

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE hCG SOBRE LA REGULACIÓN DE MOLÉCULAS  
ANGIOGÉNICAS EN CÉLULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL  
HUMANO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**ANA BELÉN JARA CAMPOS**

**TEMUCO – CHILE**

**2013**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE hCG SOBRE LA REGULACIÓN DE MOLÉCULAS  
ANGIOGÉNICAS EN CÉLULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL  
HUMANO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**ANA BELÉN JARA CAMPOS**  
**PROFESOR GUIA: ALEJANDRO TAPIA PIZARRO**

TEMUCO – CHILE

2013

“EFECTO DE hCG SOBRE LA REGULACIÓN DE MOLÉCULAS ANGIOGÉNICAS EN  
CÉLULAS DE ESTROMA ENDOMETRIAL HUMANO”

PROFESOR GUIA

---

: Dr. Alejandro Tapia Pizarro

Laboratorio de Endocrinología Molecular Reproductiva

Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI)

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROFESOR CONSEJERO

---

: Dr. Raúl Sánchez

Directivo-Vicerrectoría Investigación y Postgrado

Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS : \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Manifestaré mis agradecimientos a todos quienes participaron de forma directa o indirectamente en este proceso de formación académica, quienes a través de su sincera compañía lograron apoyarme en cada momento.

Quiero agradecer principalmente a mi familia, por estar cada día y cada hora alentándome a seguir en esta carrera de aprendizaje. Primero a mis padres, quienes con su infinito amor y por consiguiente gran esfuerzo, han logrado que todos nosotros, mis hermanos y yo, hayamos finalizado esta etapa de nuestras vidas de la mejor manera, por alentarnos a estudiar, aunque nuestras aspiraciones cambiaran constantemente. Gracias Papá y Mamá por hacernos y creernos los más inteligentes. Agradecer a mis hermanos Jorge, Mauricio y Carolina, por mostrarme que el camino del éxito llega en cada una de nuestras carreras profesionales con esfuerzo y dedicación, aun no sabiendo que es lo que nos espera la vida. Por ayudarme en cada duda y cada respuesta que quizás no era la que esperaba, pero que por consiguiente, permitió que buscara las herramientas para encontrar las respuestas que necesitaba. De entre ellos, quiero agradecer enormemente a mi hermana Carolina, quien fue un apoyo importantísimo en este año de práctica y de preparación de esta tesis, al permitirme desarrollarla en otra ciudad recibíendome en su hogar, y que a pesar de todas las dificultades siempre me alentó a seguir creciendo.

Quiero agradecer a mis amigos de siempre y mis compañeros, coreutas y de carrera quienes siempre estuvieron presentes en este largo proceso. De entre ellos especialmente a mi compañera Valeria Riffo, con quien pudimos afrontar muchísimas dudas vocacionales juntas, y que sin embargo, fuimos el apoyo de una y de otra en todo este proceso universitario, animándonos a superar cada obstáculo que encontrásemos.

Quiero agradecer enormemente a mis compañeros del IDIMI, quienes en todo momento fueron un gigante apoyo en mi estadía en Santiago, ayudándome con dudas o quehaceres en el mismo trabajo de investigación. Así pues, agradezco a Felipe Argandoña por cuidarme en todo momento y enseñarme gran parte de las técnicas que aprendí en todo este proceso.

Agradecer a mi profesor tutor, el Dr. Alejandro Tapia, que sé que con mucha paciencia, atención y comprensión me guió en todo este proceso académico. Fue con quien más pude apreciar las ganas y el entusiasmo de hacer investigación para contribuir a la ciencia, al desafiar la ignorancia para entender y comprender procesos que pueden ser desconocidos, pero que de a poco pueden ser dilucidados. Y junto a esto, vi a través de él una vez más que cuando se hace lo que se gusta, el éxito es más apreciado por uno mismo.

Por último, agradezco infinitamente a Dios por permitirme llegar a término en este proceso, por entregarme una familia que me apoyó en todo momento, por colocar en mi camino a hermosas personas que no tan solo hicieron que avanzara y creciera en lo académico, sino que también aprendiera la carrera más difícil que es vivir la vida, que en estos últimos meses se tornaron más complejos, pero que con la ayuda de cada persona logré ponerme en pie y seguir adelante. Y sobre todo por darme, en su infinita misericordia, la oportunidad de estudiar y sacar un título Profesional.

A todas las personas que estuvieron y que vieron un potencial en mi, muchas gracias.

## INDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1	Endometrio	3
2.1.1	Epitelio Endometrial	3
2.1.2	Estroma Endometrial	4
2.1.3	Vasculatura Endometrial	4
2.2	Ciclo Menstrual	5
2.2.1	Fase Proliferativa	6
2.2.2	Fase Secretora	6
2.3	Implantación	7
2.3.1	Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)	8
2.4	Vasculogénesis y Angiogénesis	9
2.4.1	Tipos de Angiogénesis	9
2.4.2	Factores Angiogénicos	10
2.5	Relación Angiogénesis – hCG	10
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b>	13
<b>4</b>	<b>HIPOTESIS</b>	14
<b>5</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	14
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	14
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	15
7.1	Ensayo de estimulación con hCG	15
7.1.1	Obtención de ESC	15
7.1.2	Pre-decidualización in vitro de ESC	16
7.1.3	Estímulo con hCG	16
7.1.4	Real Time – PCR y medición de Prolactina	16
7.1.4.1	Extracción de ARN	16
7.1.4.2	Síntesis de ADN complementario	17
7.1.4.3	PCR en tiempo real	18

7.2	Ensayos de Angiogénesis	18
7.2.1	Medición de viabilidad de células Eahy926 en presencia de medios condicionados pre-decidualizados	19
7.2.2	Human Angiogenesis Array	20
7.3	Análisis Estadísticos	20
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>21</b>
8.1	Obtención de células pre decidualizadas por estímulo de 8-Br cAMP con MPA.	21
8.2	Viabilidad de células Eahy926 en presencia de 8-Br cAMP con MPA	22
8.3	Efecto de los medios condicionados de células ESC y dESC tratadas con hCG sobre el potencial angiogénico de células endoteliales Eahy926	23
8.4	Análisis de la regulación de moléculas angiogénicas	27
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>39</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>41</b>

## RESUMEN

El establecimiento de un embarazo requiere una adecuada comunicación embrio-materna mediante la señalización recíproca entre el trofoblasto y el estroma endometrial materno. Este proceso está mediado por la acción de diversas hormonas y citoquinas que están presentes en la interfase materno-fetal. La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), responsable de mantener el cuerpo lúteo, también ejerce efectos sobre el endometrio y estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis.

Durante la fase secretora del endometrio, ocurre una diferenciación de las células estromales, proceso denominado decidualización. Esta diferenciación induce cambios morfológicos y bioquímicos en las células del estroma endometrial, lo cual es crucial para el proceso de implantación y placentación temprana. La presente tesis estudia la modulación de la secreción de moléculas angiogénicas en células de estroma endometrial humano pre decidualizadas (dESC) y no pre-decidualizadas (ESC) por hCG. Para ello se estimularon las células con distintas dosis de hCG (1-100 UI/mL) por 72 horas y luego se estudió su medio condicionado (MC). Se evaluó el potencial angiogénico de los MC utilizando un ensayo *in vitro* con células derivadas de endotelio y se analizó la secreción de moléculas angiogénicas a través de un ELISA-array. Los resultados obtenidos con los ensayos de angiogénesis muestran que hCG aumenta los potenciales angiogénicos de forma dosis-dependiente en los MCs de ESC y dESC. El ensayo ELISA-array mostró la presencia de 19 moléculas relacionadas con la angiogénesis en los MCs de ESC y dESC con efectos tanto pro como anti angiogénicos.

Debido a que hCG moduló la expresión de moléculas angiogénicas, esta hormona podría tener un papel regulador en los mecanismos de control de la angiogénesis en la interfase materno-fetal, enfatizando su participación en la regulación del proceso de implantación embrionaria y placentación temprana.



## SUMMARY

The establishment of a successful pregnancy requires proper embryo-maternal communication through reciprocal signaling between the trophoblast and maternal endometrial stroma. This process is mediated by the several hormones and cytokines which are present in the maternal-fetal interface. The hormone human chorionic gonadotropin (hCG), responsible for maintaining the corpus luteum, also exerts effects in the endometrium and stimulates the formation of new blood vessels, a process known as angiogenesis.

During the secretory phase of the endometrium, a differentiation process of stromal cells take place, called decidualization. This differentiation induces morphological and biochemical changes in endometrial stromal cells, which is crucial to the processes of implantation and early placentation. This thesis studies the modulatory effects of hCG on the secretion of angiogenic molecules in human endometrial stromal cells pre decidualized (dESC) and no pre-decidualized (ESC). ESC and dESC were stimulated with different doses of hCG (1-100 IU / ml) for 72 hours and their conditioned medium (MC) was studied. The angiogenic potential from MCs was assessed through an in vitro assay using endothelium-derived cell. In addition it was analyzed the secretion of angiogenic molecules in MCs through an ELISA-array. The results obtained with angiogenesis assays showed that in the MCs of ESC and dESC, hCG increased the angiogenic potential in a dose-dependent manner. The ELISA-array 19 showed the presence of angiogenesis-related molecules in the ESC and ESC MCs with modulatory effects on both pro and anti-angiogenic molecules.

Because hCG modulated the expression angiogenic molecules, it is suggested that this hormone may have a regulatory role in the control mechanisms of angiogenesis at the maternal-fetal interface during the embryo implantation process and early placentation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El embarazo se inicia con una implantación exitosa del blastocisto en el endometrio materno. Para que ocurra este proceso, se debe establecer un dialogo correcto entre el blastocisto y la madre, lo cual es esencial para regular las adaptaciones fisiológicas necesarias para que el embarazo transcurra adecuadamente y pueda llegar a término sin complicaciones. El endometrio experimenta cambios durante el ciclo menstrual que facilitan la implantación del blastocisto y posterior invasión del trofoblasto, cambiando la morfología y función de sus células en respuesta a las hormonas esteroidales ováricas y al conjunto de moléculas que se secretan en la interfase materno-fetal. Dentro de las moléculas de origen embrionario que están presentes tempranamente en esta interfase se encuentra la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), comienza a ser secretada por el embrión a partir del estadio de 2 células. La secreción de esta hormona, además de rescatar cuerpo lúteo de la madre al comienzo del embarazo, podría estar involucrada en mecanismos autocrinos/paracrinos que regulen la función del trofoblasto. La presencia de los receptores de LH/hCG está virtualmente en todos los tejidos adyacentes al embrión como las trompas de Falopio, el corion, el amnios, el endometrio y miometrio, por lo cual se le han atribuido otras funciones de las cuales se destaca su participación directa o indirecta con el proceso de angiogénesis, que comprende la formación de nuevos vasos a partir de los pre-existentes. Este proceso, ocurre principalmente en adultos en la reparación de heridas y se presenta durante toda la vida reproductiva de la mujer en el útero, ya que está íntimamente relacionado con el remodelamiento del endometrio razón por la cual se encuentra presente también durante el embarazo.

hCG estaría involucrada en la secreción de moléculas angiogénicas de manera indirecta o directa, teniendo algún efecto inmediato sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos o a través del estímulo en las células epiteliales del endometrio. Sin embargo, el mayor porcentaje de la masa celular endometrial comprende a células estromales (ESC), de las cuales existe menor información respecto a la relación hCG – ESC- Angiogénesis. En estas células la decidualización aumenta la secreción de moléculas relacionadas con la angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas.

El presente estudio analizará el efecto de la hormona hCG, en células estromales del endometrio en fase secretora y en su estado decidual, sobre la modulación de procesos de angiogénesis, analizando los factores angiogénicos que estas células puedan secretar en respuesta a hCG y evaluando la capacidad de estos factores angiogénicos para inducir la formación de estructuras tipo capilares en ensayos *in vitro* de angiogénesis.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Endometrio

El útero humano es un órgano cuya función principal es proveer un sustrato adecuado para la implantación del embrión, asegurando su crecimiento y desarrollo durante el embarazo. Histológicamente está formado por 3 capas celulares: *perimetrio*, *miometrio* y *endometrio*. Este último es la mucosa que recubre la cavidad interna del útero, y consiste en un epitelio de revestimiento, glándulas tubulares y tejido conjuntivo (Sadler y Langman, 2001; Welsch y Sobotta, 2009). Es un tejido inmunológicamente privilegiado el cual presenta alteraciones morfológicas y bioquímicas durante cada ciclo menstrual en sus glándulas, estroma y vasos sanguíneos. Estos cambios permiten la implantación del embrión durante un periodo determinado del ciclo endometrial denominado, llamado *ventana de implantación*.

Estructuralmente, el endometrio se compone de 2 capas que difieren en su funcionalidad: Capa Funcional y Capa Basal. La primera cambia constantemente durante el ciclo menstrual, aumentando de tamaño y volumen por la acción de las hormonas esteroideas ováricas. En ella encontramos el epitelio endometrial, estroma endometrial y la vasculatura. La capa basal actúa principalmente renovando la capa funcional cuando ésta se descama durante la menstruación (Tabibzadeh, 1998).

#### 2.1.1 Epitelio Endometrial

El epitelio endometrial es una monocapa de células tipo cuboidal que reviste el interior de la cavidad uterina. Actúa como una barrera protectora contra patógenos y es el primer mediador en el proceso de implantación por ser la primera capa de contacto con el embrión.

Es posible encontrar 2 tipos de epitelio: luminal y el glandular. El epitelio luminal corresponde a células cuboidales que a lo largo del ciclo endometrial pasan por una transformación de membrana plasmática que implica cambios estructurales provocados por acción del estrógeno, donde se aprecian microvellosidades largas y uniones intercelulares estrechas (Quinn y Casper, 2009).

El epitelio glandular posee un importante rol en la reproducción por los productos que secretan las células hacia el lumen uterino. Hacia la fase secretora del ciclo endometrial, el epitelio glandular aumenta su tamaño y secreta una serie de moléculas que promueven la implantación del blastocisto (Mahfoudi *et al.*, 1991; Lockwood *et al.*, 2009).

### **2.1.2 Estroma Endometrial**

El estroma endometrial es la masa celular del endometrio que se encuentra en mayor proporción y está compuesto por tejido conectivo (células de tipo fibroblastos y matriz extracelular). Las células estromales pueden promover el desarrollo y diferenciación del epitelio suprayacente durante la fase lútea a través de la *decidualización* (Arnold *et al.*, 2001), proceso de diferenciación de las células de estroma endometrial (ESC) que ocurre dentro de la fase secretora del ciclo menstrual y que involucra cambios morfológicos y fisiológicos activados por la acción de progesterona, lo que permite que el endometrio se vuelva un tejido vascular receptivo para la implantación del blastocisto (Lockwood *et al.*, 2009; Gellersen *et al.*, 2010). Es importante señalar, que en humanos este proceso es independiente del blastocisto, pero es necesario que ocurra la implantación para que las células deciduales se mantengan durante el embarazo.

Uno de los cambios más evidentes que ocurren durante la decidualización es el cambio fenotípico que experimenta la célula de estroma endometrial (ESC), que pasa de ser un fibroblasto elongado a una célula decidual tipo epitelial secretora. Este proceso ocurre por acción de progesterona ( $P_4$ ), que en la fase secretora experimenta un aumento en sangre materna. Estas células deciduales tipo epiteliales secretan al medio ciertas hormonas características, como Prolactina (PRL) y la proteína ligante del-factor de crecimiento tipo insulina -1 (IGFBP-1), por lo que son considerados marcadores de decidualización (Saleh *et al.*, 2011).

### **2.1.3 Vasculatura Endometrial**

El útero humano posee una compleja vasculatura compuesta por una red arterial que comienza en el miometrio uterino a partir de la arteria uterina que se subdivide en las arterias arcuatas que penetran el miometrio y pasan a llamarse arterias radiales. Estas últimas irrigan el endometrio, subdividiéndose en arterias basales (aquellas que irrigan el tercio basal del endometrio) y arterias

espirales (las que irrigan los dos tercios superficiales del endometrio) (Llusiá, J.B., 1997; Tortora y Derrickson, 2006). Estas arterias radiales pasan por cambios cíclicos durante el transcurso del período menstrual, experimentando una regeneración constante.

## **2.2 Ciclo Menstrual**

Durante el ciclo menstrual, el endometrio experimenta cambios cíclicos estructurales y funcionales producidos por acción de las hormonas esteroidales ováricas. Este ciclo es descrito como el periodo en que ocurre la maduración de un único ovocito y del folículo que lo rodea, la liberación de este ovocito por parte del ovario, la diferenciación del folículo a cuerpo lúteo secretor y la degeneración de este último. Durante estos eventos ocurre una variación cíclica en la secreción de hormonas esteroidales, las cuales dirigen la proliferación, maduración y la eventual descamación del endometrio; en ciclos no concepionales (Becker, 2001). Los cambios que ocurren tanto en el ovario como en el endometrio durante el ciclo menstrual se conocen como *ciclo ovárico* y *ciclo endometrial respectivamente*. El ciclo ovárico ocurre principalmente dirigido por la acción de dos hormonas gonadotrópicas: Hormona Folículo Estimulante FSH y la hormona luteinizante LH. Por otro lado el ciclo endometrial es controlado por estrógenos y progesterona, los cuales a su vez están íntimamente relacionados con las hormonas gonadotrópicas, siendo estas últimas las desencadenantes de las primeras (Adashi *et al.*, 1995; Sadler y Langman, 2001; Bajo, José Manuel, 2009). El ciclo endometrial se compone de la fase proliferativa y de la fase secretora, diferenciándose por la funcionalidad y fisiología del endometrio.

### **2.2.1 Fase Proliferativa**

Esta fase está dirigida por los estrógenos ováricos, los que inducen un aumento en la actividad mitótica de las células endometriales, siendo más evidente hacia el día 5 del ciclo periodo dentro del cual las glándulas endometriales tienden a ser rectas, tortuosas y el tejido se torna congestivo.

El estroma se encuentra en un comienzo poco vascularizado, teniendo un aspecto denso y compacto. Hacia el décimo día del ciclo, posee un aspecto más edematoso y las células se observan con límites poco nítidos, con núcleos más densos y más largos que anchos. Los cambios que se producen en el endometrio se deben al aumento de las actividades mitótica y al aumento de la síntesis de ADN nuclear y ARN citoplasmático. En cuanto a los niveles hormonales, el estrógeno aumenta a mitad del ciclo, previo a la ovulación, (Sadler y Langman, 2001; Bajo, J., 2009).

### **2.2.2 Fase Secretora**

Esta fase está regida principalmente por la progesterona que es secretada por el cuerpo lúteo ovárico. En esta etapa, el endometrio deja de proliferar debido a que existe un cese de mitosis y síntesis de ADN (Bajo, J., 2009). El endometrio alcanza su máximo espesor debido a la intensa secreción glandular de moco y polisacáridos que preparan al útero para recibir al blastocisto (Belso *et al.*, 2006), la cual da origen al nombre de esta fase endometrial.

Las células del estroma varían en su forma y tamaño del núcleo, sin mitosis apreciables. En el citoplasma de las células hay acumulación de glicógeno y el tejido se torna más edematoso. La morfología de las células cambia de un fenotipo fusado a poligonal, hasta tener un aspecto epiteloide (Rodríguez, 2005).

### 2.3 Implantación

Cuando existe fecundación del ovocito, el cigoto pasa por un periodo de segmentación que se caracteriza por las múltiples divisiones celulares que ocurren para alcanzar entre el cuarto a sexto día el estadio de blastocisto: masa celular esférica que posee 3 compartimientos conocidos como trofoectodermo, macizo celular interno y blastocele (Sadler y Langman, 2001). Necesariamente para que ocurra la implantación del embrión, este último debe ser competente y por otro lado el endometrio debe adquirir características bioquímicas y funcionales que permitan el establecimiento del embarazo. Estas características que adquiere el endometrio se presentan durante un periodo restringido de tiempo durante la fase secretora del ciclo menstrual conocido como la ventana de implantación (Navot *et al.*, 1991; Lessey, 2000).

El proceso de implantación embrionaria se ha dividido en tres fases: aposición, adhesión e invasión (Urbina y Biber, 2008). En la fase de aposición el polo embrionario donde se encuentra el macizo celular interno se orienta hacia el epitelio endometrial, el cual posee proyecciones apicales, (Pinópodos) formadas por la acción de la progesterona. En la fase de adhesión, los pinópodos se unen a las células del trofoectodermo cercanas al macizo celular interno mediante moléculas de adhesión como L-Selectina (Roura y Rodríguez, 2007). Por último en la fase de invasión cercana al octavo día, el blastocisto está parcialmente incluido en el estroma endometrial y los vasos uterinos serán invadidos, incluso reemplazados, por células embrionarias (Norwitz *et al.*, 2001). Ya en esta etapa el trofoblasto se ha diferenciado en dos capas: citotrofoblasto (interna) que comprende células mononucleadas y el sincitiotrofoblasto (externa) que posee células multinucleadas sin límites celulares muy definidos que secretan enzimas proteolíticas que permiten invadir el endometrio uterino (Rohen y Drecoll, 2007).

Para que todo este ocurra es necesario el dialogo entre el endometrio y el embrión a través de una compleja red de señales químicas entre ambos que aún no ha sido completamente dilucidada (Cole, 2012). Sin embargo, se sabe que uno de los mediadores involucrados en esta interacción es la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), una señal temprana y específica producida por el embrión incluso desde antes de implantarse



### 2.3.1 Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG)

La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica de la familia de hormonas folículo estimulante FSH, LH y TSH. Posee 244 aminoácidos formada por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de las cuales la subunidad  $\alpha$  es común para todos los miembros de esta familia, codificada por un mismo gen, y la subunidad  $\beta$  es específica para cada hormona proviniendo de un conjunto de genes (Cole, 2010; Norris *et al.*, 2011). El sincitiotrofoblasto, sintetiza y secreta hCG durante la placentación (Lunghi *et al.*, 2007) y aunque los niveles de esta hormona pueden ser detectados en la sangre materna cerca del periodo de implantación (8-10 días post fecundación) (Cole, 2009), se ha sugerido su secreción se inicia mucho antes del contacto entre el blastocisto y el endometrio (Lohstroh *et al.*, 2006). El receptor de hCG ha sido detectado en el endometrio humano, con una máxima expresión durante la fase secretora del ciclo. Luego de la implantación, la hCG es producida por las células del sincitiotrofoblasto del embrión y su función clásicamente descrita es actuar sobre el cuerpo lúteo para prevenir la luteolisis y favorecer la producción de progesterona (Keay *et al.*, 2004) lo que es esencial para evitar el desprendimiento del endometrio como ocurre tras un ciclo no concepcional durante la menstruación (Lunghi *et al.*, 2007; Cole, 2009). No obstante, tan pronto el blastocisto se acerca a la cavidad uterina se inicia una conversación cruzada entre ambos, pudiendo ejercer una serie de funciones locales que presumiblemente facilitarían la implantación. Sin embargo, en los últimos años se ha establecido que la producción de progesterona no es la única función de esta hormona, ya que tendría una participación importante en la placentación, en el útero y durante el desarrollo del feto durante el embarazo. Además de que cada tipo de hCG encontradas, (hCG hiperglicosilada, hCG  $\alpha$ , hCG $\beta$ , hCG nicked, hCG con pérdida de  $\beta$ CTP, entre otras) tendrían distintas implicancias en cada proceso (Saavedra *et al.*, 2004; Cole, 2010). Se ha planteado que hCG tendría una función estimuladora de la angiogénesis placentaria, influenciando directamente este proceso a través de su receptor LH/hCG en células vasculares o indirectamente incrementando la producción de factores pro-angiogénicos (Herr *et al.*, 2007).

## **2.4 Vasculogénesis y Angiogénesis**

La formación y regeneración de vasos sanguíneos está relacionada con dos procesos fisiológicos denominados vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis corresponde a la formación de vasos sanguíneos desde células precursoras que se diferencian en células endoteliales para llegar a formar una nueva red vascular (Plaisier, 2011). Mientras tanto la angiogénesis se conoce como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes (Zygmunt *et al.*, 2003). Donde la vasculogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario, mientras que la angiogénesis ocurre durante toda la vida de un ser vivo.

### **2.4.1 Tipos de angiogénesis**

Este proceso ocurre en dos grandes ramas. La primera de ellas es una angiogénesis *tipo fisiológica*. Esta Angiogénesis ocurre en la formación de la placenta, los procesos de crecimiento y diferenciación de los tejidos, y también participa en la reparación de fracturas, cicatrización de heridas, y la regeneración del hígado, además de estar incluida durante todo el ciclo fértil de la mujer en cada ciclo menstrual al regenerarse la vasculatura del endometrio (Kajdaniuk *et al.*, 2011). La segunda es la angiogénesis *tipo patológica* la cual se presenta más comúnmente en las enfermedades isquémicas, inflamatorias y neoplásicas, teniendo gran relevancia en la formación de tumores y cáncer (Wong *et al.*, 2009).

Los mecanismos por los cuales ambos tipos de angiogénesis se producen se ubican en tres categorías: *Ramificación (Sprouting)*, *Intususpección (Intussuspection)* y *Elongación*. La primera es la más estudiada y comprende la proliferación de células endoteliales vasculares a través de la degradación de la matriz extracelular. La segunda se produce por la adición de tabiques celulares dentro de los vasos ya establecidos y la *Elongación* es el crecimiento por proliferación de las células endoteliales vasculares (Wong *et al.*, 2009).

En el ciclo menstrual, se ha planteado que la angiogénesis ocurriría a través de una vía no clásica, a través del *No Sprouting* o por *Elongación* (Gargett y Rogers, 2001).

## **2.4.2 Factores Angiogénicos**

El proceso de angiogénesis está regulado por moléculas que activan o inhiben el proceso conocidos como Factores Angiogénicos. Aquellos que lo promueven se denominan factores Pro-angiogénicos, siendo el más estudiado el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés Vascular Endothelial Growth Factor). También encontramos al factor de crecimiento de fibrinógeno (FGF), Angiopoyetinas (Ang-1,-2), Interleucina 8 (IL-8), Factor de Crecimiento Placentario (PIGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), entre muchas otras (Kajdaniuk *et al.*, 2011). Estos factores de crecimiento aumentan la permeabilidad de los vasos, la degradación proteolítica de la matriz extra celular (lámina basal y reticular) por proteasas específicas (colagenasas y activadores del plasminógeno), y con ello inducen la proliferación de las células endoteliales. El proceso se completa con la migración quimiotáctica de las células endoteliales y la invasión de la MEC, la formación de un lumen y la maduración funcional del endotelio (reclutamiento de pericitos y células de músculo liso) (Zygmunt *et al.*, 2003).

Sin embargo, así como también existen los factores pro-angiogénicos, también encontramos inhibidores de la angiogénesis. De entre ellos se destacan la angiostatina y trombospondina, los cuales inhiben la proliferación de las células endoteliales por distintos mecanismos. (Zygmunt *et al.*, 2003).

## **2.5 Relación Angiogenesis-hCG**

hCG tendría otras funciones a parte de la mantención del cuerpo lúteo durante el embarazo, las cuales se relacionarían con el proceso de angiogenesis.

Durante el embarazo, la madre se prepara para responder a las demandas del embrión partiendo por cambios locales y sistémicos para recibir al blastocisto. Las adaptaciones fisiológicas locales que se observan en ella comprenden un ambiente uterino apto para que la implantación ocurra fácilmente, razón por lo cual cambios como la decidualización y el remodelamiento vascular se hacen necesarios (Plaisier, 2011). En el endometrio encontramos que las células estromales pasan por el proceso de decidualización, el cual entregará una variedad de funciones a la célula para

poder resistir el estrés oxidativo al cual se someterán una vez ocurra la implantación, además de otorgar la capacidad de producir factores de crecimiento y citocinas que permitirán sostener el desarrollo embrionario y además regular la respuesta inmune materna (Salamonsen *et al.*, 2003; Visse y Nagase, 2003) ayudando a restringir la capacidad invasiva del trofoblasto en el endometrio (Blois *et al.*, 2011; Plaisier, 2011).

Dado que durante el embarazo las células deciduales se mantienen en este estado, se ha sugerido que el remodelamiento vascular uterino es mediado a través de la decidua (Plaisier, 2011). Las diferencias entre el endometrio secretor y el endometrio decidual están dadas en parte por los distintos patrones vasculares que han sido observados en diferentes estudios. El endometrio secretor contiene más vasos sanguíneos caracterizados por ser pequeños, mientras que en el endometrio decidual se observa menos vasos sanguíneos pero con una estructura más larga, principalmente durante el primer trimestre de embarazo. Luego declina la densidad de los mismos a medida que se avanzan en las semanas a favor de un incremento en la superficie luminal del endometrio (Plaisier *et al.*, 2007) lo que puede deberse a las mayores demandas nutricionales del embrión a medida que transcurre el tiempo (Gibbons y Dzau, 1994).

Se ha sugerido que el blastocisto secreta varios factores que facilitan este diálogo madre/embrión de entre los cuales la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) es una de las señales hormonales más tempranas derivadas del blastocisto. De hecho, hCG es transcrita por el embrión desde el estado de 2 células (Jurisicova *et al.*, 1999). Siendo esta hormona la primera señal cuantificable de un blastocisto, en sangre materna se sugiere que el embrión a través de hCG induce cambios para favorecer la vasodilatación, aumento de permeabilidad y el desarrollo, junto a la maduración, de los vasos sanguíneos en el endometrio, atribuyéndole un rol regulador de la angiogénesis.

Se ha relacionado a hCG con la modulación en la secreción de ciertas moléculas angiogénicas como interleucina-1, VEGF-A, TGF $\beta$ , angiopoyetina-2 entre otras en distintos tipos celulares (Sengupta *et al.*, 2008; Pietrowski *et al.*, 2010; Bourdieu *et al.*, 2012; Berndt *et al.*, 2013). En el año 2002, Zygmunt y colaboradores establecieron que la hCG tiene una relación directa con el proceso de angiogénesis al estar íntimamente relacionada la expresión del receptor LH/hCG en

las células endoteliales uterinas, lo que explicaría que al estimular estas células con la hormona, aumentara la formación capilar *in vitro* y en la neovascularización *in vivo* debido a que las células podrían responder a la hormona por la abundancia del receptor de hCG en ellas.

A partir de esta hipótesis, se han establecido modelos de investigación que intentan dilucidar el modo de acción de esta hormona en el proceso de angiogénesis en el endometrio.

Bernd y colaboradores en el año 2006, establecieron que la hCG aumenta el suministro de sangre y modifica la irrigación uterina a través de la vasodilatación. Lo anterior implicaría una mayor permeabilidad y mayor desarrollo y la maduración de nuevos vasos sanguíneos. Esta hormona estaría regularía la angiogénesis de dos maneras: En la primera de ellas las células del trofoblasto secretan hCG y estimularían directamente a las células endoteliales. La segunda hCG estimularía la secreción de VEGF en las células epiteliales, ejerciendo un efecto indirecto en las células endoteliales vasculares, estimulando el proceso angiogénico en las células endoteliales.

### 3 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

Las investigaciones en relación a hCG y al proceso de angiogénesis han estado relacionadas con la acción de esta hormona frente a las células endoteliales vasculares de manera directa e indirecta, a través de las células epiteliales endometriales. Sin embargo, no se han planteado estudios en los cuales se establezca una relación de esta hormona y el proceso de angiogénesis que involucre a las células que se encuentran en mayor proporción dentro del tejido endometrial, aquellas que interactúan en gran medida con el proceso de invasión del embrión y que corresponde a las células estromales endometriales.

A partir de esto, la hipótesis es si la hCG influenciaría el proceso de angiogénesis a través de las células estromales del endometrio y si este proceso ocurriría cuando estas células están decidualizadas, estado predominante en el embarazo. Esto es relevante ya que alrededor de un 10% de los embarazos concluyen en un aborto espontáneo antes de las 12 semanas de gestación y entre 3-5% sufren complicaciones por preeclampsia, asociada a la restricción del crecimiento intrauterino, parto prematuro y riesgo de muerte materna y fetal (Solomon y Seely, 2004; Rai y Regan, 2006).

El papel que podría tener hCG en el proceso de angiogénesis permitirá comprender mejor las funciones de hCG en el endometrio humano y que podrían permitir el establecimiento de un embarazo exitoso.

#### **4 HIPOTESIS**

hCG modula la secreción de moléculas relacionadas con la angiogénesis en células de estroma endometrial pre-decidualizadas (dESC) y no pre-decidualizadas (ESC), regulando el proceso de angiogénesis en el endometrio.

#### **5 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la señalización de hCG sobre ESC y dESC modula procesos relacionados con la angiogénesis en el endometrio.

#### **6 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Determinar si el estímulo con hCG en ESC y dESC afecta la secreción de moléculas relacionadas con la angiogénesis

Determinar el efecto neto pro- o anti- angiogénico in vitro de los medios condicionados de células endometriales estromales estimuladas con hCG.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron realizados en marco del proyecto FONDECYT de iniciación 11100443, en los laboratorios del Instituto de Investigación Materno Infantil de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en la ciudad de Santiago. Se realizaron ensayos curva dosis-respuesta que fueron divididos en ensayos de estimulación con hCG y ensayos de angiogénesis. El diseño experimental se adjunta en Anexos.

### 7.1 Ensayo de estimulación con hCG

#### 7.1.1 Obtención de ESC

La obtención del cultivo primario de células de estroma endometrial se realizó a través de biopsias de tejido endometrial en fase secretora de mujeres en edad fértil (20-40 años) con ciclos normales. Estas muestras fueron obtenidas en el Hospital San Borja Arriarán durante el año 2012 – 2013 siendo transportadas hasta el laboratorio en hielo y procesada en menos de 2 horas. Las pacientes firmaron un consentimiento escrito aprobado por los comités de ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile y FONDECYT.

El tejido endometrial fue lavado con PBS para remover restos de sangre y procesado con bisturí para luego ser digerido con colagenasa y DNasa por 2 horas a 37°C en agitación (120 rpm). El tejido digerido fue pipeteado vigorosamente para romper tejidos restantes y fue pasado por un filtro de 100 µm, y posteriormente por otro filtro de 40 µm. Luego se centrifugó por 5 minutos a 18.000 rpm, de tal forma de obtener un pellet que fue resuspendido en medio de cultivo DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (*Invitrogen Life Technologies, Bethesda, MD, EEUU*) suplementado con un 10% de Suero Fetal Bovino (*Gibco Life Technologies, EE.UU*) y un 1% de antibiótico/antimicótico (*Gibco Life Technologies, EE.UU*) y luego cultivados en frascos T75 hasta pasaje 3, cambiando el medio de cultivo cada 2 días.



### **7.1.2 Pre-decidualización in vitro de ESC**

Para inducir pre-decidualización in vitro, las ESC fueron incubadas por 7 días con medio DMEM F12 suplementado con un 2% de Suero Fetal Bovino (SFB), 0,5 mM de 8 Br-cAMP (*Sigma-Aldrich, EE.UU*),  $10^{-6}$  M de MPA (medroxiprogesterona) (*Sigma-Aldrich, EE.UU*) y un 1% de A/A, (Brosens *et al.*, 1999). Posteriormente se estimuló con hCG en las dosis correspondientes, en medio DMEM F12 con un 1% de antibiótico/antimicótico.

### **7.1.3 Estímulo con hCG**

El estímulo con hCG fue realizado en cultivo primario de ESC pre-decidualizadas y no pre-decidualizadas. En ambos casos las células fueron estimuladas con hCG (*Sigma-Aldrich, EE.UU*) en dosis de 0 UI/ml, 1 UI/ml, 10 UI/ml y 100 UI/ml por 72 horas, para lo cual los cultivos se realizaron en placas de 60 mm de diámetro, con 2 mL de medio DMEM F12 suplementado con un 10% de SFB y un 1% de antibiótico/antimicótico. Para el estímulo de células no pre-decidualizadas, el estímulo con hCG fue realizado una vez que los cultivos llegaban a un ~90 % de confluencia, pasado 24 hrs de privación de las células ESC de SFB, para la cual se utilizó DMEM F12 con un 1% de antibiótico/antimicótico.

### **7.1.4 Real Time – PCR y medición de Prolactina**

Para verificar la pre-decidualización se evaluó el aumento en el nivel del transcrito que codifica para prolactina en dESC a través de PCR en tiempo real, para lo cual se extrajo ARN total de las células estromales en día 0, día 3, día 5, y día 7. Se comparó los niveles de ARNm de prolactina de ESC tratadas con 8-Br-cAMP y MPA con el de aquellas que no fueron tratadas con el estímulo de pre-decidualización.

#### **7.1.4.1 Extracción de ARN**

La extracción de ARN se realizó con el kit de extracción RNeasy Mini Kit (*Qiagen, EE.UU*) para células animales, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para esto, A cada placa de cultivo se le retiró el medio de cultivo con cada tratamiento y se lavó con PBS estéril helado 3 veces para

luego agregar 350  $\mu$ L del buffer de lisis RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol 1% (v/v) y se procedió a raspar cada placa con el raspador (*Cell Scraper, Falcon*). El homogenizado obtenido se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.6 mL almacenándolo a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Después de obtener el homogenizado de cada día de tratamiento de pre-decidualización, se procedió a extraer el ARN utilizando las columnas del Kit, agregándole un volumen de etanol 70% (v/v) al homogenizado, seguido de continuas centrifugaciones y lavados como se describe en el protocolo del kit. El ARN purificado en las columnas fue tratado con DNAsa I (*Qiagen, Hilden, Germany*) según las indicaciones del proveedor. Por último, el RNA fue eluido por centrifugación y re suspendido en 20  $\mu$ L de agua tratada con dietilpirocarbonato ( $\text{H}_2\text{O}$ -DPEC) (*Qiagen, Hilden, Germany*). Se determinó luego la concentración de RNA total (ng/ $\mu$ L) y la contaminación con proteínas por espectrofotometría a 260 y 280 nm, respectivamente (*Nanodrop 200c spectrophotometer, Wilmington, EEUU*) utilizando solo las muestras con razón 260/280 > 1.85.

#### **7.1.4.2 Síntesis de ADN complementario**

El ADN complementario (cDNA) se sintetizó a partir del ARN extraído, utilizando el Kit SuperScript™ (*Invitrogen Life Technologies, EE.UU*) teniendo que calcular el volumen en el cual habían contenidos 1  $\mu$ g de ARN para obtener, en un 100% de rendimiento, 1  $\mu$ g de cDNA. Se mezcló en un Eppendorf de 0,6 mL el volumen adecuado de RNA extraído con  $\text{H}_2\text{O}$ -DPEC, 1  $\mu$ L de los partidores (Random Primers) y 1  $\mu$ L de dNTPs completando con  $\text{H}_2\text{O}$ -DPEC un volumen total de 10  $\mu$ L. Esta mezcla se llevo al termociclador (*Master Cycler Gradient Eppendorf*) incubando para denaturación de las hebras a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos y dejando luego en hielo. Luego se preparó un mix que contenía buffer RT (200 mM tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl, 25 mM), 25 mM MgCl, 0,1 M Ditiotreititol (DTT), RNaseOUT™ y la enzima transcriptasa reversa (Super Script), agregando a cada tubo de reacción 10  $\mu$ L. Así, se llevo cada tubo nuevamente al termociclador 10 min. a  $25^{\circ}\text{C}$  para el alineamiento, luego la síntesis de cDNA a  $50^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos y posteriormente un ciclo de 5 min. a  $85^{\circ}\text{C}$  para finalizar la reacción. Como paso final se realizó un tratamiento con 1 $\mu$ L de RNasa H (*Invitrogen Life Technologies, EE.UU*) incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Los tubos fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 7.1.4.3 PCR en tiempo real

Para realizar el PCR en tiempo real se utilizaron 250 ng del cDNA sintetizado. Obtenida la dilución correspondiente, se mezcló en un tubo estéril 1 uL de cDNA 250 ng., 2 uL de los partidores para GAPDH y PRL (*Integrated DNA Technologies, CA, USA*), 10 uL de la sonda SYBR Green (*Qiagen, Hilden, Germany*) y completando a volumen final de 20 uL con H<sub>2</sub>O-DPEC.

Todas las muestras se cargaron en triplicado para cada condición y para el estudio de cada gen. También se utilizó un control negativo de transcripción, cargando solo H<sub>2</sub>O-DPEC, sin los componentes del mix en los Optical Cap (*Agilent Technologies, UK*). Los caps se llevaron al termociclador LightCycle Nano (*Roche, EE.UU.*) y los ciclos aplicados fueron etapa inicial de 10 minutos a 95°C y luego 40 ciclos repetitivos de 15 seg. a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Una etapa final de 200 seg. a 95°C y una curva de melting de 60–95°C.

## 7.2 Ensayos de Angiogénesis

Para determinar los potenciales angiogénicos de los medios condicionados de los ensayos de estimulación con hCG, se realizó un ensayo de angiogénesis in vitro para el cual se utilizaron células EA.hy926. Esta línea celular endotelial proveniente de una hibridización entre células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y una línea celular de cáncer pulmonar humano (A549/8) es positiva para Factor von Willebrand (específico de células endoteliales) y prostaciclina (Aranda y Owen, 2009). Las células fueron crecidas en pocillos de 10 cm<sup>2</sup> hasta ~ 80% de confluencia. Para los ensayos de angiogénesis se agregaron 200 µL de matrigel a cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se dejó solidificar por 30 min a 37°C antes de sembrar las células. Luego, las células endoteliales EA.hy926 fueron tripsinizadas y 35.000 células fueron resuspendidas en 500 µL de medio condicionado de células ESC o células dESC, para luego ser sembradas sobre la superficie de matrigel incubándolas a 37°C. Las células fueron observadas desde el tiempo 0 hasta 12 horas y fueron fotografiadas una vez comenzaron a observarse estructuras tipo-capilar. Como control negativo se utilizó células EA.hy926 resuspendidas en

medio de cultivo IMDM con 20% SFB. Como control positivo se utilizó medio DMEM F12 al 1% A/A y 50 ng/ml de VEGF (*hBa-165, Santa Cruz Biotechnology, Inc*).

Para determinar el índice angiogénico se fotografiaron aleatoriamente 10 campos por tratamiento con un aumento de 200X, para calcular el índice angiogénico a partir de cada fotografía aplicando la siguiente fórmula:

Índice Angiogénico por campo:

$$\frac{(\text{N}^{\circ} \text{ de c\acute{e}ls. en "sprouting" *1}) + (\text{N}^{\circ} \text{ de c\acute{e}ls. unidas *2}) + (\text{N}^{\circ} \text{ pol\acute{ı}gonos *3})}{\text{N}^{\circ} \text{ c\acute{e}lulas \textit{totales}}} + 1(2-3 \text{ c\acute{e}ls.}) \text{ \acute{o} } +2 (3 \text{ \acute{o} } + \text{ c\acute{e}ls.})$$

Se consideró como “Células en Sprouting” a aquellas que presentaron prolongaciones y polígonos tipo capilares, según la disposición que adoptan las células endoteliales.

### **7.2.1 Medición Viabilidad de células Eahy926 en presencia de medios condicionados pre-decidualizados**

El efecto de 8-Br cAMP y de MPA sobre células Eahy926 fue medido a través del uso del ensayo convencional MTS a base de tetrazolio. Se sembraron 15.000 células en pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, los medios de cultivo fueron reemplazados con medio de pre-decidualización 8- Br cAMP más MPA y medio no pre-decidualizado y incubándolas por 8 horas. Después se añadió solución de MTS (*Promega, Madison, WI, EE.UU.*) a cada pocillo y se incubó durante 45 minutos a 37°C, realizando mediciones cada 15 minutos. La reacción de cada pocillo fue leído a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplacas Sinergia 2 (*BioTek, Winooski, VT, EE.UU.*). Todos los medios condicionados se analizaron individualmente (no agrupados).

### **7.2.2 Human Angiogénesis Array**

Para determinar la presencia o ausencia de moléculas angiogénicas en los MCs de ESC y dESC tratadas con hCG, se utilizó un kit que permite la semicuantificación de 55 moléculas angiogénicas, Human Angiogenesis Antibody Array (*R&D Systems, Inc*), para lo cual se siguieron las indicaciones del fabricante. Antes de realizar el ensayo se hizo un pool con los medios condicionados de los 3 cultivos utilizados, por tipo celular (ESC y dESC) y por estímulo con hCG, para obtener solo 4 medios condicionados para ser utilizados (0 UI/ml de hCG de ESC, 0 UI/ml de hCG de dESC, 100 UI/ml de hCG de ESC y 100 UI/ml de hCG de dESC). Las membranas del kit se incubaron por una hora con buffer de bloqueo para luego agregar los medios condicionados 0 UI/ml hCG y 100 UI/ml de ESC y de dESC que previamente fueron incubados con un coctel de detección de anticuerpos proveídos en el kit, dejándolos incubando toda la noche a 4°C en un shaker. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua desionizada y con el buffer de lavado suministrado en el kit por 3 veces. Luego a cada membrana fue incubada en streptavidina- HRP por 30 minutos en un shaker a temperatura ambiente. A continuación se procedió a lavar las membranas y se agregó un mix de reactivos químicos quimioluminiscentes, incubando por 1 minutos también a temperatura ambiente para ser reveladas con el equipo Discovery 10gD (*Ultralum, Claremont, CA, EE.UU.*) obteniendo las imágenes mediante el software UltraQuant (*versión 6.0.0.344*).

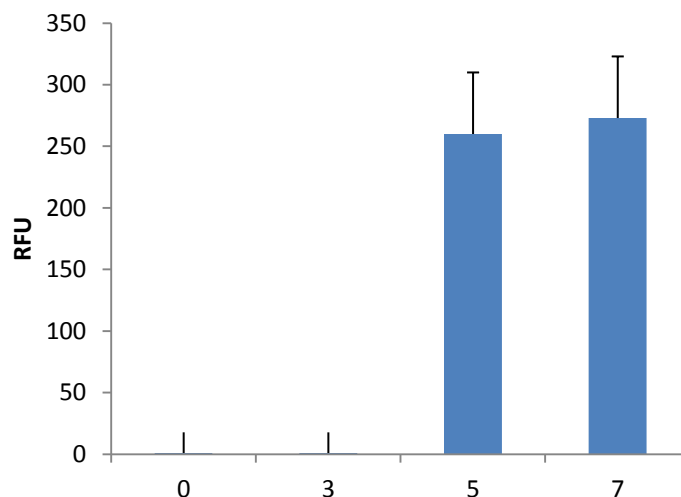
### **7.3 Análisis Estadísticos**

Los experimentos de estimulación con hCG se realizaron por duplicado utilizando preparaciones de células a partir de al menos tres biopsias endometriales diferentes ( $n \geq 3$ ). Los datos fueron analizados con el software Prism 5.0 (*GraphPad Software, San Diego, CA, EEUU*). Para determinar la significancia de los potenciales angiogénicos se realizó un test no paramétrico mediante una prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunns para las comparaciones entre las condiciones de tratamiento y de control. Un  $P < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Obtención de células pre decidualizadas por estímulo de 8-Br cAMP con MPA.

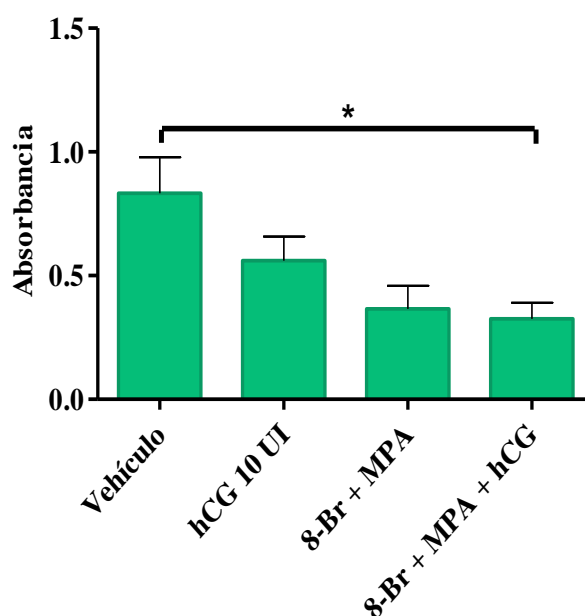
Para determinar la correcta pre-decidualización de las células estromales, se realizó a través de PCR en tiempo real la medición de Prolactina, considerada como marcador de pre-decidualización. Los resultados indicaron que al séptimo día del estímulo con 8-Br cAMP y MPA el nivel del transcrito para prolactina fue >10 veces que en las de las células del día 0 y día 3. Con estos resultados se determinó que las células estaban pre-decidualizadas.



**Figura 1.** Expresión de mRNA del marcador de Pre-decidualización Prolactina, en células de estroma endometrial humano tratadas con 8- Br cAMP y MPA. Las células fueron tratadas por 7 días con medio de pre-decidualización conteniendo 0,5 mM 8 Br-cAMP +  $10^{-6}$  M MPA. Los valores son expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar y normalizados con el gen GAPDH. N=3.

## 8.2 Viabilidad de células Eahy926 en presencia de 8-Br cAMP con MPA.

El efecto de 8-Br cAMP y MPA sobre la viabilidad de las células Eahy926 fue evaluado a través del ensayo de MTS. Las células disminuyeron su viabilidad significativamente al ser expuestas a este tratamiento (Figura 2). Por esta razón los estímulos con hCG en las células dESC, se realizaron sin la presencia de 8-Br cAMP y MPA.



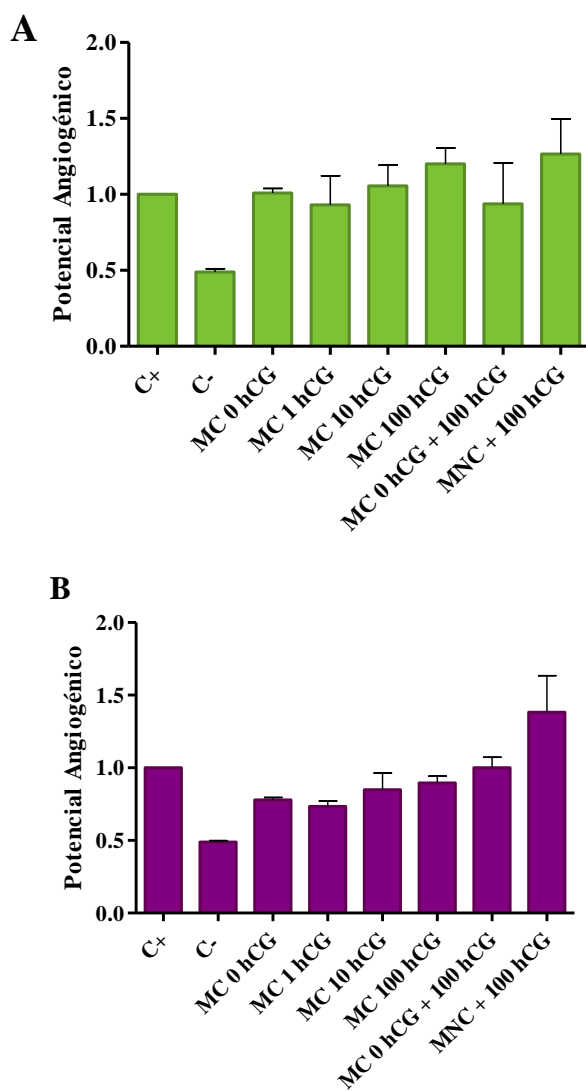
**Figura 2.** Efecto de 8 Br cAMP + MPA en la viabilidad de células Eahy926. Las células fueron incubadas por 15 minutos con solución de MTS ( $1.5 \times 10^4$  células/pocillo). El vehículo corresponde a medio DMEM F12 1% A/A. Se realizaron 5 repeticiones por tratamiento. La medición de la absorbancia fue utilizada para determinar la viabilidad celular. Los datos se expresan como la medida de la absorbancia en 490 nm. La prueba estadística de Kruskal Wallis mostro un  $p < 0,05$  con diferencias significativas entre el vehículo y el tratamiento con 8-Br cAMP + MPA + hCG.

### **8.3 Efecto de los medios condicionados de células ESC y dESC tratadas con hCG sobre el potencial angiogénico de células endoteliales Eahy926**

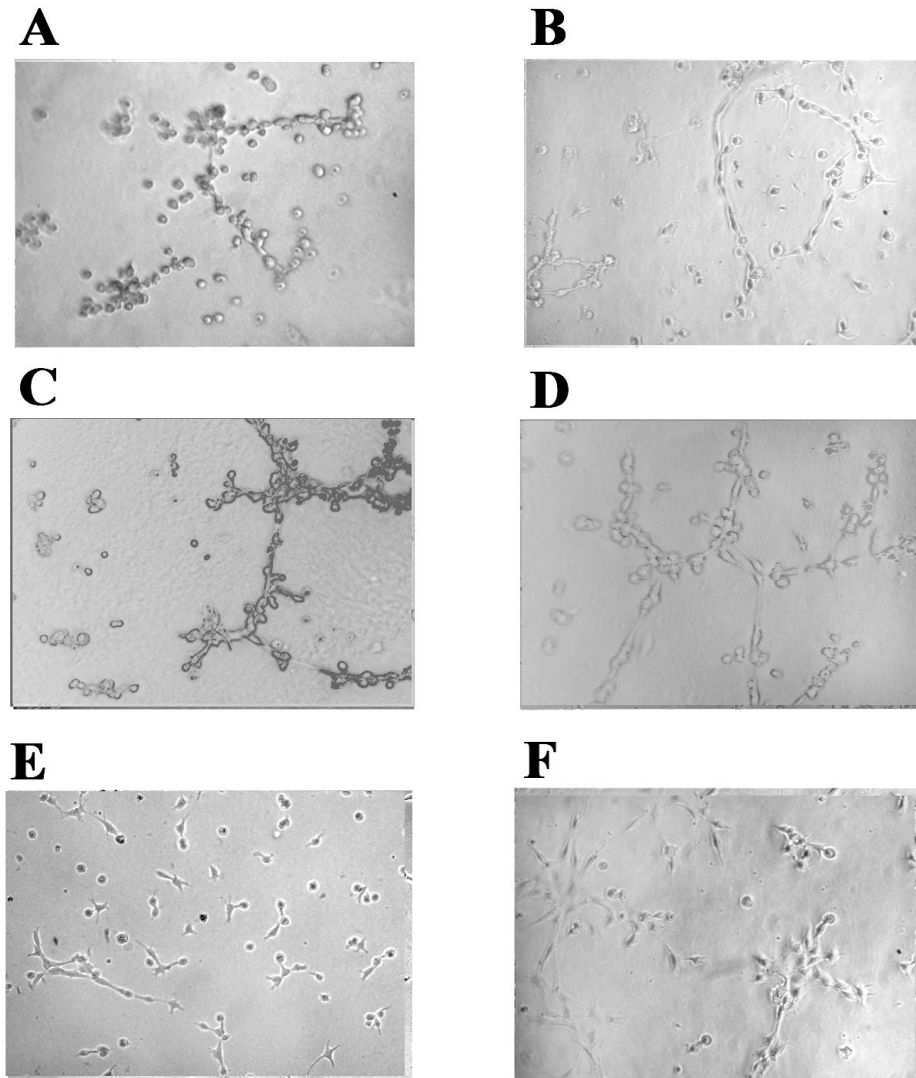
La realización de ensayos de angiogénesis determinó un efecto pro- o anti angiogénico de los medios condicionados (MC) de las células estromales endometriales. En ESC (Figura 3), los primeros ensayos mostraron que las dosis de 1, 10 y 100 UI/ml de hCG revelaron una tendencia a un aumento exponencial directamente proporcional a la dosis empleada. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre cada uno de los tratamientos. A partir de lo anterior, se realizó un ensayo de angiogénesis en el que se utilizaron solo los medios condicionados con 0 UI/hCG a los cuales se les agregó 100 UI/ml de hCG de tal manera de poder comparar los tratamientos MC 100 UI/hCG y MC 0 UI/hCG + 100 UI/hCG post 72 horas. Los resultados mostraron una tendencia anti-angiogénica de hCG en los medios condicionados. El análisis estadístico mostró que esta tendencia no es significativa.

Para estudiar si hCG tendría algún efecto anti-angiogénico se realizó un ensayo de angiogénesis en el cual se estimularon las células endoteliales con medio de cultivo DMEM F12 con 100 UI/ml de hCG incubado a 37°C por 72 horas. Con esto se pudo comparar el efecto del medio condicionado versus el medio no condicionado por las células ESC y dESC. El análisis comparativo muestra que en los MCs de las células ESC, hCG no modifica significativamente la formación de estructuras tipo capilares (Figura 3).

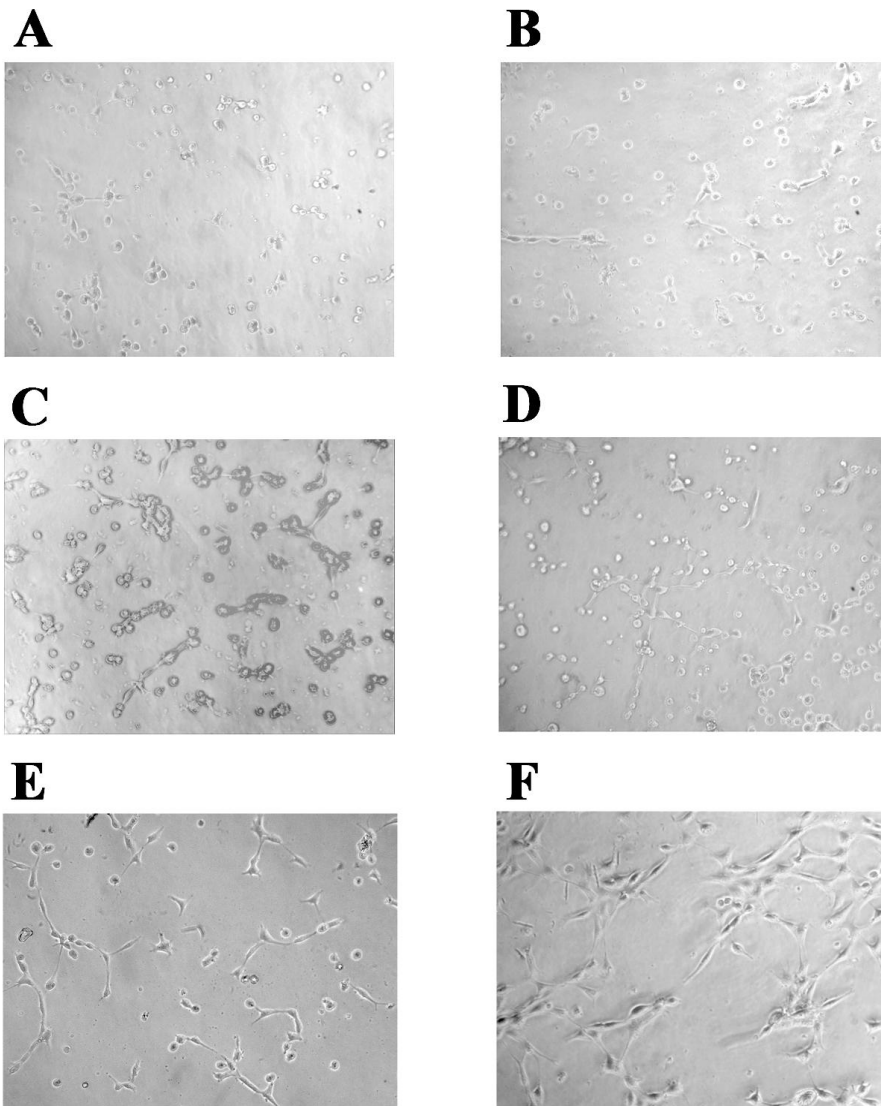




**Figura 3.** Potenciales Angiogenicos de medios condicionados obtenidos de ESC (A) y dESC (B) tratadas con hCG o vehículo por 72 horas. N =3. Los datos fueron normalizados respecto al control positivo. C+, control positivo, C- control negativo, MC medio condicionado 0, 1, 10 y 100 hCG (UI/ml), MC 0 + 100 hCG medio condicionado 0 + 100 UI/ml hCG agregados en el ensayo de angiogenesis. MNC, medio no condicionado + 100 UI/ml hCG.



**Figura 4.** Ensayo de Angiogenesis de células ESC. A) MC 0 hCG; B) MC 1 hCG; C) MC 10 hCG; D) MC 100 hCG; E) MC 0 + 100 hCG; F) MNC. Las fotografías son una muestra de la totalidad de imágenes obtenidas en los ensayos. Cada fotografía fue tomada con aumento 3X en objetivo 20X. Se aprecia que no existen mayores diferencias entre cada estímulo, datos acordes a la cuantificación de las imágenes.



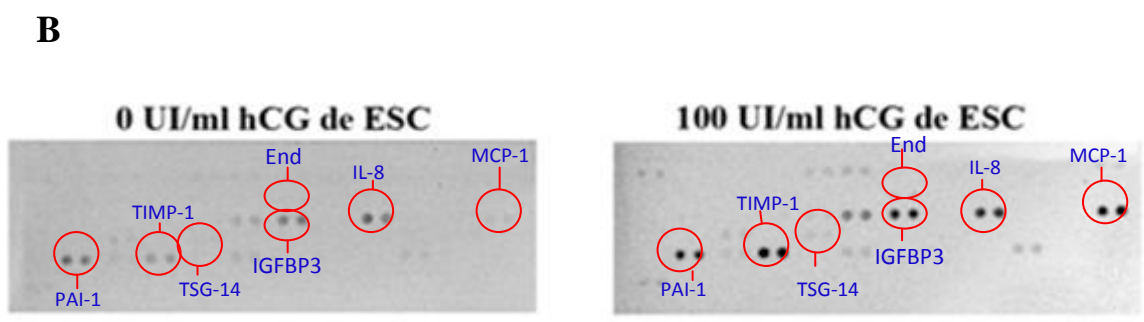
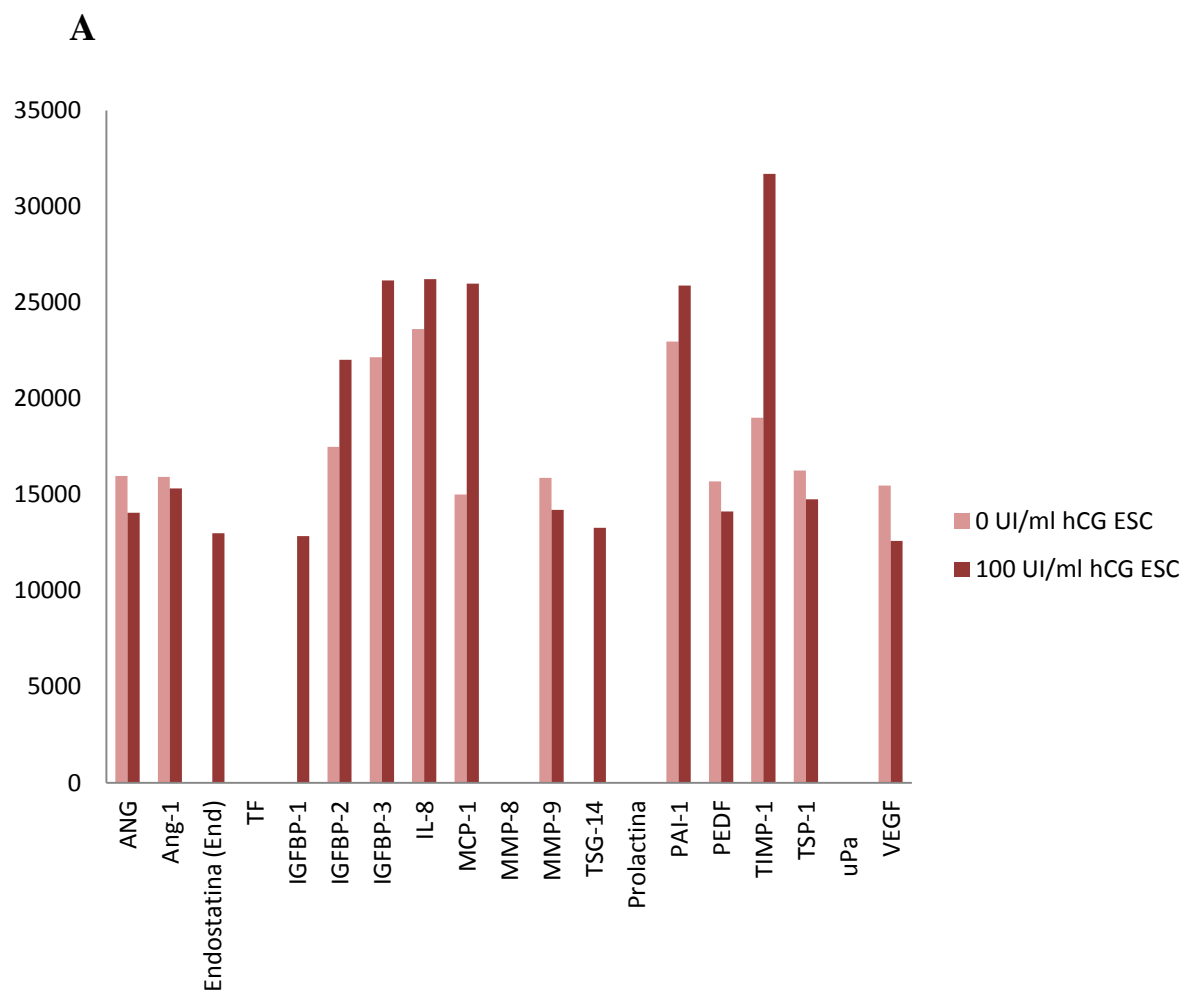
**Figura 5.** Ensayo de Angiogénesis de células dESC. A) MC 0 hCG; B) MC 1 hCG; C) MC 10 hCG; D) MC 100 hCG; E) MC 0 + 100 hCG; F) MNC. Las fotografías son una muestra de la totalidad de imágenes obtenidas en los ensayos. Cada fotografía fue tomada con aumento 3X en objetivo 20X. Se aprecia que no existen mayores diferencias entre cada estímulo, datos acordes a la cuantificación de las imágenes.

#### **8.4 Análisis de la regulación de moléculas angiogénicas**

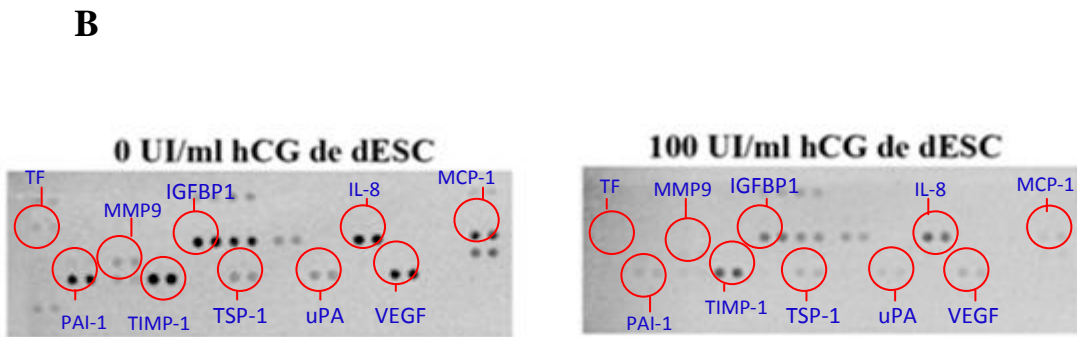
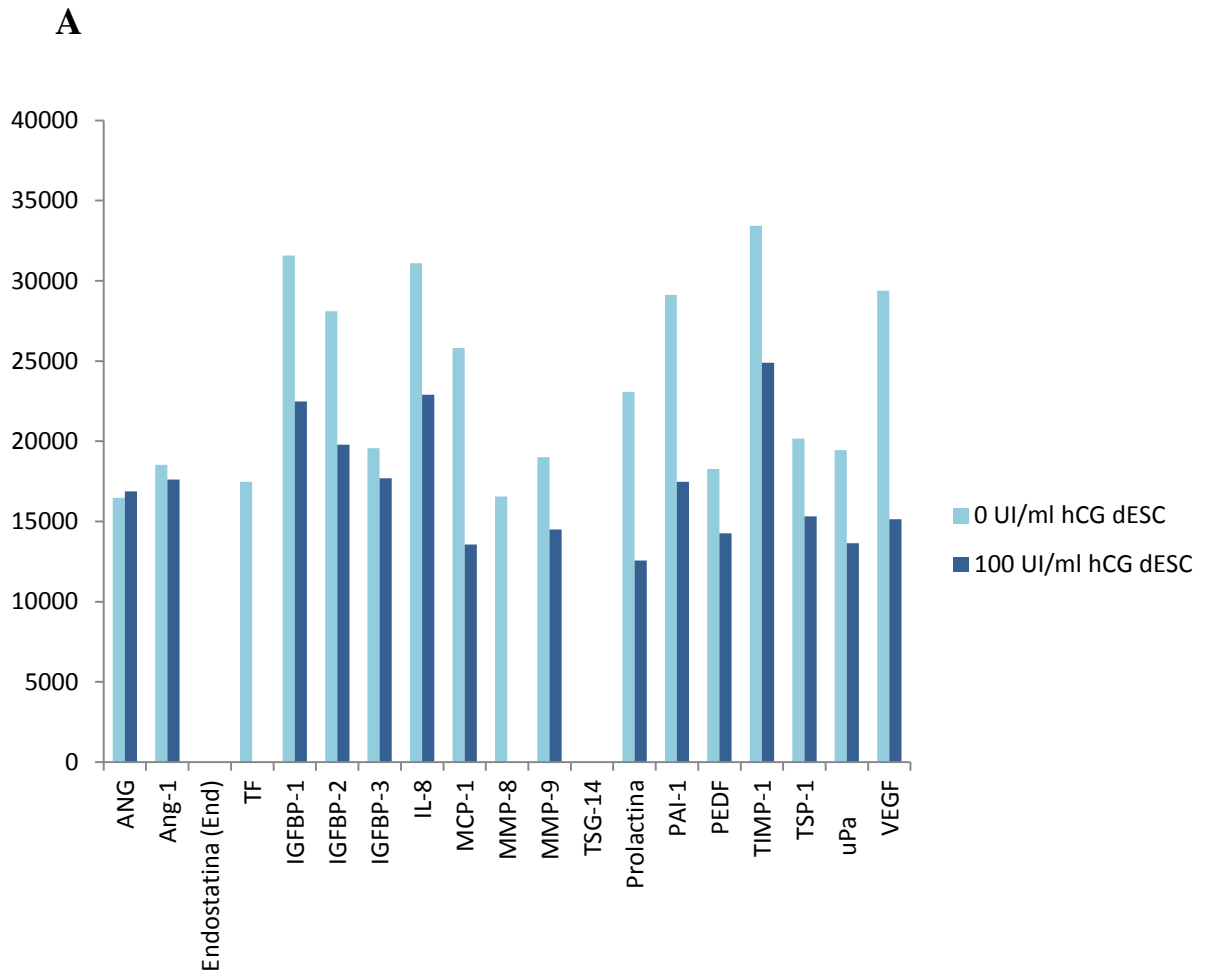
Para conocer cuáles son las moléculas angiogénicas presentes en los medios condicionados que hCG moduló en células ESC y dESC, se realizó un Array que permite conocer la presencia de 55 moléculas angiogénicas. El revelado de las membranas mostró la presencia de 19 de ellas (Figura 6,7). Como se mostró en el ensayo de ELISA, se pudo confirmar la presencia de VEGF en todos los medios condicionados. Se destaca la presencia de IGFBP-2 e IGFBP-3, IL-8, MCP-1, PAI-1, TIMP-1 y Trombospondina-1 (TSP-1) en todos los medios (tratados y no tratados con hCG).

Las diferencias entre las células tratadas y no tratadas con hCG mostraron que la hormona induce en ESC la producción de casi todos los factores angiogénicos encontrados, destacándose la inducción de Endostatina (End), IGFBP-1 y Pentraxina-3, mientras que en dESC esta hormona inhibe la producción de la mayoría de los factores angiogénicos destacándose la inhibición completa del factor de coagulación III y MMP-8. También se observaron diferencias entre las células pre-decidualizadas y no pre decidualizadas sin el tratamiento con la hormona encontrando que las células dESC presentaron mayor cantidad de moléculas angiogénicas que las otras, sumándose a la lista IGFBP-1, PRL, MMP-8 y uPA.

La cuantificación del ensayo permitió observar las diferencias en la secreción de las moléculas en los medios condicionados (Figuras 7, 8). El array de ESC mostró que hCG indujo un aumento en la angiogenina (ANG), angiopoyetina (Ang), IGFBP-1, MMP-9, PEDF, TSP-1 y VEGF; y una reducción de los factores IGFBP-2, IL-8, MCP-1, PAI-1 y TIMP-1. Respecto al array de MCs de dESC, hCG aumenta la producción de angiogenina y angiopoyetina 1 e inhibe factores angiogénicos como IGFBP-1,-2 y -3, IL-8, MCP-1, MMP-9, PRL, PAI-1, PEDF, TSP-1, uPA y VEGF (Figura 6).



**Figura 6** Revelado del Human Angiogenesis Array. (A) Gráfico de la cuantificación del Array de los tratamientos de cultivos ESC. Se aprecian las diferencias en la expresión de las 19 moléculas angiogénicas en los distintos tipos de cultivos primarios (ESC o dESC). (B) Imágenes de las membranas del ensayo.



**Figura 7** Revelado del Human Angiogenesis Array. (A) Gráfico de la cuantificación del Array de los tratamientos de cultivos dESC. Se aprecian las diferencias en la expresión de las 19 moléculas angiogénicas en los distintos tipos de cultivos primarios (ESC o dESC). (B) Imágenes de las membranas del ensayo.

## 9 DISCUSIÓN

El éxito de la implantación y placentación dependen de la correcta invasión del trofoblasto dentro del estroma endometrial materno. Este proceso está finamente regulado y es mediado por la acción de moléculas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular, proceso altamente coordinado y controlado que requiere una apropiada interacción entre el trofoblasto y el endometrio. A su vez, necesita de una remodelación vascular que permita nutrir al embrión durante su crecimiento.

Una de las primeras señales detectadas en el dialogo madre/embrión corresponde a hCG. Se ha descrito que las subunidades de hCG son transcritas por el embrión temprano a partir del estadio de 2 células y se presume que esta hormona es secretada al medio circundante mucho antes de que pueda ser medida en sangre periférica (Lopata y Oliva, 1993). La aparición temprana de hCG sugiere que, además del rol que tiene esta hormona en rescatar el cuerpo lúteo de la madre al comienzo del embarazo, también estaría involucrada en mecanismos que regulen la función del trofoblasto. Se ha descrito la presencia de los receptores de LH/hCG en virtualmente todos los tejidos adyacentes al embrión entre los cuales están las trompas de Falopio, el corion, el amnios, el endometrio y el miometrio (Reshef *et al.*, 1990; Licht *et al.*, 2003), por lo cual se ha sugerido que hCG posee una mayor participación en el embarazo.

La angiogénesis en la mujer ocurre durante todo el ciclo reproductivo y durante el proceso de implantación, sobre todo en la formación de la placenta. En estos primeros pasos del embarazo existe una alta demanda al aumento de suministro sanguíneo, por lo que los vasos del miometrio y endometrio tiene tres principales cambios adaptativos: vasodilatación, aumento de la permeabilidad y el desarrollo y maduración de nuevos vasos sanguíneos permitiendo el desarrollo exitoso del embarazo, motivos por los cuales se ha realizado una conexión entre hCG y el proceso de angiogénesis en el embarazo.

## 9.1 Modulación de Factores Pro- Angiogénicos

La determinación de la presencia del receptor LH/hCG en órganos no gonadales como en células endoteliales vasculares del útero, ha permitido establecer una relación directa de hCG para activar el inicio de la angiogénesis (Zygmunt *et al.*, 2002). El receptor de esta hormona también se encuentra en células epiteliales endometriales y estromales endometriales, lo que ha llevado a suponer que esta hormona podría activar la producción de factores angiogénicos e iniciar el proceso de angiogénesis de manera indirecta (Reshef *et al.*, 1990; Toth *et al.*, 2001; Ziecik *et al.*, 2005). A partir de esta última premisa en este estudio se observó el efecto de hCG sobre las células estromales endometriales (ESC) y las células estromales endometriales pre-decidualizadas (dESC). En otros estudios se ha establecido que en células pre-decidualizadas la dosis de 100 UI/ml de hCG induce una producción de VEGF (VEGF-A) en células estromales y epiteliales endometriales (Sengupta *et al.*, 2008). Lo anterior se correlaciona con los datos obtenidos en el ensayo de ELISA y en el Human Angiogenesis Array de este trabajo, en los cuales se observó la presencia de VEGF en ambos cultivos celulares (ESC y dESC). Sin embargo, no se han encontrado estudios anteriores en los cuales se observe un cambio exponencial de este factor de crecimiento que sea directamente proporcional a las dosis empleadas de hCG. Lo que este estudio presenta es aparentemente una producción indirectamente proporcional a las dosis de hCG, ya que si bien se estimula la producción de VEGF, también se inhibe su expresión al aumentar la dosis de la hormona en las células dESC y ESC, razón por la cual se cree que se hayan obtenido potenciales angiogénicos bajos.

Por otra parte, la participación del sistema Metaloproteinasas de la Matriz e Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (MMP/TIMP) son importantes para los procesos de implantación y de angiogénesis. Se ha definido que con dosis de 100 UI/mL de hCG por 48 horas se inhibe la producción de TIMP-1 y -2 en células estromales decidualizadas (Fluhr *et al.*, 2008) y que con dosis de 10 UI/ml se inhibe TIMP-1 y -2 en ESC (Tapia-Pizarro *et al.*, 2013). La disminución de TIMP-1 y TIMP-2 está relacionado con el proceso de implantación ya que su función es inhibir las metaloproteinasas involucradas en la degradación de matriz extracelular (MEC) de este proceso (Fluhr *et al.*, 2008) como también en la angiogénesis. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos en este estudio, donde se muestra que TIMP-1 es inhibido en células dESC con 100



UI/ml de hCG. Por el contrario, el análisis del array de ESC mostró que hCG indujo la producción de TIMP-1, lo que difiere respecto las investigaciones anteriores. La alta expresión de esta molécula en células dESC y en ESC puede ser una de las razones del por qué no se obtuvieron mayores potenciales angiogénicos en los ensayos de angiogénesis. Se plantea que al tener una alta producción de TIMP-1 por parte de los cultivos estromales, se pudo haber afectado la acción de las MMP de las propias células endoteliales Eahy926 utilizadas en el ensayo para que estas pudieran degradar la matriz y unirse a las otras células adyacentes formando las estructuras tipo capilares. De tal manera que la baja cantidad de MMP-9 encontrado en los medios condicionados no haya podido inducir en estas células la degradación de la matriz, y por esta razón se haya afectado la angiogénesis.

La remodelación de la matriz extracelular que implica la activación del sistema MMP/TIMP, también involucra otros procesos entre los que se encuentra el sistema plasmigeno/plasmina que participa en la degradación de algunos componentes de la MEC. Uno de los elementos del sistema es el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), sintetizado por las células endoteliales, el cual desencadenará la fibrinólisis al transformar el plasminógeno en plasmina y así degradar algunos componentes de la MEC (Arias y Pérez, 1999; Bajou *et al.*, 2002; Stefansson *et al.*, 2003; Plaisier, 2011). El inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) es producido por muchos tipos celulares de entre los cuales se incluyen, monocitos, células T, células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales, entre otras, y que su actividad es inhibir a uPA y a tPA (activador de plasminógeno tisular) para evitar la degradación de MEC. Sin embargo, también se ha señalado que PAI-1 podría inactivar directamente a la plasmina, sin actuar sobre uPA. Este sistema ha sido relacionado con el proceso de implantación ya que se ha encontrado que uPA es producido por el trofoblasto, permitiendo invadir el endometrio materno y que PAI-1 es expresado por la interfase materna, sin embargo existe un propio autocontrol por parte del trofoblasto al encontrar que también se produce PAI-1 y PAI-2 por parte de él (Zini *et al.*, 1992; Lockwood, 2011). Es importante destacar que la actividad de PAI-1 en el proceso de angiogénesis ha sido controversial, puesto que distintos estudios han señalado que posee propiedades pro-angiogénicas y anti-angiogénicas dependiendo de los niveles en las cuales se encuentre en tumores o en procesos fisiológicos normales. Así por ejemplo, en niveles

farmacológicos PAI-1 previene la angiogénesis y la tumorigénesis, mientras que en niveles fisiológicos PAI-1 facilita el crecimiento de tumores y de la angiogénesis y en ratones la ausencia de esta enzima afecta el crecimiento del tumor y de la angiogénesis (Soff *et al.*, 1995; Isogai *et al.*, 2001; Devy *et al.*, 2002; Labied *et al.*, 2011). En este estudio, los niveles de PAI-1 obtenidos en el ensayo array indican que las células estromales endometriales producen en su estado basal PAI-1, y que con el estímulo de hCG estos niveles disminuyen en dESC y aumentan en ESC. Lo anterior sugiere que hCG podría disminuir la producción de PAI-1 en las células predecidualizadas para ayudar la invasión del trofoblasto y contribuir a la inducción de angiogénesis, puesto que se ha señalado que PAI-1 a bajas concentraciones lo promueve y por el contrario al aumentar las concentraciones de la enzima, la angiogénesis decrece o es inhibida (Devy *et al.*, 2002). Mientras tanto los niveles de uPA que solo son expresados en las células predecidualizadas, podrían indicar que hCG facilita la degradación de la matriz por el trofoblasto a través de la producción de uPA en la decidua, de tal manera de ayudar al blastocisto a implantarse en el endometrio. Esto concuerda con el hallazgo del receptor uPAR en las células del trofoblasto (Zini *et al.*, 1992). Es probable también que al inhibir la producción de uPA, la activación de las células endoteliales para poder degradar la matriz se haya visto afectada en los ensayos de angiogénesis de este estudio.

La relación de hCG con el proceso de angiogénesis también ha sido estudiada con el sistema inmune. Esto se debe a que durante la implantación la interacción de la madre con el embrión involucra a células del sistema inmune que permiten a la madre tolerar al embrión, cediendo la supervivencia y crecimiento de este último sin un rechazo por parte de ella. De esta manera se pueden encontrar en el endometrio células blancas, macrófagos, células natural killer y células dendríticas, entre otras, que son un componente clave en la inmunidad innata y cobran una relevancia particular al momento de la implantación del embrión, pues al ser la mucosa endometrial una barrera natural de inmunidad debe estar alerta para responder ante cualquier organismo extraño incluyendo patógenos oportunistas o el mismo embrión reconocido como semi-estrño (Wira *et al.*, 2005). De hecho, dentro de los 3 primeros meses de embarazo el 30 % de las células del estroma son leucocitos y de ellos un gran porcentaje corresponden a células natural killer (Bulmer *et al.*, 1991). Se ha determinado que hCG suprime la respuesta inmune

(Kosaka *et al.*, 2002), por lo tanto la disminución de IL-8 y de MCP-1 observada en dESC con 100 UI/ml de hCG en este estudio no se aleja de estas aseveraciones, sugiriendo que al disminuir la respuesta inflamatoria local de IL-8 y de MCP-1 por hCG, se permite al embrión poder invadir de mejor forma el endometrio materno. El aumento de IL-8 y MCP-1 en las células ESC contrasta con estos datos, sin embargo, estas diferencias pueden ser las responsables de obtener las diferencias entre los potenciales angiogénicos de ESC y dESC. La disminución de IL-8 y MCP-1 en dESC pudo significar menor inducción de angiogénesis mientras que su aumento en ESC una mayor formación de estructuras tipo capilares suponiendo que en la línea celular endotelial Eahy926 se encontrasen los receptores de IL-8 (CXCLR2) y MCP-1 (CCR2) que se han descubierto presentes en otras células endoteliales, motivo por el cual a estas moléculas se las ha relacionado con el proceso de angiogénesis (Salcedo *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2005).

Otras de las moléculas que fueron altamente expresadas y discrepantes entre un cultivo y otro corresponden a las IGFbps. Estas moléculas (IGFBP-1, -2, -3) han sido encontradas en sitios de implantación de la interfase materna en ratones lo que ha sugerido que pueden estar reguladas por señales del trofoblasto (Damario *et al.*, 1998). Lo anterior podría ayudar a entender su inducción por hCG. La síntesis de IGFBP-1 en ESC se correlaciona con estudios *in vitro* anteriores en los cuales se ha establecido que hCG induce la producción de esta molécula (Giudice, 1997), así como también con los resultados obtenidos en dESC, donde hCG inhibe su producción pues se ha establecido que la proteína unida al factor de crecimiento tipo insulina -1 estaría relacionada con el proceso de implantación del blastocisto al indicar que, al igual que la función de TIMP-1, su acción en el proceso es inhibir la implantación del blastocisto (Giudice, 1997; Irwin *et al.*, 2001), por lo tanto la disminución de IGFBP-1 por hCG podría deberse para precisamente aumentar la posibilidad de implantación.

La inducción de las IGFBP-1,-2 y-3 observado en el array probablemente de más antecedentes al proceso de implantación que a la angiogénesis del embarazo, ya que existe menor información de este proceso y su relación con la angiogénesis en el endometrio no ha sido bien establecida. Sin embargo debemos aclarar que IGFBP-2 es una molécula pro-angiogénica que se le ha atribuido esta característica por inducir la angiogénesis en la formación de tumores y células

cancerígenas, mientras que IGFBP-3 ha sido catalogado como pro y anti angiogénico aunque la mayor parte de las investigaciones están enfocadas en la angiogénesis patológica (Kim *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2012). Escasa es la información referente a las IGFBPs en el proceso de angiogénesis en el endometrio, por lo que se hace interesante proponer analizar las vías en que estas moléculas pudiesen desencadenar los procesos angiogénicos durante el ciclo reproductivo de la mujer y durante el embarazo.

hCG también tuvo su efecto en el factor de coagulación III o factor tisular (TF), el cual es responsable de iniciar la cascada de coagulación (Godoi *et al.*, 2012) y que se ha detectado a través de inmunohistoquímica su presencia en las células estromales endometriales deciduales y en las de fase secretora media y tardía. Su relación con la angiogénesis se ha establecido a través de distintas vías de señalización intracelular, de los cuales se destaca la mediación de angiogénesis a través del receptor de proteasa activado tipo 2 (PAR-2) (Krikun, 2012). La importancia de este factor en el embarazo se debe a que permite evitar hemorragias después del proceso de implantación, razón por la cual se encuentra altamente expresado en las células estromales decidualizadas. Su inhibidor conocido como TFP1, es producido principalmente por el sincitotrofoblasto y en el proceso de implantación permite que el blastocisto pueda obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo (Dusse *et al.*, 2006). Eventualmente, la inhibición del TF por parte de hCG observado en este trabajo, esté relacionado también con este proceso de invasión y adhesión del blastocisto en el endometrio, sugiriendo que hCG ayuda al TFP1 a inhibir TF al inicio del embarazo. Como se ha señalado anteriormente, los niveles de hCG decrecen después del primer semestre de embarazo, por lo tanto, al disminuir los niveles de hCG, la expresión de TF en las células estromales deciduales podría aumentar y de esta forma se logra evitar hemorragias después de este periodo, logrando tener un embarazo a término.

Los otros factores pro-angiogénicos que fueron modulados por hCG (ANG y Ang-1) no fueron altamente expresados y no se observaron mayores cambios en el array de ambos tipos celulares, por lo que se cree no hayan sido moléculas importantes en la formación de las estructuras tipo capilares en los ensayos de angiogénesis.

Sobre los factores anti-angiogénicos encontrados en este estudio como son endostatina, IGFBP-1, pentraxina 3 (TSG-14) y PEDF, PAI-1 y TIMP-1 la mayoría fue inducido por hCG en ESC. Si bien algunos estaban presentes en los cultivos celulares sin estímulo, pentraxina 3 y endostatina no se encuentran en esta categoría por lo que su inducción fue bastante interesante. La endostatina es una proteína localizada en la membrana basal de los vasos sanguíneos a la cual se le ha atribuido inhibir la proliferación, migración y formación de túbulos junto con la inducción de apoptosis de las células endoteliales. Se la ha relacionado con la preeclampsia encontrándose en altas dosis en mujeres con esta enfermedad (Reyna-Villasmil *et al.*, 2013). La endostatina no interferiría negativamente en el sistema proteolítico participe en la invasión del trofoblasto (MMP/TIMP), ya que la endostatina incrementa los niveles de MMP-2, lo que ha sugerido que esta molécula podría contrarrestar los efectos de la endostatina (Pollheimer *et al.*, 2004; Pollheimer *et al.*, 2011). Respecto a Pentraxina 3 se desconoce una relación entre hCG y su inducción. Sin embargo, su estudio ha logrado encontrar altos niveles de esta molécula en mujeres con preeclampsia (Cetin *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2012). Mientras a hCG también se la ha involucrado con esta enfermedad en su forma glicosilada (Norris *et al.*, 2011) quizás hCG induzca esta enfermedad a través de la producción de pentraxina y endostatina. Sin embargo, el efecto de esta hormona en las células pre-decidualizadas *in vitro* de este trabajo no indujo su producción, por lo que la ambigüedad de su expresión indica que es necesario un mayor estudio.

Mientras PEDF y TSP-1 fueron expresados e inhibidos en ambos cultivos celulares, su inhibición pudo haber contribuido a contrarrestar los bajos potenciales angiogénicos obtenidos en los ensayos de angiogénesis.

Con todo lo anterior se plantea que la poca producción de estructuras tipo capilares en los ensayos de angiogénesis, pudo deberse a la alta producción de factores anti-angiogénicos por sobre los factores pro-angiogénicos en ambos casos. Estos últimos, aunque fueron inducidos en algunos casos, no pudieron contrarrestar los efectos de las otras moléculas angiogénicas. Las diferencias entre los potenciales angiogénicos de ESC y dESC pueden haberse dado por los contrastes en la síntesis de IL-8 y MCP-1 en ambos cultivos celulares, así como también a las IGFBPs, las cuales fueron las más expresadas y principales moléculas que presentaron grandes diferencias.

En este estudio se pudo determinar los efectos que tiene hCG en células estromales decidualizadas y no decidualizadas, sobre la secreción de moléculas relacionadas con el proceso de angiogénesis y su efecto pro- o anti-angiogénico. El efecto modulador sobre la secreción de estas moléculas inducido por hCG es claro, sin embargo no inducen cambios significativos en la inducción o inhibición del proceso angiogénico. Estas moléculas podrían estar regulando procesos complementarios a la angiogénesis durante la implantación del embrión y placentación temprana. Se requieren futuros estudios que permitan corroborar estos resultados.

## 10 CONCLUSIÓN

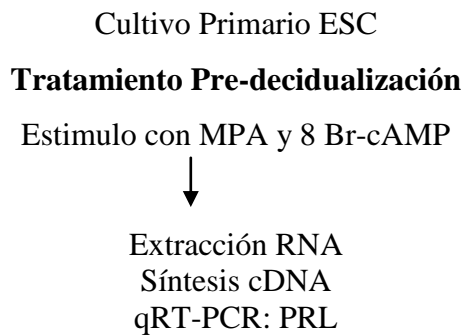
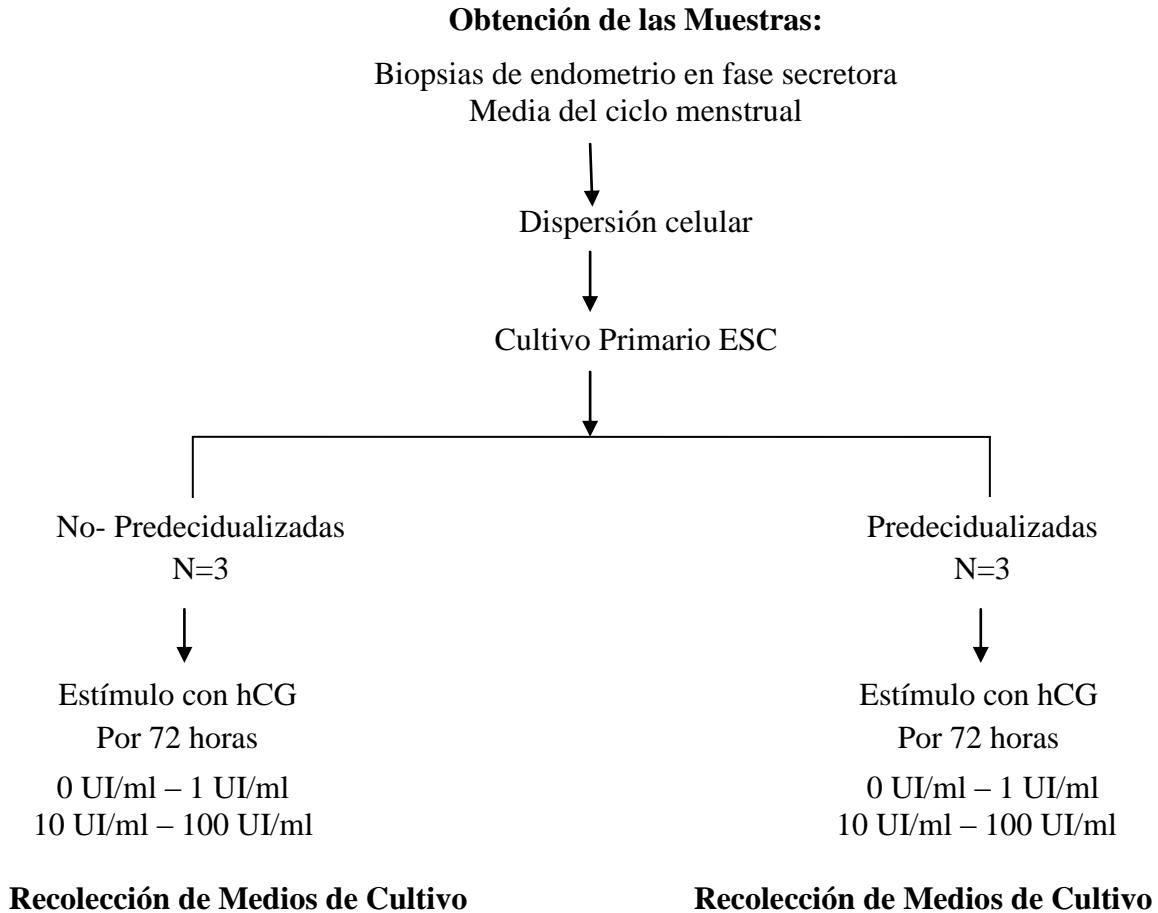
La hCG, considerada como la primera señal del embarazo posee otras funciones que complementan su principal rol en el embarazo, que es la mantención del cuerpo lúteo. Este efecto se ejerce de manera paracrina sobre el endometrio, regulando los procesos de angiogénesis en el endometrio materno durante el proceso de implantación y desarrollo placentario temprano.

Su relación con el proceso de angiogénesis dentro de estos eventos aún está en estudio y como se ha podido apreciar, la alta inducción de factores angiogénicos presentados en esta tesis, en los cuales se incluyen moléculas pro y anti angiogénicas, indica que su futuro estudio involucra dilucidar el papel de la regulación de estas moléculas por hCG in vivo. La formación de estructuras tipo capilares en las células endoteliales estimuladas con MCs de ESC y dESC tratadas con hCG y el posterior análisis de las factores angiogénicos que esta hormona indujo en los respectivos MCs de ESC y dESC muestra que hCG podría tener un papel regulador en los mecanismos de control del potencial angiogénico en la interfase materno-fetal. Estos hallazgos enfatizan el papel que tiene hCG en la regulación del proceso de implantación embrionaria y placentación temprana.

## 11 ANEXOS

### 11.1 Diseño Experimental

#### 11.1.1 Estimulo hCG en ESC y dESC.

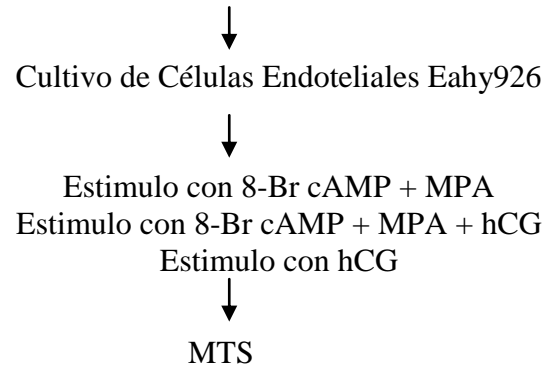




### 11.1.2 Determinación Potenciales Angiogénicos

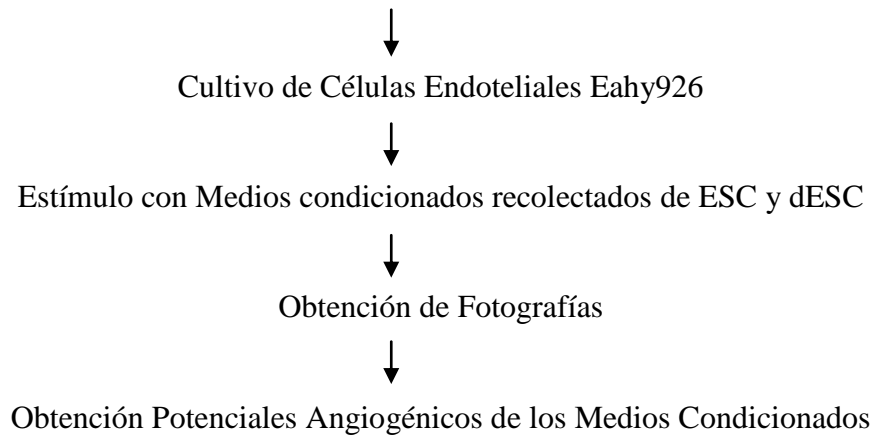
A)

#### Viabilidad de Eahy926 a 8-Br cAMP + MPA

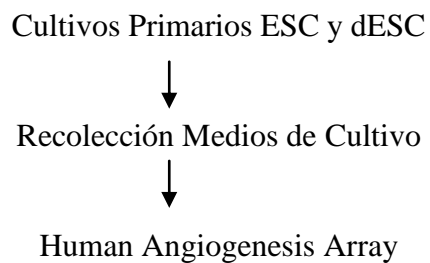


B)

#### Ensayo de Angiogénesis



### 11.1.3 Determinación Factores Angiogénicos



## 12 REFERENCIAS

- Adashi, E. Y., J. A. Rock, et al.** (1995). Reproductive endocrinology, surgery, and technology, Raven Press. <http://books.google.cl/books?id=CcUhAQAAAJ>
- Aranda, E. y G. I. Owen** (2009). "A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line." *Biol Res* **42**(3): 377-389.
- Arias, J. y J. A. Pérez** (1999). Fisiopatología quirúrgica, Editorial Tébar, S. L. <http://books.google.cl/books?id=7xy3ZfS0JO8C>
- Arnold, J. T., D. G. Kaufman, et al.** (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model." *Human Reproduction* **16**(5): 836-845.
- Bajo, J.** (2009). Fundamentos de Reproducción, Editorial Medica Panamericana Sa de. <http://books.google.cl/books?id=YHQuuaXdTisC>
- Bajou, K., J. M. Lewalle, et al.** (2002). "Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression." *Int J Cancer* **100**(5): 501-506.
- Belso, E., M. Colom, et al.** (2006). Tecnicos Especialista en Anatomia Patologica Del Servicio Vasco de Salud-osakidetza. Temario Volumen II Ebook, MAD-Eduforma. [http://books.google.cl/books?id=kIdtXWm3\\_lwC](http://books.google.cl/books?id=kIdtXWm3_lwC)
- Berndt, S., S. Blacher, et al.** (2013). "Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF-beta receptor activation." *FASEB J* **27**(4): 1309-1321.
- Blois, S. M., B. F. Klapp, et al.** (2011). "Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells." *J Reprod Immunol* **88**(2): 86-92.
- Bourdiec, A., R. Shao, et al.** (2012). "Human chorionic gonadotropin triggers angiogenesis via the modulation of endometrial stromal cell responsiveness to interleukin 1: a new possible mechanism underlying embryo implantation." *Biol Reprod* **87**(3): 66.
- Brosens, J. J., N. Hayashi, et al.** (1999). "Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells." *Endocrinology* **140**(10): 4809-4820.

**Bulmer, J. N., L. Morrison, et al.** (1991). "Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies." *Hum Reprod* **6**(6): 791-798.

**Cetin, I., V. Cozzi, et al.** (2006). "Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction." *Am J Obstet Gynecol* **194**(5): 1347-1353.

**Cole, L. A.** (2009) New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 8 DOI: 10.1186/1477-7827-7-8

**Cole, L. A.** (2010) Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* **8**, 102 DOI: 10.1186/1477-7827-8-102

**Cole, L. A.** (2012) hCG, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol* **10**, 24 DOI: 10.1186/1477-7827-10-24

**Damario, M. A., H. C. Liu, et al.** (1998). "Immunohistochemical analysis of insulin-like growth factor-binding proteins -1, -2, and -3 in implantation sites of the mouse." *J Assist Reprod Genet* **15**(8): 513-520.

**Devy, L., S. Blacher, et al.** (2002). "The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent." *FASEB J* **16**(2): 147-154.

**Dusse, L. M., M. Carvalho, et al.** (2006). "Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: a potential role in pregnancy and obstetric vascular complications?" *Clin Chim Acta* **372**(1-2): 43-46.

**Fluhr, H., D. Bischof-Islami, et al.** (2008). "Human chorionic gonadotropin stimulates matrix metalloproteinases-2 and -9 in cytotrophoblastic cells and decreases tissue inhibitor of metalloproteinases-1, -2, and -3 in decidualized endometrial stromal cells." *Fertil Steril* **90**(4 Suppl): 1390-1395.

**Gargett, C. E. y P. A. Rogers** (2001). "Human endometrial angiogenesis." *Reproduction* **121**(2): 181-186.

**Gellersen, B., K. Reimann, et al.** (2010). "Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals." *Hum Reprod* **25**(4): 862-873.

**Gibbons, G. H. y V. J. Dzau** (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." *N Engl J Med* **330**(20): 1431-1438.

**Giudice, L. C.** (1997). "Multifaceted Roles for IGFBP-1 in Human Endometrium during Implantation and Pregnancy." *Annals of the New York Academy of Sciences* **828**(1): 146-156.

**Godoi, L. C., K. B. Gomes, et al.** (2012). "Preeclampsia: the role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor." *J Thromb Thrombolysis* **34**(1): 1-6.

**Herr, F., N. Baal, et al.** (2007). "HCG in the regulation of placental angiogenesis. Results of an in vitro study." *Placenta* **28 Suppl A**: S85-93.

**Hong, K. H., J. Ryu, et al.** (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A." *Blood* **105**(4): 1405-1407.

**Ibrahim, M. I., H. M. Harb, et al.** (2012). "First trimester assessment of pentraxin-3 levels in women with primary unexplained recurrent pregnancy loss." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **165**(1): 37-41.

**Irwin, J. C., L.-F. Suen, et al.** (2001). "Insulin-Like Growth Factor (IGF)-II Inhibition of Endometrial Stromal Cell Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 and IGF-Binding Protein-1 Suggests Paracrine Interactions at the Decidua:Trophoblast Interface during Human Implantation." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(5): 2060-2064.

**Isogai, C., W. E. Laug, et al.** (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin." *Cancer Res* **61**(14): 5587-5594.

**Juriscova, A., M. Antenos, et al.** (1999). "Variability in the expression of trophoblastic markers beta-human chorionic gonadotrophin, human leukocyte antigen-G and pregnancy specific beta-1 glycoprotein by the human blastocyst." *Hum. Reprod.* **14**: 1852 – 1858.

**Kajdaniuk, D., B. Marek, et al.** (2011). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology." *Endokrynol Pol* **62**(5): 444-455.

**Keay, S. D., M. Vatish, et al.** (2004). "The role of hCG in reproductive medicine." *BJOG* **111**(11): 1218-1228.

**Kim, J. H., D. S. Choi, et al.** (2011). "Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events." *Blood* **118**(9): 2622-2631.

**Kosaka, K., H. Fujiwara, et al.** (2002). "Human chorionic gonadotropin (HCG) activates monocytes to produce interleukin-8 via a different pathway from luteinizing hormone/HCG receptor system." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(11): 5199-5208.

- Krikun, G.** (2012). "Endometriosis, Angiogenesis and Tissue Factor." *Scientifica* **2012**: 10.
- Labied, S., S. Blacher, et al.** (2011). "Transient reduction of placental angiogenesis in PAI-1-deficient mice." *Physiol Gen* **43**(4): 188-198.
- Lessey, B. A.** (2000). "Endometrial receptivity and the window of implantation." *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **14**(5): 775-788.
- Li, A., S. Dubey, et al.** (2003). "IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis." *J Immunol* **170**(6): 3369-3376.
- Licht, P., M. von Wolff, et al.** (2003). "Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and decidua." *Fertil Steril* **79 Suppl 1**: 718-723.
- Lockwood, C. J.** (2011). "Mechanisms of normal and abnormal endometrial bleeding." *Menopause* **18**(4): 408-411.
- Lockwood, C. J., G. Krikun, et al.** (2009). "Decidualized human endometrial stromal cells mediate hemostasis, angiogenesis, and abnormal uterine bleeding." *Reprod Sci* **16**(2): 162-170.
- Lohstroh, P., H. Dong, et al.** (2006). "Daily immunoactive and bioactive human chorionic gonadotropin profiles in periimplantation urine samples." *Biol Reprod* **75**(1): 24-33.
- Lopata, A. y K. Oliva** (1993). "Chorionic gonadotrophin secretion by human blastocysts." *Hum Reprod* **8**(6): 932-938.
- Lunghi, L., M. E. Ferretti, et al.** (2007) Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol* **5**, 6 DOI: 10.1186/1477-7827-5-6
- Llusiá, J. B.** (1997). *El útero: Fisiología y Patología*, Díaz de Santos. <http://books.google.cl/books?id=XyENVKKG99SQC>
- Mahfoudi, A., M. Nicollier, et al.** (1991). "Establishment of endometrial glandular epithelial cell subculture in a serum-free, hormonally defined medium, on a basement membrane matrix." *Biol Cell* **71**(3): 255-265.
- Navot, D., R. T. Scott, et al.** (1991). "The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro." *Fertil Steril* **55**(1): 114-118.

**Norris, W., T. Nevers, et al.** (2011). "Review: hCG, preeclampsia and regulatory T cells." *Placenta* **32 Suppl 2**: S182-185.

**Norwitz, E. R., D. J. Schust, et al.** (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." *N Engl J Med* **345**(19): 1400-1408.

**Oh, S. H., W. Y. Kim, et al.** (2012). "Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Sci* **103**(7): 1259-1266.

**Pietrowski, D., P. Wiehle, et al.** (2010). "Regulation of the angiopoietin-2 gene by hCG in ovarian cancer cell line OVCAR-3." *Horm Metab Res* **42**(5): 328-333.

**Plaisier, M.** (2011). "Decidualisation and angiogenesis." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**(3): 259-271.

**Plaisier, M., S. Rodrigues, et al.** (2007). "Different degrees of vascularization and their relationship to the expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, angiopoietins, and their receptors in first-trimester decidual tissues." *Fertil Steril* **88**(1): 176-187.

**Pollheimer, J., S. Bauer, et al.** (2004). "Expression pattern of collagen XVIII and its cleavage product, the angiogenesis inhibitor endostatin, at the fetal-maternal interface." *Placenta* **25**(10): 770-779.

**Pollheimer, J., P. Haslinger, et al.** (2011). "Endostatin suppresses IGF-II-mediated signaling and invasion of human extravillous trophoblasts." *Endocrinology* **152**(11): 4431-4442.

**Quinn, C. E. y R. F. Casper** (2009). "Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity." *Hum Reprod Update* **15**(2): 229-236.

**Rai, R. y L. Regan** (2006). "Recurrent miscarriage." *Lancet* **368**(9535): 601-611.

**Reshef, E., Z. M. Lei, et al.** (1990). "The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua." *J Clin Endocrinol Metab* **70**(2): 421-430.

**Reyna-Villasmil, E., J. Mejia-Montilla, et al.** (2013) Endostatina sérica en preeclampsia y eclampsia. *Diagnóstico Prenatal* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diapre.2013.03.003>

**Rodriguez, A.** (2005). *Guía de Laboratorio de Histología*, Editorial Universidad de Costa Rica. <http://books.google.cl/books?id=dDuXkB2Bj0QC>

**Rohen, J. W. y E. L. Drecoll** (2007). Embriología funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo, Editorial Medica Panamericana Sa de. [http://books.google.cl/books?id=g\\_uCJe-YEw0C](http://books.google.cl/books?id=g_uCJe-YEw0C)

**Roura, L. C. y D. S. Rodríguez** (2007). Obstetricia y medicina materno-fetal / Obstetrics and Maternofetal Medicine, Editorial Medica Panamericana Sa de. <http://books.google.cl/books?id=AGh8rK1MmOsC>

**Saavedra, M. S., E. E. Filgueira, et al.** (2004). "Formas moleculares de gonadotropina coriónica humana (hCG): Impacto en su medición." *Rev Argent Endocrinol Metab* **41**(1).

**Sadler, T. W. y J. Langman** (2001). Embriología médica: con orientación clínica, Ed. Médica Panamericana.

**Salamonsen, L. A., E. Dimitriadis, et al.** (2003). "Complex Regulation of Decidualization: A Role for Cytokines and Proteases—A Review." *Placenta* **24**: S76-S85.

**Salcedo, R., M. L. Ponce, et al.** (2000). "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression." *Blood* **96**(1): 34-40.

**Saleh, L., G. R. Otti, et al.** (2011) Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reprod Biol Endocrinol* **9**, 155 DOI: 10.1186/1477-7827-9-155

**Sengupta, S., J. Sengupta, et al.** (2008). "Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on expression of vascular endothelial growth factor a (VEGF-a) in human mid-secretory endometrial cells in three-dimensional primary culture." *Indian J Physiol Pharmacol* **52**(1): 19-30.

**Soff, G. A., J. Sanderowitz, et al.** (1995). "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model." *J Clin Invest* **96**(6): 2593-2600.

**Solomon, C. G. y E. W. Seely** (2004). "Preeclampsia -- searching for the cause." *N Engl J Med* **350**(7): 641-642.

**Stefansson, S., G. A. McMahon, et al.** (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling." *Curr Pharm Des* **9**(19): 1545-1564.

**Tabibzadeh, S.** (1998). "Molecular control of the implantation window." *Hum. Reprod. Update* **4** 465-471.

**Tapia-Pizarro, A., F. Argandona, et al.** (2013) Human chorionic gonadotropin (hCG) modulation of TIMP1 secretion by human endometrial stromal cells facilitates extravillous trophoblast invasion in vitro. *Hum Reprod* DOI: 10.1093/humrep/det136

**Tortora, G. y B. Derrickson** (2006). *Anatomía y Fisiología*. E. M. P. S.A.: 1086-1087

**Toth, P., H. Lukacs, et al.** (2001). "Clinical importance of vascular LH/hCG receptors--a review." *Reprod Biol* **1**(2): 5-11.

**Urbina, M. T. y J. L. Biber** (2008). *Fertilidad y Reproducción Asistida*, Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela. <http://books.google.cl/books?id=pyQzvkJ3rDEC>

**Visse, R. y H. Nagase** (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* **92**(8): 827-839.

**Welsch, U. y J. Sobotta** (2009). *Histología, Medica Panamericana*.

**Wira, C. R., J. V. Fahey, et al.** (2005). "Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions." *Immunol Rev* **206**: 306-335.

**Wong, M. L., A. Prawira, et al.** (2009). "Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas." *J Clin Neurosci* **16**(9): 1119-1130.

**Ziecik, A. J., G. Bodek, et al.** (2005). "Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new applicable approach." *Vet J* **169**(1): 75-84.

**Zini, J. M., S. C. Murray, et al.** (1992). "Characterization of urokinase receptor expression by human placental trophoblasts." *Blood* **79**(11): 2917-2929.

**Zygmunt, M., F. Herr, et al.** (2002). "Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(11): 5290-5296.

**Zygmunt, M., F. Herr, et al.** (2003). "Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy." *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **110 Suppl 1**: S10-18.