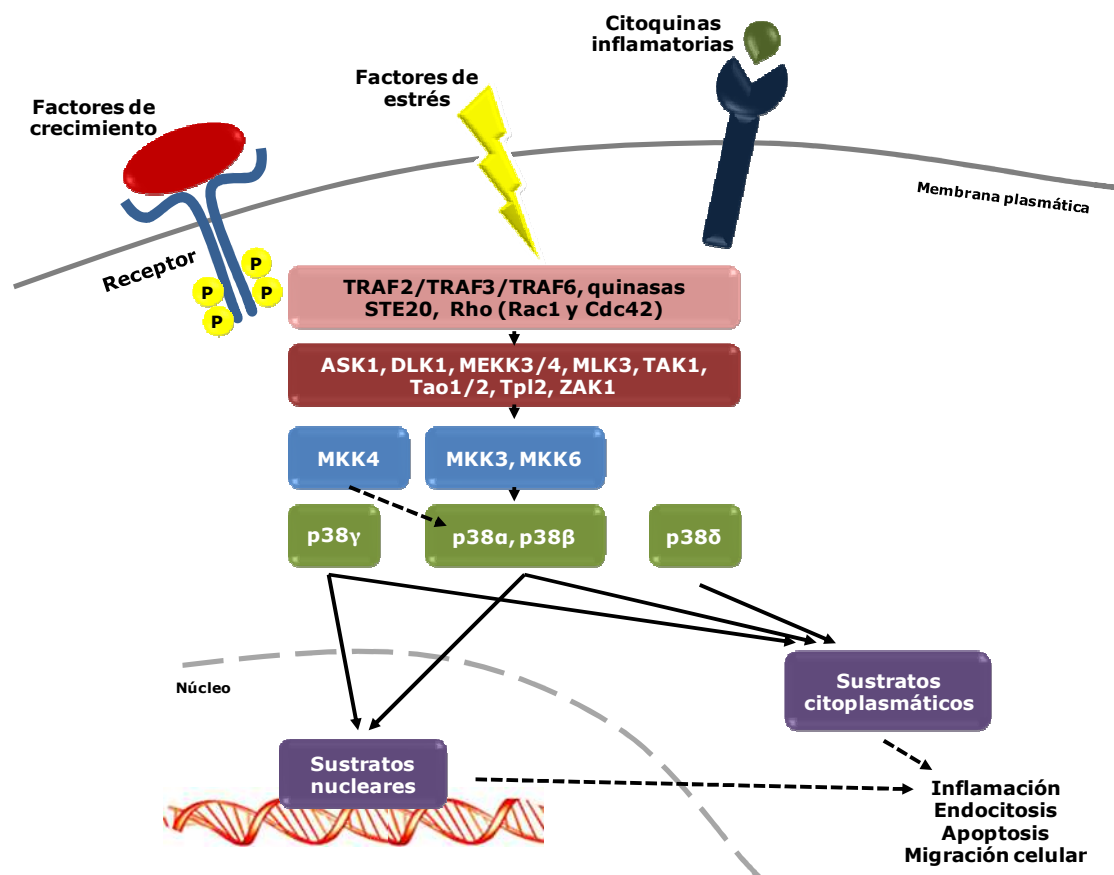
### 1.3.4.3.2.2. Vía de la MAPK p38

La familia de p38 en mamíferos está compuesta por cuatro isoformas identificadas como p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (MAPK11), p38 $\gamma$  (MAPK12, ERK6 o SAPK3) y p38 $\delta$  (MAPK13 o SAPK4). A diferencia de la familia ERK, los miembros de esta familia poseen en el segmento de activación el motivo dual de fosforilación Thr-Gly-Tyr. Las cuatro isoformas de p38 están codificadas en genes distintos y mientras que la variante  $\alpha$  es ubicua y se expresa en la mayoría de los tipos celulares, las demás isoformas dependen del tejido. Así, p38 $\beta$  es expresada principalmente en el cerebro, p38 $\gamma$ , en el músculo esquelético y p38 $\delta$ , en las glándulas endócrinas. La comparación de secuencias revela que cada isoforma comparte el 60% de identidad con los miembros de la familia, pero sólo el 40-45% con las otras MAPK (ERK y JNK) (Zarubin T. y Han J., 2005; Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010).

En los mamíferos, las MAPKs p38 son activadas principalmente por estímulos extracelulares de estrés físico o químico (como el estrés oxidativo, la radiación UV, el calor, la isquemia, la hipoxia o el shock osmótico), algunas citoquinas inflamatorias (como el TNF- $\alpha$  y la IL-1) y algunos factores de crecimiento (como el CSF-1) (Roux P.P. y Blenis J., 2004).

En la vía canónica, las MAPKs p38 son activadas por las MAP2K 3 y 6 (MKK3 y MKK6, respectivamente) (Figura 1.11). Estas serina/treonina quinasas son específicas de esta familia, y mientras que MKK6 fosforila y activa a todas las isoformas de p38, MKK3 no activa a p38 $\beta$ , pero sí a las demás (Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010). Además, MKK4, una quinasa que activa a la MAPK JNK, también puede participar en la activación de p38 $\alpha$  y p38 $\delta$  en algunos tipos celulares (Zarubin T. y Han J., 2005). Por otro lado, existen además mecanismos de activación alternativos e independientes de MAP2K en los cuales p38 $\alpha$  se autofosforila y se activa: i) luego de interactuar con la proteína TAB1 (de las siglas en inglés "*Transforming growth factor- $\beta$ -Activated protein kinase 1 (TAK1)-Binding protein*") (Zarubin T. y Han J., 2005), o bien ii) en linfocitos T activados, luego de ser fosforilada en Tyr323 por la tirosina quinasa ZAP70 próxima al receptor de antígenos de células T (TCR) y por p56lck

(Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010). Las MAP3K que participan en la vía de MAPK p38 incluyen ASK1 (o MAP3K5), DLK1 (de las siglas en inglés "Dual-Leucine-zipper-bearing Kinase 1"), MEKK3/4, MLK3, TAK1, Tao1/2, Tpl2 y ZAK1 (de las siglas en inglés "leucine Zipper And sterile- $\alpha$  motif Kinase 1") (Roux P.P. y Blenis J., 2004; Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010). La regulación de estas MAP3Ks es aún más compleja e involucra a distintos mecanismos, tales como la participación de algunas proteínas de la familia TRAF (de las siglas en inglés "TNF-Receptor Associated Factor"), la fosforilación de quinasas de la familia de STE20 y la unión a pequeñas proteínas que unen GTP de la familia Rho (Rac1 y Cdc42) (Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010).



**Figura 1.11. Vía canónica de activación de MAPK p38.** Las MAPKs p38 son activadas por MKK3 y MKK6. Además MKK4, una quinasa que activa JNK, puede participar en la activación de p38 $\alpha$  y p38 $\delta$  en algunos tipos celulares. Las MAP3K que participan en la vía de MAPK p38 incluyen ASK1, DLK1, MEKK3/4, MLK3, TAK1, Tao1/2, Tpl2 y ZAK1. En la regulación de estas MAP3Ks participan miembros de la familia TRAF, quinasas de la familia de STE20 y pequeñas proteínas de unión a GTP de la familia Rho. Los sustratos de p38 incluyen proteína quinasas implicadas en diversos procesos, proteínas nucleares (factores de transcripción y reguladores de la remodelación de la cromatina) y proteínas citosólicas que regulan numerosas funciones celulares. Figura adaptada de Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010.

Los sustratos de p38 incluyen proteína quinasas implicadas en diversos procesos, proteínas nucleares (factores de transcripción y reguladores de la remodelación de la cromatina) y proteínas citosólicas que regulan numerosas funciones celulares (inflamación, degradación de proteínas, localización de proteínas, estabilidad del ARNm, endocitosis, apoptosis, cambios en el citoesqueleto, migración celular) (Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010). Algunas de estas proteínas blanco son la fosfolipasa A; la proteína asociada a microtúbulos Tau; los factores de transcripción ATF1/2, MEF2A, Sap-1, Elk-1, NF- $\kappa$ B, Ets-1, p53; y las MKs MSK1 y 2, MNK 1 y 2 y MK2 (Roux P.P. y Blenis J., 2004). Como los miembros de la familia de MAPKs p38 comparten algunos sustratos, existe redundancia funcional entre las isoformas de p38 (Cuadrado A. y Nebreda A.R., 2010).

#### **1.3.4.3.3. Vía del factor nuclear $\kappa$ B**

El factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ha sido considerado la vía típica de señalización en la inflamación inducida por citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la IL-1, que culmina con la transcripción génica de citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión que participan en el proceso inflamatorio (Lawrence T., 2009). De esta manera, el NF- $\kappa$ B cumple un rol fundamental en el control de la inmunidad innata y adaptativa (Verma I.M., 2004).

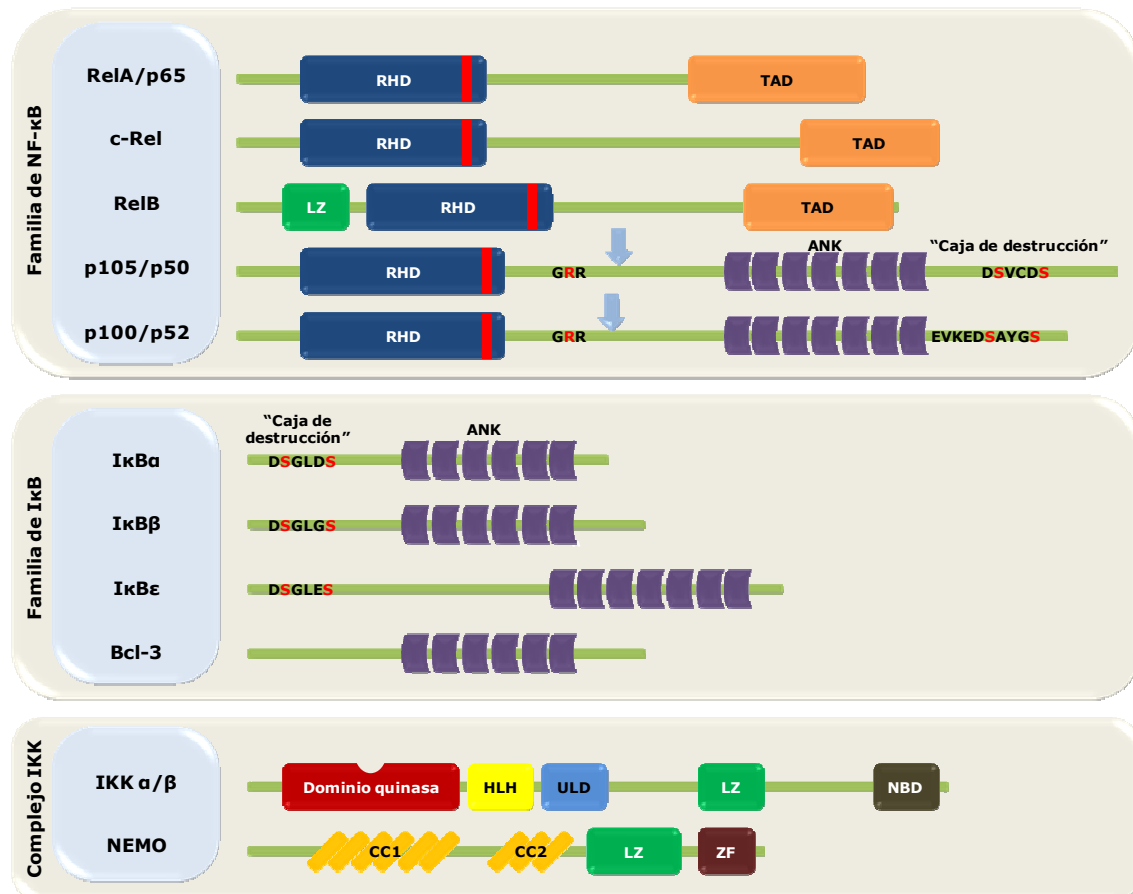
En los mamíferos, la familia de NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros: RelA/p65, c-Rel, RelB, p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) y p100/p52 (NF- $\kappa$ B2) (Figura 1.12) (Verma I.M., 2004; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Estas proteínas son factores de transcripción que se unen como homodímeros o heterodímeros a sitios de 9-10 pares de bases de ADN (sitios  $\kappa$ B) caracterizados por tener un alto grado de variabilidad en su secuencia (Gilmore T.D., 2006). Estructuralmente, comparten un extremo N-terminal de 300 residuos de aminoácidos, altamente conservado, denominado dominio de homología a Rel (RHD, por las siglas en inglés "*Rel Homology Domain*") que contiene los dominios de dimerización, localización nuclear y unión al ADN

(Figura 1.12) (Verma I.M., 2004; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Las proteínas Rel contienen, además, un dominio de transactivación (TAD) en el extremo C-terminal que les confiere la capacidad de iniciar la transcripción génica. Si bien las proteínas p50 y p52 (producto del clivaje de p105 y p100, respectivamente) carecen de dominios TAD, pueden regular positivamente la transcripción a través de la heterodimerización con una proteína Rel o bien, interactuar con otras proteínas que no son Rel, pero que poseen la capacidad de transactivar. Alternativamente, los homodímeros de p50 y p52 pueden inhibir la transcripción de genes al competir por los sitios  $\kappa$ B (Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Todos los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B, con excepción de RelB, pueden formar homodímeros, así como heterodímeros. La dupla más comúnmente activada es el heterodímero de RelA (p65) con las subunidades p50 o p52 (Verma I.M., 2004; Gilmore T.D., 2006).

NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma en una forma inactiva, ya que está asociado con proteínas de la familia del inhibidor  $\kappa$ B, como I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$  y Bcl-3 (Verma I.M., 2004; Gilmore T.D., 2006; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Estas proteínas regulatorias se caracterizan por poseer repeticiones múltiples de anquirina (un motivo de 33 residuos de aminoácidos que median la interacción proteína-proteína) (Figura 1.12). En general, estos factores, al interactuar con sus sustratos, ocultan la señal de localización nuclear del NF- $\kappa$ B e impiden su translocación al núcleo (Karin M. y Delhase M., 2000; Gilmore T.D., 2006). Como los factores p100 y p105 también poseen estas repeticiones de anquirina pueden actuar como proteínas tipo I $\kappa$ B. Por otro lado, la proteína Bcl-3 interactúa específicamente con los homodímeros de p50 o p52 e induce la expresión génica, en contraste con los otros miembros de la familia I $\kappa$ B que tienen una función inhibitoria (Verma I.M., 2004). La activación de NF- $\kappa$ B ocurre cuando I $\kappa$ B es fosforilado en residuos de serina conservados, situados en la denominada "caja de destrucción" (DSGXXS), lo que conduce al reconocimiento por proteínas de la familia de enzimas ligasas E3 y la enzima E2 y ubiquitinización de la Lys48 del I $\kappa$ B (Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Las proteínas I $\kappa$ B poliubiquitinizadas son rápidamente degradadas por el



proteosoma 26S, lo que lleva a la liberación de NF- $\kappa$ B que transloca al núcleo y activa la transcripción génica (Karin M. y Delhase M., 2000).



**Figura 1.12. Componentes de la vía de NF- $\kappa$ B.** Los miembros de la familia de NF- $\kappa$ B comparten en el extremo N-terminal una región denominada RHD que contiene la señal de localización nuclear (línea roja). Además, las proteínas Rel contienen un dominio de transactivación (TAD). Las proteínas p105 y p100 se clivan (flechas celestes) para dar lugar a las proteínas p50 y p52, respectivamente. La secuencia GRR es indispensable para el procesamiento parcial de la proteína.

La familia de I $\kappa$ B y las proteínas p105 y p100 poseen múltiples copias de anquirina (ANK). En las cajas de destrucción, las Ser (S) marcadas en rojo indican los sitios de fosforilación.

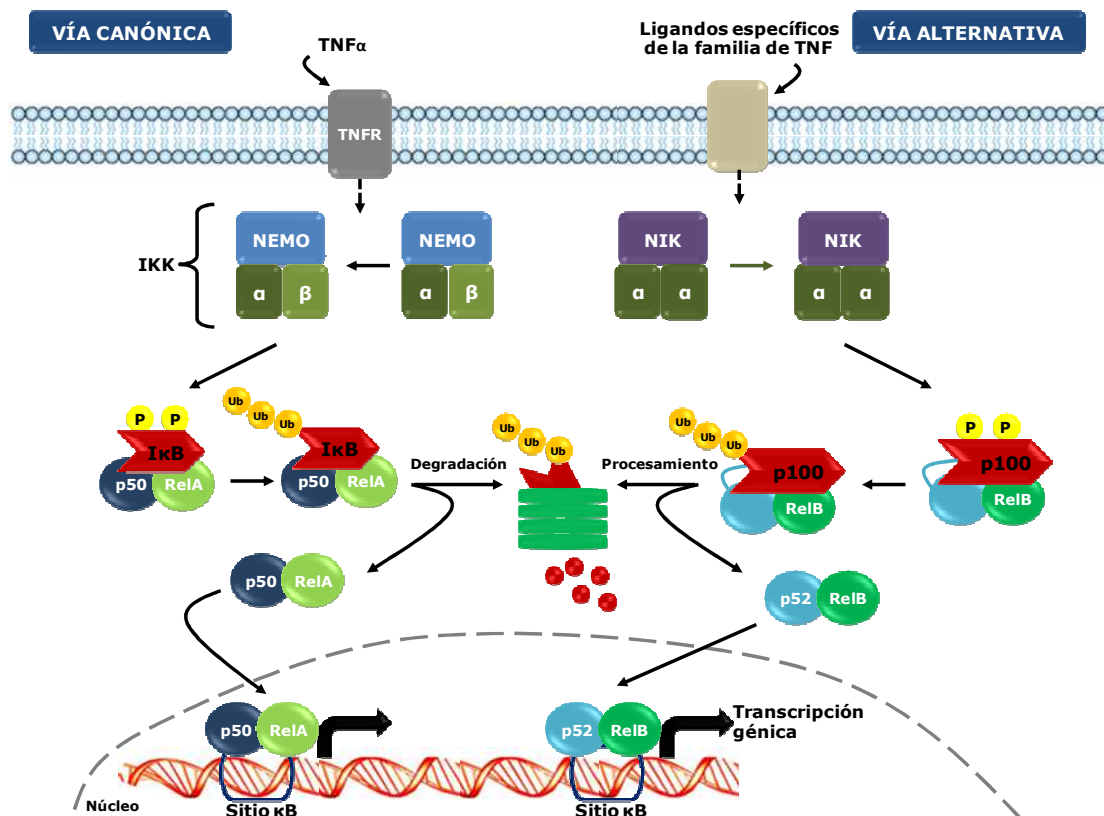
Las IKKs se caracterizan por poseer un dominio quinasa en el extremo N-terminal, una región hélice-*loop*-hélice (HLH), una región tipo ubiquitina (ULD), un "cierres de leucinas" (LZ) y una región de unión a NEMO (NBD). A su vez, NEMO posee dos dominios "coiled-coil" (CC1 y CC2), un dominio LZ y un motivo "dedos de zinc" (ZF). Figura adaptada de Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012.

Las cascadas de señalización de NF- $\kappa$ B se dividen en una vía canónica y una vía no canónica o alternativa. En la vía canónica o clásica (Figura 1.13) luego del reconocimiento del ligando, los receptores, como el receptor para TNF- $\alpha$  o para la IL-1 o el TLR4 (de las siglas en inglés "*Toll Like Receptor*"), gatillan las cascadas de señalización que culminan en la activación del complejo de la quinasa del I $\kappa$ B, conocido como IKK. Este complejo de alrededor de 700-900 kDa está formado por las quinasas IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  y la proteína reguladora NEMO (de las siglas en inglés "*NF- $\kappa$ B Essential MOdulator*"). Como se muestra en la Figura 1.12, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  contienen un dominio quinasa en el extremo N-terminal, seguidos de un motivo "cierre de leucinas" (LZ), indispensable para la dimerización y la formación del complejo multimérico y un motivo hélice-"loop"-hélice (HLH), esencial para una actividad quinasa óptima (Karin M. y Delhase M., 2000). La porción C-terminal contiene la secuencia LDWSWL (NBD, por las siglas en inglés "*NEMO Bindind Domain*"), que es crítica para la interacción con la subunidad IKK $\gamma$  (NEMO) (Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009). NEMO posee algunas regiones de hélices- $\alpha$  superenrolladas o "*coiled-coil*", un motivo LZ y un motivo "dedos de zinc" (ZF) hacia el extremo C-terminal (Figura 1.12). Para que el complejo IKK se active, debe ocurrir la fosforilación de dos residuos de serina en el motivo SLCTS de alguna de las quinasas (IKK $\alpha$  ó IKK $\beta$ ). Una vez activado, el complejo es capaz entonces de fosforilar a proteínas de la familia de I $\kappa$ B y así, inducir la liberación de NF- $\kappa$ B y su posterior translocación al núcleo con la consecuente activación de la transcripción génica (Verma I.M., 2004; Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012).

En la vía alternativa o no canónica (Figura 1.13), NF- $\kappa$ B es activado por miembros específicos de la familia de TNF, como el ligando CD40, el factor activador de células B (BAFF) y la linfotoxina- $\beta$ . A diferencia de la cascada clásica, esta vía depende de IKK $\alpha$  y es independiente de IKK $\beta$  y NEMO. La quinasa NIK (por las siglas en inglés "*NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase*") no sólo activa a IKK $\alpha$ , sino que funciona como una proteína de anclaje para IKK $\alpha$  y p100. La activación de IKK $\alpha$  lleva a la fosforilación de p100 y al reclutamiento de las enzimas ligasas E3 y la enzima E2, que poliubiquitinizan a p100 en Lys855. La

secuencia GRR de p100 es requerida para el procesamiento y la generación de p52. Finalmente, se forman los heterodímeros p52/RelB, que translocan al núcleo y activan la transcripción génica (Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012).

Entre los genes activados por NF- $\kappa$ B se encuentran genes de citoquinas inflamatorias (TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ ), quemoquinas (CXCL1, CXCL2, CXCL10), proteínas relacionadas con la supervivencia (Bcl21L1, serpin, PAI2) o con el estrés oxidativo, y proteasas proinflamatorias (CASP1) (Ben-Neriah Y. y Karin M., 2011).



**Figura 1.13. Vía de señalización canónica y alternativa de NF- $\kappa$ B.** En la vía canónica los receptores gatillan cascadas de señalización que activan al complejo de la quinasa del I $\kappa$ B, conocido como IKK, mediante la fosforilación de dos residuos de Ser de alguna de las quinasas (IKK $\alpha$  ó IKK $\beta$ ). Una vez activado, el complejo puede fosforilar a proteínas I $\kappa$ B y así, inducir la liberación de NF- $\kappa$ B y su posterior translocación al núcleo con la consecuente inducción de la transcripción de genes relacionados con la inflamación, la supervivencia o el estrés oxidativo.

La vía alternativa o no canónica depende de IKK $\alpha$  y es independiente de IKK $\beta$  y NEMO. La quinasa NIK activa a IKK $\alpha$  lo que lleva a la fosforilación y posterior poliubiquitinación de p100. Finalmente, se forman los heterodímeros p52/RelB, que translocan al núcleo y activan la transcripción génica. Figura adaptada de Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009.

Por último, otras cascadas de señalización, no indicadas en la Figura 1.13, pueden activar al complejo IKK. Así, por ejemplo, varias MAP3Ks (como NIK, NAK, TAK1, MEKK1 y MEKK3, Tpl-2) y las quinasas PKC- $\theta$ , PKC- $\zeta$  y PKC- $\lambda$  pueden fosforilar a IKK $\alpha$  e IKK $\beta$  *in vitro*. Además, la cascada de PI3K/Akt también estaría involucrada en el control de la actividad de IKK a través de mTOR. Otras proteínas también relacionadas con el NF- $\kappa$ B son p53, IRF y Notch (Oeckinghaus A. y col., 2011; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). El gran número de quinasas potenciales de IKK refleja la amplia variedad de estímulos que pueden participar en la activación de la vía de NF- $\kappa$ B.

#### 1.4. Placenta

La placenta es un órgano transitorio y altamente especializado que, junto con las membranas fetales y el fluido amniótico, mantiene el crecimiento y desarrollo normal del feto durante el embarazo (Guce N.M. y col., 2004). La placenta, como órgano de intercambio entre la madre y el feto, debe funcionar aún mientras se desarrolla, de manera que todos los cambios de la misma deben estar finamente sincronizados con su función (Huppertz B., 2008). Este órgano tiene diferentes funciones, entre las que se destacan la función de intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto; la función endocrina, ya que sintetiza gonadotrofina coriónica, progesterona y lactógeno placentario; y por último, la función protectora, porque no sólo protege al feto de ser rechazado por la respuesta inmune materna, sino también de ciertos xenobióticos, infecciones y enfermedades maternas (Roa, I. y col., 2012). Las alteraciones en el desarrollo de la placenta o de su función derivan en complicaciones para el feto, como el retraso del crecimiento intrauterino, o inconvenientes para la madre, como la preeclampsia (Guce N.M. y col., 2004; Tsatsaris V. y col., 2006).

La unidad útero-placentaria está compuesta por tejidos fetales derivados del saco coriónico y por tejidos maternos derivados del endometrio. La placenta humana es un órgano hemocorial vellosa, ya que la sangre materna entra en contacto directo con las células trofoblásticas fetales (Guce N.M. y col., 2004).

### 1.4.1. Implantación embrionaria

La implantación embrionaria, también denominada anidación, es un proceso único, que en humanos se caracteriza por ser intrusivo (los trofoblastos humanos son sumamente invasivos, pero no destruyen las células epiteliales uterinas), intersticial (el embrión se implanta profundamente en la pared uterina) y antimesometrial (ocurre en la porción superior de la pared posterior del útero) (Bischof P. y Campana A., 1996).

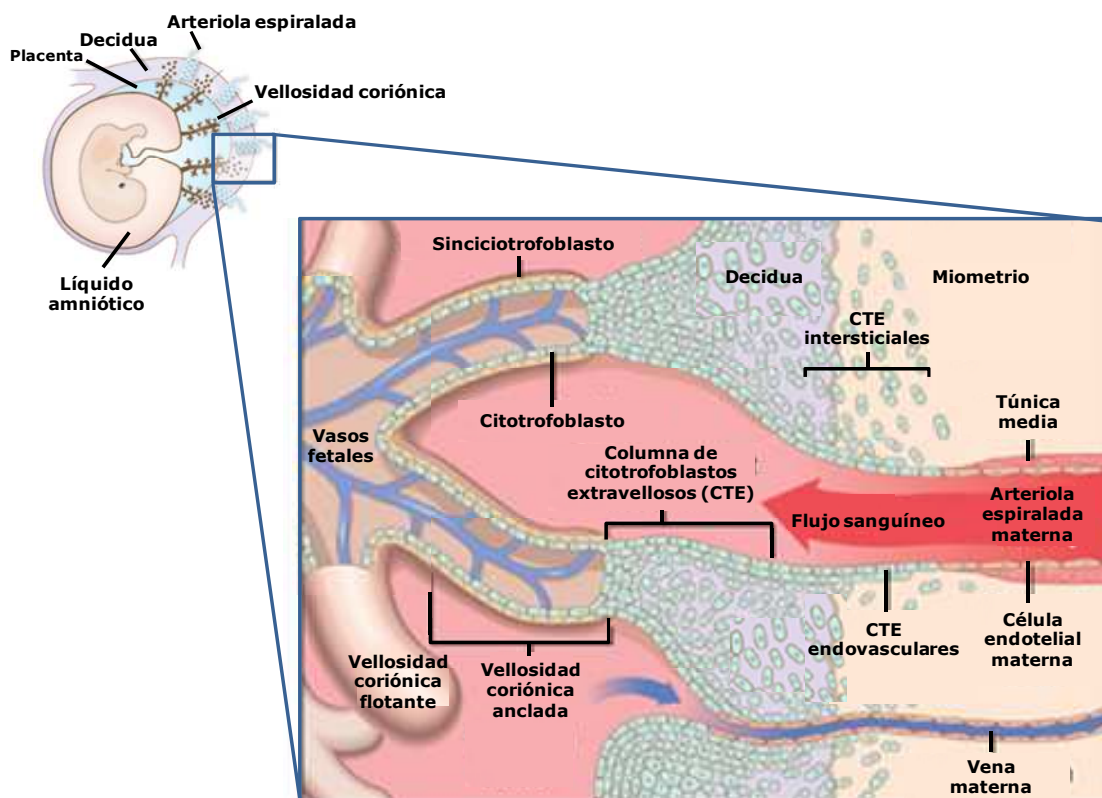
Las particularidades de este proceso tornan complicado su estudio en humanos. Existen muy pocos casos que documenten lo que ocurre en los primeros estadios del desarrollo embrionario en humanos, y no es poco común encontrar que la información que se tiene sobre algún estadio en particular proviene de un único caso clínico. Algunos eventos, como la adhesión inicial del blastocisto a la pared uterina, nunca fueron caracterizados en humanos y provienen de estudios realizados en animales (Norwitz E.R. y col., 2001).

El proceso de implantación embrionaria consiste básicamente en tres etapas. La primera, denominada aposición o de contacto, denota la adhesión inestable del blastocisto a la pared uterina. En la etapa siguiente, donde la adhesión se vuelve estable, existe un contacto físico entre el blastocisto y el epitelio uterino. Durante la última etapa, denominada invasión, las células trofoblásticas invaden todo el endometrio y un tercio del miometrio, y finalmente la vasculatura uterina (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005).

Luego de la anidación, las células trofoblásticas se diferencian en vellosas y extravelosas. En el fenotipo vellosa, los citotrofoblastos se ubican en forma de monocapa en las vellosidades coriónicas flotantes, proliferan, se diferencian y fusionan para dar lugar a los sinciotrofoblastos (Figura 1.14). Alrededor del día 14 de implantación, los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas ancladas se abren paso a través de la capa de sinciotrofoblastos, e invaden el estroma uterino como columnas o agregados multicelulares (Burrows T.D. y col., 1996; Guibourdenche J. y col., 2009). Estos citotrofoblastos, denominados extravelosos (CTE), pueden invadir la decidua (CTE

intersiticiales), o bien invadir y remodelar las arteriolas espiraladas maternas (CTE endovasculares) (Figura 1.14) (Demitriadis E. y col., 2010).

El grado de invasión de los citotrofoblastos en la pared uterina es un factor determinante del resultado del embarazo. Una excesiva invasión puede llevar a patologías relacionadas con una mayor adhesión de la placenta al miometrio (placenta acreta, percreta e increpa, según la magnitud de la adhesión) (Norwitz E.R. y col., 2001), o bien a patologías tumorales como mola hidatiforme y coriocarcinoma. Por otro lado, una invasión deficiente está asociada a la hipertensión, la preeclampsia y un inadecuado crecimiento fetal



**Figura 1.14. Interfase materno-fetal.** En el embarazo normal, los citotrofoblastos invaden la decidua materna hasta un tercio del endometrio. Las arteriolas espiraladas maternas, que son las ramas terminales de las arterias uterinas de la madre, son remodeladas por los citotrofoblastos extravellosos endovasculares para poder suministrar a la placenta y al feto la perfusión adecuada de sangre.

(Bischof P. y Campana A., 1996). Es por ello que la invasión trofoblástica es un proceso finamente regulado por numerosos factores producidos en el microambiente trofoblasto-endometrio (Demitriadis E. y col., 2010). Más aún, la capacidad migratoria e invasiva de los CTE está regulada en forma temporo-espacial (Ferreti C. y col., 2007).

Para que la implantación embrionaria resulte satisfactoria, el estroma del endometrio materno debe estar preparado para recibir al blastocisto. Este proceso, conocido como decidualización, si bien ocurre durante el ciclo menstrual normal, es más extenso durante el embarazo. Los cambios que acontecen son inducidos por la progesterona e incluyen la aparición de células NK uterinas específicas ("*natural killer*", con abundante expresión de CD56). Además, las células estromales se alargan por la acumulación de glucógeno y lípidos en sus citoplasmas. A su vez, como estas células mantienen el receptor de progesterona, a pesar de la presencia constante de la hormona, la exposición prolongada a la progesterona favorece la secreción de prolactina y de la proteína de unión del factor de crecimiento análogo a la insulina (IGFBP-1). Asimismo, también se producen cambios en la vasculatura y se secretan IL-15, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y metaloproteinasas de membrana (Dunn C.L. y col., 2003; Guce N.M. y col., 2004). En su conjunto, estos cambios proporcionan el ambiente regulatorio necesario para la implantación del blastocisto y la posterior penetración de los trofoblastos en los vasos sanguíneos maternos.

#### **1.4.2. Mediadores**

El éxito de la implantación embrionaria depende de una apropiada interacción entre el blastocisto y el endometrio uterino materno que se encuentra decidualizado. Numerosas hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores inmunológicos y enzimas juegan un papel crucial en la interacción materno-fetal durante este proceso (Norwitz E.R. y col., 2001; Huang H.Y., 2006). De todos estos factores, el rol de las hormonas esteroideas es el mejor entendido. La implantación requiere un aumento de la secreción de

17 $\beta$ -estradiol durante la fase preovulatoria para estimular la proliferación y diferenciación de las células epiteliales uterinas, mientras que la producción de progesterona por el cuerpo lúteo promueve la proliferación y diferenciación de células estromales (Norwitz E.R. y col., 2001). En la Tabla 1.2 se resumen algunos factores que fueron asociados con el proceso implantatorio y el mantenimiento del embarazo. Asimismo, se mencionan los posibles roles que podrían desempeñar (Norwitz E.R. y col., 2001).

**Tabla 1.2.**  
**Factores asociados a la implantación embrionaria**

<b>Factor</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Rol sugerido</b>
Hormonas	17 $\beta$ -estradiol, progesterona	Promueven la proliferación y diferenciación de células estromales endometriales y epiteliales.
	Gonadotropina coriónica humana (hCG)	Mantiene la producción de progesterona por parte del cuerpo lúteo.
Cambios en el epitelio luminal endometrial	Pinopodos, alteraciones en moléculas de adhesión y expresión de mucinas	Facilitan la captura del blastocisto y su adhesión. Promueven la diferenciación e invasión trofoblástica.
Citoquinas y factores de crecimiento	Factor inhibidor de leucemia (LIF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HBEGF), factor de crecimiento hepático (HGF), interleuquinas, VEGF	Facilitan la señalización entre el blastocisto y el útero. Promueven la proliferación, diferenciación e invasión del endometrio. Regulan la permeabilidad vascular y remodelación del endometrio.
Factores inmunológicos	Interleuquina-10	Inmunosupresión.
	HLA-G	Previene reconocimiento inmunológico y el rechazo del feto.
	Indoleamina 2,3-dioxigenasa	Degrada Trp, aminoácido esencial para la acción de macrófagos.
Proteinasas, inhibidores y moléculas de adhesión	Metaloproteinasas (MMP), inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP), catepsinas B y L, cadherinas e integrinas	Regulan la invasión trofoblástica, facilitan al trofoblasto la mimetización vascular.
Otros factores	Ciclooxigenasa-2	Regula la producción de prostaglandinas.
	Tensión de oxígeno	Regula el balance entre proliferación y diferenciación trofoblástica.



Aunque el rol biológico de muchos de los factores (hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores inmunológicos y enzimas) presentes en la interfase materno-fetal ha sido estudiado (Norwitz E.R. y col., 2001; Staun-Ram E. y Shalev E., 2005), resta aún dilucidar las funciones biológicas que ejercen otras proteínas tradicionalmente no relacionadas con el proceso de implantación, como por ejemplo el G-CSF. Tanto esta citoquina como su receptor se expresan en placenta (Uzumaki H. y col., 1989; Shorter S.C. y col., 1992; McCracken S.A. y col., 1996 y 1999), y si bien fue sugerido que podría participar durante la placentación de manera paracrina (McCracken S.A. y col., 1996), se desconoce su mecanismo de acción en este tejido.

#### **1.4.2.1. Metaloproteinasas**

La invasión trofoblástica no es el resultado de un crecimiento pasivo, sino más bien de un proceso bioquímico activo. Atravesar las membranas basales e invadir la matriz extracelular (MEC) requiere de una proteólisis activa de sus constituyentes, como son los diferentes tipos de colágeno (tipos I-X), las glicoproteínas de la matriz (laminina, LM; fibronectina, Fn; elastina; entactina; etc.) y los proteoglicanos (Bischof P. y Campana A., 1996). Además, simultáneamente, debe existir una homeostasis controlada y neoangiogénesis en los tejidos deciduales (Hill J.A., 2001). Distintos procesos invasivos fueron relacionados con la participación de enzimas que degradan componentes de la MEC, tales como serina proteasas, catepsinas y metaloproteinasas o matrixinas (MMPs) (Westermarck J. y Kähäri V.M., 1999). Durante la implantación, las proteínas de la MEC como LM, Fn y colágeno son abundantes en la decidua; es por esta razón, que la producción específica de MMPs es necesaria para una migración exitosa por parte del trofoblasto. Estas enzimas, por lo tanto, desempeñan un papel esencial en la invasión trofoblástica (Burrows T.D. y col., 1996).

Las MMPs son una familia de, al menos, 23 endopeptidasas dependientes de  $Zn^{+2}$  que tienen un rol fundamental en la implantación embrionaria, la remodelación tisular, el desarrollo de órganos y la cicatrización de heridas.

También están asociadas a procesos patológicos, como la iniciación del cáncer y su progresión, la osteoartritis, la inflamación y algunas patologías vasculares y neurodegenerativas (Murphy G. y Nagase H., 2008; Kapinska A. y Fields G.B., 2012). Estas enzimas, que colectivamente son capaces de degradar todos los componentes de la MEC, se clasifican, según su especificidad de sustrato y su estructura, en: colagenasas, gelatinasas, estromelisinias, matrilitinas, proteinasas unidas a membranas (MT-MMPs) y otras MMPs (Tabla 1.3) (Bischof P., 2001; Visse R. y Nagase H., 2003; Cohen M. y col., 2006; Murphy G. y Nagase H., 2008; Yadav L. y col., 2014).

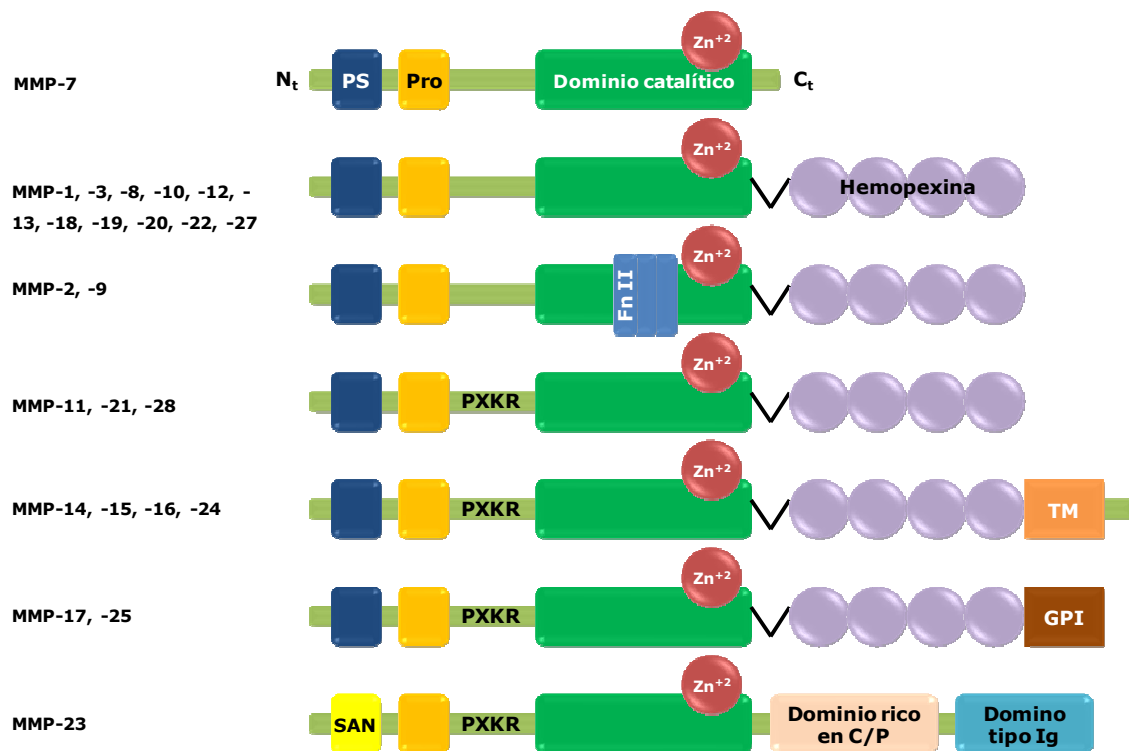
**Tabla 1.3.**  
**Clasificación de metaloproteinasas**

Sub-familia	MMP	Otra denominación	Sustrato
Colagenasas	<b>MMP-1</b>	Colagenasa 1, Colagenasa intersticial o fibroblástica	Colágeno (I, II, III, VII, VIII y X), caseína, agregano, perleciano, entactina, laminina, proMMP-1, -2 y -9, serpinas
	<b>MMP-8</b>	Colagenasa 2, Colagenasa neutrófila	Colágeno (I- III, V, VII, VIII y X), gelatina, agregano, fibronectina
	<b>MMP-13</b>	Colagenasa 3	Colágeno (I, II, III, IIV, IX, X y XIV), gelatina, plasminógeno, agregano, perleciano, fibronectina
	<b>MMP-18*</b>	Colagenasa 4	Colágeno I
Gelatinasas	<b>MMP-2</b>	Gelatinasa A, 72 kDa gelatinasa	Gelatina, colágeno (I, IV, V, VII, X y XI) agregano, laminina, fibronectina, elastina, tenascina C, vitronectina, precursor de la proteína $\beta$ -amiloide
	<b>MMP-9</b>	Gelatinasa B, 92 kDa gelatinasa	Gelatina, colágeno ( IV, V, VII, X y XIV), agregano, elastina, entactina, vitronectina, osteonectina
Estromelisinias	<b>MMP-3</b>	Estromelisinina-1, Transina-1	Agregano, colágeno (III, IV, IX y X), gelatina, laminina, fibronectina, elastina, caseína, tenascina C, vitronectina

<b>Estromelisininas</b>	<b>MMP-10</b>	Estromelisinina-2, Transina-2	Agrecano, colágeno (II- V), fibronectina, gelatina, caseína, agrecano, elastina, MMP-1 y -8	
	<b>MMP-11</b>	Estromelisinina-3	Débil actividad sobre fibronectina, laminina, colágeno IV, agrecano, gelatina, IGFBP-1, inhibidor de proteinasas- $\alpha$ -1	
<b>Matrilisininas</b>	<b>MMP-7</b>	Metaloproteinasa-1 putativa (PUMP-1), Matrilisina	Agrecano, IGFBP-1, laminina, elastina, colágeno IV, entactina, tenascina C, caseína, fibronectina, gelatina, vitronectina, agrecano, proMMP-9	
	<b>MMP-26</b>	Matrilisina-2	Gelatina, $\beta$ -caseína, fibronectina, colágeno IV, proMMP-9	
<b>Unidas a membranas</b>	<b>Transmembrana</b>	<b>MMP-14</b>	MT1-MMP, MMP-X1	Colágeno (I- III), gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, dermatán sulfato, agrecano, tenascina, proMMP-2 y -13
		<b>MMP-15</b>	MT2-MMP	ProMMP-2, fibronectina, laminina, agrecano, perlecano
		<b>MMP-16</b>	MT3-MMP	ProMMP-2, colágeno III, gelatina, caseína
	<b>Anclaje de GPI**</b>	<b>MMP-24</b>	MT5-MMP	ProMMP-2, proteoglucanos
		<b>MMP-17</b>	MT4-MMP	Fibrinógeno, precursor de TNF
		<b>MMP-25</b>	MT6-MMP	ProMMP-2, colágeno IV, gelatina, fibronectina, fibrina
<b>Otras</b>	<b>MMP-12</b>	Metaloelastasa	Elastina, fibronectina, gelatina, colágeno (I, IV), laminina, vitronectina, proteoglucanos	
	<b>MMP-19</b>	RASI MMPasa	Agrecano, colágeno I	
	<b>MMP-20</b>	Enamelisina	Amelogenina, agrecano	
	<b>MMP-21</b>	-		
	<b>MMP-23</b>	MIFR/FEMAL-YSIN	Gelatina	
	<b>MMP-27</b>	-		
	<b>MMP-28</b>	Epilisina	Caseína	

\* No se encuentra en humanos. \*\* Anclaje glicosilfosfatidilinositol.

Estructuralmente, las MMPs están formadas por distintos dominios conservados entre las diferentes subfamilias (Figura 1.15). Entre ellos se encuentran: i) un péptido señal que es clivado durante la vía secretoria; ii) un prodominio que debe ser clivado para la activación enzimática; iii) un dominio catalítico que tiene una secuencia rica en histidinas (HEXGHXXGXXH) que son necesarias para la unión del  $Zn^{+2}$ , además de una metionina conservada que forma un "loop" y estabiliza la unión con el  $Zn^{+2}$ ; y iv) un dominio de hemopexina (excepto en MMP-7) que está involucrado en la interacción con otras MMPs y con los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) (Visse R. y Nagase H., 2003; Yadav L. y col., 2014).



**Figura 1.15. Estructura de las MMPs.** Las MMPs en general consisten de un prodominio (Pro), un dominio catalítico y un dominio de hemopexina. Todas las MMPs tienen en su extremo N-terminal ( $N_t$ ) un péptido señal (PS) que es clivado durante la vía secretoria, y en el dominio catalítico, un sitio de unión a  $Zn^{+2}$ . Las gelatinasas poseen además tres dominios de fibronectina tipo II (FnII) en el dominio catalítico. Las MMPs que son activadas intracelularmente poseen la secuencia PXKR. Las MT-MMPs tienen en su extremo C-terminal ( $C_t$ ) una región transmembrana (TM) o un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI). Por último, la MMP-23 también es una proteína de unión a membrana que tiene la señal de anclaje en el extremo  $N_t$  (SAN).

Los integrantes de la familia de las MMPs además comparten ciertas características comunes: i) cada uno degrada al menos un componente de la matriz extracelular, ii) son activos a pH fisiológico, iii) requieren 2 iones de  $Zn^{+2}$ /molécula para estar activos, iv) son inhibidos tanto por quelantes de metales como por inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), y v) son secretados como zimógenos o proenzimas (proMMP) y requieren activación extracelular (John A. y Tuszynski G., 2001).

Bajo condiciones fisiológicas, las MMPs están finamente reguladas a diferentes niveles: i) a nivel transcripcional, que depende tanto de elementos en *cis* presentes en los promotores del gen, como de varios factores (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento) capaces de inducir la expresión génica; ii) a nivel de la secreción, relacionado con el empaquetamiento en los gránulos de secreción; y iii) a nivel de las proteínas, ligado a la estabilización de las MMPs (modificaciones postraduccionales, como la glicosilación), a la activación de las proenzimas, a la inhibición de las formas tanto activas como inactivas y/o a la localización en la superficie celular (Cohen M. y col., 2006; Biljana E. y col., 2011). Los factores que regulan la producción y actividad de las MMPs modulan indirectamente la degradación de la MEC. Entre estos factores se encuentran serina proteasas, TIMPs, citoquinas y factores de crecimiento (Birkedal-Hansen H. y col., 1993; Burrows T.D. y col., 1996).

Las MMPs se secretan como proenzimas inactivas (también conocidas como proformas o formas latentes), ya que las histidinas presentes en el dominio catalítico y una cisteína en el prodominio se coordinan con el  $Zn^{+2}$  de tal manera que impiden el acceso de las moléculas de agua y previenen que la forma latente se active (Figura 1.16) (Nagase H. y col., 2006). Por esta razón, la activación del zimógeno depende de un cambio conformacional en el prodominio que remueve al residuo de cisteína y permite la interacción de las moléculas de agua con el  $Zn^{+2}$  en el sitio activo. Este evento puede ser iniciado: 1) por proteólisis, que implica la remoción del prodominio por clivaje promovido por otras endoproteinasas intracelulares (vía de la furina) o extracelulares; o 2) por activación química, producida por un cambio

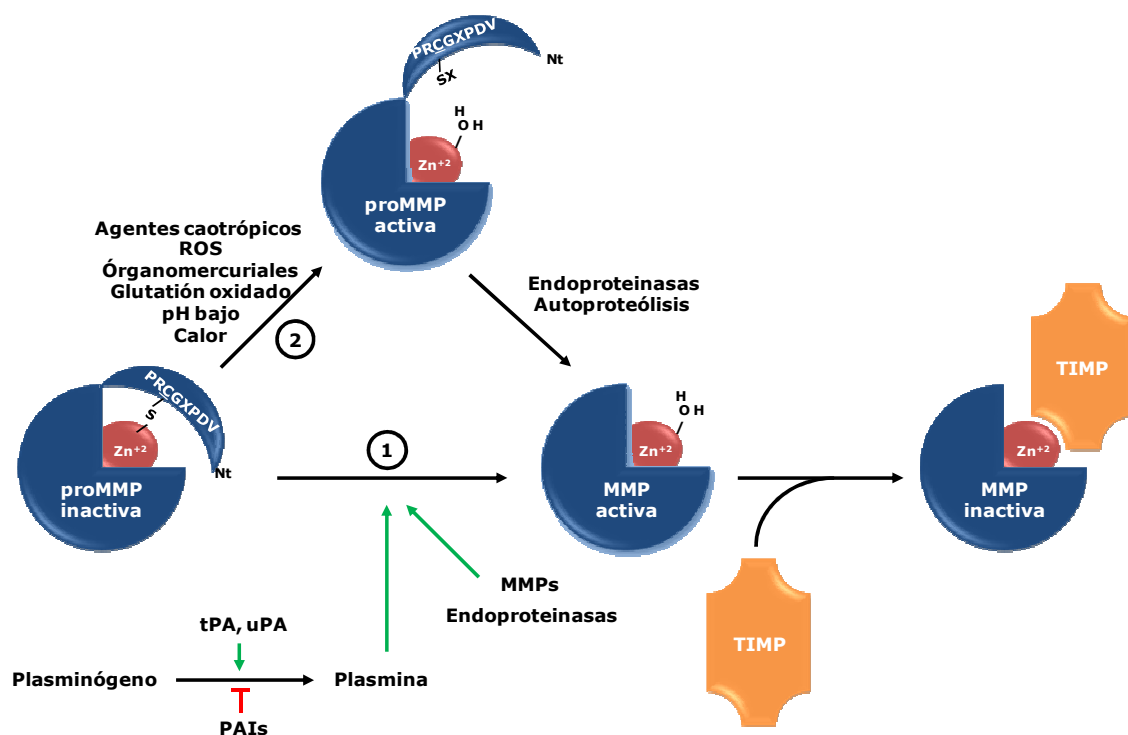
conformacional alostérico del prodominio por agentes caotrópicos, como el SDS; o por la modificación química de la cisteína por ROS, por compuestos órganomercuriales modificadores de grupos tioles, tales como el acetato 4-aminofenilmercurio, el  $\text{HgCl}_2$  y la N-etilmaleimida, o por el glutatión oxidado. El pH bajo y el calor también pueden conducir a la activación de las proformas (Visse R. y Nagase H., 2003; Löffek S. y col., 2011). La activación extracelular de la mayoría de las MMPs puede ser iniciada por MMPs activas o bien por serina proteasas, como la plasmina. La activación del plasminógeno a plasmina es mediada por el activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA). Este sistema está regulado por los inhibidores de los activadores del plasminógeno (PAI-1 y -2) (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005; Cohen M. y col., 2006). Por lo tanto, aquellos factores que modifiquen la expresión de t-PA, u-PA o PAIs regularán indirectamente la actividad de las MMPs y en consecuencia, la degradación de la MEC y la invasión. La activación no sólo está modulada por el sistema PA o MMPs activas, sino que participan además otros factores presentes en el entorno.

Por otro lado, los TIMPs son los principales inhibidores de MMPs y controlan fisiológicamente su actividad. Los cuatro TIMPs conocidos inhiben a las MMPs al interactuar con el sitio catalítico que se encuentra en la región C-terminal de las mismas. Aunque TIMP-1 y TIMP-2 exhiben una actividad inhibitoria hacia todas las formas de MMPs, fue demostrado que TIMP-1 inhibe preferencialmente a la MMP-9, mientras que TIMP-2, a la MMP-2, tanto en sus formas activas como latentes. A su vez, TIMP-2 tiene un importante rol junto con MT1-MMP en la activación de la MMP-2 (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005).

Entre las citoquinas y los factores de crecimiento que inducen la expresión de las MMPs se encuentran: la IL-1, la IL-8, el  $\text{TNF-}\alpha$ , el factor de crecimiento tumoral- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento básico de fibroblastos, el factor de crecimiento neuronal, el factor de crecimiento tipo insulina II (IGF-II) y el VEGF. Entre las sustancias que inhiben su expresión se pueden mencionar: los glucocorticoides, la progesterona, el TGF- $\beta$ , la IL-10, la

IL-12, el factor inhibidor de leucemia y el IFN- $\gamma$  (Birkedal-Hansen H. y col., 1993; Karmakar S. y col., 2004; Cohen M. y col., 2006).

En la placenta, el trofoblasto normal expresa: i) MMP-2 y MMP-9, que degradan principalmente colágeno IV (el mayor constituyente de la MEC) y colágeno desnaturalizado (gelatina); ii) MMP-11, que degrada colágeno y otros sustratos; iii) MMP-14 (o MT1-MMP) y MMP-15 (o MT2-MMP), MMPs de unión a membrana, que son consideradas no sólo responsables de la activación de la pro-MMP-2, sino también de tener actividad sobre algunos sustratos de la MEC; iv) MMP-26, que principalmente cumpliría un rol cooperativo con MMP-9 al activar a esta última; y v) MMP-1, MMP-3 y MMP-7, que si bien se expresan en distintos estadios del embarazo, aún no ha sido establecido claramente su rol en la invasión trofoblástica (Cohen M. y col., 2006; Ferreti C. y col., 2007).



**Figura 1.16. Activación de MMPs extracelulares.** Las MMPs son secretadas como zimógenos (proMMP), que pueden ser activadas por endoproteinasas mediante el clivaje de la cisteína en la secuencia conservada **PRCGXPDV** (1) o por agentes fisicoquímicos que activan parcialmente a la enzima al producir un cambio conformacional o una modificación química de esa cisteína (2). La activación completa ocurre cuando el propéptido es removido proteolíticamente. Las MMPs activas (y las latentes) pueden ser inhibidas por los TIMPs.

Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, que degradan fundamentalmente el principal componente de las membranas basales (colágeno IV), son reconocidas como enzimas clave en el proceso de implantación, ya que permiten la invasión del trofoblasto a través de la decidua y de la vasculatura materna (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Numerosos trabajos científicos han sugerido que la MMP-9 tendría un rol más importante que la MMP-2 en la invasión trofoblástica durante el embarazo, y que la expresión y activación de la misma es un prerrequisito para la invasión (Librach C.L. y col., 1991; Bischof P., 2001; Cohen M. y col., 2006). Sin embargo, fue recientemente demostrado que la MMP-9 se expresa en trofoblastos vellosos de fenotipo no invasivo, mientras que la MMP-2 se detecta en trofoblastos extravellosos invasivos. Este hallazgo sugirió que la capacidad invasiva de los trofoblastos estaría regulada principalmente por la actividad gelatinasa de la MMP-2 (Isaka K. y col., 2005). A pesar de la naturaleza aparentemente contradictoria de estos resultados, debería tenerse en cuenta que durante el primer trimestre existe una expresión diferencial de estas enzimas. Así, la producción de MMP-2 es predominante entre las semanas 6-8, mientras que la MMP-9 es la principal gelatinasa durante las últimas semanas (9-12) del primer trimestre (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Esta expresión temporal podría explicar las diferencias encontradas en distintos trabajos científicos sobre la importancia de cada una de estas enzimas en la invasión trofoblástica, y sugerir que tanto la MMP-2 como la -9 desempeñarían un rol en este proceso sujeto a su perfil de secreción y al tipo celular que las expresa.

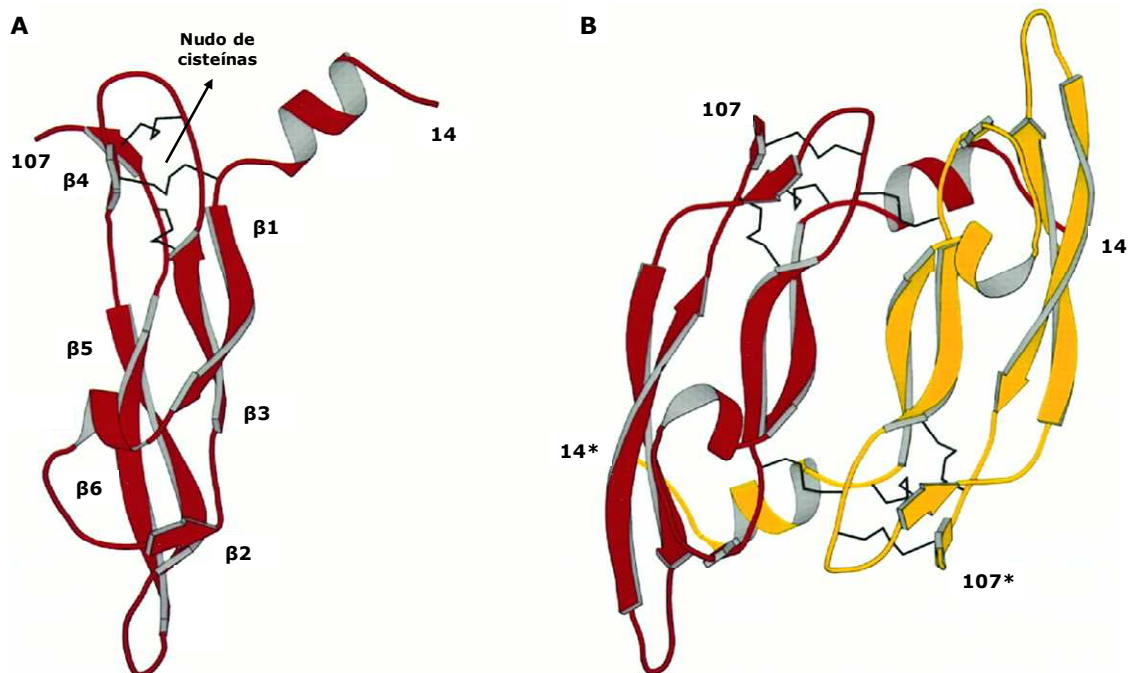
#### **1.4.2.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular**

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) conforma una familia de proteínas críticas para el desarrollo embrionario del sistema vascular (vasculogénesis) y linfático (linfangiogénesis), y para la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes en el adulto (angiogénesis) (Holmes K. y col., 2007). A su vez, el VEGF participa en procesos patológicos,



como el cáncer, la artritis reumatoidea, desórdenes de neovascularización ocular y enfermedades cardiovasculares (Zachary I., 2001).

La familia de VEGF está compuesta por glicoproteínas diméricas, con un peso aproximado de 40 kDa, que son secretadas al medio extracelular (Olsson A.K. y col., 2006). Estructuralmente, cada monómero presenta cuatro hojas  $\beta$  conservadas que se disponen de forma anti-paralela en el centro de la molécula ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 5$  y  $\beta 6$ ) y participan en la dimerización (Figura 1.17). Además, en un extremo de la molécula, se encuentra el característico motivo "nudo de cisteínas" ("cystine knot motif"), que consiste en un anillo formado por los puentes disulfuro Cys57-Cys102, Cys61-Cys104 y Cys26-Cys68. En el otro extremo, se extiende una estructura formada por tres hojas  $\beta$  ( $\beta 2$ , zona final de  $\beta 5$  y la región inicial de  $\beta 6$ ) (Figura 1.17) (Muller Y.A. y col., 1997 y



**Figura 1.17. Diagrama de cintas de la estructura del VEGF.** Se muestran las estructuras secundarias de los dominios de unión al receptor del monómero (A) y del dímero (B). La estructura de hojas  $\beta$  central está compuesta por las hojas  $\beta 1$  (residuos 27-34),  $\beta 3$  (residuos 51-58),  $\beta 5$  (residuos 73-83) y  $\beta 6$  (residuos 89-99). En un extremo de la molécula se encuentra el característico motivo "nudo de cisteínas" y en el otro extremo, se ubica una estructura de hojas  $\beta$ , formada por las hojas  $\beta 2$  (residuos 46-49) y las secuencias finales e iniciales de la hojas  $\beta 5$  y  $\beta 6$ , respectivamente. Los puentes disulfuro se muestran como líneas completas negras. Los números 14 y 107 indican los extremos del monómero rojo y los asteriscos denotan los extremos del monómero amarillo. Figura adaptada de Muller Y.A. y col., 1997.

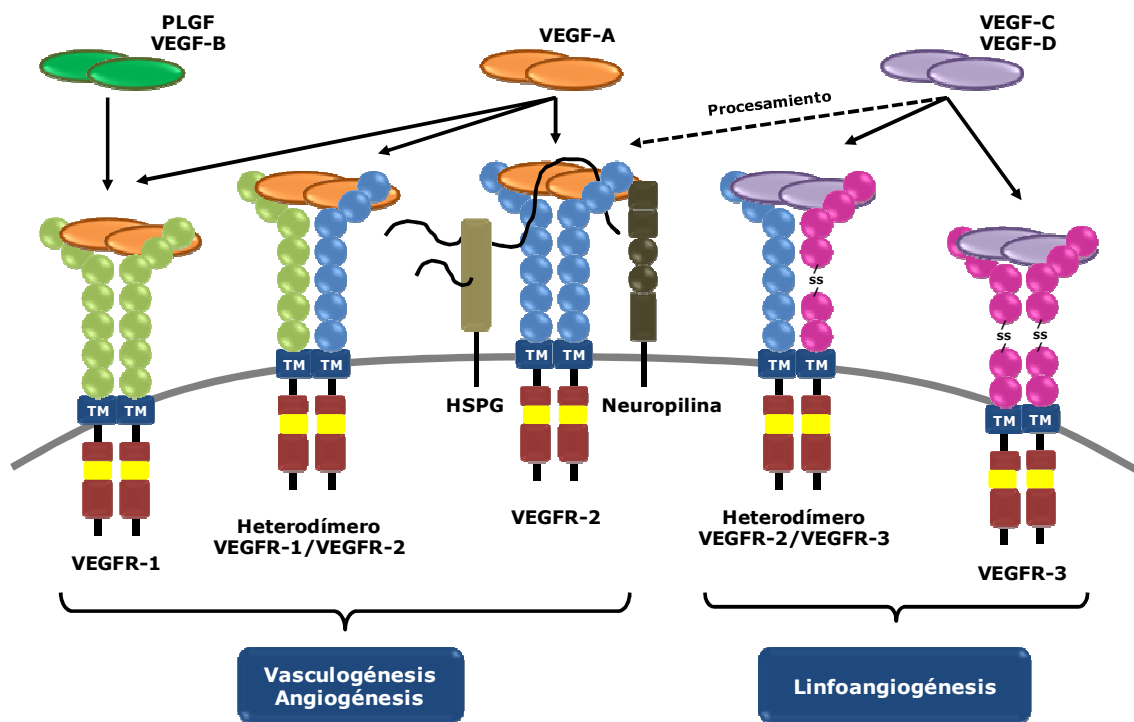
1997b; Hoeben A. y col., 2004).

En los mamíferos, la familia de VEGF consiste de cinco miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de placenta (PLGF) (Olsson A.-K. y col., 2006; Holmes K y col., 2007). VEGF-A es la isoforma más abundante y estudiada de la familia VEGF, y tiene importantes roles en la proliferación, la migración y la supervivencia de las células endoteliales. En humanos, VEGF-A tiene, al menos, siete isoformas provenientes del "splicing" alternativo de un mismo gen: 121, 145, 148, 165, 183, 189 y 206 (Hoeben A. y col., 2004). De estas variantes, VEGF-A 165 es la isoforma más abundante y se expresa como un homodímero de 46 kDa (Zachary I., 2001).

Estos ligandos se unen de manera solapada a tres receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, conocidos como receptores para VEGF (VEGFRs), así como a co-receptores (capaces de unir al VEGF pero no de señalizar por sí solos), tales como los proteoglicanos de heparansulfato (HSPGs, de las siglas en inglés "*Heparan Sulphate ProteoGlycans*") y las neuropilinas (Nrp-1 y -2) (Olsson A.K. y col., 2006). Los VEGFRs (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) pertenecen a la superfamilia de receptores con actividad tirosina quinasa y están formados por un dominio extracelular de aproximadamente 750 residuos de aminoácidos organizado en siete dominios análogos a Ig (Figura 1.18). El VEGFR3 tiene el quinto dominio análogo a Ig reemplazado por un puente disulfuro. Además, poseen un dominio transmembrana seguido de un dominio tirosina quinasa con una inserción de 70 residuos de aminoácidos (inserción quinasa) (Figura 1.18) (Zachary I., 2001; Olsson A.K. y col., 2006). VEGF-B y PLGF se unen con gran afinidad a VEGFR-1, pero no lo hacen a VEGFR-2, mientras que los heterodímeros de VEGF-A/PLGF sí se unen a VEGFR-2. El VEGFR-1 sólo transmite señales mitogénicas débiles; sin embargo, cuando forma un complejo heterodimérico con VEGFR-2 mejora su capacidad de señalización. El VEGFR-1 se expresa en células endoteliales, así como en osteoblastos, monocitos/macrófagos, pericitos, células trofoblásticas, células renales mesangiales y en algunas células madres hematopoyéticas (Tammela T., 2005). El VEGFR-2 es el principal encargado de transducir las señales de VEGF en células endoteliales,

pero también se encuentra en células neuronales, osteoblastos, células del ducto pancreático, progenitores de células de la retina, megacariocitos y células madre hematopoyéticas. El VEGFR-3 sólo une VEGF-C y VEGF-D. Debido a que este receptor se restringe a células endoteliales linfáticas en el adulto, su activación sólo estimula la proliferación, la migración, la diferenciación y la supervivencia de estas células (Zachary I., 2001; Hoeben A. y col., 2004). Por último, las neuropilinas y los HSPGs tienen un rol en la angiogénesis al funcionar como co-receptores (Tammela T. y col., 2005).

La vascularización en la placenta humana es el resultado de dos procesos: la vasculogénesis y la angiogénesis. En primer lugar, ocurre la formación *de novo* de vasos sanguíneos (vasculogénesis) a partir de células progenitoras mesodermales ubicadas en las vellosidades coriónicas alrededor del inicio de la tercer semana de embarazo. Estas células progenitoras mesenquimales se



**Figura 1.18. Familia de VEGF y sus receptores.** Los VEGFs se unen de manera solapada a los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) que están formados por siete dominios análogos a Ig (círculos), un dominio transmembrana (TM) y un dominio tirosina quinasa (cajas bordó) interrumpido con una inserción (cajas amarillas). Los co-receptores, como los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) y las neuropilinas (Nrp-1 y Nrp-2), aumentan la señal al interactuar con los VEGFR.

diferencian a hemangioblastos (precursores de células sanguíneas) y angioblastos (precursores de las células endoteliales) (Clark D.E. y Charnock-Jones D.S., 1998/1999; Demir R. y col., 2004; Wang Y. y Zhao S., 2010). La formación de capilares vellosos a partir de células hemangioblásticas puede observarse hasta las semanas 10-12 de gestación (Wang Y. y Zhao S., 2010). Por otra parte, luego de que se produce el establecimiento de la circulación feto-placentaria primitiva se suman a los procesos de vasculogénesis, los de angiogénesis, es decir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, la cual continúa hasta el final del embarazo (Wang Y. y Zhao S., 2010).

Además, desde etapas tempranas del embarazo, las arterias espiraladas uterinas de la madre sufren una remodelación vascular. En este proceso, que ocurre desde la semana 8 hasta mitades del segundo trimestre del embarazo, los trofoblastos extravelosos invaden las arterias espiraladas maternas y reemplazan a las células endoteliales y a las células del músculo liso de la vasculatura. El objetivo de esta remodelación es lograr un aumento del flujo y una menor resistencia de los vasos y así, incrementar la perfusión de la placenta permitiendo un desarrollo fetal correcto (Cartwright J.E. y col., 2010; Dubinsky V. Y col., 2010).

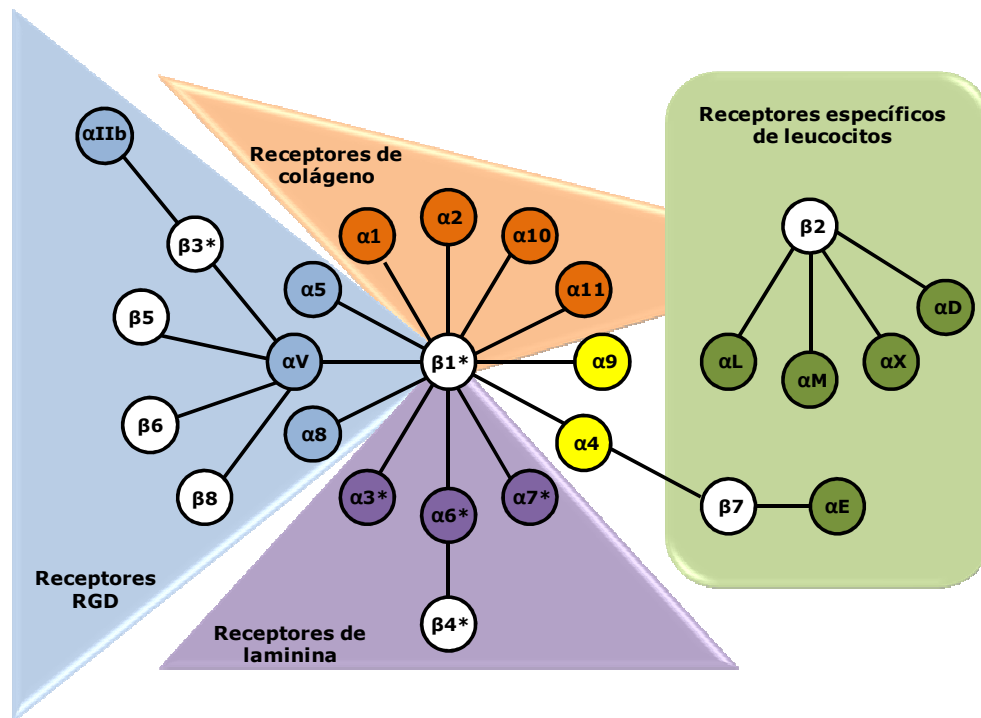
El desarrollo de la red vascular de la placenta, a partir de los procesos de vasculogénesis y angiogénesis, está sumamente controlado a lo largo de toda la gestación mediante la secreción de numerosos factores producidos por células del entorno placentario (células trofoblásticas, células de Hofbauer, pericitos, células endoteliales). Los factores más destacados son: el VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la angiopoyetina (Reynolds L.P. y Redmer D.A., 2001). El VEGF es expresado en los trofoblastos invasivos y los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas, así como en células de la decidua materna. Las células de Hofbauer (macrófagos), presentes en las vellosidades coriónicas desde etapas tempranas, secretan VEGF, lo que sugiere su participación en la vasculogénesis (Demir R. y col., 2004). De esta manera, el VEGF contribuye a un embarazo exitoso al aumentar la permeabilidad vascular y estimular la formación de la densa red de vasos presentes en la

placenta (Morrish D.W. y col., 2007). Más aún, los blastocistos ya expresan VEGF, lo que indica que los embriones, desde etapas muy tempranas del embarazo, pueden promover la angiogénesis en el sitio de implantación a través de receptores endometriales (Krüssel J.A. y col., 2003; Staun-Ram E. y Shalev E., 2005).

### **1.4.2.3. Integrinas**

Las integrinas son moléculas que participan en la adhesión celular (van der Flier A. y Sonnenberg A., 2001). En células eucarióticas, estas proteínas integrales de membrana son consideradas los principales receptores de unión a la MEC, ya que se unen a la mayoría de sus componentes (como colágeno, Fn, LM). Asimismo, las integrinas también interactúan con algunos receptores de la superfamilia de Ig, como ICAM-1 y V-CAM (de las siglas en inglés "*InterCellular Adhesion Molecule 1*" y "*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*", respectivamente) (Alberts B. y col., 2002; Hynes R.O., 2002). Es interesante resaltar que estas moléculas participan en los procesos de migración e invasión celular, no sólo porque físicamente unen a las células con la MEC, sino porque también desencadenan la señalización que regula estas respuestas celulares (Hood J.D. y Cheresch D.A., 2002).

Las integrinas son moléculas heterodiméricas compuestas por dos glicoproteínas transmembrana (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas no covalentemente (Alberts B. y col., 2002). En humanos, la familia de las integrinas está formada por 24 miembros que son el resultado de las distintas combinaciones entre las subunidades  $\alpha$  (1-18) y  $\beta$  (1-8) (Figura 1.19).

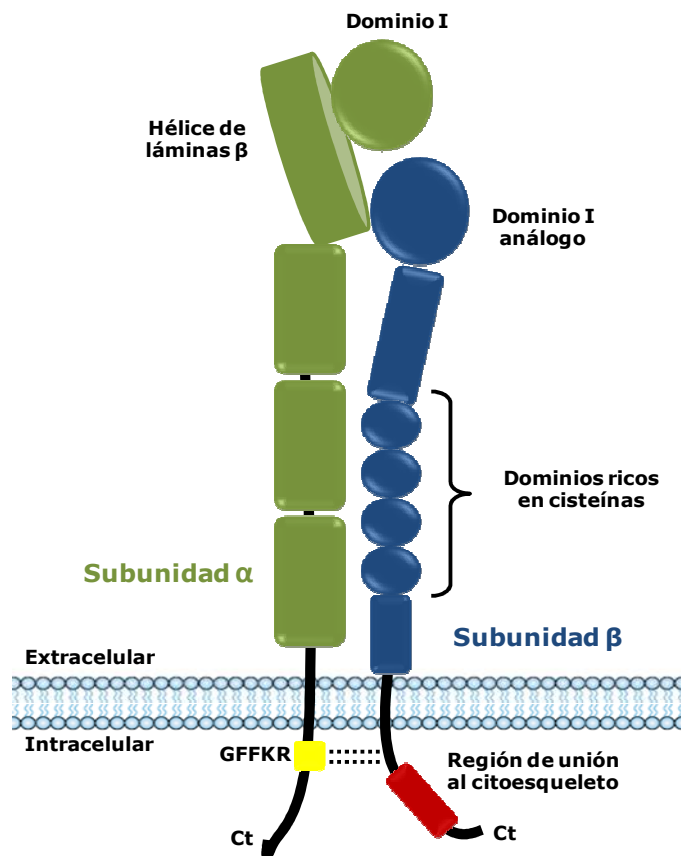


**Figura 1.19. La familia de las integrinas.** En mamíferos, existen 88 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$  para formar, al menos, 24 integrinas. Algunas integrinas están restringidas a cordados ( $\alpha 4$  y  $\alpha 9$ , en amarillo) y a leucocitos ( $\beta 2$  y  $\beta 7$ ). Otras son específicas, como las que forman los receptores de LM (violeta), de colágeno (naranja) o que reconocen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD; celeste). Además, debido al "splicing" alternativo (asterisco) puede haber más diversidad aún. Figura adaptada de Hynes R.O., 2002.

El "splicing" alternativo de algunas de estas subunidades y las modificaciones postraduccionales incrementan aún más la diversidad de los miembros de esta familia (van der Flier A. y Sonnenberg A., 2001; Hynes R.O., 2002). Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  no muestran homología entre sí, sin embargo, subunidades  $\alpha$  diferentes presentan similitudes entre ellas, así como distintas subunidades  $\beta$  poseen regiones conservadas (Barczyk M. y col., 2010).

Las porciones extracelulares de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (con alrededor de 700 y 1000 aminoácidos, respectivamente) forman un tallo elongado con una cabeza globular donde se encuentra la región de unión al ligando (Figura 1.20) (Danen E.H.J., 2000). En la subunidad  $\alpha$ , esta región está formada por una estructura de hélice de láminas  $\beta$  (" $\beta$ -propeller"). Aproximadamente la mitad de las integrinas con subunidades  $\alpha$  poseen dentro de esta estructura una inserción denominada dominio I; mientras que en el caso de las subunidades

$\beta$ , todas poseen un análogo del dominio I en la región globular de unión al ligando. Estos dominios I contienen un sitio de adhesión dependiente de iones metálicos. Durante la unión de la integrina al ligando se afecta la coordinación del ión metálico y el dominio I pasa de una conformación cerrada a abierta, que no sólo incrementa la unión al ligando sino la fuerza de la adhesión. Por otro lado, las porciones citoplasmáticas poseen, en su mayoría, menos de 75 aminoácidos. Existe una gran homología entre las regiones citoplasmáticas de las subunidades  $\beta$ ; no así entre las subunidades  $\alpha$ , que sólo conservan el motivo GFFKR, necesario para la unión a la subunidad  $\beta$  (Danen E.H.J., 2000; Kinashi T., 2005).



**Figura 1.20. Estructura de las integrinas.** Las integrinas son glicoproteínas transmembranas formadas por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . El ligando se une a los dominios I que poseen un sitio de adhesión dependiente de iones metálicos. Las cortas porciones citoplasmáticas contienen regiones de unión a las otras subunidades (secuencia GFFKR para las subunidades  $\alpha$ ) y/o al citoesqueleto (subunidades  $\beta$ ). Figura adaptada de Kinashi T., 2005.

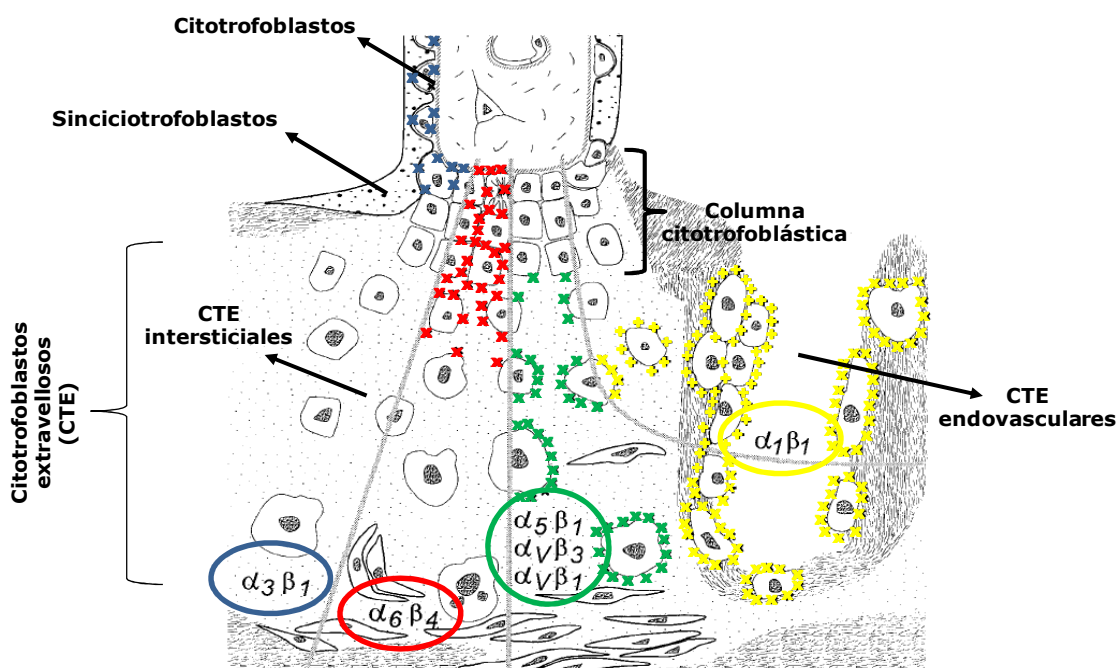
En mamíferos, algunas integrinas están limitadas a ciertos tipos celulares o tejidos, por ejemplo,  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 a las plaquetas;  $\alpha$ 6 **$\beta$** 4 a los queratinocitos;  $\alpha$ E **$\beta$** 7 a linfocitos T, células dendríticas y mastocitos de la mucosa;  $\alpha$ 4 **$\beta$** 1 a los leucocitos;  $\alpha$ 4 **$\beta$** 7 a una subpoblación de células T de la memoria; y las integrinas con subunidad  $\beta$ 2 a los leucocitos. Otras integrinas están ampliamente distribuidas, como la  $\alpha$ V **$\beta$** 3 que se expresa en endotelio (Takada Y. y col., 2007). En cuanto a la especificidad de ligando, las integrinas pueden ser agrupadas en integrinas de unión a LM, de unión a colágeno, de leucocitos y aquellas que reconocen las secuencias Arg-Glu-Asp (RGD) (Figura 1.19). Asimismo, cada integrina en particular posee sustratos únicos, como se enumeran en la Tabla 1.4 (Takada Y. y col., 2007).

**Tabla 1.4.**  
**Ligandos específicos para las integrinas humanas**

<b>Integrina</b>	<b>Ligando</b>
$\alpha$ 1 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina, colágeno
$\alpha$ 2 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina, colágeno, trombospondina, cadherina-E, tenascina
$\alpha$ 3 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina, trombospondina, uPAR
$\alpha$ 4 <b><math>\beta</math></b> 1	Trombospondina, MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina, osteopontina, ADAM, ICAM-4
$\alpha$ 5 <b><math>\beta</math></b> 1	Fibronectina, osteopontina, fibrilina, trombospondina, ADAM, COMP, L1
$\alpha$ 6 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina, trombospondina, ADAM, Cyr61
$\alpha$ 7 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina
$\alpha$ 8 <b><math>\beta</math></b> 1	Tenascina, fibronectina, osteopontina, vitronectina, LAP-TGF- $\beta$ , nefronectina
$\alpha$ 9 <b><math>\beta</math></b> 1	Tenascina, VCAM-1, osteopontina, uPAR, plasmina, angiostatina, ADAM, VEGF-C, VEGF-D
$\alpha$ 10 <b><math>\beta</math></b> 1	Laminina, colágeno
$\alpha$ 11 <b><math>\beta</math></b> 1	Colágeno
$\alpha$ V <b><math>\beta</math></b> 1	LAP-TGF- $\beta$ , fibronectina, osteopontina, L1
$\alpha$ L <b><math>\beta</math></b> 2	ICAM, ICAM-4
$\alpha$ M <b><math>\beta</math></b> 2	ICAM, iC3b, factor X, fibrinógeno, ICAM-4, heparina
$\alpha$ X <b><math>\beta</math></b> 2	ICAM, iC3b, fibrinógeno, ICAM-4, heparina, colágeno
$\alpha$ D <b><math>\beta</math></b> 2	ICAM, VCAM-1, fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, Cyr61, plasminógeno
$\alpha$ I <b>Ib</b> $\beta$ 3	Fibrinógeno, trombospondina, fibronectina, vitronectina, FvW, Cyr61, ICAM-4, L1, CD40
$\alpha$ V <b><math>\beta</math></b> 3	Fibrinógeno, vitronectina, FvW, trombospondina, fibrilina, tenascina, PECAM-1, fibronectina, osteopontina, Cyr61, ICAM-4,
$\alpha$ 6 <b><math>\beta</math></b> 4	Laminina
$\alpha$ V <b><math>\beta</math></b> 5	Osteopontina, vitronectina
$\alpha$ V <b><math>\beta</math></b> 6	Fibronectina, osteopontina, ADAM
$\alpha$ 4 <b><math>\beta</math></b> 7	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectina, osteopontina
$\alpha$ E <b><math>\beta</math></b> 7	E-cadherina
$\alpha$ V <b><math>\beta</math></b> 8	LAP-TGF- $\beta$



En la interfase materno-fetal, la diferenciación trofoblástica hacia un fenotipo invasivo es acompañada por un cambio en el perfil de integrinas (Figura 1.21) (Damsky C.H. y col., 1994; Kaufmann P. y Castellucci M., 1997). Los citotrofbastos que se encuentran dentro de la vellosidad coriónica sólo expresan la integrina  $\alpha 3 \beta 1$ , un receptor de LM; mientras que aquellos que se disponen cerca de la membrana basal, donde se ancla la vellosidad coriónica a la pared uterina, presentan altos niveles de la integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , también un receptor de LM. La formación de la columna trofoblástica es el primer paso de la diferenciación de estas células hacia un fenotipo invasivo y los trofbastos con estas características presentan un aumento en la expresión de las integrinas  $\alpha 5 \beta 1$  (principal receptor de Fn),  $\alpha V \beta 3$  (receptor de vitronectina) y  $\alpha V \beta 1$  (receptor de Fn y vitronectina). Cuando los trofbastos dejan la columna y se convierten en invasivos, además de estos receptores de adhesión, expresan la integrina  $\alpha 1 \beta 1$ , un receptor para colágeno y LM. En esta instancia, los niveles de expresión de la integrina  $\alpha 6 \beta 4$  son muy bajos (Damsky C.H. y



**Figura 1.21. Expresión de integrinas en la invasión trofoblástica.** Las distintas poblaciones de trofbastos expresan un perfil diferente de integrinas. Así, mientras que la integrina  $\alpha 3 \beta 1$  está restringida a los citotrofbastos vellosos, la integrina  $\alpha 6 \beta 4$  se expresa en los citotrofbastos ubicados en la columna trofoblástica. A medida que los citotrofbastos extravelosos invaden la decidua materna, se produce un cambio en el perfil de las integrinas: hay pérdida de la integrina  $\alpha 6 \beta 4$  y ganancia de  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha V \beta 3$  y  $\alpha V \beta 1$ , y finalmente de  $\alpha 1 \beta 1$  en los estadios más invasivos. Figura adaptada de Kaufmann P. y Castellucci M., 1997.

col., 1994; Kaufmann P. y Castellucci M., 1997).

### **1.5. Migración celular**

La migración celular es un proceso altamente coordinado que comprende múltiples pasos que llevan finalmente a la translocación, mediada por el citoesqueleto de actina, de las células sobre o a través de un sustrato (Cain R.J. y Ridley A.J., 2009; Friedl P. y Wolf K., 2009). Este proceso es fundamental tanto en situaciones fisiológicas, como la morfogénesis embrionaria, la vigilancia inmunológica, la homeostasis tisular, la angiogénesis, la cicatrización de heridas; como en procesos patológicos, tales como la aterosclerosis, algunas enfermedades inflamatorias crónicas y el cáncer (Cain R.J. y Ridley A.J., 2009). En este sentido, aquellos tumores cuyas células migran y producen metástasis son considerados los más agresivos (Bozzuto G. y col., 2010).

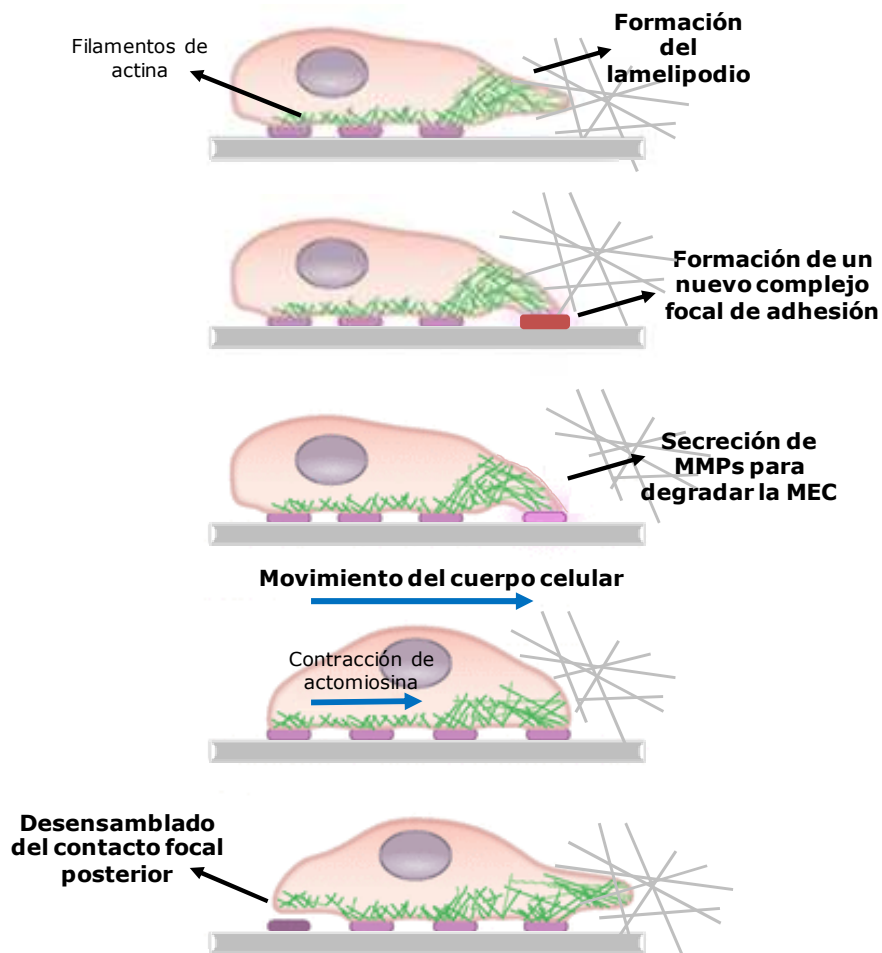
La mayoría de las células de mamíferos migran en tejidos tridimensionales, como el tejido conectivo o el tejido neuronal, y la manera en que lo hacen es específica de cada tipo celular, ya que puede variar tanto la morfología, la cinética y/o las fuerzas involucradas en las interacciones célula-célula o célula-matriz (Friedl P. y Wolf K., 2009). La migración de células a través de una MEC tridimensional es un proceso de múltiples pasos que incluye cambios en el citoesqueleto y en las interacciones célula-célula y célula-matriz. En general, se puede resumir en cinco pasos (Figura 1.22) (Parri M. y Chiarugi P., 2010). El primer paso comprende la formación del lamelipodio en el borde de avance ("*leading edge*") mediante la polimerización de filamentos de actina. En este proceso participan las proteínas relacionadas con la actina 2/3 (Arp 2/3, de las siglas en inglés "*Actin-Related Proteins 2/3*") y la proteína Rac, principal mediador de la migración inducida por factores de crecimiento, citoquinas y componentes de la MEC. En un segundo paso, se ensamblan los nuevos complejos focales de adhesión, localizados en la región del lamelipodio. Cuando el lamelipodio entra en contacto con la MEC, las integrinas se reorganizan en la membrana para interactuar con la quinasa de adhesión focal

(FAK, de las siglas en inglés "*Focal Adhesion Kinase*"), la  $\alpha$ -actinina y la talina. Estas proteínas, a su vez, se unen a proteínas adaptadoras, a través de dominios SH2 y SH3, y dominios ricos en prolina, para reclutar proteínas de unión a actina, como vinculina, paxilina y  $\alpha$ -actinina, y proteínas reguladoras (PI3K). También Rac está involucrada en la formación de estos complejos. Luego, en un tercer paso, se secretan MMPs para degradar los componentes de la MEC en los contactos focales y permitir el avance de la célula a través de la matriz. En un cuarto paso ocurre la contracción del cuerpo celular mediado por la contractilidad de la actomiosina (complejo formado por filamentos de actina y miosina II). En este caso, la proteína G Rho a través de su efector ROCK (de las siglas en inglés "*Rho-associated serine/threonine Kinase*") afecta la fosforilación de la cadena liviana de la miosina, regulando así la contractilidad celular. Por último, en un quinto paso, se rompen las uniones en el borde posterior o de retracción ("*trailing edge*"). Los mecanismos involucrados en el desensamblado de estos complejos dependen del tipo celular y de la fuerza de adhesión a la MEC (Parri M. y Chiarugi P., 2010).

La migración celular es afectada por diversos factores extracelulares. Así, por ejemplo, la presencia de gradientes bioquímicos (citoquinas, factores de crecimiento), la superficie de anclaje (sustrato), la interacción con células vecinas o ciertos factores físicos relacionados con las fuerzas externas, la topografía o la elasticidad de la MEC pueden dar inicio a este proceso (Parri M. y Chiarugi P., 2010; Ladoux B. y Nicolas A., 2012).

Durante el proceso de implantación, los trofoblastos extravelosos migran e invaden el útero materno hasta un tercio del miometrio y remodelan parte de la vasculatura. Este proceso está estrictamente regulado por numerosos factores que se expresan en la interfase materno-fetal, como factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas, componentes de la MEC, moléculas de adhesión, que actúan de manera autocrina y paracrina (Chakraborty C. y col., 2002; Knöfler M. y Pollheimer J., 2013). Los trofoblastos invasivos, particularmente, producen proteasas (MMPs, uPA y catepsinas) que permiten degradar la MEC de la decidua materna e invadir el tejido. Además, junto con

células de la decidua, secretan inhibidores de estas proteasas con el fin de limitar la invasión (Knöfler M. y Pollheimer J., 2013).



**Figura 1.22. Esquema de la migración celular.** La migración celular se puede resumir en cinco pasos: i) formación del lamelipodio en el borde de avance mediante la polimerización de filamentos de actina, ii) ensamblado de los nuevos complejos focales de adhesión, localizados en la región del lamelipodio, iii) secreción de MMPs para degradar los componentes de la matriz extracelular, iv) Contracción del cuerpo celular mediado por la contractilidad de la actomiosina, y v) desensamblado del contacto focal en el borde posterior o de retracción. MEC: matriz extracelular, MMPs: metaloproteinasas.

# ***Objetivos***

La implantación embrionaria y el posterior desarrollo placentario involucran una sincronización compleja de diversos eventos moleculares y celulares que participan en la regulación de la comunicación entre el útero materno y el embrión (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Numerosas hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, factores inmunológicos y enzimas presentes en la interfase materno-fetal regulan finamente estos eventos (Norwitz E.R. y col., 2001; Staun-Ram E. y Shalev E., 2005; Huang H.Y., 2006). La identificación de los mecanismos de acción de las moléculas que intervienen en las etapas tempranas del embarazo es sumamente relevante para comprender las bases bioquímicas de muchas de las patologías gestacionales y, de esta manera, ofrecer un tratamiento clínico efectivo. Como se ha mencionado previamente, el G-CSF es una citoquina hematopoyética que se expresa en tejidos placentarios durante toda la gestación (Shorter S.C. y col., 1992; McCracken S.A. y col., 1996 y 1999). Si bien ha sido reportado que esta citoquina es efectiva en el tratamiento de mujeres embarazadas con antecedentes de abortos recurrentes idiopáticos (Scarpellini F. y Sbracia M., 2009), el rol biológico del G-CSF en la placenta es aún desconocido.

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo es que el G-CSF contribuye, de manera conjunta con otros factores de la interfase materno-fetal, a promover la implantación embrionaria y el desarrollo placentario. Es por esta razón, que el objetivo general de esta Tesis consiste en: i) investigar las acciones biológicas desencadenadas luego de la interacción G-CSF:G-CSFR en células trofoblásticas humanas, ii) dilucidar las vías de transducción de señales que estarían mediando esas funciones.

Con el fin de esclarecer el rol funcional que ejerce el G-CSF en la placenta, se utilizará una línea de células trofoblásticas derivadas de una placenta humana de 7 semanas (Swan 71). Luego de verificar la expresión del G-CSFR en esta línea celular, se investigará si el G-CSF se comporta como una citoquina que regula la proliferación o la supervivencia (efecto protector ante un estímulo citotóxico) y/o si cumple una función biológica relacionada con: i) la inducción de la actividad y la expresión de metaloproteinasas (enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular), ii) cambios en la

secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (molécula clave en la angiogénesis placentaria y la migración trofoblástica), iii) alteraciones en la expresión de moléculas de adhesión, como las integrinas (receptores característicos de un fenotipo trofoblástico invasivo), iv) modificación en la organización del citoesqueleto de actina (paso inicial para la adquisición de un fenotipo migratorio), v) promoción de la migración celular.

Asimismo, se estudiarán las cascadas de transducción de señales activadas por el G-CSF en las células trofoblásticas. Con el fin de dilucidar el rol desempeñado por cada vía en la expresión de la(s) respuesta(s) estimulada(s) por el G-CSF, se utilizarán inhibidores farmacológicos específicos y/o mutantes dominantes negativas de las quinasas involucradas en la señalización.

***Capítulo 2***  
***Materiales y Métodos***



## 2.1. Materiales

### 2.1.1. Reactivos

La aprotinina, el Bay 11-7082, el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), el Coomassie Blue R, el Hepes, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), la gelatina tipo B, el glicerol, la L-glutamina, el inhibidor de tripsina, la leupeptina, el MG-132, el ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), el p-formaldehído, la seroalbúmina bovina (BSA) y el Triton X-100 fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA). El Ly 294002, la pepstatina A y el SB 203580 fueron comprados en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA). El PD 98059 fue de Promega (Madison, Wisconsin, USA). El cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) fue de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

El cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ), el dodecil sulfato de sodio (SDS), el tris [hidroximetil]aminometano (Tris) y el Tween-20 fueron obtenidos de Biopack (Zárate, Buenos Aires, Argentina). El 2-mercaptoetanol fue adquirido en Merck Argentina.

La acrilamida, la bisacrilamida y el ditioneitol (DTT) son de Amersham Biosciences (USA). Las membranas de nitrocelulosa (HyBond ECL) y de difluoruro de polivinilideno (PVDF) fueron adquiridas en GE Healthcare, Amersham Biosciences (USA).

El ácido etildiaminotetraacético (EDTA), el cloruro de potasio (KCl), el cloruro de sodio (NaCl) y el piruvato de sodio fueron conseguidos en Anedra (San Fernando, Buenos Aires, Argentina). El fluoruro de sodio (NaF) y el pirofosfato de sodio ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) fueron adquiridos en Riedel-de Haën AG. El ácido clorhídrico (HCl) fue de Cicarelli (San Lorenzo, Santa Fe, Argentina) y el Nonidet P-40 fue de Fluka AG. El medio D-MEM/F-12 y la mezcla de antibióticos penicilina/streptomycin fueron de Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA). El suero fetal bovino (SFB) fue de Natocor (Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina). Todos los demás reactivos fueron de pureza analítica.

### **2.1.2. Citoquinas**

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), proteína recombinante de origen humano, fue provisto por Bio Sidus S.A. (Buenos Aires, Argentina).

### **2.1.3. Línea celular**

La línea celular Swan 71, trofoblastos humanos de primer trimestre inmortalizados con un sistema retroviral que expresa la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT), fue gentilmente donada por el Dr. Gil Mor, (Straszewski-Chavez S.L. y col., 2009). Las células fueron cultivadas en botellas de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó como medio de crecimiento: D-MEM/F12 (Gibco, Invitrogen Corporation) suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml y SFB 10% (v/v).

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Ensayos de proliferación**

Las células Swan 71 (1.500 células/pocillo) sembradas en una placa de 96 pocillos en medio de crecimiento con o sin SFB 10% (v/v), fueron incubadas en presencia o ausencia de distintas concentraciones de G-CSF (10-1.000 ng/ml). Luego de 72 horas a 37°C se evaluó el número de células viables mediante el ensayo de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) (Cory A.H. y col., 1991).

Para evaluar el posible efecto protector del G-CSF ante un agente citotóxico, las células Swan 71 (1.500 células/pocillo) sembradas en una placa de 96 pocillos en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v) fueron lavadas dos veces con buffer fosfato de sodio 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4 (PBS) e incubadas con distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),

utilizado como agente citotóxico, durante 4 horas a 37°C. El número de células viables fue evaluado por el método de MTS. Posteriormente, se repitió el ensayo en presencia de G-CSF con la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que produjo un 50% de disminución de la viabilidad celular. Para esto, las células fueron primero incubadas a 37°C durante toda la noche, con medio de crecimiento sin SFB que contenía o no distintas concentraciones de G-CSF (250-2.000 ng/ml). Luego, las células fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM durante 4 horas a 37°C.

Para determinar la citotoxicidad de los inhibidores de las vías de señalización, las células Swan 71 fueron incubadas 24 horas a 37°C con distintas concentraciones de cada inhibidor farmacológico en medio de crecimiento sin SFB (PD 98059, SB 203580, Ly 294002, Bay 11-7082 y MG-132) en presencia o ausencia de 100 ng/ml de G-CSF.

## **2.2.2. Inmunocitoquímica**

### **2.2.2.1. Detección del receptor para G-CSF**

Las células Swan 71 (20.000 células) sembradas sobre cubreobjetos de vidrio fueron lavadas con PBS a 37°C y fijadas con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS. Luego de tres lavados de 5 minutos con PBS, las células fueron incubadas con BSA 1% (p/v) en PBS, durante dos horas a temperatura ambiente, para bloquear los sitios de unión inespecífica. Se retiró la solución de BSA y las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor de G-CSF (R&D Systems, Inc.) diluido en PBS, BSA 1% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Las células fueron lavadas tres veces con PBS, e incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC; Becton Dickinson) diluido en PBS, BSA 1% (p/v) durante dos horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS, cubiertas con la solución de montaje 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO, Sigma), y los cubreobjetos fueron sellados sobre un portaobjetos. La epifluorescencia se visualizó con un microscopio (Olympus BX50) acoplado a una cámara digital. A la solución de montaje se le agregó

bisbencimida 2 µg/ml (Höescht 33258; Sigma) para teñir los núcleos. Ensayos en paralelo fueron realizados con una solución de inmunoglobulina G (IgG) normal de ratón, utilizada como control negativo.

#### **2.2.2.2. Detección de MT1-MMP**

Las células Swan 71 (75.000 células) sembradas en cubreobjetos de vidrio fueron incubadas en medio de crecimiento sin SFB en presencia o ausencia de una concentración 100 ng/ml de G-CSF durante 24 horas a 37°C, bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas 15 minutos con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS e incubadas una hora con un anticuerpo anti-MT1-MMP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v) conteniendo saponina 0,1% (p/v). Luego de tres lavados con PBS, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con la cianina Cy3 (Jackson ImmunoResearch) durante 45 minutos en la oscuridad. Los núcleos fueron teñidos con una solución de 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI; Sigma) en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v) y saponina 0,1% (p/v) durante 5 minutos en la oscuridad. Finalmente, se realizaron lavados y los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje AquaPolyMount (Polysciences Inc.). Se tomaron imágenes aleatorias en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200M.

#### **2.2.2.3. Visualización del citoesqueleto de actina**

Las células Swan 71 (75.000 células) sembradas en cubreobjetos de vidrio fueron incubadas durante la noche con medio de crecimiento con SFB 0,1% (v/v). Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS e incubadas en medio de crecimiento sin SFB en presencia o ausencia de G-CSF 100 ng/ml durante 0, 30 minutos o 9 horas a 37°C, bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego del tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, fijadas 15 minutos con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS e incubadas con una dilución 1/100 de rodamina-faloidina (Molecular Probes) en medio de crecimiento con

SFB 10% (v/v) conteniendo saponina 0,1% (p/v). Los núcleos fueron teñidos con una solución de DAPI (Sigma) en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v) y saponina 0,1% (p/v) durante 5 minutos en la oscuridad. Finalmente, se realizaron lavados y los cubreobjetos fueron montados con líquido de montaje AquaPolyMount (Polysciences Inc.). Se tomaron imágenes aleatorias en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200M.

#### **2.2.2.4. Detección de la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo**

Las células Swan 71, (20.000 células) sembradas sobre cubreobjetos de vidrio y mantenidas con medio de crecimiento sin SFB 24 horas, fueron tratadas o no con G-CSF 100 ng/ml durante 0, 15, 30 y 60 minutos. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas durante 5 minutos con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS y lavadas tres veces con Triton X-100 0,2% (v/v) en PBS (PBS-TX). Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con BSA 1% (p/v) en PBS-TX durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez retirada la solución de bloqueo, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido en PBS-TX, BSA 1% (p/v) durante toda la noche a 4°C. Luego de tres lavados con PBS-TX, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con la cianina Cy3 (Jackson ImmunoResearch) a temperatura ambiente durante dos horas en la oscuridad. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados con PBS-TX y sellados sobre portaobjetos en presencia del líquido de montaje. Se tomaron imágenes aleatorias en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX50) acoplado a una cámara digital. En el líquido de montaje se agregó Hoescht 33258 para teñir los núcleos.

En algunos ensayos, previo al agregado de la citoquina, las células fueron preincubadas durante una hora con inhibidores farmacológicos: PD 98059 (1  $\mu$ M), Ly 294002 (1  $\mu$ M), Bay 11-7082 (0,5  $\mu$ M).

### **2.2.3. Efecto del G-CSF sobre la expresión de mediadores involucrados en la invasión trofoblástica**

#### **2.2.3.1. Determinación de la expresión de MMP-2, VEGF**

Las células Swan 71 ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) fueron sembradas en una placa de 6 pocillos. Luego de 24 horas en cultivo (50-60% de confluencia), las células fueron lavadas dos veces con PBS e incubadas en medio de crecimiento sin SFB conteniendo o no distintas concentraciones de G-CSF (10, 50, 100 ng/ml) durante 24 o 48 horas. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados, concentrados en tubos Amicon Ultra Centrifugal Filters (corte 10 kDa, Millipore) y congelados para su posterior uso. Además, se recogieron los sobrenadantes de cultivo luego de exponer las células a una concentración de 100 ng/ml de G-CSF durante 8 y 16 horas de incubación.

En algunos ensayos, previo al agregado de la citoquina, las células fueron preincubadas durante una hora con inhibidores farmacológicos: PD 98059 (1  $\mu$ M), Ly 294002 (1  $\mu$ M), Bay 11-7082 (0,5  $\mu$ M).

##### **2.2.3.1.1. Zimografía**

La presencia de metaloproteinasas gelatinolíticas (MMP-2 y MMP-9) en sobrenadantes de cultivo fue detectada mediante la técnica de zimografía (Kleiner D.E. y Stetler-Stevenson W.G., 1994). Los sobrenadantes concentrados (10  $\mu$ l), obtenidos según se indicó en la Sección 2.2.3.1, fueron mezclados con buffer de siembra 2X sin 2-mercaptoetanol (1:1) y luego sembrados en geles de poliacrilamida al 10% con gelatina tipo B (1 mg/ml). Luego de la electroforesis a 150 V, los geles fueron lavados 2 veces con Triton X-100 2,5% (v/v) en TBS durante una hora, para remover el SDS, seguido de un lavado de 15 minutos con TBS y finalmente, fueron incubados en buffer de reacción (NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ M, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5) durante 22 horas a 37°C. Posteriormente, los geles fueron teñidos durante 30 minutos con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (p/v) en

metanol:ácido acético:agua (4:1:5), y fueron decolorados en el mismo diluyente. La actividad gelatinolítica fue detectada como bandas claras sobre un fondo azul uniforme. Los geles fueron escaneados y la intensidad de las bandas fue cuantificada con el programa Gel Pro Analyzer.

#### **2.2.3.1.2. Ensayo de ELISA para VEGF**

Para evaluar la concentración de VEGF proveniente de los sobrenadantes de cultivo obtenidos según se indica la Sección 2.2.3.1, se siguieron las instrucciones del kit de ELISA para VEGF humano (Invitrogen). Brevemente, durante la primera incubación de 2 horas, el antígeno presente en las muestras (VEGF) se une a un anticuerpo de captura inmovilizado en la superficie del pocillo. Luego de los lavados, se incuba durante 1 hora con un anticuerpo monoclonal biotinilado contra VEGF humano, que se unirá al VEGF previamente capturado. Tras la remoción del exceso de anticuerpo, se agrega estreptavidina-peroxidasa. Posterior a la tercera incubación de 30 minutos, se realizan lavados para remover la enzima libre y se adiciona un sustrato cromogénico de la peroxidasa. La intensidad de color (absorbancia en 450 nm) que se obtiene es directamente proporcional a la cantidad de VEGF humano.

#### **2.2.3.2. Evaluación de la expresión de integrinas por citometría de flujo**

Células Swan 71 sembradas en placas de Petri en estado de subconfluencia y deprivadas de SFB durante 24 horas, fueron tratadas con G-CSF 100 ng/ml durante 0, 4, 8, 12 y 16 horas. Luego, las células fueron lavadas con PBS y disociadas de la superficie de la placa con tripsina. Después de inactivar la tripsina con medio de crecimiento con SFB 10% (v/v), se efectuaron tres lavados con PBS y las células fueron fijadas con p-formaldehído 1% (p/v) en PBS. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS, permeabilizadas con PBS-Tween 0,1% (v/v) durante 20 minutos e incubadas con un anticuerpo anti-integrina  $\beta 1$  (Abcam) durante 1 hora a 4°C. Tras la

remoción del anticuerpo primario mediante lavados con PBS-Tween 0,1% (v/v), las células fueron incubadas nuevamente con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con FITC, 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Luego, se realizaron lavados con PBS-Tween 0,1% (v/v) y las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas en un citómetro de flujo (BD Accuri™ C6).

#### **2.2.4. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas de las diferentes muestras provenientes de lisados celulares fue establecida por el método descrito por Bradford M.M. (1976). En particular, se empleó el reactivo de Bradford comercial (BioRad) y se siguieron las instrucciones de uso. La concentración de proteínas fue determinada por la medida de la absorbancia en 595 nm, utilizando BSA como patrón de calibración.

#### **2.2.5. Ensayos de transfección**

Para obtener células Swan 71 transfectadas transientemente se utilizó el reactivo de transfección comercial SuperFect (Qiagen) y se siguieron las instrucciones de uso. Los plásmidos utilizados fueron: i) pCEP4 ERK1 K71R y pCEP4 ERK2 K52R, donado gentilmente por el Dr. James C. Fleet del Department of Foods and Nutrition, Purdue University (West Lafayette, Indiana, USA) (Robbins D.J. y col., 1993), ii) pcDNA3 p38 $\alpha$  T180A/Y182F (#20352, Addgene), iii) pWZL-neo  $\delta$ p85 del478-513 (#10888, Addgene). Brevemente, se mezclaron 0,5  $\mu$ g de ADN, 30  $\mu$ l de medio DMEM-F12 sin SFB y sin antibióticos, y 2,5  $\mu$ l del reactivo de transfección SuperFect, (mezcla/pocillo). La mezcla fue resuspendida e incubada 5-10 minutos para permitir la formación de los complejos de transfección. Las células Swan 71 (80% de confluencia) sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos, fueron lavadas con PBS y posteriormente, incubadas con la mezcla de los complejos de transfección que fue previamente homogeneizada con 150  $\mu$ l de medio de crecimiento con SFB 10% (v/v). Luego de incubar 2-3 horas, las células fueron



lavadas con PBS y recuperadas con medio de crecimiento con SFB 10% (v/v). Finalmente, las células fueron deprivadas de SFB durante toda la noche para efectuar el ensayo de migración (Sección 2.2.7.2).

Para comprobar la efectividad de la transfección de las mutantes dominantes negativas mediante ensayos de Western blot (Sección 2.2.6.4), se transfectaron células Swan 71 (400.000 células) sembradas en placas de Petri de 6 cm con: 5 µg de ADN, 150 µl de medio DMEM-F12 sin SFB y sin antibióticos, y 30 µl del reactivo de transfección SuperFect. Luego, se procedió como se describió en el párrafo anterior usando 1 ml como volumen final/pocillo.

## **2.2.6. Ensayos de Western blot**

### **2.2.6.1. Detección del receptor de G-CSF**

Monocapas de células Swan 71 fueron resuspendidas mecánicamente, lavadas con PBS frío y lisadas durante 30 minutos en hielo con 10 µl de un buffer de lisis adecuado para recuperar proteínas de membrana (Triton X-100 1,5% (v/v), NaCl 50 mM, colato de sodio 0,5% (p/v), SDS 0,2% (p/v), Nonidet P-40 2% (v/v), leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 µg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5). Los lisados fueron centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm y los sobrenadantes fueron diluidos en buffer de siembra (Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), pH 6,8) y calentados a 100°C durante 3 minutos. Para la separación electroforética de proteínas, 100 µg de proteínas se sembraron en geles de poliacrilamida al 8%. Luego, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con BSA 3% (p/v) en Tris 10 mM, NaCl 130 mM, Tween-20 0,05% (v/v), pH 7,4 (TBS-T) durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Las membranas luego fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-receptor de G-CSF (R&D Systems, Inc.) diluido en TBS-T, BSA 1% (p/v) durante toda la noche a 4°C con

agitación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con la peroxidasa de rabanito (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluido en TBS-T, BSA 1% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Las proteínas inmunorreactivas fueron visualizadas con el sistema de detección ECL Plus Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc.), según las instrucciones del fabricante. Además, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-actina como control de carga.

#### **2.2.6.2. Niveles de expresión de MMP-2 y VEGF**

Los sobrenadantes concentrados obtenidos en 2.2.3.1 (80 µl) fueron secados en un equipo Speed Vac Savant (LANAIS-PRO), resuspendidos en 20 µl de buffer de siembra y desnaturalizados a 100°C durante 3 minutos. Las muestras fueron luego sometidas a un SDS-PAGE al 12% y las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con TBS-T, BSA 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-MMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) o anti-VEGF humano (Millipore) diluidos en TBS-T, BSA 1% (p/v) durante toda la noche a 4°C con agitación. Posteriormente, para detectar las proteínas inmunorreactivas se procedió como en 2.2.6.1 utilizando un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rabanito (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Particularmente en este caso, la carga proteica se evaluó mediante la tinción de las membranas de PVDF con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (Sigma) en metanol: ácido acético: agua (4:1:5) (Welinder C. y Ekblad L., 2011).

#### **2.2.6.3. Niveles de expresión de integrina $\beta$ 1**

Células Swan 71 sembradas en placas de Petri y en estado de subconfluencia, fueron incubadas en medio de crecimiento sin SFB durante toda la noche y posteriormente tratadas con G-CSF 100 ng/ml durante 0, 4 y 8

horas. Luego, las células fueron resuspendidas mecánicamente, lavadas con PBS frío y lisadas durante 30 minutos en hielo con 10 µl de buffer de lisis para proteínas de membrana (ver Sección 2.2.6.1). Los lisados fueron centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm y los sobrenadantes fueron diluidos en buffer de siembra y calentados a 100°C durante 3 minutos. Para la separación electroforética de proteínas, las muestras (60 µg de proteínas) fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 8%. Luego, se realizó la transferencia a membranas de PVDF. Posterior al bloqueo de los sitios de unión inespecífica, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-integrina β1 (BD Transduction Laboratories™), o bien con un anticuerpo anti-actina (Sigma) para determinar la carga proteica. Para la detección de las proteínas inmunorreactivas se procedió como se describe en la Sección 2.2.6.1.

#### **2.2.6.4. Activación de Akt, Erk1/2 y p38**

Monocapas de células Swan 71 fueron lavadas dos veces con PBS y mantenidas durante 24 horas en medio de crecimiento sin SFB. Para determinar la fosforilación de Akt, Erk1/2 y p38, las células fueron tratadas o no con G-CSF 100 ng/ml durante distintos tiempos. Tras retirar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas mecánicamente, lavadas con PBS frío y lisadas durante 30 minutos en hielo con 10 µl de buffer de lisis (Triton X-100 0,5% (v/v), leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, inhibidor de tripsina 1 µg/ml, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). Los lisados fueron centrifugados durante 10 minutos a 12.000 rpm y los sobrenadantes fueron diluidos en buffer de siembra y desnaturalizados a 100°C durante 3 minutos. Las muestras proteicas (40 µg de proteínas) fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 10% y posteriormente transferidas a membranas de PVDF. Luego de bloquear los sitios de unión inespecífica, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con agitación con los siguientes anticuerpos: anti-Akt fosforilada (Ser473) (Cell Signaling Technology, Inc.) o anti-Akt (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-Erk1/2 fosforilada

(Thr202/Tyr204) o anti-Erk1/2 (Cell Signaling Technology, Inc), anti-p38 fosforilada (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology) o anti-p38 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Posteriormente, para detectar las proteínas inmunorreactivas se procedió como se describe en 2.2.6.1.

En algunos ensayos, previo al agregado de la citoquina, las células fueron pre-incubadas durante una hora con un inhibidor farmacológico: PD 98059 (1  $\mu$ M) o Ly 294002 (1  $\mu$ M). También se evaluaron los niveles de fosforilación de las quinasas en células transfectadas con mutantes dominantes negativas (ver Sección 2.2.5).

#### **2.2.6.5. Niveles de expresión de I $\kappa$ B $\alpha$**

Se procedió de manera similar a la descrita en la Sección 2.2.6.4. Luego de SDS-PAGE al 10%, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posterior al bloqueo de los sitios de unión inespecífica, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (Cell Signaling Technology, Inc.), o bien con un anticuerpo anti-tubulina (Abcam) para determinar la carga proteica. Para la detección de las proteínas inmunorreactivas se procedió como se describe en la Sección 2.2.6.1.

En algunos ensayos, previo al agregado de la citoquina, las células fueron preincubadas durante una hora con inhibidores farmacológicos: PD 98059 (1  $\mu$ M), Ly 294002 (1  $\mu$ M), Bay 11-7082 (0,5  $\mu$ M).

#### **2.2.6.6. Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo**

Monocapas de células Swan 71 fueron lavadas dos veces con PBS y mantenidas durante 24 horas en medio de crecimiento sin SFB. Para determinar la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo, las células fueron tratadas o no con G-CSF 100 ng/ml durante 30 minutos. Tras retirar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas mecánicamente, lavadas con PBS frío y lisadas durante 10 minutos en hielo con 10  $\mu$ l de buffer de lisis A (KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Nonidet P-40 1% (v/v), DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10  $\mu$ g/ml,

leupeptina 10 µg/ml, pepstatina A 10 µg/ml, EDTA 0,2 mM, Hepes 10 mM, pH 7,9). Los lisados fueron centrifugados durante un minuto a 3.000xg y los sobrenadantes (extracto citoplasmático) fueron recolectados. Por otra parte, la fracción precipitada fue resuspendida en buffer de lisis B (NaCl 0,42 M, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, glicerol 0,25% (v/v), DTT 0,5 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml, EDTA 0,2 mM, Hepes 20 mM, pH 7,9) durante 30 minutos en hielo. Tras una centrifugación de 30 minutos a 14.000xg a 4°C, los sobrenadantes (extracto nuclear) fueron diluidos 1:2 con buffer de lisis C (KCl 0,05 M, glicerol 20% (v/v), DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, EDTA 0,2 mM, Hepes 20 mM, pH 7,9). Posteriormente, las muestras proteicas (40 µg de proteínas) fueron diluidas en buffer de siembra y calentadas a 100°C durante 3 minutos, sometidas a un SDS-PAGE al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL). Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con TBS-T, BSA 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti-NF-κB p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), o bien con una anticuerpo anti-actina (Sigma) como control de carga proteica. Posteriormente, para detectar las proteínas inmunorreactivas se procedió como se describe en 2.2.6.1.

## 2.2.7. Ensayos de migración

### 2.2.7.1. Migración en cámaras "transwell"

Luego de incubar las membranas de las cámaras "transwell" (poro de 8 µm, Corning Inc. Costar) con 10 µg/ml de fibronectina durante 2 horas, las células Swan 71 (50.000/inserto) fueron sembradas en medio de crecimiento con SFB 1% (v/v) en el inserto superior (Figura 2.1). Después de tres horas, las células fueron incubadas con medio de crecimiento con SFB 0,1% (v/v) durante la noche. Posteriormente, se agregó medio de crecimiento sin SFB en ambas cámaras y las células fueron incubadas durante 9 horas con una concentración 100 ng/ml de G-CSF agregado en la cámara inferior. Concluido

ese lapso de tiempo, los insertos fueron retirados, lavados con PBS y fijados con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS durante 12 minutos. Luego, los núcleos fueron teñidos con una solución de DAPI (Sigma) en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v) y saponina 0,1% (v/v) durante 5 minutos en la oscuridad. Se tomaron imágenes aleatorias de 10 campos en un microscopio de epifluorencia Zeiss Axiovert 200M equipado con una cámara digital. Finalmente, las células presentes en la cara superior de la membrana fueron removidas con un hisopo estéril, y se volvieron a tomar imágenes aleatorias de 10 campos de las células presentes en la cara inferior de la membrana (células migradas).

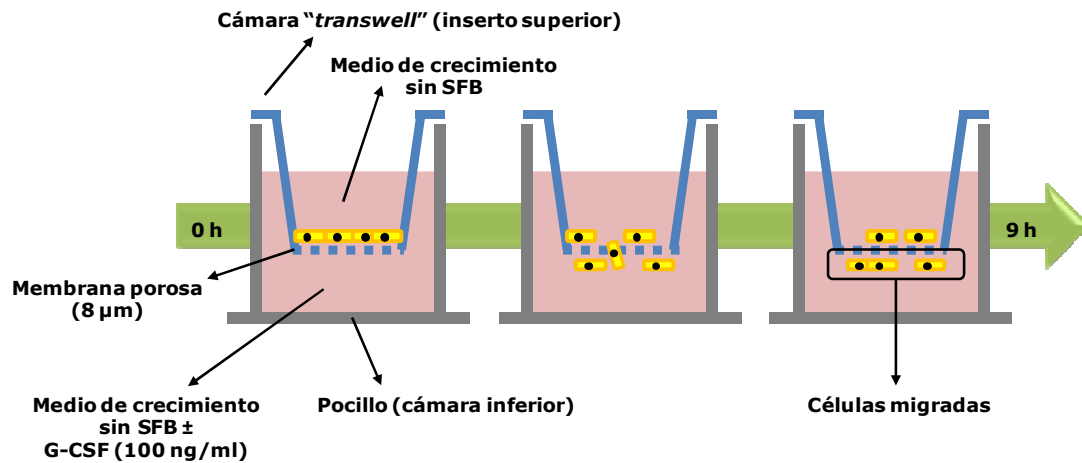


Figura 2.1. Esquema del ensayo de migración en cámaras "transwell".

### 2.2.7.2. Ensayo de la herida ("wound healing assay" o "scratch")

Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante toda la noche. Luego de realizar una herida con un tip p10 y remover el medio, las células fueron incubadas con medio de crecimiento sin SFB en presencia o ausencia de una concentración 100 ng/ml de G-CSF durante 16 horas. Se tomaron imágenes de las heridas a tiempos 0 y 16 horas con un microscopio Nikon Eclipse 300, acoplado a una cámara digital (Figura 2.2).

En algunos ensayos, previo al agregado de la citoquina, las células fueron pre-incubadas durante una hora con medio de crecimiento sin SFB en presencia o ausencia de inhibidores farmacológicos: PD 98059 (1  $\mu$ M), SB 203580 (2  $\mu$ M) y Ly 294002 (1  $\mu$ M). También se realizó el ensayo con células transfectadas con mutantes dominantes negativas (ver Sección 2.2.5).

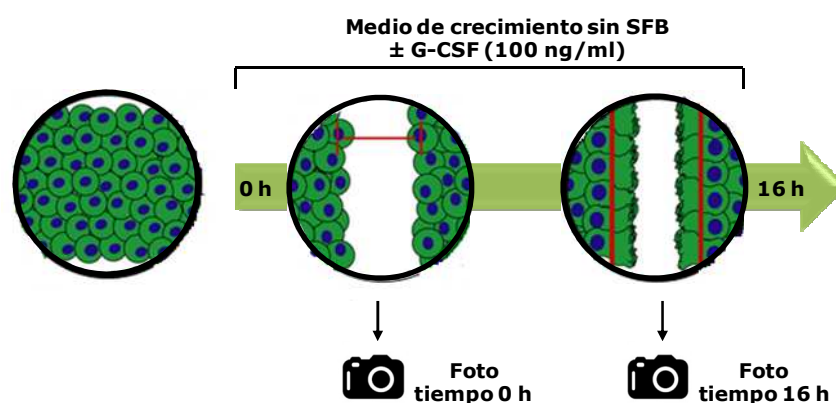


Figura 2.2. Esquema del ensayo de la herida.

### 2.2.8. Métodos estadísticos

Para establecer las comparaciones entre resultados experimentales, se empleó el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA). La significación estadística se calculó mediante el test  $t$  de Student. En aquellos casos donde se compararon más de dos grupos se utilizó el test de ANOVA de una vía, seguido por el test de Bonferroni. Asimismo, aquellos datos que no seguían una distribución normal fueron tratados con los tests no paramétricos de Wilcoxon o de Mann-Whitney, en el caso de más de dos grupos. Un  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

***Capítulo 3***  
***Acciones biológicas promovidas***  
***por el G-CSF***



### 3. Acciones biológicas promovidas por el G-CSF

#### 3.1. Detección del receptor para G-CSF

Las actividades biológicas del G-CSF están mediadas por su receptor específico (G-CSFR) ubicado en la superficie de las células. La presencia de este receptor en células del tejido placentario y, particularmente, en algunas líneas de células trofoblásticas fue previamente descrita por varios autores (Uzumaki H. y col., 1989; Shorter S.C. y col., 1992; McCracken S.A. y col., 1999; Marino V.J. y col., 2001; Marino V.J. y Roguin L.P., 2008).

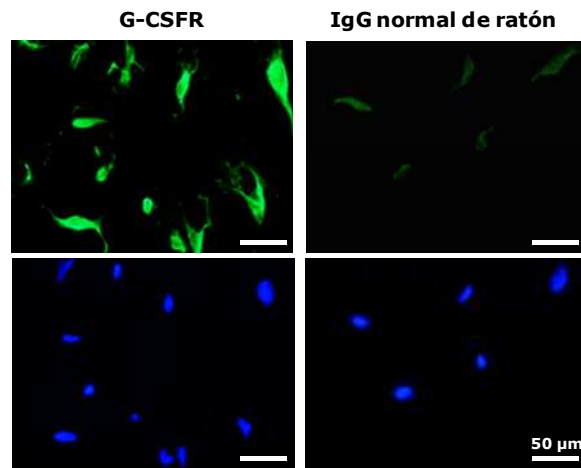
Con el fin de determinar si la línea celular de trofoblastos humanos Swan 71 expresa receptores para el G-CSF se realizaron inicialmente ensayos de inmunocitoquímica. Para ello, las células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio y, posterior a la fijación, fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal específico para G-CSFR o con una inmunoglobulina normal de ratón, utilizada como control de especificidad del anticuerpo secundario. La observación al microscopio de epifluorescencia mostró que las monocapas de células Swan 71 incubadas con el anticuerpo anti-receptor presentaban mayor marca fluorescente que las células tratadas con la inmunoglobulina normal de ratón (Figura 3.1A).

Para confirmar la presencia del G-CSFR en las células Swan 71, se realizaron también ensayos de Western blot (WB) con lisados celulares. En este caso, además de las células Swan 71, se evaluaron lisados provenientes de una línea de células de leucemia mieloide murina (NFS-60) y de una línea de células de ovario de insecto (Sf9). La línea NFS-60 se utilizó como control positivo, ya que estas células expresan niveles detectables del receptor para G-CSF en la membrana plasmática (Matsuda S. y col., 1989). En este sentido, es interesante señalar que la proliferación de esta línea celular depende de la presencia en el medio de cultivo de algunos factores de crecimiento, como el G-CSF o la IL-3. A su vez, la línea Sf9, derivada de un clon de células de ovario de *Spodoptera frugiperda*, usualmente utilizada como sistema de infección por baculovirus, se empleó como control negativo. Puesto que fue sugerido que

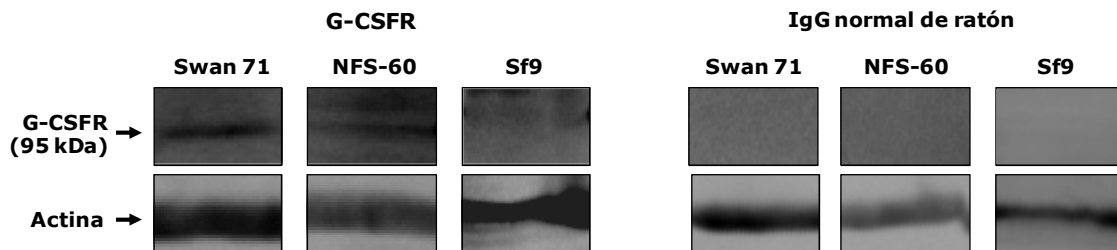
estas células no poseen tirosinas quinasas citosólicas (Smithgall T.E., 2002), es poco probable que expresen proteínas ortólogas del receptor de G-CSF.

Los resultados mostrados en la Figura 3.1B indican que tanto la línea celular Swan 71 como la línea NFS-60 (control positivo) expresan G-CSFR, ya que fue observada la presencia de una banda de 95 kDa, que concuerda con el peso molecular estimado para el receptor (85-135 kDa, dependiendo del grado de glicosilación). Por otro lado, el receptor para G-CSF no fue detectado en la línea Sf9 (control negativo).

**A**



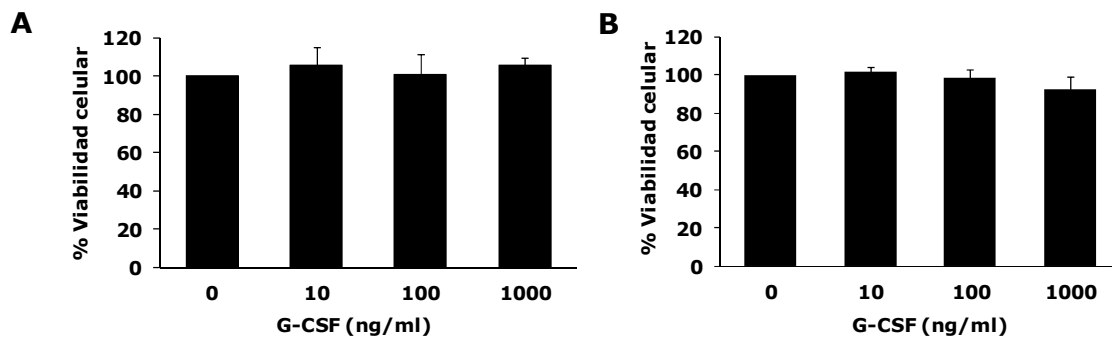
**B**



**Figura 3.1. Expresión del G-CSFR en células Swan 71.** **(A)** Monocapas de células Swan 71 fijadas con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS fueron incubadas primero con un anticuerpo de ratón anti-G-CSFR (o IgG normal de ratón como control negativo) y luego con una Ig de cabra anti-ratón conjugada con FITC. En la solución de montaje se agregó Hoescht 33285 (2 µg/ml) para teñir los núcleos. La presencia de receptores fue detectada por microscopía de epifluorescencia. **(B)** Se realizó un SDS-PAGE al 8% para separar 100 µg de proteína/calle provenientes de lisados celulares de las líneas Swan 71, NFS-60 y Sf9. Luego de transferir las proteínas a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con un anticuerpo anti-G-CSFR o Ig normal de ratón, y con un anticuerpo anti-actina, como control de carga.

### 3.2. Efecto del G-CSF sobre la proliferación y la sobrevivencia de células Swan 71

Diversos grupos de investigación han demostrado que el G-CSF induce una respuesta proliferativa en células NFS-60 (Hara K. y col., 1988; Matsuda S. y col., 1989; Marino V.J. y col., 2003). En este sentido, Marino V.J. y Roguin L.P. (2008) determinaron que el G-CSF incrementa el crecimiento de células NFS-60 de manera dosis dependiente hasta una concentración de 0,1 ng/ml. Para evaluar el efecto del G-CSF sobre la proliferación de la línea celular Swan 71, las células fueron incubadas con distintas concentraciones de esta citoquina en presencia de SFB 10% (v/v) durante 72 horas. Este ensayo también se realizó en ausencia de SFB, ya que el suero, como fuente de G-CSF y otros factores de crecimiento, podría encubrir el posible efecto de esta citoquina. Como se muestra en la Figura 3.2, no se evidenció ningún efecto proliferativo hasta una concentración 1 µg/ml de G-CSF en las condiciones ensayadas, es decir, en presencia (Figura 3.2A) o ausencia (Figura 3.2B) de SFB 10% (v/v).



**Figura 3.2. Efecto del G-CSF sobre la proliferación de células Swan 71.** Células Swan 71 fueron incubadas en medio de crecimiento con distintas concentraciones de G-CSF en presencia (A) o ausencia (B) de SFB 10% (v/v) durante 72 horas. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de MTS. Los resultados están expresados como porcentaje de viabilidad obtenida con respecto al control (células incubadas sin G-CSF) y representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes.

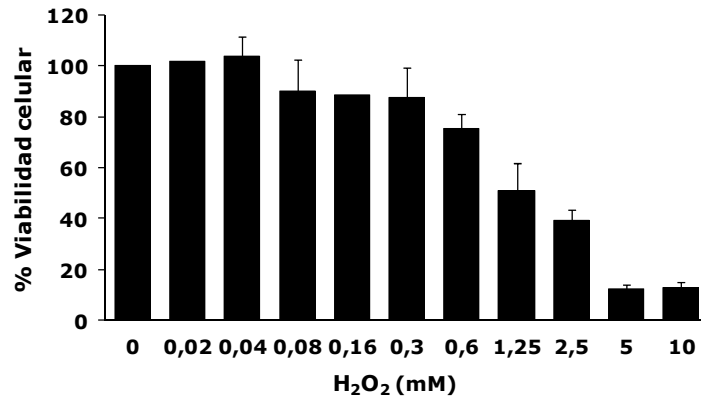
Puesto que fue demostrado que el G-CSF promueve la supervivencia en células mieloides (Smithgall T.E. y col., 2000), cardiomiocitos (Harada M. y col., 2005), células neuronales (Schneider A. y col., 2005) y células de coriocarcinoma (Marino V.J. y Roguin L.P., 2008), decidimos evaluar si el G-CSF ejerce un efecto protector en células Swan 71 incubadas en presencia de un agente citotóxico, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Harada M. y col., 2005). Con el fin de establecer una concentración citotóxica apropiada de  $H_2O_2$ , las células Swan 71 fueron inicialmente incubadas con distintas concentraciones de este agente (Figura 3.3A). Sobre la base de los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración 1 mM de  $H_2O_2$ , que produjo una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente un 50%.

Luego de determinar la concentración efectiva del agente citotóxico, se procedió a estudiar el posible efecto protector del G-CSF. Para ello, las células fueron incubadas en ausencia de SFB con diferentes concentraciones de G-CSF durante toda la noche, y luego se les agregó una concentración 1 mM de  $H_2O_2$  durante 4 horas. Los resultados mostraron que el pre-tratamiento de las células con concentraciones de citoquina hasta 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  no fue efectivo para revertir o al menos disminuir el efecto citotóxico del  $H_2O_2$  (Figura 3.3B).

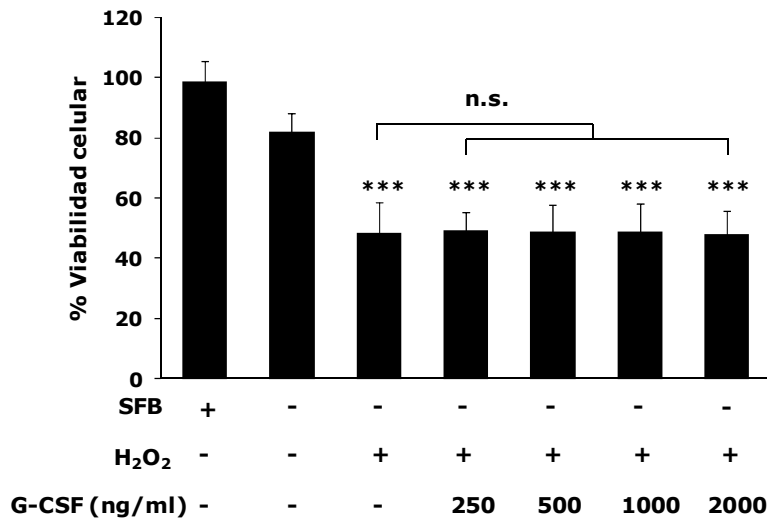
### **3.3. Efecto del G-CSF sobre la actividad y la expresión de MMP-2**

Las metaloproteinasas son enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular y que participan activamente en la invasión trofoblástica (Cohen M. y col., 2006). Dentro de esta gran familia de enzimas, las gelatinasas (MMP-2 o gelatinasa A; MMP-9 o gelatinasa B) se destacan por su rol fundamental en la intrusión de los trofoblastos a través de los tejidos maternos (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Por esta razón, decidimos estudiar si el G-CSF se comporta como un factor que modifica la actividad y/o la expresión de estas enzimas gelatinolíticas en las células trofoblásticas Swan 71.

**A**



**B**



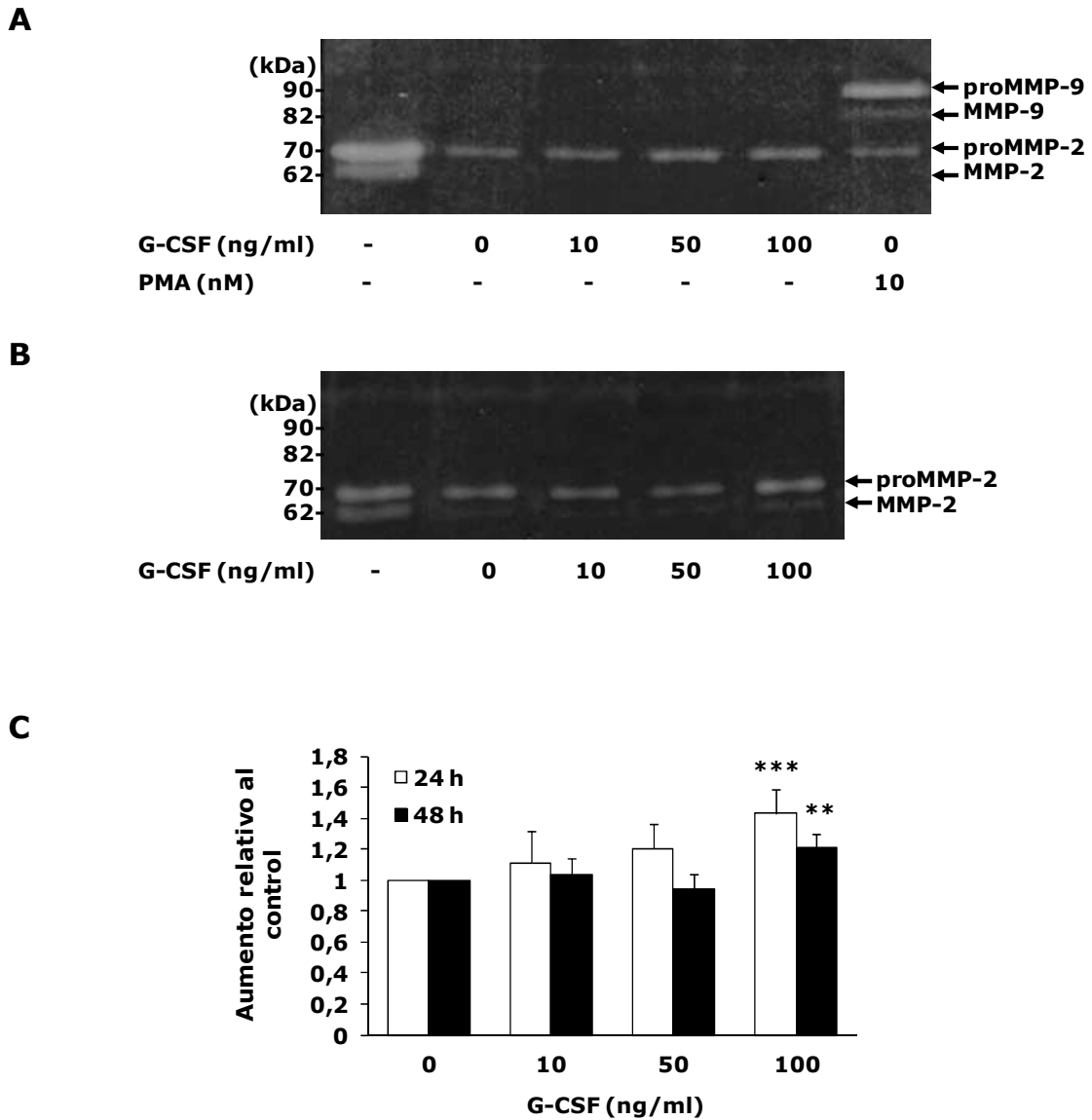
**Figura 3.3. Efecto del G-CSF sobre la sobrevivencia de células Swan 71. (A)** Células Swan 71 fueron incubadas con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en medio de crecimiento sin SFB durante 4 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTS. **(B)** Células Swan 71 fueron incubadas con distintas concentraciones de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 16 horas. Luego, las células fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM durante 4 horas. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad obtenida con respecto a las células incubadas con SFB y representan la media ± ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \*\*\*p<0,001 respecto de células sin tratar en medio sin SFB; n.s., no significativo respecto de células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Luego de incubar las células Swan 71 en medio de crecimiento sin SFB con concentraciones variables de G-CSF (0-100 ng/ml) durante 24 o 48 horas, los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados, concentrados y sembrados

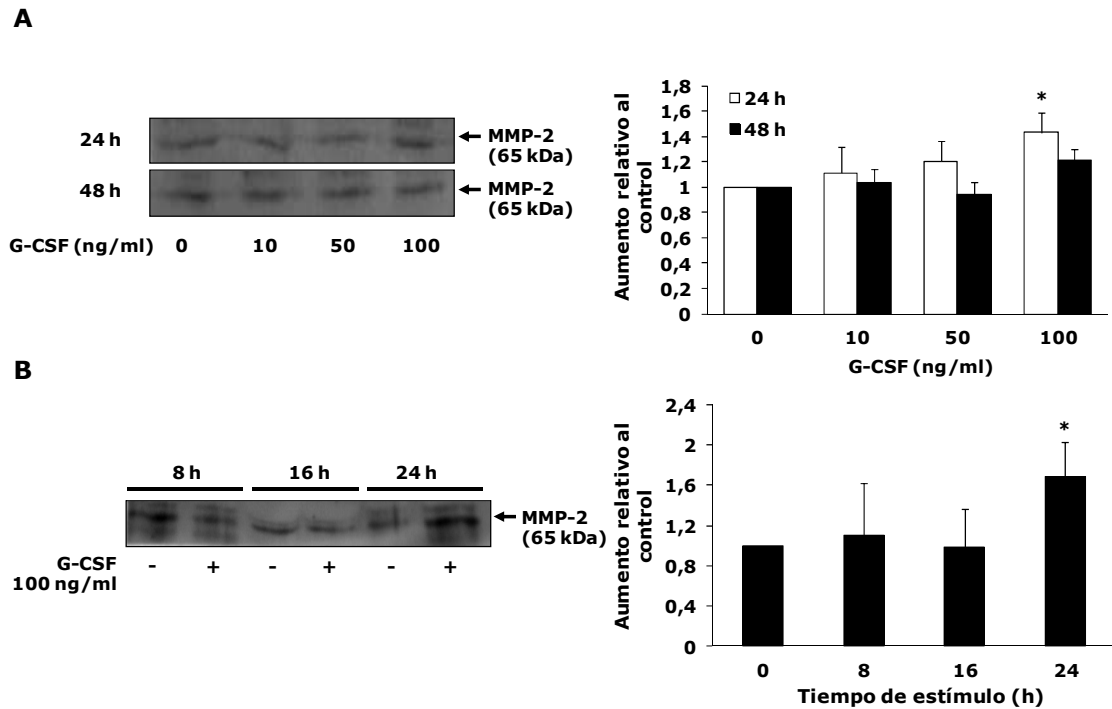
en geles de poliacrilamida para realizar una zimografía. Esta técnica permite evaluar la actividad proteolítica de una enzima a través de la degradación de un sustrato -en este caso gelatina- copolimerizado con la mezcla de acrilamida/bisacrilamida del gel. En este ensayo se puede observar tanto la actividad de las formas activas como las latentes, ya que en presencia de SDS se produce un cambio conformacional en la proforma, que le confiere actividad. De esta manera, la detección de bandas claras en el gel teñido de azul indica la acción gelatinolítica de la enzima.

Los resultados obtenidos a partir de la zimografía de los sobrenadantes de células estimuladas con distintas concentraciones de G-CSF durante 24 o 48 horas revelaron que el G-CSF aumentó la actividad gelatinolítica de la forma latente de MMP-2 (proMMP-2) de manera dependiente de la concentración (Figura 3.4). En particular, para una concentración de 100 ng/ml se obtuvo un incremento significativo del 40% y del 20% luego de 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. Sin embargo, en este ensayo, no se observó la actividad gelatinolítica de MMP-9, una metaloproteinasa que fue detectada luego de incubar las células con una concentración 10 nM del inductor acetato de forbol miristato (o PMA, por sus siglas en inglés "*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*") durante 24 horas (Figura 3.4A) (Hwang Y.P. y col., 2010).

La identidad de la MMP-2 se comprobó mediante ensayos de Western blot de los sobrenadantes de cultivo de células tratadas con la citoquina. En este caso, sólo se obtuvo un aumento significativo en la expresión de esta MMP en presencia de una concentración 100 ng/ml de G-CSF luego de 24 horas de tratamiento (Figura 3.5A). Asimismo, la incubación de las células Swan 71 con esa concentración de citoquina durante tiempos menores no incrementó los niveles de expresión de MMP-2, en tanto que el pico de expresión fue obtenido tras 24 horas de estímulo con el G-CSF (Figura 3.5B).



**Figura 3.4. Efecto del G-CSF sobre la actividad de MMP-2.** Células Swan 71 fueron incubadas con distintas concentraciones de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 24 **(A)** o 48 h **(B)**. Los sobrenadantes de cultivo concentrados (10  $\mu$ l) fueron sembrados en geles con 1 mg/ml de gelatina y separados por SDS-PAGE al 10%. Luego, los geles fueron lavados con TBS-Triton X-100 2,5% (v/v) e incubados en buffer de reacción (Tris 50 mM, NaCl 0,12 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ M, pH 7,5) durante 22 horas a 37°C. Posteriormente, los geles fueron coloreados con una solución de Coomassie Blue R-250 0,25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (4:1:5). En **(A)** y **(B)** se muestra la zimografía de un ensayo representativo. La primera calle corresponde a una muestra de sobrenadante de células Swan 71 incubadas con medio de crecimiento con SFB. **(C)** Análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 3.5. Efecto del G-CSF sobre la expresión de MMP-2.** Células Swan 71 fueron incubadas con **(A)** distintas concentraciones de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 24 o 48 h, o **(B)** con 100 ng/ml de G-CSF durante los tiempos indicados. Los sobrenadantes de cultivo concentrados (80  $\mu$ l) fueron secados y sometidos a un SDS-PAGE al 10%. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF e incubadas con un anticuerpo específico para MMP-2. El revelado se describe en Materiales y Métodos. En los paneles de la izquierda se muestran WB de ensayos representativos. En los paneles de la derecha, el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ .

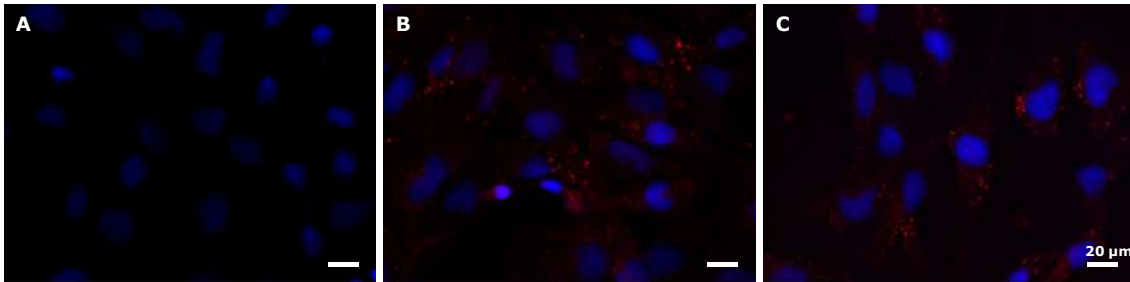
### 3.4. Efecto del G-CSF sobre la expresión de MT1-MMP

La MT1-MMP (o MMP-14) es una metaloproteinasas de unión a membrana que se expresa en los trofoblastos y que, además de la degradación de algunos sustratos de la MEC, participa junto con el TIMP-2 en la activación fisiológica de la proMMP-2 (Cohen M. y col., 2006).

Con el propósito de estudiar si el G-CSF afecta la expresión de esta MT-MMP, evaluamos la presencia de MT1-MMP en células Swan 71 mediante ensayos de inmunocitoquímica. Para ello, las células fueron incubadas en ausencia o presencia de 100 ng/ml de G-CSF durante 24 horas y, luego de la



fijación, se agregó un anticuerpo específico anti-MT1-MMP. La observación en un microscopio de fluorescencia indicó que si bien las células Swan 71 expresan esta MMP, la incubación con el G-CSF no modificó los niveles de expresión de la proteína (Figura 3.6).



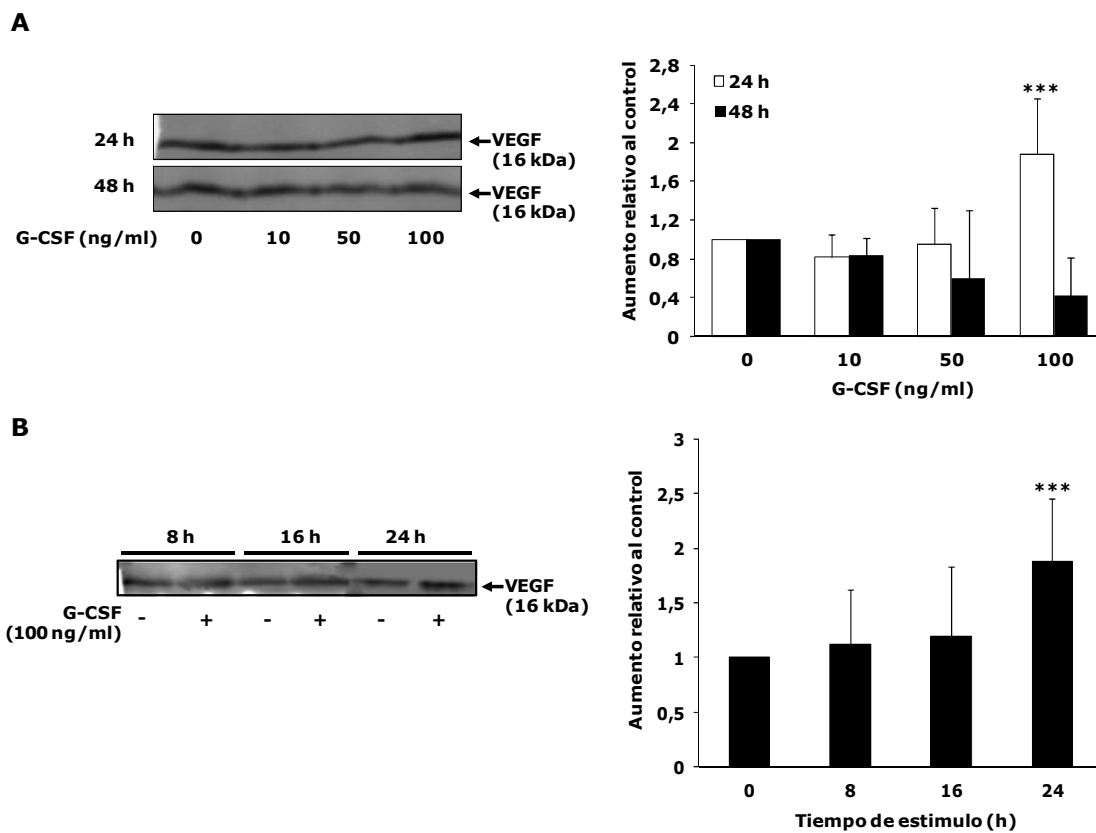
**Figura 3.6. Efecto del G-CSF sobre la expresión de MT1-MMP.** Luego de 24 horas en cultivo, las células Swan 71 sembradas sobre cubreobjetos, fueron lavadas con PBS e incubadas en presencia o ausencia de 100 ng/ml G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 24 horas. Posteriormente, luego de la fijación con p-formaldehído 4% (v/v) en PBS y la incubación con un anticuerpo específico contra MT1-MMP, las células fueron observadas al microscopio de epifluorescencia. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **(A)** Células incubadas en ausencia de un anticuerpo anti-MT1-MMP, **(B)** Células sin estimular incubadas con un anticuerpo específico anti-MT1-MMP, **(C)** Células estimuladas con 100 ng/ml de G-CSF durante 24 horas e incubadas con un anticuerpo específico anti-MT1-MMP.

### 3.5. Efecto del G-CSF sobre la expresión de VEGF

El proceso angiogénico que se produce durante la implantación embrionaria depende de la vasculogénesis y la angiogénesis (Wang Y. y Zhao S., 2010), y de la invasión de las arterias espiraladas uterinas, que culmina en la oclusión y remodelación endotelial por parte de los trofoblastos con fenotipo invasivo (Cartwright J.E. y col., 2010; Dubinsky V. y col., 2010). En general, estos eventos son iniciados por factores de crecimiento como el VEGF, una glicoproteína homodimérica crítica para el desarrollo embrionario (Zygmunt M. y col., 2003; Holmes K. y col., 2007).

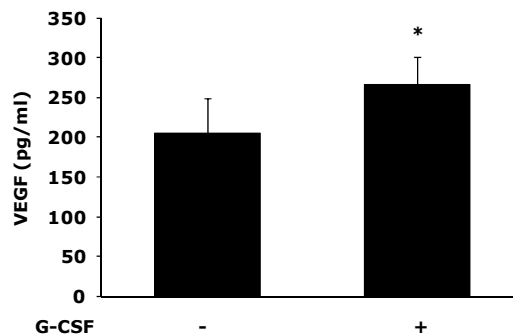
Con el propósito de evaluar si el G-CSF afecta la secreción de VEGF en las células Swan 71, se realizaron ensayos de Western blot con sobrenadantes de cultivo provenientes de células incubadas en ausencia de SFB con diferentes concentraciones de la citoquina durante 24 o 48 horas, o bien con 100 ng/ml

de G-CSF durante distintos tiempos. Como se muestra en la Figura 3.7A, una concentración 100 ng/ml de G-CSF incrementó los niveles de secreción de VEGF en los sobrenadantes de las células estimuladas con la citoquina durante 24 horas. Asimismo, no se evidenció un aumento del factor de crecimiento ni a tiempos mayores (48 horas) ni menores (8 y 16 horas) en presencia de 100 ng/ml de G-CSF (Figura 3.7A y B, respectivamente).



**Figura 3.7. Efecto del G-CSF sobre la secreción de VEGF.** Células Swan 71 fueron incubadas con distintas concentraciones de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 24 o 48 horas **(A)**, o bien con 100 ng/ml de G-CSF durante distintos tiempos **(B)**. Los sobrenadantes de cultivo concentrados (80  $\mu$ l) fueron secados y sometidos a WB como se describe en Materiales y Métodos. En el panel derecho se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,001$ .

Los niveles de VEGF en los sobrenadantes de cultivo de células Swan 71 incubadas por 24 horas con 100 ng/ml de G-CSF también fueron cuantificados por ensayos de ELISA. Como se observa en la Figura 3.8, los niveles de secreción de este factor de crecimiento luego del tratamiento con la citoquina fueron significativamente mayores ( $265 \pm 36$  pg/ml) que los niveles de secreción basales ( $204 \pm 44$  pg/ml).



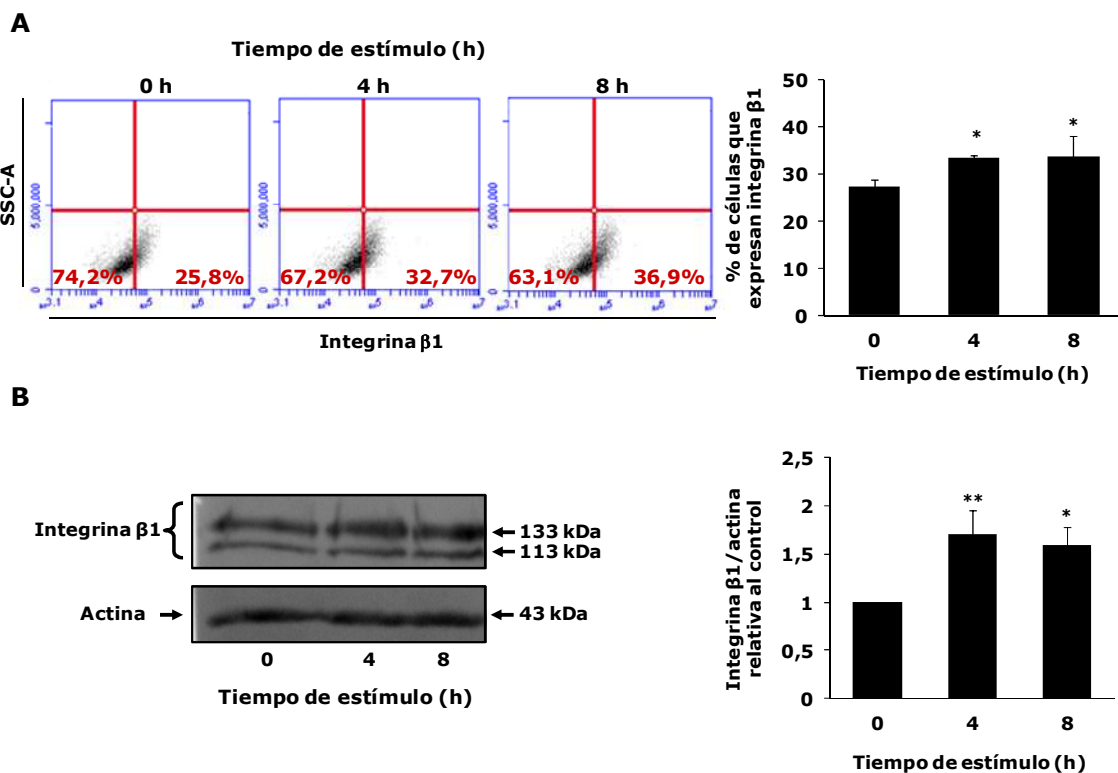
**Figura 3.8. Efecto del G-CSF sobre los niveles de secreción de VEGF.** Células Swan 71 fueron incubadas con G-CSF (100 ng/ml) en medio de crecimiento sin SFB durante 24 horas. Los niveles de VEGF en los sobrenadantes de cultivo concentrados fueron determinados mediante un ensayo de ELISA como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de seis experimentos independientes. Test *t* de Student, \* $p < 0,05$ .

### 3.6. Efecto del G-CSF sobre la expresión de integrinas

Las integrinas son receptores de membrana que desempeñan un papel fundamental en la invasión y la migración celular, no sólo porque interactúan con algunos componentes de la MEC, sino porque funcionan como moléculas de señalización que regulan estos procesos (Hood J.D. y Cheresh D.A., 2002). En la placenta humana, los trofoblastos invasivos de primer trimestre presentan una expresión disminuida de la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , mientras que tienen una mayor expresión de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 1\beta 1$  (Damsky C.H. y col., 1994; Kaufmann P. y Castellucci M., 1997).

Con el propósito de investigar si el G-CSF modifica o altera la expresión de integrinas, se decidió evaluar los niveles de expresión de la integrina  $\beta 1$ , receptor característico de los citotrofoblastos extravelosos con fenotipo

invasivo. Para lograr este objetivo, las células Swan 71 fueron incubadas en ausencia de SFB con 100 ng/ml de G-CSF durante 4 y 8 horas. Posteriormente, se realizaron ensayos de citometría de flujo y WB. En ambos ensayos se observó que las células que fueron incubadas en presencia de la citoquina durante 4 y 8 horas presentaban un aumento significativo de la expresión de la integrina  $\beta 1$  con respecto a aquellas células que no fueron incubadas con el G-CSF (Figura 3.9A y B). Asimismo, es interesante señalar que a tiempos mayores (12 y 16 horas) no se observaron cambios en los niveles de expresión



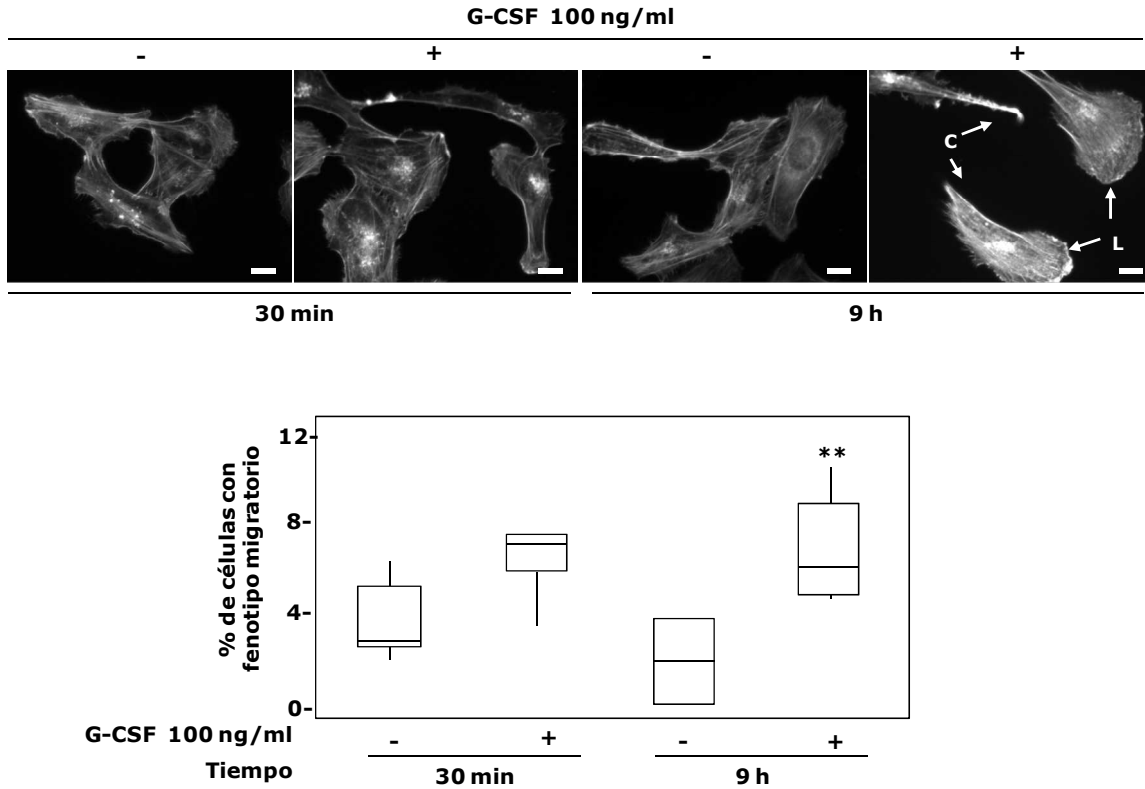
**Figura 3.9. Efecto del G-CSF sobre la expresión de la integrina  $\beta 1$ .** Células Swan 71 fueron incubadas con G-CSF (100 ng/ml) en medio de crecimiento sin SFB durante 0, 4 y 8 horas. **(A)** Luego, las células fueron resuspendidas con tripsina 0,25% (p/v) y fijadas con p-formaldehído 1% (p/v) en PBS. La expresión de integrina  $\beta 1$  fue analizada por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. En el cuadrante inferior derecho de los gráficos ("Dot plots") se muestra el porcentaje de células que expresan la integrina  $\beta 1$  (un experimento representativo). En el panel de la derecha se muestra el análisis de tres experimentos independientes (media  $\pm$  ES). ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ . **(B)** Lisados provenientes de células incubadas con la citoquina durante los tiempos indicados fueron sometidos a WB como se describe en Materiales y Métodos. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

de la integrina  $\beta 1$  (datos no mostrados).

### **3.7. Efecto del G-CSF sobre el citoesqueleto de actina**

Si bien el fenotipo migratorio y los factores que desencadenan la migración varían según el tipo celular, este proceso puede resumirse en cinco pasos (ver Introducción, Figura 1.22). En breves palabras, primero ocurre la extensión del borde de avance (lamelipodio), luego la formación de nuevos focos de adhesión, la degradación de la matriz extracelular circundante, seguida por la contracción y el movimiento celular, y finalmente, la desaparición de los focos de adhesión de la parte posterior de la célula (Parri M. y Chiarugi P., 2010). En todos estos pasos hay polimerización, despolimerización y reorganización del citoesqueleto de actina (Raftopoulou M. y Hall A., 2004; Mogilner A. y Keren K., 2009).

Con el fin de evaluar si el G-CSF promueve la migración de las células Swan 71, se registraron los cambios en el citoesqueleto de actina mediante ensayos de inmunocitoquímica. En particular, se analizó la aparición de células con fenotipo migratorio, es decir, células que presentan borde de avance (lamelipodio) y borde de retracción (cola). Para ello, las células Swan 71 fueron incubadas en ausencia de SFB con 100 ng/ml de G-CSF durante 30 minutos o 9 horas. Posteriormente, para evidenciar el citoesqueleto de actina, se realizó una tinción con rodamina-faloidina (Chazotte B., 2010). Las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia revelaron que no hubo diferencias significativas en el número de células con fenotipo migratorio luego de incubar 30 minutos con G-CSF (Figura 3.10). Sin embargo, el tratamiento de las células con 100 ng/ml de G-CSF durante 9 horas mostró un mayor número de células con cambios marcados en el citoesqueleto de actina, concordantes con un fenotipo migratorio (Figura 3.10).



**Figura 3.10. Efecto del G-CSF sobre el citoesqueleto de actina.** Las células Swan 71 sembradas sobre cubreobjetos fueron tratadas 30 min o 9 h en presencia o ausencia de 100 ng/ml de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB. Luego, las células fijadas con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS fueron incubadas con rodamina-faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina mediante inmunofluorescencia. En el panel inferior se muestran los resultados representados en un gráfico de "Box and Whiskers", como el porcentaje de células con fenotipo migratorio (presencia de lamelipodio, L y cola, C) de cuatro experimentos independientes. Test no paramétrico de Wilcoxon,  $**p < 0,01$ .

### 3.8. Efecto del G-CSF sobre la migración

Numerosos factores participan en la regulación de la migración y la invasión trofoblástica (Knöfler M., 2010). Si se tiene en cuenta que el G-CSF estimuló la expresión de algunos factores involucrados en la implantación embrionaria, tales como la MMP-2, el VEGF y la integrina  $\beta 1$ , y además,

produjo cambios en el citoesqueleto de actina, nos preguntamos si el G-CSF es un factor que promueve la migración de las células Swan 71.

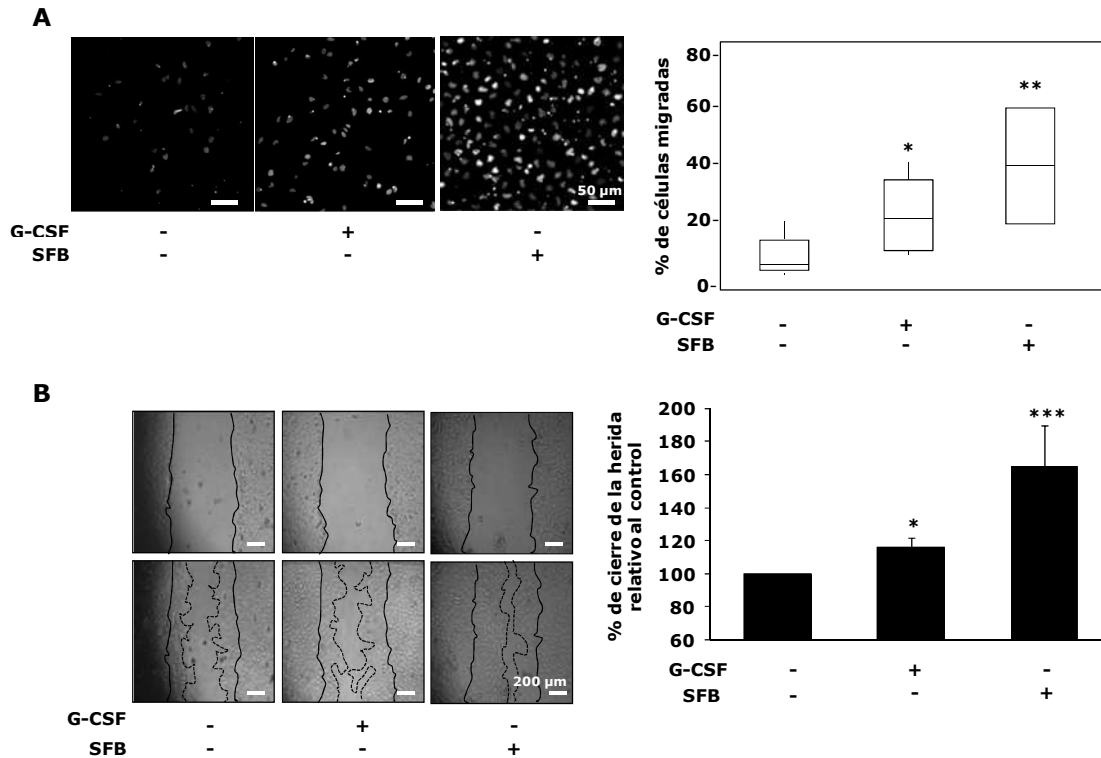
Para evaluar este proceso se utilizaron dos metodologías distintas. Por un lado, se emplearon cámaras "transwell" en las cuales las células con capacidad migratoria atraviesan una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$ . En este ensayo, las células Swan 71 sembradas en el inserto superior de la cámara fueron incubadas con 100 ng/ml de G-CSF en ausencia de SFB durante 9 horas. Posteriormente, las células fueron teñidas con DAPI para poder cuantificar los núcleos. El número de células que migran se determina contando aquellas células que se encuentran del lado opuesto de la membrana de donde fueron sembradas. El análisis de los resultados muestra que las células estimuladas con la citoquina durante 9 horas migraron aproximadamente un 20% (Figura 3.11A). Como el G-CSF fue agregado sólo en la cámara inferior, estos resultados indicaron que la citoquina tuvo un efecto quimioattractante. Además, se obtuvo un porcentaje de células migradas de alrededor de un 40% para aquellas células incubadas en presencia de suero, utilizado como estímulo quimioattractante.

Por otro lado, se realizó el ensayo de la herida ("wound healing assay" o "scratch assay"), en el que se efectúa una brecha con la punta de un tip sobre una monocapa de células confluentes. Posteriormente, se evalúa la capacidad de las células para cerrar la herida o, en otras palabras, de migrar para establecer nuevos contactos célula-célula. En este caso, se observó que las células incubadas con una concentración 100 ng/ml de G-CSF durante 16 horas migraron un 15% más que las células sin tratamiento (Figura 3.11B). Asimismo, el cierre de la herida de las células incubadas en medio de crecimiento con SFB (inductor positivo) fue de un 65%.

### 3.9. Discusión

Si bien el G-CSF es ampliamente conocido por ejercer acciones biológicas a través de su receptor (G-CSFR) en el linaje mieloide (Avalos B.R., 1996), en los últimos años, fue incrementando el número de publicaciones que revelaron

la presencia de este receptor en tejidos no hematopoyéticos. En este sentido, nuevas funciones biológicas para el G-CSF fueron reportadas en células endoteliales (Bussolino F. y col., 1991; Fusté B. y col., 2004), cardiomiocitos (Harada M. y col., 2005), células neuronales (Schneider A. y col., 2005; Jung



**Figura 3.11. Efecto del G-CSF sobre la migración de células Swan 71. (A)** Las células Swan 71 sembradas sobre el inserto superior de la cámara "transwell" fueron incubadas 9 horas en ausencia o presencia de 100 ng/ml de G-CSF (agregado sólo en la cámara inferior) en medio de crecimiento sin SFB. El control positivo fue realizado en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v). Luego, las células fueron teñidas con DAPI para cuantificar los núcleos. Posterior a la toma de imágenes de las células totales en un microscopio de fluorescencia, las células del inserto superior fueron removidas con un hisopo y se tomaron nuevas imágenes de las células del inserto inferior (células migradas). En el panel de la derecha se muestran los resultados representados en un gráfico de "Box and Whiskers" como el porcentaje de células migradas de cinco experimentos independientes. Test no paramétrico de Mann-Whitney, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . **(B)** Se realizó la herida con un tip p10 sobre monocapas de células Swan 71 deprivadas de SFB durante 24 horas. Luego, las células fueron incubadas durante 16 horas en ausencia o presencia de 100 ng/ml de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB. El control positivo fue realizado con células incubadas en medio de crecimiento con SFB 10% (v/v). Se tomaron fotografías en los tiempos 0 y 16 horas. El área de la herida fue medida con el programa ImageJ. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES del porcentaje de cierre de la herida respecto del control de nueve experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



K.H. y col., 2006), células trofoblásticas y células de tejido placentario (Uzumaki H. y col., 1989; Shorter S.C. y col., 1992; McCracken S.A. y col., 1999; Marino V.J. y col., 2001; Marino V.J. y Roguin L.P., 2008), así como en algunas líneas tumorales (Tachibana M. y col., 1997; Yang X. y col., 2005; Chakraborty A. y Guha S., 2007; Kumar J. y col., 2014; Morris K.T. y col., 2014). Los resultados obtenidos en el presente trabajo en los ensayos de inmunocitoquímica y Western blot permitieron demostrar -por primera vez- la presencia de receptores para G-CSF en la línea de células trofoblásticas Swan 71 derivadas de una placenta humana de 7 semanas de gestación.

El G-CSF es una citoquina, y como tal, tiene acciones pleiotrópicas, entre las que se destaca la promoción de la proliferación celular. Respecto a este efecto mitogénico, diversos grupos de investigación informaron que el G-CSF induce una respuesta proliferativa en la línea NFS-60 de leucemia mieloide murina (Hara K. y col., 1988; Matsuda S. y col., 1989; Marino V.J. y col., 2003), en cardiomiocitos (Shimoji K. y col., 2010), en células endoteliales (Bussolino F. y col., 1991), en células de músculo esquelético (Hara M. y col., 2011), y en cáncer de colon y estómago (Morris K.T. y col., 2014). Por otra parte, también fue reportado que esta citoquina inhibe o no estimula la proliferación de líneas celulares de coriocarcinoma (Vandermolen D.T. y Gu Y., 1996; Marino V.J. y Roguin L.P., 2008). En el caso particular de las células Swan 71, no se observó un efecto proliferativo cuando las células fueron incubadas con G-CSF durante 72 horas, ya sea en presencia o ausencia de SFB. Esto podría atribuirse al hecho de que las Swan 71 tienen un fenotipo comparable con los citotrofoblastos extravelosos, es decir un fenotipo de tipo invasivo (Aplin J.D. y col., 2006), a diferencia de los citotrofoblastos vellosos que tienen un fenotipo principalmente proliferativo (Caniggia I. y col., 2000).

Asimismo, fue observado que el G-CSF tiene un rol protector en cardiomiocitos expuestos a un estímulo citotóxico (Harada M. y col., 2005), en células endoteliales sometidas a un estrés oxidativo (Kojima H. y col., 2011), en células de intestino injuriadas por irradiación (Kim J.S. y col., 2013) y en células de coriocarcinoma deprivadas de suero (Marino V.J. y Roguin L.P., 2008). Los resultados obtenidos en células Swan 71 pre-tratadas con G-CSF y

posteriormente incubadas durante 4 horas con peróxido de hidrógeno revelaron que el G-CSF no ejerció un efecto protector frente a la acción citotóxica del agente utilizado. Estos resultados sugieren que el tipo celular y la naturaleza del estímulo citotóxico serían factores importantes para determinar finalmente la acción de la citoquina en un sistema biológico en particular.

Para evaluar entonces el posible rol biológico del G-CSF en las células Swan 71, se determinó el efecto de la citoquina sobre uno de los mediadores involucrados en el proceso de implantación embrionaria. Las metaloproteinasas son enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular y que participan activamente durante la invasión trofoblástica (Cohen M. y col., 2006). Dentro de esta gran familia de enzimas, las gelatinasas (MMP-2 o gelatinasa A, MMP-9 o gelatinasa B) se destacan por su rol fundamental en el avance de los trofoblastos a través de los tejidos maternos (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Así, fue reportado que mientras la IL-8 (CXCL-8) induce la migración y la invasión trofoblástica al incrementar los niveles de estas gelatinasas (Jovanovic M. y col., 2010), la IL-12 inhibe la invasión de la línea de coriocarcinoma JEG-3 a través de la disminución de los niveles de MMP-2 y MMP-9 (Karmakar S. y col., 2004). En la línea celular Swan 71, una concentración de 100 ng/ml de G-CSF aumentó la actividad de la proMMP-2 luego de 24 y 48 horas de incubación. A su vez, esa misma concentración de G-CSF produjo un incremento en los niveles de expresión de MMP-2, que fue sólo observado a las 24 horas de tratamiento. Es interesante señalar que los niveles de G-CSF en suero de individuos sanos se encuentran en el rango de <30-163 pg/ml (Panapoulos A.D. y Watowich S.S., 2008). Sin embargo, los niveles de esta citoquina en medios condicionados de explantos de vellosidades coriónicas correspondientes a 7 semanas de gestación varían entre 30-300 ng/ml (Shorter S.C. y col., 1992). En este sentido, debería ser tenido en cuenta que los efectos inducidos por el G-CSF en células trofoblásticas dependerán de la concentración local de la citoquina en los tejidos placentarios.

Asimismo, mientras que en las zimografías se observó la proforma de la gelatinasa A, en los ensayos de Western blot se evidenció la forma activa de la

enzima. La divergencia de estos resultados podría explicarse sobre la base de las distintas metodologías empleadas para el tratamiento de las muestras en ambas técnicas. Así, en el Western blot, a diferencia de la zimografía, las muestras son desnaturalizadas por medio de calor y reducidas con  $\beta$ -mercaptoetanol, y fue descrito que estos dos tratamientos pueden producir la proteólisis de las formas latentes a formas activas (Visse R. y Nagase H., 2003). En el mismo sentido, a las 48 horas se observó un aumento de la actividad de la proMMP-2 en la zimografía, no así en el Western blot. Esta discrepancia podría resultar de la diferencia que existe en la sensibilidad de las técnicas empleadas, ya que fue demostrado que la zimografía es una técnica mucho más sensible que el Western blot (Snoek-van Beurden P.A.M. y Von den Hoff J.W., 2005). Por otro lado, en las condiciones ensayadas no se evidenció la presencia de la MMP-9. La ausencia de esta metaloproteinasa podría estar relacionada con la expresión diferencial que tienen las gelatinasas durante el primer trimestre de gestación. Mientras que la producción de MMP-2 es predominante entre las semanas 6-8, la MMP-9 es la principal gelatinasa durante las últimas semanas (9-12) del primer trimestre (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). Es importante recordar que la línea celular Swan 71 fue obtenida a partir de una placenta de 7 semanas de gestación. Además, los resultados observados concuerdan con lo reportado previamente por Xu P. y colaboradores (2000). Estos investigadores evaluaron el perfil de secreción de MMPs en medios de cultivos de células citotrofoblásticas provenientes de pacientes con diferentes semanas de gestación. De este modo, demostraron por ensayos de zimografía que mientras que la actividad de la proMMP-2 disminuye desde la semana 6 hacia la 11, la forma activa de MMP-2 casi no se observa a partir de la semana 7. Además, la actividad de la proMMP-9 aumenta a partir de la semana 8 de gestación, a diferencia de la MMP-9 activa que recién se detecta en la semana 11. Asimismo, en otro estudio llevado a cabo en la línea metastásica T3M-1, derivada de células escamosas de una cavidad oral humana, fue informado que el incremento en los niveles de proMMP-2 inducido por el G-CSF estaría relacionado con la invasividad tumoral (Sugimoto C. y col., 2001).

Con respecto a la MT1-MMP, si bien no se evidenciaron cambios en su expresión en la superficie de células Swan 71 incubadas con 100 ng/ml de G-CSF, estos resultados coinciden con lo informado por Xu P. y colaboradores (2000), quienes tampoco observaron cambios en los niveles de expresión de la MT1-MMP en cultivos primarios de células trofoblásticas obtenidos de placentas de 6-11 semanas.

Otro de los mediadores implicados activamente en la implantación embrionaria es el VEGF (Dubinsky V. Y col., 2010). Este factor de crecimiento está involucrado en numerosos procesos, desde la promoción de la angiogénesis y la formación de una red vascular placentaria (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005) hasta la participación en la motilidad (Lash G.E. y col., 2003) y la sobrevivencia de células trofoblásticas (Bills V.L. y col., 2014). En el caso particular de las células Swan 71, se observó que 100 ng/ml de G-CSF incrementaron los niveles de secreción de VEGF en los sobrenadantes de las células trofoblásticas estimuladas con la citoquina durante 24 horas. En este sentido, nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que el G-CSF está implicado en el proceso implantatorio, ya que el VEGF es un factor íntimamente relacionado con la angiogénesis que ocurre durante el desarrollo placentario.

Las integrinas son glicoproteínas heterodiméricas transmembrana que funcionan como receptores bidireccionales capaces de unirse a varios componentes de la MEC, así como a otras moléculas de adhesión. Esta unión regula posteriormente varios procesos, como la adhesión, la migración, la invasión, la reorganización del citoesqueleto y la señalización celular (Staun-Ram E. y Shalev E., 2005). El trofoblasto presenta un repertorio de integrinas que varía según su estado de diferenciación. Así, los trofoblastos que se encuentran dentro de la vellosidad coriónica sólo expresan la integrina  $\alpha 3\beta 1$ , mientras que aquellos que se disponen cerca de la membrana basal, donde se ancla la vellosidad coriónica a la pared uterina, presentan altos niveles de la integrina  $\alpha 6\beta 4$ . Cuando estos citotrofoblastos se diferencian a trofoblastos extravellosos y adquieren un fenotipo invasivo, cambian el perfil de integrinas, expresan las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 1$ , y disminuyen la expresión de

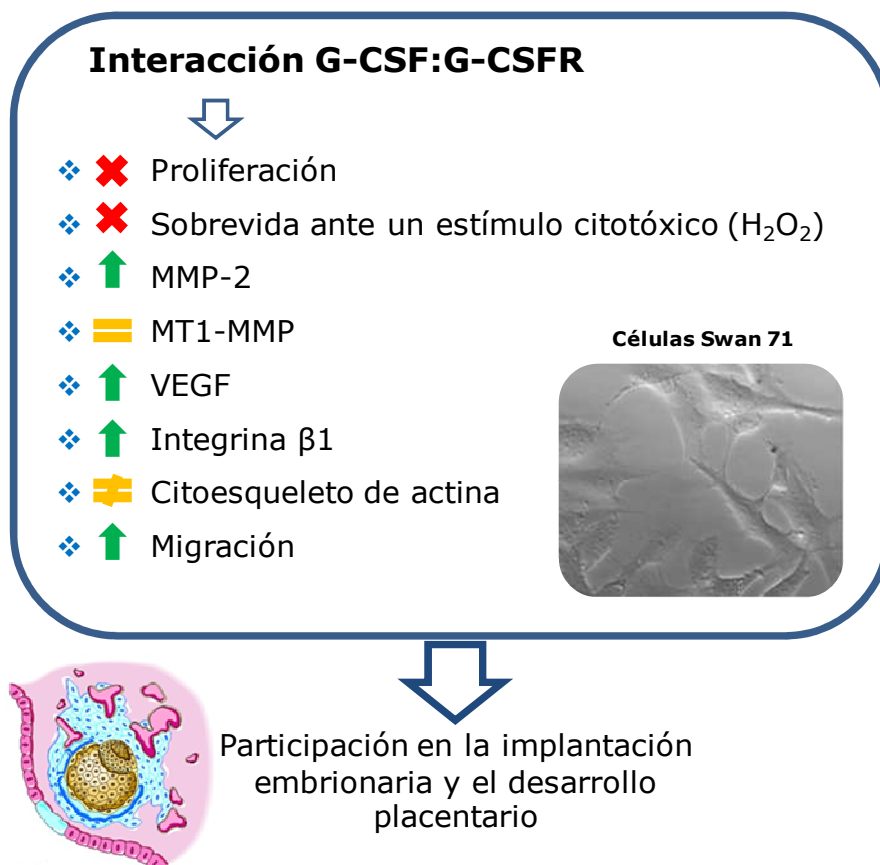
la integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Damsky C.H. y col., 1994; Kaufmann P. y Castellucci M., 1997). Sobre la base de estos hallazgos, la presencia de la integrina  $\beta 1$  en células Swan 71 concuerda con lo encontrado para citotrofblastos extravellosos con fenotipo invasivo (Kaufmann P. y Castellucci M., 1997), más aún si se tiene en cuenta que esta línea celular ya fue asociada con las características extravellosas (Aplin J. y col., 2006). En este sentido, demostramos que el G-CSF estimula la expresión de la integrina  $\beta 1$  en células Swan 71 luego de 4 y 8 horas de incubación con 100 ng/ml de la citoquina. Estos resultados indican que el G-CSF favorece la adquisición de un fenotipo invasivo al aumentar la expresión de un receptor clave para la migración y la invasión trofoblástica.

Los trofblastos extravellosos invaden la pared uterina materna hasta un tercio del miometrio y las arterias espiraladas asociadas. Debido a que los trofblastos irrumpen el endotelio y las células de músculo liso de las arterias espiraladas, el proceso culmina con la remodelación de estos vasos con el fin de aumentar el calibre de las arterias y así, incrementar el flujo sanguíneo y lograr un adecuado suministro de oxígeno y nutrientes al feto (Caniggia I. y col., 2000). Durante el proceso de migración e invasión trofoblástica ocurren, como en cualquier otro evento de migración celular, cambios en el citoesqueleto de actina. Estos cambios son fundamentales para lograr la translocación del cuerpo celular a través de un sustrato o de la MEC (Cain R.J. y Ridley A.J., 2009). Numerosos factores presentes en la interfase materno-fetal pueden modular la migración trofoblástica a partir de rearrreglos en los filamentos de actina. Así, por ejemplo, el EGF induce la migración de células trofoblásticas a través de RhoA, una pequeña proteína GTPasa directamente involucrada en la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina (Han J. y col., 2010). Cuando se evaluó el efecto del G-CSF sobre la migración de células Swan 71, en primer lugar, se observaron cambios en el citoesqueleto de actina consistentes con un fenotipo migratorio (Raftopoulou M. y Hall A., 2004; Mogilner A. y Keren K., 2009). Luego de incubar las células con 100 ng/ml de G-CSF durante 9 horas aumentó el número de células que presentaban bordes de avance y retracción de los bordes posteriores. Este

resultado nos alentó a estudiar el rol del G-CSF en el proceso de migración. Al evaluar tal efecto, demostramos que el G-CSF indujo la migración de las células Swan 71 luego de 9 horas (ensayo en "transwells") o 16 horas (ensayo de la herida) de incubación. Es importante resaltar que el G-CSF no sólo promovió la migración, sino que también fue un estímulo quimioattractante. Este efecto quimioattractante también fue descrito para el G-CSF en células madre hematopoyéticas (Zhang Y. y col., 2009). Sin embargo, en neutrófilos, si bien el G-CSF no induce directamente quimotaxis, sí tiene actividad quimocinética, es decir, que promueve la motilidad no direccionada, lo que incrementa la respuesta a factores quimioattractantes (Bendall L.J. y Bradstock K.F., 2014). En consecuencia, la quimotaxis inducida por el G-CSF depende del tipo celular involucrado. Con respecto a la divergencia en los tiempos de migración ensayados en cada técnica, deberíamos tener en cuenta la diferencia en las distancias que tienen que migrar las células. Así, mientras que el espesor de la membrana del inserto ("transwell") tiene alrededor de 10-50  $\mu\text{m}$  (Corning), la herida realizada con el tip es aproximadamente 10 veces más grande (500-700  $\mu\text{m}$ ). Por otro lado, en cuanto a la potencia del efecto migratorio inducido por el G-CSF, es interesante señalar que el G-CSF, en una concentración similar a la utilizada en nuestros ensayos, induce un incremento importante en la migración de células hematopoyéticas (entre 60-200%) (Yong K.L., 1996; Khan M. y col., 2009). Sin embargo, fue informado un efecto más moderado en células no hematopoyéticas, comparables con nuestros resultados en las células Swan 71. Así, por ejemplo, en células de glioma, una concentración 100 ng/ml de G-CSF incrementa la migración un 30-40% luego de 24 horas de tratamiento (Wang J. y col., 2012). Valores similares fueron obtenidos en células de carcinoma escamoso (Gutschalk C.M. y col., 2006).

Los hallazgos obtenidos hasta el momento muestran que en las células Swan 71, el G-CSF no promovió la proliferación ni la sobrevivencia ante un estímulo citotóxico ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Figura 3.12). Además, si bien aumentó la actividad y la expresión de la MMP-2, una proteasa involucrada en la degradación de la MEC durante la invasión de los trofoblastos a través de los tejidos maternos, no se observaron cambios en la expresión de la MT1-MMP. También esta

citoquina incrementó los niveles de secreción de VEGF, mediador indiscutido de la formación de nuevos vasos sanguíneos y de la red vascular placentaria. Más aún, el G-CSF indujo un aumento en los niveles de expresión de la integrina  $\beta 1$ , receptor característico de los trofoblastos extravellosos invasivos. Asimismo, el G-CSF promovió cambios en el citoesqueleto de actina y estimuló la migración de las células trofoblásticas Swan 71. Es por ello, que en su conjunto, estos resultados sugieren la participación activa del G-CSF en el proceso de implantación embrionaria, ya que no sólo favorece la aparición de un fenotipo invasivo en las células trofoblásticas, sino además, de un fenotipo migratorio. Estos cambios permiten, en última instancia, que los trofoblastos se aniden en la pared uterina materna y contribuyan al desarrollo tanto del embrión como del tejido placentario.



**Figura 3.12. Acciones biológicas del G-CSF en la línea de trofoblastos humanos Swan 71.**

## ***Capítulo 4***

# ***Participación de las vías de señalización en las acciones mediadas por el G-CSF***



# ***Resumen***

#### **4. Participación de las vías de señalización en las acciones mediadas por el G-CSF**

Muchos factores, como hormonas, interleuquinas, factores de crecimiento y enzimas, secretados tanto por los trofoblastos como por otros tipos celulares presentes en la interfase materno-fetal, están involucrados en la proliferación, la diferenciación, la migración y la invasión trofoblástica. Estos factores utilizan más de una cascada de transducción de señales para llevar a cabo sus funciones biológicas. Así, por ejemplo, entre las vías de señalización más frecuentemente activadas en estos procesos se hallan las proteínas JAK/STATs, las MAPKs, la vía mediada por la PI3K, la FAK y la cascada de ligandos de tipo Wnt (Fitzgerald J. y col., 2005; Knöfler M., 2010).

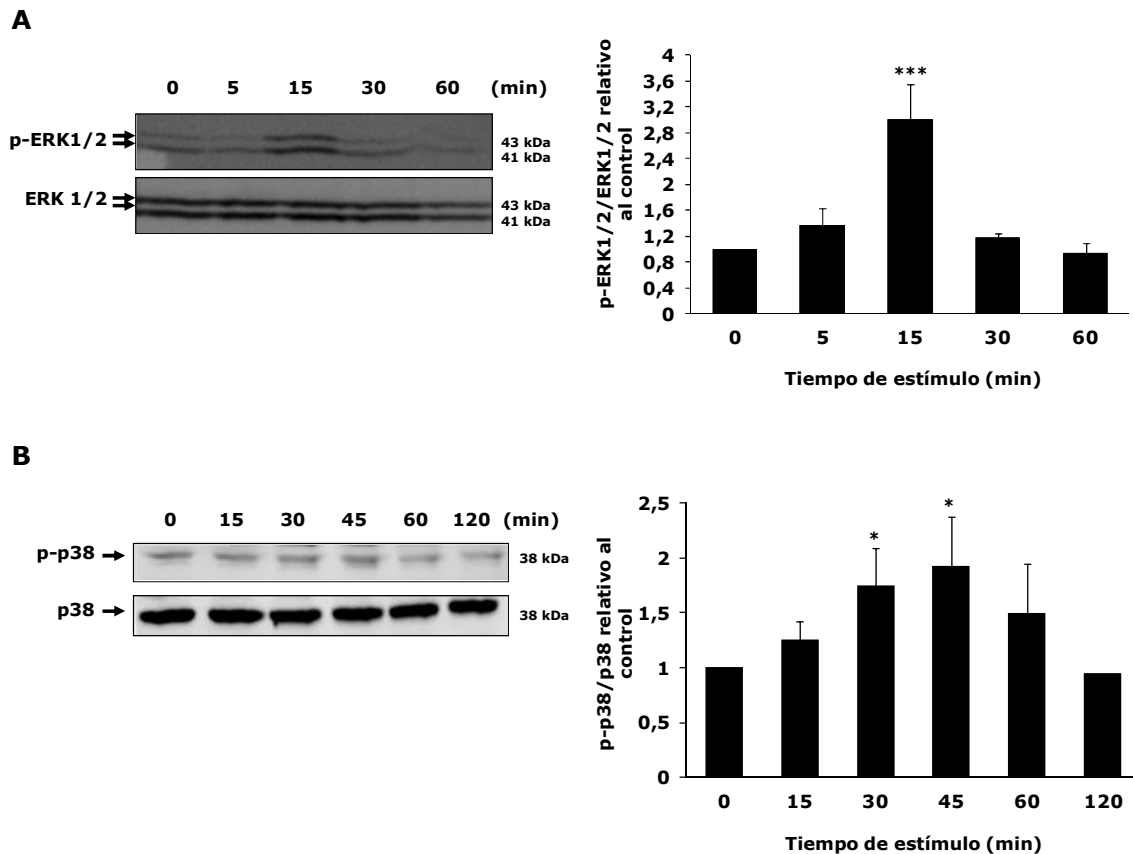
En el caso particular del G-CSF, fue demostrado que esta citoquina ejerce sus acciones biológicas a través de las vías de JAK/STATs, Ras/MAPKs y PI3K/Akt (Sampson M. y col., 2007). Es por ello que, en el marco de esta Tesis, se estudió la activación de algunas de las vías anteriormente mencionadas, como las cascadas de transducción de las MAPKs ERK1/2 y p38, y de PI3K/Akt, en las células trofoblásticas humanas Swan 71.

##### **4.1. Activación de las vías de MAPKs ERK1/2 y p38, y PI3k/Akt**

Numerosos estudios realizados en diferentes líneas celulares han demostrado que el G-CSF es capaz de estimular las vías de MAPKs (Rausch O. y Marshall C.J., 1999; Kamezaki K. y col., 2005; Kim S.O. y col., 2006; Geest C.R. y col., 2009) y PI3K/Akt (Nakamae-Akahori M. y col., 2006; Zhu Q.S. y col., 2006). Sin embargo, la participación del G-CSF en la activación de estas cascadas de señalización en células trofoblásticas, no ha sido ampliamente estudiada. Previamente, en nuestro laboratorio, fue demostrado que el G-CSF activa las vías de MAPKs p38 y ERK1/2 en la línea de coriocarcinoma humano JEG-3 (Marino J.V. y Roguin L.P., 2008). Asimismo, el GM-CSF, factor de crecimiento relacionado con el G-CSF, activa las vías de MAPKs ERK1/2 y

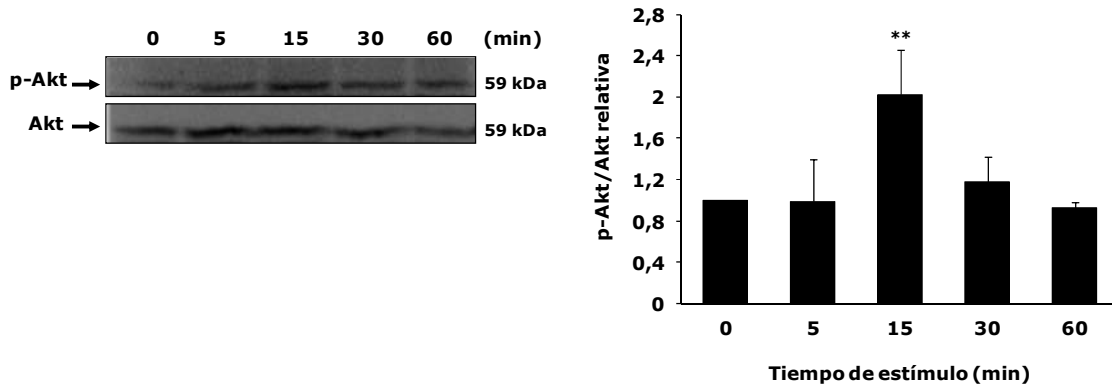
PI3K/Akt en células de trofoectodermo porcinas y estimula también la proliferación celular (Jeong W. y col., 2014).

Con el fin de evaluar si el G-CSF induce la activación de las vías de MAPKs y PI3K en las células Swan 71, las células privadas de SFB fueron estimuladas con 100 ng/ml de G-CSF durante distintos tiempos, y la cinética de fosforilación de las quinasas ERK1/2, p38 y Akt se examinó por ensayos de Western blot. Como se muestra en el Figura 4.1, el máximo nivel de fosforilación para ERK1/2 se observó luego de 15 minutos de incubación con el G-CSF (Figura 4.1A), mientras que para la MAPK p38, la mayor fosforilación se alcanzó luego de 30-45 minutos de estímulo (Figura 4.1B). Asimismo, el G-CSF



**Figura 4.1. Efecto del G-CSF sobre la activación de MAPKs ERK1/2 y p38.** Monocapas de células Swan 71 fueron privadas de SFB durante 24 horas y luego estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante distintos tiempos. Los lisados celulares fueron sometidos a WB con los anticuerpos específicos. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. **(A)** Cinética de activación de ERK1/2. **(B)** Cinética de activación de p38. **(A)** y **(B)** ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ;  $n = 3$ . p-ERK1/2: fosfo-ERK1/2; p-p38: fosfo-p38.

también fue capaz de activar la vía de PI3K/Akt en las células Swan 71. La fosforilación de Akt se produjo luego de incubar las células durante 15 minutos con una concentración de 100 ng/ml de la citoquina (Figura 4.2).

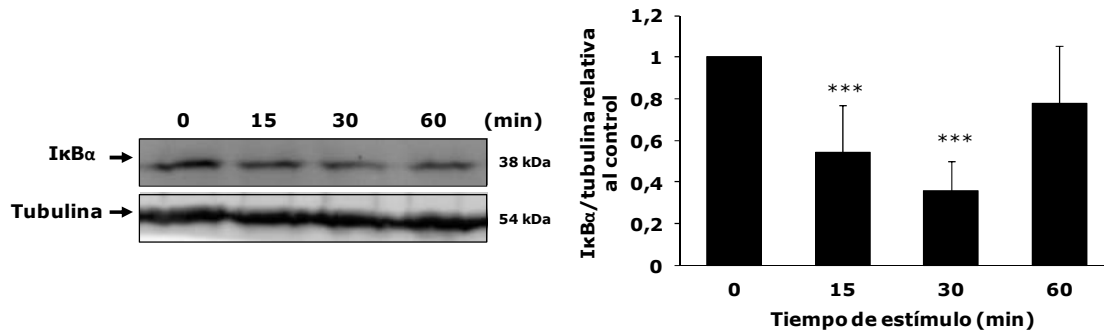


**Figura 4.2. Efecto del G-CSF sobre la activación de Akt.** Monocapas de células Swan 71 fueron privadas de SFB durante 24 horas y luego estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante distintos tiempos. Los lisados celulares fueron sometidos a WB con los anticuerpos específicos. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES de cuatro experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni,  $**p < 0,01$ . p-Akt: fosfo-Akt.

#### 4.2. Activación de la vía del factor nuclear $\kappa$ B

Tanto la cascada de MAPK ERK1/2 como la vía de PI3K/Akt activan numerosos blancos, entre los cuales se encuentra el factor nuclear  $\kappa$ B (Manning B.D. y Cantley L.C., 2007; Oeckinghaus A. y col., 2011; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). En general, en células en reposo, el NF- $\kappa$ B está unido a su inhibidor específico I $\kappa$ B. Cuando se produce un estímulo, I $\kappa$ B es fosforilado, ubiquitinizado y subsiguientemente degradado, y de este modo, permite la liberación de NF- $\kappa$ B y su posterior translocación al núcleo, donde regula la transcripción génica (Verma I.M., 2004; Oeckinghaus A. y Ghosh S., 2009; Hayden M.S. y Ghosh S., 2012). Con respecto al G-CSF, fue previamente demostrado que este factor activa la vía del factor nuclear  $\kappa$ B en un modelo murino de Alzheimer (Jiang H. y col., 2010).

Con el propósito de investigar el efecto del G-CSF sobre este factor de transcripción, se decidió evaluar tanto los niveles de expresión del inhibidor I $\kappa$ B, como la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo tras el estímulo con G-CSF.

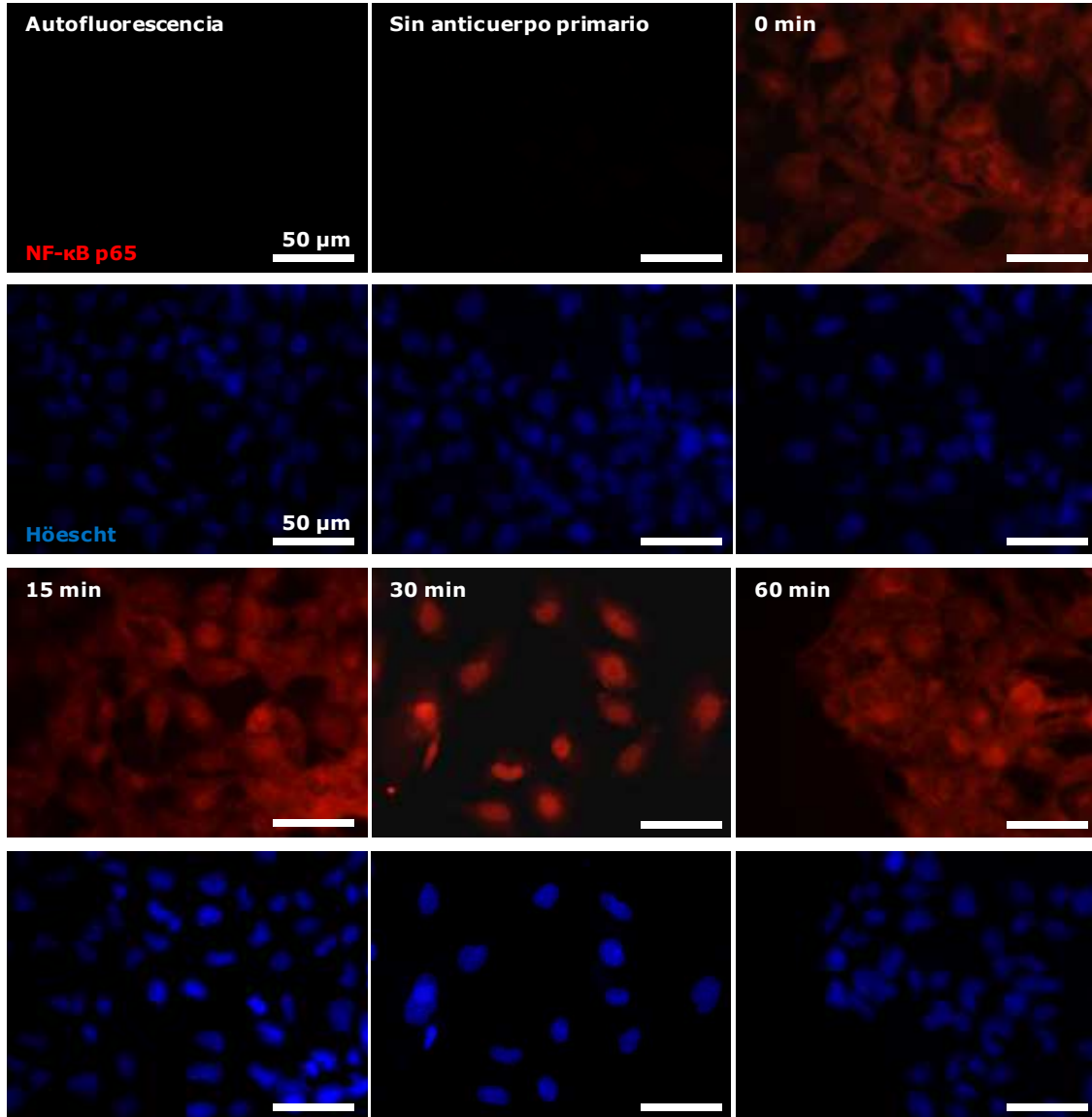


**Figura 4.3. Efecto del G-CSF sobre la expresión de I $\kappa$ B.** Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante 24 horas y luego fueron estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) por distintos tiempos. Los lisados celulares fueron sometidos a WB con un anticuerpo específico para I $\kappa$ B $\alpha$  y un anticuerpo anti-tubulina, como control de carga. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ .

En la Figura 4.3 se muestran los niveles de expresión de I $\kappa$ B en las células Swan 71 estimuladas con G-CSF durante distintos tiempos. Luego de 15 minutos de incubación con la citoquina se observó que la expresión del inhibidor disminuyó un 50%, mientras que a los 30 minutos, este valor fue de aproximadamente un 65%. Estos resultados sugieren que, luego del estímulo con G-CSF, los niveles de expresión de I $\kappa$ B disminuirían como consecuencia de una mayor fosforilación, ubiquitinización y posterior degradación del inhibidor en el proteosoma, proceso que facilitaría la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B.

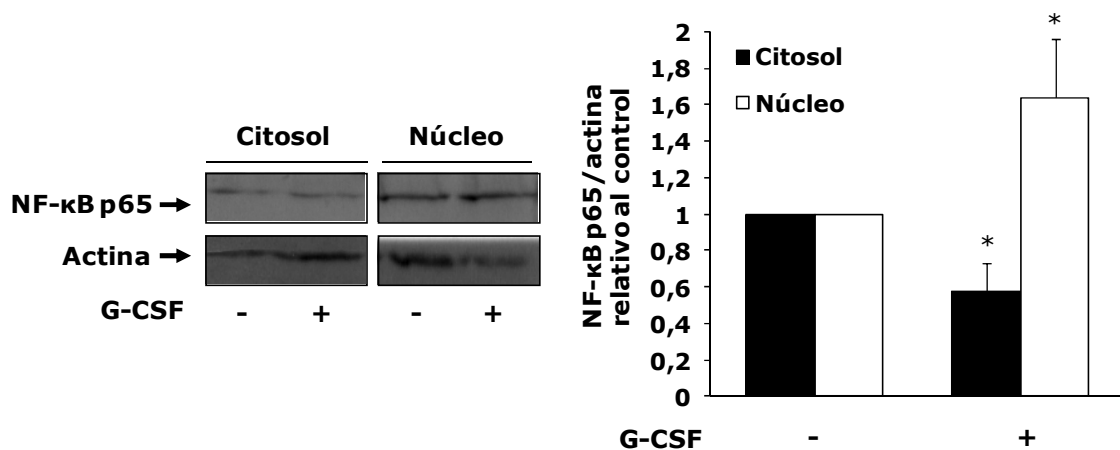
Asimismo, para evaluar la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B al núcleo, se realizaron ensayos de inmunocitoquímica de células Swan 71 estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante diferentes tiempos. En las imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia se observó que luego de incubar las células 30 minutos con el G-CSF, la marca fluorescente correspondiente al NF- $\kappa$ B fue encontrada mayoritariamente en el núcleo,

mientras que la localización fue citosólica para otros tiempos de incubación (Figura 4.4).



**Figura 4.4. Cinética de translocación de NF-κB al núcleo.** Las células Swan 71 sembradas sobre cubreobjetos, tratadas o no con 100 ng/ml de G-CSF durante diferentes tiempos, fueron fijadas con p-formaldehído 4% (p/v) en PBS y los sitios inespecíficos fueron bloqueados con una solución de BSA 1% (p/v) en PBS-Triton X-100 0,2% (v/v). Posteriormente, las células fueron incubadas con un anticuerpo primario anti-NF-κB p65 durante toda la noche a 4°C. Luego de lavar con PBS-Triton X-100 0,2% (v/v), las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Cy3. La fluorescencia se detectó en un microscopio de epifluorescencia. En la solución de montaje se agregó Höescht 33285 para teñir los núcleos.

Además, se realizaron ensayos de Western blot para confirmar la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo luego del estímulo con la citoquina. Estos ensayos mostraron que después de 30 minutos de estímulo con G-CSF, los niveles de NF- $\kappa$ B en la fracción nuclear aumentaron alrededor de un 50% y concomitantemente disminuyeron en el citosol (Figura 4.5).



**Figura 4.5. Translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo.** Lisados provenientes de monocapas de células Swan 71 tratadas o no con 100 ng/ml de G-CSF durante 30 minutos, y previamente separados en fracciones citosólica y nuclear, fueron sometidos a ensayos de WB. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. Test *t* de Student, \* $p < 0,05$ .

### 4.3. Participación de las vías de transducción en las acciones biológicas inducidas por el G-CSF

Para evaluar la participación de las vías de MAPKs ERK1/2 y p38, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en las acciones biológicas mediadas por el G-CSF en células Swan 71 (descritas en el Capítulo 3), se utilizaron dos estrategias distintas. Por un lado, se emplearon inhibidores farmacológicos de cada una de las vías de señalización implicadas; por otro lado, las células fueron transfectadas con

mutantes dominantes negativas de quinasas involucradas en estas cascadas de transducción.

### **4.3.1. Inhibidores farmacológicos**

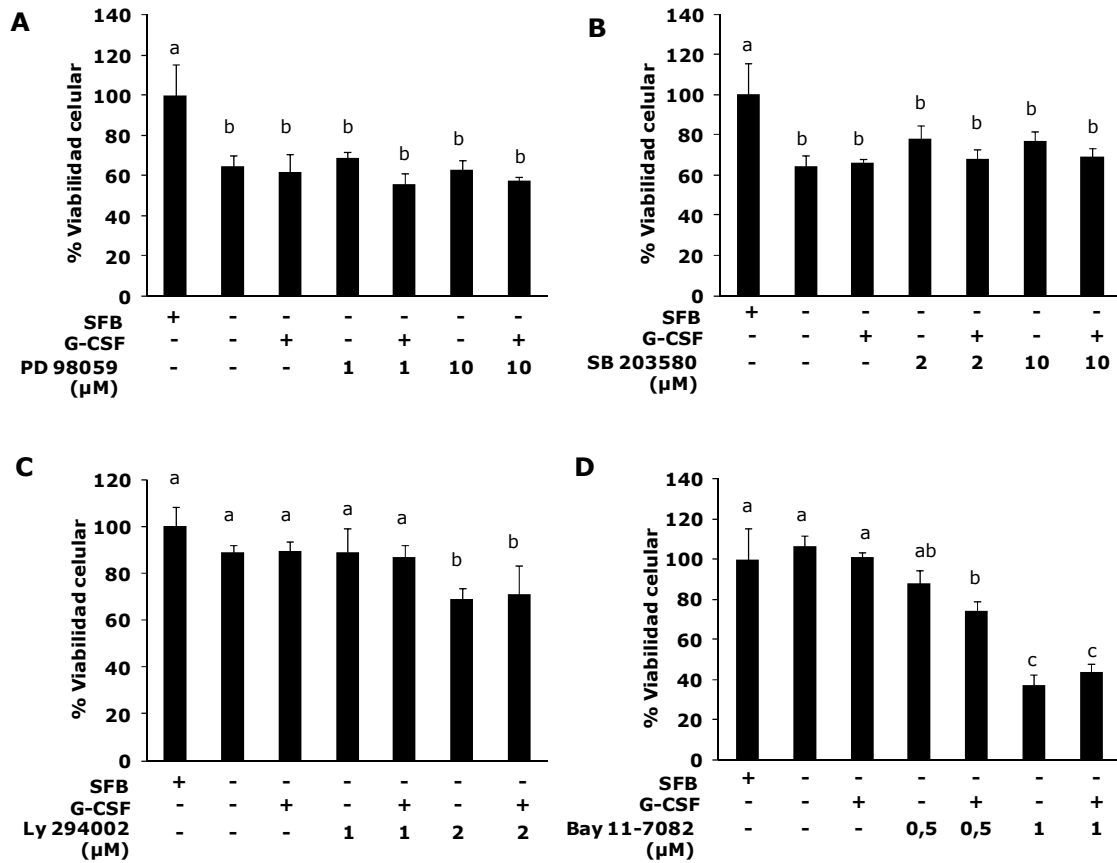
Se utilizaron los siguientes inhibidores farmacológicos de las distintas cascadas de señalización: PD 98059, un potente y selectivo inhibidor de MEK (Alessi D.R. y col., 1995); SB 203580, un inhibidor específico ampliamente utilizado para bloquear a la MAPK p38 (Cuenda A. y col., 1995); Ly 294002, un inhibidor específico de PI3K que se une al sitio de unión de ATP de la enzima (Vlahos C.J. y col., 1994); Bay 11-7082, un inhibidor irreversible de la fosforilación de I $\kappa$ B, y por lo tanto de la activación de NF- $\kappa$ B (Pierce J.W. y col., 1997); y MG-132, un péptido que inhibe la actividad proteolítica del proteosoma 26S y que es empleado para inhibir la degradación de I $\kappa$ B (Lee D.H. y Goldberg A.L., 1998).

#### **4.3.1.1. Evaluación de la toxicidad de los inhibidores farmacológicos**

Con el objeto de evaluar la toxicidad de diferentes concentraciones de inhibidores farmacológicos sobre la línea celular Swan 71, las células fueron incubadas en un medio sin SFB en presencia o ausencia de G-CSF y/o de los inhibidores durante 24 horas. En particular, se determinó la viabilidad celular a las 24 horas, ya que los efectos para MMP-2 y VEGF fueron obtenidos en ese tiempo. Como se observa en la Figura 4.6, las concentraciones ensayadas para PD 98059 (1 y 10  $\mu$ M) y SB 203580 (2 y 10  $\mu$ M) no disminuyeron la viabilidad de las células Swan 71, tanto en ausencia como en presencia del G-CSF (Figura 4.6A y B). Sin embargo, cuando las células fueron incubadas en presencia de Ly 294002, el uso de una concentración 2  $\mu$ M disminuyó significativamente la viabilidad celular, no así 1  $\mu$ M, que fue la concentración elegida para los ensayos posteriores (Figura 4.6C). A su vez, resultados similares fueron obtenidos con Bay 11-7082, ya que la incubación de células Swan 71 con una concentración 1  $\mu$ M disminuyó la viabilidad celular, por lo

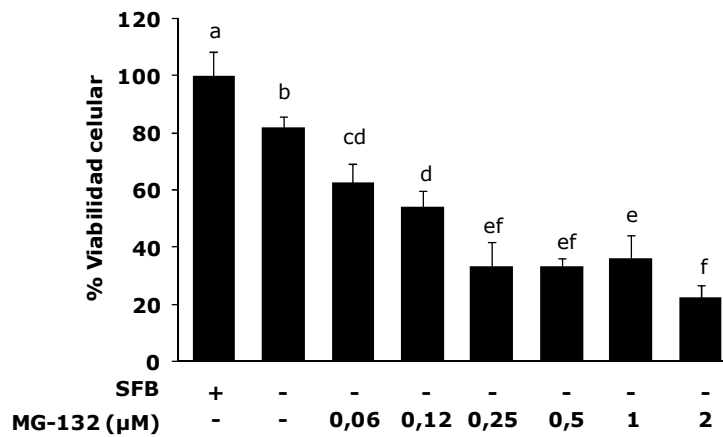


tanto se decidió trabajar con una concentración inferior, en este caso 0,5  $\mu$ M (Figura 4.6D).



**Figura 4.6. Efecto de inhibidores farmacológicos sobre la viabilidad de células Swan 71.** Células Swan 71 sembradas en placas de 96 pocillos fueron incubadas con distintas concentraciones de inhibidores farmacológicos de las vías de señalización en presencia o ausencia de 100 ng/ml de G-CSF durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTS. **(A)** PD 98059, inhibidor selectivo de MEK. **(B)** SB 203580, inhibidor selectivo de p38. **(C)** Ly 294002, inhibidor de PI3K. **(D)** Bay 11-7082, inhibidor de la fosforilación de I $\kappa$ B. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni,  $p < 0,001$ .

Cuando se evaluó la toxicidad del inhibidor del proteosoma MG-132, se encontró que todas las concentraciones ensayadas redujeron drásticamente la viabilidad de las células Swan 71 luego de 24 horas de tratamiento (Figura 4.7). Por esta razón, se descartó el uso de ese inhibidor.



**Figura 4.7. Efecto de MG-132 sobre la viabilidad de células Swan 71.** Células Swan 71 sembradas en placas de 96 pocillos fueron incubadas con distintas concentraciones del inhibidor farmacológico MG-132 durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTS. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

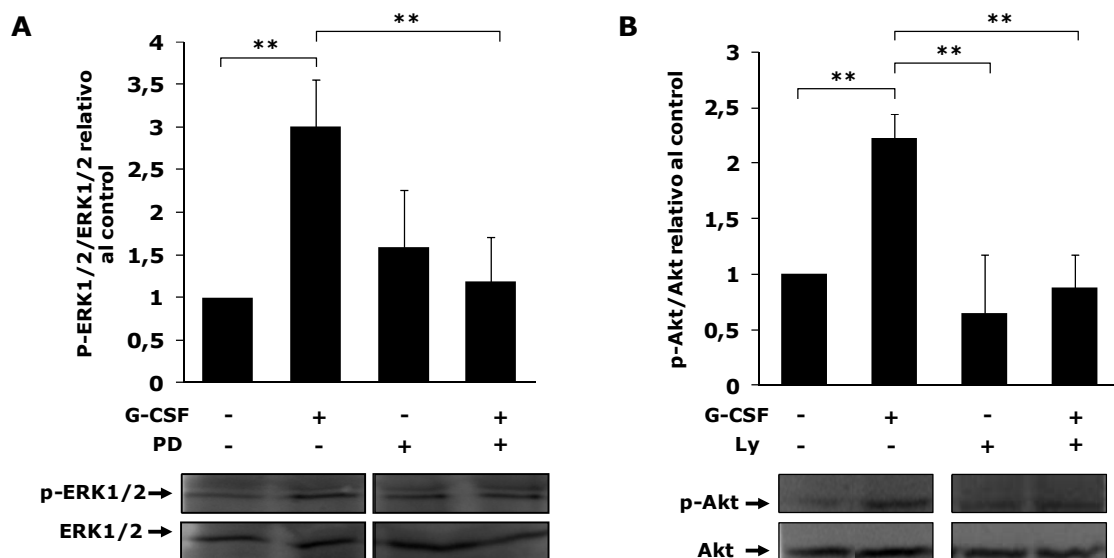
#### 4.3.1.2. Efectividad de los inhibidores farmacológicos

Con el propósito de corroborar que las concentraciones seleccionadas de los inhibidores farmacológicos fueran efectivas, las células Swan 71 fueron pre-tratadas durante una hora con cada inhibidor y luego fueron incubadas con G-CSF. Los tiempos de incubación empleados variaron según la proteína ensayada. Así, para el caso de ERK1/2 y Akt, el tiempo fue de 15 minutos, ya que en ese período se produjo la máxima fosforilación de estas proteínas inducida por el G-CSF (Figuras 4.1 y 4.2); mientras que para los niveles de expresión de IκB o la translocación nuclear del NF-κB, se emplearon 30 minutos, ya que en ese lapso de tiempo se evidenció la mayor disminución de los niveles de expresión del inhibidor (Figura 4.3) y la translocación del factor de transcripción al núcleo (Figuras 4.4 y 4.5).

En la Figura 4.8 se observa que tanto el inhibidor de MEK1, PD 98059, como el inhibidor de PI3K, Ly 294002, en las concentraciones ensayadas (1 μM) inhibieron la fosforilación inducida por el G-CSF de ERK1/2 y Akt, respectivamente.

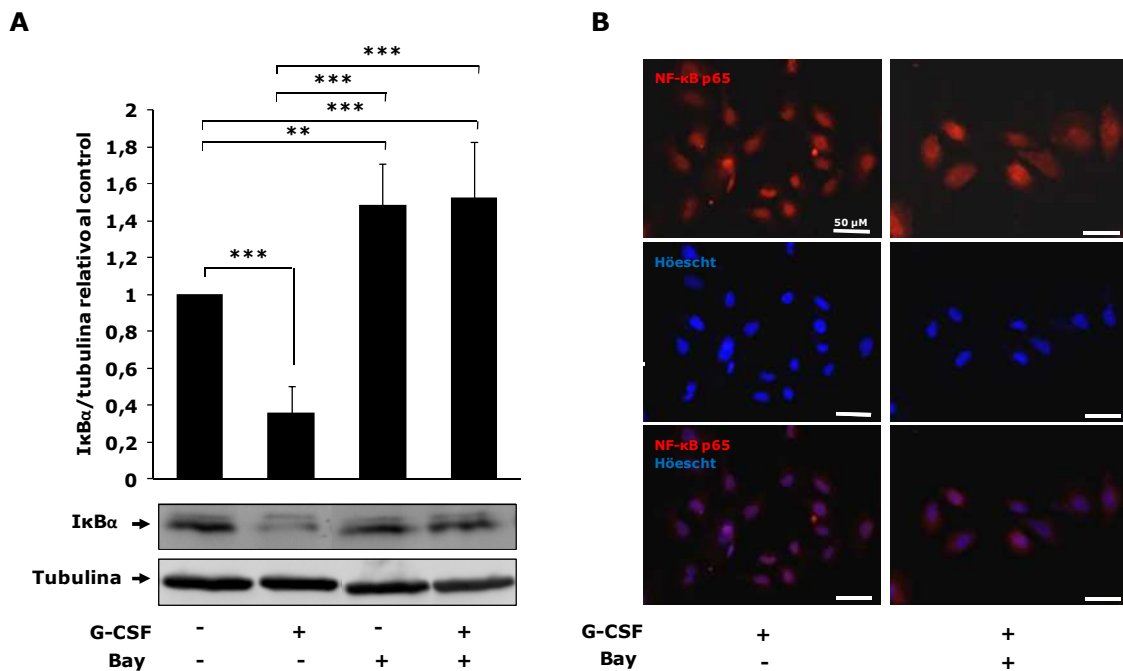
Por otra parte, cuando se evaluó el efecto inhibitorio de Bay 11-7082 sobre los niveles de expresión de I $\kappa$ B, se encontró que una concentración 0,5  $\mu$ M del inhibidor revirtió la disminución de los niveles de I $\kappa$ B inducida por el G-CSF luego de 30 minutos de incubación (Figura 4.9A). Asimismo, esa concentración de Bay 11-7082 impidió la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B promovida por el G-CSF luego de 30 minutos de estímulo (Figura 4.9B).

En el caso del inhibidor específico de la quinasa p38, SB 203580, no se pudo comprobar su acción a una concentración de 2  $\mu$ M porque no se contaba con un blanco de esta proteína, ya que este inhibidor no bloquea la fosforilación de la MAPK p38, sino su acción catalítica (van den Blink B. y col., 2001). De todos modos, en bibliografía está ampliamente reportada la efectividad del SB 203580 a la concentración utilizada en nuestros ensayos. En este sentido, Craxton A. y colaboradores (1998) observaron que la inhibición de MAPKAPK2, un blanco "downstream" MAPK p38 (Sudo T. y col., 2005), es dependiente de la concentración de SB 203580 ensayada y demostraron que, a



**Figura 4.8. Efecto de inhibidores farmacológicos sobre la fosforilación de ERK1/2 y Akt inducida por el G-CSF.** Monocapas de células Swan 71 fueron privadas de SFB durante 24 horas y luego fueron pre-tratadas por una hora con PD 98059 (1  $\mu$ M) (A) o Ly 294002 (1  $\mu$ M) (B). Posteriormente, fueron estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante 15 minutos. Los lisados celulares fueron sometidos a un WB con los anticuerpos específicos para ERK y Akt y sus formas fosforiladas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES. En el panel superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni,  $**p < 0,01$ ,  $n=3$ . p-ERK1/2: fosfo-ERK1/2; p-Akt: fosfo-Akt.

partir de una concentración 1  $\mu\text{M}$ , se evidencia la inhibición de la actividad enzimática de esta quinasa blanco. Por otro lado, es importante resaltar que los ensayos en los que se utilizó SB 203580 fueron validados en paralelo mediante el uso de una mutante dominante negativa de la MAPK p38.



**Figura 4.9. Efecto del Bay 11-7082 sobre la disminución de los niveles de expresión de IκB y la translocación nuclear de NF-κB inducidas por el G-CSF.** (A) Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante 24 horas y luego fueron pre-tratadas o no por una hora con Bay 11-7082 (0,5  $\mu\text{M}$ ). A continuación, las células fueron estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante 30 minutos. Los lisados celulares fueron sometidos a WB con un anticuerpo específico para IκBα y un anticuerpo anti-tubulina, como control de carga. En el panel superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguido del test de Bonferroni, \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . (B) Células Swan 71 sembradas sobre cubreobjetos fueron pre-tratadas o no por una hora con Bay 11-7082 (0,5  $\mu\text{M}$ ) y luego fueron incubadas con 100 ng/ml de G-CSF durante 30 minutos. Posteriormente, fueron preparadas para inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos.

### 4.3.2. Mutantes dominantes negativas

Las mutantes dominantes negativas constituyen una alternativa para inhibir la función de una proteína de interés, ya que bloquean la función de la proteína silvestre o "wild type" (Sheppard D., 1994).

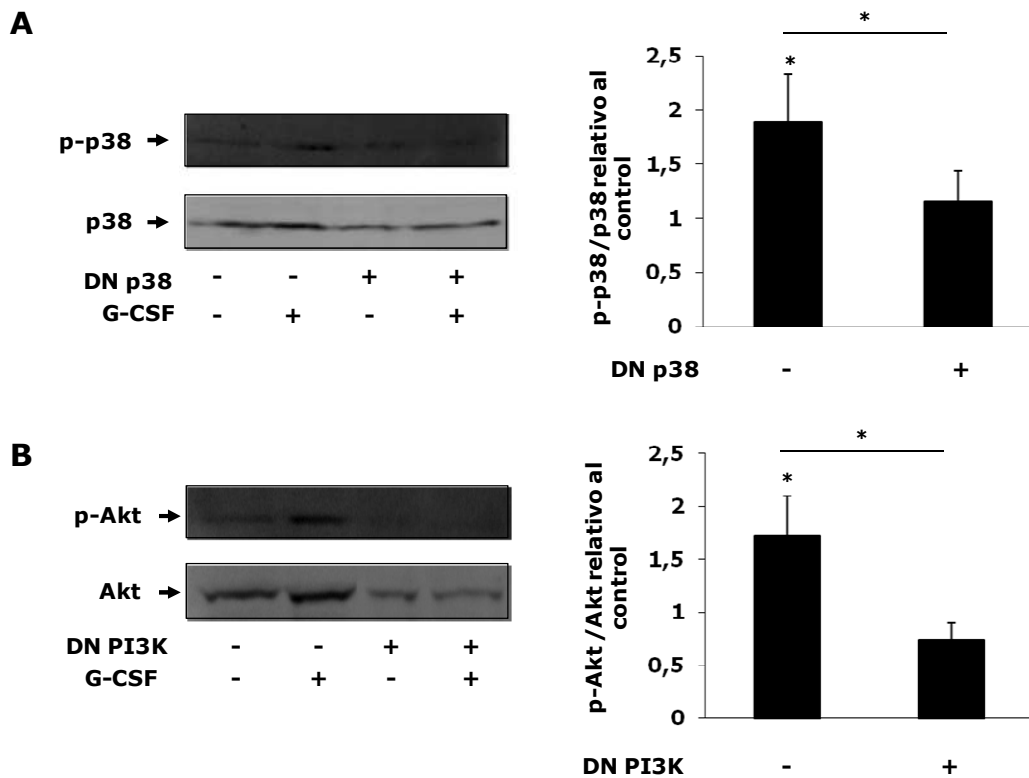
Como segunda estrategia para evaluar las vías que participan en las acciones biológicas promovidas por el G-CSF en la línea Swan 71, las células fueron transfectadas con mutantes dominantes negativas (DN) de las quinasas ERK1/2, p38 y PI3K. Los plásmidos utilizados en las transfecciones fueron los siguientes: i) pCEP4 ERK1 K71R y pCEP4 ERK2 K52R, que codifican para mutantes de ERK1/2 que carecen de actividad catalítica (Robbins D.J. y col., 1993); ii) pcDNA3 p38 $\alpha$  T180A/Y182F, que codifica para una p38 $\alpha$  cuyo sitio de fosforilación está mutado (Han J. y col., 1994); y iii) pWZL-neo  $\delta$ p85 del478-513, que codifica para la subunidad regulatoria de PI3K desprovista del dominio SH2 necesario para la regulación de la subunidad catalítica p110 (Zhao J.J. y col., 2003; Geering B. y col., 2007).

#### 4.3.2.1. Efectividad de las mutantes dominantes negativas

En el caso particular de las mutantes dominantes negativas de ERK1 y ERK2 (K71R y K52R, respectivamente) la efectividad de las mismas fue determinada previamente por varios grupos de investigación. En este sentido, como las mutantes carecen de actividad catalítica, pero mantienen sus sitios de fosforilación intactos, ha sido descrito que el nivel de fosforilación de un sustrato exógeno, como la proteína básica de mielina, se encuentra disminuido en células transfectadas con respecto al nivel encontrado en células sin transfectar (Robbins D.J. y col., 1993; Park S. y col., 2004).

Con el objeto de corroborar que las transfecciones con las mutantes dominantes negativas de MAPK p38 (#20352, Addgene) y PI3K (#10888, Addgene) resultaran efectivas, las células Swan 71, transfectadas o no con las dominantes negativas de las quinasas p38 y PI3K (DN p38 y DN PI3K), fueron estimuladas con una concentración 100 ng/ml de G-CSF durante los tiempos

en que se observó el mayor nivel de fosforilación inducido por la citoquina para cada proteína a estudiar. Así, para el caso de Akt el tiempo fue de 15 minutos, mientras que para la MAPK p38 fue de 45 minutos (Figuras 4.1 y 4.2). En la Figura 4.10A, se observa que las células Swan 71 transfectadas con los plásmidos que codifican para la DN p38 presentan menor nivel de fosforilación de esa quinasa luego del estímulo con el G-CSF con respecto a los niveles de fosforilación en células estimuladas sin transfectar. Resultados similares en los niveles de fosforilación de Akt fueron obtenidos para la DN PI3K (Figura 4.10B).



**Figura 4.10. Efectividad de la transfección con las mutantes dominantes negativas.**

Células Swan 71 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para las mutantes dominantes negativas (DN) de **(A)** MAPK p38 (DN p38) y **(B)** PI3K (DN PI3K). Posteriormente, las células fueron estimuladas con G-CSF (100 ng/ml) durante 45 **(A)** o 15 minutos **(B)**. Los lisados celulares fueron sometidos a un WB con los anticuerpos específicos según corresponda. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES. En el panel de la derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Test *t* de Student. \* $p < 0,05$ . p-p38: fosfo-p38; p-Akt: fosfo-Akt.

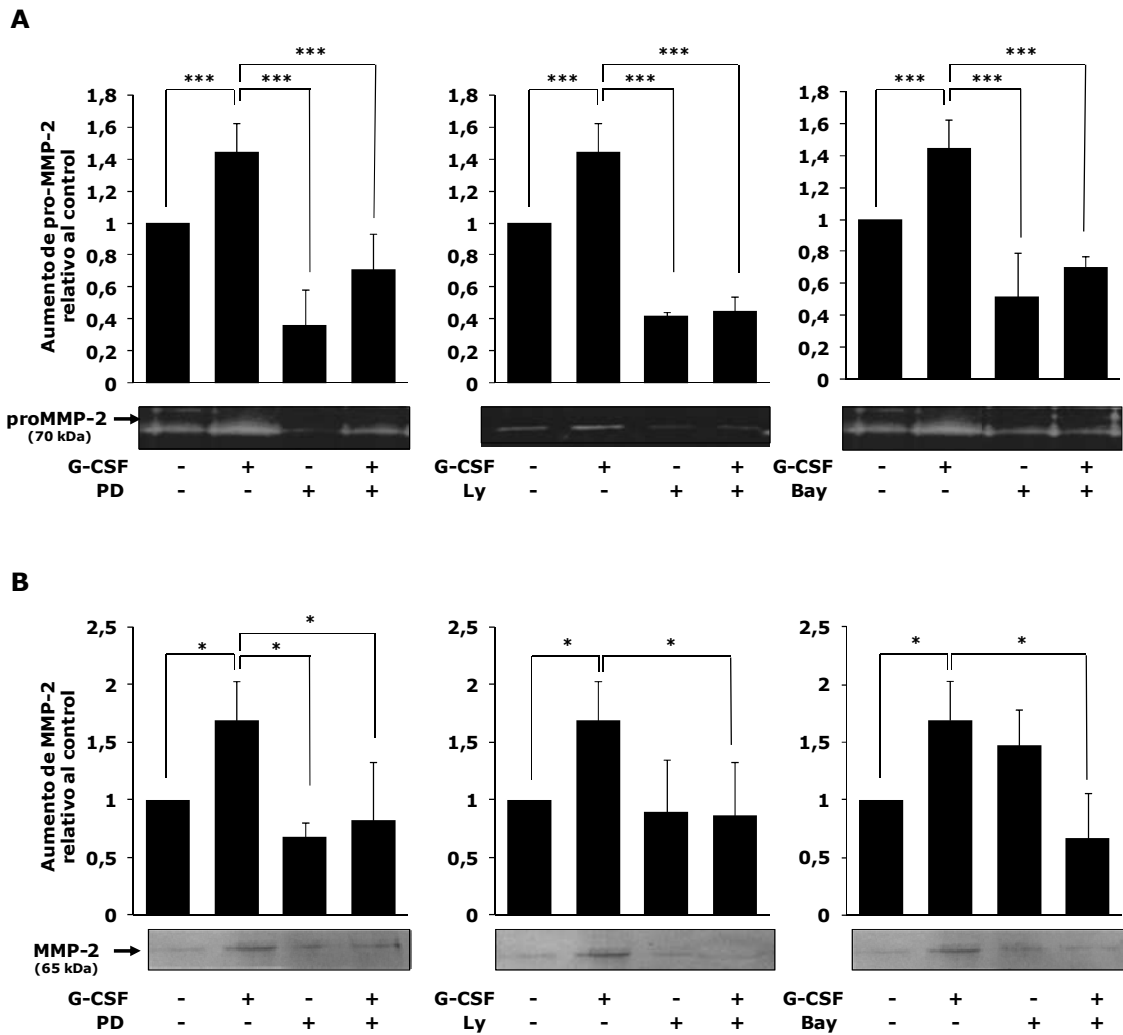
### **4.3.3. Efecto de los inhibidores farmacológicos y/o mutantes dominantes negativos sobre las acciones biológicas inducidas por el G-CSF**

Para evaluar la participación de las vías de transducción activadas por el G-CSF en las acciones biológicas desencadenadas por esta citoquina en la línea Swan 71, las células fueron incubadas en presencia de los correspondientes inhibidores farmacológicos y/o mutantes dominantes negativos.

Teniendo en cuenta que las vías de MAPK ERK1/2, PI3K y del factor nuclear  $\kappa$ B han sido previamente descritas como cascadas de señalización involucradas en la inducción de la secreción de la MMP-2 (Wang L. y col., 2006; Su Y. y col., 2013) y del VEGF (Shibata A. y col., 2002; Giuliani N. y col., 2004), decidimos evaluar el efecto de los inhibidores específicos de estas vías, PD 98059, Ly 294002 y Bay 11-7082, sobre el aumento de los niveles de expresión de MMP-2 y VEGF inducidos por el G-CSF.

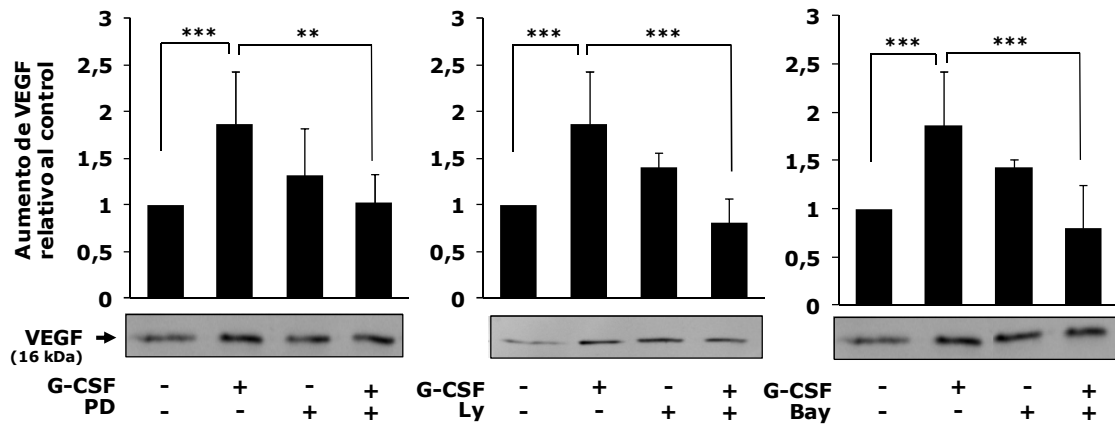
En la figura 4.11 se observa que el pre-tratamiento de las células Swan 71 con los inhibidores PD 98059, Ly 294002 o Bay 11-7082 revirtió en cada caso el incremento de los niveles de actividad gelatinolítica (Figura 4.11A) y los niveles de expresión (Figura 4.11B) de MMP-2 en sobrenadantes de células estimuladas con 100 ng/ml de G-CSF.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se determinó el efecto de los inhibidores farmacológicos sobre el aumento de los niveles de secreción de VEGF en sobrenadantes de células tratadas con G-CSF durante 24 horas (Figura 4.12). Como se muestra en la Figura 4.12, en presencia de los tres inhibidores farmacológicos ensayados no se produjo el aumento en los niveles de secreción de VEGF inducido por el G-CSF.



**Figura 4.11. Efecto de los inhibidores farmacológicos sobre el aumento de la actividad y la expresión de MMP-2 inducido por G-CSF.** Células Swan 71 fueron pre-tratadas por una hora con PD98059 (1  $\mu$ M), Ly 294002 (1  $\mu$ M) o Bay 11-7082 (0,5  $\mu$ M) y luego fueron incubadas con 100 ng/ml de G-CSF en medio de crecimiento sin SFB durante 24 horas. Los sobrenadantes concentrados fueron secados y sometidos a ensayos de **(A)** zimografía o **(B)** Western blot, como se describe en Materiales y Métodos. Cada ensayo representativo es acompañado por un gráfico que muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \* $p$ <0,05, \*\*\* $p$ <0,001.



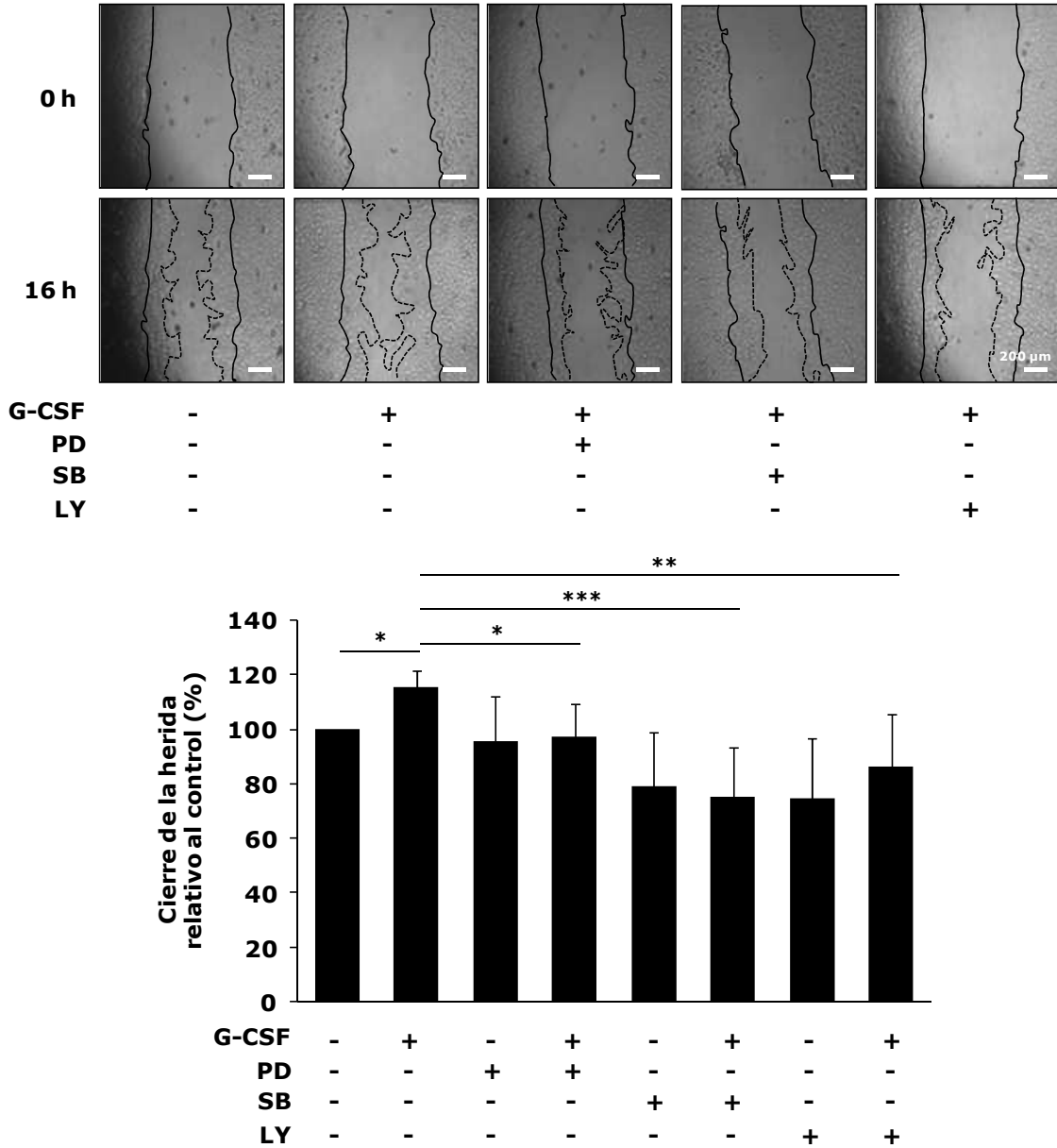


**Figura 4.12. Efecto de inhibidores farmacológicos sobre el aumento de VEGF inducido por G-CSF.** Células Swan 71 fueron pre-tratadas por una hora con PD 98059 (1  $\mu$ M), Ly 294002 (1  $\mu$ M) o Bay 11-7082 (0,5  $\mu$ M) y luego fueron incubadas en medio de crecimiento sin SFB con 100 ng/ml de G-CSF durante 24 horas. Los sobrenadantes concentrados (80  $\mu$ l) fueron secados y sometidos a WB, como se describe en Materiales y Métodos. En el panel superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados representan la media  $\pm$  ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

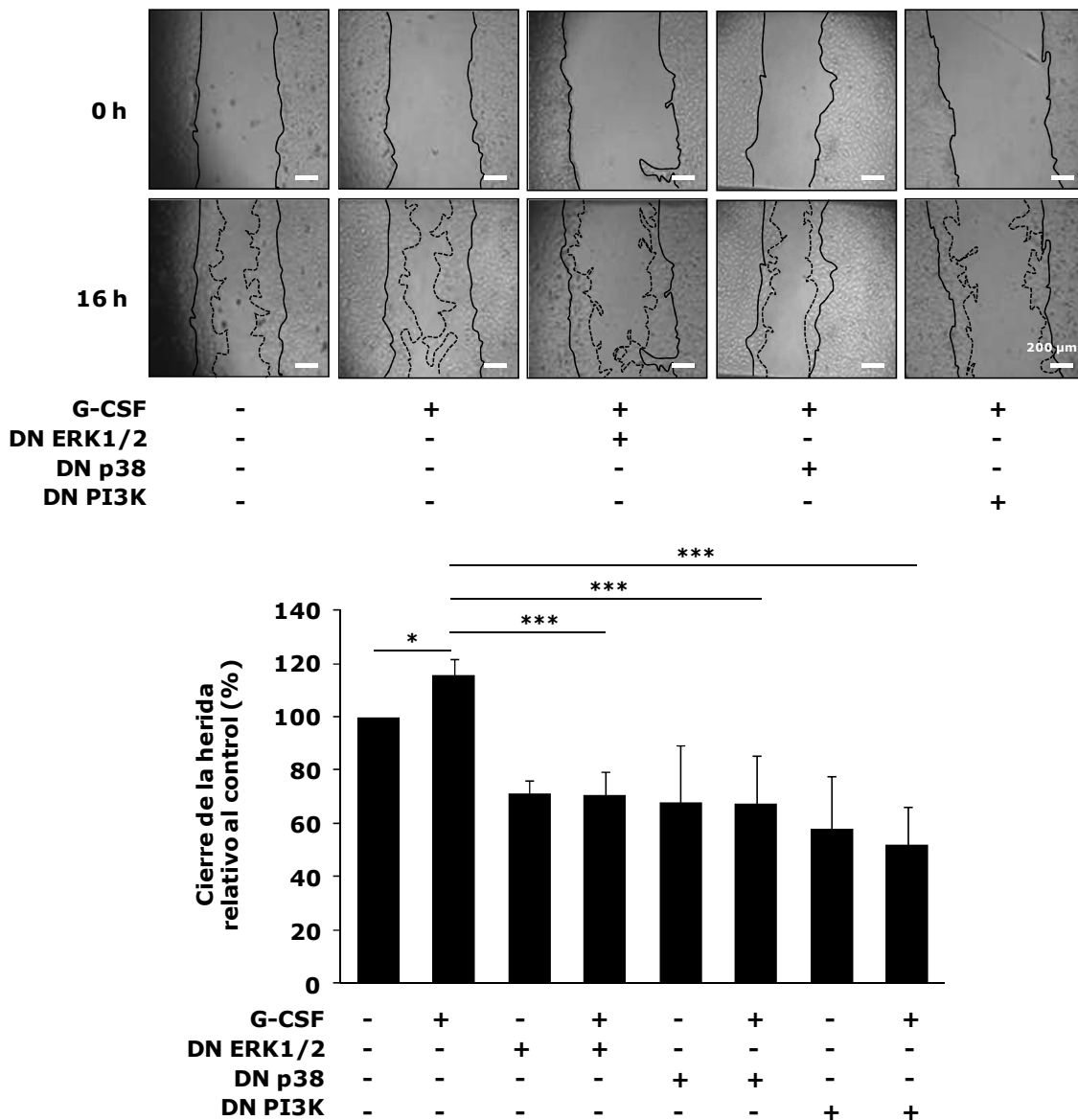
Además, se estudió la participación de las cascadas de MAPKs ERK1/2 y p38, así como la de PI3K/Akt en la migración de las células Swan 71 inducida por el G-CSF. La contribución de estas cascadas de transducción en la migración de distintos tipos celulares fue informada por diferentes grupos de investigación. De esta manera, tanto las cascadas de MAPKs (Huang C. y col., 2004) como la vía de PI3K/Akt (Huang C.Y. y col., 2009) son consideradas actores fundamentales en el proceso de migración celular. Para determinar si estas vías estaban involucradas en la promoción de la migración mediada por el G-CSF, se utilizaron inhibidores farmacológicos específicos de las cascadas de transducción y mutantes dominantes negativas en el ensayo de la herida.

En la Figura 4.13 se observa el efecto de los inhibidores farmacológicos de las vías de MAPKs ERK1/2 (PD 98059) y p38 (SB 203580), y de la vía de PI3K/Akt (Ly 294002) en la migración de las células Swan 71 inducida por el G-CSF luego de 16 horas de estimulación. El pre-tratamiento de las células con los tres inhibidores revirtió el aumento del 20% de la migración inducido por el G-CSF. Asimismo, la transfección de las células con las mutantes dominantes

negativas de las quinasas ERK1/2, p38 y PI3K también disminuyó el efecto migratorio inducido por el G-CSF (Figura 4.14).



**Figura 4.13. Efecto de los inhibidores farmacológicos sobre la migración inducida por G-CSF.** Células Swan 71 fueron pre-tratadas por una hora con PD 98059 (1  $\mu$ M), SB 203580 (2  $\mu$ M) o Ly 294002 (1  $\mu$ M). Luego de realizar la herida con un tip p10, las células fueron incubadas en medio de crecimiento sin SFB con 100 ng/ml de G-CSF en presencia o ausencia de los inhibidores durante 16 horas. Se tomaron fotografías en los tiempos 0 y 16 horas. El área de la herida fue medida con el programa ImageJ. En el panel inferior se muestra el análisis de los resultados, que están expresados como la media  $\pm$  ES del porcentaje de cierre de la herida respecto del control de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 4.14. Efecto de las mutantes dominantes negativas sobre la migración inducida por G-CSF.** Células Swan 71 fueron transfectadas con plásmidos que codifican para las mutantes dominantes negativas de MAPK ERK1/2 (DN ERK1/2), MAPK p38 (DN p38) y PI3K (DN PI3K). Luego de realizar la herida con un tip p10, las células fueron incubadas en medio de crecimiento sin SFB con 100 ng/ml de G-CSF durante 16 horas. Se tomaron fotografías en los tiempos 0 y 16 horas. El área de la herida fue medida con el programa ImageJ. En el panel inferior se muestra el análisis de los resultados, que están expresados como la media  $\pm$  ES del porcentaje de cierre de la herida respecto del control de seis experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.4. Intercomunicación (“*cross-talk*”) de vías de señalización

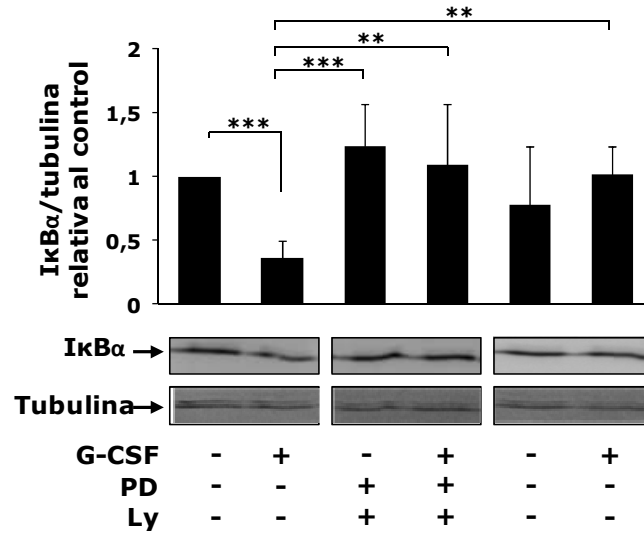
Con el fin de establecer si existe alguna intercomunicación (“*cross-talk*”) entre las vías de transducción activadas por el G-CSF en las células Swan 71, se utilizaron inhibidores farmacológicos y mutantes dominantes negativos como estrategias de bloqueo de las cascadas. De este modo, se trata de determinar si se afecta la activación de alguna(s) de las moléculas blanco que se encuentran “*dowstream*” en una vía de señalización en particular.

Previamente fue descrito que tanto la cascada de MAPK ERK1/2 como la de PI3K/Akt podían estar involucradas en la regulación del factor nuclear  $\kappa$ B (McCubrey J.A. y col., 2006; Huang C.Y. y col., 2009; Shant J. y col., 2009; Kloster M.M. y col., 2011). Con el fin de explorar si alguna de estas vías media la activación del NF- $\kappa$ B, evaluamos el efecto de inhibidores farmacológicos de ambas cascadas de señalización (PD 98059 y Ly 294002) sobre los niveles de expresión de I $\kappa$ B y sobre la translocación nuclear del NF- $\kappa$ B.

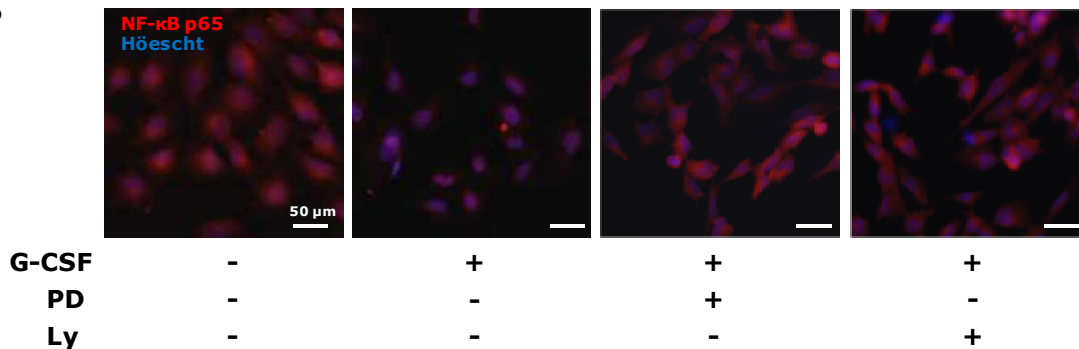
En la Figura 4.15A se observa que la incubación de las células en presencia de los inhibidores PD 98059 y Ly 294002 revierte la disminución de los niveles de expresión de I $\kappa$ B promovida por el G-CSF. Asimismo, el pre-tratamiento con estos inhibidores impidió la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B estimulada luego de la incubación con G-CSF durante 30 minutos (Figura 4.15B).

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio y por otros grupos de investigación revelaron que, dependiendo del tipo celular y de la clase de estímulo, PI3K puede comportarse como un regulador “*upstream*” de la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y p38 (Zhuang Z.Y. y col., 2004; Sahay B. y col., 2009; Blank V.C. y col., 2013; Ebi H. y col., 2013). Con el propósito de dilucidar si esta secuencia de activaciones ocurría en la línea Swan 71 luego del estímulo con G-CSF, se evaluó la fosforilación de p38 y ERK1/2 en presencia del inhibidor específico de PI3K y de la mutante dominante negativa de esta quinasa.

**A**



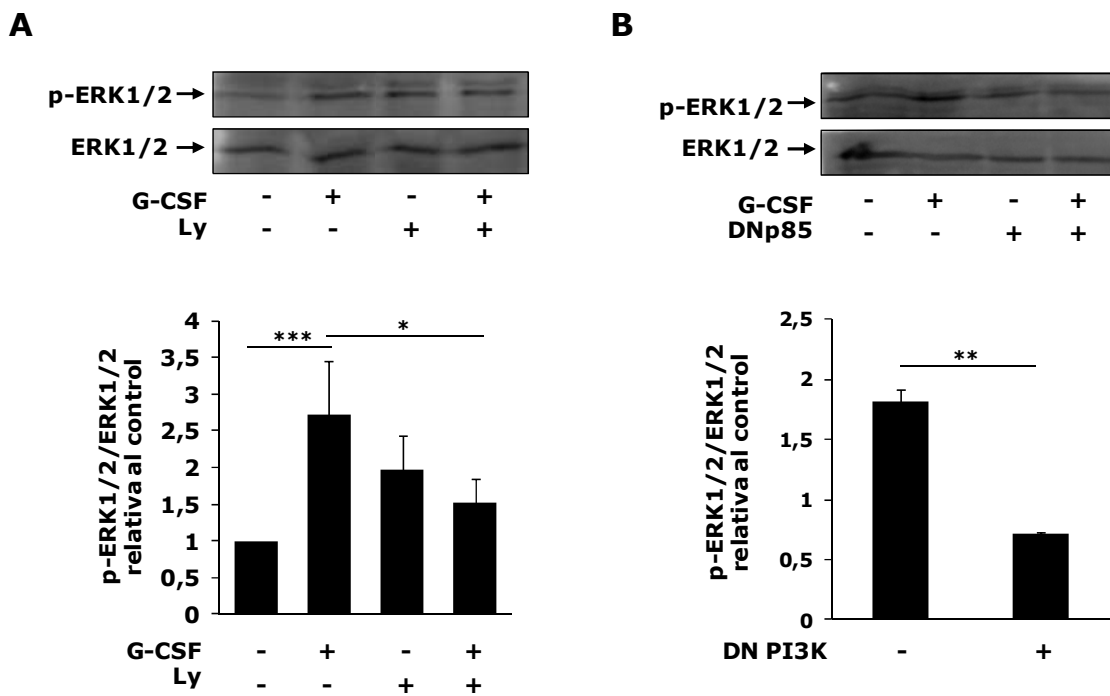
**B**



**Figura 4.15. Efecto de inhibidores de las vías de MAPK ERK1/2 y PI3K/Akt sobre los niveles de expresión de IκB y la translocación de NF-κB inducidos por el G-CSF. (A)** Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante 24 horas y luego fueron pre-tratadas o no por una hora con PD 98059 (1 μM) o Ly 294002 (1 μM). Luego de estimular las células con G-CSF (100 ng/ml) durante 30 minutos, los lisados celulares fueron sometidos a WB con un anticuerpo específico para IκBα y un anticuerpo anti-tubulina, como control de carga. En el panel superior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados están expresados como la media ± ES de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. **(B)** Células Swan 71 sembradas sobre cubreobjetos y deprivadas de SFB durante 24 horas fueron pre-tratadas por una hora con PD 98059 (1 μM) o Ly 294002 (1 μM) y luego incubadas con 100 ng/ml de G-CSF durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó la inmunocitoquímica como se describe en Materiales y Métodos.

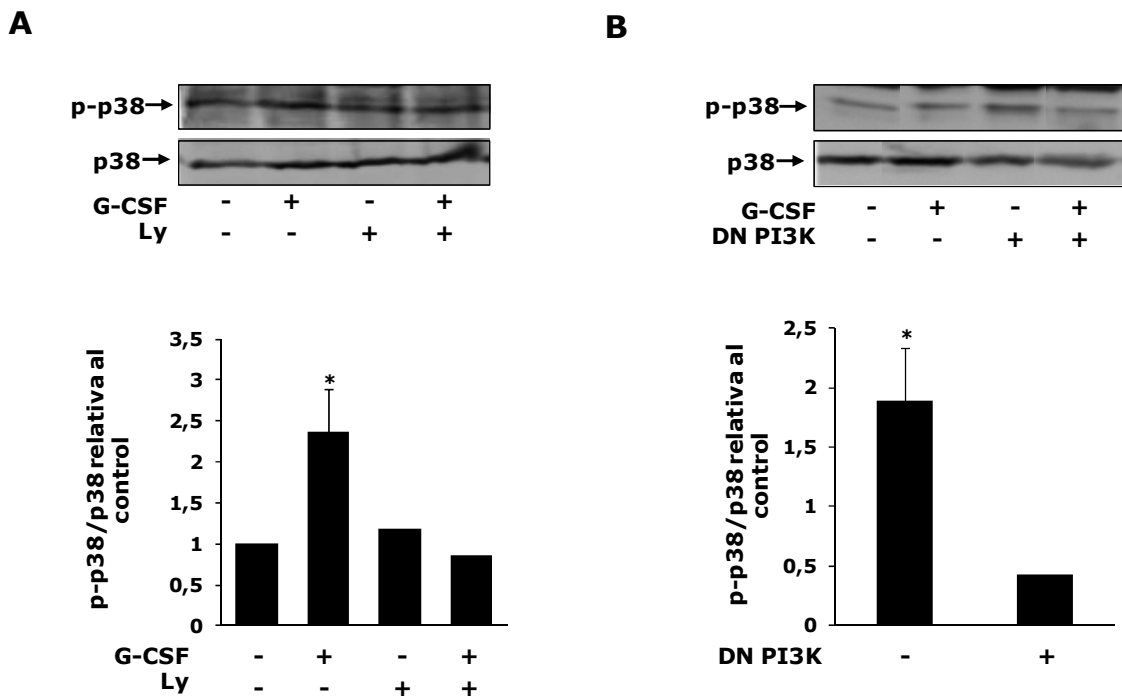
Cuando las células Swan 71 fueron preincubadas con Ly 294002 durante 1 hora y luego fueron estimuladas con G-CSF por 15 minutos, se observó claramente que la presencia del inhibidor revirtió la fosforilación de ERK1/2 inducida por el G-CSF (Figura 4.16A). Resultados equivalentes fueron obtenidos cuando las células fueron transfectadas con la mutante dominante negativa de PI3K; la fosforilación de ERK1/2 promovida por el G-CSF luego de 15 minutos no se produjo en las células transfectadas (Figura 4.16B).

Además, las células Swan 71 pre-incubadas con Ly 294002 durante 1 hora fueron estimuladas con G-CSF por 45 minutos para evaluar los niveles de fosforilación de p38. Como se puede apreciar en la Figura 4.17A, el pre-



**Figura 4.16. Efecto del bloqueo de la vía PI3K sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducidos por el G-CSF. (A)** Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante 24 horas y luego fueron pre-tratadas o no por una hora con Ly 294002 (1  $\mu$ M). **(B)** Células Swan 71 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la mutante dominante negativa de PI3K. **(A)** y **(B)**. Luego de estimular las células con G-CSF (100 ng/ml) durante 15 minutos, los lisados celulares fueron sometidos a WB con un anticuerpo específico para p-ERK1/2 y ERK1/2. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES de cuatro **(A)** o tres **(B)** experimentos independientes. ANOVA de una vía, seguida del test de Bonferroni, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . p-ERK1/2: fosfo-ERK1/2.

tratamiento de las células con Ly 294002 disminuyó los niveles de fosforilación de p38 inducidos por el G-CSF. Cuando se evaluó la activación de esta MAPK tras el estímulo de G-CSF en las células que fueron transfectadas con la mutante dominante negativa de PI3K, se observó que los niveles de fosforilación disminuyeron con respecto a las células sin transfectar (Figura 4.17B).



**Figura 4.17. Efecto del bloqueo de la vía PI3K sobre los niveles de fosforilación de p38 inducidos por el G-CSF. (A)** Monocapas de células Swan 71 fueron deprivadas de SFB durante 24 horas y luego fueron pre-tratadas o no por una hora con Ly 294002 (1  $\mu$ M). **(B)** Células Swan 71 fueron transfectadas con un plásmido que codifica para la mutante dominante negativa de PI3K. **(A)** y **(B)** Luego de estimular las células con G-CSF (100 ng/ml) durante 45 minutos, los lisados celulares fueron sometidos a WB con un anticuerpo específico para p-p38 y p38. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ES. Test *t* de Student, \**p*<0,05; *n*=3 **(A)**, *n*=4 **(B)**. p-p38: fosfo-p38.

#### 4.5. Discusión

Entre las vías de señalización que activa el G-CSF fueron informadas, entre otras, la vía de PI3K (Nakamae-Akahori M. y col., 2006; Zhu Q.S. y col.,

2006), de las MAPKs ERK1/2 (Kamezaki K. y col., 2005; Geest C.R. y col., 2009), JNK (Kim S.O. y col., 2006) y p38 (Rausch O. y Marshall C.J., 1999), así como la vía de NF- $\kappa$ B (Jiang H. y col., 2010). Estas cascadas de transducción de señales, además, fueron relacionadas con los procesos de proliferación, diferenciación, migración e invasión trofoblástica (Fitzgerald J. y col., 2005; Knöfler M., 2010).

Puesto que se desconocía, hasta el momento, la presencia de receptores funcionales para G-CSF en las células Swan 71, decidimos investigar algunas de las vías de señalización que se activan luego de la interacción de la citoquina con sus receptores. Es por ello que evaluamos las cinéticas de fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y p38, de PI3K/Akt y los niveles de expresión del factor nuclear  $\kappa$ B y su inhibidor (IkB), y demostramos, por primera vez, que el G-CSF está mediando la activación de estas vías en la línea de células trofoblásticas humanas Swan 71. Como indicamos anteriormente, la activación de estas cascadas por diferentes tipos de estímulos ha sido relacionada con múltiples respuestas biológicas involucradas en la regulación de la función de células trofoblásticas (Fitzgerald J. y col., 2005; Knöfler M., 2010).

Con el propósito de investigar cuáles son las vías de señalización que participan en las acciones biológicas inducidas por el G-CSF en las células Swan 71, en primer lugar, se evaluó la toxicidad y la efectividad de los inhibidores farmacológicos empleados. El inhibidor de proteosoma, MG-132, resultó tóxico en las condiciones ensayadas y por lo tanto, fue descartado como posible inhibidor de la vía de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, las concentraciones de los demás inhibidores, elegidas luego de los ensayos de toxicidad, fueron efectivas al momento de bloquear las vías de señalización respectivas. En este sentido, las concentraciones empleadas, 1  $\mu$ M de PD 98059 (Ishida-Takahashi R. y col., 2004), 2  $\mu$ M de SB 203580 (Shapiro L. y Dinarello C.A., 1995; Craxton A. y col., 1998), 1  $\mu$ M de Ly 294002 (Imai Y. y col., 2012) y 0,5  $\mu$ M de Bay 11-7082 (Lee H.Y. y col., 2008), fueron previamente utilizadas por diversos grupos de investigación.



Posteriormente, se determinó si las vías de MAPK ERK1/2, PI3K/Akt y del factor nuclear  $\kappa$ B participaban en el aumento de la actividad y de la expresión de MMP-2 inducido por el G-CSF. Los resultados obtenidos luego de evaluar los niveles de activación y de expresión de la MMP-2 en células preincubadas con los correspondientes inhibidores farmacológicos, indicaron que las tres cascadas estudiadas (MAPK ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B) estarían mediando las acciones biológicas del G-CSF sobre la MMP-2. Diversos grupos de investigación han informado que estas vías de transducción de señales están involucradas en la modulación de la gelatinasa A en distintos procesos invasivos (Rychahou P.G. y col., 2004; Lan Y.Q. y col., 2009; Xiao L.J. y col., 2012). Más aún, la vía de ERK1/2 fue relacionada con el aumento de MMP-2 inducido por la combinación de eritropoyetina y G-CSF en células madre mesenquimales (Yu Q. y col., 2010). PI3K también fue implicada en las acciones del G-CSF sobre la activación de proMMP-2 en células hematopoyéticas progenitoras (Shirvaikar N. y col., 2010).

Asimismo, se evaluó la participación de las vías de señalización de ERK1/2, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B en el incremento de la secreción de VEGF como consecuencia del estímulo con G-CSF en células Swan 71. Los resultados obtenidos a partir de ensayos con inhibidores farmacológicos, revelaron que las tres vías estarían participando en el efecto del G-CSF sobre los niveles de expresión del VEGF. En este sentido, fue previamente indicado que estas cascadas de señalización regulan la secreción de este factor de crecimiento en otros tipos celulares (Giuliani N. y col., 2004; Matei D. y col., 2007; Klettner A. y col., 2013).

Además, se determinó la participación de las vías de MAPKs ERK1/2 y p38, y de PI3K/Akt en el proceso migratorio inducido por el G-CSF en las células Swan 71. Para ello, se utilizaron tanto inhibidores farmacológicos como mutantes dominantes negativas en el ensayo de la herida. El bloqueo de estas vías, mediante cualquiera de las dos estrategias utilizadas, fue efectivo en revertir el efecto del G-CSF sobre la migración celular, sugiriendo que las tres cascadas de transducción de señales estarían interviniendo en la acción migratoria promovida por el G-CSF. Estas vías de señalización ya fueron

relacionadas con procesos migratorios inducidos por el G-CSF en otros tipos celulares. Así, por ejemplo, las vías de MAPK ERK1/2 y PI3K/Akt estarían mediando la migración de neutrófilos luego de periodos cortos de incubación con la citoquina (Nakamae-Akahori M. y col., 2006). Del mismo modo, la vía de p38 también ha sido estudiada en procesos migratorios inducidos por otros factores, como en el caso de la reparación de células de epitelio de córnea dañado, en la cual el TGF- $\beta$  endógeno estimula la reparación de la herida a través de la migración celular mediada por la MAPK p38 (Saika S. y col., 2004). O bien, en células endoteliales, donde la vía de P38/PRAK/FAK regula la migración inducida por VEGF a través de su receptor VEGFR-2 (Yoshizuka N. y col., 2012).

Con el fin de explorar si existe "cross-talk" entre las vías activadas por el G-CSF en la línea celular Swan 71, se utilizaron las estrategias de bloqueo mencionadas anteriormente. En primera instancia, mediante el uso de los inhibidores de las vías de MAPK ERK1/2 (PD 98059) y PI3K/Akt (Ly 294002), se logró determinar que ambas vías están implicadas en la activación del NF- $\kappa$ B inducida por G-CSF en células Swan 71. Es interesante señalar que resultados previos informados por diversos grupos de investigación indicaron que tanto la cascada de MAPK ERK1/2 como la vía de PI3K/Akt tienen como blanco "downstream" al factor nuclear  $\kappa$ B (McCubrey J.A. y col., 2006; Huang C.Y. y col., 2009; Shant J. y col., 2009; Kloster M.M. y col., 2011).

También se investigó si PI3K participa como un mediador "upstream" de la activación de las MAPKs ERK1/2 y p38. Para ello, mediante ensayos de Western blot, se evaluó si el G-CSF podía estimular la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 o p38 cuando la quinasa PI3K estaba inhibida, ya sea por la presencia de su inhibidor específico (Ly 294002) o de su mutante dominante negativa. Los resultados obtenidos revelaron que cuando la PI3K se encontraba bloqueada, el G-CSF no logró activar las vías de ERK1/2 y p38. Este hallazgo, fue consistente con lo reportado anteriormente por nuestro laboratorio. Así, la activación de PI3K, seguida de la fosforilación de PKC $\delta$  y posterior activación de MAPK p38 contribuye al efecto antitumoral de un péptido quimérico del IFN- $\alpha$ 2b en una línea transformada de epitelio de amnios (Blank V.C. y col., 2013).

Asimismo, la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y p38 por parte de PI3K también fue informada por otros grupos de investigación (Zhuang Z.Y. y col., 2004; Sahay B. y col., 2009; Ebi H. y col., 2013).

En su conjunto, los resultados obtenidos constituyen un avance en el esclarecimiento del mecanismo de acción del G-CSF en células trofoblásticas, particularmente, en la línea celular Swan 71. Asimismo, se describen, por primera vez, las vías de señalización implicadas en los efectos biológicos inducidos por el G-CSF en estas células (Figura 4.18). En este sentido, la activación del NF- $\kappa$ B por las quinasas ERK1/2 y PI3K luego del estímulo con G-CSF, sería la responsable de incrementar los niveles de expresión de MMP-2 y VEGF en las células Swan 71. Además, a través de las vías de MAPKs ERK1/2 y p38, y de la cascada de PI3K/Akt, el G-CSF estaría mediando su efecto positivo en la migración celular. Más aún, PI3K estaría participando como un mediador "upstream" en la fosforilación y activación de las MAPKs ERK1/2 y p38 (Figura 4.18).

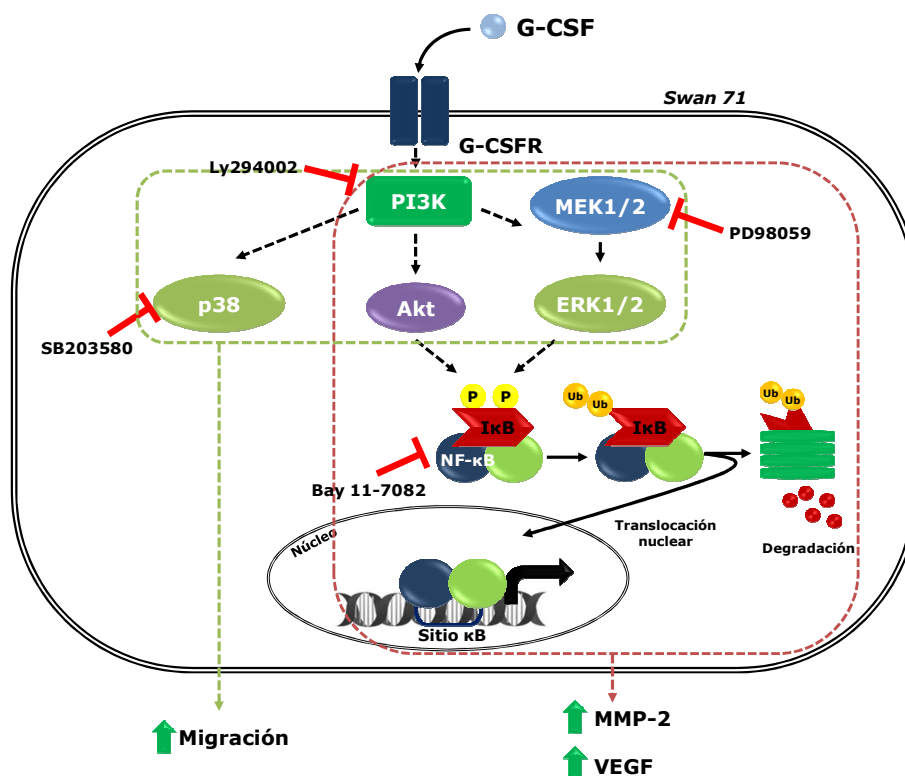


Figura 4.18. Participación de las vías de las MAPKs ERK1/2 y p38, de PI3K/Akt y del factor nuclear  $\kappa$ B en las acciones biológicas inducidas por el G-CSF en la línea celular Swan 71.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina hematopoyética ampliamente conocida por estimular la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de células del linaje granulocítico, y favorecer la activación de los neutrófilos maduros. Más aún, la forma recombinante de la citoquina es utilizada en la clínica, desde hace más de dos décadas, para el tratamiento de pacientes con cáncer que padecen neutropenia como consecuencia de la quimioterapia. Los receptores para G-CSF han sido detectados no sólo en células progenitoras mieloides, neutrófilos maduros, plaquetas, monocitos y algunas líneas celulares leucémicas y linfoides de tipo T y B, sino también en otros tipos celulares, como células endoteliales, cardiomiocitos, células madre neuronales, células trofoblásticas, tejido placentario humano, y algunas líneas tumorales. En este sentido, si bien fue informada previamente la presencia del G-CSF y su receptor en la placenta, así como la efectividad de la citoquina en el tratamiento de mujeres embarazadas con antecedentes de abortos recurrentes, aún no han sido descritas sus acciones biológicas en tejidos placentarios. Es por ello que lograr un mejor entendimiento del mecanismo de acción del G-CSF en tejidos placentarios contribuiría a mejorar la comprensión de algunas de las patologías gestacionales que actualmente carecen de explicación y tratamiento.

Con el propósito de dilucidar las acciones biológicas desencadenadas por la interacción G-CSF:G-CSFR en células trofoblásticas humanas y determinar las vías de transducción de señales que median esas funciones, se utilizó una línea de trofoblastos, denominada Swan 71, derivada de una placenta humana de 7 semanas. Esta línea celular inmortalizada tiene características de células trofoblásticas extravelosas, es decir, posee un fenotipo invasivo.

Luego de detectar la presencia de receptores para G-CSF en la línea celular Swan 71, se estudió el efecto del G-CSF sobre la proliferación y la supervivencia. Los resultados obtenidos indicaron que la citoquina no resultó un estímulo proliferativo para estas células. Asimismo, al evaluar el rol protector del G-CSF ante un agente citotóxico, como el peróxido de hidrógeno, encontramos que la citoquina no promovió la supervivencia de las células Swan 71. Posteriormente, se investigó un posible rol modulador del G-CSF sobre algunos

de los mediadores clave de la implantación embrionaria, como la metaloproteinasa-2 (MMP-2), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la integrina  $\beta 1$ . Demostramos que el G-CSF produjo un aumento de la actividad y de los niveles de expresión de la MMP-2, enzima fundamental para la degradación de la matriz extracelular materna, en sobrenadantes de células incubadas con 100 ng/ml de la citoquina durante 24 horas. También, en esas condiciones de ensayo, determinamos que el G-CSF incrementó los niveles de secreción del VEGF, factor de crecimiento crítico para la angiogénesis placentaria y la migración trofoblástica. Además, la expresión de la integrina  $\beta 1$ , receptor característico de un fenotipo trofoblástico invasivo, aumentó luego de tratar las células con 100 ng/ml de G-CSF durante 4 y 8 horas.

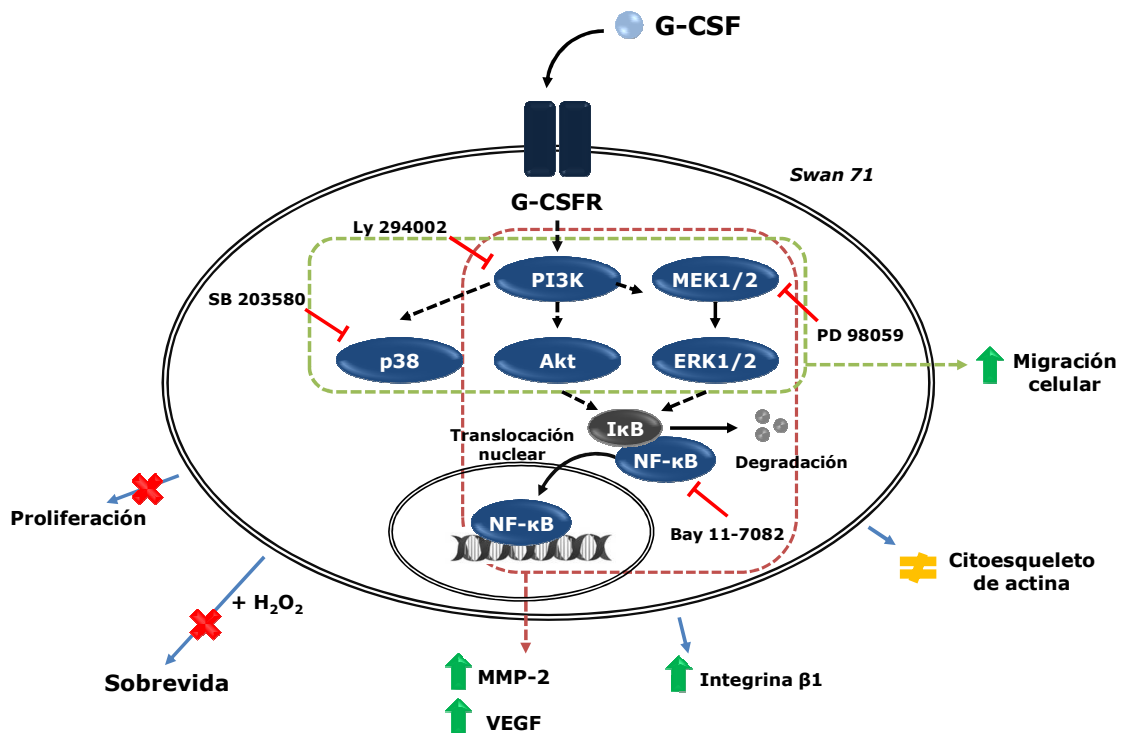
Sobre la base de estos resultados, se decidió estudiar la participación del G-CSF en el proceso de migración celular. Para ello, se comenzó evaluando posibles cambios en el ordenamiento del citoesqueleto de actina. En este sentido, encontramos que las células que fueron tratadas con 100 ng/ml de G-CSF durante 9 horas adquirieron un fenotipo migratorio. Asimismo, el G-CSF promovió la migración de células Swan 71 luego de ser incubadas con 100 ng/ml de citoquina durante 9 horas (ensayo en "transwell") o 16 horas (ensayo de la herida).

Por otra parte, comprobamos que el G-CSF activó las cascadas de transducción de señales de MAPKs ERK1/2 y p38, de PI3K/Akt y de NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B. Con el fin de investigar si estas vías estaban implicadas en algunas de las acciones biológicas inducidas por el G-CSF en las células Swan 71, decidimos utilizar distintas estrategias de bloqueo. Así, por ejemplo, mediante el uso de inhibidores farmacológicos específicos de las vías de MAPK ERK1/2 (PD98059), de PI3K (Ly294002) y del factor nuclear  $\kappa$ B (Bay 11-7082), comprobamos que los mismos revirtieron el efecto del G-CSF sobre el aumento de los niveles de secreción de MMP-2 y VEGF. Asimismo, mediante el empleo de inhibidores y de mutantes dominantes negativas, demostramos la participación de las vías de las MAPKs ERK1/2 y p38, y de la vía PI3K/Akt en la migración de células Swan 71 inducida por el G-CSF. De este modo, los resultados obtenidos sugirieron

que las cascadas de señalización estudiadas están involucradas en las acciones biológicas inducidas por el G-CSF en las células Swan 71.

Finalmente, cuando estudiamos la secuencia de activación de estas cascadas, observamos que las vías ERK1/2 y PI3K/Akt contribuyen en la activación del factor nuclear  $\kappa$ B. Además, fue posible determinar que PI3K participa como un estímulo "upstream" en la fosforilación de las MAPKs ERK1/2 y p38.

En su conjunto, los resultados obtenidos no sólo permitieron dilucidar el mecanismo de acción del G-CSF en células trofoblásticas, sino también, refuerzan la hipótesis de que el G-CSF, a través de la promoción de la adquisición de un fenotipo trofoblástico migratorio, estaría participando, junto con otros factores de la interfase materno-fetal, en la implantación embrionaria y en el desarrollo placentario.



**Mecanismo de acción del G-CSF en las células trofoblásticas humanas Swan 71**

# ***Bibliografía***

- Aapro M.S., Bohlius J., Cameron D.A., Dal Lago L., Donnelly J.P., Kearney N., Lyman G.H., Pettengell R., Tjan-Heijnen V.C., Walewski J., Weber D.C., Zielinski C. (2011) 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *European Journal of Cancer* 47, 8–32.
- Akbarzadeh S. and Layton J.E. (2001) Granulocyte colony-stimulating factor receptor: structure and function. *Vitamins & Hormones* 63, 159-164.
- Akira S. (1999) Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 17, 138-46.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition. New York: Garland Science.*
- Alessi D.R., Cuenda A., Cohen P., Dudley D.T., Saltiel A.R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27489-94.
- Aplin J.D., Straszewski-Chavez S.L., Kalionis B., Dunk C., Morrish D., Forbes K., Baczyk D., Rote N., Malassine A., Knöfler M. (2006) Trophoblast differentiation: progenitor cells, fusion and migration - a workshop report. *Placenta* 27, S141-3.
- Avalos B.R. (1996) Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood* 88, 761-777.
- Baker S.J., Rane S.G. and Reddy E.P. (2007) REVIEW: Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26, 6724–6737.
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. (2010) Integrins. *Cell and Tissue Research* 339, 269–280.
- Bendall L.J. and Bradstock K.F. (2014) G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25, 355–367.
- Ben-Neriah Y. and Karin M. (2011) Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the matchmaker. *Nature Immunology* 12, 715–723.



- Biljana E., Boris V., Cena D. and Veleska-Stefkovska D. (2011) Matrix metalloproteinases (with accent to collagenases). *Journal of Cell and Animal Biology* 5, 113-120.
- Bills V.L., Hamdollah-Zadeh M., Soothill P.W., Harper S.J. and Bates D.O. (2014) The role of VEGF-A165b in trophoblast survival. *Bio Med Central Pregnancy and Childbirth* 14, 278.
- Birkedal-Hansen H., Moore W. G. I., Bodden M. K., Windsor L. J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A. and Engler J. A. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4(2), 197-250.
- Bischof P. (2001) Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases. *Early Pregnancy* 5, 30-31.
- Bischof P. and Campana A. (1996) A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. *Human Reproduction Update* 2(3), 262-270.
- Bischof P., Meissner A. and Campana A. (2001) Biochemistry and molecular biology of trophoblast invasion. *Annals New York Academy of Sciences* 943, 157-62.
- Blank V.C., Bertucci L., Furmento V.A., Peña C., Marino V.J., Roguin L.P. (2013) A chimeric cyclic interferon- $\alpha$ 2b peptide induces apoptosis by sequential activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C $\delta$  and p38 MAP kinase. *Experimental Cell Research* 319, 1471-81.
- Boggon T.J. and Eck M.J. (2004) Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918-7927.
- Bozzuto G., Ruggieri P. and Molinari A. (2010) Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 46, 66-80.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Burrows T.D., King A. and Loke Y.W. (1996) Trophoblast migration during human placental implantation. *Human Reproduction Update* 2, 307-321.

- Bussolino F., Ziche M., Ming Wang J., Alessi D., Morbidelli L., Cremona O., Bosia A., Marchisio P.C. and Mantovani A. (1991) In Vitro and In Vivo Activation of Endothelial Cells by Colony-stimulating Factors. *Journal of Clinical Investigation* 87, 986-995.
- Buzzeo M.P., Yang J., Casella G. and Reddy V. (2007) Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF induces innate inflammation yet suppresses adaptive immune gene expression as revealed by microarray analysis. *Experimental Hematology* 35, 1456-1465.
- Cain R.J. and Ridley A.J. (2009) Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the Cell* 101, 13-29 (Printed in Great Britain).
- Canales M.A. and Hernández-Navarro F. (2004) G-CSF or not G-CSF? That is the question. *Bone Marrow Transplantation* 34, 557.
- Caniggia I., Winter J., Lye S.J., Post M. (2000) Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 21, Supplement A, S25-30.
- Cantrell D.A. (2001) Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *Journal of Cell Science* 114, 1439-1445.
- Cartwright J.E., Fraser R., Leslie K., Wallace A. E. and James J.L. (2010) Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction* 140, 803-813.
- Chakraborty A. and Guha S. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor/granulocyte colony-stimulating factor receptor biological axis promotes survival and growth of bladder cancer cells. *Urology* 69, 1210-5.
- Chakraborty C., Gleeson L. M., McKinnon T., Lala P. K. (2002) Regulation of human trophoblast migration and invasiveness. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80, 116-124.
- Chazotte B. (2010) Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harbour Protocols* (5):pdb.prot4947.

- Chen X., Kelemen S.E., Autieri M.V. (2005) Expression of granulocyte colony-stimulating factor is induced in injured rat carotid arteries and mediates vascular smooth muscle cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288, C81-8.
- Chuderland D., Konson A. and Seger R. (2008) Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular Cell* 31, 850-861.
- Clark D.E. and Charnock-Jones D.S. (1998/1999) Placental angiogenesis: the role of the VEGF family of proteins. *Angiogenesis* 2, 309-318.
- Cohen M., Meissner A. and Bischof P. (2006) Metalloproteinases and human placental invasiveness. *Placenta* 27, 783-793.
- Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications* 3, 207-12.
- Craxton A., Shu G., Graves J.D., Saklatvala J., Krebs E.G., Clark E.A. (1998) p38 MAPK is required for CD40-induced gene expression and proliferation in B lymphocytes. *Journal of Immunology* 161, 3225-36.
- Cruciani M., Lipsky B.A., Mengoli C., de Lalla F. (2005) Are granulocyte colony-stimulating factors beneficial in treating diabetic foot infections?: A meta-analysis. *Diabetes Care* 28, 454-60.
- Cruciani M., Lipsky B.A., Mengoli C., de Lalla F. (2009) Granulocyte-colony stimulating factors as adjunctive therapy for diabetic foot infections. *Cochrane Database Systematic Reviews* 8, CD006810.
- Cuadrado A. and Nebreda A.R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochemical Journal* 429, 403-417 (Printed in Great Britain).
- Cuenda A., Rouse J., Doza Y.N., Meier R., Cohen P., Gallagher T.F., Young P.R., Lee J.C. (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters* 364, 229-33.
- Cuevas B.D., Abell A.N. and Johnson G.L. (2007) Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* 26, 3159-3171.

- Dagil R., Knudsen M.J., Olsen J.G., O'Shea C., Franzmann M., Goffin V., Teilum K., Breinholt J., Kragelund B.B. (2012) The WSXWS Motif in Cytokine Receptors Is a Molecular Switch Involved in Receptor Activation: Insight from Structures of the Prolactin Receptor. *Structure* 20, 270–282.
- Damsky C.H., Librach C., Lim K.-H., Fitzgerald M.L., McMaster M.T., Janatpour M., Zhou Y., Logan S.K. and Fisher S.J. (1994) Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 120, 3657-3666.
- Danen E.H.J. (2000) Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. *Madame Curie Bioscience Database, Austin (TX), Landes Bioscience*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6259/>
- Demitriadis E., Menkhorst E., Salamonsen L.A. and Paiva P. (2010) Review: LIF and IL-11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy. *Trophoblast Research* 24, 99-104.
- Demir R., Kayisli U.A., Seval Y., Celik-Ozenci C., Korgun E.T., Demir-Weusten A.T. and Huppertz B. (2004) Sequential Expression of VEGF and its Receptors in Human Placental Villi During Very Early Pregnancy: Differences Between Placental Vasculogenesis and Angiogenesis. *Placenta* 25, 560–572.
- Donald M. (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485–491.
- Donini M., Fontana S., Savoldi G., Vermi W., Tassone L., Gentili F., Zenaro E., Ferrari D., Notarangelo L.D., Porta F., Facchetti F., Notarangelo L.D., Dusi S. and Badolato R. (2007) G-CSF treatment of severe congenital neutropenia reverses neutropenia but does not correct the underlying functional deficiency of the neutrophil in defending against microorganisms. *Blood* 109, 4716-23.
- Dubinsky V., Poehlmann T.G., Suman P., Gentile T., Markert U.R., Gutierrez G. (2010) Role of regulatory and angiogenic cytokines in invasion of trophoblastic cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 63, 193-199.
- Dunn C.L., Kelly R.W., Critchley H.O. (2003) Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reproductive Biomedicine Online* 7, 151-61.

- Ebi H., Costa C., Faber A.C, Nishtala M., Kotani H., Juric D., Della Pelle P., Song Y., Yano S., Mino-Kenudson M., Benes C.H., Engelman J.A. (2013) PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 21124–21129.
- Ferreti C., Bruni L., Dangles-Marie V., Pecking A.P. and Ballet D. (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, 121-141.
- Fitzgerald J., Busch S., Wengenmayer T., Foerster K., de la Motte T., Poehlmann T., Markert U. (2005) Signal Transduction in Trophoblast Invasion. *Markert UR (ed): Immunology of Gametes and Embryo Implantation. Chem Immunol Allergy, Basel, Karger* 88, 181-199.
- Friedl P. And Wolf K. (2009) Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Reviews* 28, 129–135.
- Fusté B., Mazzara R., Escolar G., Merino A., Ordinas A., Díaz-Ricart M. (2004) Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK. *Haematologica* 89, 578-85.
- Futami M., Zhu Q., Whichard Z.L., Xia I., Ke Y., Neel B.G., Feng G.S. and Corey S.J. (2011) G-CSF receptor activation of the Src kinase Lyn is mediated by Gab2 recruitment of the Shp2 phosphatase. *Blood* 118, 1077-1086.
- Geering B., Cutillas P.R., Nock G., Gharbi S.I., Vanhaesebroeck B. (2007) Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7809–7814.
- Geest C.R., Buitenhuis M., Groot Koerkamp M.J.A., Holstege F.C.P., Vellenga E. And Cofer P.J. (2009) Tight control of MEK-ERK activation is essential in regulating proliferation, survival, and cytokine production of CD34+-derived neutrophil progenitors. *Blood* 114, 3402-3412.

- Gilmore T.D. (2006) Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680–6684.
- Giuliani N., Lunghi P., Morandi F., Colla S., Bonomini S., Hojden M., Rizzoli V., Bonati A. (2004) Downmodulation of ERK protein kinase activity inhibits VEGF secretion by human myeloma cells and myeloma-induced angiogenesis. *Leukemia* 18, 628-35.
- Graham C.H. and Lala P.K. (1992) Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochemical Cell Biology* 70, 867-74.
- Gu H., Maeda H., Moon J.J., Lord J.D., Yoakim M., Nelson B.H., Neel B.G. (2000) New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7109-20.
- Guce N.M., Roberts C.T., Kalionis B. King R.G. (2004) Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research* 114, 397-407.
- Guibourdenche J., Fournier T., Malassiné A. and Evain-Brion D. (2009) Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 47, 35-40.
- Gutschalk C.M., Herold-Mende C.C., Fusenig N.E., Mueller M.M. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas in vivo. *Cancer Research* 66, 8026-36.
- Han J., Lee J.D., Bibbs L., Ulevitch R.J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-11.
- Han J., Li L., Hu J., Yu L., Zheng Y., Guo J., Zheng X., Yi P., Zhou Y. (2010) Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through Rho A and Rho C activation. *Endocrinology* 151, 1732-42.
- Hara K., Suda T., Suda J., Eguchi M., Ihle J.N., Nagata S., Miura Y., Saito M. (1988) Bipotential murine hemopoietic cell line (NFS-60) that is responsive to IL-3, GM-CSF, G-CSF, and erythropoietin. *Experimental Hematology* 16, 256–261.

- Hara M., Yuasa S., Shimoji K., Onizuka T., Hayashiji N., Ohno Y., Arai T., Hattori F., Kaneda R., Kimura K., Makino S., Sano M. and Fukuda K. (2011) G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 715-727.
- Harada M., Qin Y., Takano H., Minamino T., Zou Y., Toko H., Ohtsuka M., Matsuura K., Sano M., Nishi J., Iwanaga K., Akazawa H., Kunieda T., Zhu W., Hasegawa H., Kunisada K., Nagai T., Nakaya H., Yamauchi-Takahara K., Komuro I. (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nature Medicine* 11, 305-11.
- Hauke R.J. and Tarantolo S.R. (2000) Hematopoietic Growth Factors. *Laboratory Medicine* 31, 613-15.
- Hayden M.S. and Ghosh S. (2012) NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding. *Genes & Development* 26, 203-234.
- Hemmings B.A. and Restuccia D.F. (2012) PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 4, a011189.
- Hengge U.R., Brockmeyer N.H., Goos M. (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment in AIDS patients. *The Clinical Investigator* 70, 922-6.
- Hill C.P., Osslund T.D., Eisenberg D. (1993) The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90, 5167-5171.
- Hill J.A. (2001) Maternal-embryonic cross-talk. *Annals New York Academy of Sciences* 943, 17-25.
- Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S., Wildiers H., Van Oosterom A.T., De Bruijn E.A. (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 56, 549-80.
- Holmes K., Roberts O.L., Thomas A.M., Cross M.J. (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signaling* 19, 2003-2012.

- Hood J.D. and Cheresh D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer* 2, 91-100.
- Huang C., Jacobson K. and Schaller M.D. (2004) MAP kinases and cell migration. *Journal of Cell Science* 117, 4619-4628.
- Huang C.Y., Fong Y.C., Lee C.Y., Chen M.Y., Tsai H.C., Hsu H.C., Tang C.H. (2009) CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways. *Biochemical Pharmacology* 77, 794-803.
- Huang H.Y. (2006) The cytokine network during embryo implantation. *Chang Gung Medical Journal* 29, 25-36.
- Huppertz B. (2008) The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology* 61, 1296-302.
- Hwang Y.P., Yun H.J., Kim H.G., Han E.H., Lee G.W., Jeong H.G. (2010) Suppression of PMA-induced tumor cell invasion by dihydroartemisinin via inhibition of PKCa/Raf/MAPKs and NF-kB/AP-1-dependent mechanisms. *Biochemical Pharmacology* 79, 1714-1726.
- Hynes R.O. (2002) Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 110, 673-687.
- Ihle J.N., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Yamamoto K., Thierfelder W.E., Kreider B., Silvennoinen O. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 222-7.
- Imai Y., Yoshimori M., Fukuda K., Yamagishi H., Ueda Y. (2012) The PI3K/Akt inhibitor LY294002 reverses BCRP-mediated drug resistance without affecting BCRP translocation. *Oncology Reports* 27, 1703-9.
- Isaka K., Usuda S., Ito H., Sagawa Y., Nakamura H., Nishi H., Suzuki Y., Li Y. F. and Takayama M. (2003) Expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24, 53-64.
- Ishida-Takahashi R., Uotani S., Abe T., Degawa-Yamauchi M., Fukushima T., Fujita N., Sakamaki H., Yamasaki H., Yamaguchi Y., Eguchi K. (2004) Rapid inhibition of leptin signaling by glucocorticoids in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 279, 19658-64.



- Jatiani S.S., Baker S.J., Silverman L.R. and Reddy E.P. (2010) JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. *Genes & Cancer* 1, 979-993.
- Jeong W., Kim J., Bazer F.W., Song G. (2014) Proliferation-Stimulating Effect of Colony Stimulating Factor 2 on Porcine Trophectoderm Cells Is Mediated by Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase. *PLoS ONE* 9, e88731.
- Jiang H., Liu C.X., Feng J.B., Wang P., Zhao C.P., Xie Z.H., Wang Y., Xu S.L., Zheng C.Y., Bi J.Z. (2010) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates chronic neuroinflammation in the brain of amyloid precursor protein transgenic mice: an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of International Medical Research* 38, 1305-12.
- John A. and Tuszynski G. (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathology Oncology Research* 7, 14-23.
- Jovanovic M., Stefanoska I., Radojicic L. and Vicovac L. (2010) Interleukin-8 (CXCL8) stimulates trophoblast cell migration and invasion by increasing levels of matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 and integrins  $\alpha 5$  and  $\beta 1$ . *Reproduction* 139, 789-798.
- Jung K.H., Chu K., Lee S.T., Kim S.J., Sinn D.I., Kim S.U., Kim M., Roh J.K. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation. *Brain Research* 1073-1074, 190-201.
- Kaczmarek R.S. y Mufti G.J. (1991) The cytokine receptor superfamily. *Blood Reviews* 5, 193-203.
- Kamezaki K., Shimoda K., Numata A., Haro T., Kakumitsu H., Yoshie M., Yamamoto M., Takeda K., Matsuda T., Akira S., Ogawa K., Harada M. (2005) Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells* 23, 252-63.
- Karin M. and Delhase M. (2000) The I $\kappa$ B kinase (IKK) and NF- $\kappa$ B: key elements of proinflammatory signaling. *Seminars in Immunology* 12, 85-98.

- Karmakar S., Dhar R. and Das C. (2004) Inhibition of cytotrophoblastic (JEG-3) cell invasion by interleukin 12 involves an interferon  $\gamma$ -mediated pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 55297-55307.
- Kaufmann P. and Castellucci M. (1997) Extravillous trophoblast in the human placenta: a review. *Placenta* 18, 21-65.
- Khan M., Manzoor S., Mohsin S., Khan S.N., Ahmad F.J. (2009) IGF-1 and G-CSF complement each other in BMSC migration towards infarcted myocardium in a novel in vitro model. *Cell Biology International* 33, 650-7.
- Kim J.S., Yang M., Lee C.G., Kim S.D., Kim J.K., Yang K. (2013) In vitro and in vivo protective effects of granulocyte colony-stimulating factor against radiation-induced intestinal injury. *Archives of Pharmacal Research* 36, 1252-61.
- Kim S.O., Sheikh H.I., Ha S.D., Martins A., Reid G. (2006) G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cellular Microbiology* 8, 1958-71.
- Kinashi T. (2005) Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 5, 546-559.
- Kleiner D.E. and Stetler-Stevenson W.G. (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Analytical Biochemistry* 218, 325-9.
- Klettner A., Westhues D., Lassen J., Bartsch S., Roider J. (2013) Regulation of constitutive vascular endothelial growth factor secretion in retinal pigment epithelium/choroid organ cultures: p38, nuclear factor  $\kappa$ B, and the vascular endothelial growth factor receptor-2/phosphatidylinositol 3 kinase pathway. *Molecular Vision* 19, 281-91.
- Kloster M.M., Naderi E.H., Carlsen H., Blomhoff H.K., Naderi S. (2011) Hyperactivation of NF- $\kappa$ B via the MEK signaling is indispensable for the inhibitory effect of cAMP on DNA damage-induced cell death. *Molecular Cancer* 10, 45.

- Knapinska A. and Fields G.B. (2012) Chemical Biology for Understanding Matrix Metalloproteinase Function. *ChemBioChem* 13, 2002–2020.
- Knöfler M. (2010) Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *International Journal of Developmental Biology* 54, 269-280.
- Knöfler M. and Pollheimer J. (2013) Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics* 26, 190.
- Kojima H., Otani A., Oishi A., Makiyama Y., Nakagawa S. and Yoshimura N. (2011) Granulocyte colony-stimulating factor attenuates oxidative stress-induced apoptosis in vascular endothelial cells and exhibits functional and morphologic protective effect in oxygen-induced retinopathy. *Blood* 117, 1091-1100.
- Krüssel J.-A-, Bielfeld P., Lake Polan M., Simón C. (2003) Regulation of embryonic implantation. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110, S2–S9.
- Kumar J., Fraser F.W., Riley C., Ahmed N., McCulloch D.R. and Ward A.C. (2014) Granulocyte colony-stimulating factor receptor signalling via Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 110, 133–145.
- Kuritzkes D.R. (2000) Neutropenia, Neutrophil Dysfunction, and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Clinical Infectious Diseases* 30, 256–60.
- Ladoux B. and Nicolas A. (2012) Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on Progress in Physics* 75, 116601 (25pp).
- Lan Y.Q., Zhang C., Xiao J.H., Zhuo Y.H., Guo H., Peng W., and Ge J. (2009) Suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  increases the expression of matrix metalloproteinase-2 in human ciliary muscle cells. *Molecular Vision* 15, 1977–1987.

- Lash G.E., Warren A.Y., Underwood S., Baker P.N. (2003) Vascular endothelial growth factor is a chemoattractant for trophoblast cells. *Placenta* 24, 549-56.
- Lawrence T. (2009) The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 1, a001651.
- Layton J.E. and Hall N.E. (2006) The interaction of G-CSF with its receptor. *Frontiers in Bioscience* 11, 3181-3189.
- Layton J.E., Hall N.E., Connell F., Venhorst J. and Treutlein H.R. (2001) Identification of ligand-binding site III on the immunoglobulin-like domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36779-36787.
- Layton J.E., Shimamoto G., Osslund T., Hammacher A., Smith D.K., Treutlein H.R., Boone T. (1999) Interaction of Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) with Its Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17445-17451.
- Lee D.H. and Goldberg A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* 8, 397-403.
- Lee H.Y., Kim S.D., Shim J.W., Lee S.Y., Lee H., Cho K.H., Yun J., Bae Y.S. (2008) Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. *Journal of Immunology* 181, 4332-9.
- Liao Y. and Hung M.C. (2010) Physiological regulation of Akt activity and stability. *American Journal of Translational Research* 2, 19-42.
- Librach C.L., Werb Z., Fitzgerald M.L., Chiu K., Corwin N.M., Esteves R.A., Grovelny D., Galaray R., Damsky C.H. and Fisher S.J. (1991) 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *The Journal of Cell Biology* 113, 437-49.
- Löffek S., Schilling O. and Franzke C.W. (2011) Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* 38, 191-208.

- Luciano B.S., Hsu S., Channavajhala P.L., Lin L. and Cuozzo J.W. (2004) Mechanisms of Signal Transduction: Phosphorylation of Threonine 290 in the Activation Loop of Tpl2/Cot Is Necessary but Not Sufficient for Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry* 279, 52117-52123.
- Lunney J.K. (1998) Cytokines orchestrating the immune response. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)* 17, 84-94.
- Manning B.D., and Cantley L.C. (2007) AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261-1274.
- Marino V.J. and Roguin L.P. (2008) The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *Journal of Cell Biochemistry* 103, 1512-23.
- Marino V.J., Sterin-Prync A.E., Carbonetto C.H., Roguin L.P. (2001) Conformational and sequential epitopes on the human granulocyte-colony stimulating factor molecule (hG-CSF) and their role in binding to human placenta receptors. *Cytokine* 16, 41-50.
- Marino V.J., Sterin-Prync A.E., Roguin L.P. (2003) Change in the accessibility of an epitope of the human granulocyte-colony stimulating factor after binding to receptors. *Cytokine* 22, 5-11.
- Matei D., Kelich S., Cao L., Menning N., Emerson R.E., Rao J., Jeng M.H., Sledge G.W. (2007) PDGF BB induces VEGF secretion in ovarian cancer. *Cancer Biology and Therapy* 6, 1951-9.
- Matsuda S., Shirafuji N. and Asano S. (1989) Human granulocyte colony-stimulating factor specifically binds to murine myeloblastic NFS-60 cells and activates their guanosine triphosphate binding proteins/adenylate cyclase system. *Blood* 74, 2343-2348.
- McCracken S., Layton J.E., Shorter S.C., Starkey P.M., Barlow D.H., Mardon H.J. (1996) Expression of granulocyte-colony stimulating factor and its receptor is regulated during the development of the human placenta. *Journal of Endocrinology* 149, 249-58.

- McCracken S.A., Grant K.E., MacKenzie I.Z., Redman C.W., Mardon H.J. (1999) Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor expression in the human placenta. *Biology of Reproduction* 60, 790-6.
- McCubrey J.A., Steelman L.S., Abrams S.L., Lee J.T., Chang F., Bertrand F.E., Navolanic P.M., Terrian D.M., Franklin R.A., D'Assoro A.B., Salisbury J.L., Mazzarino M.C., Stivala F., Libra M. (2006) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in Enzyme Regulation* 46, 249-79.
- Metcalf D. (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-491.
- Mogilner A. and Keren K. (2009) The Shape of Motile Cells. *Current Biology* 19, R762-R771.
- Morris K.T., Khan H., Ahmad A., Weston L., Nofchissey R.A., Pinchukand I.V., Beswick E. J. (2014) G-CSF and G-CSFR are highly expressed in human gastric and colon cancers and promote carcinoma cell proliferation and migration. *British Journal of Cancer* 110, 1211-1220.
- Morrish D.W., Kudo Y., Caniggia I., Cross J., Evain-Brion D., Gasperowicz M., Kokozidou M., Leisser C., Takahashi K., Yoshimatsu J. (2007) Growth Factors and Trophoblast Differentiation e Workshop Report. *Placenta* 28, Supplement A, *Trophoblast Research* 21, S121eS124.
- Morrison D.K. (2012) MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a011254.
- Muller Y.A., Li B., Christinger H.W., Wells J.A., Cunningham B.C. and de Vos A.M. (1997) Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 7192-7197.
- Muller Y.A., Christinger H.W., Keyt B.A. and de Vos A.M. (1997b) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure* 5, 1325-1338.
- Murphy G. and Nagase H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine* 29, 290-308.

- Nagase H., Visse R., Murphy G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69, 562-573.
- Nakamae-Akahori M., Kato T., Masuda S., Sakamoto E., Kutsuna H., Hato F., Nishizawa Y., Hino M. and Kitagawa S. (2006) Enhanced neutrophil motility by granulocyte colony-stimulating factor: the role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Immunology* 119, 393-403.
- Nicholson K.M. and Anderson N.G. (2002) The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signalling* 14, 381-95.
- Norwitz E. R., Schust D. J. and Fisher S. J. (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine* 345, 1400-8.
- Oeckinghaus A. and Ghosh S. (2009) The NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 1, a000034.
- Oeckinghaus A., Hayden M.S. and Ghosh S. (2011) Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nature Immunology* 12, 695-708.
- Okada M. (2012) Regulation of the Src Family Kinases by Csk. *International Journal of Biological Sciences* 8, 1385-1397.
- Olsson A.K., Dimberg A., Kreuger J. and Claesson-Welsh L. (2006) VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 7, 359-71.
- O'Shea J.J., Pesu M., Borie D.C. and Changelian P.S. (2004) A new modality for immunosuppression: targeting the JAK/STAT pathway. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 555-564.
- Panopoulos A.D. and Watowich S.S. (2008) Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and "emergency" hematopoiesis. *Cytokine* 42, 277-288.

- Park S., Park C.H., Hahm E.R., Kim K., Kimler B.F., Lee S.J., Park H.K., Lee S.H., Kim W.S., Jung C.W., Park K., Riordan H.D., Lee J.H. (2005) Activation of Raf1 and the ERK pathway in response to l-ascorbic acid in acute myeloid leukemia cells. *Cell Signalling* 17, 111-9.
- Parri M. and Chiarugi P. (2010) Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling* 8, 23.
- Parsons S.J. and Parsons J.T. (2004) Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 23, 7906-7909.
- Pierce J.W., Schoenleber R., Jesmok G., Best J., Moore S.A., Collins T., Gerritsen M.E. (1997) Novel inhibitors of cytokine-induced I $\kappa$ B phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21096-103.
- Qi M. and Elion E.A. (2005) MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science* 118, 3569-3572.
- Qian Y., Corum L., Meng Q., Blenis J., Zheng J.Z., Shi X., Flynn D.C. and Jiang B.H. (2004) PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 286, C153-C163.
- Raftopoulou M. and Hall A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology* 265, 23-32.
- Rameh L.E., Arvidsson A.K., Carraway K.L.3rd, Couvillon A.D., Rathbun G., Crompton A., VanRenterghem B., Czech M.P., Ravichandran K.S., Burakoff S.J., Wang D.S., Chen C.S., Cantley L.C. (1997) A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *Journal of Biological Chemistry* 272, 22059-66.
- Rausch O. and Marshall C.J. (1999) Cooperation of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways during granulocyte colony-stimulating factor-induced hemopoietic cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 4096-105.



- Rawlings J.S., Rosler K.M. and Harrison D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* 117, 1281-1283.
- Reidhaar-Olson J.F., De Souza-Hart J.A., Selick H.E. (1996) Identification of residues critical to the activity of human granulocyte colony-stimulating factor. *Biochemistry* 35, 9034-41.
- Reynolds L.P. and Redmer D.A. (2001) Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction* 64, 1033-1040.
- Roa, I., Smok C., Prieto R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology* 30, 1490-1496.
- Robb L. (2007) Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715-6723.
- Robbins D.J., Zhen E., Owakiq H., Vanderbilt C.A., Ebert D., Geppertll T.D., and Cobb M.H. (1993) Regulation and Properties of Extracellular Signal-regulated Protein Kinases 1 and 2 in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 268, 5097-5106.
- Roskoski R.Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1155-64.
- Roux P.P. and Blenis J. (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 320-344.
- Rychahou P.G., Murillo C., Evers B.M. (2004) Downregulation of the PI3k/Akt pathway leads to decreased invasion of the human colon cancer cells *Journal of the American College of Surgeons* 199, 10.
- Sampson M., Zhu Q.-S. and Corey S.J. (2007) Src kinases in G-CSF Receptor Signaling. *Frontiers in Bioscience* 12, 1463-1474.
- Scarpellini F., Sbracia M. (2009) Use of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of unexplained recurrent miscarriage: a randomised controlled trial. *Human Reproduction* 24, 2703-8.
- Schneider A., Krüger C., Steigleder T., Weber D., Pitzer C., Laage R., Aronowski J., Maurer M.H., Gassler N., Mier W., Hasselblatt M., Kollmar

- R., Schwab S., Sommer C., Bach A., Kuhn H-G and Schäbitz W-R. (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 115, 2083–2098.
- Seger R. and Krebs E.C. (1995) The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal* 9, 726-35.
- Sen B. and Johnson F.M. (2011) Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. *Journal of Signal Transduction* 2011, 865819.
- Sahay B., Patsey R.L., Eggers C.H., Salazar J.C., Radolf J.D., Sellati T.J. (2009) CD14 signaling restrains chronic inflammation through induction of p38-MAPK/SOCS-dependent tolerance. *PLoS Pathogens* 5, e1000687.
- Saika S., Okada Y., Miyamoto T., Yamanaka O., Ohnishi Y., Ooshima A., Liu C.Y., Weng D., Kao W.W. (2004) Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45, 100-9.
- Shant J., Cheng K., Marasa B.S., Wang J.Y., Raufman J.P. (2009) Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis. *Experimental Cell Research* 315, 432-50.
- Shapiro L. and Dinarello C.A. (1995) Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12230-4.
- Sheppard D. (1994) Dominant negative mutants: tools for the study of protein function in vitro and in vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 11, 1-6.
- Shibata A., Nagaya T., Imai T., Funahashi H., Nakao A., Seo H. (2002) Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 73, 237-43.
- Shimoji K., Yuasa S., Onizuka T., Hattori F., Tanaka T., Hara M., Ohno Y., Chen H., Egasgira T., Seki T., Yae K., Koshimizu U., Ogawa S., Fukuda K.

- (2010) G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 6, 227-37.
- Shirvaikar N., Marquez-Curtis L.A., Shaw A.R., Turner A.R., Janowska-Wieczorek A. (2010) MT1-MMP association with membrane lipid rafts facilitates G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Experimental Hematology* 38, 823-35.
- Shorter S.C., Vince G.S and Starkey P.M. (1992) Production of granulocyte colony-stimulating factor at the materno-foetal interface in human pregnancy. *Immunology* 75, 468-474.
- Smithgall T.E., Briggs S.D., Schreiner S., Lerner E.C., Cheng H., Wilson M.B. (2000) Control of myeloid differentiation and survival by Stats. *Oncogene* 19, 2612-8.
- Smithgall T.E. (2002) Chapter 3: STAT activation by Src, Fes and Btk tyrosine kinases. *The Jak-Stat Pathway in Hematopoiesis and Disease Edited by Alister C. Ward. Landes series: Molecular Biology Intelligence Unit 20. Landes Biosciences.*
- Soede-Bobok A.A. and Touw I.P. (1997) Molecular understanding of hematopoietin/cytokine receptor signaling defects in hematopoietic disorders. *Journal of Molecular Medicine (Berl)* 75, 470-7.
- Snoek-van Beurden P.A.M. and Von den Hoff J.W. (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38, 73-83.
- Staun-Ram E. and Shalev E. (2005) Human trophoblast function during implantation process. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3, 56-67.
- Staun-Ram E., Goldman S., Gabarin D. and Shalev E. (2004) Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 59.
- Straszewski-Chavez S.L., Abrahams V.M., Alvero A.B., Aldo P.B., Ma Y., Guller S., Romero R., Mor G. (2009) The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta* 30, 939-48.

- Su Y., Gao L., Teng L., Wang Y., Cui J., Peng S. and Fu S. (2013) Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B/MMP-2 signaling pathways. *Journal of Translational Medicine* 11, 132.
- Sudo T., Kawai K., Matsuzaki H., Osada H. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase plays a key role in regulating MAPKAPK2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 415-21.
- Sugimoto C., Fujieda S., Sunaga H., Noda I., Tanaka N., Kimura Y., Saito H., Matsukawa S. (2001) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mediated signaling regulates type IV collagenase activity in head and neck cancer cells. *International Journal of Cancer* 93, 42-46.
- Tachibana M., Miyakawa A., Uchida A., Murai M., Eguchi K., Nakamura K., Kubo A., Hata J.I. (1997) Granulocyte colony-stimulating factor receptor expression on human transitional cell carcinoma of the bladder. *British Journal of Cancer* 75, 1489-96.
- Takada Y., Ye X. and Simon S. (2007) Protein family review: The integrins. *Genome Biology* 8, 215.
- Tamada T., Honjo E., Maeda Y., Okamoto T., Ishibashi M., Tokunaga M., Kuroki R. (2006) Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling complex. *Protocols of the National Academy of Sciences* 103, 3135-3140.
- Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K. (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research* 65, 550- 563.
- Tian S.S., Tapley P., Sincich C., Stein R.B., Rosen J. and Lamb P. (1996) Multiple Signaling Pathways Induced by Granulocyte Colony-Stimulating Factor Involving Activation of JAKs, STATS, and/or STAT3 Are Required for Regulation of Three Distinct Classes of Immediate Early Genes. *Blood* 88, 4435-4444.
- Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. (2012) Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 16-32.

- Tsatsaris V., Malassiné A., Fournier T., Handschuh K., Schaaps J.P., Foidart J.M., Evain-Brion D. (2006) Placenta humana. *EMC-Ginecología-Obstetricia* 42, 1-23.
- Usuki K., Iki S., Endo M., Kitazume K., Ito K., Watanabe M., Urabe A. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor in acute myeloid leukemia. *Stem Cells* 13, 647-54.
- Uzumaki H., Okabe T., Sasaki N., Hagiwara K., Takaku F., Tobita M., Yasukawa K., Ito S. and Umezawa Y. (1989) Identification and characterization of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human placenta and trophoblastic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9323-9326.
- van den Blink B., Juffermans N.P., ten Hove T., Schultz M.J., van Deventer S.J., van der Poll T., Peppelenbosch M.P. (2001) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibition Increases Cytokine Release by Macrophages In Vitro and During Infection In Vivo. *The Journal of Immunology* 166, 582-587.
- van der Flier A. y Sonnenberg A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Research* 305, 285-98.
- Vandermolen D.T. and Gu Y. (1996) Human endometrial expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and its receptor, stimulation of endometrial G-CSF production by interleukin-1 beta, and G-CSF inhibition of choriocarcinoma cell proliferation. *American Journal of Reproductive Immunology* 36, 278-84.
- Verma I.M. (2004) Nuclear factor (NF)-kB proteins: therapeutic targets. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63, ii57-ii61.
- Visse R. and Nagase H. (2003) Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circulation Research* 92, 827-839.
- Vlahos C.J., Matter W.F., Hui K.Y., Brown R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *Journal of Biological Chemistry* 269, 5241-8.

- Wang J., Yao L., Zhao S., Zhang X., Yin J., Zhang Y., Chen X., Gao M., Ling E.A., Hao A., Li G. (2012) Granulocyte-colony stimulating factor promotes proliferation, migration and invasion in glioma cells. *Cancer Biology and Therapy* 13, 389-400.
- Wang L., Zhang Z.G., Zhang R.L., Gregg S.R., Hozeska-Solgot A., LeTourneau Y., Wang Y., Chopp M. (2006) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *Journal of Neurosciences* 26, 5996-6003.
- Wang Y. and Zhao S. (2010) *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael (CA) Morgan & Claypool Life Sciences.
- Welinder C., Ekblad L. (2011) Coomassie staining as loading control in western blot analysis. *Journal of Proteome Research* 10, 1416-1419.
- Welte K., Gabrilove J., Bronchud M.H., Platzer E. and Morstyn G. (1996) Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood* 88, 1907-1929.
- Westermarck J. and Kähäri V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *The FASEB Journal* 13, 781-792.
- Wortzel I. and Seger R. (2011) The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & Cancer* 2, 195-209.
- Xiao L.J., Lin P., Lin F., Liu X., Qin W., Zou H.F., Guo L., Liu W., Wang S.J., Yu X.G. (2012) ADAM17 targets MMP-2 and MMP-9 via EGFR-MEK-ERK pathway activation to promote prostate cancer cell invasion. *International Journal of Oncology* 40, 1714-24.
- Xu P., Wang Y.L., Zhu S.J., Luo S.Y., Piao Y.S., Zhuang L.Z. (2000) Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. *Biology of Reproduction* 62, 988-94.
- Yadav L., Puri N., Rastogi V., Satpute P., Ahmad R., Kaur G. (2014) Matrix Metalloproteinases and Cancer - Roles in Threat and Therapy. *Asian Pacific Organization for Cancer Prevention* 15, 1085-1091.

- Yang X., Liu F., Xu Z., Chen C., Wu X., Li G., Li J. (2005) Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. *Postgraduate Medicine Journal* 81, 333–337.
- Yong K.L. (1996) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *British Journal of Haematology* 94, 40-7.
- Yoshizuka N., Chen R.M., Xu Z., Liao R., Hong L., Hu W.Y., Yu G., Han J., Chen L. and Sun P. (2012) A Novel Function of p38-Regulated/Activated Kinase in Endothelial Cell Migration and Tumor Angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 32, 606–618.
- Young D.C., Zhan H., Cheng Q.L., Hou J., Matthews D.J. (1997) Characterization of the receptor binding determinants of granulocyte colony stimulating factor. *Protein Science* 6, 1228-36.
- Yu Q., Chen L., You Y., Zou C., Zhang Y., Liu Q., Cheng F. (2010) Erythropoietin combined with granulocyte colony-stimulating factor enhances MMP-2 expression in mesenchymal stem cells and promotes cell migration. *Molecular Medicine Reports* 4, 31-6.
- Zachary, I. (2001) Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *American Journal of Physiology and Cell Physiology* 280, C1375–C1386.
- Zarubin T. and Han J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 15, 11-18.
- Zhang Y., Cheng G., Yang K., Fan R., Xu Z., Chen L., Li Q., Yang A., Jin B. (2009) A novel function of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization of human hematopoietic progenitor cells. *Immunology and Cell Biology* 87, 428-32.
- Zhao J.J., Gjoerup O.V., Subramanian R.R., Cheng Y., Chen W., Roberts T.M., Hahn W.C. (2003) Human mammary epithelial cell transformation through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Cell* 3, 483-95.

- Zhu Q.S., Xia L., Mills G.B., Lowell C.A., Touw I.P. and Corey S.J. (2006) G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood* 107, 1847-1856.
- Zhuang Z.Y., Xu H., Clapham D.E., Ji R.R. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *Journal of Neuroscience* 24, 8300-9.
- Zygmunt M., Herr F., Münstedt K., Lang U., Liang O.D. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 110, S10-S18.