

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR IGF2R EN TROFOBLASTO HUMANO

Juan José Castro Badilla

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

2021

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR IGF2R EN TROFOBLASTO HUMANO

Juan José Castro Badilla

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de
Doctor en Ciencias Bioquímica

Directora

Adriana Umaña Pérez

Química, MSc., Doctor en Ciencias

Línea de Investigación

Factores de crecimiento, diferenciación y cáncer

Grupo de Investigación en Hormonas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2021

A mi familia que con su esfuerzo y sacrificio me permitieron ser el profesional que soy. En especial a mi padre que desde el cielo me bendice.

A mi amada esposa por su apoyo incondicional y por siempre creer en mí.

“Sé cómo el árbol: párate derecho y orgulloso, recuerda tus raíces, toma mucha agua, disfruta de la vista y el aire libre, crece sin miedo, no niegues la riqueza de tus frutos, da sombra a quien anda cansado en el camino, llena tu corazón del canto de las aves, purifícate con el agua de la lluvia y sé lo mejor que puedas ser”

Anónimo

“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo y no convertir en realidad tus sueños”

Pablo Neruda

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mi familia, la cual siempre ha estado junto a mí alentándome, dándome todo su apoyo y comprensión. A mi madre por su entrega, su fuerza de voluntad y su preocupación eterna; a mi hermano por sus ganas y empuje, en todo este camino, de que todo va a salir excelente, y a mi padre, que con sus enseñanzas y con el recuerdo vivo en mi corazón me motivan a terminar este proyecto, entre muchas otras cosas más, gracias a Uds. por su apoyo, los quiero.

A mi amada esposa Lorena por su incondicional amor y cariño, su esfuerzo, su confianza puesta en mí y, sobre todo, por ser mi pilar en esta etapa de formación, gracias, te amo. A su familia por acogerme en su hogar y hacerme sentir como uno más de la familia, por su cariño, por su preocupación, por su entrega, gracias.

También agradecer a mi tutora la Dra. Adriana Umaña por la confianza depositada en mí, su paciencia, su constancia, sus enseñanzas y consejos entregados a lo largo de la tesis. A mis amigos y compañeros del Grupo de Investigación en Hormonas por todo el ánimo, apoyo, tanto experimental como académico, y ayuda entregada en todo este tiempo, en especial a Francisco Olea.

Y finalmente, agradecer al profesor Juan Manuel Peralta por todas las horas de baloncesto que me permitieron mantenerme bien físicamente durante todo el doctorado, y a muchos que se quedan en el tintero pero que cada uno aportó con su granito de arena. Gracias a todos por cumplir este sueño.

Resumen

Caracterización de la vía de señalización intracelular mediada por IGF2R en trofoblasto humano

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2, IGF2, ejerce acciones a través de los receptores de la familia IGF incluyendo el receptor tipo 1 (IGF1R), el receptor de insulina (IR) y los híbridos IGF1R/IR. Preferiblemente, su acción es mediada a través del receptor IGF1R modulando rutas de señalización intracelulares esenciales en procesos como la proliferación, migración e invasión celular, eventos que son de carácter crucial en las manifestaciones patológicas originadas en el trofoblasto, tales como, la enfermedad trofoblástica gestacional, molas, preeclampsia o la restricción de crecimiento intrauterino; siendo estas complicaciones un problema actual para la salud pública del país.

Se ha descrito que en tejido de mola la expresión de IGF2 se encuentra elevada y que participa activamente en el proceso de la embriogénesis. La regulación de la biodisponibilidad de este ligando se atribuye, entre otros, a la unión con el receptor IGF2R, el cual lo internaliza para su degradación. Sin embargo, hace más de una década existe controversia sobre si esta interacción IGF2/IGF2R puede desencadenar una vía de señalización que participe en los procesos celulares descritos anteriormente.

En este orden de ideas, para explorar si existe una vía de señalización dependiente de IGF2R, sin la activación directa de los otros receptores de la familia, se usó como estrategia estimular células de trofoblasto humano HTR-8/SVneo con Leu²⁷IGF2, péptido análogo de IGF2, que se une exclusivamente al IGF2R. La inducción de las células con el análogo generó una activación temprana de las proteínas ERK1 y 2 mayor a la inducida por el IGF2. Se observó un incremento en los niveles de transcripción de MMP-9 de carácter tiempo-dependiente de Leu²⁷IGF2 y anticipado con respecto al péptido IGF2, concordante con un aumento temprano de la actividad gelatinasa de MMP-9. Se determinó que la interacción de IGF2R con Leu²⁷IGF2 generó un incremento significativo del 20%, 13% y 23% en adhesión, migración y proliferación celular respectivamente. Resultados que nos sugieren que el IGF2 en células de trofoblasto, activa al receptor IGF2R y al menos una ruta de señalización, como la de MAPKs, involucrada en el aumento de la activación

de proteínas y transcripción de genes que favorecen la adhesión, migración e invasión celular durante la implantación blastocística.

Palabras clave: IGF receptor, factor de crecimiento similar a insulina tipo 2, HTR-8/SVneo, implantación, placenta, obesidad.

Abstract

Characterization of the intracellular signaling mediated by IGF2R in human trophoblast

The insulin-like growth factor or type 2, IGF2, exerts actions through receptors in the IGF family including the type 1 receptor (IGF1R), the insulin receptor (IR) and IGF1R/IR hybrids. Preferably, its action is mediated through the IGF1R receptor modulating intracellular signaling pathways essential in processes such as cell proliferation, migration or invasion, events that are crucial in the pathological manifestations originated by the trophoblast, such as gestational trophoblastic diseases, moles, preeclampsia or intrauterine growth restriction, being these complications a current problem for the public health of the country.

It has been described that the expression of IGF2 in mole tissue is high and, in addition, that it actively participates in the embryogenesis process. The regulation of the bioavailability of this ligand is attributed, among others, to the binding with the IGF2R receptor which internalizes it for degradation. However, for more than a decade there has been controversy about whether this interaction IGF2/IGF2R can trigger a signaling pathway involved in the cellular processes described above. To explore if there is an IGF2R-dependent signaling pathway, without the direct activation of the other receptors of the family, cells derived from human trophoblast HTR-8/SVneo were stimulated with Leu²⁷IGF2, an analogous peptide of IGF2, which binds exclusively to IGF2R. The induction of cells with the analogue generated a higher early activation of ERK1 and 2 proteins compared to that induced by IGF2. Similarly, an increase in the transcription levels of Leu²⁷IGF2-dependent and anticipated MMP-9 with respect to IGF2 peptide was observed, consistent with an early increase in MMP-9 gelatinase activity. It was determined that

interaction of IGF2R with Leu²⁷IGF2 generated a significant increase of approximately 20%, 13% and 23% in adhesion, migration and cell proliferation respectively with respect to basal condition.

These results suggest that IGF2 in trophoblast cells activates the IGF2R receptor and at least one signaling pathway, such as MAPKs, involved in increased protein activation and gene transcription that favor cell adhesion, migration and invasion during blastocyst implantation.

Keywords: IGF receptor, insulin-like growth factor type 2, HTR-8/SVneo, implantation, placenta, obesity.

Contenido

	Pág.
Capítulo 1: Marco teórico.....	5
Capítulo 2: Metodología.....	17
Capítulo 3: Resultados.....	27
Capítulo 4. Discusión.....	44
Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones.....	57

Lista de figuras

	Pág.
Fig. 1. Afinidad de los ligandos por sus receptores en el sistema IGF.	3
Fig. 2. Interfase feto placentaria.	6
Fig. 3. Inapropiada invasión del trofoblasto en la preeclampsia.	8
Fig. 4. Componentes del sistema IGF.	9
Fig. 5. Principales vías de señalización de los receptores tirosina quinasa.	11
Fig. 6. Procedimiento para obtención de explantes y clasificación de muestras placentarias.	18
Fig. 7. Fosforilación de IGF1R inducida por IGF2 y su análogo.	28
Fig. 8. Localización celular de IGF2R.	28
Fig. 9. Fosforilación de AKT y ERK en respuesta a IGF2	29
Fig. 10. Niveles de AMPc en células inducidas con IGF2 y su análogo.	30
Fig. 11. Migración electroforética de IGF2R en extracto celular incubado con Leu ²⁷ IGF2.	31
Fig. 12. Efecto de Leu ²⁷ IGF2 e IGF2 sobre la adhesión de células HTR-8/SVneo.	33

Fig. 13. Efecto de Leu ²⁷ IGF2 e IGF2 sobre la migración celular.	34
Fig. 14. Efecto de Leu ²⁷ IGF2 e IGF2 sobre la invasión celular.	36
Fig. 15. Efecto de Leu ²⁷ IGF2 e IGF2 sobre la proliferación celular.	38
Fig. 16. Contenido proteico de IGF2R en placentas humanas de diferente sexo.	40
Fig. 17. Expresión génica y contenido proteico de IGF2R en placentas humanas.	42
Fig. 18. Expresión génica de ADAM17, uPA, IGF2 e IR en placentas humanas.	43
Fig. 19. Generación de adenosina a partir de adenosín monofosfato cíclico.	47
Fig. 20. Modelo propuesto de la vía de señalización mediada por IGF2R en células trofoblásticas.	50
Fig. 21. Modelo propuesto de la funcionalidad de IGF2R en células trofoblásticas.	51
Fig. 22. Activación de TGF- β por el receptor IGF2R.	53
Fig. 23. Regulación de la señalización de TGF- β .	54

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Secuencia de <i>primers</i> usados para Real Time PCR en genes de la línea celular.	21
Tabla 2. Secuencia de <i>primers</i> usados para Real Time PCR en genes placentarios.	22
Tabla 3. Características antropométricas de las madres y de los recién nacidos.	41

Abreviaturas

Abreviatura	Término
A β	Beta amiloide
AC	Adenilato ciclasa
ADAM17	Desintegrina y metaloproteasa 17
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APP	Proteína precursora de amiloides
α -SMA	Actina del músculo liso alfa
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AKT	Serina/Treonina proteína quinasa
ALS	Subunidad ácido lábil
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Seroalbúmina de bovino
CREB	Factor que se une a elementos de respuesta al AMPc
CT	Citotrofoblasto
DAG	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosaheptaenoico
E/L	Endosoma-Lisosoma
ETG	Enfermedad trofoblástica gestacional
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HTR-8/SVneo	Línea celular derivada del citotrofoblasto extra vellosa
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGF1R	Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1
IGF2	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2
IGF2R	Receptor del factor de crecimiento similar a insulina tipo 2
IGF2Rs	Forma clivada y soluble del receptor IGF2R
IGFBPs	Proteínas de unión a los factores de crecimiento similar a insulina
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Receptor de insulina
LAMP1	Proteína de membrana asociada a lisosoma 1
Leu ²⁷ IGF2	Péptido IGF2 al cual se reemplaza la tirosina en la posición 27 por leucina
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MH	Mola hidatiforme
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
RCIU	Restricción de crecimiento intrauterino
RN	Recién nacidos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
ST	Sinciotrofoblasto
TACE	Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β

Abreviatura **Término**

<i>TBS</i>	Buffer salino tris
<i>TE</i>	Trofoblasto extra veloso
<i>TEM</i>	Transición Epitelio-Mesénquima
<i>TV</i>	Trofoblasto veloso
<i>uPA</i>	Activador de plasminógeno tipo uroquinasa
<i>uPAR</i>	Receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa

Introducción

Tanto la adhesión, como la migración y la invasión de las células del trofoblasto extra veloso hasta un tercio de la capa del miometrio, son procesos esenciales para el desarrollo de la placenta y para la comunicación química entre la madre y el feto [1,2], eventos celulares que se encuentran regulados tanto espacial como temporalmente por mediadores biológicos [3,4]. Cuando estos procesos celulares se desregulan u ocurren de una manera inapropiada, conllevan a patologías como la mola hidatiforme, el coriocarcinoma, la preeclampsia o la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) [5–9], las cuales en conjunto constituyen un importante problema de salud pública en el país [10,11].

Nuestro grupo de investigación y otros investigadores han descrito que alteraciones en los componentes del sistema de los factores de crecimiento similares a insulina, IGFs, promueven estas patologías [11–13]. En particular, el IGF2, uno de los ligandos que conforma este sistema, se encuentra sobre expresado en el tejido de mola [11], se ha descrito como el principal precursor de la embriogénesis [14] y su contenido en circulación sanguínea es cinco veces mayor con respecto al de IGF1 [15], características que lo hacen un buen candidato para nuestro estudio. Su biodisponibilidad es regulada por el receptor IGF2R, el cual lo internaliza para su degradación [16]. No obstante, desde hace más de una década, existe controversia de si esta interacción ligando-receptor podría mediar una señalización a nivel intracelular en las células trofoblásticas que participen en procesos como proliferación, migración o invasión celular, cruciales en las manifestaciones patológicas originadas por el trofoblasto.

Varios estudios describen que el receptor IGF2R presenta relevancia en diversos procesos celulares como son la regulación y el transporte de glicoproteínas que contienen manosa-6-fosfato (M6P), principalmente enzimas lisosomales, de la red trans-Golgi hacia los lisosomas [17], la activación proteolítica del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [17], la interacción con proteínas que participan en la remodelación de la matriz extracelular

[16–18], el clivaje del dominio extra celular mediado por la proteasa TACE/ADAM17, que lo vuelve soluble en sangre actuando como una proteína de unión a IGF (o IGFBP) [18–20], la remoción del IGF2 extracelular [17], péptido con el cual presenta la mayor afinidad [21], así como, diversos estudios muestran que presenta un rol en la proliferación, migración celular y apoptosis [22,23]. Su expresión/contenido se ve alterado en las patologías en estudio [24,25], siendo un prometedor biomarcador para diversos tipos de cáncer.

Por consiguiente, nuestro objetivo fue evaluar si el receptor IGF2R, activado por IGF2, en la línea celular HTR-8/SVneo, línea derivada de trofoblasto humano, puede activar efectores *corriente abajo* que participen en los procesos necesarios para el desarrollo de estas células. Optamos por esta línea como modelo de estudio dado que: **a)** muchos de los mecanismos proliferativos, angiogénicos, invasivos o de evasión del sistema inmune son compartidos con las células tumorales [26], **b)** responde a las acciones anti-proliferativas del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) pero no a las anti-invasivas; así mismo, es incapaz de formar colonias en agar o presentar tumorigenicidad en ratones desnudos [27], **c)** la *American Type Culture Collection* (ATCC) la recomienda para estudiar funciones placentarias, tratar de comprender enfermedades relacionadas a la progresión tumoral y estudiar placentación anormal relacionadas con la preeclampsia [28], y **d)** esta línea celular deriva del citotrofoblasto extra vellosos del primer trimestre, población celular encargada de migrar e invadir la capa endometrial, además de remodelar las arterias espirales [29], procesos celulares que nos interesan para nuestro estudio.

El ligando IGF2, por otra parte, presenta afinidades diferentes por los receptores de la familia IGF, además de interactuar con ellos y mediar vías de señalización a nivel intracelular (ver figura 1) [21].

Se ha descrito que sus acciones mitogénica e invasiva son mediadas por el receptor de IGF1, IGF1R [14], por lo cual, para responder a nuestro objetivo abordamos la estrategia de utilizar un péptido análogo a IGF2, denominado Leu²⁷IGF2, el cual se une exclusivamente al receptor IGF2R siendo su agonista. Este péptido se encuentra libre en el suero, no interactúa con las proteínas IGFBPs y presenta una muy baja afinidad por los receptores IGF1R y el receptor de insulina IR [22,30–33].

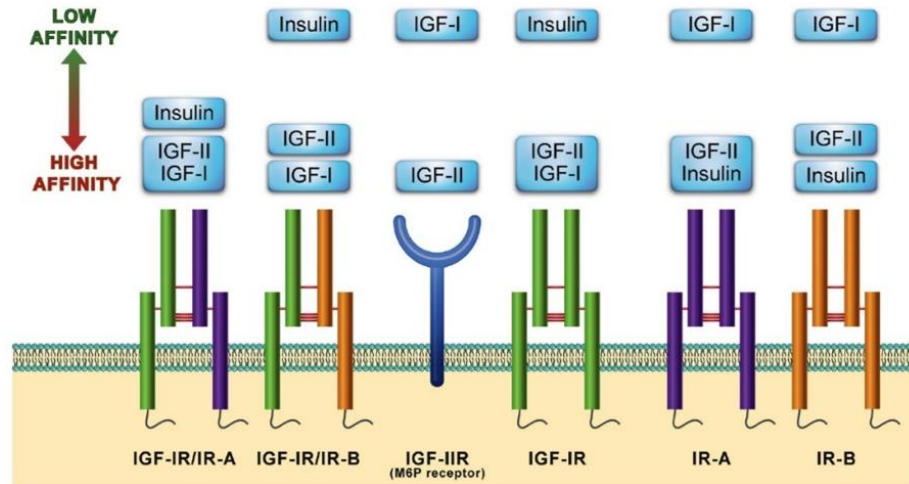


Figura 1. Afinidad que presentan los ligandos por sus receptores en el sistema IGF. Tomado de [21].

Nuestra estrategia experimental fue cultivar la línea HTR-8/SVneo hasta alcanzar un porcentaje de confluencia, e inducirlas con los péptidos normal y análogo a diferentes tiempos. Se extrajo proteína total y ARN total de cada condición, además de almacenar los medios condicionados por ellas, para evaluar la activación de proteínas canónicas en la vía de los receptores tirosina quinasa, receptores a los cuales pertenece el sistema IGF, a través de la técnica *western blot*, la expresión génica de efectores en respuesta a estos factores mitogénicos utilizando *Real Time PCR*, y la secreción de proteínas/enzimas al medio, en particular metaloproteasas, en respuesta a estos factores, a través de zimografías.

Se realizaron ensayos funcionales para evaluar la participación del receptor en los procesos celulares en estudio como son: ensayos de MTT para la adhesión celular, ensayos con rojo neutro para la proliferación celular, ensayos con cámaras de Boyden y cierre de herida para evaluar migración e invasión celular.

La localización del receptor se observó a través de inmunofluorescencia y para evaluar la posible vía de señalización del receptor, se midió el metabolito secundario adenosín monofosfato cíclico (AMPc), a través de ELISA, además de realizar inmunoprecipitación del receptor para determinar cuáles proteínas interactúan cuando el receptor está activado.

Considerando los resultados preliminares que obtuvimos con esta línea celular y los recientes reportes realizados en tejido placentario asociados a las patologías en estudio,

además a una relación directa entre los niveles del receptor soluble con la obesidad y diabetes [34–36]. Abordamos un estudio en el cual evaluamos tanto la expresión génica, a través de *Real Time* PCR, como el contenido proteico del receptor en explantes placentarios humanos de madres con peso normal, madres con obesidad y madres con obesidad suplementadas con ácido docosahexaenoico (DHA), suplemento que se ha descrito como anti inflamatorio [37], disminuyendo quizás la inflamación crónica generada por estas patologías.

Nuestro propósito con este trabajo es hacer hincapié en que el crecimiento y el desarrollo normal del feto y su placenta, dependen en gran medida de la interacción entre los factores fetales y maternos, donde la familia de los factores IGFs presenta un rol crítico. Actualmente, el origen de las patologías fetales, importantes para el país sigue siendo controversial, por ende, estudiar los componentes de este sistema y entender los posibles mecanismos moleculares que expliquen el desarrollo de estas enfermedades, utilizando como modelo una línea celular derivada de trofoblasto o explantes de placentas de término, permiten aproximarnos a una solución que mejore el bienestar y la salud, tanto de la madre, como del feto. Además de aportar conocimiento básico en lo que refiere a la presencia de una o varias vías de señalización intracelulares mediadas por el receptor IGF2R, y activadas por IGF2, que promueven los procesos celulares descritos anteriormente, facilitando la condición inicial de implantación en la capa endometrial.

Capítulo 1: Marco teórico

1.1 Introducción

Al iniciarse la implantación blastocística, se produce la activación de diversos mecanismos moleculares y rápidas transformaciones en la interface compartida por la placenta materna y el blastocisto implantado, las cuales, son cruciales para la supervivencia y desarrollo embrionario [2,38]. Inicialmente, se producen dos linajes celulares a partir de la división de los blastómeros: las células trofodérmicas epiteliales que formarán la placenta, y el embrioblasto que formará al embrión como tal. A partir del trofodermo se originará el trofoblasto, que a su vez se diferenciará en 2 tipos celulares: el citotrofoblasto (CT) y el sincitiotrofoblasto (ST) [3,39].

Las células del CT, son células mononucleares con citoplasma bien definido y que están en constante mitosis diferenciándose en dos poblaciones: el trofoblasto veloso (TV) y el trofoblasto extra veloso (TE). Mientras que el ST son células multinucleadas que no presentan mitosis y que están expuestas a la sangre materna y a los efectores del sistema inmune. Nacen de las células madres del CT y su función es actuar como una membrana de diálisis que permite el intercambio bidireccional de moléculas que entran y salen de la circulación fetal (ver figura 2) [38–40].

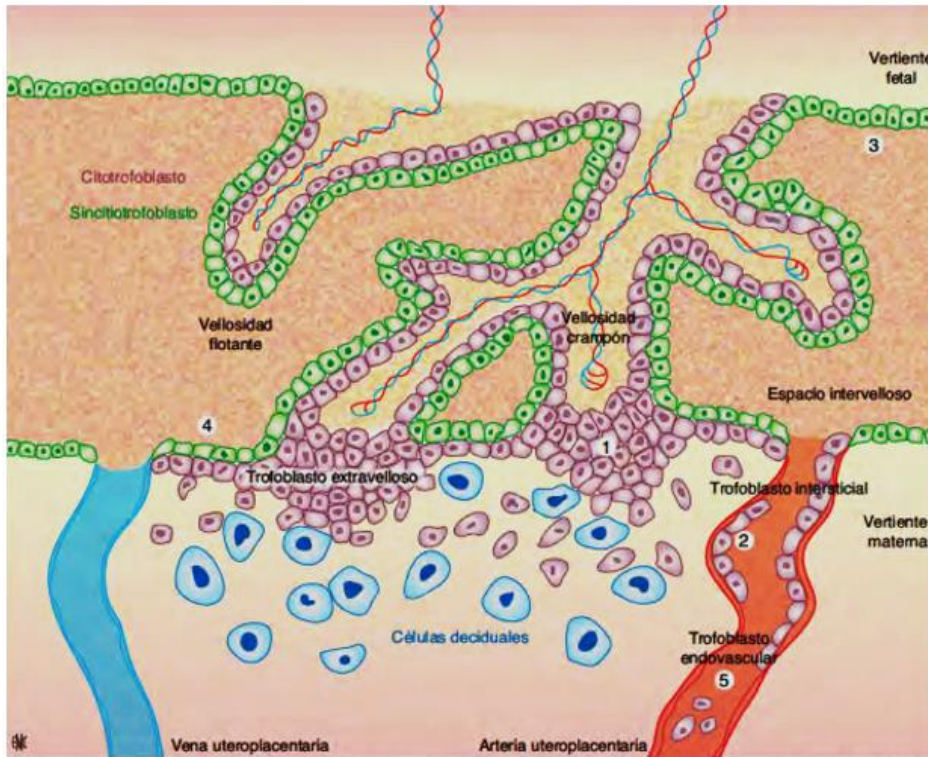


Figura 2. *Interfase feto placentaria.* En la parte superior de la figura se encuentra la zona fetal y en la parte inferior la zona materna. En color verde se observan las células del ST y en color morado las células del CT. En (1) el TE migra e invade la decidua, en (2) el trofoblasto invade y remodela las paredes de las arterias uterinas, en (3) el ST se encuentra en contacto con la sangre materna en el espacio intervilloso permitiendo el ingreso de nutrientes y en (4) el ST permite la salida de los desechos metabólicos al espacio intervilloso. Tomado de [41].

1.2 Patologías asociadas a las células trofoblásticas

La invasión, migración y proliferación inapropiadas de las células trofoblásticas están implicadas en diversas complicaciones durante el embarazo, como son la RCIU, la enfermedad trofoblástica gestacional (ETG) o la preeclampsia [7,8,42,43]. La ETG, es un conjunto de patologías, derivadas de una proliferación anormal de la placenta y de un proceso de fertilización con exceso de genoma paterno [42,43]. Dentro de estas patologías, se incluyen la mola hidatiforme (MH) y el coriocarcinoma, las cuales se caracterizan por la transformación del tejido placentario en vesículas o quistes de diferentes tamaños; siendo algunas de estas lesiones neoplasias verdaderas y otras representan formaciones anormales de la placenta con predisposición a la transformación neoplásica del trofoblasto [43,44].

La MH se caracteriza por una hiperplasia trofoblástica y tumefacción edematosa de las vellosidades coriónicas o tumefacción quística de las vellosidades placentarias, acompañada de una proliferación trofoblástica variable. Actualmente, se reconoce que la mola puede subdividirse en mola completa y en mola parcial, sobre la base de su apariencia morfológica, sus características histopatológicas y el origen genético establecido a través de polimorfismos [8,40]. La MH completa se presenta con vellosidades hidrópicas, hiperplasia del trofoblasto y ausencia de tejidos fetales y surge por la fertilización de un óvulo vacío, generando un tejido diploide con dotación cromosómica de origen completamente paterno, mientras que la MH parcial posee vellosidades coriónicas de tamaño diverso, con tejidos fetales identificables; en su mayoría son triploides, y con genoma de origen paterno y materno [8].

El coriocarcinoma a su vez, se desarrolla por una proliferación atípica tanto del CT como del ST, sin presencia del estroma. Generalmente la lesión está formada por un área central de tejido necrótico, rodeada por un anillo periférico de tejido tumoral. Es uno de los tumores malignos más invasivos con metástasis extensas, siendo frecuentes a nivel de pulmones, vagina, cerebro, hígado y riñones [45,46]. Tanto la MH como el coriocarcinoma, constituyen un importante problema de salud pública en Colombia con una incidencia de 4 casos de mola por cada 1000 embarazos, de los cuales, entre el 10 y 20% se transformará en coriocarcinoma [11].

En forma paralela, la preeclampsia es otra patología que también afecta la capacidad reproductiva de la mujer, caracterizada clínicamente por hipertensión y proteinuria en la madre, siendo la primera causa de mortalidad materna y la segunda causa de mortalidad perinatal en el país [10]. Se sospecha que es causada por una mala implantación/invasión del trofoblasto, ocasionando una deficiente remodelación de las arterias espirales uterinas (ver figura 3) y una reacción inmune que incrementa la secreción de mediadores inflamatorios que actúan sobre los endotelios vasculares provocando su disfunción [7,9,47].

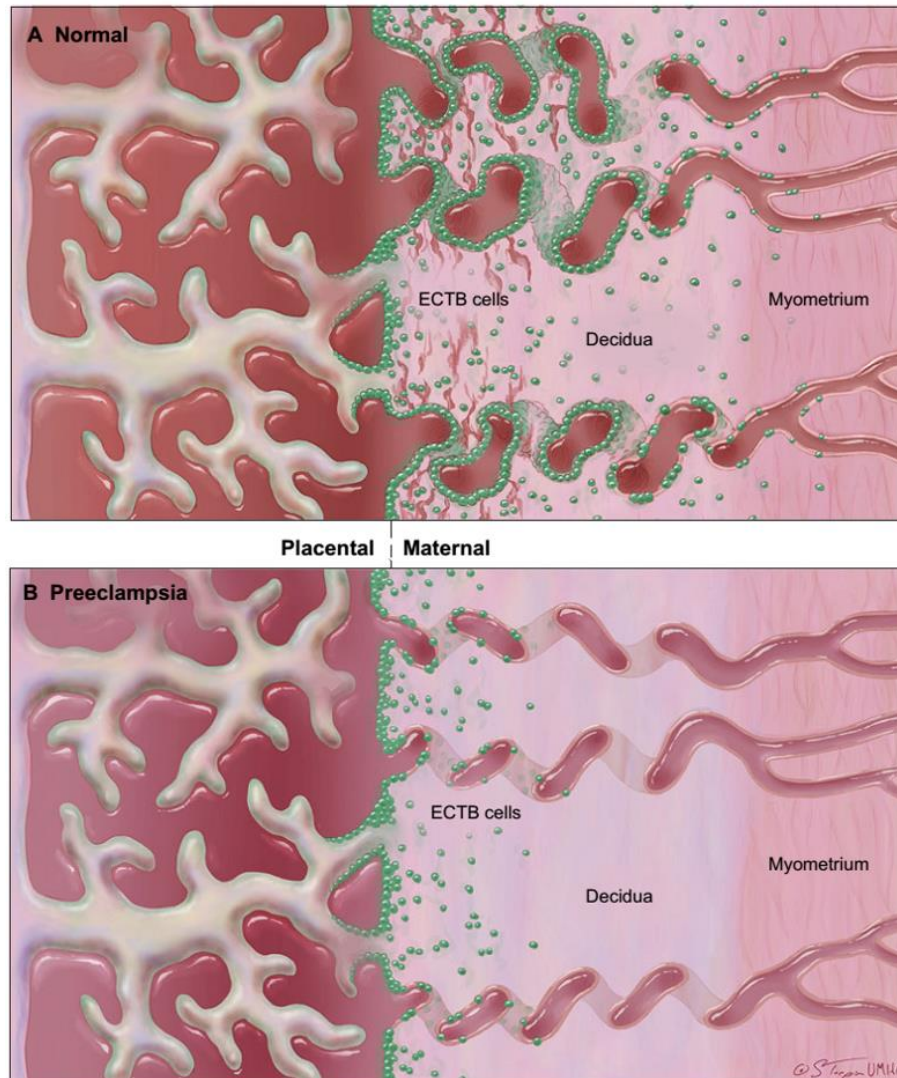


Figura 3. *Inapropiada invasión del trofoblasto en la preeclampsia.* En la placenta normal (**A**) las células del TE en color verde, denominadas en la figura **ECTB**, migran e invaden la decidua y remodelan las paredes de las arterias uterinas incrementando el flujo sanguíneo hacia la placenta, mientras que en la preeclampsia (**B**) la invasión es superficial y limitada quedando las arterias rígidas. Tomado de [7].

Finalmente, la RCIU de origen multifactorial, es una patología que disminuye tanto el desarrollo como el potencial genético del feto, la cual es vinculada estrechamente con la preeclampsia y con la disfunción placentaria. A nivel mundial incrementa significativamente el riesgo de mortalidad y morbilidad perinatal, además de predisponer al recién nacido a desarrollar enfermedades degenerativas en la adultez como por ejemplo la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares u obesidad [48–50].

1.3 Participación de IGF2 en patologías trofoblásticas

Investigaciones previas han mostrado la existencia de alteraciones en los niveles de IGF2 en estas patologías [11,12,25,51,52], como uno de los principales responsables en la regulación del desarrollo y crecimiento de la placenta y otros tejidos [25,53–56]. Este ligando forma parte de un complejo sistema, en el cual se incluyen también el IGF1 y la insulina (debido a su similitud estructural), los receptores en la superficie celular tipo 1 y 2 de IGF (IGF1R e IGF2R respectivamente), el receptor de insulina (IR) con las isoformas A y B, e híbridos formados por un dímero de IGF1R e IR-A/B, así como, las proteínas IGFBPs (ver figura 4) [14,21].

Las IGFBPs son una familia de 6 proteínas que transportan a los ligandos en suero, regulando su actividad y aumentando sus vidas medias [57]. Cerca del 75% de los IGFs circulantes existen como complejo ternario de 150 kDa compuesto de IGF1 o IGF2, IGFBP3 y la subunidad ácido lábil (ALS) y menos del 1% se encuentran libres ejerciendo su acción [58].

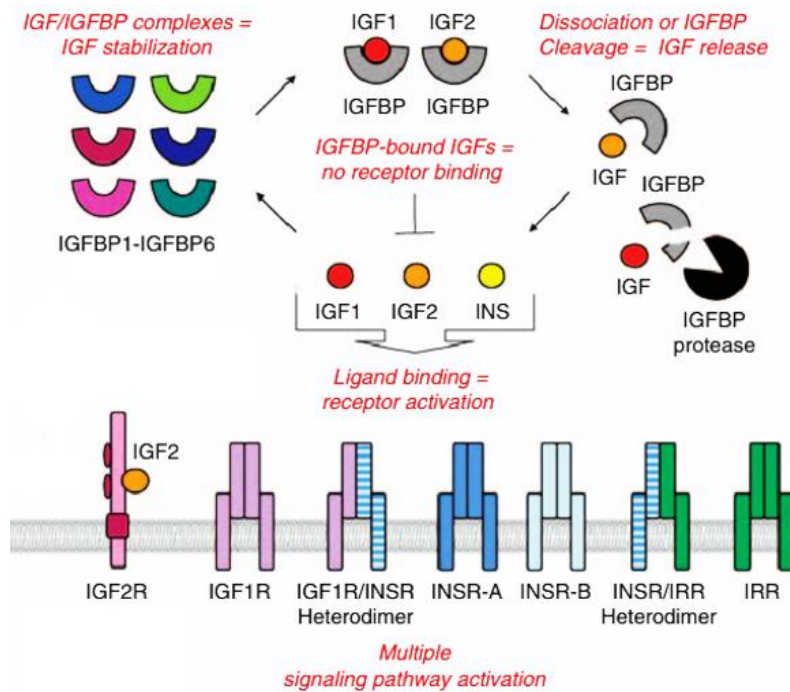


Figura 4. Componentes del sistema IGF. Modificado de [59].

IGF1 e IGF2, presentan acciones metabólicas, mitogénicas, anti-apoptóticas y de diferenciación, tanto a nivel fisiológico o patológico, regulando diversos procesos como son el aumento de la síntesis proteica, la inhibición de la proteólisis, la captación de glucosa, y por ende el crecimiento, migración, invasión y diferenciación celular [14,60,61].

En particular, se ha descrito que el IGF2, un péptido de 67 aminoácidos y con un peso de 7.5 kDa, es 3 veces más abundante que IGF1 en suero y tiene una relevancia específica en el crecimiento fetal, siendo su expresión muy alta en la embriogénesis [14,15,61,62]. Su sobreexpresión tanto en el tejido de mola como circulante se ha asociado con el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de placenta, colorrectal, de seno, próstata y pulmón [11,51,62,63].

Los factores genéticos juegan un rol importante en la regulación de la expresión de IGF2, siendo la proporción de dicha regulación de un 66%, mientras que para IGF1 es de solo un 38%. La transcripción es regulada por impronta genómica, mecanismo que restringe la expresión del alelo materno en muchos tejidos, mientras que para su receptor, el IGF2R, encargado de regular su biodisponibilidad, la impronta restringe la expresión del alelo paterno [62,64–66]. Lo anterior sugiere la importancia que presenta su regulación a nivel genético, debido a que la pérdida de este mecanismo se ha propuesto como un factor en la oncogénesis de varios tipos de tumores humanos [62,64,67]. IGF2, además, se puede transcribir a partir de 4 promotores (P1 – P4) de los cuales, durante la embriogénesis, la transcripción ocurre a partir de los promotores P2 y P4 resultando en la expresión monoalélica normal [64,65].

La acción de IGF2 es mediada preferencialmente por el receptor IGF1R, aunque también puede ser mediada por el receptor IR-A y por el receptor híbrido IGF1R/IR-A [14,21]. Cuando IGF2 se une a uno de estos receptores induce la autofosforilación de los residuos tirosinas del receptor desencadenando el reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras permitiendo la activación de dos vías principales, por un lado, la ruta de las MAPKs importantes en el crecimiento celular, y la ruta PI3K/AKT crucial en el metabolismo celular e inhibición de la apoptosis (ver figura 5) [68,69]. Sin embargo, se debe considerar que la afinidad con su propio receptor, IGF2R, es mayor en comparación a los otros receptores mencionados [21].

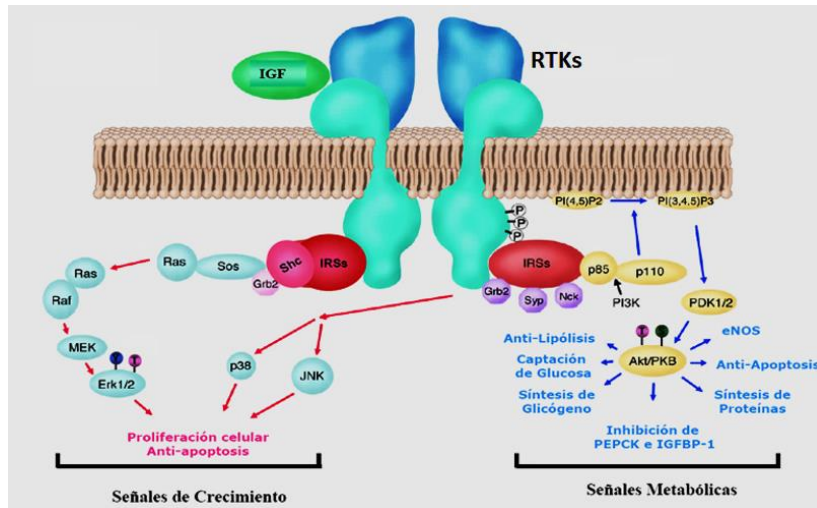


Figura 5. Principales vías de señalización de los receptores tirosina quinasa (RTKs). Tomado de [70].

1.4 Procesos celulares en los que participa IGF2R

El IGF2R, también conocido como receptor manosa-6-fosfato catión-independiente (M6PR), en humanos es una glicoproteína de alrededor de 300 kDa que se expresa en casi todos los tejidos, con una región extracelular formada por 15 regiones homólogas ricas en cisteínas, un dominio transmembranal de 23 residuos y un dominio citoplasmático carboxi-terminal de 163 residuos.

Este receptor presenta afinidad por dos tipos de ligando principalmente, las moléculas que poseen en su estructura manosa-6-fosfato (M6P) y el IGF2 [18,71–74]. Las evidencias sugieren que el contenido de este receptor en la superficie celular es de alrededor del 10%, participando en la remoción del IGF2 extracelular, en la activación proteolítica del TGF-β y con posibilidad de señalizar a nivel intracelular [17,22,72,74]; mientras que el 90% se encuentra a nivel intracelular en el aparato de Golgi o en el compartimento endosomal-lisosomal (E/L), participando presumiblemente en el reconocimiento, clasificación y disposición de las enzimas lisosomales recién modificadas en la red trans-Golgi [17].

A la fecha aún no se ha establecido con claridad la presencia o no de una vía de señalización asociada a este receptor IGF2R o un mecanismo por el cual el receptor pueda modular las redes de señalización activadas por los receptores tirosina quinasa para mediar sus efectos biológicos.

Harris y cols. utilizando células BeWo, línea derivada de CT maligno, encontraron que la activación específica del receptor a través de un análogo de IGF2, denominado Leu²⁷IGF2, agonista exclusivo de IGF2R [22,30–32], inhibió significativamente la apoptosis inducida por privación de nutrientes; mientras que, la reducción en el contenido del receptor disminuyó las señales de supervivencia [23], sugiriendo que la activación del receptor regula rutas de señalización anti-apoptóticas.

M^oKinnon y cols., en cambio, reportaron que en células HTR-8/SVneo, línea derivada del TE, al adicionar anticuerpos policlonales contra el receptor IGF2R, y posteriormente, adicionar IGF2 en el medio redujo la tasa de migración celular de manera dosis dependiente. En contraste, si las células son inducidas con Leu²⁷IGF2, la tasa de migración se incrementa 2,5 veces en comparación a la basal, mostrando que IGF2R juega un rol esencial en la migración de las HTR-8/SVneo modulado por IGF2 [22]. Y el silenciamiento de IGF2R en células endoteliales derivadas de hemangiomas, disminuyó la actividad proliferativa e indujo apoptosis y arresto del ciclo celular [75].

Por otra parte, se ha descrito también que durante la fibrogénesis hepática habría una regulación positiva de la transcripción de IGF2R en las células tipo estrelladas [76] y que este receptor podría tener un rol en el contexto de la hipertrofia cardiaca y muerte celular debido principalmente a que células estresadas por hipoxia, secretan IGF2 y promueven la expresión de IGF2R [77]. Wei-Kung y cols. reportaron que en células de cardiomioblastos embrionales H9c2 sometidas a hipoxia hay una elevada expresión del receptor y que el factor de transcripción CREB juega un rol crucial en la viabilidad y supervivencia de estas células, al regular negativamente la expresión de este receptor uniéndose a su región promotora [77]. Sin embargo, otro estudio realizado en cardiomioblasto de ventrículo en ratones adultos muestra que la activación de la renina mediada por IGF2R es crucial para la supervivencia celular [78] estableciendo quizás un rol dual espaciotemporal del receptor en estas células.

La cicatrización de una herida es un proceso complejo que involucra inflamación, migración, diferenciación, proliferación y remodelamiento de la matriz extracelular. Ciertas moléculas que están involucradas en la cicatrización cómo la renina, uPAR, plasminógeno, ácido retinoico o la heparanasa interactúan con IGF2R [17].

Un estudio de localización de este receptor en una injuria o herida de queratinocitos de córnea en murino mostró que la expresión del receptor se incrementa tanto en el epitelio central como en el estroma [79]. Al realizar una injuria en la capa de la córnea de porcino, se encontró un elevado incremento de la expresión de IGF2R en el estroma al comparar contra el control, y al realizar un doble marcaje junto con la α -SMA (proteína expresada en miofibroblastos), mostró que efectivamente la mayor expresión del receptor ocurre en los miofibroblastos de la capa estromal de porcino, sugiriendo un posible rol del receptor en la diferenciación [79]. Adicionado a lo anterior, se determinó el contenido de la proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP1) en miofibroblastos, encontrando que fue mayor respecto al contenido en fibroblastos, sugiriendo que el aumento en la expresión de IGF2R estaría asociado a una expansión del compartimento E/L, el cual puede ser utilizado en la remodelación de la matriz extracelular [79].

Finalmente, una búsqueda en la base de datos de genes humanos *GeneCards*, muestra que la expresión proteica de este receptor en líneas tumorales, es mayor que en tejidos normales, sugiriendo una participación crucial de este receptor en todos los procesos celulares que conllevan al desarrollo tumoral [80].

1.5 Señalización intracelular mediada posiblemente por IGF2R

Algunos trabajos sugieren que IGF2R podría tener señalización intracelular mediada por proteínas G [22,81–85]. En uno de ellos, se encontró que la reducción en la actividad de la adenilato ciclasa (AC), *corriente abajo* de las proteínas G, en fracciones membranales de HTR-8/SVneo y en presencia de IGF2, disminuyó la concentración del AMPc, e incrementó la tasa de migración 6 veces respecto a las que estaban en ausencia de IGF2, indicando un rol funcional de IGF2R/AC en la migración de estas células [22]. De igual manera, en otro estudio se encontró que IGF2 puede activar de manera diferencial Rho GTPasas dependiendo de si la interacción es con el receptor IGF1R o con el IGF2R, promoviendo en ambos la migración de HTR-8/SVneo [85].

Al respecto, uno de estos reportes propone que parte de la secuencia humana de IGF2R presenta una alta similitud con el Mastoparan, péptido pequeño que modula la actividad

de la proteína G estimulando la actividad de ciertas GTPasas [84]; siendo Okamoto *y cols.* quienes identifican la región Arg²⁴¹⁰ - Lys²⁴²³ como la posible responsable de la activación de la proteína G [82].

Como se mencionó anteriormente, tanto IGF2 como IGF2R podrían estar asociados a hipertrofia cardíaca. Chun-Hsien *y cols.* silenciaron la expresión de IGF1R en células del miocardio y las indujeron con Leu²⁷IGF2, encontrando que este receptor al unir IGF2 señalizaría a través de proteína G (Gαq), activando efectores *corriente abajo* como la proteína quinasa C (PKC), la quinasa dependiente de calmodulina/Ca²⁺ tipo II (CAMKII) o la calcineuria; ésta última responsable de la desfosforilación de Bad, permitiendo su ingreso a la mitocondria y la salida del citocromo C al citosol, desencadenando la muerte celular programada en los cardiomiocitos embrionales [86].

Por otra parte, en células HEK293 que expresan IGF2R y estimuladas con IGF2, se encontró que se induce la activación de la quinasa esfingosina y la producción de esfingosina-1- fosfato, siendo esta última molécula la que permitiría la activación de las MAPK1/2 dependientes de proteína G [81]. Un análisis de alta resolución con ARNs de interferencia identificó genes que regulan el tráfico del receptor IGF2R en el sistema Golgi – Lisosoma, genes que participan o se encuentran en las vías de señalización de las MAPKs, adhesión focal, señalización de las Wnt, rearreglo de actinas, vías de receptores acoplados a proteínas G y en el metabolismo del fosfatidil-inositol [87]; mostrando una asociación entre estas vías con el receptor.

Hace algunos años, se reportó que IGF2R podría estar participando en la patología de la enfermedad de Alzheimer, pues la formación de los β-amiloides (Aβ) a partir de las proteínas precursoras de amiloides (APP), se dan en el compartimento E/L, el cual correlaciona con un aumento en la expresión del receptor en este compartimento [88]. Wang *y cols.*, reportaron que la sobre expresión del receptor incrementa los niveles de las APP y el procesamiento de los Aβ mediado por secretasas, sugiriendo que la sobre expresión de IGF2R estaría involucrado en la regulación positiva de las APP y en su metabolismo [89].

Aunque la función primaria de estas proteínas membranales no es conocida, se asocia con el transporte de hierro, la regulación de la sinapsis, plasticidad y diferenciación neuronal

[90]. Dichas proteínas poseen un dominio similar al factor de crecimiento (ricos en Cisteína) [91] y se ha propuesto que podrían tener participación en la adhesión celular [92], además, su procesamiento post traduccional se ha comparado con la señalización que presentan los receptores *Notch* [93]. Por otro lado, el procesamiento de las APP regula tanto la proliferación de las células madres embriónicas humanas como la diferenciación de las células precursoras neuronales y la hormona gonadotropina coriónicas humana (hCG), producida por el trofoblasto, incrementa su expresión [94] sugiriendo una vía de señalización alternativa entre estos dos componentes desde el compartimento E/L.

1.6 IGF2 e IGF2R en tejido placentario

La placenta es el órgano responsable de permitir el intercambio bidireccional de nutrientes y desechos metabólicos entre la madre y el feto, además de producir una gran variedad de hormonas y citoquinas [40]. Aquellas placentas que derivan de estas patologías, como son la preeclampsia o la RCIU, se caracterizan por una morfo-funcionalidad mucho menor en comparación a las normales, mientras que las derivadas de una macrosomía fetal, presentan una exacerbada funcionalidad, indicando que alteraciones en el crecimiento y desarrollo de este órgano pueden contribuir en la formación de estas patologías [95,96]. El sistema IGF, como se describió anteriormente, regula el desarrollo de este órgano y se sabe que algunos de sus componentes se encuentran alterados cuando hay presencia de estas patologías [69,96].

En particular, se ha descrito que alteraciones en los niveles de IGF2 afectan tanto la estructura como la función placentaria, con la concomitante desregulación en el transporte de nutrientes [95], mientras que la completa reducción de la expresión de IGF2R en trofoblasto proveniente de tejido placentario de término, afecta la proliferación de estas células [23] mostrando que ambos componentes se encuentran muy asociados a la restricción del crecimiento fetal [24,25,66,97].

Interesantes estudios muestran que la infusión subcutánea constante de Leu²⁷IGF2 en ratones que presentan restricción de crecimiento, recuperan su crecimiento fetal a niveles similares a los normales [98], y del mismo modo, la infusión de este análogo en la gestación

temprana de cerdos incrementó la zona laberíntica y el área de superficie del ST aumentando a su vez la capacidad de transporte de nutrientes hacia el feto [99]. También, la interacción IGF2/IGF2R regula la expresión de genes homeóticos placentarios responsables del desarrollo de este órgano [24] y, además, se han encontrado relaciones directas entre los niveles de la forma soluble del receptor IGF2R (IGF2Rs) con la edad gestacional de embarazos con preeclampsia [100], y entre la proporción molar de IGF2 e IGF2Rs con el peso placentario y del recién nacido [101], indicando la importancia que presenta la activación de este receptor, mediada por su ligando, en el desarrollo placentario y fetal.

1.7 Participación de IGF2R en otras patologías

Cifras alarmantes reportan que el 56.4% de la población adulta colombiana (entre 18 a 64 años) presenta exceso de peso y obesidad, siendo la prevalencia mayor en mujeres [102]. Se sabe que esta patología conlleva diversas complicaciones degenerativas para el paciente y lo predispone a desarrollar otras enfermedades, como son la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión o enfermedades cardiovasculares [103]. En concreto, la *obesidad materna* también genera las patologías mencionadas con anterioridad, como son la preeclampsia o la restricción del crecimiento fetal, así como, diabetes gestacional, macrosomía o cesáreas, eventos que en su conjunto incrementan la tasa de mortalidad y morbilidad tanto para el recién nacido como para la madre [104].

Recientes estudios describen que hay una mayor concentración de IGF2Rs en pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo 2, la cual disminuye luego de realizada una cirugía de banda gástrica, junto con una disminución en los niveles de glucosa y de insulina [36]. Del mismo modo, existe una asociación directa entre los niveles de la forma soluble, el índice de masa corporal y una variante génica de IGF2R con la diabetes tipo 2 [105], dando cuenta que es de suma importancia estudiar este biomarcador en placentas derivadas de madres obesas, para comprender como participa en el desarrollo fetal.

Capítulo 2: Metodología

En referencia a la importancia que presentan los componentes del sistema IGF, IGF2 e IGF2R, en el desarrollo y crecimiento de las células trofoblásticas, su participación en la progresión de patologías fetales, y el papel que presentarían en procesos inflamatorios asociados particularmente a la obesidad materna, optamos por utilizar la línea celular derivada de trofoblasto humano HTR-8/SVneo, estimulada tanto con IGF2 como con su análogo Leu²⁷IGF2, para establecer posibles mecanismos por los cuales el receptor IGF2R transduzca una señalización intracelular en estas células, evaluando activación de efectores, cambios en la expresión génica y modulación de procesos celulares. Así mismo, trabajamos en placentas provenientes de madres con diferente peso gestacional para evaluar si este receptor, y la alteración en su señalización, podrían ser un eficiente indicador de la condición inflamatoria que involucra el desarrollo fetal.

Material biológico

Cultivo Celular

La línea trofoblástica HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271™) se cultivó en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM (Cat. 12800 Gibco™), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Cat. 16140 Gibco™), y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Life Technologies). Se mantuvo a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5%.

Muestras Placentarias

Placentas de embarazos a término entre 37 y 41 semanas de gestación se recolectaron inmediatamente después del nacimiento de hijos de madres con peso normal (Np), con obesidad (Ob), siendo su índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 kg/m², y de madres obesas suplementadas con ácido docosahexaenoico (DHA) 800 mg/día (Ob + DHA).

Los criterios de exclusión incluyeron hipertensión y diabetes materna, consumo de alcohol, drogas o cigarrillos (>5 cigarrillos/día), embarazos múltiples y trastornos genéticos en el recién nacido. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética correspondiente.

Cada placenta se secciona transversalmente (aproximadamente 7 x 5 cm) cerca de la inserción del cordón umbilical y las membranas tanto de la placa coriónica como de la decidua se removieron. Los explantes (aproximadamente 27 mm³) se lavaron en una solución salina estéril, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis [106] (ver figura 6).

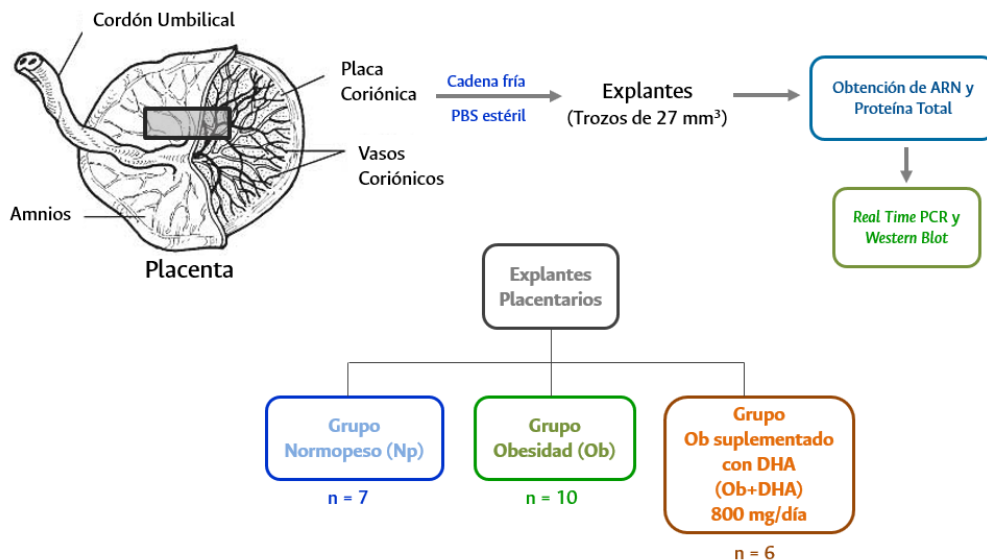


Figura 6. Procedimiento para obtención de explantes y clasificación de muestras placentarias.

Respuesta a IGF2 o su análogo Leu²⁷IGF2

Las células se cultivaron hasta alcanzar un 80% de confluencia. Posteriormente, se privaron de suero durante 4 horas y se incubaron con 10 nM de IGF2 (GroPep FU100) o con su análogo, Leu²⁷IGF2 (GroPep TU100), cuya característica de encontrarse libre en el suero, no unirse a las proteínas IGFBPs y su baja afinidad por los receptores IGF1R e IR, permite observar la señal mediada por el receptor IGF2R [22,30–32].

Como condición basal se dejaron las células en presencia de medio libre de suero y como control positivo las células se dejaron nuevamente en el medio suplementado con SFB. Se realizaron estímulos entre 1 minuto y 72 horas para discriminar respuestas proteicas a corto plazo, procesos celulares a corto o largo plazo y aumento de la expresión génica en todo el rango de trabajo.

Obtención de Extractos Proteicos

En los tiempos de incubación las células trofoblásticas se rasparon en presencia del buffer salino fosfato (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 3 mM; KH₂PO₄ 47 mM) obteniendo el pellet celular por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. En seguida, el pellet se sometió a lisis con buffer RIPA (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 2 mM; Tritón X-100 1%), adicionando un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Se incubó por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 10000 rpm, 4°C, por 20 minutos recuperando el sobrenadante que equivale al extracto total de proteína. Cada extracto proteico se cuantificó por triplicado empleando el método del ácido Bicinconínico BCA (Pierce® BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific).

En el extracto proteico placentario se utilizó buffer de lisis comercial (Bio Source, Invitrogen) suplementado con Tritón X-100 al 1% y un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche).

Western Blot

A cada extracto proteico celular se le adicionó buffer de carga (Tris 60 mM pH 6.8; SDS 2%; ditioneitol 20 mM; glicerol 10%; azul de bromofenol 0.01%) y se desnaturizó por calentamiento a 92°C durante 5 min. Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. La electroforesis se realizó utilizando buffer de Corrida (25 mM Tris, 192 mM Glicina y SDS al 0,1%) a 100 V por 2 horas. El estándar de peso molecular utilizado fue Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas). Las proteínas se electro-transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (Bio-Rad) a un amperaje constante de 220 mA durante 2 horas en frío y en buffer de transferencia (25 mM

Tris, 192 mM Glicina, 15% Metanol, pH 8,90). Las membranas se bloquearon con 5% de leche 0% grasa en TBS-T (20 mM de Tris; 137 mM de NaCl; 0,1% de Tween-20, pH: 7,60) durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se incubaron con los anticuerpos primarios para las proteínas: ERK 1/2 (Cat. sc-153 Santa Cruz), Fosfo-ERK1 (Thr202/Tyr204) y Fosfo-ERK2 (Thr185/Tyr187) (Cat. gtx82696 Genetex), Fosfo-AKT (Thr308) (Cat. gtx52321 Genetex), Fosfo-IGF1R (Tyr1165/Tyr1166) (Cat. gtx50154 Genetex) y β -Actina (Cat. A2228 Sigma) durante toda la noche en frío. Terminada la incubación, se realizaron lavados de 10 y 5 minutos con TBS-T para luego incubar por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Horseradish Peroxidase*, Amersham Biosciences), Anti-IgG de conejo o Anti-IgG de ratón. Se detectó la señal por medio del sistema comercial ECL Western Blotting de BioRad y se revelaron en placas radiográficas (Kodak). Los resultados se analizaron mediante densitometría con el *software* GelAnalyzer1D [107].

Los extractos placentarios se electro-transfirieron a una membrana de PVDF de 0,2 μ m (Bio-Rad) a un amperaje constante de 60 mA durante toda la noche en frío y en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 10% Metanol, pH 8,90). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: IGF2R (Cat. #14364 *Cell Signaling*) y β -Actina (Cat. A2228 Sigma) durante 3 horas a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (*Horseradish Peroxidase*, Amersham Biosciences), Anti-IgG de conejo 1 hora y la detección de las señales se realizó usando el equipo UVP *BioSpectrum*TM 510 *Multispectral Imaging System*.

Ensayo de actividad gelatinasa

Proteínas presentes en los medios celulares condicionados se separaron por electroforesis SDS-PAGE en presencia de 0,06% de gelatina a 80V durante 2 horas. Como control positivo se utilizó una muestra de plasma sanguíneo y como control negativo una muestra de Albúmina Sérica Bovina. Se realizaron tres lavados con Tritón X-100 al 3% para retirar el SDS, seguido de tres lavados con agua destilada con el fin de renaturalizar las enzimas. Para evaluar la actividad gelatinasa se realizó una incubación de los geles durante toda la noche a 37°C con el buffer: Tris 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5mM y ZnCl₂ 1 μ M, pH 7,40. La tinción de los geles se realizó con Azul de Coomassie R-250 en ácido tricloroacético y

se aclaró con una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%. La documentación de los geles se realizó en Gel Doc™ XR+(BioRad) y el análisis densitométrico se realizó con ayuda del programa GelAnalyzer1D [107].

Análisis de la expresión génica

Las células se colocaron en presencia del reactivo Trizol® (Invitrogen) y cloroformo. La cantidad de ARN extraído se cuantificó de acuerdo con la relación de absorbancia 260/280 nm (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Del ARN se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) empleando 1 µg del ARN y el sistema de retro transcripción Superscript™ III (Invitrogen). Para determinar la expresión relativa de los genes en estudio (ver tabla 1), se empleó la técnica Real Time PCR con el sistema de amplificación/detección iQ SYBR® Green Master Mix en el equipo CFX96 (BioRad). El análisis de expresión y su normalización se determinó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ [108] siguiendo la guía MIQE [109].

Gen	Forward	Reverse	Tº anillamiento (°C)	Tamaño amplicón (pb)
<i>c-FOS</i>	ACCATGATGTTCTCGGGTTT	GAGATGGCTGTCACCGTGGG	56	206
<i>c-MYC</i>	AGAGTTTCATCTGCGACCCG	GAAGCCGCTCCACATACAGT	56	77
<i>IGF2R</i>	AGGTGAATAAGGAAGAAGAGAC	ACTGACTTGGTGGTAATATGG	56	124
<i>MMP-9</i>	AACCAATCTCACCGACAGG	CGACTCTCCACGCATCTC	56	85
<i>STAT5b</i>	CATTTTCCATTGAGGTGCG	GGGTGGCCTTAATGTTCTCC	60	103
<i>β-ACTINA</i>	GCGTGAACATTAAGGAGAAG	GAAGGAAGGCTGGAAGAG	56	173
<i>18S</i>	GCGTGACATTAAGGAGAAG	GAAGGAAGGCTGGAAGAG	56	172

Tabla 1. Secuencia de *primers* usados para Real Time PCR en genes de la línea celular.

En el caso de la obtención de ARN placentario, a partir de los explantes, el procedimiento fue similar al realizado en células, excepto que se determinó la expresión relativa de los genes presentes en la tabla 2 utilizando el equipo Eco™ qPCR System (Illumina San Diego, CA, U.S.A.).

Gen	Forward	Reverse	Tº anillamiento (°C)	Tamaño amplicón (pb)
<i>ADAM17</i>	TCCAGCAGCATTTCGGTAAGA	TTTACCATCCACCACCACGA	56	158
<i>IGF2</i>	GTTGAGGAGTGCTGTTTC	AGGTGTCATATTGGAAGAAC	56	157
<i>IGF2R</i>	AGGTGAATAAGGAAGAAGAGAC	ACTGACTTGGTGGTAATATGG	56	124
<i>IR</i>	GCCTCTACAACCTGATGAAC	ACAGATGTCTCCACACTCC	56	164
<i>uPA</i>	AGCAGAGACACTAACGACTTCAG	CTTACTCACACTTACACTCACAGC	56	120
<i>β-ACTINA</i>	AGAGCCTCGCCTTTGCCGATCC	GACGACGAGCGCGCGATATC	62	83
<i>GAPDH</i>	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	ACATCGCTCAGACACCATG	60	143
<i>YWHAZ</i>	ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA	CCGCCAGGACAAACCAGTAT	57	94

Tabla 2. Secuencia de *primers* usados para Real Time PCR en genes placentarios.

Ensayo de adhesión celular

100 µL de suspensiones celulares equivalentes a 100 células/µL, se sembraron en platos de 96 pozos, y se colocaron en presencia de medio de mantenimiento considerada la condición basal, IGF2, Leu²⁷IGF2 y SFB, y se incubaron por 0, 5, 15, 30 y 60 minutos. Al final de cada período los platos se lavaron dos veces con una solución de PBS estéril para remover las células que no adhirieron. A las células remanentes en medio de cultivo se les adicionó una solución de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en concentración final de 0.5 mg/mL, y se incubó durante 4 horas.

Tras la formación de los cristales de formazán, éstos se disolvieron con dimetilsulfóxido y se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm con un lector de microplaca (Bio-Rad). Para la expresión de los datos se hizo la normalización a la condición con SFB 10% a los 60 minutos en la cual se alcanzó el 100% de adhesión. Este experimento se realizó 9 veces y se expresó como media ± DE.

Ensayo de proliferación celular

Suspensiones celulares de 100 µL, equivalente a 100 células/µL, se sembraron de acuerdo con los tratamientos: basal, IGF2, Leu²⁷IGF2 y SFB, y se incubaron por 24 horas. Al final del período de estimulación se adicionó la solución de Rojo Neutro 40 µg/mL durante 4 horas. Posteriormente, tras la acumulación del analito en las vacuolas [110], las células se lavaron dos veces con una solución de PBS estéril para remover el exceso de Rojo Neutro.

Se disolvió el analito en una solución 50% etanol, 1% ácido acético glacial y se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm con un lector de microplaca (Bio-Rad).

Ensayo de migración celular

Se sembraron 2×10^5 células por pozo, en medio libre de suero, en el compartimiento superior de una cámara de Boyden (Costar®) y en el compartimiento inferior se dejaron los tratamientos durante 6 horas. Al final de la incubación, las células que no migraron se removieron mientras que las células que sí migraron se fijaron con una solución de para formaldehído 4% (Sigma Chemicals), se tiñeron con una solución de cristal violeta 0,5% y se lavaron con agua destilada hasta la remoción completa de cualquier tinción inespecífica. Se realizó un registro fotográfico de las células teñidas y posteriormente, la membrana de cada pozo se removió para disolver el cristal violeta en ácido acético al 10% y medir la absorbancia respectiva a 570 nm. Los resultados se expresaron como índice de migración que presenta el número de células migrantes en cada tratamiento con respecto al número de células en el tratamiento control.

Ensayo de cierre de herida

Las células se sembraron en placas de 12 pozos (Costar®) hasta formar una monocapa celular. Posteriormente, con un agente cortopunzante, se realizó una herida sobre las monocapas y se lavaron con una solución de PBS para remover las células desprendidas. Inmediatamente, las células se dejaron en presencia de los péptidos, y en los tiempos 0, 2, 4, 8, 16 y 24 horas de incubación se realizó un registro fotográfico de las heridas. Se utilizó el software ImageJ para determinar el área de cierre de la herida en las diferentes condiciones. Los resultados se expresaron como porcentaje de migración que presenta el % de células migrantes en cada tratamiento con respecto a la condición en la cual se alcanza el 100% del cierre de la herida.

Ensayo de invasión celular

En los compartimientos superiores de cámaras de Boyden (Costar®) se adicionó una capa de matrigel (Geltrex™ Gibco) según indicaciones del proveedor. Posteriormente, en estos mismos compartimientos se sembraron 2×10^5 células por pozo, en medio libre de suero, y en los compartimientos inferiores se dejaron los tratamientos durante 24 horas de estimulación, previa optimización.

Al final de la incubación, se removió el matrigel de cada uno de los compartimientos y las células que atravesaron esta capa, quedando en la membrana, se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% (Sigma Chemicals), se tiñeron con una solución Hoechst 33342 (Invitrogen) y se lavaron con agua destilada hasta la remoción completa de cualquier tinción inespecífica. Se realizó un registro fotográfico de los núcleos marcados y se contabilizaron los núcleos en el microscopio de fluorescencia (Thermo Fisher modelo EVOS 5000) con el software EVOS 2. Los resultados se expresaron como índice de invasión que presenta el número de células que atravesaron el matrigel en cada tratamiento con respecto al número de células en el tratamiento control.

Inmunocitoquímica

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y se permitió adherencia. Posteriormente, se lavaron con PBS, se fijaron con una solución de paraformaldehído 4% (Sigma Chemicals) y se permeabilizaron con PBS suplementado con Tritón X-100 al 0,1%. Se bloquearon con una solución BSA 1% y se incubaron con el anticuerpo primario IGF2R (Cat. sc-25462 Santa Cruz) toda la noche en frío. Al día siguiente las células se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor®488 (BioLegend Cat. 406416) y, además, con una solución Hoescht 33342 (Invitrogen). Se realizaron varios lavados para remover el marcaje inespecífico, y sobre portaobjetos se colocaron los cubreobjetos quedando las células en contacto con una solución glicerol – agua (1:1). Finalmente, los bordes se sellaron con esmalte y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Thermo Fisher modelo EVOS 5000).

Determinación de los niveles presentes de AMPc

Las células en cultivo se sembraron en placas de 96 pozos (Costar®) hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, las células se dejaron en presencia de los tratamientos, y en tiempos que van hasta los 15 minutos. Al final de cada incubación, se recuperó el medio condicionado y se le adicionó 1/10 volumen de HCl 0,1M. Mientras las células se sometieron a lisis con buffer RIPA (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 2 mM; Tritón X-100 1%) frío suplementado con 1/10 volumen de HCl 0,1M.

Finalmente, se evaluó el contenido de AMPc, tanto en el medio condicionado como en el lisado celular, utilizando el kit *cyclicAMP* ELISA (Cat. OKEH02525 AVIVA SYSTEMS BIOLOGY) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Inmunoprecipitación

Las células se cultivaron en medio *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640 (Cat. R1780 Sigma™) sin rojo fenol ni leucina, suplementado con SFB al 10% (Cat. 16140 Gibco™) y con L-Foto-Leucina (Thermo Fisher Cat. 22610) hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, se estimularon con Leu²⁷IGF2 durante 5 minutos y luego, se expusieron a radiación UV 330 nm para la formación de enlaces covalentes entre las foto-leucinas con las moléculas más cercanas a ellas.

Las células se lisaron en presencia de buffer RIPA (NaCl 150 mM; Tris-HCl 50 mM; EDTA 2 mM; IGEPAL 0,1%) frío suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche SKU 11697498001). De cada tratamiento se tomó el equivalente a 1 mg de proteína total y se incubaron con 1 µg del anticuerpo IGF2R (Cat. sc-25462 Santa Cruz), toda la noche en frío, para la formación de los inmunocomplejos. Posteriormente, se adicionó la proteína A/G agarosa (Cat. sc-2003 Santa Cruz) en cada condición, se incubó a 4°C con agitación rotacional durante 30 minutos y se centrifugaron recuperando los *pellets*, los cuales se lavaron varias veces y se trataron para desnaturalizar y reducir las proteínas que se precipitaron.

Estas proteínas se separaron en geles SDS-PAGE continuando el protocolo de *Western blot* para evaluar la presencia de IGF2R. La señal se detectó por medio del sistema comercial ECL Western Blotting de BioRad y se revelaron en placas radiográficas (Kodak). Los resultados se analizaron utilizando el *software* GelAnalyzer1D [107].

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como promedio \pm D.E. o como mediana (percentiles 25 – 75). Las diferencias entre los grupos se evaluaron utilizando ANOVA de dos vías o los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, considerando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Se usó el programa estadístico GraphPad Prism v7 (GraphPad Software Inc.) para los respectivos análisis.

Capítulo 3: Resultados

A continuación, se presentan los resultados encontrados en la línea celular HTR-8/SVneo, inducida tanto con IGF2 como con Leu²⁷IGF2, péptido análogo de IGF2 el cual se une exclusivamente a IGF2R, y los resultados encontrados en los explantes placentarios.

3.1 Vía de señalización intracelular mediada por IGF2R en células trofoblásticas

En una primera aproximación de nuestro estudio evaluamos la presencia del receptor y el efecto que presenta el péptido análogo sobre la activación de efectores canónicos y segundos mensajeros en la línea celular, con la finalidad de dilucidar la activación de una vía de señalización y sus posibles componentes moleculares.

La presencia de Leu²⁷IGF2 no activa a IGF1R.

Las células de trofoblasto mantienen una actividad por fosforilación del receptor de IGF1 de manera basal que fue inducible por la incubación en presencia de IGF2 10 nM, tal como se observa en el resultado del *western blot* de la **figura 7**. La subunidad β del receptor IGF1R se fosforiló rápidamente y de manera creciente en respuesta al péptido IGF2 hasta por 5 minutos alcanzando un máximo 3 veces mayor que el basal, luego esta señal retornó a niveles iniciales. En contraste, no se observó este incremento en el tratamiento con el análogo Leu²⁷IGF2 en ninguno de los tiempos analizados. Este comportamiento se observó en al menos 2 experimentos, mostrando que no hay activación del receptor de IGF1.

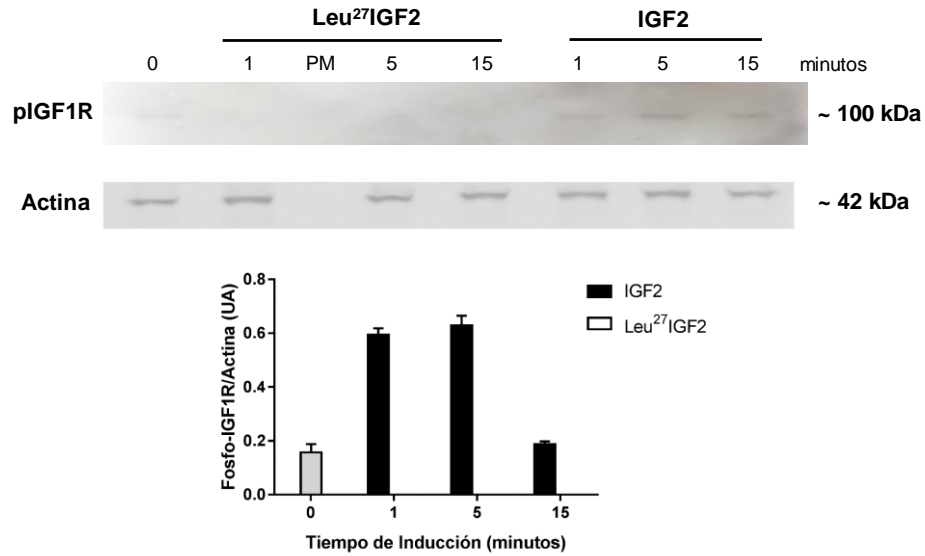


Figura 7. Fosforilación de IGF1R inducida por IGF2 y su análogo. En la parte superior imágenes representativas de los blots y en la imagen inferior la medición densitométrica normalizada contra actina. Los datos se expresaron como media \pm DE.

El receptor IGF2R se expresa en la línea HTR-8/SVneo.

A continuación, se procedió a evaluar la expresión del receptor tipo 2, IGF2R y su localización celular, dado sus funciones de transporte celular. El receptor se ubicó tanto en la membrana plasmática como en los compartimentos endosomales y lisosomales de las células (**figura 8**).

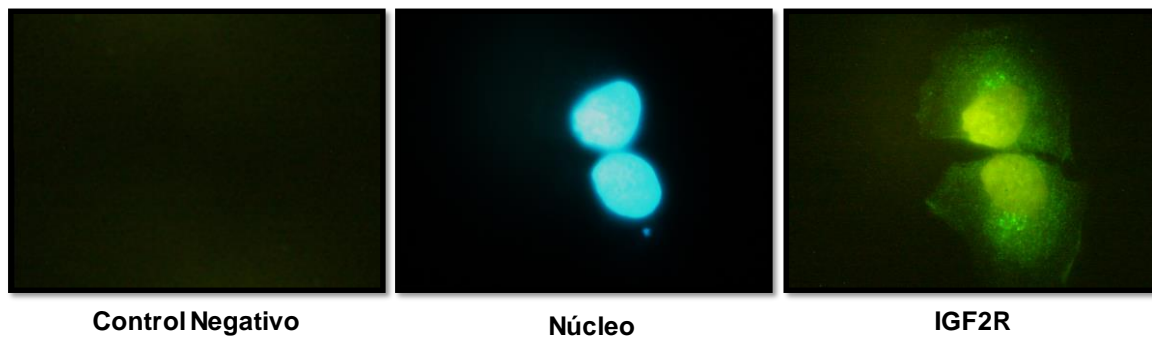


Figura 8. Localización celular de IGF2R. Microfotografías de células fijadas y marcadas con Hoechst 33342 para tinción de núcleos y con anticuerpo para visualizar la presencia de IGF2R en verde tal como se describió en la metodología. Se realizaron 2 réplicas biológicas con dos réplicas técnicas.

La activación de IGF2R fosforila los efectores AKT y ERK.

Para evaluar la activación de rutas de señalización mediadas por fosforilación se realizó *western blot* para la identificación de las proteínas efectoras ERK y AKT en extractos de las células HTR-8/SVneo tras la inducción con los péptidos IGF2 y análogo. La inducción con este último generó un incremento de la fosforilación de ambos efectores con respecto a las células sin estímulo y de forma más intensa a la inducida por IGF2. Así, en el minuto 1 de estimulación, la fosforilación de AKT y de ERK mediada por Leu²⁷IGF2, fue de 2.5 y 6 veces mayor respectivamente respecto a la mediada por IGF2, efecto que posteriormente decayó gradualmente en el tiempo hasta los 15 minutos (**figura 9**).

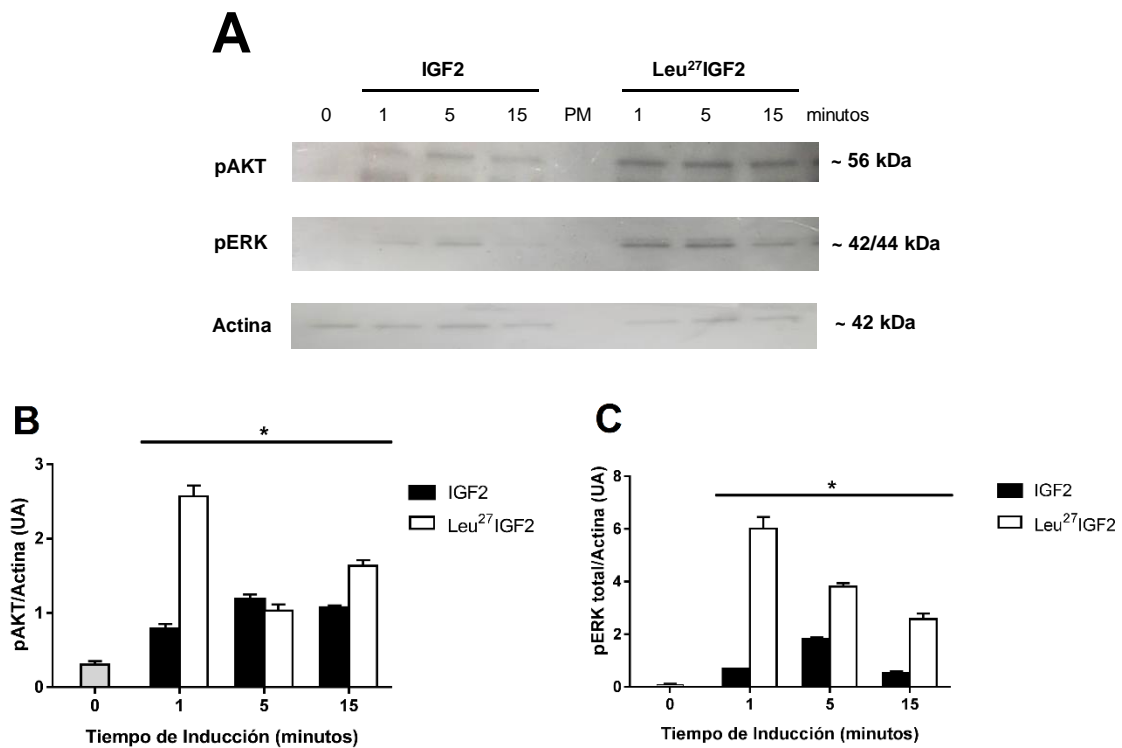


Figura 9. Fosforilación de AKT y ERK en respuesta a IGF2. En (A) imágenes representativas de los *blots* para las proteínas fosforiladas a los distintos tiempos de estimulación y en la figura inferior la relación del análisis densitométrico de las proteínas fosforiladas AKT (B) y ERK (C) contra actina. * $p < 0,05$ tiempo de estímulo vs. tiempo 0. Test Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como media \pm DE (n=2 para cada condición).

La activación de IGF2R disminuye los niveles intracelulares de AMPc e incrementa los niveles extracelulares.

El inmunoensayo enzimático tipo competitivo nos permitió cuantificar la concentración de este segundo mensajero post estímulo en células, al competir con un AMPc biotinilado por los sitios de unión de anticuerpos inmovilizados anti-AMPc. De acuerdo con nuestros resultados, la línea mostró una curva de descenso en los niveles de AMPc total medidos hasta los 15 minutos después del tratamiento con IGF2 (**figura 10**). Al discriminar la fuente de AMPc, se observó que no hubo cambio en el segundo mensajero a nivel extracelular, y que la disminución en AMPc fue debida a los cambios en el espacio citoplasmático (**figura 10A**).

Por el contrario, células inducidas con Leu²⁷IGF2 mostraron una rápida disminución del contenido de AMPc a nivel intracelular en el primer minuto de inducción, en comparación a la condición basal, y en paralelo, un incremento del segundo mensajero en el espacio extracelular, tanto en el minuto 1 como en el minuto 5 de inducción (**figura 10B**). De igual manera que con el péptido normal, tanto el contenido citoplasmático como el total también disminuyeron a los 15 minutos de inducción.

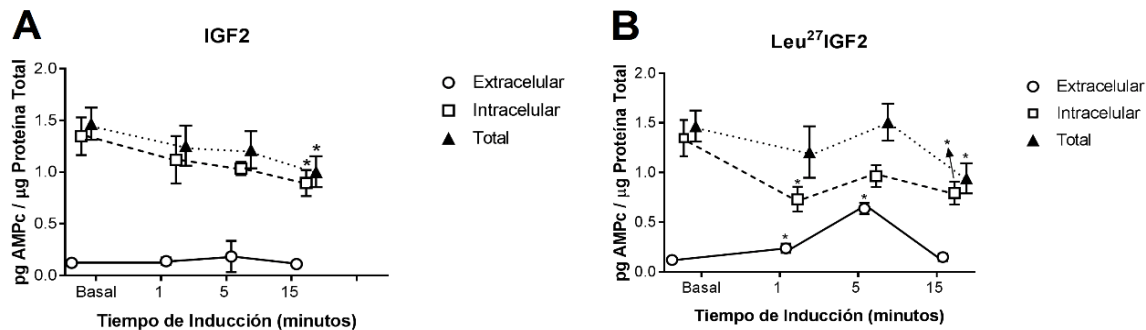


Figura 10. Niveles de AMPc en células inducidas con IGF2 y su análogo. Niveles del AMPc liberados por las células HTR-8/SVneo cuando se incubaron en presencia de IGF2 (**A**) o su análogo (**B**). Los datos se normalizaron respecto al contenido total de proteínas. * $p < 0,05$ tiempos vs basal a tiempo 0 según test Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como media \pm DE ($n=3$ para cada condición).

La inducción con el Leu²⁷IGF2 favorece el reclutamiento de proteínas que interactúan con el receptor.

Una vez que se estableció la presencia del receptor IGF2R en estas células, la activación de algunos efectores y la disminución de un segundo mensajero, en respuesta al péptido IGF2, se evaluó la existencia de interacción del receptor con otras proteínas cuando se encuentra unido a su ligando, mediante un ensayo de entrecruzamiento. La separación electroforética de los extractos celulares sometidos a entrecruzamiento e inmunoprecipitados con anticuerpo contra IGF2R mostró que 5 minutos post inducción con el análogo del IGF2, la movilidad de la proteína receptora en el gel se vio retrasada en comparación a la condición basal, lo cual indica que el receptor formó diversos complejos proteicos, reflejándose así un mayor tamaño molecular, tal como se muestra en la **figura 11**.

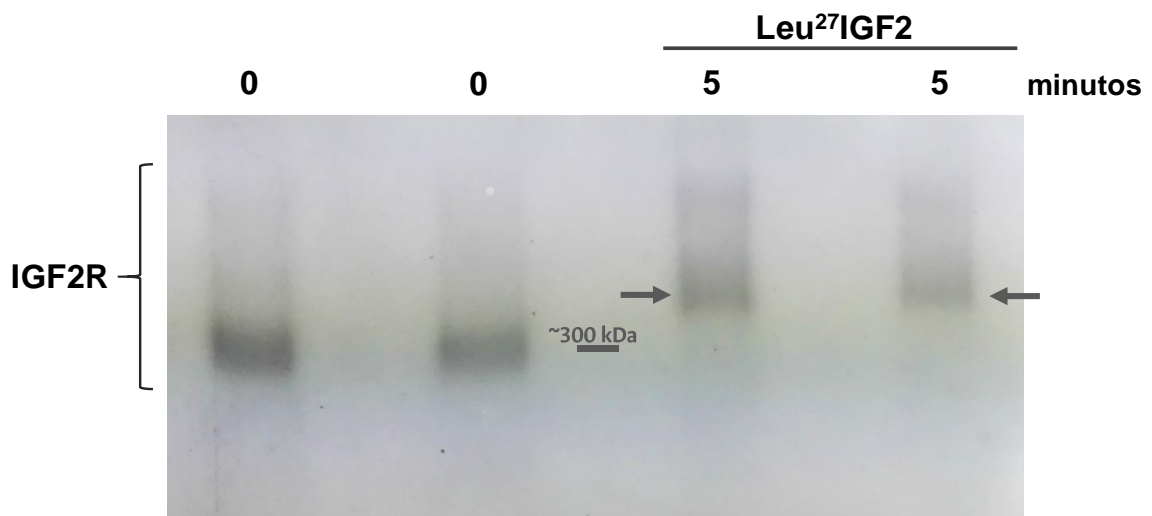


Figura 11. Migración electroforética de IGF2R en extracto celular incubado con Leu²⁷IGF2. Posterior al entrecruzamiento con las foto-leucinas, la inmunoprecipitación y la detección del receptor por western blot se observan las señales para el receptor en la condición basal y estimulada (n=2 para cada condición).

3.2 Participación de IGF2R en los procesos celulares de células trofoblásticas

Con una idea parcial de los efectores activados por IGF2/IGF2R nuestro siguiente paso fue evaluar si la activación del receptor era capaz de promover los procesos celulares necesarios para una implantación adecuada, permitiendo el buen desarrollo de la placenta.

La activación de IGF2R facilita una adhesión celular temprana.

Con la finalidad de evaluar si el receptor participa y modula este proceso celular, se determinó el número de células que, en respuesta al estímulo del factor de crecimiento, se adhirieron a la superficie del plato de cultivo durante 60 minutos. La formación de cristales de formazán se utilizó como criterio para establecer si la enzima mitocondrial presente en estas células fue funcional y la disolución de estos permitió hacer una comparación con curva de absorbancia de células adheridas.

Se encontró que a los 15 minutos de inducción con el análogo hubo un incremento del 20% de la adhesión, siendo mayor a la observada en presencia del péptido normal o de sólo medio de cultivo DMEM (**figura 12**). Transcurrido 30 minutos de estimulación, la adhesión mediada por el análogo decayó ligeramente, alcanzando niveles similares a los observados con solo medio de cultivo, mientras que la adhesión mediada por IGF2, se incrementó en un 30%, mantuvo un crecimiento sostenido en el tiempo alcanzando el 70% a los 60 minutos de inducción.

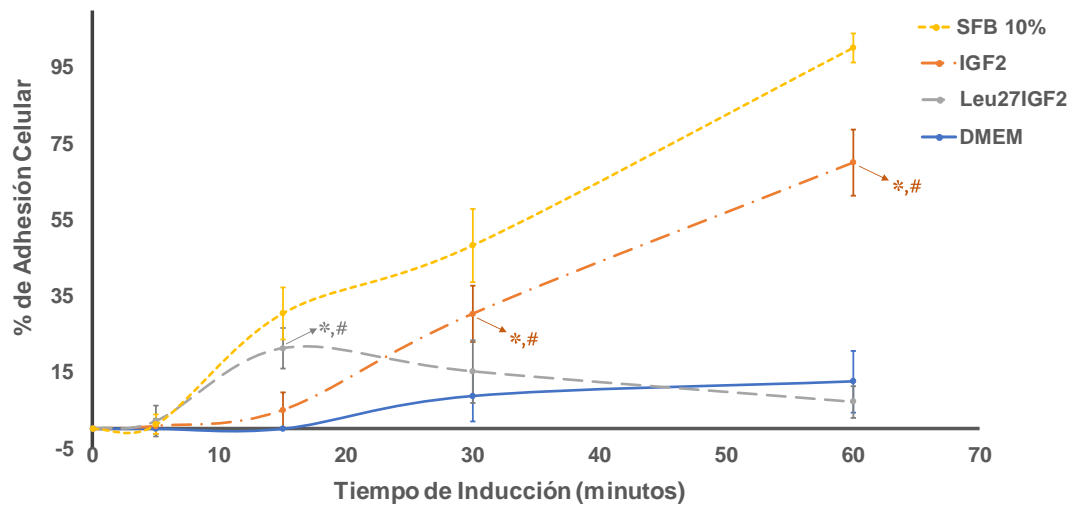


Figura 12. Efecto de Leu²⁷IGF2 e IGF2 sobre la adhesión de células HTR-8/SVneo. Los datos se normalizaron a la condición SFB 10% 60 minutos en la cual se alcanzó el 100% de adhesión celular en este cultivo. Células en presencia de SFB 10% se utilizaron como control positivo de la técnica. * $p < 0,05$ DMEM vs. péptido. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2. Test Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, respectivamente. Los datos se expresaron como media \pm DE (n=9 para cada condición).

La activación de IGF2R contribuye a la migración celular.

La inducción de células trofoblásticas con el péptido IGF2 generó un incremento de 2 veces en la migración respecto a su basal en el ensayo de cámara de *Boyden*, a las 6 horas post estímulo, mientras que el estímulo con el análogo solo mostró alrededor de un 13% más de migración respecto a la condición basal de cultivo (**figura 13A**). Asimismo, la inducción con IGF2 mostró un incremento de la migración desde las 8 a las 24 horas de manera sostenida en el ensayo de cierre de herida, como se aprecia en las microfotografías tomadas durante el ensayo, comparando contra la condición basal (**figura 13B**), y un leve incremento del 15% a las 24 horas en este ensayo cuando el estímulo fue el análogo (**figura 13C**).

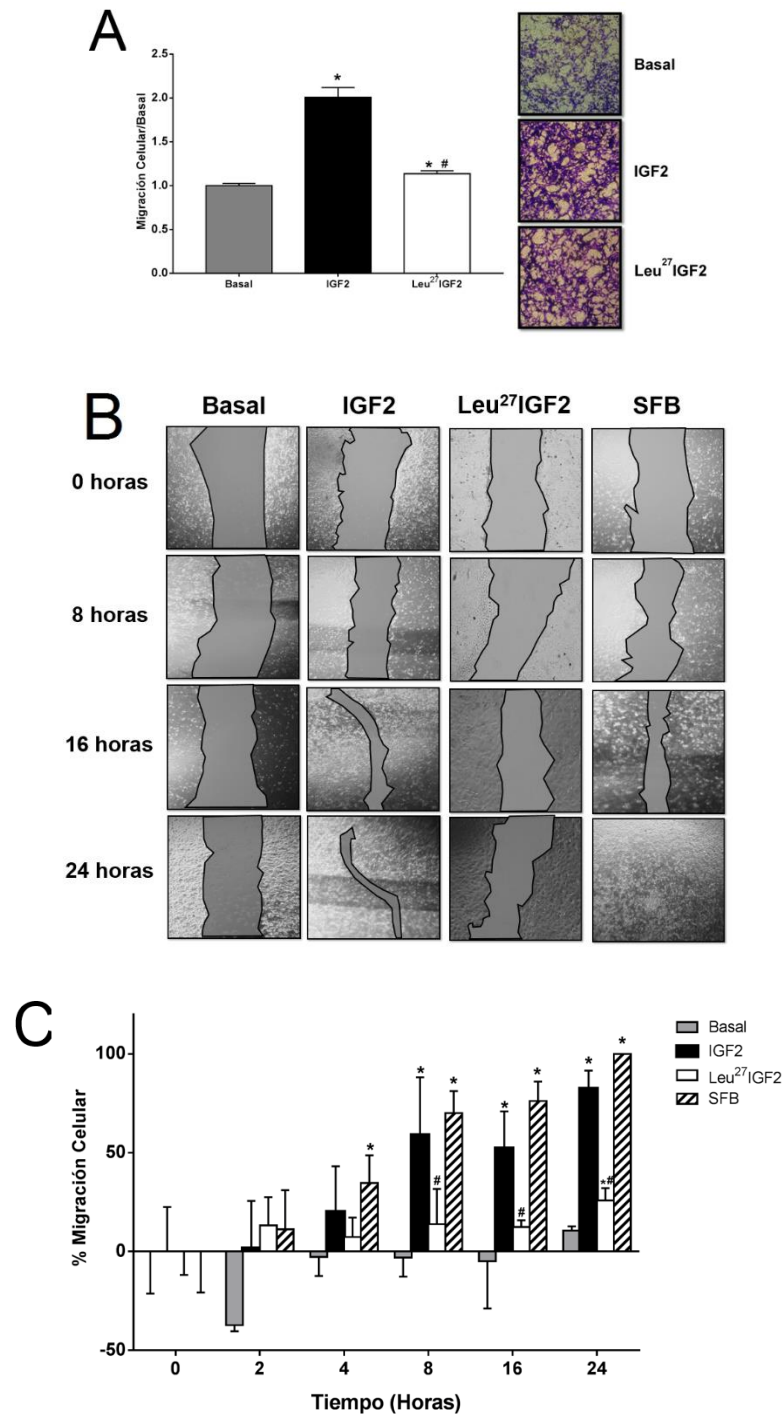


Figura 13. Efecto de Leu²⁷IGF2 e IGF2 sobre la migración celular. En **A** se muestra la migración celular en el ensayo de *Transwell* para los tratamientos normalizados contra el basal (n=4 para cada condición), en **B** microfotografías del ensayo cierre de la herida, mostrando las más representativas de acuerdo con la migración para cada condición y en **C** se muestra el % de migración celular normalizado contra la condición SFB 24 horas en la cual se cierra completamente la herida. Células en presencia de SFB 10% se utilizaron como control

positivo de la técnica (n=6 para cada condición). * $p < 0,05$ Basal vs. estímulos. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2. Test Mann-Whitney. Los datos se expresaron como media \pm DE.

La activación de IGF2R promueve la invasión celular.

Al evaluar la expresión génica de *MMP-9*, metaloproteasa secretada por el trofoblasto y crucial en la actividad invasiva, en las células inducidas con ambos péptidos se encontró que IGF2 incrementa la expresión a partir de las 4 horas hasta las 12 horas en comparación a la condición basal, seguido de una disminución sostenida hasta las 48 horas (**figura 14A**). Por su parte, el análogo incrementó la expresión a partir de la primera hora, a diferencia del efecto de IGF2, manteniéndose hasta las 4 horas y disminuyendo a partir de las 8 horas en comparación al basal (**figura 14A**).

Sabiendo que ambos péptidos promueven la expresión de esta metaloproteasa, evaluamos además si estos ligandos tienen alguna participación en la actividad de MMP-9 presente en el medio condicionado de estas células, encontrando que la inducción con IGF2 mostró una disminución en la actividad en los primeros minutos de estimulación y un incremento a los 60 minutos con respecto a la condición basal (**figura 14B**); por el contrario, la inducción con el análogo no generó una disminución en la actividad durante los primeros minutos de estimulación pero sí un incremento de la actividad a partir de los 15 minutos, la cual se mantuvo hasta los 60 minutos con respecto a su basal (**figura 14B**).

Finalmente, al evaluar la invasión de esta línea celular a las 24 horas, contabilizando los núcleos marcados, se encontró que la inducción con IGF2 incrementa hasta 2.4 veces este proceso con respecto a la condición basal, de manera similar la inducción con el análogo, ya que incrementa 1.6 veces la invasión respecto a la condición basal (**figura 14C**).

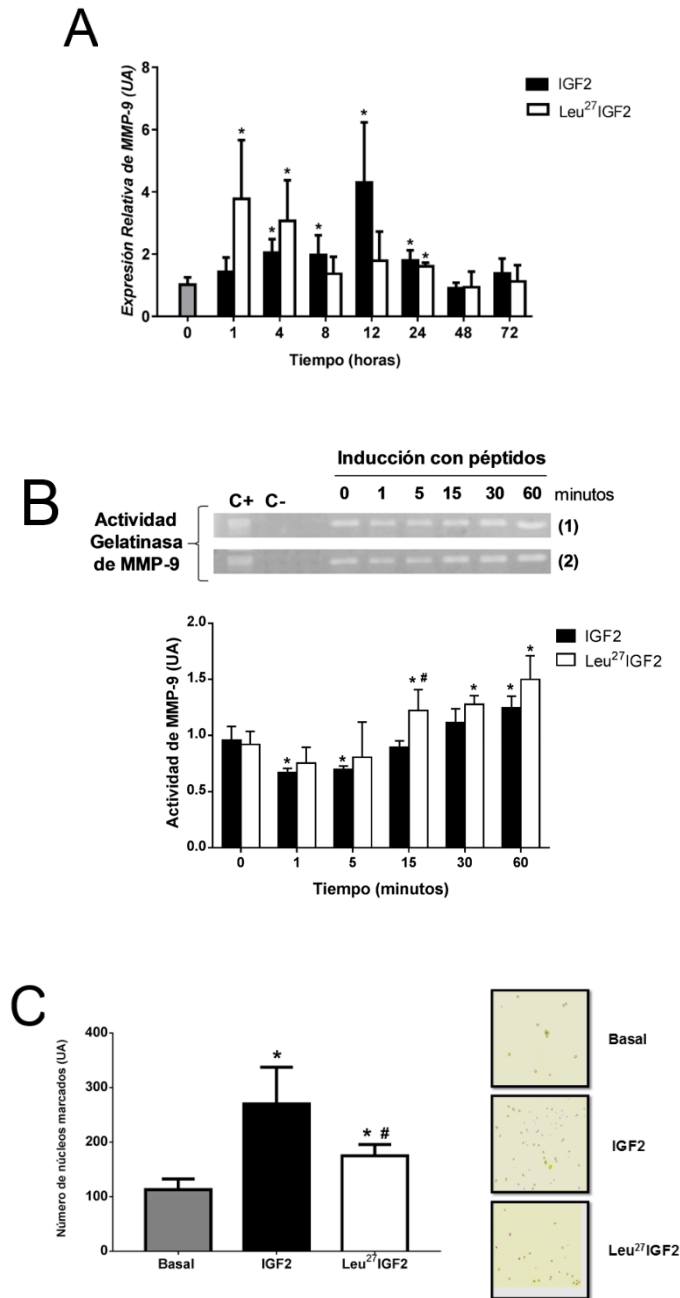


Figura 14. Efecto de Leu²⁷IGF2 e IGF2 sobre la invasión celular. En **A** se muestra la expresión génica relativa de MMP-9 en presencia de los péptidos. Los datos fueron normalizados contra la solución vehículo de cada condición y con la media geométrica de los genes de referencia *18S* y *Actina* * $p < 0,05$ Basal vs. tiempos. Test Mann-Whitney ($n=2$ para cada condición). En **B** la actividad gelatinasa de la metaloproteasa. En la parte superior las imágenes representativas de los geles siendo (1) inducido con IGF2 y (2) con el análogo, y en la parte inferior los datos densitométricos graficados y normalizados contra el basal correspondiente. C+ es el control positivo equivalente a plasma sanguíneo y C- es el control negativo equivalente a seroalbúmina de bovino. * $p < 0,05$ Basal vs. tiempos. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2 Test Mann-Whitney ($n=4$ para cada condición). En **C** se muestra el número de núcleos marcados de las células que atravesaron el matrigel en los tratamientos. * $p < 0,05$ Basal vs. estímulos. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2 Test Kruskal-Wallis ($n=6$ para cada condición). Los datos se expresaron como media \pm DE.

IGF2R participa en la proliferación celular a través de rutas no canónicas.

Al determinar la expresión génica relativa de factores transcripcionales que promuevan la proliferación, se encontró que, en correlación a la condición basal, la inducción con el péptido normal incrementó la expresión de *c-MYC* a partir de las 4 horas hasta las 24 horas (**figura 15A**), de *c-FOS* a partir de las 12 horas hasta las 72 horas (**figura 15B**) y de *STAT5b* a las 12 y 72 horas (**figura 15C**). Sin embargo, no se encontró una mayor expresión en los 3 genes cuando la inducción se realizó con el análogo.

En contraste a estos resultados, cuando se evaluó la proliferación a través del ensayo con rojo neutro se encontró que la inducción con el análogo favorece en un 23% este proceso en comparación al basal (**figura 15D**) teniendo un incremento del 86% y 64% cuando el estímulo fue IGF2 y SFB respectivamente (**figura 15D**).

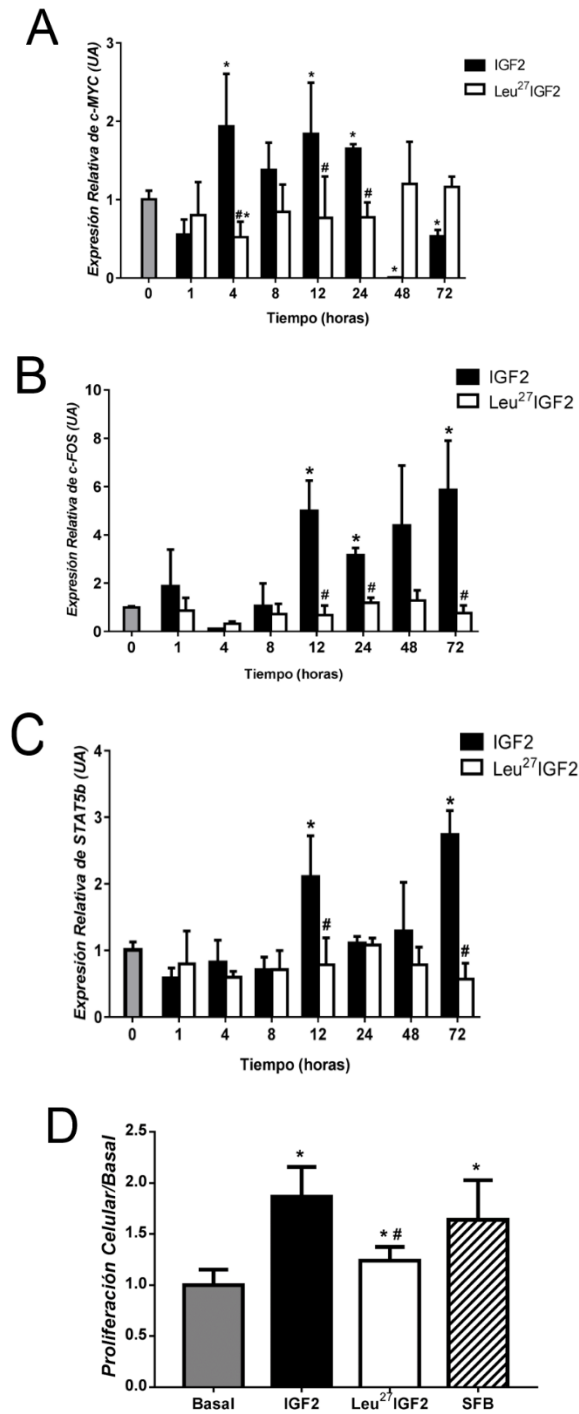


Figura 15. Efecto de Leu²⁷IGF2 e IGF2 sobre la proliferación celular. En **A**, **B** y **C** se muestra la expresión génica relativa de *c-MYC*, *c-FOS* y *STAT5b* respectivamente en presencia de los péptidos. Los datos se normalizaron contra la solución vehículo de cada condición y con la media geométrica de los genes de referencia *18S* y *Actina*. * $p < 0,05$ Basal vs. tiempos. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2. Test Mann-Whitney ($n=2$ para cada condición). En **D** se muestra la proliferación celular para los tratamientos normalizados contra el basal. Se utilizaron células en presencia de SFB como control positivo de la técnica. * $p < 0,05$ Basal vs. estímulo. # $p < 0,05$ IGF2 vs. Leu²⁷IGF2 Test Mann-Whitney ($n=9$ para cada condición). Los datos se expresaron como media \pm DE.

3.3 Expresión y contenido de IGF2R en placentas de madres con diferente peso gestacional

Considerando los resultados, tanto en señalización como en los procesos celulares, y los antecedentes descritos previamente en los que se menciona la asociación de IGF2R con la obesidad, evaluamos la presencia del receptor en tejido placentario proveniente de madres obesas. Mientras se realizaba el estudio, un subgrupo de estas madres fueron suplementadas con DHA para determinar si este ácido graso presentaba un efecto antiinflamatorio frente a esta condición, por lo que también se incluyó este subgrupo al estudio.

El contenido de IGF2R es mayor en placentas de madres obesas que tuvieron niños.

Al evaluar el contenido del receptor tanto en placentas a término de madres con peso normal como con obesidad, las cuales tuvieron niños y niñas, se encontró un mayor contenido de IGF2R en las placentas de madres obesas con recién nacidos (RN) niños en comparación a las madres con peso normal, como se aprecia en la **figura 16**, sin encontrar diferencias en las madres que tuvieron RN niñas. Por consiguiente, el estudio sólo se continuó en las placentas de madres con RN niños.

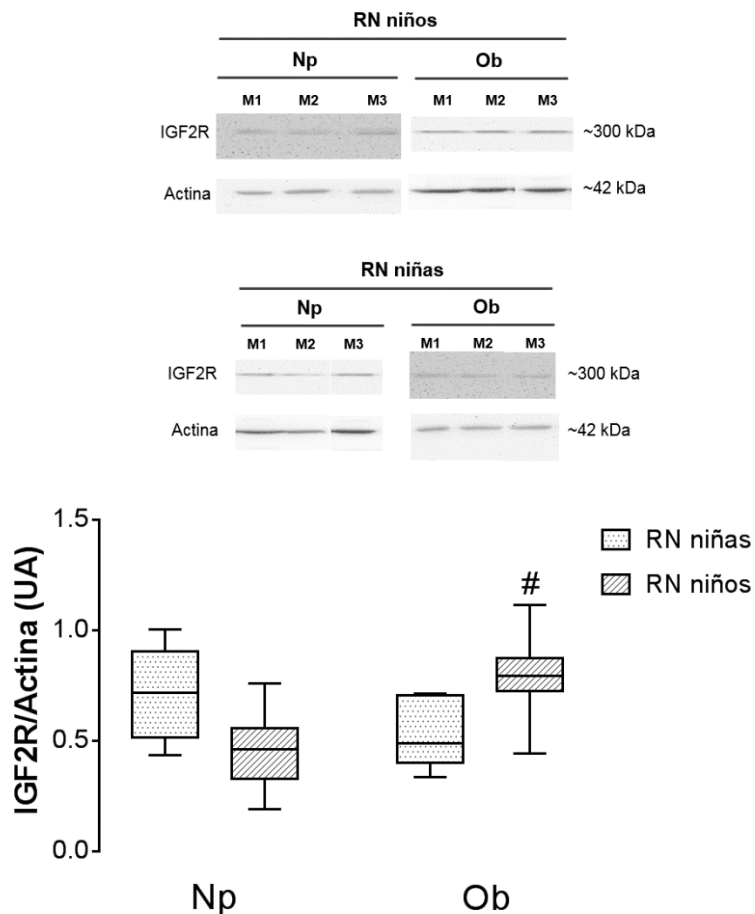


Figura 16. Contenido proteico de IGF2R en placentas humanas de diferente sexo. En la parte superior imágenes representativas de los blots y en la imagen inferior la medición densitométrica normalizada contra actina. # $p < 0,005$ Ob RN niños vs. Np RN niños ANOVA de 2 vías. Los datos se expresaron como mediana y percentiles 25-75. **Np:** Normopeso, **Ob:** Obesidad y **RN:** Recién nacidos.

Los datos antropométricos muestran diferencias en las madres con diferente peso gestacional.

Como era de esperarse, tanto el peso como el IMC pregestacional y post parto de las madres con normopeso fue menor en comparación a las madres obesas y suplementadas con DHA (ver tabla 3), sin encontrar diferencias en los datos antropométricos de los RN.

Características	Np (n=7)	Ob (n=10)	Ob + DHA (n=6)
Peso pregestacional (kg)	60.14 ± 6.87*	82.38 ± 15.35	86.36 ± 13.52
IMC pregestacional (kg/m ²)	23.77 ± 3.22*	32.50 ± 5.87	33.83 ± 3.19
Peso post parto (kg)	72.47 ± 7.10*	87.93 ± 15.10	97.29 ± 11.57
IMC post parto (kg/m ²)	28.71 ± 3.97*	35.45 ± 5.69	37.94 ± 2.85
Ganancia de peso (kg)	12.33 ± 3.36	9.31 ± 4.69	10.93 ± 3.97
Edad gestacional (semanas)	39.17 ± 0.75	38.87 ± 1.31	39.00 ± 1.41
Adherencia a la suplementación con DHA (%)	-	-	50-55
Peso RN (g)	3497.14 ± 413.03	3505.29 ± 63.80	3589.29 ± 404.84
Longitud RN (cm)	50.86 ± 1.70	50.45 ± 2.13	50.36 ± 1.97
Índice ponderal	2.66 ± 0.27	2.70 ± 0.24	2.81 ± 0.26
Peso placenta (g)	431.30 ± 115.90	436.52 ± 80.89	417.71 ± 83.58

Tabla 3. Características antropométricas de las madres y de los recién nacidos. Los datos son presentados como media ± DE. * $p < 0,05$ Np vs. Ob y Ob+DHA. Test Kruskal-Wallis. **Np**: Normopeso, **Ob**: Obesidad IMC ≥ 25 Kg/m², **Ob+DHA**: Obesidad suplementada con DHA y **RN**: Recién nacidos.

La expresión génica de IGF2R y su contenido proteico son regulados en presencia de DHA.

En las placentas provenientes de madres con normopeso los niveles génicos del receptor fueron mayores respecto a las placentas provenientes de madres obesas suplementadas con DHA sin encontrar diferencias con las madres obesas (**figura 17A**). En contraste, el contenido proteico del receptor fue mayor en placentas de madres obesas al comparar con las placentas de madres normopeso, y equivalentes entre placentas de madres obesas suplementadas con DHA y placentas provenientes de madres normopeso (**figura 17B**).

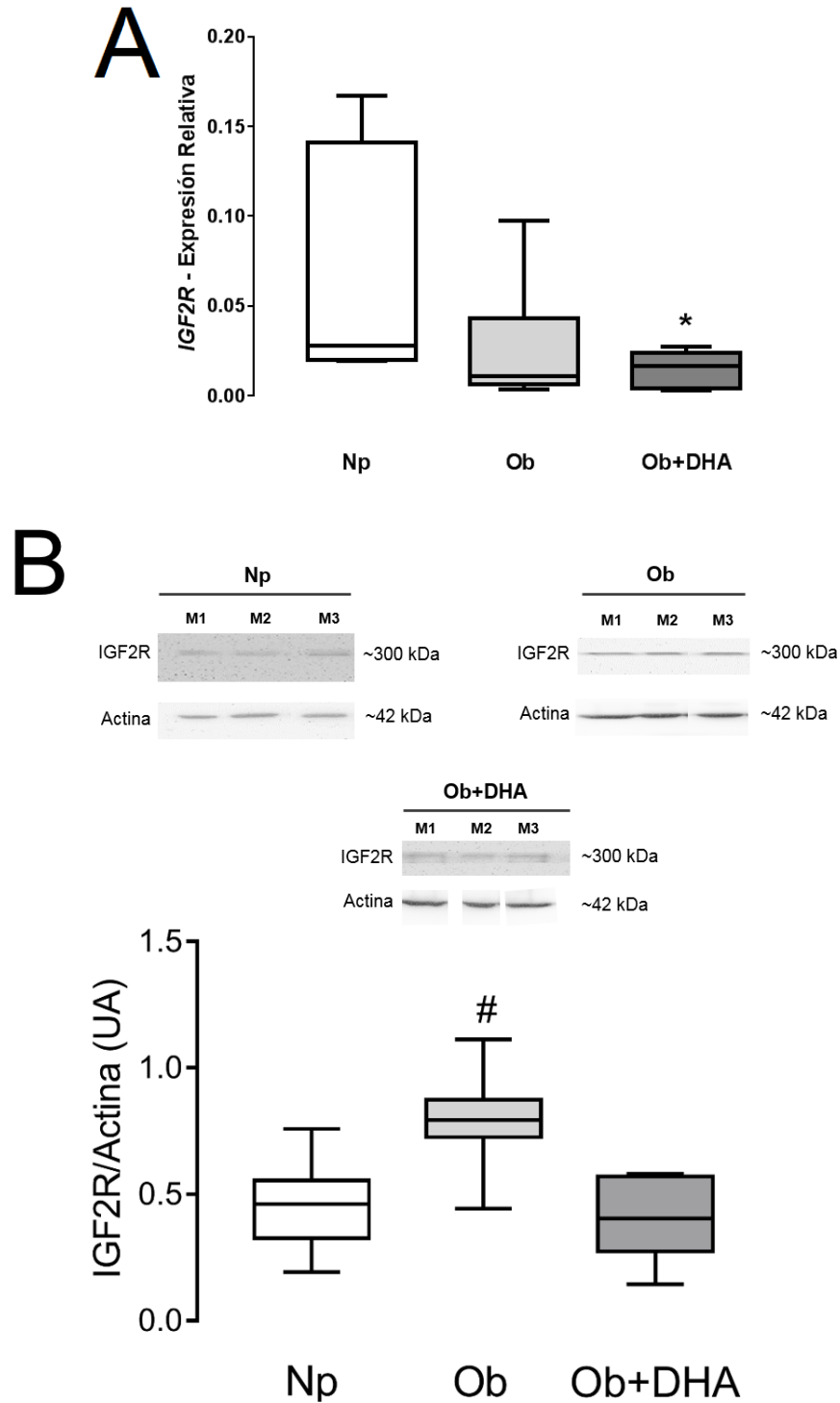


Figura 17. Expresión génica y contenido proteico de IGF2R en placentas humanas. En **A** se muestra la expresión génica relativa de IGF2R normalizada contra la media geométrica de los genes de referencia GAPDH, YWHAZ y Actina. En **B** imágenes representativas de los blots y la medición densitométrica del contenido del receptor normalizado contra actina. * $p < 0,005$ Np vs. Ob + DHA, # $p < 0,005$ Ob vs. Np y Ob+DHA Test Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como mediana y percentiles 25-75. **Np**: Normopeso, **Ob**: Obesidad, **Ob + DHA**: Madres obesas suplementadas con DHA.

La expresión génica de *ADAM17* y *uPA* son menores en placentas de madres obesas suplementadas con DHA.

De manera similar a la expresión génica del receptor, la expresión de *ADAM17* y *uPA* son menores en placentas provenientes de madres obesas suplementadas en comparación a las placentas provenientes de madres normopeso (**figura 18A y B**), no encontrando diferencias entre grupos para los genes *IGF2* e *IR* (**figura 18C y D**).

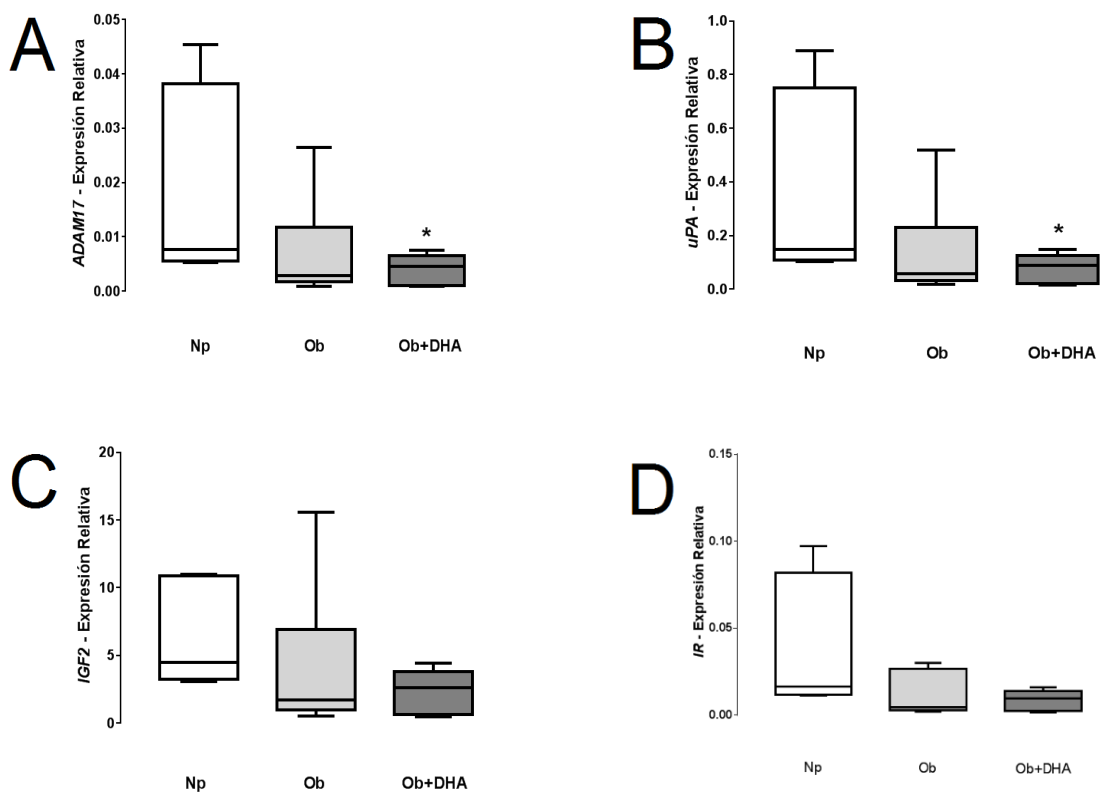


Figura 18. Expresión génica de *ADAM17*, *uPA*, *IGF2* e *IR* en placentas humanas. La expresión génica relativa de *ADAM17* (A), *uPA* (B), *IGF2* (C) e *IR* (D) se normalizo contra la media geométrica de los genes de referencia *GAPDH*, *YWHAZ* y *Actina*. * $p < 0,005$ Np vs. Ob+DHA, Test Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como mediana y percentiles 25-75. **Np**: Normopeso, **Ob**: Obesidad, **Ob+DHA**: Madres obesas suplementadas con DHA.

Capítulo 4. Discusión

El blastocisto, seis o siete días después de la fertilización, se implanta en la pared uterina para la formación del feto y de la placenta [38]. La capa más externa, denominada trofoblasto, debe efectuar procesos celulares que permitan una normal implantación, la cual se puede dividir en 3 fases: a) *la aposición* que es el contacto inicial del blastocisto con la pared uterina, b) *la adhesión* que es la interacción de los receptores en la superficie celular del trofoblasto con los receptores en el lugar de la implantación [111,112] y c) *la invasión* que es la penetración de estas células en la decidua, hasta un tercio del miometrio, remodelando además las arterias uterinas [38,113].

Todos estos procesos, junto con una proliferación y diferenciación celular adecuada del trofoblasto, permiten el desarrollo normal de la placenta [38,114]. Dichos procesos son regulados de manera espacio-temporal por una compleja red de señalización de mediadores biológicos [3,4,111,115], de entre los cuales la familia de los IGFs presentan un rol muy importante. En particular, los dos componentes en este estudio, IGF2 e IGF2R, y su interrelación y participación en el desarrollo fetal y placentario no son del todo claros existiendo actualmente un desconocimiento de los mecanismos moleculares dependientes de este receptor y su ligando, así como el mecanismo a través del cual su desregulación favorece las patologías mencionadas anteriormente en el capítulo 1.

Se ha descrito que la forma más común de la ETG son las molas hidatiformes, las cuales se desarrollan cuando uno o dos espermatozoides fecundan un óvulo que no contiene su núcleo siendo la totalidad del material genético de origen paterno [9], y que la impronta de IGF2 en humanos es exclusivamente transcrita del alelo paterno, mientras que la de su receptor es proveniente exclusivamente del alelo materno [66], sugiriendo que la inexistencia de un regulador de los niveles de IGF2 sería una de las causas principales de la proliferación descontrolada en las molas. De manera similar, diversos estudios muestran

que estos dos componentes se encuentran muy asociados a la restricción del crecimiento fetal [24,25,66,97], motivo por el cual es indispensable comprender los mecanismos en los cuales participa esta interacción IGF2/IGF2R.

Abordamos la estrategia de utilizar el análogo de IGF2, Leu²⁷IGF2, debido a su actuación como un agonista exclusivo del receptor IGF2R según reportes [22,30–33]. Corroboramos su especificidad en la línea de estudio evaluando la activación del receptor IGF1R, y se valoró que efectivamente, este ligando no indujo la fosforilación del receptor, lo que nos permite asegurar que todos los efectos celulares activados por este péptido análogo son mediados por el receptor en estudio.

Los niveles de fosforilación de los efectores canónicos ERK y AKT al inducir las células con el péptido ratifican que IGF2 induce la activación de las dos proteínas [60]. El análogo también indujo la activación de ambos efectores, pero con una fosforilación mayor y aparentemente más rápida en los primeros minutos de inducción en comparación a la efectuada por IGF2.

Es probable que la diferencia de afinidades por el IGF2R este impactando el nivel de fosforilación inicial y la unión favorecida del análogo a un único tipo de receptor podría estar llevando a una sobre activación de las proteínas. También es posible que algunos factores que limitan la activación de las vías de señalización, como lo son la regulación en los niveles de los receptores de la familia IGF o la presencia de inhibidores intracelulares de estas cascadas, afecten la señal observada en la estimulación con IGF2 [116]. M^oKinnon y cols. reportaron la fosforilación de ERK en presencia de IGF2 en la línea HTR-8/SVneo, con una activación máxima a los 5 minutos seguido de un declive en los tiempos posteriores y propusieron que era mediado por IGF2R [22]. Nuestro estudio usando Leu²⁷IGF2 nos permite asegurar que esta activación es dependiente del receptor.

De manera novedosa, el análisis realizado a AKT es el primero en evaluar su fosforilación y en determinar que IGF2R es capaz de modular la activación de este efector en la línea celular, probablemente a través de la activación de Ras mediada por las subunidades βγ de la proteína G acoplada a este receptor [117], activación que también permitiría la fosforilación de ERK [22, 118].

Ciertos estudios proponen que IGF2R puede activar una o varias vías de señalización intracelulares, al transactivar receptores esfingosina 1-fosfato acoplados a proteína G o al

encontrarse él acoplado a una proteína G [22,81–85], motivo por el cual decidimos medir la concentración post incubación con el péptido del AMPc, uno de los segundos mensajeros más importantes en las señalizaciones intracelulares, el cual es producido por la acción de las ACs, siendo estas últimas reguladas principalmente por las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$ provenientes de la activación de un receptor acoplado a proteína G [119]. Encontramos que a los 15 minutos de inducción con IGF2 se produjo una disminución a nivel citoplasmático del AMPc lo que estaría en concordancia con lo reportado por Strauss y cols [120] y observado por M^oKinnon y cols posteriormente [22]. Sumado a que el receptor se encontraría acoplado a una subunidad G_{α} inhibitoria [83], podemos sugerir que quien regula la disminución del AMPc en estas células trofoblásticas es el receptor IGF2R.

Aún más interesante es el incremento del segundo mensajero en el espacio extracelular durante los primeros minutos, cuando el estímulo fue el análogo, mostrando un mecanismo adicional en la disminución del AMPc intracelular [121]. Un rol alternativo a la salida de este segundo mensajero podría estar asociado a la generación extracelular de adenosina, como se soporta en la figura 19, que al activar receptores de adenosina, fomenta tanto la proliferación como la invasión celular en trofoblasto [122].

A través de la técnica de inmunoprecipitación, seguida de la detección del receptor, encontramos que su masa molecular se incrementa en la corrida electroforética post inducción, sugiriendo la interacción y el reclutamiento de un o unos efector/es que permita la señalización intracelular; sin embargo, creemos necesario complementar este resultado realizando una espectrometría de masas a estas muestras para identificar las proteínas que interaccionan con el receptor. Con base en estos resultados, podemos sugerir que el receptor IGF2R se podría acoplar a una proteína G para desencadenar una vía de señalización intracelular una vez activo.

Determinada la activación de IGF2R y la modulación de vías de señalización intracelulares en estas células, realizamos ensayos funcionales para determinar en qué procesos celulares participa este receptor, encontrando que al inducir con el IGF2 se promueve la adhesión celular a partir de los 30 minutos de inducción con un crecimiento sostenido en el tiempo. Diversos estudios han propuesto que la interacción entre el blastocisto y el endometrio está mediado principalmente por citoquinas, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, de entre las cuales las integrinas, las moléculas de adhesión de la

familia de las inmunoglobulinas, cadherinas, selectinas y efrinas son las más relevantes en este proceso [111,112,123].

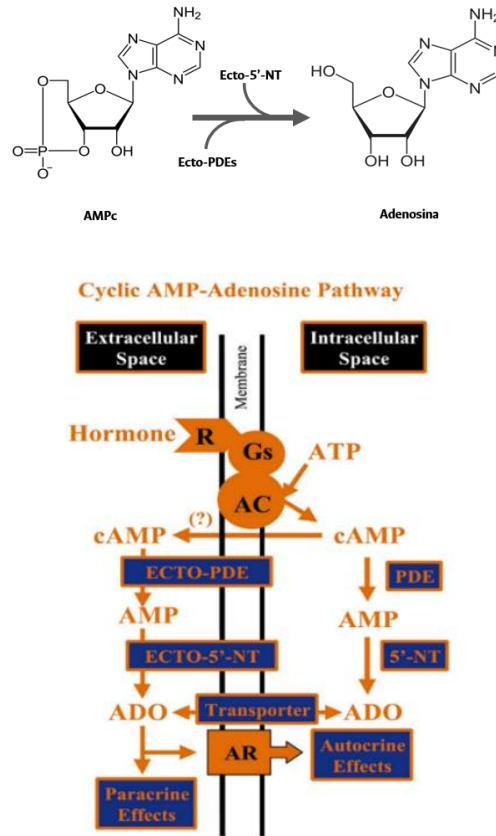


Figura 19. Generación de adenosina a partir de adenosín monofosfato cíclico. En la imagen superior se muestran las enzimas que catalizan la formación de adenosina y en la imagen inferior un posible mecanismo de cómo el AMPc puede generar adenosina. Nomenclatura: **Ecto**: Extracelular, **5'-NT**: 5'-nucleotidasa, **PDE**: Fosfodiesterasa, **ADO**: Adenosina, **AR**: Receptor de adenosina. Tomado de [124].

En particular, las integrinas son las más caracterizadas en la adhesión del trofoblasto, colaborando con los factores de crecimiento en la transactivación de los receptores tirosina quinasa, lo que permite la fosforilación de la ruta MAPKs [125] con la consecuente activación de efectores *corriente abajo* y el rearrreglo del citoesqueleto, facilitando así la formación de los contactos focales [126]. La inducción con Leu²⁷IGF2, en cambio, mostró solo un pequeño incremento en la adhesión a los 15 minutos, en comparación a la condición basal y a la inducida por IGF2, sugiriendo que IGF2R participa en este proceso, que su actividad parece facilitar la activación de mecanismos de transducción rápida, tal vez a través de las integrinas preparando la maquinaria celular necesaria [125], y que la

activación de ERK en los primeros minutos podría ser la causa de este incremento temprano en la adhesión.

En seguida, evaluamos la migración celular en presencia de ambos péptidos, encontrando un incremento significativo de este proceso en células que se estimularon con IGF2, resultado esperado debido a que otros estudios reportan que este ligando favorece la migración [22,85,127,128]. Sin embargo, tanto en el trabajo de M^oKinnon como en el de Lala los experimentos se realizaron con un 1% de SFB, lo que puede llevar a una sobreestimación de los resultados debido a la presencia de factores de crecimiento en el suero, por lo que creemos que realizar los ensayos bajo condiciones libre de suero, nos asegura que el efecto evaluado sólo está dado por el péptido, siendo nuestros resultados similares a los obtenidos por Shields y Hills, bajo las mismas condiciones de trabajo.

En contraste, las células inducidas con Leu²⁷IGF2 mostraron un pequeño incremento en la migración en ambos experimentos, siendo los resultados del transwell similares a lo reportado por Shields y cols. [85]. Trabajos previos sostienen que la familia de las integrinas juegan un rol muy importante en la migración del trofoblasto, de entre las cuales la $\alpha 5\beta 1$ sería esencial en este proceso activando *corriente abajo* la quinasa de adhesión focal y la ruta MAPK [127,129,130]. Así, este leve incremento de la adhesión en presencia de Leu²⁷IGF2 producto tal vez de la transactivación con integrinas y a la activación de ERK en los primeros minutos de inducción, podría explicar el incremento en la migración mediado por IGF2R, a través de una vía de señalización en la cual participarían las Rho quinasas, ROCK I y ROCK II, activadas por la ruta MAPKs [85].

M^oKinnon y cols. [22] reportan que, células inducidas con el análogo incrementan su migración 2,5 a 3 veces respecto a la condición basal, siendo mayor su efecto en comparación al mediado por IGF2. No obstante, debido a la presencia de SFB en dicho experimento, nosotros podemos sugerir que este elevado incremento de hasta 3 veces sería más bien producto de un efecto aditivo con Leu²⁷IGF2 explicando la diferencia con el resultado presentado en este trabajo.

Cabe resaltar que la migración de la población celular total a tiempos tempranos en el ensayo de cierre de la herida y en presencia de Leu²⁷IGF2, al parecer no tendría un rol relevante si lo comparamos con el ensayo de transwell, probablemente porque la activación de IGF2R no participaría en la polaridad planar de estas células, pero sí favorecería la transición epitelio-mesénquima (TEM) necesaria para la migración de

células individuales atravesando barreras físicas, de manera similar al proceso de implantación [131].

IGF2 también promovió la invasión celular en HTR-8/SVneo, incrementando la expresión génica de la metaloproteasa-9 (MMP-9) y su actividad. El factor de crecimiento IGF2 se ha descrito como una molécula clave en la progresión de la invasión [55] y presenta una elevada expresión en el trofoblasto extraveloso, en comparación a la expresión que presenta el sincitiotrofoblasto [132,133], induciendo en este linaje la expresión y secreción de MMP-9 y MMP-2, metaloproteasas cruciales en la invasión trofoblástica durante el primer trimestre de embarazo [132].

Asimismo, nuestro grupo de investigación reportó previamente que en esta línea celular, IGF2 puede estimular la actividad de ambas MMPs [134], sugiriendo la importancia que presenta la regulación de dichas proteasas por este ligando, debido a que su desregulación muestra ser partícipe en el desarrollo de la preeclampsia [135].

Con respecto a los fenómenos de adhesión y migración en presencia de Leu²⁷IGF2, las células con este péptido muestran un leve incremento en la invasión al comparar contra la condición basal y la condición IGF2, teniendo un incremento tanto de la expresión génica, como de la actividad de MMP-9 anticipados a los inducidos por IGF2, resultados que son similares a los encontrados en un modelo de cardiomioblasto inducido con el mismo análogo Leu²⁷IGF2, sugiriendo que la activación de IGF2R promueve estos cambios celulares de manera temprana al activar *corriente abajo* al efector AKT, el cual se ha descrito como responsable de modular este proceso, facilitando la TEM [131,136,137].

Finalmente evaluamos la proliferación celular con ambos péptidos, y como era de esperarse, IGF2 promueve este proceso en la línea de estudio junto con el incremento en la expresión de factores transcripcionales [23,56,60,75,97,138,139] asociados a este evento, mientras que en presencia de Leu²⁷IGF2 la proliferación presentó un ligero incremento, en comparación a la condición sin péptido, sin encontrar cambios en la expresión génica de los factores analizados al comparar contra la condición basal.

Esto sugiere que la activación del receptor y la modulación de la vía de señalización intracelular no son suficientes para desencadenar la expresión de estos genes, requiriendo la participación de otros componentes intracelulares que promuevan esta expresión [116], y que, activar la ruta MAPK y la ruta PI3K/AKT, pueden generar este cambio fosforilando

efectores responsables de este proceso e inhibiendo la apoptosis [23,60]. Adicionalmente, debemos considerar que el receptor promueve la salida del AMPc y su conversión a adenosina podría ser otro mecanismo que favorezca este evento.

En la figura 20, presentamos una propuesta de cómo podría ser la caracterización de la vía de señalización mediada por IGF2R, al unirse a IGF2, en estas células trofoblásticas:

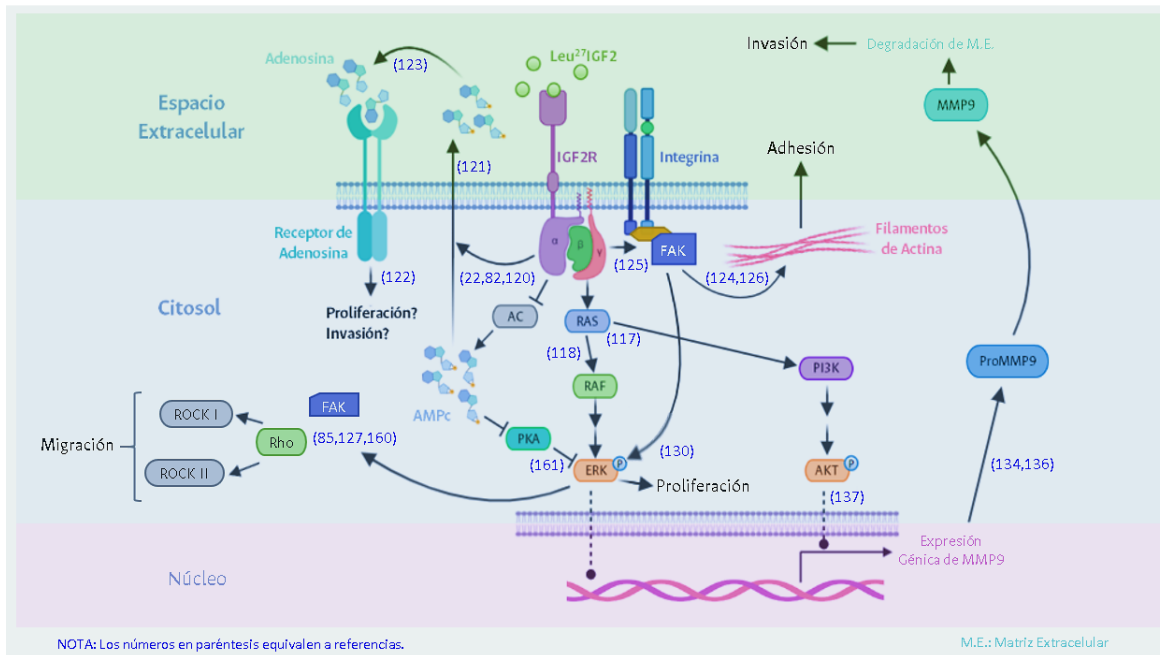


Figura 20. Modelo propuesto de la vía de señalización mediada por IGF2R en células trofoblásticas.

De manera global, tenemos entonces que el receptor IGF2R, activado por IGF2, promueve sutilmente los procesos de adhesión, migración, invasión y proliferación celular en las células trofoblásticas, eventos interrelacionados, secuenciales y de acción temprana que facilitan la condición inicial de implantación y el desarrollo de este linaje.

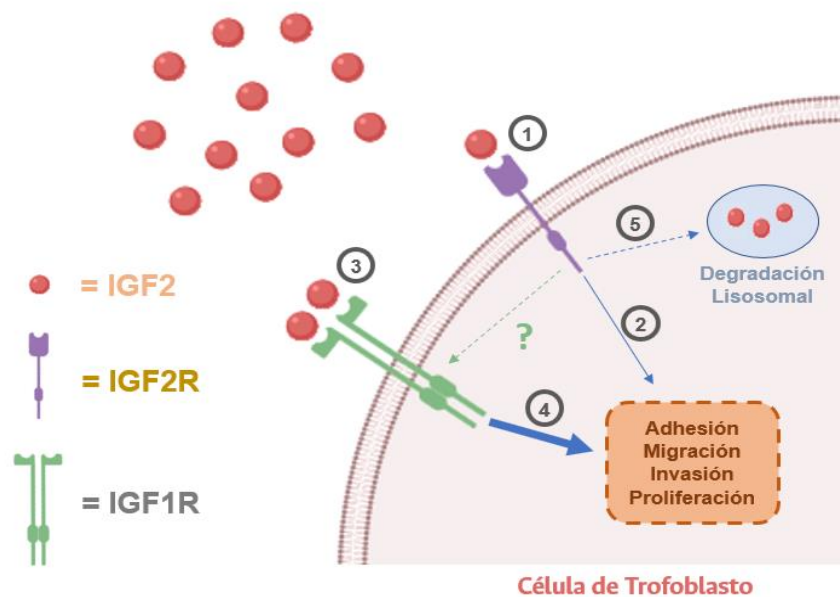


Figura 21. Modelo propuesto de la funcionalidad de IGF2R en células trofoblásticas.

La función tradicional atribuida al receptor ha sido la regulación de la biodisponibilidad del ligando, sin embargo, nosotros proponemos, como se muestra en la figura 21, que en un inicio la interacción IGF2/IGF2R (1) desencadena una vía de señalización que culmina en la promoción de estos procesos (2) posteriormente, la activación del receptor IGF1R (3) conllevará al desarrollo de estos procesos celulares, pero con una mayor intensidad y duración, (4) haciendo que IGF2R deje de señalizar y comience a internalizar a IGF2 (5). Lo anterior se sustenta, al ver como esta unión ligando-receptor puede incrementar el crecimiento de la zona laberíntica y el área de superficie del ST [99], así como también la participación de IGF2R en la expresión de genes homeóticos [24], dando a entender que estos dos componentes son claves en el desarrollo de la placenta. De todas maneras, si IGF2R desempeña estas funciones espacio-temporales de acuerdo con la condición en la que se encuentra, surgen interrogantes tales como el balance que presenta frente a estos dos roles, cómo se regula o cómo sensa una función u otra, y como se complementa con el receptor IGF1R.

Por otro lado, considerando los resultados en la línea celular, los antecedentes de que IGF2R presenta un rol en la función placentaria [24,99] y que el receptor podría tener una participación en el desarrollo de la obesidad y la diabetes [36,105]; evaluamos su contenido en placentas provenientes de madres con diferente peso gestacional, encontrando sólo

diferencias en las placentas de madres obesas de RN niños, en comparación a las placentas de madres normopeso, hecho que podemos atribuir al dimorfismo sexual que presentan este órgano cuando son expuestos a condiciones de estrés, siendo más susceptibles a una perturbación en el desarrollo los fetos masculinos en comparación a los femeninos [140].

En contraste, la expresión génica del receptor no mostró diferencias entre las placentas de madres normopeso y las placentas de madres obesas, sugiriendo que este cambio observado en el contenido proteico pueda ser a nivel post traduccional. Curiosamente, la expresión en las placentas de madres obesas suplementadas con DHA, disminuyó en comparación al grupo normopeso y aún más interesante, se encontró que el contenido del receptor en placentas de madres obesas suplementadas con DHA es equivalente al contenido en placentas de madres con normopeso; sugiriendo la participación de este suplemento en mantener los niveles funcionales normales del receptor frente a esta condición, por alguno de sus mecanismos moleculares, como son la reducción de citoquinas proinflamatorias, prostaglandinas y leucotrienos, el incremento en la expresión de citoquinas anti inflamatorias o la disrupción de las balsas lipídicas, que disminuye la producción de mediadores de la familia de eicosanoides [141].

Estos resultados generan la inquietud de por qué el contenido de IGF2R es mayor en placentas de madres obesas, en comparación a las placentas de madres normopeso, y que efecto tiene el DHA para regular su contenido. Una posible explicación viene del clivaje que sufre este receptor mediado por TACE/ADAM17 [20], la activación de TGF- β mediada por IGF2R [142] y el rol antiinflamatorio que presenta el DHA [141].

Se ha descrito que el dominio 1 de IGF2R interactúa con uPAR que, en conjunto con el activador uPA, promueven la activación del plasminógeno a plasmina, siendo ésta última la que facilita la activación del factor TGF- β [142].

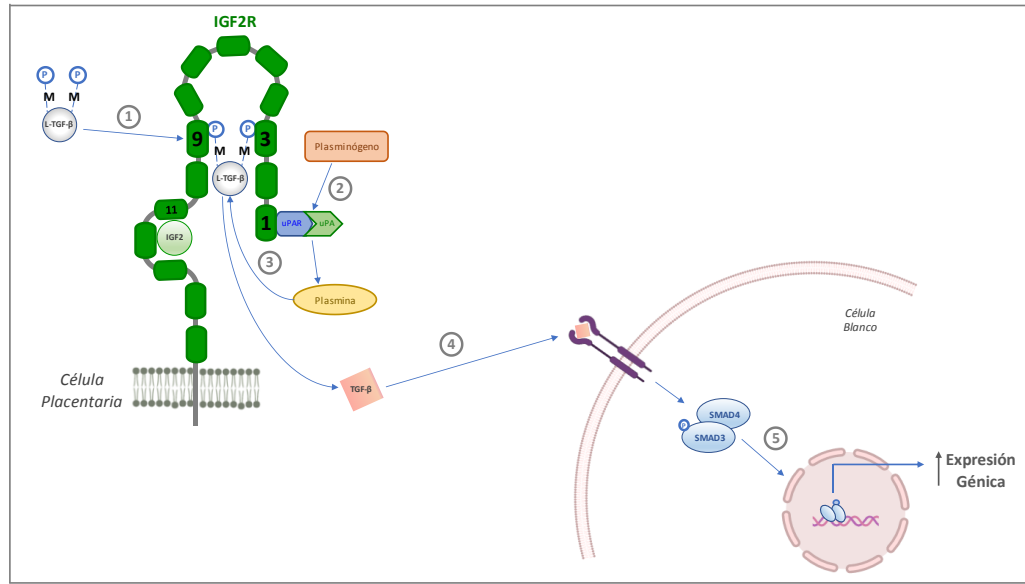


Figura 22. Activación de TGF-β por el receptor IGF2R. TGF-β se secreta de forma *inactiva* o *latente* (L-TGF-β) (1) y su activación es mediada por la proteasa Plasmina (3), forma activa del Plasminógeno (2). Una vez activo inducirá la activación de las SMADs (4) en la célula blanca incrementando la expresión génica de citoquinas proinflamatorias (5). IGF2R interacciona con uPAR en su dominio 1, y con L-TGF-β, a través de sus manosas-6-fosfatos estructurales.

TGF-β, por su parte, es una citoquina proinflamatoria que muestra niveles alterados, junto con otras citoquinas, en placentas que presentan una elevada acumulación de lípidos, inflamación y estrés oxidativo [143–146], como son las provenientes de madres obesas que además, tiene un rol significativo en el desarrollo de la obesidad [147–149]. TGF-β presenta una retroalimentación negativa de su señalización al activar a la metaloproteasa TACE/ADAM17, a través de las MAPKs, reclutándola a la membrana para permitir el clivaje, tanto de IGF2R, como de su propio receptor [20,150–152].

Nosotros planteamos que el aumento en el contenido de IGF2R de las placentas de madres obesas, podría deberse a que no está siendo clivado (el anticuerpo utilizado para detectar este receptor reconoce los aminoácidos aledaños a Ala1675, que se encuentran en la región extracelular), lo que incrementa los niveles de TGF-β activo y favorece la condición de inflamación crónica. Siendo ADAM17 el responsable de clivar el receptor, proponemos que frente a esta condición de inflamación crónica habría una desregulación en su contenido, activación, translocación o tal vez un incremento de su inhibidor [150] en estas células placentarias producto de algún factor o factores presentes generados por

esta complicación, y que la presencia de DHA por alguno de sus mecanismos moleculares [141] permitiría regular a niveles normales la función de esta metaloproteasa.

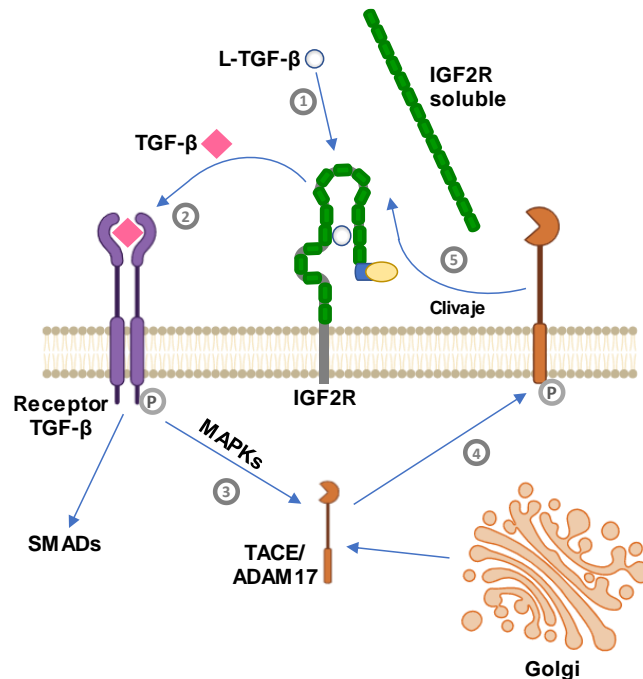


Figura 23. Regulación de la señalización de TGF- β . Una vez activa esta citoquina (1) e interactuando con su receptor (2) permitirá la fosforilación de TACE/ADAM17, a través de la ruta MAPK (3), translocándola a la membrana celular (4) para permitir el clivaje del receptor IGF2R (5).

Evaluamos entonces la expresión génica de *ADAM17* y otros componentes asociados a nuestro estudio, como son *IGF2* (participación en la acumulación y metabolismo de lípidos regulando el crecimiento y diferenciación de adipocitos [153,154]), *uPA* (formación de plasmina) e *IR* (regulación del ingreso de la glucosa), en estos grupos; encontrando un comportamiento similar al observado con el receptor en la expresión de *ADAM17* y *uPA*. En el caso de la metaloproteasa esperábamos un incremento en su expresión, no obstante, esta disminución en el grupo suplementado la podemos atribuir a que el DHA sería capaz de incrementar tanto la estabilidad como el contenido de *ADAM17*, inhibiendo su degradación [155], por lo que un incremento de su mensajero no sería necesario.

En el caso de la disminución de *uPA* en el grupo suplementado, creemos que se debe a una reducción en la activación del plasminógeno [35,142], disminuyendo a su vez la inflamación causada por esta patología. No encontramos diferencias entre grupos para los genes *IGF2* e *IR*, probablemente porque el péptido es crucial para el desarrollo y

crecimiento del feto [53,133,156] y el receptor debe mantener una adecuada homeostasis de la glucosa fetal, evitando complicaciones metabólicas durante su desarrollo [157–159].

Capítulo 5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El receptor IGF2R presenta una vía de señalización intracelular crucial para el desarrollo de las células trofoblásticas, involucrando la activación de proteína G y la fosforilación de efectores claves como ERK1/2 y AKT, modulando el comienzo de los procesos celulares adhesión, migración e invasión, lo que facilitaría a estas células adaptarse a la condición inicial de implantación en la decidua, al activar toda la maquinaria necesaria para el crecimiento celular, y asimismo, permitiendo el buen desarrollo de la placenta para un intercambio eficiente de nutrientes entre la madre y el feto.

En un ambiente con inflamación crónica y elevados niveles de nutrientes, como es la condición de obesidad, el receptor IGF2R no estaría siendo clivado en placentas provenientes de madres obesas que tuvieron niños, lo que facilitaría la activación del TGF- β exacerbando la patología. La suplementación con DHA permitiría que el receptor sea clivado favoreciendo procesos antiinflamatorios, lo cual, muestra la importancia de la multifuncionalidad de este receptor a nivel celular y en el tejido placentario, sugiriendo nuevamente su participación en el desarrollo del feto y en la función de la placenta.

Por consiguiente, la familia de los factores IGFs, en particular IGF2 e IGF2R, juegan un rol crítico en el desarrollo, función y crecimiento del trofoblasto y de la placenta.

5.2 Recomendaciones

Para comprender mejor la vía de señalización mediada por IGF2R y activada por IGF2 en las células trofoblásticas, una aproximación plausible es analizar el fosfoproteoma en la línea celular HTR-8/SVneo, inducida tanto con IGF2 como con Leu²⁷IGF2 a distintos tiempos, incluyendo por supuesto la condición basal.

Se podría además, comparar el comportamiento de los genes y proteínas en estudio, así como, los procesos celulares de células trofoblásticas normales, con células trofoblásticas malignas, al inducir estas últimas con los péptidos con los cuales se trabajó, verificando la importancia que tiene esta interacción IGF2/IGF2R en el desarrollo normal de estas células y su participación en estas patologías.

En el estudio del receptor IGF2R en placentas asociadas a obesidad, queda pendiente incrementar el *n* de cada grupo para confirmar los resultados, realizar más investigaciones que permitan dilucidar los mecanismos por los cuales el receptor no estaría siendo clivado y profundizar en los fenómenos biológicos que describan/expliquen las razones por las cuales se observan estas diferencias entre los recién nacidos niños y niñas. Trabajo que debe verse como pionero, ya que permite la apertura de nuevas líneas de investigación no sólo en cuanto a la funcionalidad del tejido placentario y al desarrollo fetal, sino también, en evaluar su participación en otras patologías y su utilización como biomarcador.

Bibliografía

1. Apps R, Sharkey A, Gardner L, Male V, Trotter M, Miller N, et al. Genome-wide expression profile of first trimester villous and extravillous human trophoblast cells. *Placenta*. 2011;32: 33–43. doi:10.1016/j.placenta.2010.10.010
2. Heidari Z, Sheibak N. Trophoblast Giant Cells, the Prime Suspects of Deficient Placentation Associated With Pregnancy Complications. *Gene Cell Tissue*. 2016;3: e38516. doi:10.17795/gct-38516
3. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol RBE*. 2007;5: 6. doi:10.1186/1477-7827-5-6
4. Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knofler M. Regulation of Placental Extravillous Trophoblasts by the Maternal Uterine Environment. *Front Immunol*. 2018;9: 2597. doi:10.3389/fimmu.2018.02597
5. Khan MA, Manna S, Malhotra N, Sengupta J, Ghosh D. Expressional regulation of genes linked to immunity & programmed development in human early placental villi. *Indian J Med Res*. 2014;139: 125–140.
6. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008;75: 1–8. doi:10.1016/j.mvr.2007.04.009
7. Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech*. 2012;5: 9–18. doi:10.1242/dmm.008516
8. Monchek R, Wiedaseck S. Gestational trophoblastic disease: an overview. *J Midwifery Womens Health*. 2012;57: 255–259. doi:10.1111/j.1542-2011.2012.00177.x
9. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213: S115-122. doi:10.1016/j.ajog.2015.08.042
10. Alcaldía Mayor de Bogotá DC. Guía de trastornos hipertensivos del embarazo. 2014. Available: http://www.saludcapital.gov.co/DDS/Publicaciones/Guia%20Maternidad-Trastornos_baja.pdf
11. Cortés C, Ching R, Rodríguez A, León H, Capasso S, Lozano F, et al. La mola hidatidiforme: un indicador de la situación sociodemográfica en salud sexual y reproductiva. *Inf Quinc Epidemiol Nac*. 2003;12: 193–208.

12. Gratton RJ, Asano H, Han VKM. The regional expression of insulin-like growth factor II (IGF-II) and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) in the placentae of women with pre-eclampsia. *Placenta*. 2002;23: 303–310. doi:10.1053/plac.2001.0780
13. Gurel D, Ozer E, Altunyurt S, Guclu S, Demir N. Expression of IGR-IR and VEGF and trophoblastic proliferative activity in placentas from pregnancies complicated by IUGR. *Pathol Res Pract*. 2003;199: 803–809. doi:10.1078/0344-0338-00499
14. Livingstone C. IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20: R321-339. doi:10.1530/ERC-13-0231
15. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012;12: 159–169. doi:10.1038/nrc3215
16. Gary-Bobo M, Nirdé P, Jeanjean A, Morère A, Garcia M. Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14: 2945–2953. doi:10.2174/092986707782794005
17. Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4: 202–212. doi:10.1038/nrm1050
18. Leksa V, Ilkova A, Vicikova K, Stockinger H. Unravelling novel functions of the endosomal transporter mannose. *Immunol Lett*. 2017;190: 194–200. doi:10.1016/j.imlet.2017.08.011
19. Zaina S, Squire S. The soluble type 2 insulin-like growth factor (IGF-II) receptor reduces organ size by IGF-II-mediated and IGF-II-independent mechanisms. *J Biol Chem*. 1998;273: 28610–28616. doi:10.1074/jbc.273.44.28610
20. Leksa V, Loewe R, Binder B, Schiller HB, Eckerstorfer P, Forster F, et al. Soluble M6P/IGF2R released by TACE controls angiogenesis via blocking plasminogen activation. *Circ Res*. 2011;108: 676–685. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234732
21. Vishwamitra D, George SK, Shi P, Kaseb AO, Amin HM. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in hematological malignancies. *Oncotarget*. 2017;8: 1814–1844. doi:10.18632/oncotarget.12123
22. McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86: 3665–3674. doi:10.1210/jcem.86.8.7711
23. Harris LK, Crocker IP, Baker PN, Aplin JD, Westwood M. IGF2 actions on trophoblast in human placenta are regulated by the insulin-like growth factor 2 receptor, which can function as both a signaling and clearance receptor. *Biol Reprod*. 2011;84: 440–446. doi:10.1095/biolreprod.110.088195
24. Harris LK, Pantham P, Yong HEJ, Pratt A, Borg AJ, Crocker I, et al. The role of insulin-like growth factor 2 receptor-mediated homeobox gene expression in human placental

- apoptosis, and its implications in idiopathic fetal growth restriction. *Mol Hum Reprod*. 2019;25: 572–585. doi:10.1093/molehr/gaz047
25. Kaku K, Osada H, Seki K, Sekiya S. Insulin-like growth factor 2 (IGF2) and IGF2 receptor gene variants are associated with fetal growth. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. 2007;96: 363–367. doi:10.1111/j.1651-2227.2006.00120.x
 26. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and pregnancy: parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clin Proc*. 2009;84: 985–1000. doi:10.1016/S0025-6196(11)60669-1
 27. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, et al. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*. 1993;206: 204–211. doi:10.1006/excr.1993.1139
 28. American Type Culture Collection. HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271TM). [cited 18 Jan 2020]. Available: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-3271.aspx#>
 29. Rai A, Cross JC. Development of the hemochorial maternal vascular spaces in the placenta through endothelial and vasculogenic mimicry. *Dev Biol*. 2014;387: 131–141. doi:10.1016/j.ydbio.2014.01.015
 30. Sakano K, Enjoh T, Numata F, Fujiwara H, Marumoto Y, Higashihashi N, et al. The design, expression, and characterization of human insulin-like growth factor II (IGF-II) mutants specific for either the IGF-II/cation-independent mannose. *J Biol Chem*. 1991;266: 20626–20635.
 31. GroPep. GroPep Bioreagents IGF Analogues. In: Human [Leu27]IGF-II [Internet]. [cited 6 May 2020]. Available: https://gropep.com/product_families/igf-analogues/products/human-leu27-igf-ii--7
 32. Forbes BE, Hartfield PJ, McNeil KA, Surinya KH, Milner SJ, Cosgrove LJ, et al. Characteristics of binding of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II analogues to the type 1 IGF receptor determined by BIAcore analysis. *Eur J Biochem*. 2002;269: 961–968. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02735.x
 33. Oh Y, Müller HL, Zhang H, Ling N, Rosenfeld RG. Synthesis and characterization of IGF-II analogs: applications in the evaluation of IGF receptor function and IGF-independent actions of IGFBPs. *Adv Exp Med Biol*. 1993;343: 41–54. doi:10.1007/978-1-4615-2988-0_5
 34. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reprod Camb Engl*. 2017;153: R97–R108. doi:10.1530/REP-16-0495
 35. Scott CD, Kiess W. Soluble M6P/IGFIIR in the circulation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2015;29: 723–733. doi:10.1016/j.beem.2015.08.001
 36. Jeyaratnaganathan N, Hojlund K, Kroustrup JP, Larsen JF, Bjerre M, Levin K, et al. Circulating levels of insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in

- obesity and type 2 diabetes. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc.* 2010;20: 185–191. doi:10.1016/j.ghir.2009.12.005
37. Molfino A, Amabile MI, Monti M, Arcieri S, Rossi Fanelli F, Muscaritoli M. The Role of Docosahexaenoic Acid (DHA) in the Control of Obesity and Metabolic Derangements in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17: 505. doi:10.3390/ijms17040505
38. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2005;3: 56. doi:10.1186/1477-7827-3-56
39. Bischof P, Irminger-Finger I. The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37: 1–16. doi:10.1016/j.biocel.2004.05.014
40. Moffett A, Loke C, McLaren A, editors. *Biology and Pathology of Trophoblast.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. doi:10.1017/CBO9780511545207
41. Hanssens S, Salzet M, Vinatier D. Aspectos inmunológicos de la gestación. *EMC - Ginecol-Obstet.* 2013;49: 1–21. doi:10.1016/S1283-081X(13)64079-5
42. American Cancer Society. What Is Gestational Trophoblastic Disease? Available: <https://www.cancer.org/cancer/gestational-trophoblastic-disease/about/what-is-gtd.html>
43. Alfredo López Cousillas JME. Enfermedad Trofoblástica Gestacional. Aspectos Clínicos y Morfológicos. *Rev Esp Patol.* 2002;35: 187–200.
44. Shaaban AM, Rezvani M, Haroun RR, Kennedy AM, Elsayes KM, Olpin JD, et al. Gestational Trophoblastic Disease: Clinical and Imaging Features. *RadioGraphics.* 2017;37: 681–700. doi:10.1148/rg.2017160140
45. Le Bret T, Tranbaloc P, Benbunan J-L, Salet-Lizée D, Villet R. [Endometrial choriocarcinoma in peri-menopausal women]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2005;34: 85–89. doi:10.1016/s0368-2315(05)82674-2
46. Sierra-Bergua B, Sánchez-Marteles M, Cabrerizo-García JL, Sanjoaquin-Conde I. Choriocarcinoma with pulmonary and cerebral metastases. *Singapore Med J.* 2008;49: e286-288.
47. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta.* 2000;21 Suppl A: S25-30. doi:10.1053/plac.1999.0522
48. Nathanielsz PW. Animal models that elucidate basic principles of the developmental origins of adult diseases. *ILAR J.* 2006;47: 73–82. doi:10.1093/ilar.47.1.73
49. Nardoza LMM, Caetano ACR, Zamarian ACP, Mazzola JB, Silva CP, Marçal VMG, et al. Fetal growth restriction: current knowledge. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;295: 1061–1077. doi:10.1007/s00404-017-4341-9

50. Barker DJP. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2002;13: 364–368. doi:10.1016/s1043-2760(02)00689-6
51. Sánchez-Gómez M. Entendiendo el papel del sistema de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) en la regulación funcional del trofoblasto humano. *Rev Acad Colomb Cienc Exactas Fis Nat*. 2014;38: 118+.
52. Diaz LE, Chuan Y-C, Lewitt M, Fernandez-Perez L, Carrasco-Rodriguez S, Sanchez-Gomez M, et al. IGF-II regulates metastatic properties of choriocarcinoma cells through the activation of the insulin receptor. *Mol Hum Reprod*. 2007;13: 567–576. doi:10.1093/molehr/gam039
53. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993;75: 73–82.
54. Kumar N, Leverage J, Bick D, Sampath V. Ontogeny of growth-regulating genes in the placenta. *Placenta*. 2012;33: 94–99. doi:10.1016/j.placenta.2011.11.018
55. Hamilton GS, Lysiak JJ, Han VK, Lala PK. Autocrine-paracrine regulation of human trophoblast invasiveness by insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF-binding protein (IGFBP)-1. *Exp Cell Res*. 1998;244: 147–156. doi:10.1006/excr.1998.4195
56. Chen H, Li Y, Shi J, Song W. Role and mechanism of insulin-like growth factor 2 on the proliferation of human trophoblasts in vitro. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42: 44–51. doi:10.1111/jog.12853
57. Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JI, et al. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res*. 1995;6: 357–366. doi:10.1016/0955-2235(95)00013-5
58. Baxter RC. Changes in the IGF-IGFBP axis in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2001;15: 421–434. doi:10.1053/beem.2001.0161
59. Massoner P, Ladurner-Rennau M, Eder IE, Klocker H. Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *Br J Cancer*. 2010;103: 1479–1484. doi:10.1038/sj.bjc.6605932
60. Forbes K, Westwood M, Baker PN, Aplin JD. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294: C1313-1322. doi:10.1152/ajpcell.00035.2008
61. Pombo M, Audí L, Bueno M, Calzada R, Cassorla F, Diéguez C, et al. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*. 4^o edición. España: McGRAW-HILL; 2009.
62. O'Dell SD, Day INM. Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30: 767–771. doi:10.1016/S1357-2725(98)00048-X
63. Yu H, Rohan T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92: 1472–1489. doi:10.1093/jnci/92.18.1472

64. Vu TH, Hoffman AR. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature*. 1994;371: 714–717. doi:10.1038/371714a0
65. Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, et al. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest*. 1996;98: 2612–2615. doi:10.1172/JCI119081
66. Bergman D, Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. Insulin-Like Growth Factor 2 in Development and Disease: A Mini-Review. *Gerontology*. 2013;59: 240–249. doi:10.1159/000343995
67. Chao W, D'Amore PA. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008;19: 111–120. doi:10.1016/j.cytogfr.2008.01.005
68. Krauss G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 5th edition. Germany: Wiley-VHC; 2014.
69. Iniguez G, Castro JJ, Garcia M, Kakarieka E, Johnson MC, Cassorla F, et al. IGF-IR signal transduction protein content and its activation by IGF-I in human placentas: relationship with gestational age and birth weight. *PloS One*. 2014;9: e102252. doi:10.1371/journal.pone.0102252
70. Iñiguez G, Cassorla F. Expresión y contenido placentario de los componentes del eje somatotrófico en niños con alteraciones del crecimiento fetal. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*. 2012;3 Suppl(1): 33–37. doi:10.3266/RevEspEndocrinolPediatr.pre2012.Apr.96
71. Brown J, Delaine C, Zaccheo OJ, Siebold C, Gilbert RJ, van Boxel G, et al. Structure and functional analysis of the IGF-II/IGF2R interaction. *EMBO J*. 2008;27: 265–276. doi:10.1038/sj.emboj.7601938
72. El-Shewy HM, Luttrell LM. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. *Vitam Horm*. 2009;80: 667–697. doi:10.1016/S0083-6729(08)00624-9
73. Fang J, Furesz TC, Lurent RS, Smith CH, Fant ME. Spatial polarization of insulin-like growth factor receptors on the human syncytiotrophoblast. *Pediatr Res*. 1997;41: 258–265. doi:10.1203/00006450-199702000-00017
74. Gary-Bobo M, Nirdé P, Jeanjean A, Morère A, Garcia M. Mannose 6-phosphate receptor targeting and its applications in human diseases. *Curr Med Chem*. 2007;14: 2945–2953. doi:10.2174/092986707782794005
75. Ou J-M, Lian W-S, Qiu M-K, Dai Y-X, Dong Q, Shen J, et al. Knockdown of IGF2R suppresses proliferation and induces apoptosis in hemangioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 2014;45: 1241–1249. doi:10.3892/ijo.2014.2512
76. Weiner JA, Chen A, Davis BH. E-box-binding repressor is down-regulated in hepatic stellate cells during up-regulation of mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II

- receptor expression in early hepatic fibrogenesis. *J Biol Chem.* 1998;273: 15913–15919. doi:10.1074/jbc.273.26.15913
77. Chen W-K, Kuo W-W, Hsieh DJ-Y, Chang H-N, Pai P-Y, Lin K-H, et al. CREB Negatively Regulates IGF2R Gene Expression and Downstream Pathways to Inhibit Hypoxia-Induced H9c2 Cardiomyoblast Cell Death. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 27921–27930. doi:10.3390/ijms161126067
78. Hinrichs S, Heger J, Schreckenber R, Wenzel S, Euler G, Arens C, et al. Controlling cardiomyocyte length: the role of renin and PPAR- γ . *Cardiovasc Res.* 2011;89: 344–352. doi:10.1093/cvr/cvq313
79. Bohnsack RN, Warejcka DJ, Wang L, Gillespie SR, Bernstein AM, Twining SS, et al. Expression of insulin-like growth factor 2 receptor in corneal keratocytes during differentiation and in response to wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55: 7697–7708. doi:10.1167/iovs.14-15179
80. Instituto Weizmann de Ciencias. GeneCards HUMAN GENE DATABASE. [cited 5 Apr 2020]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IGF2R>
81. El-Shewy HM, Johnson KR, Lee M-H, Jaffa AA, Obeid LM, Luttrell LM. Insulin-like growth factors mediate heterotrimeric G protein-dependent ERK1/2 activation by transactivating sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem.* 2006;281: 31399–31407. doi:10.1074/jbc.M605339200
82. Okamoto T, Katada T, Murayama Y, Ui M, Ogata E, Nishimoto I. A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose. *Cell.* 1990;62: 709–717. doi:10.1016/0092-8674(90)90116-v
83. Okamoto T, Nishimoto I. Analysis of stimulation-G protein subunit coupling by using active insulin-like growth factor II receptor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88: 8020–8023. doi:10.1073/pnas.88.18.8020
84. Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating. *J Biol Chem.* 1988;263: 6491–6494.
85. Shields S-K, Nicola C, Chakraborty C. Rho Guanosine 5'-Triphosphatases Differentially Regulate Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor-Dependent and -Independent Actions of IGF-II on Human Trophoblast Migration. *Endocrinology.* 2007;148: 4906–4917. doi:10.1210/en.2007-0476
86. Chu C-H, Tzang B-S, Chen L-M, Liu C-J, Tsai F-J, Tsai C-H, et al. Activation of insulin-like growth factor II receptor induces mitochondrial-dependent apoptosis through G(α)q and downstream calcineurin signaling in myocardial cells. *Endocrinology.* 2009;150: 2723–2731. doi:10.1210/en.2008-0975
87. Anitei M, Chenna R, Czupalla C, Esner M, Christ S, Lenhard S, et al. A high-throughput siRNA screen identifies genes that regulate mannose 6-phosphate receptor trafficking. *England;* 2014. doi:10.1242/jcs.159608

88. Amritraj A, Hawkes C, Phinney AL, Mount HT, Scott CD, Westaway D, et al. Altered levels and distribution of IGF-II/M6P receptor and lysosomal enzymes in mutant APP and APP + PS1 transgenic mouse brains. *Neurobiol Aging*. 2009;30: 54–70. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.004
89. Wang Y, Buggia-Prévoit V, Zavorka ME, Bleackley RC, MacDonald RG, Thinakaran G, et al. Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor II Receptor Increases β -Amyloid Production and Affects Cell Viability. *Mol Cell Biol*. 2015;35: 2368–2384. doi:10.1128/MCB.01338-14
90. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*. 2003;70: 1–32. doi:10.1016/s0301-0082(03)00089-3
91. Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Gührs K-H, Than ME. Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107: 5381–5386. doi:10.1073/pnas.0911326107
92. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*. 2006;1: 5. doi:10.1186/1750-1326-1-5
93. Selkoe D, Kopan R. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2003;26: 565–597. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334
94. Porayette P, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Meethal SV, Atwood CS. Amyloid-beta precursor protein expression and modulation in human embryonic stem cells: a novel role for human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364: 522–527. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.021
95. Gao H, Sathishkumar KR, Yallampalli U, Balakrishnan M, Li X, Wu G, et al. Maternal protein restriction regulates IGF2 system in placental labyrinth. *Front Biosci Elite Ed*. 2012;4: 1434–1450. doi:10.2741/472
96. Sferruzzi-Perri AN, Sandovici I, Constancia M, Fowden AL. Placental phenotype and the insulin-like growth factors: resource allocation to fetal growth. *J Physiol*. 2017;595: 5057–5093. doi:10.1113/JP273330
97. Harris LK, Westwood M. Biology and significance of signalling pathways activated by IGF-II. *Growth Factors Chur Switz*. 2012;30: 1–12. doi:10.3109/08977194.2011.640325
98. Charnock JC, Dilworth MR, Aplin JD, Sibley CP, Westwood M, Crocker IP. The impact of a human IGF-II analog ([Leu27]IGF-II) on fetal growth in a mouse model of fetal growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310: E24-31. doi:10.1152/ajpendo.00379.2015
99. Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Standen P, Roberts CT. Maternal insulin-like growth factor-II promotes placental functional development via the type 2 IGF receptor in the guinea pig. *Placenta*. 2008;29: 347–355. doi:10.1016/j.placenta.2008.01.009

100. Costello M, Baxter RC, Scott CD. Regulation of soluble insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in human serum: measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84: 611–617. doi:10.1210/jcem.84.2.5488
101. Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Costello M, Scott C, Dunger D. Size at birth and cord blood levels of insulin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and the soluble. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85: 4266–4269. doi:10.1210/jcem.85.11.6998
102. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de Situación Nutricional ENSIN. In: Nutrición [Internet]. [cited 17 May 2020]. Available: <https://www.icbf.gov.co/bienestar/nutricion/encuesta-nacional-situacion-nutricional>
103. Blancas-Flores G, Almanza-P JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo, Rebeca, Cruz M. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2010;67: 88–97.
104. Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, Corvalan C, Uauy R, Herring S, et al. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4: 1025–1036. doi:10.1016/S2213-8587(16)30217-0
105. Chanprasertyothin S, Jongjaroenprasert W, Ongphiphadhanakul B. The association of soluble IGF2R and IGF2R gene polymorphism with type 2 diabetes. *J Diabetes Res.* 2015;2015: 216383. doi:10.1155/2015/216383
106. Caviedes L, Iñiguez G, Hidalgo P, Castro JJ, Castaño E, Llanos M, et al. Relationship between folate transporters expression in human placentas at term and birth weights. *Placenta.* 2016;38: 24–28. doi:10.1016/j.placenta.2015.12.007
107. Lazar I. Jr., Horvath-Lazar E., Lazar I. GelAnalyzer 19.1. Available: <http://www.gelanalyzer.com/index.html>
108. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001;25: 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
109. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55: 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
110. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3: 1125–1131. doi:10.1038/nprot.2008.75
111. Armant DR. Blastocysts don't go it alone. Extrinsic signals fine-tune the intrinsic developmental program of trophoblast cells. *Dev Biol.* 2005;280: 260–280. doi:10.1016/j.ydbio.2005.02.009

112. Anette Lindhard, Ursula Bentin-Ley, Vibeke Ravn, Henrik Islin, Thomas Hviid, Sven Rex, et al. Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation. *MODERN TRENDS*. 2002;78: 221–233. doi:[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03240-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03240-5)
113. Carter AM, Enders AC, Pijnenborg R. The role of invasive trophoblast in implantation and placentation of primates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370: 20140070. doi:[10.1098/rstb.2014.0070](https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0070)
114. Lala PK, Hamilton GS. Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. *Placenta*. 1996;17: 545–555. doi:[10.1016/s0143-4004\(96\)80071-3](https://doi.org/10.1016/s0143-4004(96)80071-3)
115. Umaña Pérez A., Novoa Herrán S., Castro JJ., Correa Sánchez A., Guevara V., López González D., et al. Role of the Insulin-like growth factor axis and the Transforming growth factor- β in the regulation of the placenta and the pathogenesis of Gestational Trophoblastic Diseases. *Med Res Arch*. En Prensa.
116. Barolo S, Posakony JW. Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev*. 2002;16: 1167–1181. doi:[10.1101/gad.976502](https://doi.org/10.1101/gad.976502)
117. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2: 489–501. doi:[10.1038/nrc839](https://doi.org/10.1038/nrc839)
118. Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1994;369: 418–420. doi:[10.1038/369418a0](https://doi.org/10.1038/369418a0)
119. Krauss G. *Intracellular Messenger Substances: “Second Messengers.”* 5th edition. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 5th edition. Germany; 2014. pp. 369–416.
120. Strauss JF 3rd, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N, Gafvels ME. The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta*. 1992;13: 389–403. doi:[10.1016/0143-4004\(92\)90047-w](https://doi.org/10.1016/0143-4004(92)90047-w)
121. Biondi C, Ferretti ME, Lunghi L, Medici S, Cervellati F, Pavan B, et al. cAMP efflux from human trophoblast cell lines: a role for multidrug resistance protein (MRP)1 transporter. *Mol Hum Reprod*. 2010;16: 481–491. doi:[10.1093/molehr/gaq023](https://doi.org/10.1093/molehr/gaq023)
122. Darashchonak N, Koepsell B, Bogdanova N, von Versen-Hoynck F. Adenosine A2B receptors induce proliferation, invasion and activation of cAMP response element binding protein (CREB) in trophoblast cells. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014;14: 2. doi:[10.1186/1471-2393-14-2](https://doi.org/10.1186/1471-2393-14-2)
123. Harris LK, Jones CJP, Aplin JD. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. II. extravillous trophoblast. *Placenta*. 2009;30: 299–304. doi:[10.1016/j.placenta.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.12.003)

124. Jackson EK, Dubey RK. Role of the extracellular cAMP-adenosine pathway in renal physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281: F597-612. doi:10.1152/ajprenal.2001.281.4.F597
125. Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 1996;135: 1633–1642. doi:10.1083/jcb.135.6.1633
126. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Hasan-Nejad H, Sakai K, Nagamatsu S, et al. Characterization of morphological and cytoskeletal changes in trophoblast cells induced by insulin-like growth factor-I. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87: 5751–5759. doi:10.1210/jc.2002-020550
127. Irving JA, Lala PK. Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF-beta, IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res.* 1995;217: 419–427. doi:10.1006/excr.1995.1105
128. Hills FA, Elder MG, Chard T, Sullivan MHF. Regulation of human villous trophoblast by insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding protein-1. *J Endocrinol.* 2004;183: 487–496. doi:10.1677/joe.1.05867
129. Burrows TD, King A, Loke YW. Trophoblast migration during human placental implantation. *Hum Reprod Update.* 1996;2: 307–321. doi:10.1093/humupd/2.4.307
130. Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK. Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86: 2484–2493. doi:10.1210/jcem.86.6.7532
131. Li T, Wei S, Fan C, Tang D, Luo D. Nesfatin-1 Promotes Proliferation, Migration and Invasion of HTR-8/SVneo Trophoblast Cells and Inhibits Oxidative Stress via Activation of PI3K/AKT/mTOR and AKT/GSK3 β Pathway. *Reprod Sci Thousand Oaks Calif.* 2021;28: 550–561. doi:10.1007/s43032-020-00324-1
132. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2004;2: 59. doi:10.1186/1477-7827-2-59
133. Han VK, Carter AM. Spatial and temporal patterns of expression of messenger RNA for insulin-like growth factors and their binding proteins in the placenta of man and laboratory animals. *Placenta.* 2000;21: 289–305. doi:10.1053/plac.1999.0498
134. Sánchez-Gómez M, Novoa-Herran SS. EL IGF-II ESTIMULA LA ACTIVIDAD DE MMP-9 Y MMP-2 EN UN MODELO DE TROFOBLASTO HUMANO. *Acta Biológica Colomb.* 2011;16: 121–132.

135. Espino Y Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Nuñez A, Medina-Bastidas D, Vadillo-Ortega F, Zaga-Clavellina V, et al. New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2017;18. doi:10.3390/ijms18071448
136. Chang M-H, Kuo W-W, Chen R-J, Lu M-C, Tsai F-J, Kuo W-H, et al. IGF-II/mannose 6-phosphate receptor activation induces metalloproteinase-9 matrix activity and increases plasminogen activator expression in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Mol Endocrinol.* 2008;41: 65–74. doi:10.1677/JME-08-0051
137. Pinzón M, Díaz L, Ortiz B, Umaña A, De Rodriguez S, Sanchez de Gomez M. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT POR EL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA TIPO II ESTIMULA LA EXPRESIÓN DEL mARN DE LA METALOPROTEINASA 9 EN CÉLULAS DE CORIOCARCINOMA. *Rev Colomb Quím Vol 38 Núm 3 2009.* 2009. Available: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/13490>
138. de Alboran IM, O'Hagan RC, Gartner F, Malynn B, Davidson L, Rickert R, et al. Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity.* 2001;14: 45–55.
139. Rivera VM, Greenberg ME. Growth factor-induced gene expression: the ups and downs of c-fos regulation. *New Biol.* 1990;2: 751–758.
140. Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. *Placenta.* 2017;54: 10–16. doi:10.1016/j.placenta.2016.12.008
141. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans.* 2017;45: 1105–1115. doi:10.1042/BST20160474
142. Dennis PA, Rifkin DB. Cellular activation of latent transforming growth factor beta requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88: 580–584. doi:10.1073/pnas.88.2.580
143. Saben J, Lindsey F, Zhong Y, Thakali K, Badger TM, Andres A, et al. Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta.* 2014;35: 171–177. doi:10.1016/j.placenta.2014.01.003
144. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta.* 2008;29: 274–281. doi:10.1016/j.placenta.2007.12.010
145. Howell KR, Powell TL. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reprod Camb Engl.* 2017;153: R97–R108. doi:10.1530/REP-16-0495
146. Zhu MJ, Du M, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. *Placenta.* 2010;31: 387–391. doi:10.1016/j.placenta.2010.02.002

147. Zulet MA, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez JA. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexos de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr Hosp.* 2007;22: 511–527.
148. Samad F, Yamamoto K, Pandey M, Loskutoff DJ. Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice. *Mol Med Camb Mass.* 1997;3: 37–48.
149. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab.* 2011;14: 67–79. doi:10.1016/j.cmet.2011.04.013
150. Zunke F, Rose-John S. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017;1864: 2059–2070. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.001
151. Liu C, Xu P, Lamouille S, Xu J, Derynck R. TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Mol Cell.* 2009;35: 26–36. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.018
152. Vicikova K, Petrovcikova E, Manka P, Drach J, Stockinger H, Leksa V. Serum and urinary levels of CD222 in cancer: origin and diagnostic value. *Neoplasma.* 2018;65: 762–768. doi:10.4149/neo_2018_171203N792
153. Liping Xuan, Jun Ma, Mei Yu, Zhenxing Yang, Yongmin Huang, Caiyun Guo, et al. Insulin-like growth factor 2 promotes adipocyte proliferation, differentiation and lipid deposition in obese type 2 diabetes. *J Transl Sci.* 2019;6. doi:10.15761/JTS.1000362
154. Alfares MN, Perks CM, Hamilton-Shield JP, Holly JMP. Insulin-like growth factor-II in adipocyte regulation: depot-specific actions suggest a potential role limiting excess visceral adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;315: E1098–E1107. doi:10.1152/ajpendo.00409.2017
155. Grimm MOW, Kuchenbecker J, Grösgen S, Burg VK, Hundsdörfer B, Rothhaar TL, et al. Docosahexaenoic acid reduces amyloid beta production via multiple pleiotropic mechanisms. *J Biol Chem.* 2011;286: 14028–14039. doi:10.1074/jbc.M110.182329
156. Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta.* 2003;24: 803–812. doi:10.1016/s0143-4004(03)00080-8
157. Morrison JL, Duffield JA, Muhlhausler BS, Gentili S, McMillen IC. Fetal growth restriction, catch-up growth and the early origins of insulin resistance and visceral obesity. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2010;25: 669–677. doi:10.1007/s00467-009-1407-3
158. Catalano PM. Obesity and pregnancy--the propagation of a viscous cycle? *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88: 3505–3506. doi:10.1210/jc.2003-031046
159. O'Reilly JR, Reynolds RM. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78: 9–16. doi:10.1111/cen.12055

160. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 2004;117: 4619–4628. doi:10.1242/jcs.01481
161. Sevetson BR, Kong X, Lawrence JC. Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90: 10305. doi:10.1073/pnas.90.21.10305

Financiación

La tesis de doctorado se desarrolló en el Grupo de Investigación en Hormonas, Departamento de Química de la Facultad de Ciencias, enmarcada dentro del proyecto “*Caracterización de la vía de señalización intracelular mediada por IGF-IIIR en trofoblasto humano*” con código Hermes 39172 y financiada por el Ministerio de Ciencias, Tecnología e Innovación, COLCIENCIAS, Convocatoria 727 de 2015 Doctorados Nacionales.

Los resultados de este trabajo se han divulgado en los siguientes eventos:

Guevara V., **Castro JJ.**, Umaña A. “*IGF2 induce la expresión de genes invasivos y proliferativos a través del receptor IGF2R en trofoblasto humano*”. I Simposio Universitario de Investigación en Química, modalidad oral, Bogotá, Colombia, 3-4 dic., 2020.

Arcila S., Olea F., **Castro JJ.**, Sánchez Gómez M., Umaña A. “*Construction of a phosphoproteome signaling network generated by M6P/IGF2R in a trophoblast cell model*”. VIII Symposium Mexican Proteomics Society, modalidad poster, Acapulco, México, 20-23 oct., 2019.

Castro JJ., Olea F., Umaña A. “*Activación de ERK ½ en respuesta a IGF-II es mediado por el receptor IGF-IIIR en trofoblasto humano*”. III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular (C2B2), modalidad poster, Bogotá, Colombia, 1-3 nov., 2018.

Castro JJ., Sánchez-Gómez M., Umaña A. “*IGF-II induce la expresión de c-myc y stat5b a través del receptor IGF-IIIR en trofoblasto humano*”. LII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, modalidad oral, Cali, Colombia, 9-13 oct., 2017.

Se encuentra en evaluación para proceso de publicación los manuscritos:

IGF2 receptor is involved in the inflammatory processes associated with obesity in human placentas at term

Juan José Castro^a, Adriana Umaña-Pérez^a, Paola Cassanello^b, Erika Castaño^c, Ana María Ronco^c

^aDepartment of Chemistry, Hormone Research Group, Faculty of Sciences, National University of Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

^bLaboratory of Programming and Perinatal Epigenetics, Department of Obstetrics and Department of Neonatology, School of Medicine, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

^cLaboratory of Nutrition and Metabolic Regulation, Human nutrition Unit; Institute of Nutrition and Food Technology, Doctor Fernando Monckeberg Barros (INTA), University of Chile, Santiago, Chile.

IGF2R promotes adhesion, migration and invasion in human trophoblastic cells

Juan José Castro^a, Andrés F. Correa-Sánchez^a, Adriana Umaña-Pérez^a

^aDepartment of Chemistry, Hormone Research Group, Faculty of Sciences, National University of Colombia, Bogotá D.C., Colombia.