

INTRODUCCION

Las acuaporinas (AQP) son canales que permiten el pasaje rápido de agua a través de la membrana plasmática en respuesta a gradientes osmóticos o hidrostáticos.

Si bien existen 13 isoformas sólo ha sido reportada una expresión considerable de **AQP1, AQP3 y AQP9** en vellosidades coriónicas humanas durante el primer trimestre de gestación. Recientemente se han descubierto nuevas funciones para estos canales, destacándose su participación en la migración de células epiteliales, endoteliales y tumorales.

El establecimiento de la placenta requiere que las células del citotrofoblasto adquieran un fenotipo invasivo que les permita invadir y remodelar la vasculatura uterina para asegurar un apropiado flujo sanguíneo e intercambio feto-placentario. Una invasión desregulada puede desencadenar patologías placentarias tales como restricción del crecimiento intrauterino y preeclampsia.

OBJETIVO

Evaluar el rol de las AQP_s en la migración e invasión de células del citotrofoblasto humano durante el primer trimestre de gestación

RESULTADOS

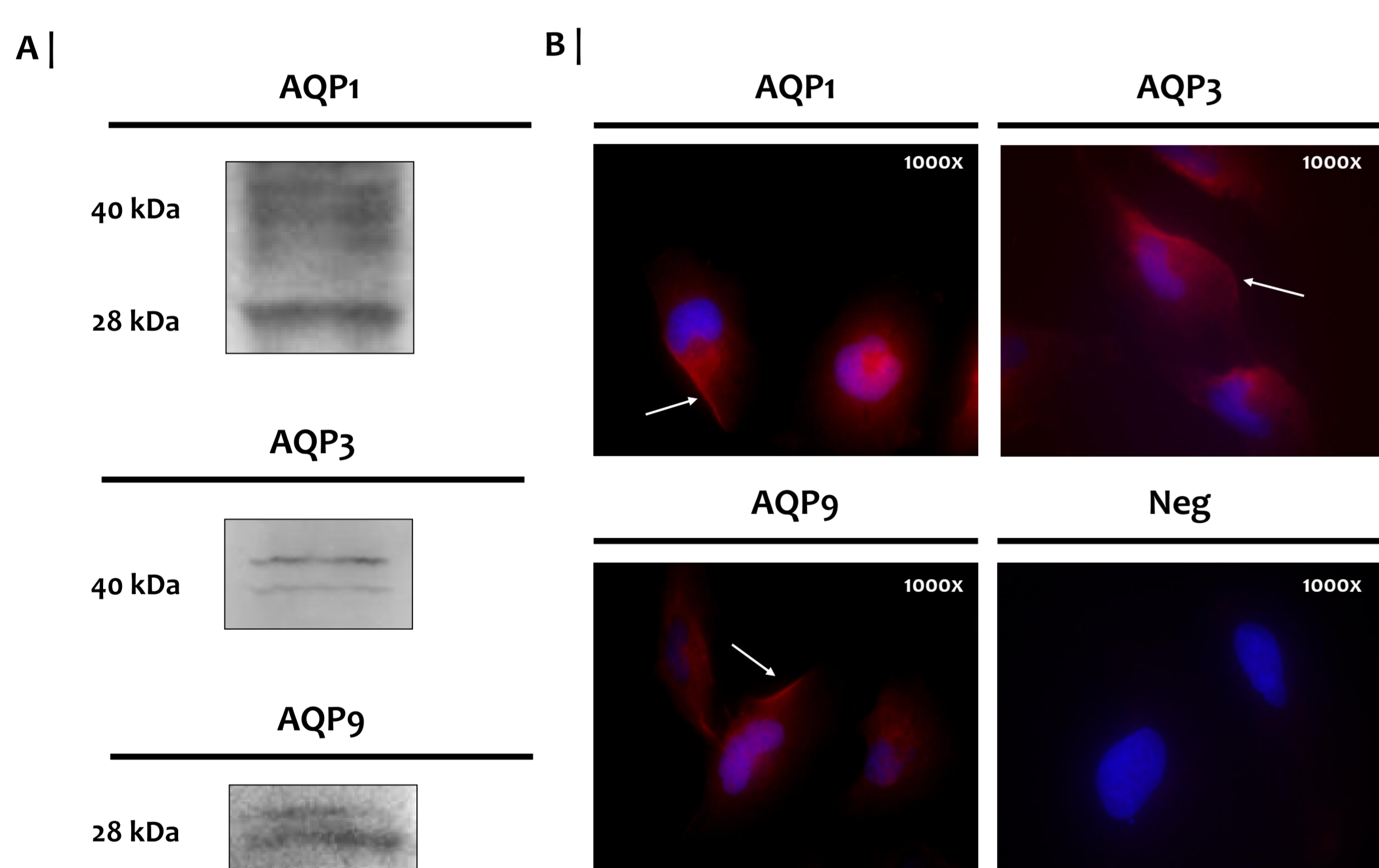


Figura 1. Expresión de AQP1, 3 y 9 en la línea celular Swan 71. A | WB: Se observan formas glicosiladas y no glicosiladas de las distintas isoformas. B | IF: Se observa la expresión de las distintas isoformas, particularmente a nivel de la membrana plasmática.

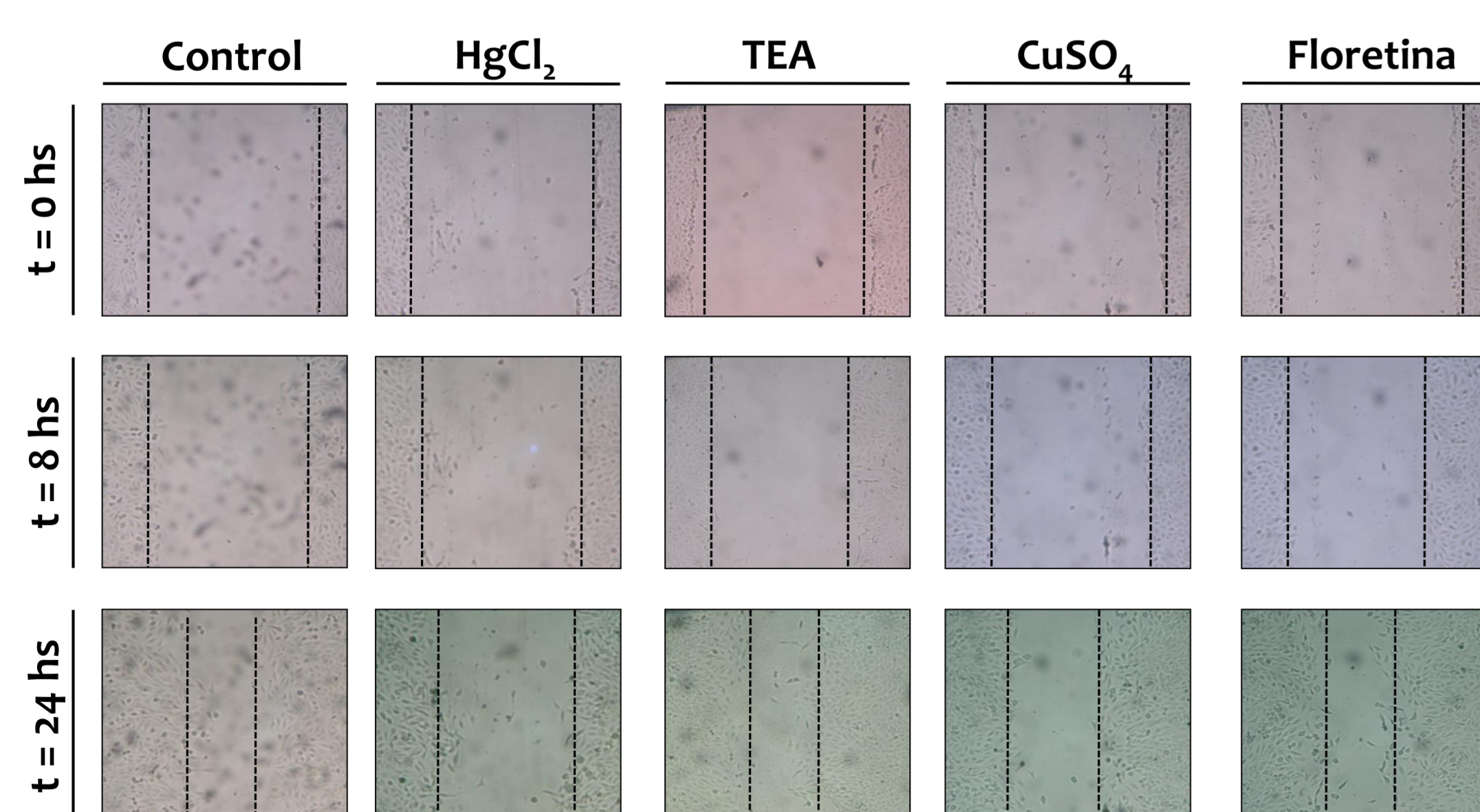


Figura 2. Ensayo de wound healing. Imágenes representativas de la cobertura de la herida frente a los diferentes tratamientos.

MATERIALES y METODOS

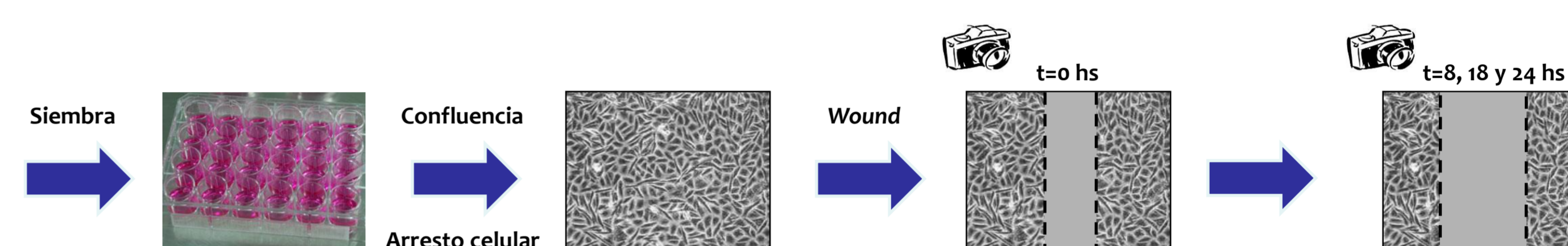
Línea celular utilizada: La línea celular de citotrofoblasto humano de primer trimestre, Swan 71, fue mantenida en DMEM/F12 suplementado con 10% SFB y antibióticos a 37°C en 5% de CO₂.

Western Blot de AQP1, AQP3 y AQP9: Se realizó por medio de Acs específicos frente a AQP1, AQP3 y AQP9 (Alpha Diagnostic, dilución 1/1000) con posterior revelado por medio de Ac 2rio a-conejo IgG conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, dilución 1/30000) y un sistema de detección quimioluminiscente.

Inmunofluorescencia de AQP1, AQP3 y AQP9: Se realizó por medio de Acs específicos frente a AQP1, AQP3 y AQP9 (Alpha Diagnostic, dilución 1/100) con posterior revelado por medio de Ac 2rio conjugado a Texas Red (AbCam). Los núcleos fueron contracolorados por medio de tinción de Hoechst.

Evaluación de la viabilidad celular: Monocapas de Swan 71 fueron sometidas a un arresto de 18 horas en presencia de DMEM/F12 con 0,5% SFB. Se realizaron los siguientes tratamientos: Control (DMEM/F12 0,5% SFB), Inhibición no selectiva de AQP_s (50 µM HgCl₂), Inhibición de AQP1 (100 µM Cloruro de tetraetilamonio, TEA), Inhibición de AQP3 (100 µM CuSO₄) e Inhibición de AQP9 (100 µM Floretina) y se evaluó la viabilidad por medio del ensayo de MTT.

Ensayo wound healing: Monocapas confluentes fueron sometidas a un arresto de 18 horas previo a realizar manualmente el wound y se evaluó el cierre del mismo a las 8, 18 y 24 horas en 5 condiciones experimentales: Control (DMEM/F12 0,5% SFB), Inhibición no selectiva de AQP_s (50 µM HgCl₂), Inhibición de AQP1 (100 µM TEA), Inhibición de AQP3 (100 µM CuSO₄) e Inhibición de AQP9 (100 µM Floretina). La cuantificación de las imágenes fue realizada utilizando el programa Tscratch®.



Ensayo de invasión en transwells tratados con ECM®: Las células fueron sometidas al tratamiento con HgCl₂ o CuSO₄, sembradas y se evaluó la invasión (sobre transwells de 8µ de poro recubiertos con matriz extracelular) a las 24 hs por recuento de las mismas luego de tinción con hematoxilina-eosina.

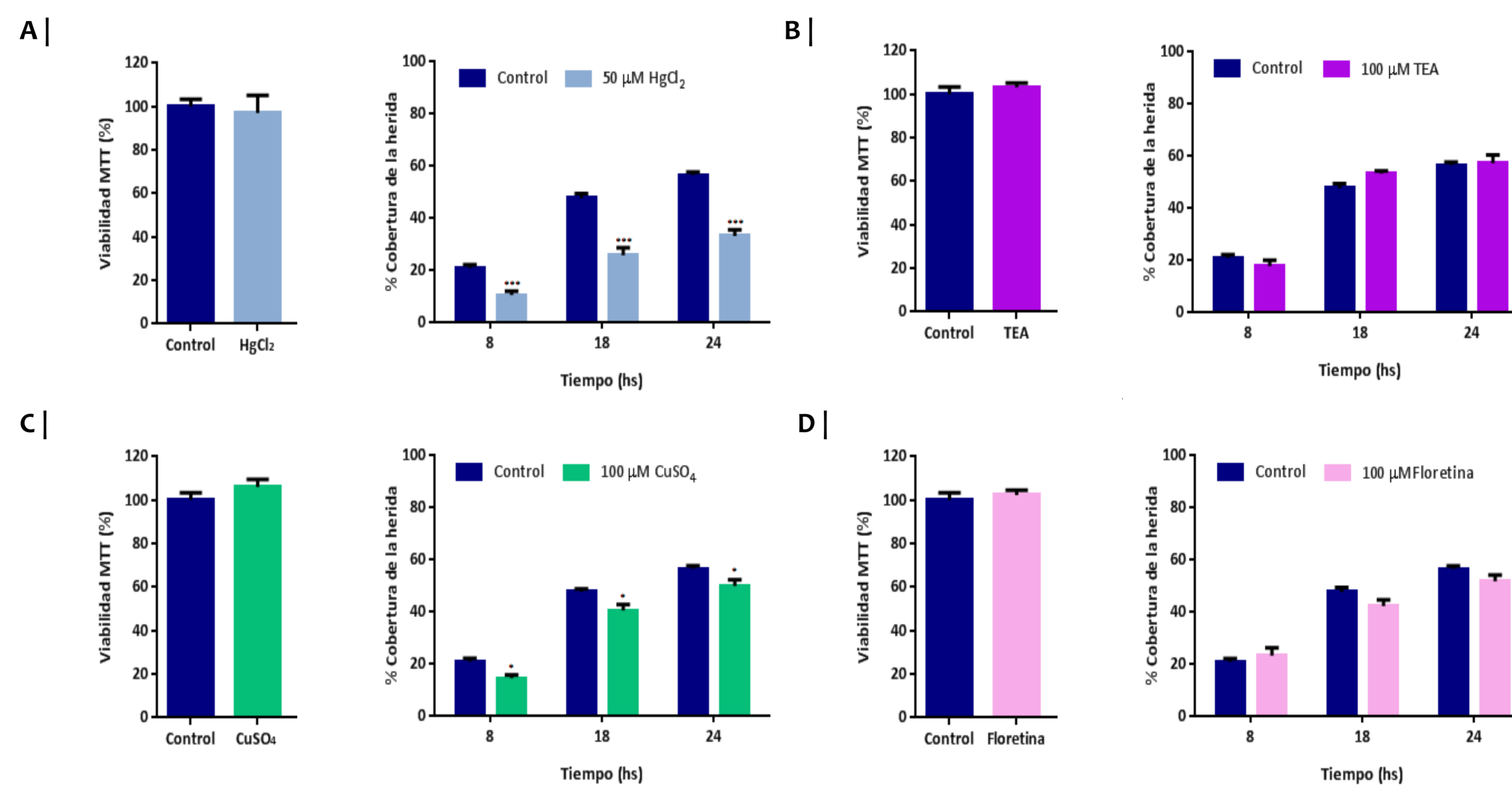


Figura 3. Ensayo de MTT. La viabilidad de la línea celular no resulta afectada por ninguno de los tratamientos efectuados. **Ensayo de wound healing.** Cuantificación de la cobertura de la herida a las 8, 18 y 24 horas luego del tratamiento con HgCl₂ (A), TEA (B), CuSO₄ (C) y Floretina (D). El tratamiento con HgCl₂ redujo significativamente la cobertura de la herida con respecto al control a las 8 (10.36 ± 1.496 vs. 20.77 ± 1.234, n=6, p < 0.05), 18 (25.64 ± 2.865 vs. 47.50 ± 1.824, n=6, p < 0.05) y 24 hs (33.00 ± 2.459 vs. 56.34 ± 1.220, n=6, p < 0.05). No se observaron diferencias con el control en el caso de los tratamientos con TEA y floretina. El tratamiento con CuSO₄ redujo significativamente la cobertura de la herida con respecto al control a las 8 (14.44 ± 1.205 vs. 20.77 ± 1.234, n=6, p < 0.05), 18 (40.40 ± 2.327 vs. 47.50 ± 1.222, n=6, p < 0.05) y 24 hs (49.75 ± 2.380 vs. 56.34 ± 1.220, n=6, p < 0.05).

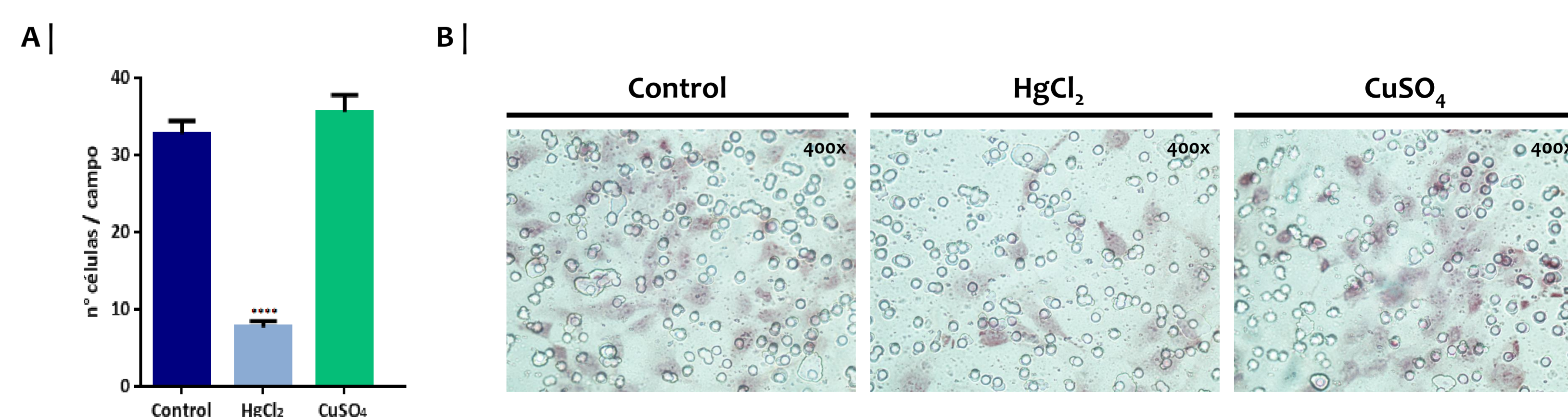


Figura 4. Ensayo de invasión. A | El tratamiento con HgCl₂ atenuó la capacidad invasiva de la línea celular con respecto al control (33 ± 2 células/campo vs. 8 ± 1 células/campo, n=3, p < 0.05) sin embargo no se observaron diferencias con el tratamiento con CuSO₄. B | Imágenes representativas de la invasión luego de 24 hs.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicarían que las AQP_s se encuentran involucradas en la migración e invasión del trofoblasto, siendo la migración un proceso isoforma dependiente a expensas de AQP3, lo que no fue posible verificar en el caso de la invasión, donde podrían existir mecanismos compensatorios mediados por las restantes isoformas.

Por lo tanto, podemos postular que alteraciones en la expresión o funcionalidad de estos transportadores podrían ocasionar defectos en los estadios iniciales de formación de la placenta, afectando el establecimiento de un apropiado intercambio materno-fetal y de esta forma contribuyendo al desarrollo de diversas patologías del embarazo.