

“Determinación del impacto de  
pesticidas organofosforados sobre la  
placenta humana a través de  
modelos *in vitro*”

*Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas*

**Lic. en Bioquímica Clínica  
MAGALI EVELIN RIDANO**

Directora de Tesis: Dra. Graciela M. Panzetta-Dutari

Departamento de Bioquímica Clínica  
CIBICI-CONICET  
Facultad de Ciencias Químicas  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
Córdoba 2015



Alumno: R-I  
Especialidad: 572.86  
Topografía: R  
Código: 13852  
Módulo: Auto  
Semestre: Auto  
Practica:  
Experiencia:  
Indicador:  
Actividad:  
Evaluación:  
Fecha de ingreso: 02/12/20

JMU		
-----	--	--

**Directora de Tesis**

Dra. Graciela M. Panzetta-Dutari

**Comisión de Tesis**

Dr. Ricardo Fretes

Dra. Liliana Cancela

Dra. Andrea Smania

Handwritten signatures in blue ink for Ricardo Fretes, Liliana Cancela, and Andrea Smania.

**Evaluador Externo**

Dra. Elisa Cebra

Handwritten signature in blue ink for Elisa Cebra.

*"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la Ciencia logra abrir"*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMIENTOS

*Uno mira hacia atrás con agradecimiento a los maestros brillantes, pero con gratitud a aquellos que tocaron nuestros sentimientos humanos. El plan de estudios es tanto la materia prima necesaria, pero el calor es el elemento vital de la planta en crecimiento y para el alma del niño". Carl Jung*

En primer lugar agradezco a Dios por guiar mis pasos y darme fuerza para siempre seguir adelante.

Gracias al personal docente y no docente del Dpto. de Bioquímica Clínica y del CIBICI por aceptarme dentro del equipo de trabajo, por su ayuda y formación. También gracias a los agentes que financiaron el proyecto: CONICET, FONCyT, SACyT, SECyT y CICAL.

Muchas personas han contribuido de una u otra forma a que este trabajo de tesis pueda llevarse a cabo y estoy muy agradecida a cada uno de ellos.

A mi directora de tesis, Dra. Graciela Panzetta-Dutari, por aceptarme para realizar el doctorado bajo su dirección y en una temática nueva para su grupo de trabajo. Gracias por la confianza, el apoyo, la ayuda y la libertad para adentrarme en el proyecto.

Gracias también a la Dra. Susana Genti por su ayuda y apoyo constante y por sus gestos sinceros más allá de lo académico.

A los miembros de mi comisión de tesis, por sus contribuciones positivas y su buena predisposición, y a la evaluadora externa por aceptar evaluar este trabajo.

Al Dr. Ricardo Fretes y su equipo por su gran ayuda para analizar los datos del último capítulo de esta tesis y por la paciencia, predisposición y perfección para realizar los cortes y marcaciones histológicas.

A la Dra. Estela Bevilacqua por su calidez al recibirme en su laboratorio y en su casa y por sus enseñanzas experimentales y humanas. A todo su grupo de trabajo que me ayudó y me hizo sentir en casa, en especial a Carla Bandeira, Alexander Borbely, Rodrigo Barbano, Fernanda Carini da Silva y Karoll Nacimiento.

A las enfermeras del Hospital Privado de Córdoba por su ayuda y buena predisposición para la recolección de las placentas, en especial a Marta Taborda y Lita.

Al grupo de compañeros y amigos del laboratorio 120, gracias por su cariño y ayuda y por la calidez que me han brindado en cada jornada laboral. Son muchos los que han estado y están, cada uno ha dejado su huella positiva, gracias a TODOS. En especial, a Jesi y Ana, por su paciencia, ayuda y afecto constante. A Lucy, Iris, Luci junior, Ana Lia, Nubi, Meli, Hernán, Lucas, Ale, Paulo, Gastón, Mati, Gonzalo y Juan por estar siempre brindando su apoyo y cariño. A Sofi, Vivi, Sole, Vero y Andrea, que aunque ya no están en el laboratorio han dejado su huella.

A mis amigas y colegas del laboratorio 9, Emi y Cande por su apoyo y alegría.

Al Dr. Patrito, Dr. Bocco, Dra. Alvarez, Dr. Echenique y Dra. Sola por su colaboración en cada seminario y en la tarea diaria del laboratorio.

En lo personal, gracias al amor, apoyo y libertad que me ha dado siempre mi familia: A mis amados padres, Adriana y Pilo, y mi queridísimo hermano Ariel; a mi tío por hacerme conocer el mundo de la ciencia; a mis abuelos, en especial a mi nono por darme motivación desde el cielo; y a mi novio Gustavo, por su amor, ayuda y paciencia, y por alegrar mis días en esta última etapa.

Finalmente, a mis mejores amigas de la vida por respetar mis tiempos, apoyarme y brindarme su cariño. A las que están lejos pero cerca: Vale, Natí, Ali, Gabi, Maris (1 y 2) y a las que están aquí a mi lado, Romi y Pau.

*GRACIAS. de corazón.*

# ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	<u>1</u>
<u>RESUMEN</u>	<u>5</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>9</u>
<u>INTRODUCCIÓN: Primera parte</u>	<u>3</u>

## 1. La placenta humana: Interfase materno-fetal

- 1.1. Características principales (15-17)
- 1.2. Breve reseña del desarrollo placentario (17-18)
- 1.3. CTBv : Sincialización y mantenimiento de la Barrera Placentaria (18-25)
- 1.4. CTBev: Clasificación y funciones asociadas (25-28)
- 1.5. Placenta y patologías asociadas al embarazo (28-30)
- 1.6. Rol de la placenta frente a la presencia de xenobióticos (30-35)
- 1.7. Modelos experimentales para el estudio del efecto de tóxicos sobre la placenta humana (35-36)

<u>INTRODUCCIÓN: Segunda parte</u>	<u>37</u>
------------------------------------	-----------

## 2. Pesticidas o plaguicidas

- 2.1. Situación socioeconómica actual (37-40)
- 2.2. Definición y clasificación (40-41)
- 2.3. Características generales de plaguicidas OP (organofosforados) (42-43)
- 2.4. Exposición humana a pesticidas (43-45)
- 2.5. Biomarcadores asociados a OP (45-46)
- 2.6. Toxicidad de pesticidas OP sobre la salud humana (46-49)
- 2.7. Efectos de plaguicidas OP sobre la gestación y la placenta humana (49-51)

<u>HIPÓTESIS y OBJETIVOS</u>	<u>52</u>
------------------------------	-----------

<u>MATERIALES y MÉTODOS</u>	<u>55</u>
-----------------------------	-----------

## 1. CPF (Clorpirifos): Modo de uso y controles (56)

## 2. Líneas celulares eucariotas: JEG-3, BeWo y HTR-8/SVneo

- 2.1. Cultivo y exposición a CPF o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (56-57)
- 2.2. Exposición de las células JEG-3 a N-acetilcisteína (NAC) (57-58)
- 2.3. Silenciamiento de las células JEG-3 con ARN pequeños de interferencia (siARN) (58)

## 3. Cultivos a partir de placentas humanas normales a término

- 3.1. Explantos vellosos: Obtención, cultivo y exposición a CPF (58-59)
- 3.2. Purificación de CTBv (59-60)
- 3.3. CTBv: Cultivo y exposición a CPF (61)
- 3.4. CTBv: Cálculo del índice de fusión (61)
4. Evaluación de la viabilidad celular
  - 4.1. Ensayos de MTT (62)
  - 4.2. Tinción con Naranja de Acridina (NA) y Bromuro de Etidio (BE) (62-63)
  - 4.3. Tinción con Hoechst (63)
5. Evaluación de la proliferación, migración, e invasión celular
  - 5.1. Ensayo de proliferación celular basado en la captación de Bromodeoxiuridina (BrdU) (63-64)
  - 5.2. Ensayo de migración celular por cierre de la herida (64)
  - 5.3. Ensayo de invasión celular (64-65)
6. Detección de la producción de EROs (65)
7. Determinación de niveles de transcritos
  - 7.1. Purificación de ácido ribonucleico (ARN) total de cultivos celulares: Integridad y pureza (66)
  - 7.2. Reacción de transcripción reversa: Conversión de ARN a ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) (66-67)
  - 7.3. Amplificación semicuantitativa de ADNc de Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (67)
  - 7.4. Amplificación cuantitativa de ADNc por PCR a tiempo real (qPCR) (67-69)
8. Análisis proteico: Western blot e inmunomarcaciones
  - 8.1. Detección de proteínas por western blot (69-70)
  - 8.2. Inmunofluorescencias sobre células (70-71)
  - 8.3. Inmunofluorescencias sobre tejido (71-72)
  - 8.4. Inmunohistoquímicas (72)
  - 8.5. Cuantificación de secreción hormonal (72)
9. Análisis histológico
  - 9.1. Microscopía óptica (72-73)
  - 9.2. Microscopía electrónica (73)
10. Análisis estadístico (73)



- 1.1. Trofoblastos vellosos (75-80)
- 1.2. Trofoblastos extravellosos (81-83)
- 1.3. Conclusiones CAPITULO I (83-84)

---

RESULTADOS: CAPÍTULO II 85

2. Consecuencias de la exposición al pesticida CPF en procesos celulares asociados a las funciones biológicas de los trofoblastos

- 2.1. Diferenciación trofoblástica vellosa (85-88)
- 2.2. Proliferación, migración e invasión de trofoblastos extravellosos (88-91)
- 2.3. Conclusiones CAPITULO II (91)

---

RESULTADOS: CAPÍTULO III 92

3. Efecto de CPF sobre la expresión de genes importantes para la función placentaria

- 3.1. Trofoblastos vellosos (92-100)
- 3.2. Trofoblastos extravellosos (100-103)
- 3.3. Conclusiones CAPITULO III (109-110)

---

RESULTADOS: CAPÍTULO IV 105

4. Estudio de factores moleculares potencialmente involucrados en los efectos de CPF sobre el trofoblasto vellosa

- 4.1. Rol de las EROs en la producción de  $\beta$ -hCG (105-107)
- 4.2. Participación del factor de transcripción Nrf2 (107-109)
- 4.3. Participación del factor de transcripción KLF6 (109-112)
- 4.4. Rol de  $\beta$ -hCG en la viabilidad celular y homeostasis redox (112-115)
- 4.5. Conclusiones CAPITULO IV (115)

---

RESULTADOS: CAPÍTULO V 116

5. Efectos de CPF sobre las vellosidades coriónicas

- 5.1. Evaluación mediante Microscopía Óptica (116-124)
- 5.2. Evaluación utilizando Microscopía Electrónica (125)
- 5.3. Conclusiones CAPITULO V (125-126)

---

CONCLUSIÓN GENERAL 127

---

DISCUSIÓN 129

---

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS 150

---

BIBLIOGRAFÍA 152

**ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

<b>ABCG2</b>	Segundo miembro de la subfamilia G de transportadores ABC o proteína resistente al cáncer de mama (del inglés, ATP-binding cassette sub-family G member 2; también llamada BCRP)
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AchE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNasas</b>	Enzimas que degradan ADN
<b>ADNc</b>	ADN copia o complementario
<b>AhR</b>	Receptor de hidrocarburos aromáticos
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante (del inglés, Antioxidant Response Element)
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasas</b>	Enzimas que degradan ARN
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>BE</b>	Bromuro de etidio
<b>BrdU</b>	Bromodeoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bobina (del inglés, Bovine serum albumin)
<b>β-hCG</b>	Subunidad β de la hormona gonadotropina coriónica
<b>CaE</b>	Carboxilesterasa
<b>CAR</b>	Receptor constitutivo de androstano
<b>CAT</b>	Catalasas
<b>CPF</b>	Clorpirifos (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate)
<b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico (del inglés, cyclic AMP response element binding protein)
<b>CTB</b>	Citotrofoblastos
<b>CTBev</b>	CTB extravellosos
<b>CTBv</b>	CTB vellosos
<b>CYPs</b>	Enzimas citocromo P450
<b>DAP</b>	Metabolitos dialquilfosfatos
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DL50</b>	Dosis letal media
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, Epidermal Growth Factor)
<b>EPA</b>	Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos (del inglés, Environmental Protection Agency)
<b>EROs</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>FAO</b>	Organización de agricultura y alimentos de las naciones unidas (del inglés, Food and Agriculture Organization of the United Nations)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>Flt1</b>	Receptor 1 del VEGF
<b>FSG</b>	Gelatina de piel de pescado (del inglés, Fish Skin Gelatin)
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa
<b>GCM1</b>	Factor ausente de las células gliales 1 (del inglés, Glial Cell Missing 1)
<b>GR</b>	Receptor de glucocorticoides

<b>GS</b>	Suero de cabra (del inglés, Goat Serum)
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>hCG</b>	Hormona gonadotropina coriónica
<b>HANKS</b>	Solución salina balanceada (también llamada HBSS, del inglés, Hank's balanced salt solution)
<b>He-Eo</b>	Hematoxilina - eosina
<b>H-hCG</b>	hCG hiperglicosilada
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducible por hipoxia 1 alfa (del inglés, Hipoxia Inducible Factor 1 alpha)
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano (del inglés, Human Leukocyte Antigen)
<b>HO-1</b>	Hemoxigenasa 1
<b>hPL</b>	Hormona lactógeno placentaria humana
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	2',7' diclorodihidrofluoreceína diacetato
<b>KGM</b>	Medio de crecimiento para queratinocitos (del inglés, Keratinocyte Growth Medium)
<b>ki-67</b>	Antígeno nuclear asociado con proliferación celular
<b>KLF6</b>	Factor 6 de la familia tipo Krüppel (del inglés, Krüppel like factor 6)
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MOPS</b>	Tampón ácido 3-(Nmorfolino)propanesulfónico
<b>MRP2</b>	Proteína de resistencia a multi-drogas 2 (del inglés, Multidrug Resistance-associated Protein 2)
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NA</b>	Naranja de acridina
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>Nrf2</b>	Factor de transcripción 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (del inglés, Nuclear factor-erythroid 2-Related Factor 2)
<b>OC</b>	Organoclorados
<b>OECD</b>	Organización para el desarrollo y la cooperación económica (del inglés, Organisation for Economic Co-operation and Development)
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>OP</b>	Organofosforados
<b>PAHs</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (del inglés, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)
<b>PAS</b>	Ácido periódico de Schiff
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PBS-T</b>	PBS suplementado con 0,2% v/v de tween-20
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>P-gp</b>	Glicoproteína-p (también llamada MDR1, ABCB1 o CD243)
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C (del inglés, protein kinase C)
<b>PON</b>	Paraoxonasa
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (del inglés, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
<b>PSG</b>	Glicoproteínas Específicas del Embarazo (del inglés, Pregnancy Specific Glycoproteins)
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa (del inglés, quantitative PCR)
<b>qRT-PCR</b>	Transcripción reversa seguida de qPCR (del inglés, quantitative Reverse Transcription - PCR)
<b>RCIU</b>	Retardo en el crecimiento intrauterino
<b>SCB</b>	Mezcla de ARN pequeños al azar (del inglés, Scrambled)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio (del inglés, sodium dodecyl sulfate)
<b>SFB</b>	Suero fetal bobino
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasas

<b>sFlt1</b>	Forma soluble del receptor Flt1
<b>siARN</b>	ARN pequeños de interferencia (del inglés, Small interference RNA)
<b>siKLF6</b>	siARN específico para KLF6
<b>siNrf2</b>	siARN específico para Nrf2
<b>sihCG</b>	siARN específico para $\beta$ -hCG
<b>STB</b>	Sinciciotrofoblasto
<b>StarD7</b>	Proteína 7 que posee el dominio Star asociado al transporte lipídico (del inglés, StAR-related lipid transfer domain protein 7)
<b>Syn</b>	Sincitina
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TCP</b>	3,5,6-tricloro-2-piridinol
<b>TBS</b>	Tampón salino de 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (del inglés, Tris-buffered saline)
<b>TBS-T</b>	TBS suplementado con 0,2% v/v de tween-20
<b>TGF<math>\beta</math>-1</b>	Factor de crecimiento transformante beta-1
<b>VDR</b>	Receptor de la Vitamina D
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés, Vascular Endotelial Growth Factor)

RESUMEN

## RESUMEN

La placenta cumple funciones vitales en la gestación del ser humano. Es el órgano que media la interrelación entre la madre y el individuo en gestación, permitiendo la implantación y la transferencia de nutrientes, hormonas y gases, así como de productos de desecho. Su desarrollo normal está directamente relacionado con el éxito del embarazo y la salud materno-fetal a corto y largo plazo. Consecuentemente, es de gran importancia investigar si la exposición maternal a contaminantes ambientales puede afectarla.

En las últimas décadas, la exposición a pesticidas ha incrementado notablemente debido a su uso para proteger las cosechas y mantener los ambientes libres de insectos. En este sentido, los plaguicidas organofosforados (OP) forman parte de los insecticidas químicos de mayor uso. Sus efectos tóxicos más estudiados se deben a la inhibición de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y esterasa neurotóxica, llevando a síntomas característicos de neurotoxicidad aguda y retardada respectivamente. Además, se han descrito otros mecanismos por los cuales los OP provocan una acción tóxica directa sobre distintos tejidos.

Algunos estudios han reportado un aumento en el riesgo de alteraciones en el embarazo de mujeres expuestas a estos pesticidas, sin embargo, los resultados son controvertidos y muy pocos estudios han explorado si las células y funciones placentarias se ven afectadas por la presencia de OP. La principal limitación de los estudios poblacionales sobre los efectos de plaguicidas es la incapacidad de demostrar de manera absoluta la relación causa-efecto y de detectar daños que lleven a la pérdida muy temprana de un embarazo. Por lo tanto, los avances en este sentido requieren de su complementación con estudios *in vitro* que permitan individualizar los efectos de un tóxico en particular sobre las células y estructura de la placenta humana.

En esta Tesis Doctoral se propuso caracterizar el efecto del pesticida OP Clorpirifos (CPF) sobre la placenta humana empleando modelos *in vitro*.

La viabilidad de las líneas celulares trofoblásticas JEG-3 y BeWo, así como la de cultivos primarios de citotrofoblastos vellosos (CTBv), no se alteró marcadamente en los tratamientos con CPF en las condiciones ensayadas, sugiriendo que estas células poseen mecanismos de resistencia efectivos a dosis de CPF reportadas como citotóxicas en modelos

de células neuronales. En comparación con los CTBv, las células HTR8/SV-neo, provenientes de citotroblastos extravelosos (CTBev), fueron más sensibles a CPF en concentraciones elevadas, mostrando una reducción en su viabilidad cercana al 35%.

La diferenciación de los CTBv y la capacidad proliferativa, migratoria e invasiva de los CTBev no fueron significativamente alterados en condiciones de exposición al tóxico en las cuales se mantuvo la viabilidad celular. Sin embargo, CPF alteró la expresión de genes relevantes para la función placentaria. En los modelos celulares de trofoblastos vellosos, CPF indujo la transcripción de la subunidad  $\beta$  de la hormona gonadotropina coriónica ( $\beta$ -hCG), de los transportadores de eflujo ABCG2 y glicoproteína P (P-gp), y del factor de transcripción específico de placenta GCM1. CPF generó también un aumento en la síntesis de  $\beta$ -hCG y de los transportadores de eflujo evaluados y un aumento en la secreción de  $\beta$ -hCG pero no de progesterona y estradiol. En el modelo de CTBev, se observó una disminución en la transcripción del receptor 1 del factor de crecimiento del endotelio vascular (Flt1), así como, del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y, a la mayor dosis evaluada, del factor de transcripción activado mediante unión a ligando PPAR $\gamma$  y de  $\beta$ -hCG.

En relación a los factores moleculares potencialmente involucrados en los efectos de CPF sobre el trofoblasto vellosos, se demostró que el aumento en la expresión de  $\beta$ -hCG es parcialmente dependiente de las especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas por el tóxico y del factor de transcripción tipo krüppel KLF6. En un trabajo en colaboración, se describió que CPF desencadena una respuesta antioxidante mediada, al menos en parte, por el factor de transcripción 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2). En esta tesis, se demostró que, de acuerdo a lo esperado, Nrf2 regula la expresión basal de ABCG2 en las células JEG-3, sin embargo, tanto el aumento de  $\beta$ -hCG como de ABCG2 inducido por CPF sería mediante un mecanismo independiente del mismo. Por otra parte,  $\beta$ -hCG participaría en la homeostasis redox de las células JEG-3, pero no sería necesaria para la supervivencia de las mismas en presencia de CPF, al menos en las condiciones de dosis y tiempo ensayadas.

Finalmente, se evaluó el impacto de CPF sobre las vellosidades coriónicas, observándose marcadas alteraciones morfológicas a nivel de microscopía óptica y electrónica. CPF indujo alteraciones compatibles con modificación de la composición estromal y apoptosis de células intravellositarias; y engrosamiento de la membrana basal y alteraciones en la disposición y morfología de núcleos de la barrera trofoblástica. Además, a

la dosis del tóxico más elevada ensayada, se observó marcada desorganización vellositaria y daño tisular sugerente de necrosis trofoblástica.

En conjunto los resultados indican que los trofoblastos vellosos poseen mecanismos de resistencia a la citotoxicidad por CPF, entre los cuales podemos incluir el incremento en la respuesta antioxidante, la producción de transportadores de eflujo y, posiblemente, el incremento de  $\beta$ -hCG. Sin embargo, en la vellosidad coriónica existirían otros mediadores, celulares o no, más sensibles a la toxicidad del CPF, que inducirían daño tisular marcado incluso sobre el epitelio trofoblástico.

Este estudio ha contribuido al conocimiento de los efectos de CPF sobre la placenta humana y de la respuesta del trofoblasto frente al pesticida; ha revelado nuevos blancos moleculares trofoblásticos que deberían ser considerados en la evaluación de las consecuencias de la exposición *in vivo* sobre el embarazo; y ha demostrado la importancia de abarcar diversos modelos experimentales para estudiar la toxicidad de un compuesto en particular sobre la placenta humana.

# ABSTRACT

## ABSTRACT

The placenta fulfills vital functions in human pregnancy. It is the interface between the mother and the unborn child, it allows implantation, secretes hormones that maintain pregnancy, and mediates the exchange of nutrients and metabolic waste products. Its normal development is directly related to the success of pregnancy as well as to short- and long-term health of the mother and the fetus. Consequently, it is important to investigate whether maternal exposure to environmental contaminants can disturb its development or function.

In recent decades, exposure to pesticides has significantly increased due to their use to protect crops and to keep insect-free environments. Organophosphorous (OP) pesticides are among the most widely used chemical insecticides. Their main toxic effect is the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) and neurotoxic esterase leading to characteristic symptoms of neurotoxicity. However, other mechanisms that cause a direct toxic action on various tissues have been described.

Some studies have reported an increased risk of abnormal pregnancy in women exposed to these pesticides. However, the results are controversial and few studies have explored whether cells and placental functions are affected by the presence of OP. The main limitation of population studies on the effects of pesticides is to unequivocally prove cause-effect and to detect damage that lead to early pregnancy loss. Therefore, progress in this regard requires *in vitro* studies in order to identify toxic effects particularly on the cells and structure of the human placenta.

The aim of this Thesis was to characterize the effect of chlorpyrifos (CPF), the most widely used OP pesticide, on human placenta using *in vitro* models.

Trophoblastic viability in JEG-3 and BeWo cell lines, and primary cultures of villous cytotrophoblast (CTBv), was not significantly altered in CPF treatments. The results suggest that villous trophoblasts have effective resistance mechanisms against doses of CPF that have been reported to be cytotoxic in neuron cell models. The HTR8/SV-neo cells, an extravillous cytotrophoblast (CTBev) cell model, were more sensitive to the cytotoxic effect at high concentrations, showing a cell viability reduction of about 35%.

CTBv differentiation as well as proliferative, migratory and invasive capacity of CTBv were not significantly impaired in toxic exposure conditions where cell viability was maintained. However, CPF altered the expression of genes relevant for placental function. In the villous trophoblast cell models, CPF induced the transcription of the human chorionic gonadotropin  $\beta$  subunit ( $\beta$ -hCG), of the efflux transporters ABCG2 and P-glycoprotein (P-gp), and of the placenta specific transcription factor, GCM1. CPF also increased the synthesis of  $\beta$ -hCG and the efflux transporters, as well as, the secretion of  $\beta$ -hCG but not progesterone and estradiol. A decrease in the transcription of the vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt1) and the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ), and, at high doses, of the transcription factor activated by ligand, PPAR $\gamma$ , and  $\beta$ -hCG were observed in the CTBv cell model.

Regarding to the molecular factors potentially involved in the effects of CPF on villous trophoblast cells, the increased expression of  $\beta$ -hCG was partially dependent on reactive oxygen species and on the Krüppel-like transcription factor 6, KLF6. In a collaborative research done during this thesis, it was described that CPF triggers an antioxidant response mediated, at least in part, by the Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). In this thesis, we showed that, as expected, Nrf2 regulates the basal expression of ABCG2, however, both, the increase in  $\beta$ -hCG and ABCG2 by CPF were induced by an Nrf2 independent mechanism. On the other hand, results suggest that  $\beta$ -hCG participates in the redox homeostasis of JEG-3 cells but it is not necessary for cell survival in the presence of CPF, at least under the dose and time conditions assayed.

Finally, the impact of CPF on chorionic villus was assessed. Clear morphological alterations were detected by optical and electron microscopy. They included modifications on stroma composition and increased intervillous cell apoptosis, basal membrane enlargement and nuclear disposition and morphological alterations on trophoblasts. Also, at the highest assayed doses, clear villous disorganization and tissue damage were observed, suggesting trophoblast necrosis.

Overall, the results of this Thesis indicate that villous trophoblast cells activate CPF cytotoxicity resistance mechanisms, among which we can include an increased antioxidant response, production of efflux transporters and, increased synthesis and secretion of  $\beta$ -hCG. However, in the chorionic villus there are other cellular or acellular mediators, more sensitive to the toxicity of CPF, that may induce damage to the placenta.

This study has contributed knowledge about CPF effects on the human placenta and on the trophoblast response to this pesticide; has revealed new molecular targets that should be considered in assessing the consequences of the *in vivo* exposure to CPF on pregnancy; and it has also demonstrated the importance of covering various experimental models for studying the toxicity of a particular compound on human placenta.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN: Primera parte

### 1. La placenta humana: Interfase materno-fetal

La placenta posee un papel esencial durante la gestación de mamíferos placentarios como los humanos. Llega a ser desechable después del nacimiento del bebé, lo que hace que sea el único órgano del cuerpo humano que cumple una función vital y luego se vuelve obsoleta. Es una pieza biológica extremadamente compleja que permite que la sangre del individuo en gestación y de la madre realicen complejos y continuos intercambios, sin entrar en contacto y sin mezclarse, para el suministro de nutrientes y de oxígeno al bebé y el movimiento de los productos de desecho, como el dióxido de carbono, de vuelta hacia la madre. Por lo tanto, este órgano actúa como el pulmón, el riñón y el sistema digestivo del bebé. También juega un papel importante en la producción de hormonas. La gonadotropina coriónica humana (hCG) es producida por ella y es responsable de la producción de otras hormonas como el estrógeno y la progesterona. Además, tiene el rol de proteger al bebé durante la gestación frente a posibles infecciones o daños causados por sustancias que se encuentran en el medio ambiente uterino o son utilizadas por la madre, como el alcohol, las drogas, los contaminantes y los disruptores endócrinos (Nicholson 2013). La placenta regula el ingreso de xenobióticos al feto ya que expresa transportadores de membrana y enzimas que participan en su metabolismo (Prouillac y Lecoœur 2010 y Pavék 2013). Finalmente, este órgano también juega un papel central en el mantenimiento de un estado inmunológicamente privilegiado que protege al feto del sistema inmune materno (Hemberger 2013).

La placenta es el órgano humano menos entendido y podría decirse que uno de los más importantes, no sólo para la salud de la mujer y su feto durante el embarazo, sino también para la salud de toda la vida de ambos. La estructura y la función placentaria afectan a la salud de la madre, como se ha visto en el desarrollo de resistencia a la insulina y de preeclampsia, hipertensión gestacional y eclampsia. La disfunción placentaria afecta al feto, causando la prematuridad y anomalías del crecimiento fetal y desarrollo neurológico. Además, el concepto de "Orígenes placentarios de la enfermedad de adultos" se deriva de estudios donde las variaciones en el desarrollo de la placenta afectan el suministro de nutrientes al feto y el desarrollo de sistemas vinculados a enfermedades de los adultos. En

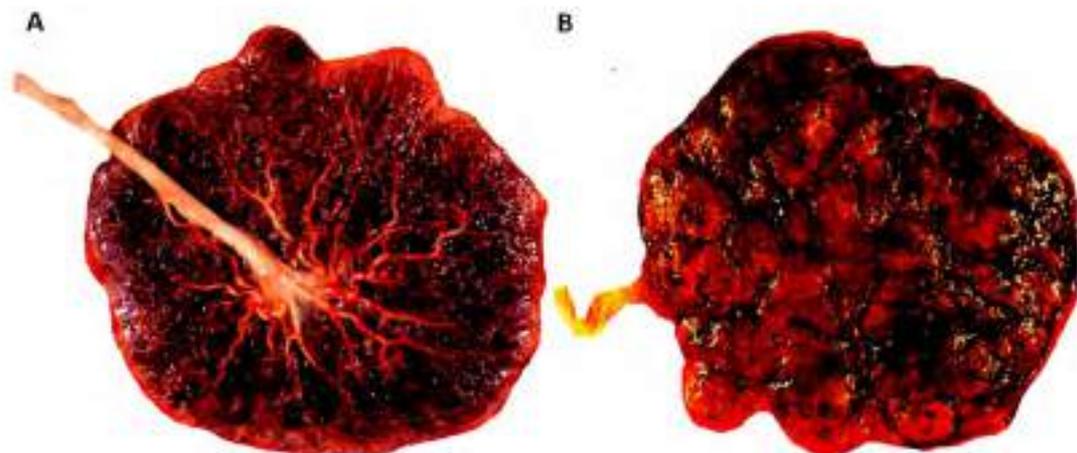
este sentido, el tamaño y la forma de la placenta se han relacionado con la nutrición materna y con la expectativa de vida de los individuos gestados (Guttmacher et al. 2014; Myatt 2006; Rogers y Velten 2011).

La creciente evidencia sobre la importancia del desarrollo de la placenta en la salud actual y futura de la madre y de los hijos, llevó a una urgente necesidad de aumentar el conocimiento sobre este órgano. En este sentido, recientemente el Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano de Estados Unidos (NICHD, del inglés National Institute of Child Health and Human Development), ha promovido la creación del "Proyecto Placenta Humana", el cual se espera que posea un impacto histórico en la investigación y en la salud de las personas. Los objetivos de esta nueva iniciativa son: (a) mejorar los métodos actuales y desarrollar nuevas tecnologías para la evaluación en tiempo real del desarrollo placentario, (b) aplicar estas tecnologías a la evaluación en tiempo real del desarrollo y función normal y anormal de la placenta y, (c) desarrollar y evaluar marcadores no invasivos para la predicción de resultados adversos del embarazo, (d) decodificar las contribuciones del desarrollo placentario a la salud y la enfermedad a largo plazo, y (e) desarrollar intervenciones para disminuir la incidencia y la gravedad de los anomalías en la placenta y acrecentar así la salud en el embarazo y durante toda la vida (Guttmacher et al. 2014; Jocelyn 2014; Sadovsky et al. 2014).

### **1.1. Características principales**

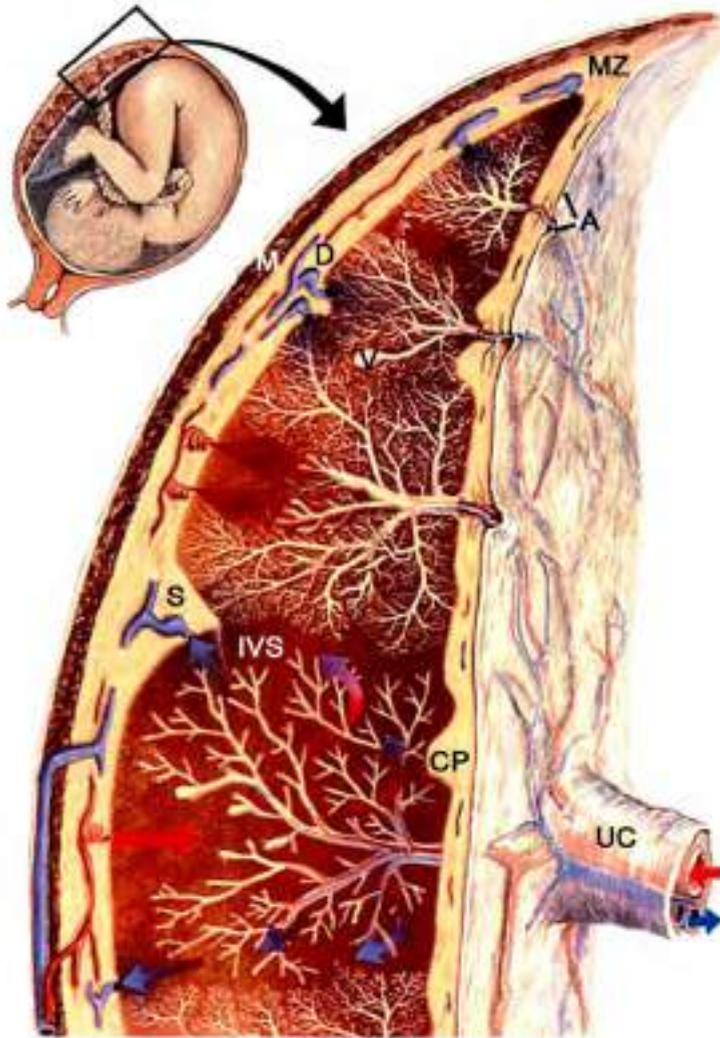
La placenta humana es de tipo hemocorial, lo que significa que invade el endometrio contactándose directamente con la sangre materna. Esta invasión controlada le permite anclarse a la pared uterina manteniendo al feto interaccionando de forma directa con la madre (Benirschke et al. 2012).

En la placenta ya formada pueden distinguirse claramente: la cara fetal, con las arterias y venas de grueso calibre que convergen hacia el cordón umbilical y se direcciona hacia la cavidad amniótica (Fig. 1 A), y la cara materna que se encuentra en contacto íntimo con el útero (Fig. 1 B) (Benirschke et al. 2012).



**Fig. 1. Placenta humana normal a término.** Se muestran la cara apical o fetal (A), donde se observa la inserción levemente excéntrica del cordón umbilical y las arterias y venas coriónicas; y la cara basal o materna (B), subdividida en lóbulos llamados cotiledones. Extraído del Libro: "Pathology of the Human Placenta" (Benirschke et al. 2012).

La cara fetal está recubierta por el saco amniótico que cubre al embrión. El saco está formado por la membrana interna, el amnios, que contiene el líquido amniótico; y la membrana externa, el corion, que envuelve al amnios y forma parte de la placenta. Dentro de la placenta se encuentran los cotiledones, constituidos principalmente por vellosidades coriónicas. Las vellosidades coriónicas contienen en su interior a los vasos fetales y se encuentran bañadas por la sangre materna. Existen vellosidades libres y otras de anclaje que contactan con la decidua (Fig. 2). Se denomina decidua a la porción del útero adyacente a la placenta, que ha sufrido modificaciones en el momento de la implantación de la misma. A partir de la decidua se originan los tabiques deciduales que dividen a la placenta en cotiledones.



**Fig. 2. Feto a término en el útero y estructura placentaria.** Se observa el amnios (A), membrana embrionaria interior. El espacio entre el amnios y el feto (cavidad amniótica) está lleno de líquido amniótico acuoso. El corion o placa coriónica (CP), membrana embrionaria más externa, desarrolla proyecciones digitiformes (vellosidades: V), algunas de las cuales crecen y penetran la capa de mucosa basal del útero o decidua (D). Las vellosidades están rodeadas por el espacio intervilloso (IVS), donde se encuentra la sangre materna. M, miometrio; MZ, zona marginal entre la placenta y las membranas fetales; S, tabique placentario; UC, cordón umbilical. Modificado del Libro: "Pathology of the Human Placenta" (Benirschke et al. 2012).

### 1.2. Breve reseña del desarrollo placentario

La placenta se desarrolla desde el mismo óvulo fecundado que da origen al feto, pero a pesar de poseer idéntico patrimonio genético que el embrión, sigue un patrón de diferenciación absolutamente divergente. Las células externas polarizadas del blastocisto diferencian en el trofoectodermo mientras que, las células internas no polarizadas forman la masa celular interna que luego dará origen a los tejidos embrionarios. Las células del trofoectodermo no contribuyen a formar el embrión pero son esenciales para su desarrollo ya que formarán la placenta. La implantación es un proceso progresivo en el que el

blastocisto se aproxima y adhiere al endometrio materno, para invadirlo. Para que el mismo se fije al útero materno requiere de un endometrio receptivo, de un embrión normal y funcional en el estado de blastocisto y de un diálogo o comunicación cruzada entre estos dos organismos, que son diferentes inmunológica y genéticamente. Este proceso se parece en alguna forma a la invasión de los tumores malignos, pues ocurre una estrategia similar que involucra: migración celular, destrucción parcial del tejido del huésped, erosión vascular, neovascularización, y un proceso de reparación y tolerancia de células antigénicamente extrañas. En forma parecida a las células tumorales, las células trofoblásticas humanas son constitutivamente invasivas, pero a diferencia de estas, en condiciones de embarazo normal el proceso de invasión se encuentra estrictamente controlado (Modi et al. 2011; Norwitz et al. 2001).

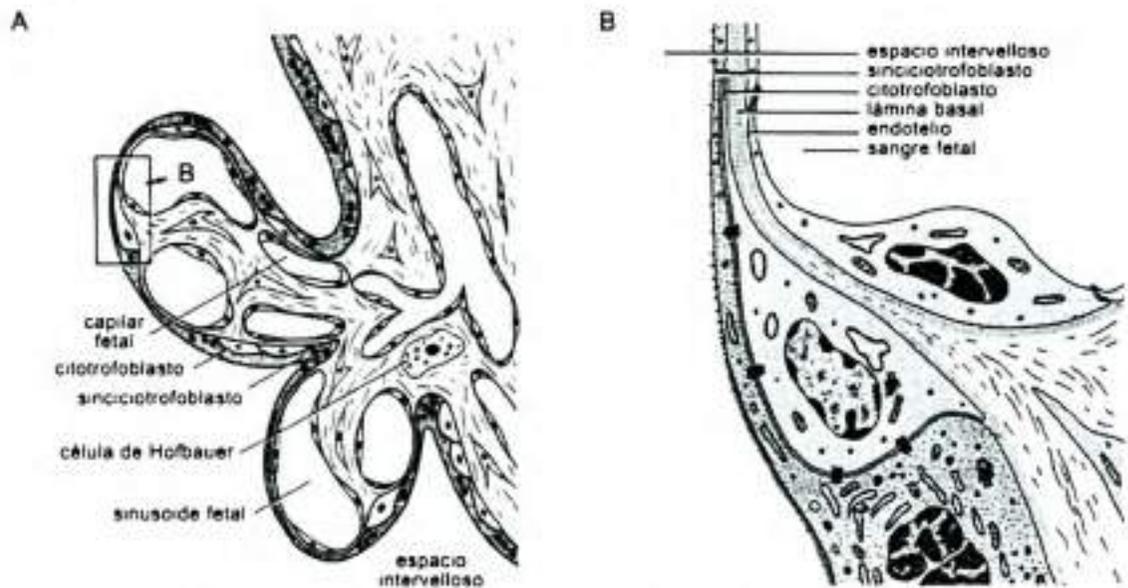
Posterior a la implantación, a partir de células madre trofoblásticas se diferencian dos poblaciones: los trofoblastos o citotrofoblastos (CTB) vellosos (v) que formarán parte de las vellosidades libres y los CTB extravellosos (ev), con un fenotipo invasivo, que formarán parte de las vellosidades de anclaje y penetrarán en la decidua. Ambos tipos de CTB conforman las unidades estructurales y funcionales de la placenta (Handwerger 2009; Ji et al. 2013).

### **1.3. CTBv: Sincialización y mantenimiento de la Barrera Placentaria**

Los CTBv incluyen a CTBv mononucleados proliferativos y al sinciotrofoblasto (STB). Ambos forman parte de la barrera placentaria, la cual tiene como función principal regular los intercambios de nutrientes, gases, metabolitos y desechos entre la sangre materna y la sangre fetal e intentar evitar la llegada de tóxicos perjudiciales para el individuo en gestación que arriban desde la sangre materna.

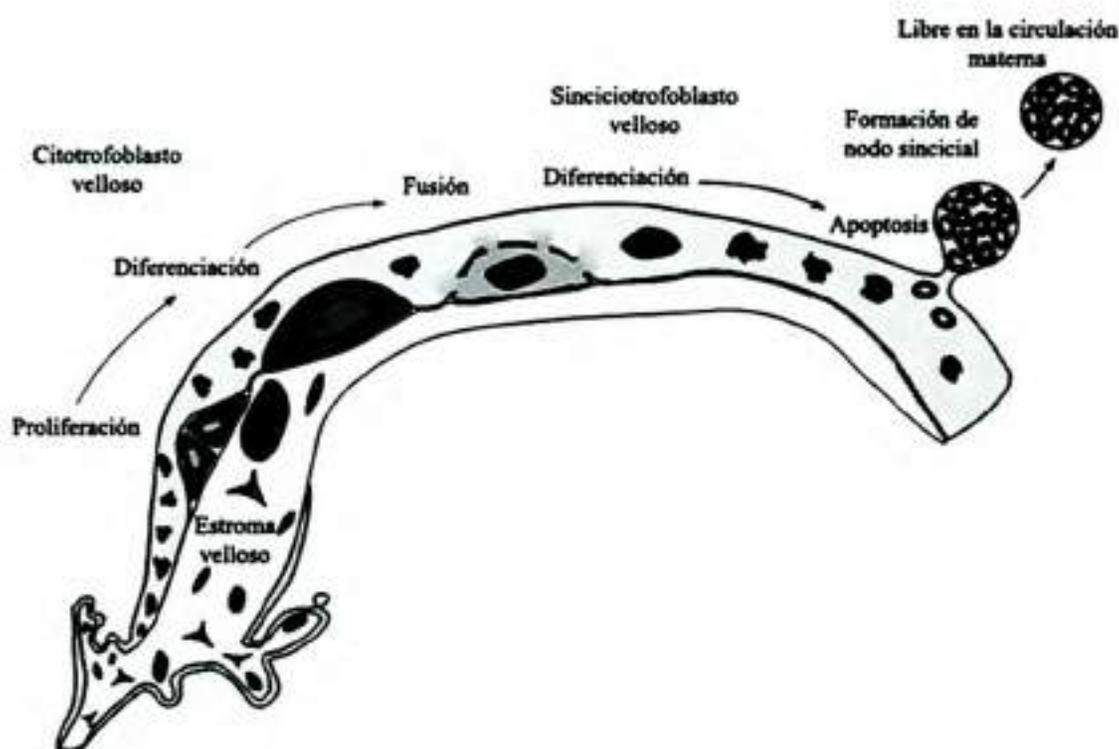
La barrera placentaria mantiene separada físicamente a la sangre materna de la sangre fetal. En su porción externa se encuentra el STB que contacta con la sangre de la madre, que a diferencia de otros epitelios, no está compuesto por células individuales sino que es una capa continua, ininterrumpida y multinucleada, no proliferativa. Al encontrarse en contacto directo con la sangre materna, el STB posee cierto grado de privilegio o tolerancia inmunológica, lograda, en parte, por la deficiencia en la expresión de antígeno leucocitario humano clase I (HLA I). Entre el STB y la membrana basal, se encuentran los CTBv mononucleados, proliferativos, los cuales sustentan el crecimiento y regeneración del STB mediante un proceso de diferenciación trofoblástica que involucra su fusión al STB.

Durante el inicio de la gestación los CTBv mononucleados con bordes celulares, forman un epitelio continuo debajo del STB, el cual a medida que transcurre el embarazo se va perdiendo, quedando solo algunos CTBv aislados debajo del STB en las placentas a término. El endotelio de los vasos fetales que se encuentran en el interior de las vellosidades coriónicas, es el último integrante de esta barrera placentaria (Fig. 3) (Benirschke et al. 2012).



**Fig. 3. Barrera placentaria.** (A) Esquema simplificado de un corte transversal de una vellosidad coriónica observado por microscopía óptica. (B) Representación de las capas que conforman la barrera placentaria observada por microscopía electrónica. Modificado del Libro: "Pathology of the Human Placenta" (Benirschke et al. 2012).

Algunos CTBv progenitores proliferan dividiéndose de manera asimétrica, de tal manera que una célula hija retiene su carácter de célula progenitora mientras que la segunda abandona el ciclo celular y comienza a diferenciarse para fusionar con la capa de STB. Durante todo el embarazo los CTBv fusionan con el STB para mantener esta capa diferenciada hasta el final de la gestación. La continua incorporación de material celular fresco debe ser balanceada por la liberación de material apoptótico (nodos sinciciales) desde el STB a la circulación materna (Fig. 4) (Huppertz y Borges 2008).



**Fig. 4. Recambio del CTBv.** Proliferación, diferenciación y fusión. Los núcleos se mantienen en el STB entre 3 y 4 semanas, luego entran en apoptosis y son liberados a la circulación materna en forma de nodos sinciciales. Modificado de: "The anatomy of the normal placenta" (Huppertz 2008).

Si bien la liberación de núcleos sinciciales apoptóticos ha sido ampliamente aceptada como parte del mantenimiento del STB, actualmente este mecanismo se encuentra en debate. Por un lado, una de las hipótesis sostiene la participación de un mecanismo de apoptosis en dos fases. En la primera, los CTBv son marcados para fusionar y en la fase de ejecución los núcleos viejos completan su proceso de apoptosis y son liberados a la circulación materna para mantener el balance a medida que los CTBv nuevos van fusionando. Sin embargo, otros autores argumentan que la apariencia heterogénea de los núcleos presentes en el STB se debe a la diferencia de tiempo que éstos llevan formando parte del STB y que no se encuentran en las etapas finales de la apoptosis y tampoco serían liberados a la circulación materna como nodos sinciciales (Ji et al. 2013). Todavía no se ha dilucidado por completo qué ocurre con estos núcleos sinciciales y es un área que continúa en estudio.

La diferenciación de CTBv mononucleados a STB es esencial para el mantenimiento de la barrera placentaria. Este proceso involucra además de la fusión celular (diferenciación morfológica), mecanismos de diferenciación bioquímica necesarios para que se lleve a cabo

adecuadamente (Handwerger 2009). Aunque aún no es completamente comprendido, se ha demostrado que son necesarios múltiples factores tales como las proteínas fusogénicas de membrana Sincitina (Syn) 1 y Syn-2, el receptor de Syn-2 SLC1A5/ASCT-2, Conexina-43, las proteínas de uniones estrechas o "Zonula Occludens" 1, Caderina 11 y la actividad de metaloproteinasas y desintegrinas (Huppertz et al. 2006; Pidoux et al. 2010). En diversos modelos celulares se ha demostrado la participación de factores de crecimiento, por ejemplo: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF $\beta$ -1); así como, la participación de la hormona hCG, de citoquinas, la externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática, la activación de la caspasa 8 y de las vías de señalización ERK 1/2, p38 y PKA (Gauster et al. 2009; Leduc et al. 2011). Además, se han identificado varios factores de transcripción reguladores de la diferenciación (Hubert et al. 2010; Knofler et al. 2001). Entre ellos, el Factor Ausente de las Células Gliales 1 (GCM1) fue el primer factor de transcripción identificado que participa en la sincicialización de trofoblasto (Baczyk et al. 2009). Entre los genes blanco regulados por GCM1 en la placenta humana se encuentran Syn-1 (Jansson 2001) y el gen que codifica para la enzima Aromatasa (Cross et al. 2002), involucrada en la síntesis trofoblástica de estrógenos (Stocco 2011). Recientemente, hemos demostrado la participación del factor de transcripción 6 de la familia tipo Krüppel (KLF6) en el proceso de fusión del CTBv (Racca et al. 2015). KLF6 fue originalmente clonado y reportado en el laboratorio donde se realizó esta Tesis mediante el rastreo de una librería de expresión de placenta con el objetivo de identificar factores regulatorios implicados en el control de la transcripción de los genes que codifican para las Glicoproteínas Específicas de Embarazo (PSG) (Koritschoner et al. 1997). Si bien es un factor de transcripción ubicuo, su expresión se encuentra muy enriquecida en la placenta humana y murina. Más aún, ratones knockout para KLF6 mueren a los 12 días y medio de gestación caracterizados por un desarrollo placentario deficiente (Matsumoto et al. 2006). Significativamente, KLF6 activa la transcripción de los genes PSG y  $\beta$ -hCG en células trofoblásticas y su expresión se induce tempranamente durante la diferenciación *in vitro* de estas células (Racca et al. 2011).

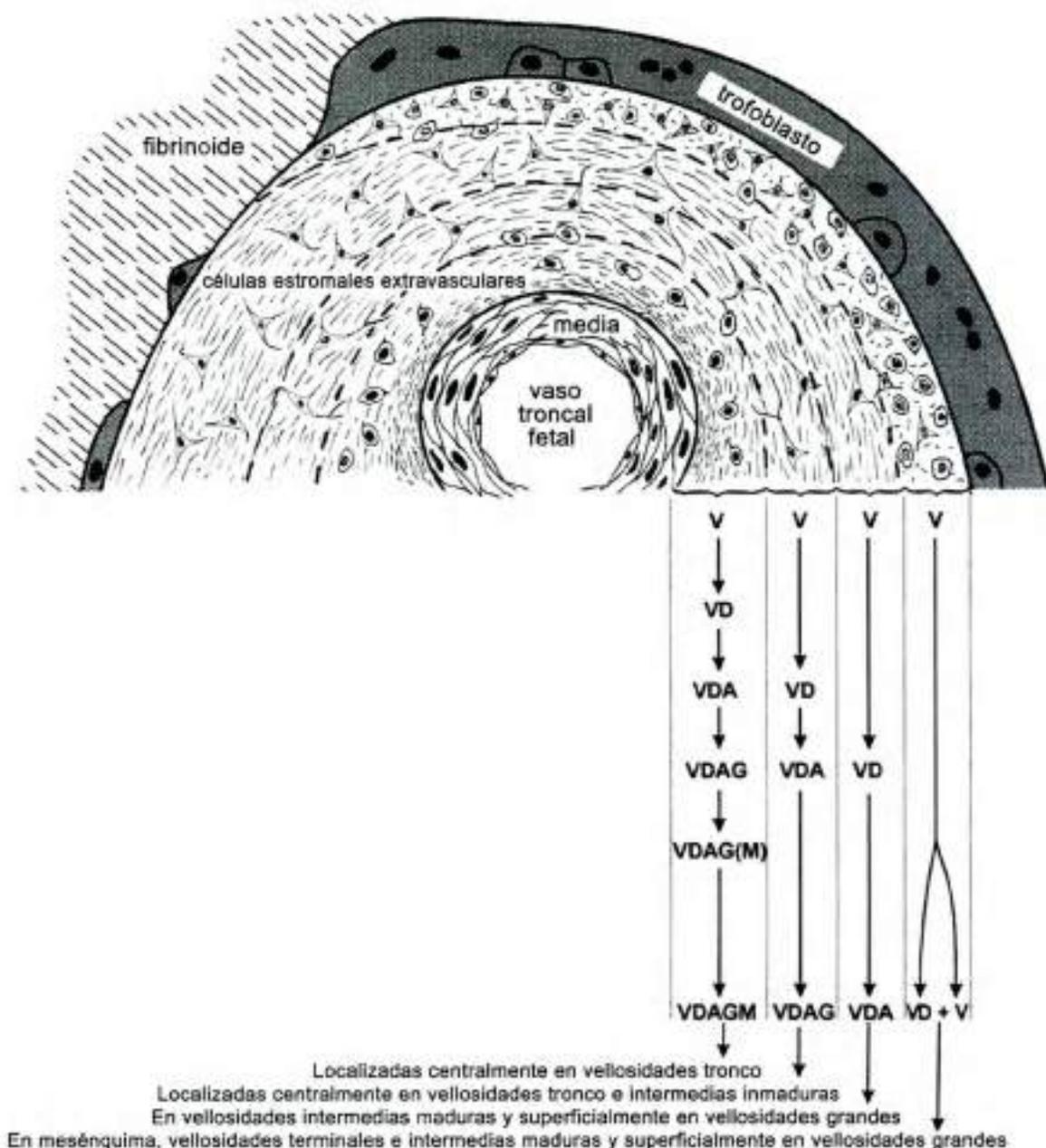
La capa sincicial también tiene un rol fundamental en el mantenimiento del embarazo mediante la producción de hormonas tales como la hCG y la hormona Lactógeno Placentaria humana (hPL) y de otras moléculas esenciales para la gestación como las PSG (Castellucci y Kaufmann 2006).

La hCG es un miembro de la familia de hormonas glicoproteicas, compuesta por dos subunidades, una  $\beta$  específica y una  $\alpha$  que comparte con las hormonas Folículo Estimulante (FSH), Luteinizante (LH) y Tirotrópica. Es principalmente sintetizada y secretada en grandes cantidades por el STB en condiciones fisiológicas. La familia de genes hCG se compone de 6 genes homólogos ubicados en tándem en el cromosoma 19, su expresión se regula principalmente a nivel de transcripto, y el gen CGB5 es el de mayor expresión en células de coriocarcinoma y placenta, tanto en etapas tempranas como tardías de la gestación (Bo y Boime 1992; Miller-Lindholm et al. 1997). La hCG es indispensable para un progreso exitoso del embarazo ya que participa en el proceso de sincicialización y mantiene la producción de progesterona y otros factores de crecimiento en el cuerpo lúteo hasta la séptima semana de gestación (Handschuh et al. 2007a; Ji et al. 2013; Shi et al. 1993; Yang et al. 2003). Además, facilitaría la angiogénesis arterial uterina y la circulación umbilical, desempeñando un rol vital para la circulación hemocorial (Cole 2012a; Reisinger et al. 2007). Esta hormona también participa en la implantación, en la prevención del rechazo fetal, en la coordinación del crecimiento fetal y uterino y, potencialmente, en el desarrollo de los órganos fetales. La distribución y la cantidad de isoformas de hCG varían en el transcurso del embarazo y en el contexto de desarrollo aberrante o enfermedad (Choi y Smitz 2013).

Las PSG son las proteínas de origen placentario más abundantes en la circulación materna (Bohn 1971). En nuestro laboratorio hemos determinado que su expresión tanto a nivel de transcripto como de proteína aumenta marcadamente durante el proceso de sincicialización precediendo a la expresión de hCG y a la diferenciación morfológica, constituyendo así un marcador temprano de diferenciación del trofoblasto (Camolotto et al. 2010). Algunos miembros de la familia PSG actúan como inmunomoduladores (Martinez et al. 2013) y participarían en la regresión de los síntomas de enfermedades autoinmunes durante el embarazo (Bebo y Dveksler 2005). Los resultados en torno a la función de PSG son consistentes con un cambio en el sistema inmune materno de una respuesta inflamatoria tipo Th1 a una predominantemente anti-inflamatoria Th2, necesaria para un embarazo exitoso (Motrán et al. 2003). Datos más recientes sugieren que las PSG son esenciales en el proceso de establecimiento de la vasculatura apropiada en la interfase materno-fetal para la provisión de nutrientes y oxígeno al feto y la placenta (Ha et al. 2010; Lisboa et al. 2011). Niveles séricos de proteína y transcripto PSG disminuidos se asocian con condiciones

patológicas como aborto espontáneo, retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU), preeclampsia y mola hidatiforme (Arnold et al. 1999; Bocco et al. 1989).

Finalmente, la membrana basal, compuesta principalmente por colágeno IV, laminina, heparán sulfato y fibronectina, separa los CTBv del estroma de la vellosidad coriónica. La arquitectura básica del estroma de las vellosidades se construye de células de tejido conectivo que forman una red que contiene las fibras del tejido conjuntivo, células libres y los vasos fetales. Se han descrito al menos cinco tipos diferentes de células estromales fijas. Análisis inmunohistoquímicos señalan que representan diferentes etapas de un gradiente de diferenciación, que van desde células indiferenciadas hasta miofibroblastos altamente diferenciados e incluso miocitos (Fig. 5) (Benirschke et al. 2006).



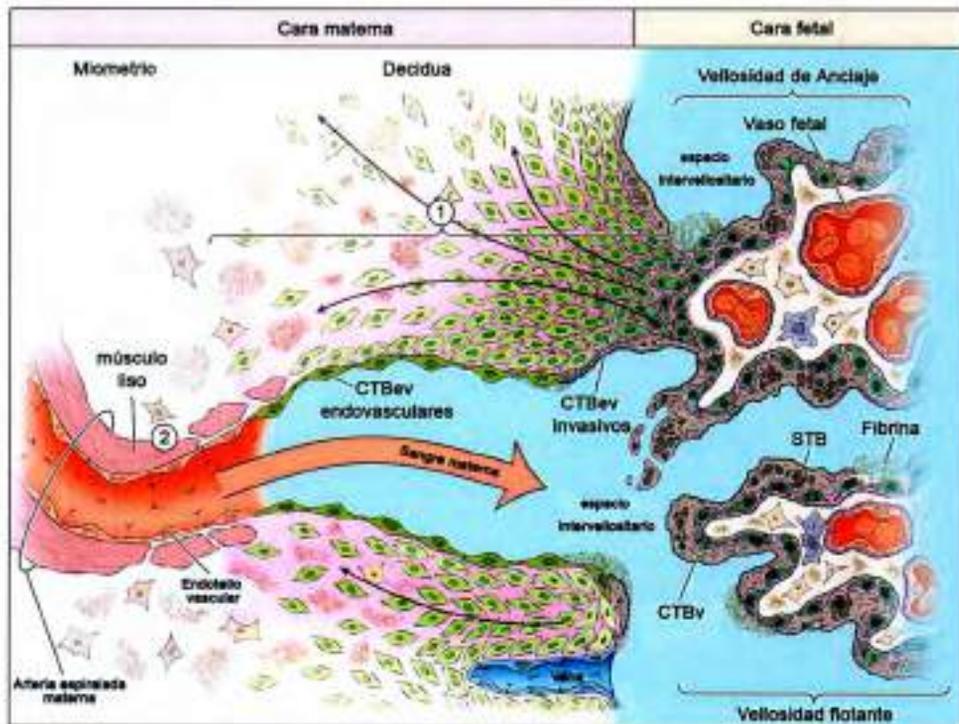
**Fig. 5. Representación de células vellositarias estromales.** Se ilustra la diferenciación normal de las células del estroma desde precursores mesenquimales proliferativos (células V), Fibroblastos (células VD y VDA) a Miofibroblastos (células VDAG y VDAGM). Una capa delgada subtrofoblástica de células V representan las células madre del estroma extravascular. Por proliferación, estas células generan nuevas capas periféricas del estroma y por lo tanto contribuyen a acrecentar el grosor de la vellosidad. Más centralmente, se pueden encontrar capas de células de tejido conectivo más antiguas y diferenciadas. Modificado del libro: "Pathology of the Human Placenta" (Benirschke et al. 2006).

Dentro de la vellosidad también se encuentran las células de Hofbauer, consideradas los macrófagos de la placenta humana. A pesar de su identificación hace más de 100 años, su papel específico en la placenta permanece en gran parte sin elucidar. Trabajos recientes afirman que estas células tendrían un papel clave en la fisiopatología de la placenta, ya que,

además de las funciones generales de los macrófagos de tejido como la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos y restos celulares y la presentación de antígenos en respuesta a agentes inflamatorios, varios estudios sugieren que están involucrados en la angiogénesis necesaria durante el desarrollo placentario temprano (Tang et al. 2011). Alteraciones en los niveles y la apariencia de las células de Hofbauer se han asociado con complicaciones del embarazo como por ejemplo en la patogénesis de la pérdida de embarazo temprana (Karakaya y Ozer 2013).

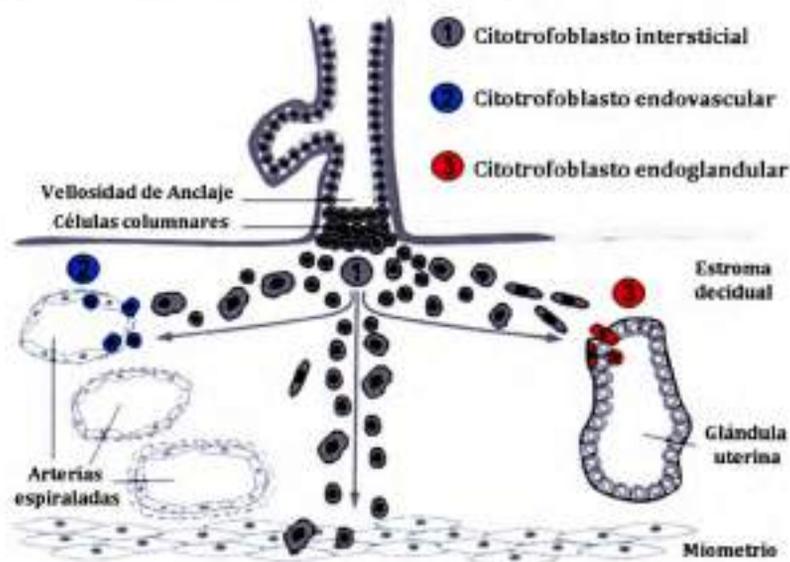
#### **1.4. CTBev: Clasificación y funciones asociadas**

Los cambios fisiológicos que ocurren en el endometrio humano en respuesta a la implantación del blastocisto constituyen la decidualización, y el tejido resultante de este proceso es denominado Decidua (Benirschke et al. 2012). Las vellosidades de anclaje adhieren la placenta a la pared uterina decidualizada. Los sitios de anclaje se establecen tempranamente durante la segunda semana de gestación y están compuestos por una población heterogénea de CTBev (Vicovac et al. 1995). A lo largo de estas vellosidades los CTBev, llamados columnares, sufren un proceso de diferenciación que va desde un fenotipo proliferativo, que se restringe a la capa basal de CTBev dentro de las columnas de células; pasando por la etapa llamada post-proliferativa, con fenotipos migratorios e invasivos, que comienza tan pronto como en la segunda capa de células de las columnas. Las partes distales de las mismas son ocupadas por los trofoblastos migratorios y finalmente éstos adquieren un fenotipo invasivo para extenderse profundamente en los tejidos maternos (Benirschke et al. 2012). La invasión de los CTBev en el tejido uterino es esencial para el éxito del desarrollo de la placenta humana y la progresión del embarazo (Knofler y Pollheimer 2012) (Fig. 6).



**Fig. 6. Anclaje de las vellosidades coriónicas a la pared uterina.** CTBev proliferan en las vellosidades de anclajes formando columnas de células que migran e invaden a través de la decidua (1) y llegan a transformar incluso a las arterias espiraladas distales (2). Modificado de: "Is heparin a placental anticoagulant in high-risk pregnancies?" (Kingdom y Drewlo 2011).

Dentro de la decidua, los CTBev adquieren nuevas características que permiten diferenciarlos en poblaciones con funciones diferentes: los CTBev intersticiales, los endovasculares y los endoglandulares (Fig. 7).



**Fig. 7. Localización de cada uno de los tipos de CTBev en la placenta.** Modificado de: "Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion?" (Moser et al. 2010).



Los CTBev intersticiales presentan dos fenotipos: los grandes poligonales y los pequeños ahusados. Los primeros se localizan en la zona de transición placenta-decidual, fijando la placenta al útero durante la gestación mediante la producción de matriz fibrinoide. En contraste, los CTBev intersticiales pequeños, invaden más profundamente la decidua hasta el primer tercio del miometrio (Huppertz 2007). Estas células se comunican con diversos tipos celulares del útero, tales como las células del estroma de la decidua, los macrófagos y las células NK uterinas, contribuyendo de esta forma al desarrollo de procesos esenciales para el éxito del embarazo, como la inmunotolerancia materno-fetal (Knofler y Pollheimer 2012; Yeh et al. 2013). Consistente con el fenotipo invasivo, los CTBev intersticiales secretan proteasas tales como Activador de Plasminógeno tipo urokinasa (uPA) y varias metaloproteinasas, principalmente las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, que facilitan la ruptura de la matriz extracelular decidual. Estas mismas células también secretan inhibidores de estas enzimas, como los inhibidores del Activador de Plasminógeno  $\frac{1}{2}$  (PAI-1/2) y de Metaloproteasa de Tejido 1 (TIMP-1), sugiriendo una regulación fina y limitada de este proceso invasivo (Hofmann et al. 1994; Huppertz et al. 1998). Algunos de los CTBev intersticiales finalmente diferencian a células gigantes multinucleadas, secretoras de hCG y hPL (Al-Lamki et al. 1998). En particular, la hCG producida por estas células es principalmente hCG hiperglicosilada (H-hCG) (Cole 2010), la cual posee funciones biológicas diferentes a las de la hCG principal sintetizada por el STB (Cole 2012a; Cole 2012b).

Los CTBev endovasculares son los encargados de remodelar las arterias espiraladas uterinas, proceso que comienza entre las semanas 8 y 12 completándose alrededor de la semana 20-22 de gestación. Este proceso consiste en la transformación de las arterias espiraladas maternas de vasos de pequeño calibre y bajo flujo sanguíneo a vasos de gran calibre y baja resistencia, permitiendo la llegada de la sangre necesaria para proveer oxigenación y nutrientes al feto y la placenta. Los CTBev endovasculares se mantienen en la vasculatura materna debido a su transición de un fenotipo epitelial a uno endotelial (Ji et al. 2013).

Recientemente se ha descrito la existencia de los CTBev endoglandulares. El remplazo de las células glandulares por estos trofoblastos, podría proveer un mecanismo para abrir las glándulas uterinas al espacio veloso permitiendo así la nutrición histiotrófica del embrión antes de establecerse la circulación materna hacia la placenta. Aún se requieren más estudios para confirmar el rol de estas células (Huppertz et al. 2014; Moser et al. 2010).

Existen numerosos factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de un fenotipo proliferativo o invasivo de los CTBev. Entre ellos se encuentran el H2.0-like Homeobox (HLX), el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y el factor winged hélix protein Storkhead box 1 (STOX-1), que promueven la proliferación del trofoblasto, inhibiendo por lo tanto la diferenciación de los CTBev (Knofler y Pollheimer 2012). De manera similar, el factor inhibidor de unión al ADN (Id2) funciona como regulador negativo en la invasión ya que al mantener su expresión elevada, los CTBev pierden su capacidad invasiva mientras aumentan la migración (Janatpour et al. 2000). Asimismo Fournier et al. demostraron inhibición de la invasión de forma dosis dependiente por parte de agonistas del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), un factor de transcripción activado mediante unión a ligando, esencial para el desarrollo placentario (Fournier et al. 2008b). En contraste, los factores TCF-4 y GCM1 se inducen en CTBev en diferenciación estimulando la migración e invasión (Knofler y Pollheimer 2012). Otras moléculas como el receptor 1 del VEGF (Flt1), se expresa en los CTBev y participa en los procesos de proliferación y diferenciación endovascular (Athanasziades et al. 1998; Fukushima et al. 2005).

Por otro lado, la diferenciación de los CTBev depende fuertemente de la presión de oxígeno. El ambiente hipóxico que se mantiene hasta el final del primer trimestre mantiene elevados los niveles del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , quien favorecería un fenotipo proliferativo reduciendo la capacidad invasiva de los trofoblastos y la expresión de moléculas asociadas al fenotipo invasivo tal como  $\alpha$ -integrina y MMP-2 (Caniggia et al. 2000; Genbacev et al. 1997). Si bien, HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción principalmente regulado por hipoxia, también puede modificarse por otros mediadores en situación de normoxia (Dery et al. 2005).

La invasión trofoblástica anormal, la oclusión incompleta de los vasos y un aumento prematuro en los niveles de oxígeno puede potencialmente dañar las vellosidades placentarias mediante estrés oxidativo resultando en el desarrollo de complicaciones tempranas del embarazo, tales como aborto espontáneo (Knofler y Pollheimer 2012).

### **1.5. Placenta y patologías asociadas al embarazo**

La perturbación de las funciones del trofoblasto puede ocasionar una variedad de complicaciones del embarazo como malformación, RCIU, preeclampsia, aborto espontáneo y

muerte fetal (Knofler y Pollheimer 2012; Marcorelles 2013; Pidoux et al. 2012). Por ejemplo, una invasión limitada del trofoblasto en los vasos maternos se ha correlacionado con el RCIU y la preeclampsia (Pollheimer y Knofler 2012; Roberts y Bell 2013), mientras que una invasión excesiva del trofoblasto se asocia con mola invasiva, placenta acreta y coriocarcinoma (Khong 2008; Knofler y Pollheimer 2013).

La placenta acreta se caracteriza por la adherencia anormal de la placenta a la pared del útero y puede incrementar la morbilidad y mortalidad materna. Su incidencia ha incrementado 13 veces desde los inicios del 1900 y se correlaciona directamente con el aumento de los partos por cesárea (Wortman y Alexander 2013).

La preeclampsia es la principal causa de partos prematuros, y de morbilidad y mortalidad en embarazadas, afectando aproximadamente el 4 a 8 % de los embarazos (Cartwright et al. 2010; Zhou et al. 2013). Se presenta con proteinuria, hipertensión no preexistente y edema, y, de acuerdo a la gravedad de la patología, con compromiso de otros órganos. Actualmente es evidente que para la mayoría de los casos de preeclampsia, la causa principal radica en la placenta. Relativamente reducida perfusión placentaria e inflamación llevan a estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico, que convergen para modificar la fisiología materna. Por otra parte, es evidente que la "constitución materna", incluyendo factores genéticos, conductuales y metabólicos, influye en la respuesta materna a la placentación anormal de la preeclampsia (Roberts y Bell 2013). Si bien la etiopatogenia de la enfermedad no ha sido completamente esclarecida la mayoría de los estudios indican que los CTBev intersticiales invasivos son los más afectados, mostrando una reducción en número y densidad, así como una invasión frecuentemente más superficial. Los CTBev endovasculares también se ven afectados de manera que la remodelación vascular se encuentra incompleta o nula. Además, se ha reportado que el estrés oxidativo, una respuesta inmune materna atípica hacia el trofoblasto, una inflamación exagerada y un incremento en la producción de factores anti-angiogénicos como la forma soluble del receptor Flt1 (sFlt1) y la endoglina soluble, podrían contribuir al desarrollo de la preeclampsia (Saito y Nakashima 2014). Así mismo, el aumento de sFlt1 en placentas con preeclampsia se produce mediante regulación dependiente del HIF-1 $\alpha$  (Nevo et al. 2006). También se ha observado un aumento en la apoptosis de los CTBev endovasculares, una disminución en la expresión del factor GCM1 y un aumento en la descamación del sincicio (Cartwright et al. 2010; Huppertz 2011; Lala y Chakraborty 2003; Red-Horse et al. 2004).

El RCIU se manifiesta como un síndrome variable de crecimiento fetal subóptimo. Se han encontrado alteraciones morfológicas placentarias asociadas al RCIU. Si bien, al igual que en la PE, la perfusión disminuida de los vasos maternos se acepta como la etiología más frecuente, también se ha observado desarrollo inadecuado del árbol veloso en la placenta, lo cual predispondría a la limitación en las funciones de transporte y secreción del STB (Marcorelles 2013). El crecimiento fetal depende además de la interacción entre la genética materna y fetal y los determinantes epigenéticos modificados por el medio ambiente al que están expuestos.

### **1.6. Rol de la placenta frente a la presencia de xenobióticos**

Las embarazadas están expuestas a una amplia variedad de agentes químicos. La exposición más frecuente proviene de la administración de medicamentos, factores relacionados al estilo de vida, tales como el cigarrillo, drogas de abuso, consumo de alcohol o factores ambientales y ocupacionales. Por lo que el feto está expuesto no solo a los xenobióticos que incorpora la madre en forma voluntaria sino también a los provenientes de los alimentos, del agua y del medio ambiente. Estos compuestos pueden interferir con la función placentaria en diferentes niveles: en las vías de señalización, en la producción y liberación de hormonas y enzimas, en el transporte de nutrientes y productos de desecho, en la implantación, crecimiento celular y maduración y finalmente, en la fase terminal de la vida placentaria / parto.

Estas desviaciones del desarrollo trofoblástico normal pueden constituir una amenaza potencial para la función placentaria, resultando en alteraciones no solo del embarazo sino también en la salud del individuo gestado en su vida adulta (Robins et al. 2011). El ambiente en el útero y la vida neonatal temprana puede inducir una respuesta permanente en el feto y el recién nacido que lleva a una mayor susceptibilidad a las enfermedades en la vida adulta (Gogal y Holladay 2008; Thiele et al. 2013). En las últimas décadas un gran número de estudios revelan la relación entre la programación epigenética durante el desarrollo y los trastornos metabólicos de la vida adulta (Foo y Mantzoros 2013).

Aunque es un órgano bastante permeable a sustancias químicas que llegan desde la sangre materna (Myllynen et al. 2007), como a algunos metales pesados presentes en el medioambiente (Caserta et al. 2013), es bien sabido que la placenta humana funciona como una barrera que intenta proteger al feto de efectos dañinos de toxinas exógenas y

endógenas (Aye y Keelan 2013). A tal fin posee transportadores y enzimas biotransformadoras que selectivamente remueven compuestos químicos intentando evitar su llegada a la sangre fetal (Prouillac y Lecoeur 2010).

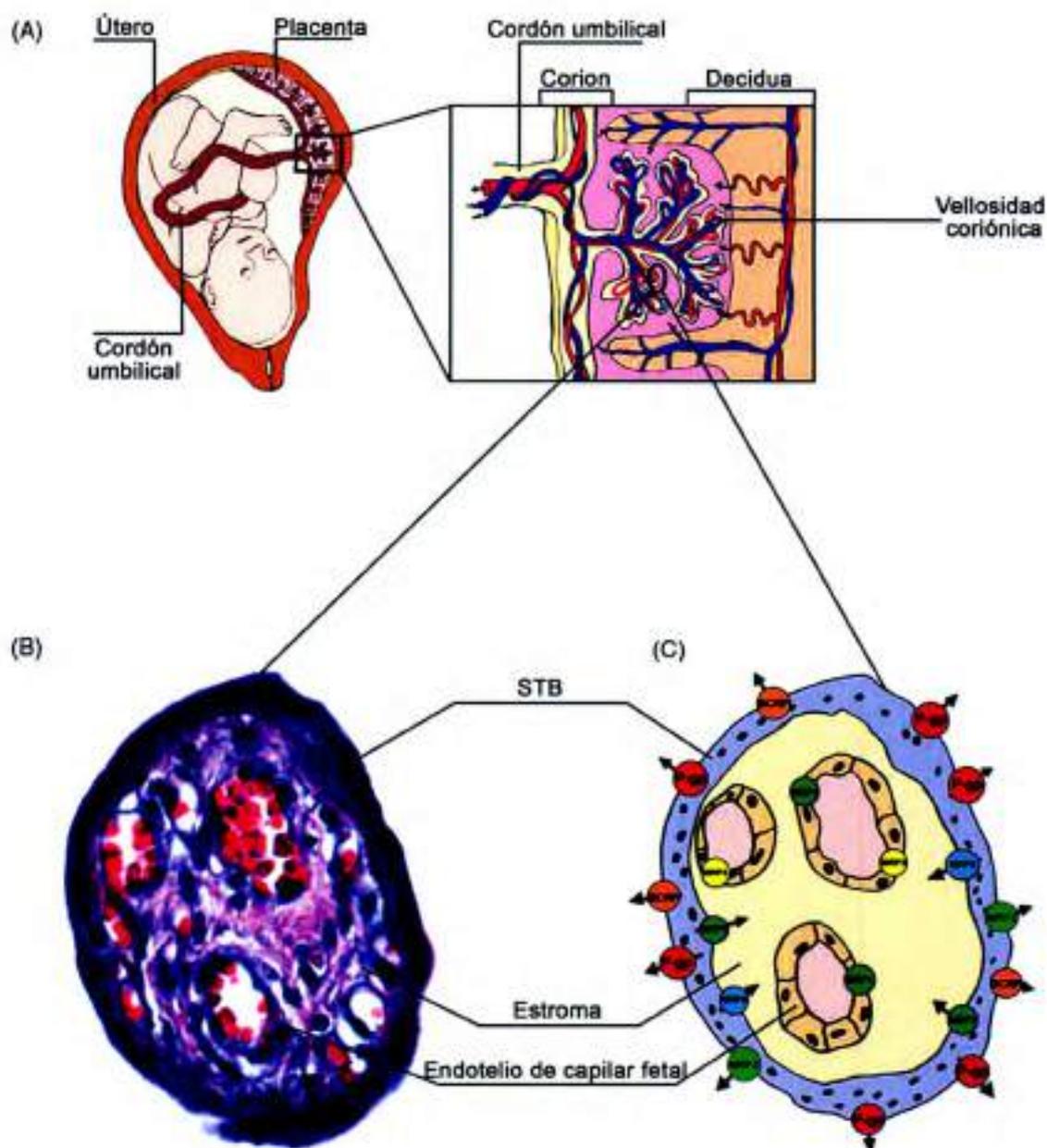
La capacidad de biotransformación de la placenta representa del 2 al 3,3 % de la capacidad hepática. Posee enzimas metabolizantes de fase I y II (Pasanen 1999; Prouillac y Lecoeur 2010). Las enzimas de fase I principalmente biotransforman xenobióticos mediante la introducción de un grupo funcional polar en sus moléculas, entre ellas, las distintas isoformas de la superfamilia de enzimas citocromo P450 (CYPs) son las más importantes. Posteriormente, enzimas metabolizantes de fase II, conjugan xenobióticos y metabolitos resultantes de las reacciones de fase I a través de glucuronidación, sulfatación, esterificación, metilación, acetilación, etc. (Pavek y Smutny 2013).

Las distintas isoformas de las CYPs varían con el desarrollo de la función placentaria, el tiempo de gestación y el estado de salud materno (Storvik et al. 2014). Ciertas CYPs placentarias son muy importantes para la síntesis y el catabolismo de los esteroides, ácidos grasos, así como para el metabolismo de los xenobióticos tales como productos farmacéuticos y contaminantes. La placenta humana a término expresa sólo unas pocas CYPs funcionales, como por ejemplo, la CYP19A1 (aromatasa), que convierte los andrógenos a estrógenos. Se conocen factores que pueden afectar a la función de las CYPs en la placenta, ejerciendo efectos de larga duración en la salud mediados por cambios epigenéticos. Una de las enzimas inducibles más conocidas en la placenta es la CYP1A1, la cual fue la única que se indujo notablemente en muestras de madres fumadoras. Por otro lado, las enzimas de fase II mayoritariamente expresadas en la placenta son las glutatión S-transferasas (GST) (Storvik et al. 2014).

La transferencia de moléculas entre la circulación materna y fetal se produce a través de la barrera placentaria (Ver sección 1.3). La permeación de sustancias está influenciada por numerosos factores: las propiedades del compuesto, las características placentarias y los determinantes maternos y fetales. La mayoría de los fármacos que cruzan la placenta humana difunden pasivamente. En este caso, el flujo de sangre de la placenta, el pH de la sangre materna y fetal, características fisicoquímicas de los compuestos, y la unión a proteínas van a determinar la capacidad de un fármaco para atravesar la barrera placentaria. La difusión facilitada, fagocitosis y pinocitosis son las rutas menos importantes de transferencia. En 1998, el descubrimiento del pasaje de xenobióticos mediado por

transportadores en la placenta destacó el papel de los transportadores con casete de unión a ATP (ABC) en este órgano (Prouillac y Lecoeur 2010). En general los miembros de esta familia proteica limitan la entrada de los xenobióticos a la circulación fetal a través de su eflujo hacia la circulación materna. Varios miembros de la familia ABC, incluyendo las proteínas de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y ABCG, son funcionales en la placenta con papeles clínicamente significativos en el eflujo de xenobióticos (Myllynen et al. 2007). Sin embargo, hallazgos recientes sugieren que estos transportadores también protegen el tejido de la placenta mediante la prevención de la acumulación celular de compuestos citotóxicos endógenos, tales como lípidos, esteroides y sus derivados. Tales funciones de protección tienden a ser particularmente importante en los embarazos complicados por estrés oxidativo o inflamación, donde se incrementa la generación de metabolitos tóxicos (Aye y Keelan 2013). Actualmente, la eliminación y excreción de sustancias tóxicas a través de estos transportadores se señala como la fase III del metabolismo implicado en la desintoxicación de xenobióticos (Pavek y Smutny 2013).

Los transportadores Glicoproteína P (P-gp), también llamada MDR1 o ABCB1, y el segundo miembro de la subfamilia G de transportadores ABC o proteína resistente al cáncer de mama (ABCG2 o BCRP), se encuentran entre los más abundantes en la placenta y son los más importantes en su rol de protección fetal frente a la llegada de xenobióticos (Iqbal et al. 2012; Pavek y Smutny 2013). Éstos se localizan en el borde en cepillo (apical) de la membrana del STB, junto con la proteína de resistencia a multi-drogas 2 (MRP2), mientras que otros transportadores se ubican en la membrana basolateral del STB (MRP1, MRP5, OAT4, etc.), o en los vasos fetales (MRP1, MRP3 y MRPS) (Pavek y Smutny 2013) (Fig. 8).



**Fig. 8. Localización de los transportadores de eflujo en la barrera placentaria.** (A) Se muestra dibujo de embarazo a término con el feto unido a la placenta a través del cordón umbilical. Se detalla la estructura de un cotiledón, unidad funcional de la placenta. (B) Tinción con hematoxilina-eosina (He-Eo) de un corte transversal de una vellosidad coriónica terminal. (C) Descripción esquemática de la vellosidad que muestra la localización de la P-gp y el ABCG2 en las microvellosidades de la membrana apical del STB y la presencia de otros transportadores placentarios de eflujo de drogas. Modificado de: "P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function" (Ceckova-Novotna et al. 2006).

Se ha observado que polimorfismos en los genes que codifican a estos transportadores de xenobióticos pueden alterar significativamente la función de los mismos, contribuyendo a la susceptibilidad del feto a drogas terapéuticas y contaminantes que arriban por vía materna (Hemauer et al. 2010; Iqbal et al. 2012).

Es importante destacar que la mayoría de los mecanismos de desintoxicación de nuestro cuerpo se encuentran bajo el control de “xenosensores”, es decir de receptores nucleares y factores de transcripción activados por ligando que responden específicamente a la exposición a xenobióticos y desencadenan la regulación positiva de la transcripción de la mayoría de las enzimas que metabolizan xenobióticos y de los transportadores de eflujo. Sus ligandos incluyen compuestos tóxicos y contaminantes ambientales, fármacos, así como suplementos dietarios o vitaminas. En la placenta se ha demostrado la participación del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR), el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de la Vitamina D (VDR) como xenosensores que regulan la expresión de genes ante la presencia de xenobióticos (Pavek y Smutny 2013).

Por otro lado, la placenta humana posee también enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos endógenos como el glutatión reducido (GSH) y exógenos como las vitaminas E y C (Myatt y Cui 2004). Los antioxidantes enzimáticos principales incluyen la familia de las enzimas superóxido dismutasas (SOD), las catalasas (CAT) y los sistemas enzimáticos del glutatión y la tiorredoxina. Las SOD están en la primera línea de defensa antioxidante y son responsables de la metabolización de dos moléculas de superóxido para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular. Las CAT se encuentran predominantemente en los peroxisomas donde catalizan la conversión de  $H_2O_2$  a oxígeno y agua. El GSH elimina  $H_2O_2$  e hidroperóxidos lipídicos a través de su auto-oxidación y posteriormente se recicla a través de la acción de la glutatión reductasa. Las tiorredoxina peroxidasas catalizan la conversión de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos de alquilo hacia agua y sus alcoholes correspondientes y a continuación son reducidos por acción de la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa. Estos sistemas juegan un papel crítico en la protección de las células trofoblásticas frente al estrés oxidativo (Perkins 2006), el cual ha sido asociado con numerosas patologías del embarazo como la preeclampsia, la prematuridad, etc. (Davis y Auten 2010; Kweider et al. 2014). Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones fisiológicas de especies reactivas del oxígeno (EROs) ejercen efectos beneficiosos, lo cual ha llevado a la formulación de la “teoría del desarrollo de radicales libres” (Balin et al. 1988; Dennery 2010). De hecho, se sabe que concentraciones bajas de EROs estimulan la proliferación celular, así como la expresión génica, y se ha sugerido que las acciones favorables de las EROs pueden estar relacionadas con el control de la reacción inflamatoria local (Myatt y Cui 2004).

En condiciones fisiológicas de la placenta, el equilibrio entre los elementos del mecanismo de defensa del estrés oxidativo se mantiene principalmente a través de la vía de señalización que involucra la participación del factor de transcripción 2 relacionado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), un potente activador que juega un papel importante en la expresión inducible de muchos genes citoprotectores en respuesta a estrés oxidativo y electrofílico; y del elemento regulador que actúa en cis llamado ARE, que se encuentra en regiones promotoras de varios genes que codifican a enzimas de fase II de desintoxicación (por ejemplo, GST) y proteínas antioxidantes como la NADPH quinona oxidoreductasa (NQO1) y la Hemoxigenasa 1 (HO-1). Evidencia reciente sugiere que el deterioro de esta vía está implicado en la patogénesis de la preeclampsia. Normalmente, la mayor parte de Nrf2 es degradado por el proteasoma y tras la exposición a electrófilos o EROs, sin embargo, se estabiliza y se acumula en el núcleo, lo que conduce a la activación de los genes blanco (Kweider et al. 2014).

Finalmente, se ha reportado que las vías de señalamiento mediadas por los factores de transcripción Nrf2 y AhR interaccionan entre sí de una manera coordinada a fin de generar una respuesta adecuada de metabolización de fase I, II y III frente a la presencia de xenobióticos o/y desbalances oxidativos (Kohle y Bock 2007).

### **1.7. Modelos experimentales para el estudio del efecto de tóxicos sobre la placenta humana**

Durante las últimas décadas se han desarrollado varios modelos *ex vivo* e *in vitro* que utilizan placentas humanas post-parto a fin de estudiar diversas funciones de este órgano. Si bien con ese objetivo también se utilizan modelos animales *in vivo*, el uso de modelos que utilicen a la placenta humana es una opción atractiva debido a su fácil disponibilidad para los estudios experimentales ya que luego del parto la misma ha cumplido su propósito y generalmente es desechada (Myllynen y Vahakangas 2013).

Los estudios en animales dan información valiosa acerca de los efectos y la cinética de compuestos químicos en la unidad feto-placentaria. Los modelos animales “knockout” han proporcionado nuevos conocimientos sobre la importancia de los transportadores placentarios en estudios de toxicidad en el desarrollo. Los roedores son el modelo animal más estudiado, ya que tienen una placenta hemocorial y un corto periodo de gestación, entre otras características favorables; sin embargo, algunos autores consideran que la

estructura de la placenta humana difiere sustancialmente de la de roedores, por lo que los datos procedentes de éstos no serían necesariamente relevantes para la situación humana (Clark 2014). De hecho, roedores y primates poseen diferencias en lo que respecta a permeabilidad placentaria, actividad de transporte, patrones de flujo de sangre y actividades metabólicas (Enders y Blankenship 1999).

En lo que respecta a la placenta humana, los métodos varían desde la utilización de fracciones subcelulares aisladas u homogenato total (Vahakangas et al. 1989), a métodos como la perfusión placentaria humana, en el cual se retiene su estructura, pudiéndose utilizar para estudios de transporte placentario (Myllynen y Vahakangas 2013).

Los sistemas basados en el modelo de líneas celulares establecidas originadas de placenta humana han demostrado ser herramientas útiles para el estudio de expresión y función de proteínas transportadoras, así como del metabolismo de xenobióticos (Myllynen y Vahakangas 2013). Las líneas celulares comúnmente utilizadas en investigación toxicológica son las BeWo, JAR y JEG-3, las cuales están disponibles desde hace más de 30 años (Kohler y Bridson 1971; Pattillo y Gey 1968).

El cultivo de células primarias aisladas de placenta humana es utilizado frecuentemente como modelo de estudio. Sin embargo, comparado con el uso de líneas inmortalizadas, es un método laborioso (Kliman et al. 1986). Además se debe considerar que los trofoblastos primarios no proliferan en cultivo y no resisten ciclos de congelado-descongelado, lo que es una desventaja práctica importante. Sin embargo, las células primarias claramente tienen la ventaja de representar a las células normales, mientras que las líneas celulares son células transformadas porque provienen de coriocarcinomas o han sido inmortalizadas *in vitro* (Myllynen y Vahakangas 2013).

Los cultivos de explantos placentarios humanos son ampliamente utilizados. Su principal ventaja radica en que, de manera similar a la situación *in vivo*, los explantos vellosos contienen múltiples tipos celulares además de células trofoblásticas, incluyendo células mesenquimales del estroma (miofibroblastos, fibroblastos, células musculares lisas, etc.), células endoteliales, células sanguíneas y células inmunes placentarias (Miller et al. 2005).

## INTRODUCCIÓN: Segunda parte

### 2. Pesticidas o plaguicidas

Los pesticidas incluyen una vasta gama de productos químicos que matan a los insectos, a las malas hierbas, hongos y otros organismos que generan problemas a nivel sanitario o productivo, trayendo grandes beneficios a la sociedad. El uso de pesticidas ha permitido mejorar la producción de alimentos en una población humana en crecimiento y proteger a millones de personas de enfermedades transmitidas por insectos como la malaria. También apoyan a sectores económicos importantes, como a grandes industrias, y contribuyen a crear mejores condiciones de vida mediante la reducción de las poblaciones de insectos en el ambiente doméstico. Sin embargo, su potencial toxicidad para la salud humana y el medio ambiente ha dado lugar a una serie de prohibiciones de los productos químicos más peligrosos. Aunque la ciencia está guiando algunos de esos cambios, todavía se requiere una mejora importante cuando se trata de pesticidas, mediante un mayor seguimiento de sus efectos y de su utilización, para reducir sus impactos negativos y buscar productos alternativos. En los últimos años ha incrementado la comprensión precisa de los efectos de los productos químicos utilizados en la actualidad, incluyendo las múltiples formas en que se degradan en el medio ambiente y el daño que causan en el mismo. Los estudios disponibles indican que, si bien parece poco probable abandonar el uso de pesticidas, es posible y necesario mejorar su uso para el control racional de plagas (Enserink et al. 2013).

#### 2.1. Situación socioeconómica actual

Con la población mundial que prevé para el año 2050 llegar a 9 mil millones de habitantes, la seguridad alimentaria, la disponibilidad y el acceso a los alimentos es cada vez más importante. Los pesticidas pueden ayudar a reducir la pérdida de rendimiento causada por plagas, patógenos y malezas, y así contribuir a alimentar a la población mundial de forma sostenible. Sin embargo, teniendo en cuenta su potencial toxicidad para la salud humana y el medio ambiente, la regulación del uso de plaguicidas en la agricultura es una temática controversial (Verger y Boobis 2013).

# BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Como se observa en la figura siguiente, América Latina se encuentra entre las zonas con mayor uso de pesticidas, y el mismo viene en ascenso en los últimos años. Los principales plaguicidas empleados son herbicidas e insecticidas (Fig. 9).

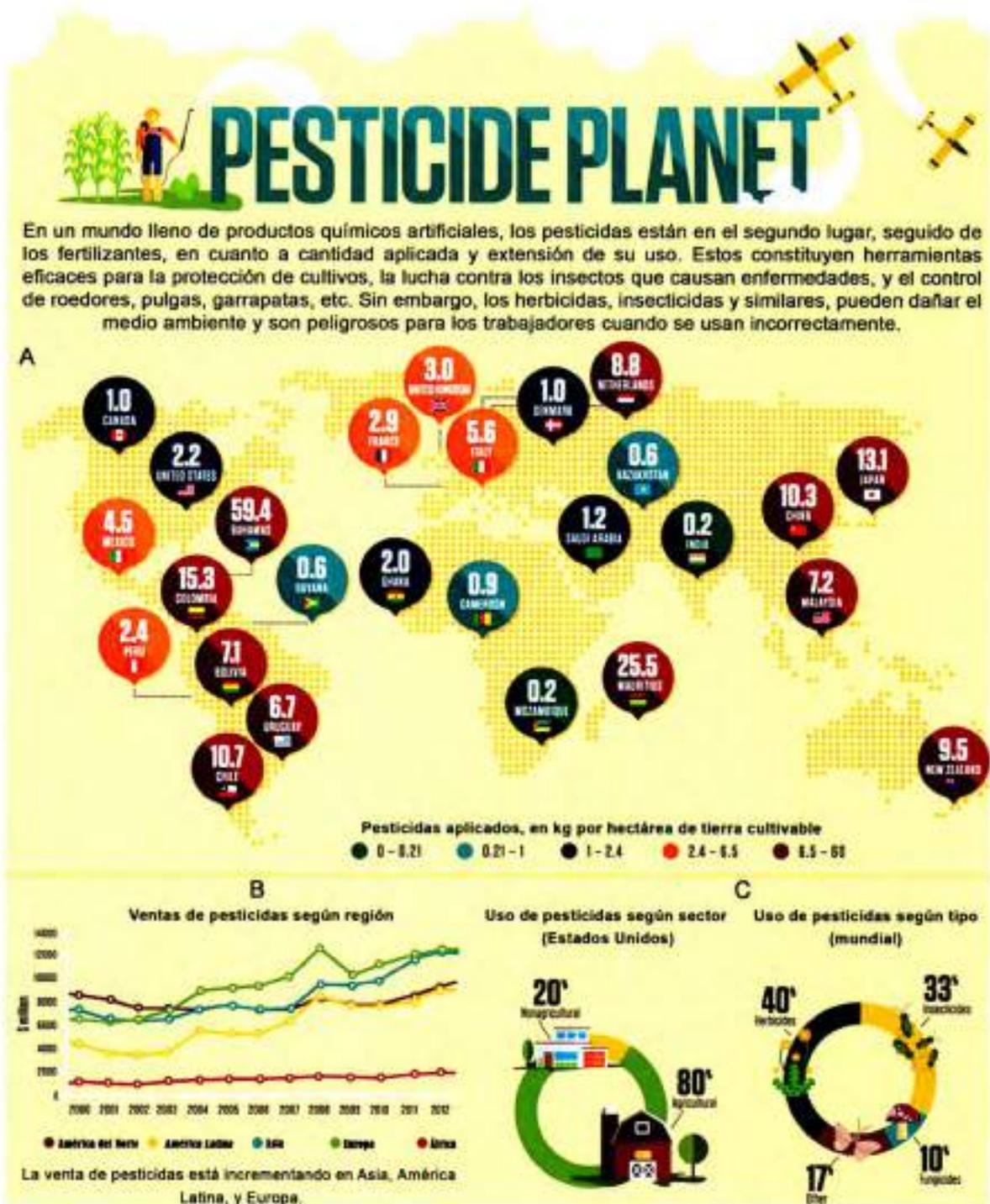


Fig. 9. Uso de plaguicidas en el mundo. (A) Mapa mundial mostrando los kilogramos por hectárea de pesticidas empleados en los países señalados durante el periodo 2005-2009. (B) Venta de plaguicidas a lo largo de los años en los continentes señalados. (C) Porcentaje de empleo de los diferentes tipos de pesticidas. Modificado de edición especial de la revista Science: "Smarter Pest Control" (Enserink et al. 2013).

En nuestro país se reportan datos desde los años 70 sobre el impacto ambiental, en los alimentos y en la salud humana a causa del uso de los pesticidas. Argentina es un país productor agrícola de importancia, lo que trae aparejado la aplicación de significativas cantidades de plaguicidas que impactan sobre la calidad del ambiente. Un cambio agrario importante ocurrido en los últimos años en nuestro país fue la introducción de la soja transgénica resistente al glifosato, lo cual trajo un aumento notable en el rendimiento de las cosechas y de las superficies sembradas, pero ha generado un crecimiento considerable del uso de un paquete tecnológico basado en la utilización de semillas modificadas genéticamente, del herbicida glifosato y de otros insecticidas, como endosulfán, clorpirifos (CPF) y piretroides. Por otro lado, se sabe que en Argentina es común la venta libre de plaguicidas, en consecuencia, sin la seguridad del correcto asesoramiento para su adecuada aplicación (Villaamil Lepori et al. 2013).

Los resultados de investigaciones realizadas recientemente indican un posible riesgo de contaminación, ya sea por deriva (transporte del plaguicida fuera del sitio de aplicación) durante el empleo de pesticidas, o por los flujos de lixiviación, lo que genera posibles riesgos para la biota acuática y los seres humanos, especialmente por los plaguicidas cipermetrina, CPF, endosulfán y el glifosato. Por ejemplo, en un estudio efectuado durante las épocas de aplicación de insecticidas, entre 2001-2003, en los arroyos Brown y Horqueta, en la provincia de Buenos Aires, principal zona de producción de soja de Argentina, se reportaron concentraciones de CPF y cipermetrina en la escorrentía y/o en el agua de inundación superiores a los criterios de calidad de agua dulce, con riesgo grave para la vida acuática. En el arroyo Horqueta, las concentraciones de CPF triplicaron los niveles máximos para agua dulce durante el período de aplicación, lo que podría poner en riesgo a la fauna acuática. En el valle del río Neuquén, fuera del sitio de aplicación de los plaguicidas utilizados en la actividad agrícola, se realizó una evaluación de la migración de residuos de pesticidas. Los resultados mostraron la presencia de residuos en el suelo, en aguas superficiales y en aguas subterráneas poco profundas. La frecuencia de detección más alta en aguas (superficial y subterránea) se encontraron para azinfos- metílico y CPF (> 70 %) (Villaamil Lepori et al. 2013).

Los datos sobre concentraciones de plaguicidas en matrices biológicas dan idea de la contaminación en la población general de nuestro país. Por ejemplo, se encontró en muestras de leche de púerperas del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá (provincia de

Buenos Aires), que el 91.5 % de las 248 muestras estudiadas tenía residuos de por lo menos un plaguicida (Villaamil Lepori et al. 2013). Además, se ha reportado la exposición a pesticidas anticolinesterásicos en mujeres y niños que viven en proximidades a las zonas agrícolas de la provincia de Río Negro (Bulgaroni et al. 2011).

La provincia de Córdoba posee diversas variables geográficas, edafo-climáticas y económico-tecnológicas que dan lugar a un fuerte desarrollo agrícola y ganadero; esta actividad, acompañada del uso de un importante volumen de plaguicidas, aumentó notablemente en los últimos años llegando a utilizar el 48% de la superficie de Córdoba (Blanco et al. 2013). Estudios en nuestra provincia alertan del impacto del empleo de pesticidas en el medio ambiente y en la salud humana regional. Por ejemplo, tanto en la Laguna Mar Chiquita como en el Río Suquia, se hallaron residuos de pesticidas en cantidades que superaron los niveles máximos en agua propuestos por la legislación argentina y también se detectaron pesticidas en concentraciones elevadas en pejerreyes habitantes de dicha laguna (Bonansea et al. 2013; Villaamil Lepori et al. 2013). Así también, se realizó un monitoreo citogenético de trabajadores de la provincia expuestos a plaguicidas y se encontró una mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas en los trabajadores rurales en comparación con el grupo testigo, lo cual pone de manifiesto el riesgo que representa la exposición a plaguicidas para la salud de esta población (Mañas et al. 2009).

## **2.2. Definición y clasificación**

Según la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA), un pesticida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier plaga. Se entiende por plaga a la aparición de organismos vivos en contextos o cantidades no deseadas, o que causan daños a los cultivos, a los seres humanos u otros animales vivos. Los ejemplos incluyen a los insectos, ratones y otros animales, plantas no deseadas (malezas), hongos, microorganismos tales como bacterias y virus, y priones, etc. Por lo cual, aunque a menudo se usa incorrectamente para referirse sólo a los insecticidas, el término pesticida o plaguicida se aplica también a los herbicidas, fungicidas, y varias otras sustancias que se utilizan para controlar las plagas (Environmental Protection Agency 2014).

Los pesticidas o plaguicidas pueden clasificarse atendiendo a diversos aspectos. A menudo se denominan de acuerdo con el tipo de plaga que controlan, como insecticidas,

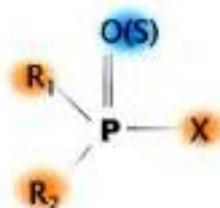
acaricidas, fungicidas, desinfectantes y bactericidas, herbicidas, rodenticidas, fitoreguladores, protectores de madera, etc. Otra forma de clasificarlos es considerar aquellos que son pesticidas químicos o que derivan de una fuente o método de producción común. Los pesticidas químicos se clasifican en carbamatos, organoclorados (OC), organofosforados (OP), piretroides, etc. (Environmental Protection Agency 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado una clasificación de los plaguicidas según su capacidad de producir daño agudo, basada en el valor de la dosis letal media (DL50), como la dosis requerida para matar al 50% de la población de animales de experimentación, determinada en ratas por vía oral o dérmica (en términos de mg/kg del peso del animal). Así, la OMS clasifica los plaguicidas según un orden creciente de DL50 desde el grupo Ia (Extremadamente peligrosos), Ib (Altamente peligrosos), II (Moderadamente peligroso), III (Ligeramente peligroso) hasta el U (Improbable que presente un grave peligro). Esta clasificación está referida a los principios activos, sin embargo la clasificación final de cualquier producto está dada por la formulación real, la cual debe basarse en los datos de toxicidad obtenidos por el fabricante para esa formulación (Fattier 2010). Es importante señalar que las formulaciones de plaguicidas además del principio activo incluyen sustancias transportadoras, diluyentes como solventes orgánicos, aditivos e impurezas, que pueden tener potencial tóxico por sí mismas (Karalliedde et al. 2003). Por otro lado, la información que brinda esta clasificación está sólo asociada con el riesgo agudo para la salud, las evaluaciones de otros efectos, como el cáncer, requieren otro tipo de estudios (Fattier 2010).

### 2.3. Características generales de plaguicidas OP

Los pesticidas OP integran un grupo de compuestos químicos utilizados desde 1930 para la protección de los cultivos, de la ganadería, de la salud humana y también como agentes de guerra. Sin embargo, su uso incrementó rápidamente en los años 70, cuando se prohibió la aplicación de plaguicidas OC como el Diclorodifeniltricloroetano (DDT) debido a su alta persistencia en el medio ambiente (Elersek y Filipic 2011). Los compuestos OP son ampliamente utilizados como pesticidas en la agricultura principalmente en los Estados Unidos, Sudamérica y Asia, donde se aplican grandes cantidades (Elsinghorst et al. 2013), sin embargo en algunos casos también se utilizan para aplicaciones domésticas e industriales (Munoz-Quezada et al. 2013).

Estructuralmente los plaguicidas OP son ésteres del ácido fosfórico y sus derivados y pueden ser representados en forma genérica como se indica en la siguiente figura.



**Fig. 10. Estructura general de los OP.** Un átomo de fósforo central (P) está unido mediante un doble enlace al átomo de oxígeno o azufre y por enlace simple a (X), que representa al grupo "saliente" (el más sensible a la hidrólisis), y a R1 y R2 que son generalmente grupos alcoxilo u otros sustitutos químicos.

Se conoce muy bien que el principal mecanismo de toxicidad de los OP es su capacidad de inhibir a la enzima acetilcolinesterasa (AChE). El grupo saliente X representa el que se sustituye (por sustitución nucleofílica) por el oxígeno de la serina del sitio activo de la AChE a tal fin. En agentes de guerra muy tóxicos X contiene flúor, que tiene una alta tendencia a la hidrólisis y de este modo la inhibición enzimática es extremadamente alta. En OP menos tóxicos, el grupo saliente por lo general contiene grupos alquilo o arilo. La configuración más activa de OP, que se une al sitio activo de la AChE, contiene una estructura oxón, es decir con el P central unido a un átomo de oxígeno. Sin embargo, la mayoría de los nuevos plaguicidas OP poseen la estructura tión, donde el P se encuentra unido a azufre. En este caso, la activación metabólica con las enzimas CYPs deben primero metabolizar el tión a oxón para que el OP actúe como inhibidor de la AChE (Elersek y Filipic 2011).

Para el desarrollo de este trabajo de tesis se utilizó el CPF (O,O-dietil o-(3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), uno de los plaguicidas más frecuentemente utilizados en todo el mundo como ingrediente activo de una gran variedad de formulaciones comerciales (Peris-Sampedro et al. 2014; Solomon et al. 2014). CPF es una molécula altamente lipofílica que pertenece a la familia de plaguicidas OP (Peris-Sampedro et al. 2014), posee acción insecticida de amplio espectro y necesita de su activación por transformación biótica de tión a oxón para poder unirse covalentemente al sitio activo de la AChE (Fig. 11) (Solomon et al. 2014).

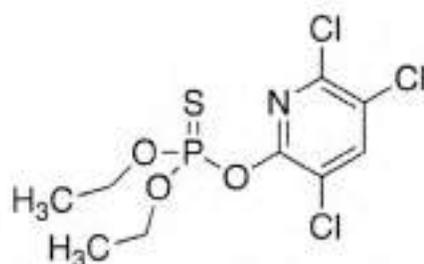


Fig. 11. Estructura química del pesticida CPF.

Según su toxicidad aguda, la OMS clasifica a CPF como moderadamente peligroso (Tipo II) (Fattier 2010). En el medioambiente posee corta a moderada persistencia como resultado de varias vías de disipación que podrían ocurrir simultáneamente, como la volatilización, fotólisis, hidrólisis abiótica, y la degradación microbiana (Solomon et al. 2014).

#### 2.4. Exposición humana a pesticidas

Los plaguicidas pueden transportarse en el ambiente dependiendo de las condiciones climáticas, las características morfológicas de la superficie vegetal y de las características fisicoquímicas del tóxico utilizado (Enriquez 2000). Se ha reportado que del total de plaguicidas aplicados, solo el 1% llega a las plagas (Gavrilescu 2005), siendo la deriva una ruta importante de ingreso de estos tóxicos al medioambiente (Gil y Sinfort 2005). A su vez, la persistencia de los plaguicidas en el ambiente depende de la eficiencia de los procesos de degradación natural, como la biodegradación, la fotodegradación y la hidrólisis química (van der Linden et al. 2009) que, en algunos casos, inducen la transformación de estas sustancias en metabolitos con mayor toxicidad (Belfroid et al. 1998; Cavoski et al. 2008). Por ejemplo, en ambientes naturales el CPF se transforma en 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), un metabolito con alto riesgo tóxico (Caceres et al. 2007). A diferencia de los pesticidas OC, los OP tienen una menor persistencia debido a que los procesos de transformación ambiental se efectúan con mayor eficiencia sobre los enlaces fosfoéster de estas moléculas. Los valores de vida media son muy variados, a modo de ejemplo, CPF tiene una vida media de 94 días, mientras que el diazinón, de 23 días (Morrel et al 1998).

La exposición humana a pesticidas OP se produce a través de una variedad de maneras que involucran el trabajo o la vivienda en proximidades a los campos donde se aplican, su uso residencial o industrial, la inhalación o ingestión no dietética de OP presentes en el polvillo ambiental, y el consumo de productos que contengan residuos de estos

plaguicidas. Para los niños, se cree que la exposición dietética de OP es la vía de exposición predominante. Sin embargo, hace una década, la exposición por el uso residencial de plaguicidas OP resultó ser también una vía de exposición significativa. Además, la exposición para-ocupacional, es decir, la exposición causada por el contacto con una persona ocupacionalmente expuesta o con artículos con los que esta persona ha estado en contacto tales como ropa o superficies, sigue siendo una importante vía de exposición en niños o cónyuges de agricultores o trabajadores agrícolas (Munoz-Quezada et al. 2013).

Los plaguicidas que ingresan al organismo, independientemente de la vía, deben atravesar diversas barreras como la piel, las mucosas, el epitelio pulmonar o el del tracto gastrointestinal. Los pesticidas se distribuyen en los órganos y compartimentos del organismo a través de la circulación con una velocidad que depende de las propiedades fisicoquímicas y las características tóxico-cinéticas propias del plaguicida, de la irrigación sanguínea, del pH tisular, del contenido de lípidos y de agua de cada órgano, etc. La metabolización de OP ocurre principalmente en el hígado. Sin embargo todos los tejidos expresan al menos algunas de las enzimas metabolizantes de xenobióticos, por lo que en menor proporción también ocurre en otros tejidos como cerebro, intestino, piel y placenta (Castro 1985).

En términos generales, los pesticidas OP pueden ser metabolizados a su forma oxón, más tóxica, que puede reaccionar con la AchE, liberando su metabolito específico. Si el plaguicida pierde sus cadenas laterales de carbono, la unión a la AchE se convierte en irreversible, que es el caso más frecuente. Si un pesticida OP no se une a la AchE, puede ser hidrolizado enzimáticamente a través de la enzima paraoxonasa (PON), o se hidroliza de forma espontánea para formar metabolitos específicos del pesticida y metabolitos dialquilfosfatos (DAP) no específicos. Estos metabolitos o sus conjugados glucuronidados o sulfatados se excretan principalmente en la orina. La vida media de pesticidas OP en el cuerpo varía para cada plaguicida pero está en el intervalo de 24-48 h. También se cree que una pequeña parte de algunos de estos plaguicidas puede ser secuestrada en los lípidos almacenados en el cuerpo (Munoz-Quezada et al. 2013).

Los plaguicidas también pueden ingresar al organismo a través de la vía intrauterina. Se han detectado OP en líquido amniótico (Bradman et al. 2003), sangre de cordón (Huen et al. 2012) y meconio (Ostrea et al. 2009; Ostrea et al. 2002). La transferencia de estos tóxicos desde la madre al feto tiene lugar a través de la barrera placentaria. Los valores de

residencia relativa, que reflejan la exposición de cada tejido respecto al plasma materno, sugieren que la placenta funciona como un depósito temporario de tóxicos OP (Abu-Qare et al. 2000).

### 2.5. Biomarcadores asociados a OP

La exposición a los pesticidas OP se puede evaluar a través de cuestionarios, mediciones ambientales y biomonitoreo, este último es cada vez más común. Las mediciones de biomonitoreo utilizadas para evaluar la exposición a plaguicidas OP incluyen la detección de la actividad de la AchE, la medición de los metabolitos urinarios específicos y no específicos, y la medición del plaguicida de origen en la sangre. Las mediciones de pesticidas en sangre proporcionan evidencia inequívoca de la exposición, pero a menudo son difíciles de obtener debido a la reactividad biológica de los pesticidas. Además, los niveles encontrados son típicamente tres órdenes de magnitud más baja que los niveles de sus metabolitos urinarios, lo que complica adicionalmente su medición. La evaluación de la exposición más utilizada consiste en la determinación de metabolitos DAP, de metabolitos específicos de plaguicidas tales como el TCP (metabolito de CPF y CPF-metil) o de pesticidas solubles en la orina (Black y Read 2013; Munoz-Quezada et al. 2013).

Además de los biomarcadores de exposición, existen biomarcadores de susceptibilidad que se han medido y utilizado para ayudar a evaluar la asociación entre la exposición a los pesticidas OP y el neurodesarrollo. El biomarcador de susceptibilidad más estudiado para las exposiciones a OP son los polimorfismos en el gen que codifica a la enzima PON1, algunos de los cuales se encuentran relacionados a cambios en su expresión y actividad (Tsatsakis et al. 2011; Tsatsakis et al. 2009), alterando así la capacidad de una persona para desintoxicar los pesticidas OP. Uno de estos polimorfismos conduce a un cambio en el aminoácido 192 de Glu/Arg y las personas homocigotas para este cambio poseen alrededor de tres veces menos actividad de PON1 que los individuos homocigotas tipo nativo (Munoz-Quezada et al. 2013).

Los biomarcadores también se utilizan para evaluar los efectos de la exposición a OP. Las actividades de la AchE eritrocitaria y de la butirilcolinesterasa plasmática se utilizan como marcadores biológicos en ambientes clínicos y ocupacionales. El biomarcador de efecto más utilizado para la exposición a plaguicidas OP es la disminución funcional en la actividad AchE, principalmente utilizado para monitorear la exposición aguda de los trabajadores agrícolas.

Sin embargo, su uso requiere la evaluación de los niveles de actividad basales y se cree que es sensible sólo frente a altas exposiciones. Además, a pesar de que la actividad de la AchE es una medida apropiada para detectar efectos agudos, esta no puede ser un biomarcador informativo de los efectos sobre el neurodesarrollo en los niños ya que la mayoría de ellos se cree que son el resultado de la interferencia de vías dopaminérgicas o serotoninérgicas durante el desarrollo a niveles de exposición que no causan inhibición apreciable de la AchE (Munoz-Quezada et al. 2013).

## 2.6. Toxicidad de pesticidas OP sobre la salud humana

Miles de casos de intoxicación por OP han sido reportados en el pasado y lo siguen siendo anualmente en todo el mundo, sea su causa suicida, accidental u ocupacional (Recena et al. 2006; Steenland et al. 2000). Actualmente los envenenamientos por OP son un importante problema de salud en todo el mundo. Se estima que hay más de tres millones de casos y más de 250.000 muertes al año a partir del auto-envenenamiento intencional que representa el 30% de los suicidios a nivel mundial (Carey et al. 2013).

La enzima AchE, considerada el principal blanco de los OP, tiene una distribución tisular variada con notable presencia en tejidos no neuronales, inclusive en placenta (Bhuiyan et al. 2006). Los OP ejercen sus efectos tóxicos agudos principalmente mediante la unión covalente a la enzima AchE, donde la fosforilación o fosfonilación del residuo serina de su sitio catalítico la inactiva. La dificultad de la AchE inhibida para hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina (Ach) resulta en una exacerbación de las sinapsis muscarínicas (sudoración profusa, diarrea, calambres abdominales, bradicardia, salivación, broncoconstricción, etc.) y nicotínicas (fasciculaciones musculares, calambres, disfunción muscular severa, etc.). La secreción excesiva en el tracto respiratorio, la parálisis de los músculos respiratorios y la alteración respiratoria central pueden llevar a paro respiratorio y finalmente hacia la muerte (Carey et al. 2013; Elsinghorst et al. 2013).

Otra esterasa blanco de varios OP es la esterasa neuropática, fosfolipasa involucrada en el metabolismo fosfolipídico, el crecimiento neuronal y la diferenciación neuronal (Terry 2012). La fosforilación de ésta por OP es similar a la observada en AchE, y conlleva a la degeneración axonal (Lotti y Moretto 2005), pudiendo producir una polineuropatía que ocurre 2-3 semanas posteriores a una única exposición a OP, y se caracteriza por hormigueo

de las manos y pies seguido por pérdida sensorial, debilidad muscular progresiva y flacidez muscular (Costa 2006; Richardson et al. 2013).

Además de los aductos que los OP forman con el sitio activo de enzimas de la superfamilia de serina-hidrolasas, como las citadas anteriormente, el análisis de una variedad de proteínas por espectrometría de masa permitió la identificación de la unión covalente de OP a residuos tirosina y lisina de otras proteínas, lo que sugiere que numerosas proteínas pueden ser modificadas por los OP (Terry 2012).

Si bien está establecida la causa de la neurotoxicidad aguda causada por OP, el impacto en la salud inducido por su exposición crónica sigue siendo controvertido. Un número importante de productores manifiestan problemas de salud crónicos que ellos atribuyen a la exposición repetida a los OP (Povey 2010). Además, estudios recientes sugieren mecanismos adicionales independientes de los efectos colinérgicos, ya que se observan interferencias con el desarrollo neurológico normal con concentraciones inferiores a las que afectan a la transmisión colinérgica. Por ejemplo, el CPF y el diazinón provocan efectos adversos en el neurodesarrollo en exposiciones a concentraciones menores a las requeridas para inhibir a la AchE. Estos efectos se han asociado con los pesticidas originales y no con sus metabolitos oxón, que son los principales responsables de la inhibición de la AchE (Androutsopoulos et al. 2013).

Muchos estudios revelan efectos adversos sobre el desarrollo neurológico de niños a causa de la exposición a plaguicidas OP, especialmente a nivel cognitivo, conductual (principalmente relacionado con problemas de atención) y motor (Munoz-Quezada et al. 2013; Polanska et al. 2013). Por ejemplo, la exposición durante el desarrollo al insecticida CPF es actualmente un tema de preocupación para la salud infantil dada su actividad neurotóxica en dosis bajas. Ratones expuestos a CPF en el útero y/o en el desarrollo temprano presentan respuestas sociales y emocionales afectadas de manera diferente para ambos sexos, lo cual llevó a proponer a CPF como un disruptor neuroendocrino y posiblemente un factor de riesgo para los trastornos del neurodesarrollo en los niños (Venerosi et al. 2012). Por otro lado, muchos trabajos realizados para determinar los efectos neurotóxicos de la exposición a largo plazo a niveles bajos de OP en lugares de trabajo, han encontrado una asociación significativa con el deterioro de la función neuroconductual, de pequeña a moderada magnitud, principalmente en las funciones cognitivas, tales como la actividad psicomotora, función ejecutora, la capacidad visoespacial, el trabajo y la memoria

visual (Ross et al. 2013). Además, la asociación entre la exposición a OP y la demencia, principalmente asociada a la enfermedad de Alzheimer, está siendo muy estudiada pero aún es controversial (Zaganas et al. 2013).

Los efectos adversos frente a la exposición a estos químicos han sido estudiados ampliamente en el sistema nervioso, tejido blanco primario de estos compuestos, pero en la actualidad se están investigando activamente sus efectos tóxicos en otros sistemas. En este sentido, se ha observado que los plaguicidas OP afectan el metabolismo celular de hidratos de carbono y lípidos y pueden conducir a resistencia a la insulina y alteraciones en la homeostasis de la glucosa. El mecanismo subyacente se cree que implica un aumento de la exocitosis de los gránulos de insulina y glucagón mediada por un aumento de los niveles de calcio citosólico libre como resultado de la activación continua de la señalización mediada por la PKC luego de la unión de Ach a los receptores muscarínicos M3 en células pancreáticas. La inducción de estrés oxidativo por OP a través del desequilibrio del estado oxidativo de las células puede reducir la secreción de insulina estimulada por la glucosa, lo que resulta en aumento de los niveles de glucosa en suero (Androutsopoulos et al. 2013). Por otro lado, los pesticidas OP son capaces por sí mismos de interferir con la función endócrina mediante la inhibición de la unión de las hormonas tiroideas a sus correspondientes receptores. También reducen el metabolismo de estradiol y perturban su función normal mediante la inhibición potente de enzimas CYP450. CPF además es capaz de inhibir la esteroidogénesis adrenal, afectando así el estado hormonal. La inhibición de la AchE en el hipotálamo después de la exposición a OP altera la tasa de secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas, que en última instancia afecta a la secreción de las hormonas hipofisarias que estimulan las gónadas, tales como la FSH y la LH. La actividad colinérgica en el cerebro también aumenta la secreción hipofisaria de prolactina (Androutsopoulos et al. 2013).

Actualmente algunas evidencias sugieren que la exposición a los pesticidas OP, en niveles tanto ocupacionales como ambientales, puede relacionarse con la disminución de parámetros de calidad del esperma, en especial con la concentración de espermatozoides (Martenies y Perry 2013). También se han observado asociaciones entre algunos productos químicos específicos dentro de los plaguicidas OP y una variedad de cáncer en humanos (Alavanja y Bonner 2012). Finalmente, si bien existen estudios que indican que algunos pesticidas pueden afectar el sistema inmunológico, en general, los estudios epidemiológicos

existentes son insuficientes para elevar conclusiones sobre el riesgo inmunotóxico asociado a la exposición a pesticidas (Corsini et al. 2013).

## 2.7. Efectos de plaguicidas OP sobre la gestación y la placenta humana

Existen estudios que sugieren un mayor riesgo de abortos espontáneos, bajo peso al nacer, RCIU y parto prematuro en mujeres embarazadas expuestas a plaguicidas OP (Adhikari et al. 2011; Dabrowski et al. 2003; Eskenazi et al. 2004; Levario-Carrillo et al. 2004a; Rita et al. 1987; Stillerman et al. 2008; Whyatt et al. 2005). Sin embargo, el efecto de estos tóxicos sobre la gestación, el desarrollo fetal y la placenta, permanecen controvertidos (Eaton et al. 2008). Así, un estudio reciente ha revisado la información epidemiológica existente y concluye que no existen suficientes evidencias que permitan establecer una asociación consistente entre niveles de exposición *in útero* a CPF y el peso, la talla o la circunferencia cefálica del recién nacido (Mink et al. 2012). Aunque se requieren estudios epidemiológicos para la evaluación del riesgo, estos presentan algunas limitaciones como la dificultad para descartar la exposición a otras sustancias tóxicas u otros factores, para demostrar la causalidad, o para obtener medidas precisas de la exposición individual al tóxico en cuestión (Devlin et al. 2005). Más aún, la evaluación epidemiológica de efectos tóxicos como la disminución en la fecundidad de mujeres en edad reproductiva y/o el desencadenamiento de abortos muy tempranos (por fallas en la implantación o en el desarrollo inicial de la placenta) presenta, además, nuevas limitaciones como la dificultad de detectar este tipo de abortos y de demostrar causalidad entre exposición a un tóxico y la disminución de la fecundidad (Peiris-John y Wickremasinghe 2008). Por lo tanto, con la información disponible, no es posible concluir si su uso representa o no un riesgo potencial en la gestación temprana. Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior (Ver 2.5), cada vez más evidencias señalan que la exposición *in útero* a OP como CPF afecta el neurodesarrollo y los índices psicomotores del individuo en su infancia (Androutsopoulos et al. 2013; Eskenazi et al. 2007; Rauh et al. 2011; Zhang et al. 2014). Recientemente un estudio acerca de trastornos autistas fortalece la evidencia que relaciona los trastornos del neurodesarrollo con la exposición a pesticidas durante la gestación, y en particular, a los OP (Shelton et al. 2014). Además, durante el embarazo, niveles maternos disminuidos de enzimas implicadas en su metabolismo, a veces asociados con la presencia de diferentes

polimorfismos, como ha sido demostrado para PON1, pueden incrementar la susceptibilidad de los hijos a desarrollar neurotoxicidad frente a OP (Eskenazi et al. 2014).

Para el CPF la información disponible sobre la embriotoxicidad también es contradictoria. La mayoría de los estudios realizados, que siguen las directrices de las guías OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) para la evaluación de la toxicidad reproductiva, han reportado embriotoxicidad sólo a dosis con las cuales se genera alta toxicidad materna. Sin embargo, otros estudios han informado que las inyecciones de CPF por vía subcutánea en ratas, durante diferentes periodos gestacionales, reducen irreversiblemente el contenido de dopamina en la corteza cerebral y en el hipocampo, dos regiones clave del cerebro implicadas en el aprendizaje y la memoria. Las discrepancias mencionadas podrían explicarse sobre la base de la ruta de exposición. En efecto, las directrices de la OECD consideran exclusivamente la exposición oral donde, al pasar por el hígado materno, el CPF administrado podría bioactivarse masivamente a su oxón, que es un inhibidor más potente de la AchE, y causar signos clínicos colinérgicos antes de alcanzar concentraciones embriotóxicas. La exposición laboral humana es en esencia inhalatoria o dérmica, lo cual podría implicar que mayores concentraciones de CPF alcancen el embrión sin producir signos de toxicidad materna. Recientemente, un estudio *in vitro* demostró que CPF y sus metabolitos son más citotóxicos para las células madre embrionarias que para los fibroblastos, y que pueden alterar significativamente la expresión de genes con capacidad probada para detectar la exposición a embriotóxicos, en concentraciones con baja o nula citotoxicidad (Estevan et al. 2013).

Como se señaló (Ver Introducción: Primera Parte, sección 1.6), la placenta cumple un rol muy importante frente a la exposición o protección del feto a tóxicos actuando, ya sea, como barrera de protección o metabolizando los tóxicos (Magnarelli y Guiñazú 2012; Nicholson 2013; Pavek y Smutny 2013). Además, el delicado balance de interacciones entre programas endógenos de expresión génica y señales externas, responsable del desarrollo y diferenciación de la placenta, puede ser alterado debido a la exposición a bajos niveles de contaminantes ambientales (Myllynen et al. 2005). Si bien muchos estudios han demostrado la presencia de OP o sus metabolitos en la placenta, líquido amniótico o cordón umbilical, pocos han analizado los efectos que causan estos pesticidas en la placenta. En este sentido, se ha reportado que la exposición prenatal a OP se asocia con modificaciones en las actividades de las enzimas placentarias AchE, carboxilesterasa (CaE), y CAT (Bulgaroni et al.

2013; Chiapella et al. 2014; Souza et al. 2005); que los OP azinfos-metilo, fosmet y CPF modifican el metabolismo de fosfoinosítidos y la actividad PI-4 quinasa en la placenta (Souza et al. 2004) y que CPF induce apoptosis en las células JAR a través de un mecanismo de señalización que no depende de FAS / TNF, de la activación de caspasas o de la inhibición de la AchE (Saulsbury et al. 2008). Recientemente se observó en placentas de mujeres que viven en una zona rural de la Patagonia argentina recolectadas en temporada de aplicación de plaguicidas, que la frecuencia de expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-13 y las actividades de las enzimas arginasa y ornitina descarboxilasa, implicadas en la reparación del tejido, fueron inducidas en el STB y en las células endoteliales (Bulgaroni et al. 2013). A nivel histológico, Levario-Carrillo et al. han descrito cambios en la estructura de la vellosidad coriónica inducidos por pesticidas *in vivo* tanto en ratas como en humanos (Levario-Carrillo et al. 2004a; Levario-Carrillo et al. 2001).

Sin dudas, una mejor comprensión de las patologías placentarias más comunes y las consecuencias de la exposición a tóxicos es de suma importancia para el avance del cuidado de la salud materno-fetal adulta. El estudio de esta problemática requiere de la concurrencia de diferentes abordajes. En esta tesis se pretende evaluar el efecto del pesticida OP CPF sobre la placenta humana a través de distintos modelos de exposición *in vitro*.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

## HIPÓTESIS

Tal como se señaló en la Introducción, la placenta cumple un rol central en el mantenimiento del embarazo; su desarrollo requiere una adecuada interacción entre programas endógenos y señales externas que convergen en la regulación de la expresión de genes; y su funcionalidad puede ser alterada por xenobióticos que llegan a través de la sangre materna.

La exposición a pesticidas OP ha incrementado notablemente para proteger las cosechas y mantener los ambientes libres de insectos. Si bien, los efectos tóxicos más conocidos de estos pesticidas son su neurotoxicidad debida a la inhibición de las enzimas AchE y esterasa neurotóxica, se ha demostrado que también pueden provocar una acción tóxica directa sobre otros tejidos y mediante mecanismos independientes de la inhibición enzimática.

Algunos estudios epidemiológicos han asociado la exposición de embarazadas a pesticidas OP con abortos espontáneos, parto prematuro, bajo peso al nacer o RCIU y deterioro del neurodesarrollo e índices psicomotores. Sin embargo, el impacto de los mismos sobre la gestación es aún controversial y son muy escasos los estudios que han evaluado directamente su efecto sobre las células y el tejido placentario.

En este contexto, la caracterización de los posibles daños celulares y moleculares ocasionados por los OP sobre las células trofoblásticas, principales ejecutoras de las funciones placentarias, y el conocimiento de los mecanismos involucrados, podría contribuir a la interpretación del impacto que la exposición ambiental a estos pesticidas ejerce sobre la salud materno-fetal.

Considerando los aspectos anteriormente mencionados, en este trabajo de tesis se planteó la siguiente hipótesis:

*“La exposición a plaguicidas OP afecta las funciones de los trofoblastos, la expresión de genes asociados a ellas, y la estructura de las vellosidades coriónicas de la placenta humana”.*

## OBJETIVOS

Para evaluar la hipótesis planteada, y reconociendo la importancia de realizar estudios toxicológicos en modelos celulares y tejidos humanos *in vitro* que permitan asociar directamente los efectos observados a un tóxico en particular, en este trabajo de Tesis Doctoral se propuso como Objetivo General:

*“Caracterizar los efectos de pesticidas OP sobre la placenta humana empleando modelos in vitro”.*

En base a los antecedentes presentados, se seleccionó al insecticida CPF como modelo de pesticida OP, y se plantearon los siguientes Objetivos Específicos:

- I. Determinar el impacto de CPF sobre la viabilidad de CTBv y CTBev;*
- II. Investigar si CPF altera la diferenciación de los CTBv o la proliferación, migración e invasión de los CTBev;*
- III. Evaluar el impacto del tóxico sobre la expresión de genes/proteínas relevantes para la fisiología trofoblástica;*
- IV. Estudiar posibles mecanismos moleculares involucrados en los efectos observados;*
- V. Caracterizar el efecto de CPF sobre la estructura de las vellosidades coriónicas.*

Los objetivos I y II pretenden determinar si los CTBv y/o CTBev son susceptibles o resistentes al efecto citotóxico de CPF descrito en otros tipos celulares, y si el mismo interfiere con alguno de los procesos esenciales que llevan a cabo los trofoblastos vellosos y extravellosos. Mediante los objetivos III y IV se pretende identificar moléculas que puedan a futuro evaluarse como posibles biomarcadores de daño o susceptibilidad frente a CPF y que permitan explicar, al menos en parte, la respuesta de los trofoblastos frente al tóxico. Finalmente, el último objetivo pretende evaluar el posible efecto tóxico del pesticida en la estructura de la vellosidad placentaria y determinar la influencia del contexto tisular en la susceptibilidad de los CTBv al plaguicida.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## MATERIALES y MÉTODOS

### 1. CPF: Modo de uso y controles

Se utilizó CPF (O,O-dietil o-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato) (CAS#2921-88-2) con una pureza del 99,5% de la compañía química Sigma (St. Louis, MO, USA). Se prepararon soluciones stock 0,25 M (molar) utilizando como solvente al dimetilsulfóxido (DMSO), debido a su baja solubilidad en medios acuosos. Se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se evitaron ciclos de congelamiento-descongelamiento. Los residuos generados fueron inactivados en solución de hidróxido de sodio 10 % p/v.

Las diluciones finales para realizar los tratamientos sobre los cultivos fueron hechas directamente con el medio de cultivo e inmediatamente antes de utilizarlas. Para todos los modelos de cultivo empleados en esta Tesis se incluyeron controles sin el tóxico, con DMSO y sin DMSO. En los primeros se empleó DMSO en una concentración porcentual equivalente a la presente en las células expuestas a CPF en la máxima dosis utilizada. En los controles sin DMSO se colocó solo medio de cultivo sin la presencia del tóxico ni de su vehículo. De esta forma se pudo asegurar que las alteraciones observadas en los parámetros estudiados eran sólo a causa de la exposición a CPF (en la sección Resultados se muestran los controles correspondientes a las muestras tratadas con DMSO). La proporción de DMSO fue del 0,02%, 0,04% y 0,08% (v/v) para los experimentos donde la concentración máxima de CPF fue de 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Cabe señalar que las concentraciones empleadas son mucho menores a la concentración citotóxica de DMSO reportada para células trofoblásticas (2%) y a las concentraciones que inhiben la diferenciación de las mismas ( $> 0,5\%$ ,  $< 2\%$ ) (Thirkill y Douglas 1997).

### 2. Líneas celulares eucariotas: JEG-3, BeWo y HTR-8/SVneo

#### 2.1. Cultivo y exposición a CPF o $\text{H}_2\text{O}_2$

Las líneas celulares empleadas en los distintos experimentos se cultivaron en atmósfera de  $\text{CO}_2$  5% v/v a  $37^{\circ}\text{C}$  en los siguientes medios de cultivo suplementados:

- JEG-3, derivada de coriocarcinoma humano: DMEM (Gibco) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina (Gibco) y suero fetal bovino (SFB) (PAA o Natocor) al 10% v/v.
- BeWo, derivada de coriocarcinoma humano: DMEM-F12 (Gibco) suplementado con 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomina, 0,4 mM de glutamina (PAA) y SFB al 10% v/v.
- HTR-8/SVneo, trofoblastos de primer trimestre inmortalizados (Graham et al. 1993): DMEM-F12 suplementado con 0,05 mg/mL de gentamicina (Schering-Plough) y SFB al 10% v/v.

Para repicar, las células se lavaron 2 o 3 veces con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,4 g/L y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/L pH 7,4) y posteriormente se trataron con 1 mL de tripsina 0,05% p/v (Gibco) 2 a 5 minutos (min) a 37 °C. Una vez desprendidas las células, se agregó 1 mL del medio suplementado al 10% v/v con SFB a fin de inhibir la tripsina. Posteriormente se cuantificaron en cámara de Neubauer tiñendo una alícuota de la suspensión celular con azul de tripán (colorante que puede ingresar solo en las células muertas) y observando en microscopio de contraste de fase. Se contaron solo las células viables y se dividieron de acuerdo al número de placas necesarias o se congelaron gradualmente a -80°C en 10% v/v de DMSO.

Para la realización de los tratamientos con CPF o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sembró la cantidad de células necesarias para obtener luego de 24 h una confluencia de entre 70 y 80%. Dicho número de células debió optimizarse y dependió de la línea celular y del modelo de placa a utilizar (Ver detalles en ítems correspondientes a los diferentes experimentos específicos). Una vez obtenida dicha confluencia se realizaron los tratamientos con CPF y sus respectivos controles o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en medio de cultivo equivalente al correspondiente para cada línea celular, pero disminuyendo diez veces la cantidad de SFB a fin de reducir la interacción del pesticida con proteínas séricas y su posible hidrólisis (Qiao et al. 2001; Saulsbury et al. 2008). Se verificó que la reducción del SFB no inducía muerte en las líneas celulares empleadas. Finalmente el medio de cultivo con el tratamiento correspondiente se renovó cada 24 h.

## 2.2. Exposición de las células JEG-3 a N-acetilcisteína (NAC)

Las células fueron crecidas al 70-80% de confluencia y se incubaron con 10 mM de NAC en su correspondiente medio de cultivo durante 2 h, luego se les retiró el mismo y se

les agregó medio nuevo con las respectivas concentraciones de CPF o sus controles junto con 10 mM de NAC. Se incubaron durante 24 h. Cabe agregar que la concentración de NAC fue elegida de forma tal que no afectara la viabilidad celular.

### **2.3. Silenciamiento de las células JEG-3 con ARN pequeños de interferencia (siARN)**

Células JEG-3 (250.000 por pocillo) se cultivaron en su correspondiente medio de cultivo (Ver ítem 2.1) en multiplacas de 6 pocillos con un volumen final de 2 mL. Luego de 24 h las células se lavaron con PBS y se transfectaron con siARN específicos para KLF6 (Ambion Id#9700) en una concentración final de 25 nM, para NRF2 (Santa Cruz sc-44332, pool de 3 siARNs específicos de 19-25 nucleótidos) en una concentración final de 10 nM, para  $\beta$ -hCG (Santa Cruz sc-39540, siARN de 19-25 nucleótidos) en una concentración final de 50 nM, o con una mezcla de ARN pequeños al azar (5CB, Ambion) en cantidades equivalentes, como control. Se utilizó 3  $\mu$ L del reactivo comercial RNAiMAX (Invitrogen) en un volumen final de 700  $\mu$ L por pocillo del medio de cultivo OPTI-MEM (Gibco) con 10% v/v de SFB libre de antibióticos, según el protocolo recomendado por el fabricante.

## **3. Cultivos a partir de placentas humanas normales a término**

Los cultivos se realizaron a partir de placentas humanas a término (37-41 semanas de gestación) obtenidas en el Hospital Privado de Córdoba capital, de pacientes no identificados, con la aprobación del Comité de Estudios Humanos de dicho centro. Se solicitó que las mismas provengan de embarazos sin patologías asociadas como preeclampsia, diabetes gestacional, hipotiroidismo, etc. Además se utilizaron sólo las obtenidas por cesáreas, a fin de reducir posibles contaminaciones y estrés asociado al pasaje por el canal de parto. Para su transporte desde el centro de salud hacia el laboratorio donde se procesaron, las placentas se colocaron en un frasco estéril cubierto con hielo.

### **3.1. Explantos vellosos: Obtención, cultivo y exposición a CPF**

El tejido se procesó dentro de los aproximadamente 30 min posteriores al alumbramiento. Para ello inicialmente se realizaron sucesivos lavados y disecciones, para luego retirar la porción correspondiente a la decidua, a fin de quedarse sólo con la porción

vellosa. Se lavó con solución fisiológica estéril reiteradas veces para eliminar la sangre contenida en el tejido. Se cortaron trozos de tejido cada vez más pequeños y se lavaron exhaustivamente hasta obtener trozos de muy pequeño tamaño (1-1.5 milímetros cúbicos) libres de calcificaciones, infartos, coágulos, fibrosis y vasculatura visible.

Posteriormente los explantos obtenidos se colocaron en placas de 24 pocillos en una proporción de 3 explantos por 1 mL (por pocillo) de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con antibióticos (estreptomicina 0,1 mg/mL, penicilina 100 U/mL) y SFB al 10% v/v y se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% v/v. Luego de 8 h se procedió a cambiar el medio de cultivo realizando los tratamientos con CPF o sus respectivos controles en las concentraciones especificadas en la sección de Resultados correspondiente. Los tratamientos se realizaron durante 36 h.

La puesta a punto de estos cultivos se realizó gracias a la ayuda del equipo de trabajo de la Dra. Estela Bevilacqua en el Laboratorio de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo, Brasil.

### **3.2. Purificación de CTBv**

Se procedió de forma equivalente a la descrita para la obtención de explantos vellosos. Se tomaron entre 17 y 20 g de explantos libres de calcificaciones, infartos, coágulos, fibrosis y vasculatura visibles y se lavaron 3 veces con solución salina balanceada (HANKS 1X o HBSS) libre de calcio y magnesio. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 incubaciones de 30 min con agitación (80 rpm) a 37 °C en tampón de digestión (10 mL de Tripsina Gibco 5% p/v en HANKS 1X, 2 mL de penicilina 10.000 U/mL / estreptomicina 10 mg/mL, 5 mL de HEPES 1 M, 0,85 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M, 10 µL de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 10.000 UI DNAsa I - Sigma aprox. 20-25 mg - y HANKS 1X hasta completar 200 mL), de acuerdo al protocolo de Kliman et al. (Kliman et al. 1986) con modificaciones. El primer paso de tripsinización se realizó en 70 mL del tampón y finalizado el tiempo de incubación se dejó decantar los explantos y se tomaron 35 mL de sobrenadante. A los 35 mL remanentes de sobrenadante de la primera tripsinización se le agregaron 70 mL de tampón de digestión y, luego de la incubación con agitación, se recuperó el sobrenadante por completo. Finalmente, la última incubación se realizó en 60 mL del tampón. En todos los casos la acción de la tripsina en los sobrenadantes fue bloqueada por el agregado de SFB al 10% v/v inmediatamente después de recogidos. Los sobrenadantes neutralizados se centrifugaron por 10 min a 850 rcf (fuerza

g) a temperatura ambiente en tubos Falcon de 15 mL, obteniéndose un pellet compuesto por 2 fases, una superior blanca en la que se encuentran los CTBv junto con otras células de la vellosidad y una fase inferior roja que contiene principalmente glóbulos rojos. Los sobrenadantes de las centrifugaciones se eliminaron y los pellets fueron resuspendidos en 1,5 mL de DMEM suplementado con antibióticos. Estas resuspensiones fueron filtradas en una malla metálica de 100  $\mu\text{m}$  a fin de eliminar agregados de células y posibles fibras remanentes y se llevó a un volumen final de 50 mL con DMEM suplementado con antibióticos. Posteriormente se alicuotó en 4 tubos con 12,5 mL que fueron centrifugados a 850 rcf a temperatura ambiente por 10 min. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets se resuspendieron en 0,5 mL de DMEM suplementado con antibióticos, obteniendo un volumen final de aproximadamente 3 mL que se sembraron en un gradiente de Percoll (GE Healthcare). El gradiente se obtuvo preparando un rango de Percoll en HANKS suplementado con antibióticos, que van del 70% al 5%, escalonando de 5 en 5, sembrando 2,5 mL de cada concentración. Una vez sembrados cuidadosamente los 3 mL de muestra en la superficie del gradiente, se centrifugó a temperatura ambiente por 35 min a 1200 rcf, sin freno. En la zona del gradiente que corresponde a un 40% de Percoll se observó la presencia de un anillo blanquecino correspondiente a las células trofoblásticas. Cuidadosamente se eliminó la parte superior del gradiente y se recuperó la porción correspondiente (entre 8 y 10 mL) en un tubo Falcon de 15 mL llevando a volumen final con DMEM suplementado con antibióticos. Se centrifugó 10 min a temperatura ambiente a 850 rcf y se observó un pellet blanco que fue lavado 2 veces en DMEM suplementado con antibióticos y finalmente resuspendido en un volumen de 5 mL. El número de células citotrofoblásticas obtenidas y su viabilidad se estimó en cámara de Neubauer tiñendo una alícuota de la suspensión celular con azul de tripán y observando en microscopio de contraste de fase. La pureza de la población celular se evaluó mediante inmunotinción de citoqueratina 7, marcador trofoblástico, obteniendo cultivos de más del 95% de pureza. Con el fin de obtener mayor número de CTBv viables, el procedimiento hasta aquí descrito fue realizado en un mismo día con una duración de aproximadamente 12 h y con una recuperación aproximada de entre 12 y 30 millones de células por gradiente de Percoll.

### 3.3. CTBv: Cultivo y exposición a CPF

Los CTBv purificados a partir de placentas normales a término y cultivados *in vitro*, no proliferan en cultivo sino diferencian espontáneamente en presencia de 10% v/v de SFB a estructuras tipo sinciciales (Douglas y King 1990; Morrish et al. 1997). Dichas células se cultivaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% v/v en medio de crecimiento para queratinocitos (KGM, Gibco) suplementado con antibióticos (estreptomicina 0,1 mg/mL, penicilina 100 U/mL), SFB al 10% v/v y 5 ng/mL de EGF (Gibco). Este factor de crecimiento se coloca a fin de incrementar el tamaño y número de sincicios obtenidos en la diferenciación de los CTBv (Morrish et al. 1997). Tres horas posteriores al plaqueo se efectuaron dos lavados con PBS y el cambio total de medio, a fin de eliminar posibles fragmentos sinciciales que hayan sido copurificados, ya que estos no se adhieren a la placa a tiempos cortos de cultivo. Se realizaron tratamientos con CPF utilizando el medio de cultivo citado anteriormente (necesario para que los CTBv diferencien *in vitro*) a diferentes tiempos, los cuales se detallan en la sección Resultados. Los tratamientos fueron renovados cada 24 h de cultivo. Cabe citar que estas células no sobreviven a ciclos de congelado-descongelado.

### 3.4. CTBv: Cálculo del índice de fusión

A fin de calcular el índice de fusión de los CTBv, estos se expusieron o no a CPF a las 3 h post-plaqueo sobre vidrios para inmunofluorescencias, durante 64 h totales de cultivo, tiempo necesario para que la mayor parte de los CTBv hayan diferenciado a estructuras tipo STB. Las células se fijaron y se sometieron a marcaciones con anticuerpos anti-desmoplaquina (Sigma, dilución 1:400) y con Hoechst 33342 (Molecular Probes), como se describe en la sección 8.2, y luego se cuantificó el número de núcleos en estructuras tipo STB, los núcleos totales y la cantidad de estas estructuras. Se analizaron más de 500 núcleos por condición en cada experimento independiente proveniente de placentas diferentes y se calculó el índice de fusión como: (cantidad de núcleos en STB – cantidad de STB totales) / cantidad de núcleos totales x 100.

## 4. Evaluación de la viabilidad celular

### 4.1. Ensayos de MTT

Para realizar los ensayos de reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) inicialmente se determinó el número de células óptimo para cada tipo celular

r empleado, realizando una curva de señal de MTT en función del número de células, eligiéndose el número tal que esté en la zona media del rango lineal. Se utilizaron placas de 96 pocillos y se sembraron 10.000 células JEG-3 o BeWo, 4.500 células HTR-8/SVneo o 40.000 CTBv por pocillo, en un volumen final de 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Luego de 24 h se expusieron a CPF o sus respectivos controles durante el tiempo de tratamiento deseado. Posteriormente se añadieron 10  $\mu$ L por pocillo de una solución 5 mg/mL del reactivo MTT (Sigma) y se incubó durante 2,5 h en estufa de cultivo (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> v/v). Durante este tiempo el reactivo ingresa a las células, y enzimas del retículo endoplásmico y mitocondriales lo transforman en un producto sólido coloreado (Berridge et al. 1996). Se utiliza para evaluar viabilidad celular ya que las células muertas no poseen enzimas activas para realizar dicha reacción. Luego de la incubación se quita suavemente el medio de cultivo y se resuspenden las células con los cristales formados en 100  $\mu$ L de DMSO por pocillo. Se lee la absorbancia a 560 nm y los resultados se expresan como el porcentaje de viabilidad relativa a la condición control, calculado como: % Viabilidad = (Promedio de la absorbancias provenientes de las células tratadas / Promedio de las absorbancias provenientes de las células control) x 100. Como control positivo de funcionamiento de cada ensayo, se trataron células con 25  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h, condiciones citotóxicas para los cultivos empleados.

### 4.2. Tinción con Naranja de Acridina (NA) y Bromuro de Etidio (BE)

Se colocaron portaobjetos circulares estériles en las placas de cultivo previo a la siembra de las células y las mismas se expusieron o no a CPF durante los tiempos indicados en la sección Resultados. Cumplido el período de exposición, las células se lavaron tres veces con PBS y se agregó 20  $\mu$ L de una dilución 1/10 en PBS de la solución madre de NA (100  $\mu$ g/mL) y se incubó durante 5 min.

El NA (o N,N,N',N'-tetrametilacridina, según IUPAC) es un colorante catiónico selectivo para los ácidos nucleicos. Interacciona con el ADN y el ARN por intercalación dentro

de la molécula o por atracción electrostática, respectivamente. Cuando está asociado al ADN, el NA es espectralmente similar a la fluoresceína, presentado un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Cuando está asociado al ARN, la excitación máxima deriva a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo). Por lo tanto, el ADN y el ARN se observan en verde y naranja respectivamente utilizando el filtro para observación en verde en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U). Las células apoptóticas se evidencian por su núcleo, o fragmentos de este, verde brillante. Por lo cual en este punto luego de lavar nuevamente con PBS se sacan fotos a fin de registrar la presencia o no de células apoptóticas.

Posteriormente o simultáneamente se agregó 20  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/10 en PBS de la solución madre de BE (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se incubó durante 5 min, se lavó con PBS y se fotografiaron las imágenes observadas en el microscopio con el filtro para visualización en el canal rojo. El BE ingresa a las células y tiñe de rojo fluorescente a los núcleos sólo cuando éstas han muerto por necrosis.

Al trabajar con células vivas, el ensayo se realiza lo más rápido posible para evitar muerte celular por causas ajenas al tratamiento específico.

### 4.3. Tinción con Hoechst

Luego de realizarse los tratamientos correspondientes, las células fueron fijadas durante 10 min a  $-20^{\circ}\text{C}$  en metanol, se disminuyó la autofluorescencia mediante la incubación con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM durante 10 min y se realizó la tinción con el marcador nuclear Hoechst 33342 en una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (en PBS) durante 15 min. Posteriormente, se observó la morfología nuclear en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U). De esta manera se pueden identificar núcleos con características apoptóticas, como ser la compactación de la cromatina y fragmentación nuclear.

## 5. Evaluación de la proliferación, migración, e invasión celular

### 5.1. Ensayo de proliferación celular basado en la captación de Bromodeoxiuridina (BrdU)

Se evaluó la proliferación celular mediante el análisis de la incorporación de BrdU durante la síntesis de ADN. Se utilizaron placas de 96 pocillos y se sembraron 4.000 células

HTR-8/SVneo por pocillo, en un volumen final de 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Luego de 24 h se expusieron a CPF o a sus respectivos controles durante el tiempo de tratamiento deseado. Cuatro horas previas a finalizar la exposición, se agregó BrdU (Molecular Probes) en concentración final de 20 mM. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron en 3% p/v de paraformaldehído (PFA) durante 10 min. Se permeabilizó con 0,01% v/v de Triton X-100 en PBS, luego de 10 min se lavaron con PBS-T (PBS conteniendo 0,2% de tween) y se trataron con HCl 2N a 37°C durante 30 min. Se realizaron dos lavados con  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0,1 M y luego tres con PBS-T. Posteriormente se realizó el bloqueo en PBS con 0,5% v/v de tween y 2% p/v de albúmina sérica bovina (BSA) y se incubó con el anticuerpo anti-BrdU (Sigma) 1/100 durante 1 h a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS-T e incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen) en una dilución 1/1000 durante 1 h a 37°C. Se efectuó la coloración nuclear con Hoechst (5 $\mu$ g/mL) durante 15 min y finalmente se realizaron los últimos lavados con PBS-T y se agregó medio de montaje acuoso (Fluor Safe, Calbiochem).

### 5.2. Ensayo de migración celular por cierre de la herida

Se midió la migración de células HTR-8/SVneo a través de su habilidad de moverse hacia un espacio acelular. Luego de los tratamientos con y sin CPF, se eligieron porciones de la placa de cultivo con una confluencia del 100% y se realizó una herida con un tip. En dicho momento se sacaron fotografías para cuantificar posteriormente el ancho de la herida a tiempo 0 h. Luego de 8 h de cultivo se realizaron nuevas fotografías en las mismas zonas de la herida y se cuantificó nuevamente el ancho de la herida con el programa Image J. De cada herida correspondiente a cada condición de tratamiento se tomaron al menos cuatro fotos en un aumento total de 200X y de cada foto se cuantificó el ancho de la herida en tres regiones equidistantes entre sí. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de apertura de la herida remanente luego de 8 h. Cabe agregar que este tiempo fue elegido de manera tal de reducir el aporte de la proliferación al cierre de la herida. Además, a las 18 h ya se llegaba a su cierre completo.

### 5.3. Ensayo de invasión celular

Se colocó, en frío, 25  $\mu$ L de una dilución ¼ de matrigel (BD Bioscience) en DMEM-F12 sin suplementar, sobre cada transwell de 8  $\mu$ m de diámetro de poro (Corning Costar, CO-

3422) y se dejó gelificar durante 40 min a 37°C en pocillos de placas de 24. Posteriormente sobre la capa formada se sembraron 40.000 células HTR-8/SVneo en 200 µL de medio DMEM-F12 suplementado con 0,05 mg/mL de gentamicina y 0,1% p/v de BSA. Sobre la base del pocillo se colocaron 300 µL del mismo medio pero con 10% v/v de SFB en lugar de BSA, a fin de generar un gradiente y así favorecer el pasaje de las células hacia la porción inferior del transwell.

Luego de 24 h, las células fueron expuestas a CPF durante 48 h totales, con recambio de medio cada 24 h. Finalmente, la porción inferior del transwell, donde se encontraban las células que atravesaron el matrigel y el poro, se fijó con metanol 10 min a -20°C y se realizó la tinción con el marcador nuclear Hoechst en una concentración de 5 µg/mL (de PBS) durante 15 min. Las células remanentes sobre el matrigel se eliminaron exhaustivamente con un hisopo. Los transwells se montaron con una gota de líquido de montaje acuoso con protector de fluoróforos (FluorSafe, Calbiochem) y se fotografiaron siete campos en una magnificación final de 200X en un microscopio de fluorescencia, para luego cuantificarse el número de núcleos correspondientes a las células que lograron invadir.

## 6. Detección de la producción de EROs

La producción intracelular *in vivo* de EROs se detectó usando la sonda fluorescente 2'7'diclorodihidrofluoreceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Las células JEG-3 se crecieron sobre cubreobjetos y se expusieron, o no, a CPF según se indica en la sección de Resultados correspondiente. Posteriormente, se incubaron con 10 mM de la sonda durante 1 h a 37°C en estufa de cultivo celular, se realizaron sucesivos lavados y se cambió el medio por RPMI sin SFB ni colorante rojo de fenol para realizar su observación en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U.

## 7. Determinación de niveles de transcritos

A fin de analizar los niveles de transcritos específicos en presencia o no de CPF se sembraron 550.000 células JEG-3 (o BeWo) ó 350.000 células HTR-8/SVneo por pocillo en multiwells de 6 y 1.000.000 de células CTBv en placas de 6 cm.

### **7.1. Purificación de ácido ribonucleico (ARN) total de cultivos celulares: Integridad y pureza**

La extracción de ARN total se efectuó lisando los cultivos de células eucariotas utilizando un volumen de 0,5 a 1 mL del reactivo TRIZOL (Sigma). El protocolo de purificación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, mediante el agregado de un volumen apropiado de reactivo TRIZOL se produjo la lisis y liberación del contenido celular y mediante la adición de cloroformo (200  $\mu$ L cada mL de TRIZOL) se separaron las fases, obteniendo el ARN en la fase acuosa superior. Finalmente, el ARN total se precipitó con isopropanol (500  $\mu$ L cada mL de TRIZOL), se lavó con etanol 75% frío (1 mL cada mL de TRIZOL), se resuspendió en H<sub>2</sub>O (Gibco, libre de ADNasas, ARNasas) y se almacenó a -80°C hasta su uso. La integridad del ARN se evaluó a través de la visualización de una alícuota de 2,5  $\mu$ L de la muestra junto con 5,6  $\mu$ L de formamida deionizada, 2  $\mu$ L de formaldehído, 1,1  $\mu$ L de tampón ácido 3-(Nmorfolino) propanesulfónico (MOPS) y 1  $\mu$ L de BE; incubada por 10 min a 65°C a fin de desarmar estructuras secundarias, y luego sembrada en un gel de agarosa desnaturalizante (agarosa 1,2% p/v, formaldehído 1,1% v/v, en tampón MOPS). Se visualizó la corrida en transiluminador y se consideró que la muestra tenía integridad adecuada cuando la relación de intensidad entre las bandas correspondientes a la subunidad 28S respecto a la 18S fue cercana a 2. La cuantificación de ARN se estimó mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm (longitud de onda en la que las bases de los ácidos nucleicos poseen su máximo de absorbancia), considerando que 1 densidad óptica a 260 nm equivale a 40  $\mu$ g/mL de ARN. La pureza de los ácidos nucleicos se calculó a través de la relación de absorbancias a 260 nm respecto a 280 nm (longitud de onda a la cual las proteínas poseen su máximo de absorbancia), considerando aceptables valores entre 1,8 y 2,0. Finalmente las muestras se conservaron a -80°C hasta su utilización. Cabe citar que se realizaron controles de procedimiento realizando los mismos pasos partiendo de TRIZOL sin extractos celulares.

### **7.2. Reacción de transcripción reversa: Conversión de ARN a ácido desoxirribonucleico copia (ADNc)**

Para la síntesis de 20  $\mu$ L de ADNc se utilizó 1  $\mu$ g de ARN, buffer de reacción 1 X comercial (Invitrogen), 8 U finales de RiboLock (inhibidor específico de ARNasas, Fermentas), 25 ng totales de hexadesoxirribonucleótidos (Invitrogen) de secuencia al azar y 10 mM de ditiotreitól (Invitrogen). Esta mezcla se incubó a 65°C por 15 min (para desarmar estructuras

secundarias) y se enfrió en hielo 1 min rápidamente para que se mantengan de esa forma. Luego se le agregó dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato), para que queden en concentración final de 1 mM cada uno, y 200 U totales de la transcriptasa reversa M-MLV-RT (Invitrogen); se incubó a 37 °C por 60 min y posteriormente se inactivó la enzima a 95 °C por 3 min. Cabe citar que se realizaron controles de procedimiento realizando los mismos pasos pero sin ARN molde.

### **7.3. Amplificación semicuantitativa de ADNc de gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

A fin de corroborar la síntesis adecuada de ADNc, se realizó una PCR para amplificar un fragmento característico del ADNc correspondiente al ARNm del gen que codifica a la proteína GAPDH, utilizado como control de carga endógena. Para ello se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu\text{L}$  del tampón de reacción comercial 10X (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), 250  $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,1  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa (preparada en el laboratorio a partir de su sobre expresión con un plásmido recombinante) y 0,25 pmol/ $\mu\text{L}$  de los cebadores correspondientes ( GAPDH-For: 5' GGTGAAGGTCGGAGTCAACG 3'; GAPDH-Rev4: 5' GATCTCGCTCCTGGAAGATGG 3') en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , de los cuales 10  $\mu\text{L}$  corresponden a una dilución 1/5 del ADNc obtenido en el ensayo de transcripción reversa descrito en el ítem anterior. El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 5 min a 95°C seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos (s), 60°C por 30 s y 72°C por 30 s; la extensión final fue de 10 min a 72°C. Se utilizó un termociclador MULTIGENE de LabMet y finalmente el fragmento de 250 pares de bases (pb) amplificado fue observado en geles de agarosa al 2% p/v. Cabe citar que en cada ensayo de PCR se incluyeron los controles negativos y positivos correspondientes.

### **7.4. Amplificación cuantitativa de ADNc por PCR a tiempo real (qPCR)**

El diseño y / o evaluación teórica de los cebadores utilizados para amplificar las secuencias de interés se realizó manualmente con el auxilio de los programas Primer Express (ABI), Primer-BLAST (Ye et al. 2012) y NetPrimer (PREMIER Biosoft International, <http://www.premierbiosoft.com/servlet/com.pbi.crm.clientside.FreeToolLoginServlet>). Los pares de cebadores utilizados a lo largo de esta tesis, se diseñaron o escogieron considerando que la hibridación de cada uno de ellos sea en diferentes exones para evitar

amplificar ADN genómico además de ADNc, que su tamaño sea menor a 250 pb, que no forme dímeros estables ( $\Delta GI \leq 6$ ) y que la temperatura de hibridación de ambos sea cercana a 60 °C. La secuencia de los cebadores utilizados se indica en la Tabla I.

Transcripto	Secuencia (5' - 3')	Concentración final (nM)
$\beta$ -hCG	$\beta$ hCG-539 For: GCT ACT GCC CCA CCA TGA CC	300
	$\beta$ hCG-632 Rev: ATG GAC TCG AAG CGC ACA TC	
ABCG2	ABCG2-For: CAA TGG GAT CAT GAA ACC TG	100
	ABCG2-Rev: CAT TTA TCA GAA CAT CTC CAG A	
GCM1	GCM1 For: GAG GCA CGA CGG ACG CTT TAT ATT CAA	250
	GCM1 Rev: TTG GAC GCC TTC CTG GAA A	
KLF6	KLF6-882 For: CAC CAA AAG CTC CCA CTT GAA	200
	KLF6-960 Rev: CAC ACC CTT CCC ATG AGC AT	
PSG3	PSG3-For: TGG TCC AGA CCT CCC CAG AAT T	100
	PSG3-Rev: CCA GGA AGA TGT CCT GTT CC	
P-gp	pgP-For: TGACACCCTGGTTGGAGAGAG	200
	pgP-Rev: ATT ACGAACTGTAGACAAACGATGAG	
Nrf2	Nrf2-For:AAA CCA GTG GAT CTG CCA AC	200
	Nrf2-Rev: GAC CGG GAA TAT CAG GAA CA	
Ciclofilina A	Ciclo A For: GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT	300
	Ciclo A Rev: CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT	
Flt1	Flt1 for: AAA TGG TGA GTA AGG AAA GCG A	300
	Flt1 rev: CGG CAG GGA ATG ACG AG	
HIF-1 $\alpha$	HIF-1 for: CTA TGA CCT GCT TGG TGC TGA	200
	HIF-1 rev: CTG TCC TGT GGT GAC TTG TCC TT	
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$ for: CCC TGG CAA AAC ATT TGT ATG ACT C	200
	PPAR $\gamma$ rev: AGC CCT GAA AGA TGC GGA TG	
StarD7	StarD7sense: GGT AAT CAA GCT GGA GGT GAT TG	100
	StarD7antisense: GAG TAC ATT GGA TAA GGA AAA TGG GT	

**Tabla I. Cebadores utilizados en la amplificación de ADNc por qPCR.** Se presenta la secuencia y concentración elegida luego de la puesta a punto realizada para cada par de cebadores. La concentración empleada fue la menor con la cual se obtuvo una curva de amplificación adecuada y una eficiencia de amplificación mayor al 80%.

El sistema de amplificación a tiempo real utilizado fue de AppliedBiosystems (ABI7500 Sequence Detection System). Las condiciones de reacción, los cebadores y el tamaño de los fragmentos se seleccionaron para amplificar el gen de interés con eficiencias

de amplificación comparables. Los experimentos se realizaron usando 1 X de la mezcla comercial de PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied BioSystems), con las concentraciones de cebadores detalladas en la Tabla I y 5  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/5, 1/10 o 1/20 de ADNc en un volumen final de reacción de 15  $\mu\text{L}$ . El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 10 min a 95°C seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 s y a 60°C por 1 min. La especificidad de la amplificación obtenida se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. El nivel de expresión relativa de los genes se calculó usando el método del  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  utilizando los transcriptos de ciclofilina A como ARNm de referencia endógeno. La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:  $[10^{(-1/a)}]-1$  donde "a" es la pendiente de la curva estándar de cada fragmento amplificado. Cabe citar que en cada ensayo se han incluido los controles negativos necesarios.

## 8. Análisis proteico: Western blot e inmunomarcaciones

Para cuantificar los niveles de proteínas específicas en los cultivos, se utilizaron ensayos de Western blot, mientras que para analizar sus patrones de expresión se realizaron ensayos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica como se detalla a continuación.

### 8.1. Detección de proteínas por western blot

A fin de analizar los niveles de proteínas específicas en presencia o no de CPF se sembraron: 550.000 células JEG-3 (o BeWo) ó 350.000 células HTR-8/SVneo por pocillo en multiwells de 6 y 1.000.000 de CTBv en placas de 6 cm. Se obtuvieron extractos proteicos celulares de cada pocillo en 150 o 200  $\mu\text{L}$  de buffer Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 2% p/v, Glicerol 25% v/v) suplementado al momento de usar con Azul de bromofenol al 0,01%,  $\beta$ -mercaptoetanol (Amersham Bioscience) al 5% v/v, 1 mM de ditioneol y 1  $\mu\text{L}$  de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) por cada mL final. Las alícuotas de proteínas se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron a 12.000 rcf por 5 min más. Se sembraron entre 20 y 30  $\mu\text{L}$  de cada muestra en un gel de dodecilsulfato sódico (SDS) y poliacrilamida al 7,5%, 10% o 12% p/v, según el tamaño esperado de la proteína de interés, y se corrieron a 100 V 15 min y a 150 V por aproximadamente 60 min en tampón de corrida (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 1% de SDS p/v). Luego se realizó una electrotransferencia húmeda en

frío de 60 min a 100 V a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL de Amersham o GE). La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% p/v en tampón TBS (20  $\mu$ M de Tris y 150  $\mu$ M de NaCl, pH 7,8) suplementado con 0,2% v/v de tween 20 (TBS-T) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario pertinente en agitación durante toda la noche a 4°C. Las soluciones de los anticuerpos primarios utilizados fueron: 1/1.000 TBS-T para  $\beta$ -hCG (conejo, Dako), 1/300 TBS-T para ABCG2 (ratón, Santa Cruz), 1/750 TBS-T para GCM1 (conejo, Sigma), 1/300 TBS-T para P-gp (ratón, Calbiochem), 1/3.000 leche descremada al 5% p/v en TBS para KLF6 (ratón, 2c11) y 1/1.000 TBS-T para  $\beta$ -actina (ratón, Sigma) utilizado como control endógeno de carga. Seguidamente la membrana se lavó 3 veces por 5 min a temperatura ambiente con TBS-T y se incubó 1 h a temperatura ambiente con una dilución 1/5.000 en TBS o TBS-T del anticuerpo secundario de burro anti-IgG de conejo o de oveja o anti-IgG de ratón conjugados a la enzima peroxidasa (Amersham Bioscience). Se realizaron 3 lavados de 5 min en TBS-T y la presencia de complejos proteína-anticuerpo se detectó incubando la membrana por 5 min con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Pierce) y con exposición en placa radiográfica (Kodak) entre 30 segundos y 15 min. La señal revelada se cuantificó con el programa de análisis de imágenes GELPRO32 para su posterior análisis semicuantitativo. En algunos ensayos se utilizaron anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o de ratón marcados con los fluorescentes IRDye 800CW o IRDye 680RD (LiCor Biosciences) revelados mediante el sistema Odyssey (LiCor Biosciences).

## 8.2. Inmunofluorescencias sobre células

Se colocaron portaobjetos circulares estériles en placas de cultivo previo a la siembra de las células. Luego de transcurrido el tiempo necesario acorde al experimento realizado, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron 10 min en metanol a -20°C o 20 min en PFA 3% p/v a temperatura ambiente, según el anticuerpo a utilizar y la proteína a detectar. Inmediatamente las células fijadas se incubaron con 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se permeabilizaron 7 min con 0,1% v/v de tritón X-100 en PBS o 20 min con 0,2% v/v de nonidet P-40 (Sigma) y se hicieron 3 lavados en PBS de 5 min. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios se realizaron 2 bloqueos de 5 o 15 min, el primero en 2,5% v/v de suero de cabra (GS) en 0,2% v/v de tween-20 en PBS (PBS-T) y otro con 0,4% v/v de gelatina de piel de pescado (FSG) en PBS-T. Los portaobjetos se incubaron por 1 h en cámara húmeda

a 37°C con diluciones en FSG de los siguientes anticuerpos primarios: anti-desmoplaquina en una dilución final 1/400 (Sigma), anti-Histona 3 acetilada 1/500 (Upstate), anti- $\beta$ -hCG 1/500 (Dako), anti-GCM1 1/50 (Sigma), anti-caspasa 3 clivada 1/100 (Cell Signaling), anti-PSG 1/100 (Dako), y una gota por cubreobjetos de una dilución comercial no especificada de anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 7 humana (Sigma). Las células se lavaron 5 veces en PBS-T por 5 min y se repitió el protocolo de bloqueo. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo (verde, Alexa Fluor 488) y anti IgG de ratón (rojo, AlexaFluor 594, Molecular Probes) se diluyeron 1/720 final en GS y se incubaron 1 h a 37°C en atmósfera húmeda. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (5  $\mu$ g/mL) durante 15 min. Por último los vidrios se lavaron 5 veces en PBS-T y se colocaron invertidos sobre una gota de líquido de montaje acuoso con protector de fluoróforos (FluorSafe, Calbiochem). Se observaron en el microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

### 8.3. Inmunofluorescencias sobre tejido

Los explantos obtenidos de placentas normales a término se fijaron en formol tamponado (fijador histológico - Biopur) y se conservaron a temperatura ambiente hasta la inclusión en parafina. A partir de los tacos de tejido incluido en parafina se realizaron cortes en micrótopo generando secciones seriadas de 3-4  $\mu$ m de ancho que se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina y se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización. El procedimiento descrito fue realizado con la colaboración del equipo de trabajo del Dr. Ricardo Fretes (Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba).

Para la detección con fluoróforos, los cortes se desparafinizaron con 3 baños de 5 min en tolueno y se rehidrataron con 2 baños de 5 min en etanol absoluto, repitiendo el procedimiento con concentraciones decrecientes de 95% y 70% finalizando con un baño de 5 min en agua. Posteriormente se realizó la activación de antígeno en baño de 95°C durante 20 min y se procedió al bloqueo con 5% de leche en TBS-T durante 2 h a temperatura ambiente. Se incubó durante toda la noche con una gota por corte histológico de una dilución comercial no especificada de anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina 7 humana a 4°C. La mañana siguiente se realizaron 3 lavados con PBS, y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (rojo, AlexaFluor 594) a una concentración final de 1/720 preparada en la misma solución de bloqueo. Se lavó 3 veces con PBS y se incubó por 15 min con una solución de Hoechst 5  $\mu$ g/mL para teñir los núcleos,

se lavó nuevamente 3 veces con PBS y se cubrió con líquido de montaje con protección de fluoróforos y cubreobjeto. Se observaron en el microscopio Nikon Eclipse TE2000-U.

#### **8.4. Inmunohistoquímicas**

Los explantos de placentas normales se procesaron como se indicó anteriormente.

Las inmunohistoquímicas para el antígeno nuclear asociado con proliferación celular ki-67, se realizaron en el servicio de la Fundación para el Progreso de la Medicina de Córdoba y las inmunohistoquímicas para vimentina y caspasa 3 clivada en el servicio técnico del laboratorio dirigido por el Dr. Ricardo Fretes en el Departamento de Biología Celular, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Para todas las marcaciones se realizaron los correspondientes controles negativos, los cuales fueron adecuados.

#### **8.5. Cuantificación de secreción hormonal**

Los sobrenadantes (medio de cultivo) de células expuestas a CPF o a sus respectivos controles se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La secreción de  $\beta$ -hCG se cuantificó a través de un ensayo inmunoquimioluminométrico automatizado (Immulite 2000 HCG, Siemens) y las cuantificaciones de progesterona total y estradiol a través de inmunoensayos electroquimioluminocentes (ECLIA, Roche), según protocolos de los fabricantes, realizados en el Laboratorio del Centro de Química Clínica, Córdoba capital.

### **9. Análisis histológico**

#### **9.1. Microscopía óptica**

Los explantos de placentas normales se procesaron como se indica en el primer párrafo del ítem Inmunofluorescencia en tejido. Los cortes ya adheridos a los portaobjetos tratados con poli-L-lisina se sometieron a tinciones con Hematoxilina y Eosina (He-Eo) o con el ácido peryódico de Schiff (PAS) y se observaron en el microscopio óptico. La descripción de las alteraciones observadas en explantos expuestos a CPF respecto a sus controles se realizó con la colaboración del Dr. Ricardo Fretes (Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba) y de la Dra. Estela Bevilacqua (Instituto de Ciencias Biomédicas,

Universidad de San Pablo, Brasil), quienes cuentan con una excelente experiencia en análisis de la histología placentaria.

## 9.2. Microscopía electrónica

Los explantos de placentas normales a término se cultivaron como se indicó anteriormente y se procesaron de acuerdo al protocolo de los servicios de Microscopía Electrónica que brinda la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. La descripción de las alteraciones observadas en explantos expuestos a CPF respecto a sus controles se realizó con la Dra. Patricia Pons y el Dr. Ricardo Fretes (Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba).

## 10. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de este trabajo de tesis, obtenidos a partir de ensayos muestrales, se partió de la premisa de que la distribución de datos era gaussiana. De esta forma, se utilizaron test paramétricos o no paramétricos en función de la homogeneidad o no de varianzas, evaluada mediante el test F o el de Barlett, según el número de condiciones de cada ensayo. Cuando la comparación se realizó entre dos grupos (condiciones), para su análisis se utilizó un test t no apareado de dos colas o un test no paramétrico de Mann Whitney. Para la comparación de múltiples grupos de datos se utilizó el test paramétrico ANOVA de una vía seguido del test de comparación de Dunnet, o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test de comparación de Dunn cuando no se cumplía la homogeneidad de varianzas. Y finalmente, cuando se analizaron comparaciones sujetas a dos variables se utilizó el test ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni. Los resultados se presentan como el Valor Medio  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM) o  $\pm$  Desviación Estándar (DE), según se muestre un gráfico realizado con datos de más de 3 experimentos independientes o un gráfico con datos representativos provenientes de un experimento, respectivamente; o Mediana con el rango intercuartil del 25-75%, acorde a si se utilizaron test paramétricos o no paramétricos para el análisis respectivo.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPadPrism 5.0 y los datos se consideraron estadísticamente diferentes cuando el valor de probabilidad (p) fue menor a 0,05.

**RESULTADOS**

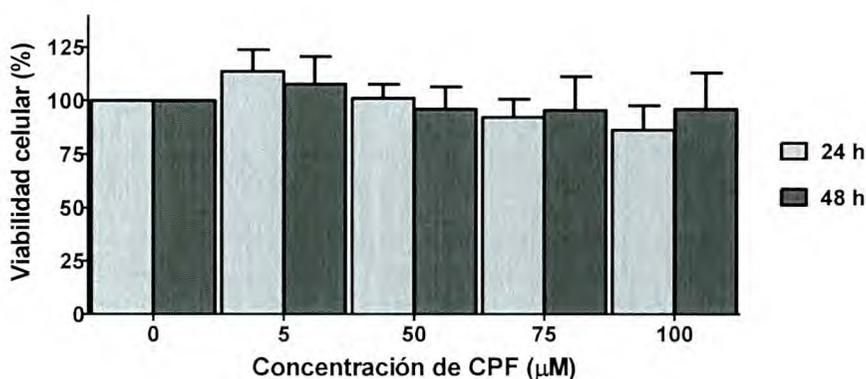
## RESULTADOS: CAPÍTULO I

### 1. Impacto del pesticida CPF sobre la viabilidad trofoblástica

Inicialmente se evaluó la viabilidad en cultivos de células trofoblásticas expuestas a diferentes concentraciones de CPF a fin de abordar el primer objetivo planteado para este trabajo de Tesis Doctoral y de establecer las condiciones de exposición a este tóxico a utilizarse en los posteriores experimentos necesarios para estudiar los objetivos siguientes.

#### 1.1. Trofoblastos vellosos

Se comenzó evaluando el impacto de CPF sobre la viabilidad utilizando como modelo experimental a la línea celular trofoblástica JEG-3. Para ello se realizaron ensayos de reducción del MTT, los cuales permiten medir el remanente de células viables adheridas a la placa de cultivo, detectando principalmente la presencia de necrosis.

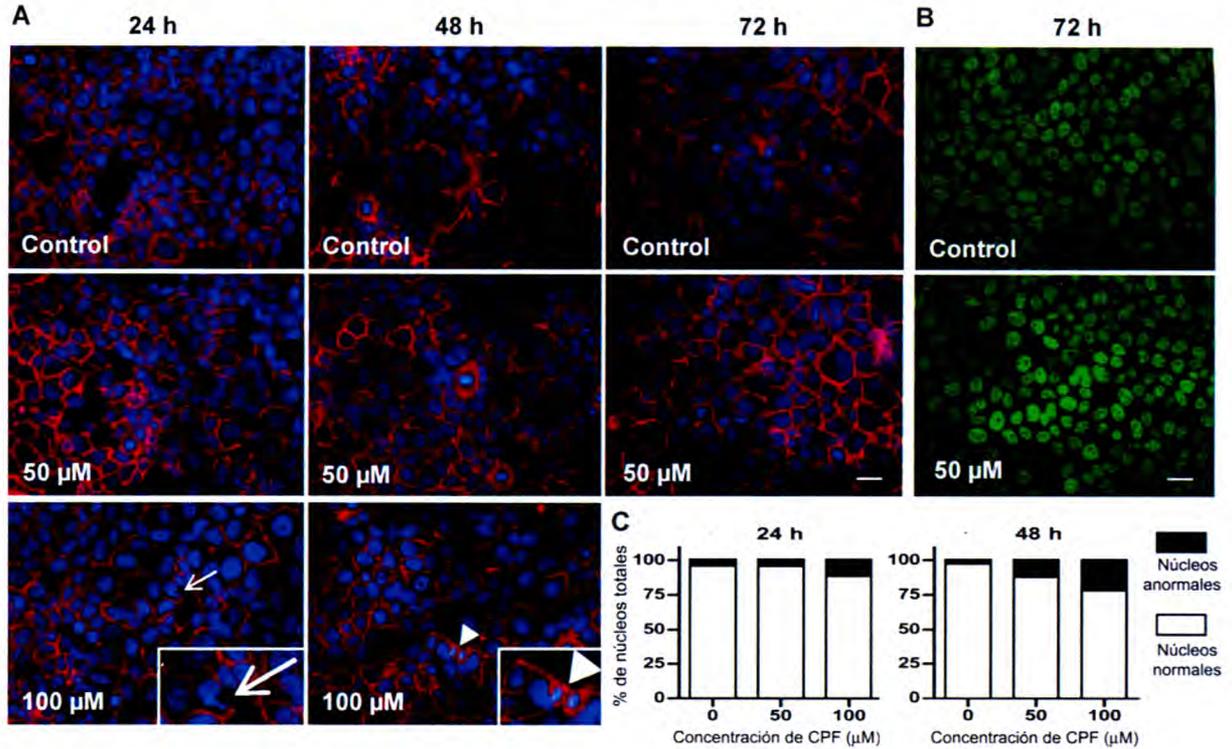


**Fig. 1. Viabilidad de células JEG-3 expuestas a CPF evaluada mediante ensayos de reducción del reactivo MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) durante 24 h (barras grises) o 48 h (barras negras). En el gráfico se representa el Valor Medio  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado y los resultados se muestran como el porcentaje de células viables remanentes respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Como puede observarse en la Fig. 1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad de las células JEG-3 expuestas al vehículo solo respecto a las expuestas a CPF en concentraciones entre 5 y 100  $\mu\text{M}$  durante 24 o 48 h.

A fin de evaluar el impacto de CPF en los contornos celulares y la morfología nuclear, se realizaron inmunofluorescencias para desmoplaquina (proteína involucrada en uniones

intercelulares), Histona 3 acetilada (proteína que participa en la compactación cromatínica) y tinciones nucleares con Hoechst en los cultivos de células JEG-3 expuestas al vehículo solo o a CPF en las dosis señaladas. Además se cuantificaron los núcleos que presentaban fragmentación o condensación de la cromatina (núcleos anormales) respecto al resto de los núcleos (núcleos normales). En la Fig. 2 se muestran los resultados obtenidos.



**Fig. 2. Efecto de CPF sobre los contornos celulares y la morfología nuclear.** Células JEG-3 se expusieron a 50 y 100  $\mu\text{M}$  de CPF o al vehículo solo durante 24, 48 o 72 h. Luego las células se fijaron y analizaron por inmunofluorescencias y tinciones nucleares con Hoechst. (A) Ensayos realizados con anticuerpos anti-desmoplaquina (rojo) y tinción nuclear con Hoechst (azul). Flecha: núcleo anormal; cabeza de flecha: núcleo mitótico. Los insertos muestran sus respectivas ampliificaciones. (B) Ensayo realizado con un anticuerpo anti-Histona 3 acetilada (verde). (A y B) Magnificación total 400X; Escala barra = 10  $\mu\text{m}$ . (C) Cuantificación de núcleos normales (barras blancas) y anormales (barras negras) en al menos cinco campos al azar. En cada condición de cultivo se cuantificaron más de 500 núcleos en tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de núcleos totales.

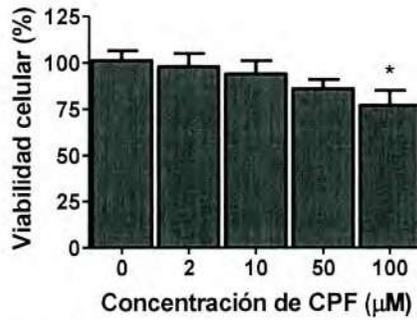
Las células JEG-3 pueden diferenciar hacia estructuras tipo sinciciales en presencia de drogas antimitogénicas como Metrotexate (Karl et al. 1996), sin embargo en presencia de CPF las células permanecieron mononucleadas y con bordes definidos. La mayoría de las células mostraron contornos celulares y morfología nuclear normal incluso en presencia de CPF hasta 100  $\mu\text{M}$  durante 24 o 48 h y hasta 50  $\mu\text{M}$  durante 72 h (Fig. 2 A). Además en esta última condición se observó un patrón de marcación de Histona 3 acetilada equivalente cuando las células estuvieron expuestas o no a CPF (Fig. 2 B), sugiriendo que este pesticida



no produce una modificación grosera sobre la acetilación de la cromatina como ha sido reportado para otros tóxicos como el etanol (Park et al. 2005).

La cuantificación de los núcleos con características anormales (condensados y fragmentados) reveló un leve incremento de los mismos en proporción a los núcleos normales, y dicho incremento fue mayor cuanto mayores fueron el tiempo y dosis de exposición (Fig. 2 C).

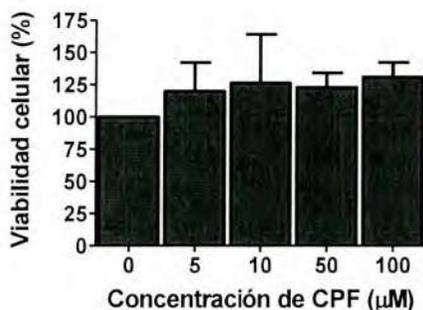
Con el propósito de estudiar si la resistencia a la citotoxicidad por CPF es, o no, una característica restringida a las células JEG-3, se realizó un ensayo de reducción del MTT en condiciones equivalentes pero sobre cultivos de la línea celular trofoblástica BeWo. Como puede observarse, más del 75% de las células BeWo permanecieron viables en presencia de CPF en concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  durante 48 h (Fig. 3).



**Fig. 3. Viabilidad de células BeWo expuestas a CPF evaluada mediante ensayo de reducción del MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) durante 48 h. En el gráfico se representa el Valor Medio  $\pm$  DE de un experimento realizado por cuadruplicado y los resultados se muestran como el porcentaje de células viables remanentes respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Si bien las líneas celulares trofoblásticas son modelos muy utilizados y aceptados para el estudio de la fisiopatología de los trofoblastos (Benachour y Seralini 2009; Myllynen y Vahakangas 2013), las mismas son células transformadas y su comportamiento no refleja necesariamente el de las células trofoblásticas normales. Por este motivo se procedió a evaluar los efectos del CPF sobre la viabilidad y morfología de CTBv purificados a partir de placentas humanas normales a término, expuestos o no a CPF *in vitro*. Este modelo permite evaluar el efecto de tóxicos sobre el proceso de diferenciación celular ya que los CTBv en cultivo diferencian espontáneamente hacia estructuras tipo sinciciales mimetizando la fusión trofoblástica que ocurre *in vivo* en la barrera trofoblástica (Morrish et al. 1997).

Inicialmente, se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de reducción del MTT en CTBv expuestos a CPF en concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 64 h totales de cultivo. En estas condiciones, no se observaron cambios estadísticamente significativos en las células tratadas en comparación con el control (Fig. 4).



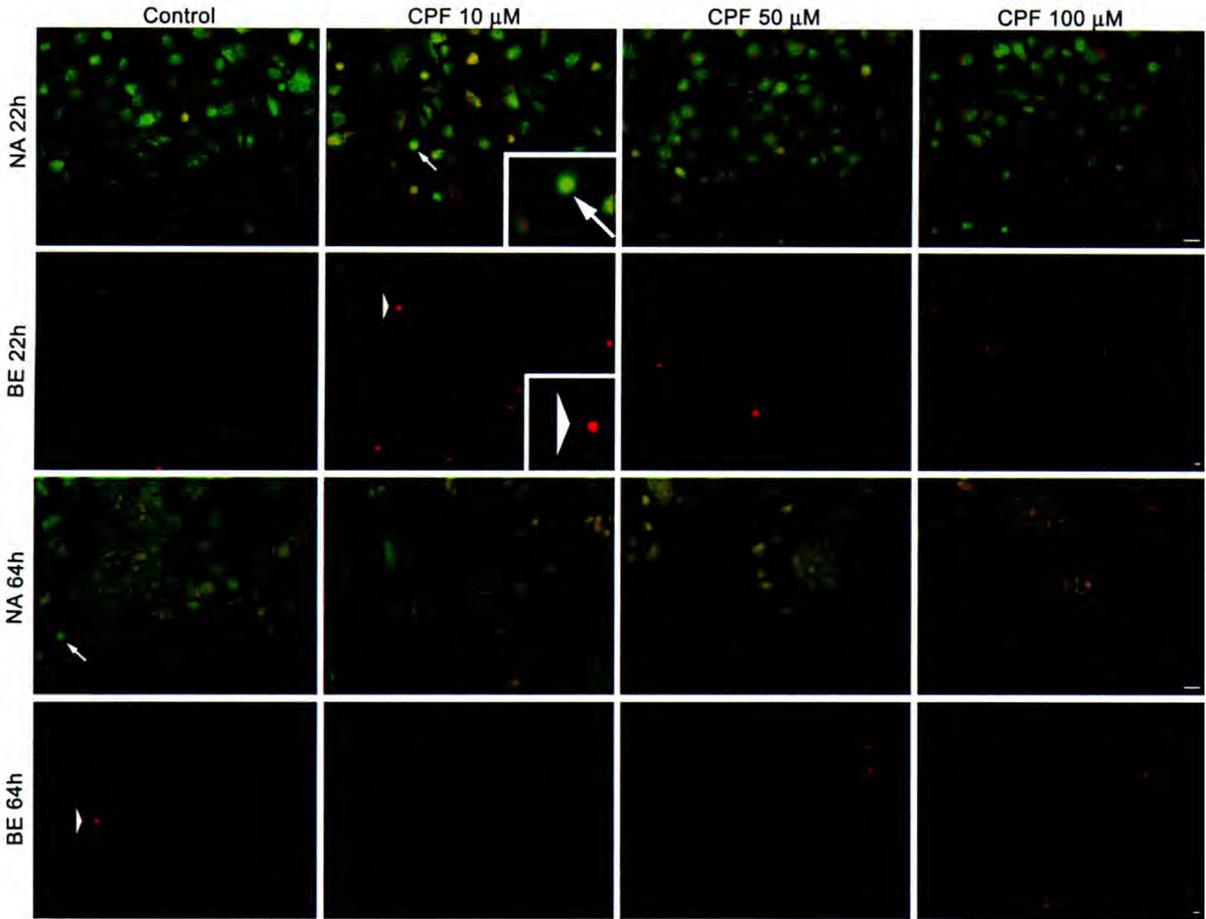
**Fig. 4. Ensayos de reducción del MTT sobre CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 64 h totales de cultivo. En el gráfico se representa el Valor Medio  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado y los resultados se muestran como el porcentaje de células viables respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Resultados similares se hallaron cuando los CTBv fueron expuestos en las mismas condiciones pero desde las 16 h post-plaqueo (datos no mostrados).

Con el fin de corroborar que, en las condiciones ensayadas, los CTBv son resistentes a la citotoxicidad inducida por CPF, a diferencia de lo reportado en células neuronales en condiciones de exposición similares (Caughlan et al. 2004 y Giordano et al.), se procedió a evaluar el impacto de este pesticida sobre su viabilidad celular mediante tinciones con NA y BE.

En los cultivos de CTBv expuestos a CPF desde el momento previo a la diferenciación morfológica (3 h post plaqueo) y hasta 22 o 64 h totales de cultivo, no se detectó ni un aumento en el número de células con núcleos verdes brillantes, compatibles con apoptosis, ni un aumento de aquellas con núcleos rojos por la marcación de necrosis con BE (Fig. 5).

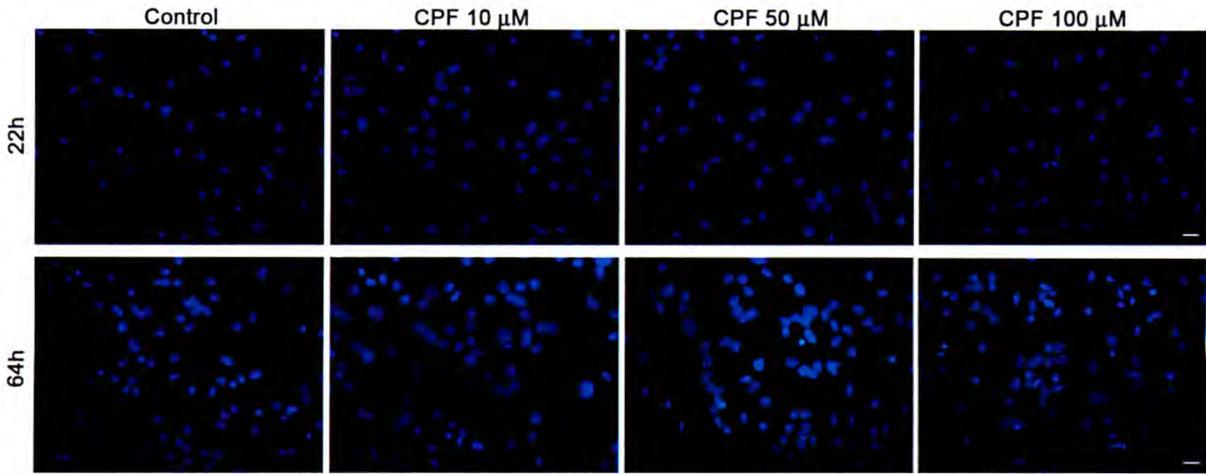




**Fig. 5. Viabilidad de CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 22 o 64 h totales de cultivo. Se muestran imágenes observadas por microscopía de fluorescencia representativas de tinciones vitales con NA (verde) y BE (rojo). Magnificación total fotos NA 400X y fotos BE 200X; Escala barra = 10  $\mu$ m. Flecha: núcleo de célula en apoptosis (verde brillante); Cabeza de Flecha: núcleo de célula necrótica (rojo). Los insertos muestran sus respectivas ampliaciones.

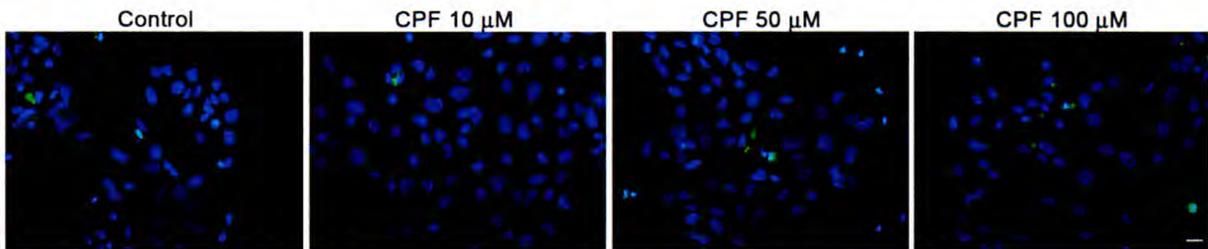
Cabe agregar que una co-marcaación mitocondrial (con Mitotraker) y anti-citocromo C, en los CTBv expuestos a CPF en las mismas condiciones citadas, fue equivalente al de la condición control (datos no mostrados). Esta observación apoya los resultados anteriores que sugieren que CPF no induce apoptosis en las condiciones evaluadas.

En concordancia con los resultados mostrados previamente, el análisis de la morfología nuclear mediante marcación con Hoechst no reveló la aparición de núcleos condensados o fragmentados característicos de células apoptóticas. Imágenes representativas se muestran en la Fig. 6.

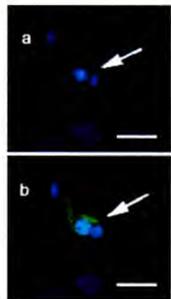


**Fig. 6. Marcación nuclear de CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 22 o 64 h totales de cultivo. Se realizaron marcaciones con Hoechst (azul) y se observó la morfología nuclear. Se muestran imágenes representativas de al menos cuatro experimentos independientes. Magnificación total 400X; Escala barra = 10  $\mu$ m.

Finalmente, considerando que en la etapa final del proceso de diferenciación y mantenimiento del STB participaría la fase ejecutora de la apoptosis, y que en condiciones patológicas como la preeclampsia se ha observado un aumento de células en esta fase (Huppertz 2011; Huppertz y Borges 2008), se realizó una marcación con anti-caspasa 3 clivada en CTBv expuestos a CPF durante 24 h a partir de las 64 h de cultivo, es decir, cuando la mayoría de las células se encuentran formando estructuras tipo STB. En estas condiciones no se observó un aumento en el número de células positivas para esta inmunomarcación, sugiriendo que CPF no incrementa la apoptosis asociada a la fase final del mantenimiento del STB (Fig. 7).



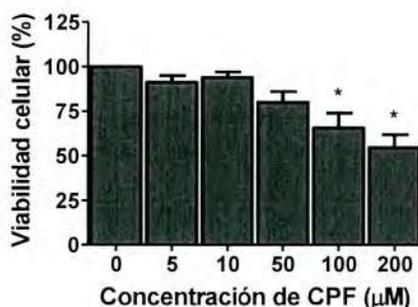
**Fig. 7. Evaluación de la fase ejecutora de la apoptosis en STB expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) desde las 64 h post-plaqueo y hasta las 88 h totales de cultivo. Se realizaron marcaciones con Hoechst (azul) y anti-caspasa 3 clivada (verde), presente en células que están adentradas en la fase final ejecutora de la apoptosis. Magnificación total 400X. En el panel de la derecha se muestra núcleo picnótico y parcialmente fragmentado (Flecha), teñido con Hoechst (a y b) y marcado positivamente con el anticuerpo anti-caspasa 3 clivada (b), en una magnificación final de 1000X, demostrando la especificidad de la marcación en células apoptóticas. Escala barra = 10  $\mu$ m.



## 1.2. Trofoblastos extravelosos

Se evaluó el impacto de CPF sobre la viabilidad de células trofoblásticas de origen extraveloso. Para tal fin se empleó como modelo a las células HTR-8/SVneo. Esta línea celular fue obtenida a partir de CTBev provenientes de placenta humana de primer trimestre transformados con el antígeno T largo del virus SV-40 para lograr su inmortalización (Graham et al. 1993). Estas células no son tumorales ni metastásicas, pero son altamente invasivas *in vitro* y expresan propiedades fenotípicas de trofoblastos placentarios extravelosos. Las mismas constituyen un modelo aceptado para estudiar diferentes aspectos de la biología de los trofoblastos extravelosos de primer trimestre tales como proliferación, adhesión, migración e invasión (Fitzpatrick et al. 2003; Hannan et al. 2010).

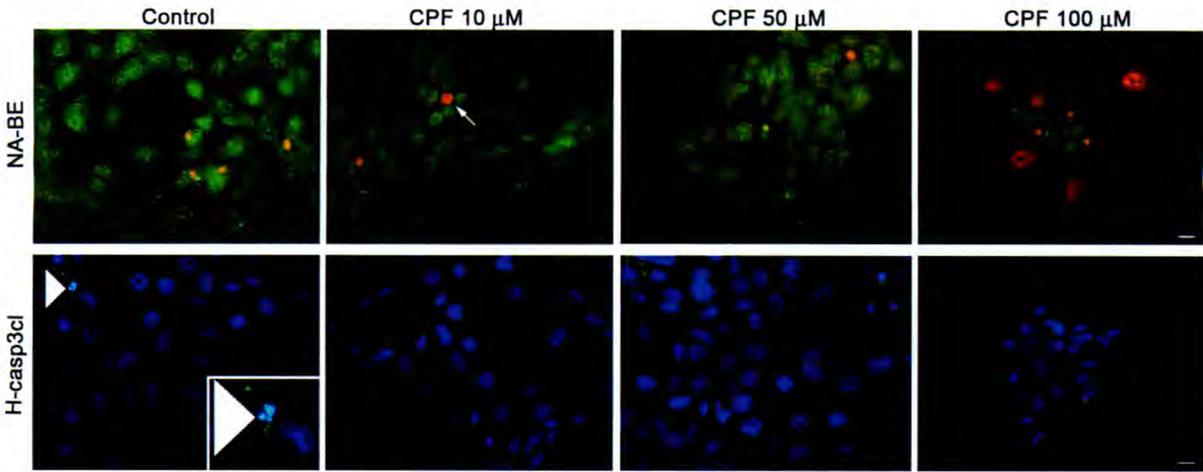
Inicialmente se realizaron ensayos de MTT sobre células HTR-8/SVneo expuestas en cultivo a CPF en dosis de entre 5 y 200  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Como se muestra en la Fig. 8, el tratamiento con dosis de 100 y 200  $\mu\text{M}$  provocó una reducción aproximada de entre un 35 y un 45%, respectivamente, en el número de células viables respecto a la situación control. Por lo tanto, las células HTR-8/SVneo cultivadas en condiciones similares a las células JEG-3, fueron más sensibles que éstas a la citotoxicidad de 100  $\mu\text{M}$  de CPF.



**Fig. 8. Viabilidad de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF evaluada mediante ensayos de reducción del MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) durante 48 h. En el gráfico se representa el Valor Medio  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado y los resultados se muestran como el porcentaje de células viables remanentes respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

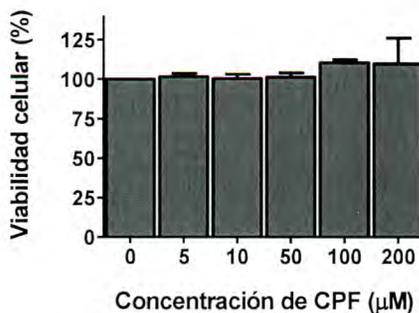
A fin de profundizar estas observaciones, se realizaron tinciones con NA y BE, Hoechst e inmunofluorescencias para caspasa 3 clivada. Los patrones de marcación con NA y anti-caspasa 3 clivada, indicadores de células apoptóticas, no mostraron cambios significativos. Sin embargo, se observaron más células positivas para la marcación con BE en

los tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de CPF, lo cual, en concordancia con el resultado de los ensayos de MTT, sugiere que el aumento en la muerte celular observado es principalmente vía necrosis (Fig. 9).



**Fig. 9. Viabilidad de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) durante 48 h. Se realizaron marcaciones con NA y BE (NA-BE: arriba) y Hoechst e inmunofluorescencias con anti-caspasa 3 clivada (H-casp3cl: abajo). Magnificación total 400X; Escala barra = 10  $\mu\text{m}$ . Flecha: núcleo positivo para marcación con BE (rojo); cabeza de flecha: núcleo positivo para marcación con anti-caspasa 3 clivada (verde). El inserto muestra una ampliación de la célula positiva para caspasa 3 clivada.

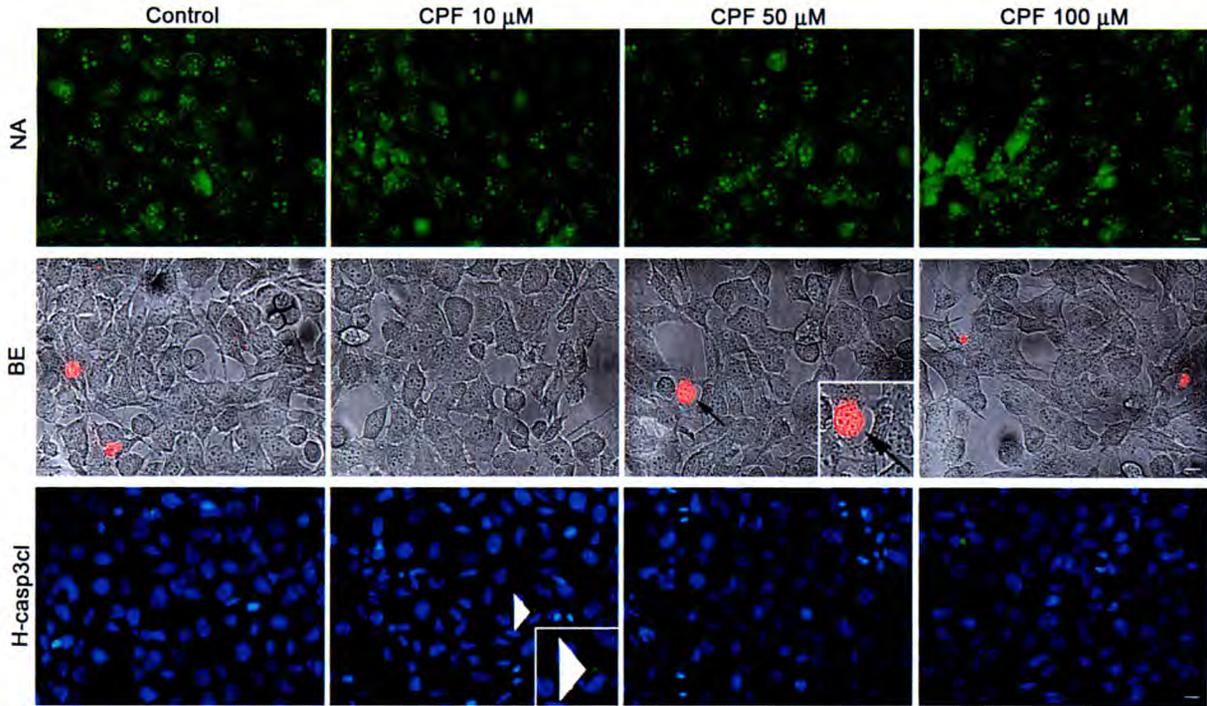
Posteriormente se realizaron tratamientos de las células HTR-8/SVneo con concentraciones equivalentes de CPF pero en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB.



**Fig. 10. Viabilidad de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF evaluada mediante ensayos de reducción de MTT.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) durante 48 h en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. En el gráfico se representa el Valor Medio  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado y los resultados se muestran como el porcentaje de células viables remanentes respecto a la condición control. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Los resultados arrojados por los ensayos de MTT demostraron que el incremento en la cantidad de SFB al medio de cultivo redujo la citotoxicidad inducida por CPF, observando

viabilidad celular sostenida aún en tratamientos con dosis de hasta 200  $\mu\text{M}$  durante 48 h (Fig.10). Resultados equivalentes se encontraron al realizar tinciones con NA y BE, ya que no se observaron cambios en las marcas que revelan apoptosis ni necrosis cuando las células HTR-8/SVneo se cultivaron en presencia de CPF en dosis de hasta 100  $\mu\text{M}$  durante 48 h en medio suplementado con 10% de SFB (Fig. 11).



**Fig. 11. Viabilidad de HTR-8/SVneo expuestas a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) durante 48 h. Se muestran imágenes representativas observadas por microscopia de fluorescencia de las marcaciones con NA (verde), panel superior, BE (rojo) superpuesta a la observación por contraste de fase, panel medio, y Hoechst e inmunofluorescencias con anti-caspasa 3 clivada (H-casp3cl: azul y verde respectivamente), panel inferior. Magnificación total 400X; Escala barra = 10  $\mu\text{m}$ . Flecha: núcleo positivo para marcación con BE (rojo); cabeza de flecha: núcleo positivo para marcación con anti-caspasa 3 clivada (verde).

### 1.3. Conclusiones CAPITULO I

El tratamiento con el pesticida CPF durante 24 y 48 h a dosis de hasta 100  $\mu\text{M}$ , no afecta la viabilidad ni los contornos celulares de las JEG-3, induciendo un leve aumento de núcleos anormales respecto a la condición control. Además, las células BeWo también presentaron elevada resistencia a la citotoxicidad del pesticida.

De manera similar, la viabilidad de los CTBv durante su diferenciación *in vitro* o cuando ya se han diferenciado no fue afectada por la exposición a concentraciones de hasta 100  $\mu\text{M}$  del pesticida OP en las condiciones de cultivo empleadas.

Los experimentos hasta aquí descriptos revelan que los trofoblastos vellosos son resistentes a las concentraciones de CPF empleadas en las condiciones en las cuales se realizó este estudio *in vitro*, sugiriendo que estas células poseen mecanismos de resistencia efectivos contra la citotoxicidad descrita para CPF en otros tipos celulares (Caughlan et al. 2004 y Giordano et al.).

En relación al efecto sobre las células de origen extravelloso, las HTR-8/SVneo fueron más sensibles que las células JEG-3 y BeWo a la citotoxicidad de 100  $\mu\text{M}$  de CPF. El incremento en la muerte celular fue por inducción de necrosis y se revirtió cuando se aumentó diez veces la cantidad de SFB en el medio de cultivo, posiblemente debido a la unión de CPF a las proteínas séricas, tal como ha sido reportado previamente (Qiao et al. 2001; Saulsbury et al. 2008).

Cabe agregar que no fue posible encontrar la DL50 para ninguna de estas células ya que a dosis superiores CPF no se disolvía adecuadamente en el medio de cultivo y precipitaba sobre las mismas.

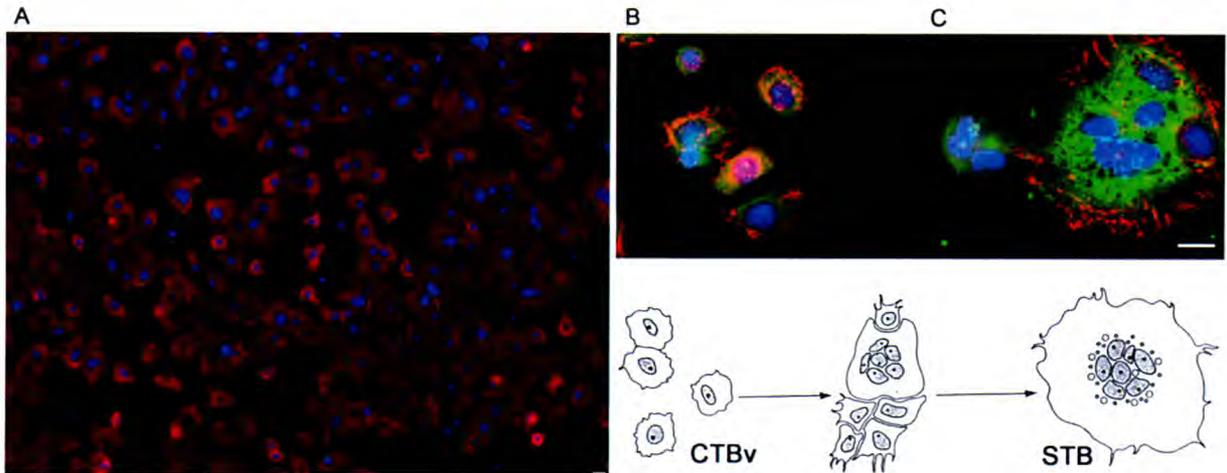
## RESULTADOS: CAPÍTULO II

### 2. Consecuencias de la exposición al pesticida CPF en procesos celulares asociados a las funciones biológicas de los trofoblastos

Como se señaló en la Introducción, la placenta cumple funciones esenciales en el desarrollo y mantenimiento del embarazo. Entre ellas, funciona como una barrera que protege al feto de tóxicos y metabolitos endógenos evitando o disminuyendo la llegada de los mismos al feto a través de la circulación materna. Además, participa en la implantación, en el control del flujo sanguíneo y en la inmunomodulación que conduce al estado de inmunotolerancia hacia el feto. Para llevar adelante estas funciones es indispensable que los procesos de diferenciación del CTBv y de proliferación, migración e invasión del CTBev ocurran adecuadamente (Benirschke et al. 2012). Por lo tanto, se procedió a evaluar si estos procesos son potencialmente afectados por el pesticida CPF.

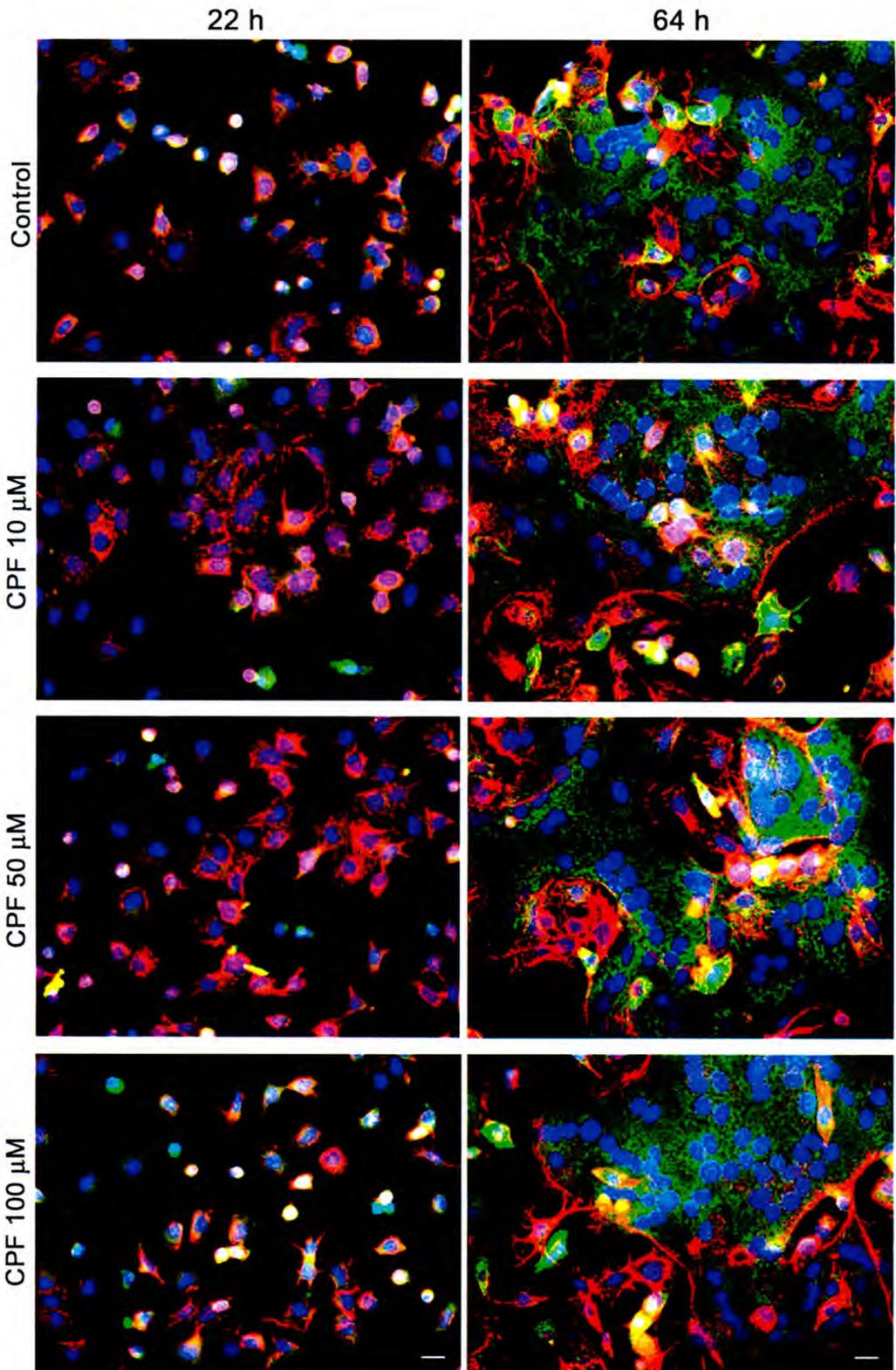
#### 2.1. Diferenciación trofoblástica vellosa

Para evaluar este proceso se emplearon CTBv purificados a partir de placentas humanas normales a término y cultivados *in vitro* en presencia o no de CPF. Previamente, se verificó la pureza de los cultivos mediante inmunomarcación de la proteína de filamentos intermedios, citoqueratina 7, la cual en la placenta se expresa en trofoblastos pero no en células mesenquimales o sanguíneas. La contratinción de núcleos con Hoechst reveló un porcentaje de trofoblastos mayor o igual al 95% en todas las purificaciones realizadas (Fig. 12 A). Los CTBv cultivados en presencia de SFB diferencian espontáneamente en estructuras tipo sinciciales mimetizando la fusión celular fisiológica que mantiene la estructura de la barrera placentaria (Morrish et al. 1997). El proceso de diferenciación celular puede evidenciarse mediante ensayos de inmunofluorescencias para proteínas involucradas en uniones intercelulares, como desmoplaquina, y proteínas marcadoras del proceso de diferenciación bioquímica como las PSG (Camolotto et al. 2010). Luego de 18 h de cultivo los CTBv se encuentran como células aisladas y mononucleadas (Fig. 12 B), sin embargo, luego de 64 h de cultivo se observa la formación de estructuras multinucleadas y un aumento en la expresión de las proteínas PSG (Fig. 12 C).



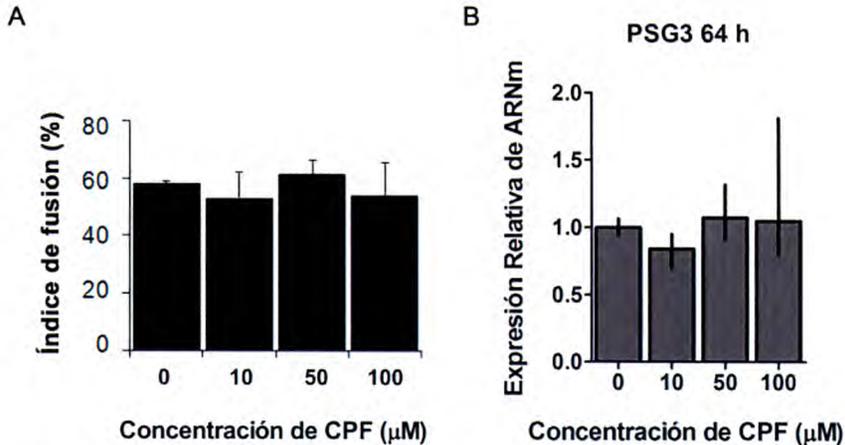
**Fig. 12. Pureza y diferenciación *in vitro* de CTBv.** Los CTBv se purificaron a partir de vellosidades coriónicas de placentas humanas a término según se describe en la sección Materiales y Métodos. Después de 18 h de cultivo se evaluó su pureza mediante inmunofluorescencia con anti-citoqueratina 7 (rojo) y contratinción de núcleos con Hoechst (azul) (A). Detección inmunofluorescente de desmoplaquina (rojo) y de PSG (verde) y marcación de núcleos con Hoechst (azul) luego de 18 h (B) y 64 h (C) de cultivo. Se muestran imágenes representativas del proceso de diferenciación de los cultivos realizados en esta tesis, las cuales se corresponden con el esquema de diferenciación *in vitro* reportado (Kliman et al. 1986). Magnificación total 100X (A) y 1000X (B y C); Escala barra = 10  $\mu$ m.

Empleando el modelo descripto, se evaluó si CPF altera el proceso de diferenciación morfológico y bioquímico de los CTBv. Las células se sembraron en placas de cultivo y 3 h después se expusieron o no a concentraciones crecientes de CPF. Las inmunomarcaciones para desmoplaquina y PSG y la tinción nuclear con Hoechst revelaron la ausencia de cambios marcados en la diferenciación trofoblástica vellosa aún en exposiciones a concentraciones de 100  $\mu$ M y durante 64 h de cultivo. En todos los casos a las 22 h de cultivo se observaron células pequeñas, en su mayoría mononucleadas y aisladas con baja señal para las proteínas PSG, mientras que a las 64 h la mayoría de las células se encontraban formando estructuras tipo sinciciales con un claro incremento en la expresión de las PSG (Fig. 13).



**Fig. 13. Diferenciación trofoblástica vellosa en presencia del pesticida CPF.** CTBv fueron expuestos a CPF o al vehículo solo (Control) a las 3 h post-plaqueo y durante 22 h (panel izquierdo) o 64 h (panel derecho) totales de cultivo. Posteriormente se realizaron inmunofluorescencias utilizando anticuerpos anti-desmoplakina (rojo) y anti-PSG (verde). En azul se observa el patrón de marcación nuclear con Hoechst. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes realizados a partir de diferentes placentas. Magnificación total 400X; Escala barra = 10  $\mu\text{m}$ .

Además, la presencia de CPF en el cultivo no modificó el índice de fusión trofoblástico, es decir la cantidad de sincicios (o estructuras tipo sinciciales) y el número de núcleos en sincicios (Fig. 14 A). Finalmente se cuantificaron los niveles de transcritos para PSG3, los cuales tampoco sufrieron cambios significativos frente a CPF luego de 64 h de cultivo (Fig. 14 B).

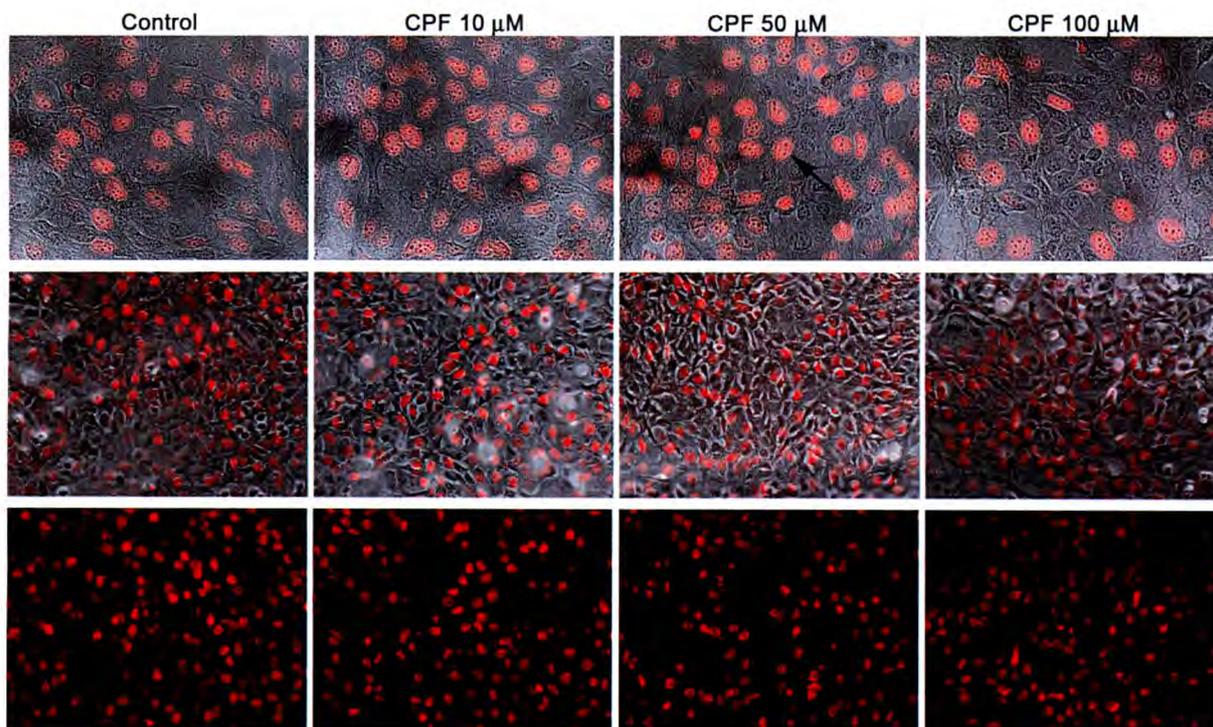


**Fig. 14. Índice de fusión y niveles de transcritos PSG3.** CTBv fueron expuestos a CPF, o al vehículo solo, a las 3 h post-plaqueo durante 64 h totales de cultivo. (A) Se cuantificaron más de 500 núcleos por condición en cada experimento independiente de al menos tres, provenientes de diferentes placentas. Se calculó el índice de fusión como: (Cantidad de núcleos en STB – Cantidad de STB) / (Cantidad de núcleos totales x 100). Se muestra su Valor Medio  $\pm$  EEM. Datos analizados mediante el test ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. (B) Se determinaron los niveles de ARNm por transcripción reversa seguida de qPCR (qRT-PCR). Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Se muestra la Mediana y el rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% de cuatro experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por triplicado. Los datos se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

## 2.2. Proliferación, migración e invasión de trofoblastos extravellosos

A fin de investigar si CPF afecta la funcionalidad de los CTBv, se utilizó como modelo a las células HTR-8/SVneo y se las cultivó en presencia y ausencia del tóxico en condiciones tales que la viabilidad no se encontrara afectada, tal como se describió en el Capítulo I.

Inicialmente se evaluó si CPF afecta la proliferación de estas células crecidas en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB y expuestas al pesticida durante 48 h. La proliferación celular se evaluó agregando BrdU al medio de cultivo e inmunodetectando a las células que la incorporaron, es decir a las que pasaron o se encontraban en fase de síntesis de ADN.



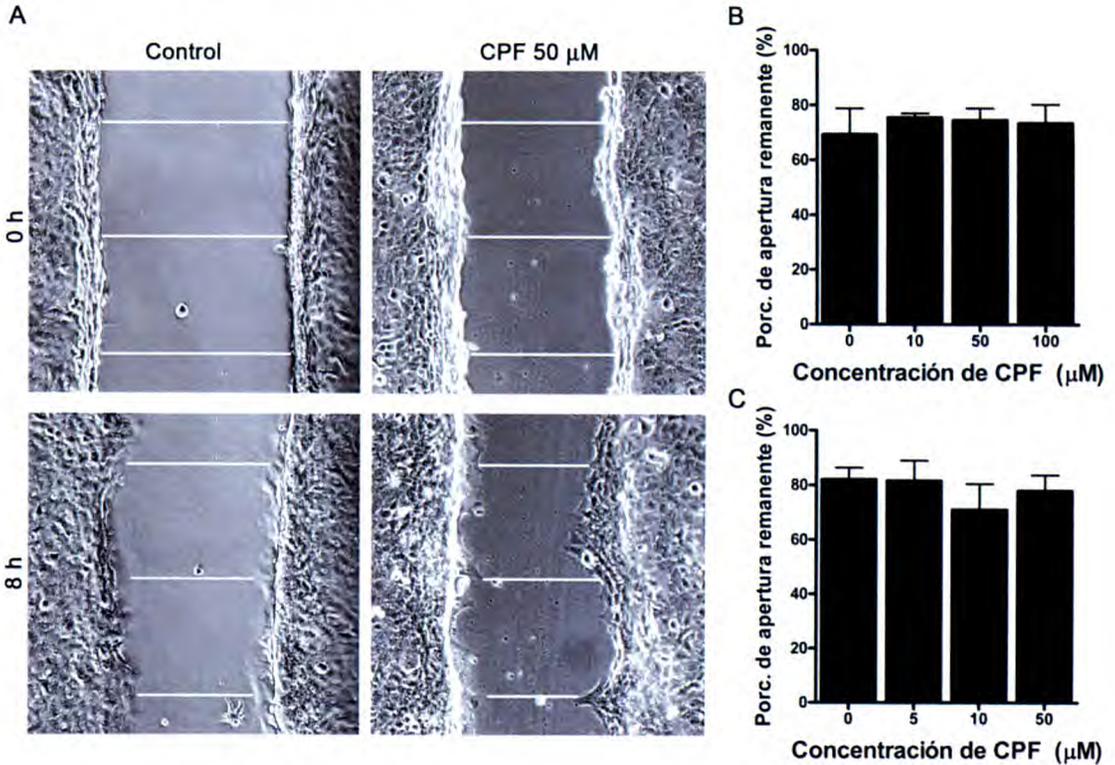
**Fig. 15. Proliferación de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (Control) durante 48 h y se realizaron ensayos de incorporación de BrdU. Se observa la superposición de fotografías en contraste de fase e inmunofluorescencia (paneles superior y medio) y sólo las correspondientes a la detección inmunofluorescente de células BrdU positivas (panel inferior). Flecha: núcleo rojo de célula que incorporó BrdU. Se muestran fotos representativas de dos experimentos independientes. Magnificación total 400X (arriba) y 200X (medio y abajo); Escala barra = 10  $\mu$ m.

Como se observa en la Fig. 15, CPF no modificó marcadamente la cantidad de células en fase de síntesis de ADN, lo cual sugiere que este pesticida no altera la proliferación celular en las condiciones ensayadas.

A fin de corroborar esta observación, se realizó la cuantificación de células positivas para la inmunomarcación (núcleos rojos) respecto al número total de núcleos (contra coloreados con Hoechst), sobre al menos 500 núcleos totales de cada condición. Células tratadas con el vehículo del tóxico (control) presentaron un 51% de núcleos positivos, frente al 52% en las expuestas a 10  $\mu$ M de CPF, 56% en las expuestas a 50  $\mu$ M y 45% en las tratadas con 100  $\mu$ M. Es decir, la diferencia entre la cantidad de células control en fase de síntesis de ADN respecto a las expuestas a CPF, no excede el 6% en las condiciones evaluadas. Resultados similares se observaron cuando las células fueron expuestas a CPF en dosis de hasta 50  $\mu$ M en medio de cultivo suplementado con 1% de SFB, sin embargo, cuando se expusieron a 100  $\mu$ M en estas condiciones, las células presentaron características

compatibles con daño celular y menor marcación de BrdU (datos no mostrados), en concordancia con los resultados descritos en el Capítulo I.

Habiendo observado que CPF no alteró marcadamente la proliferación, se evaluó si este pesticida impactaba en la capacidad de migración celular. Para ello se realizaron Ensayos de Cierre de la Herida en presencia y ausencia del tóxico.

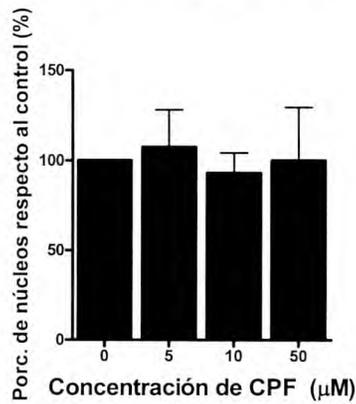


**Fig. 16. Migración de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de CPF o sólo con el vehículo (CPF 0, condición control) durante 48 h totales. Ocho horas antes se realizó una herida sobre el pavimento celular y se fotografió en dicho momento (0 h) y luego de 8 h. Posteriormente se midió el ancho de la herida a partir de al menos cuatro fotos por condición y tres mediciones de cada foto como se muestra en la figura (A). En los gráficos de barras se muestran los resultados de las cuantificaciones de al menos tres experimentos independientes para cada condición: HTR-8/SVneo expuestas a CPF en las dosis señaladas en medio con 10% SFB (B) o con 1% SFB (C). Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  EEM y se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

La migración de las células HTR-8/SVneo no se vio afectada por la presencia de CPF ya que el porcentaje de apertura remanente de la herida luego de 8 h fue equivalente al obtenido en la situación control (Fig. 16). Resultados similares se observaron tanto cuando las células fueron expuestas a CPF en dosis de hasta 100 µM en medio suplementado con 10% de SFB (Fig. 16 B), como en dosis de hasta 50 µM en medio suplementado con 1% de SFB (Fig. 16 C). La herida se cerró completamente después de 18 h tanto en la condición

control como en los problemas, lo cual confirma la capacidad migratoria de las células HTR-8/SVneo (datos no mostrados).

Finalmente se evaluó si la invasión de estas células se encontraba alterada cuando se exponían a CPF. Para ello se cultivaron sobre una matriz gelatinosa colocada encima de las membranas de 8  $\mu\text{m}$  de transwells comerciales, y se determinó el número de células que consiguieron atravesarla. Los resultados obtenidos indicarían que CPF no impacta de manera significativa la capacidad invasiva de las células HTR-8/SVneo (Fig. 17).



**Fig. 17. Invasión de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de CPF o sólo con el vehículo (CPF 0) durante 48 h totales sobre una matriz gelatinosa colocada en transwells comerciales con poros de 8  $\mu\text{m}$ . En el gráfico se muestra el porcentaje de células que lograron atravesar la membrana, considerando la cantidad que atravesó en la condición control (0) como 100%. Los resultados corresponden a cuantificaciones de al menos dos experimentos independientes. Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  DE.

### 2.3. Conclusiones CAPÍTULO II

CPF no modificó el índice de fusión de CTBv ni alteró la expresión de los transcritos PSG3, marcadores de diferenciación vellosa. Estas observaciones sugieren que CPF no interfiere marcadamente con la formación del STB necesario para el mantenimiento de la barrera placentaria.

La proliferación, migración e invasión de células HTR-8/SVneo no se vio marcadamente afectada ante la exposición a CPF en las condiciones evaluadas. Estos resultados, junto con los del capítulo anterior, sugieren que si bien las células HTR-8/SVneo son sensibles a concentraciones altas de CPF, en condiciones en las cuales éstas resisten a su citotoxicidad, no presentan alteraciones marcadas en su funcionalidad.

En resumen, la diferenciación de los CTBv y la funcionalidad de los CTBev, estimada por su capacidad proliferativa, migratoria e invasiva, no serían los blancos principales de la toxicidad de CPF *in vitro*.

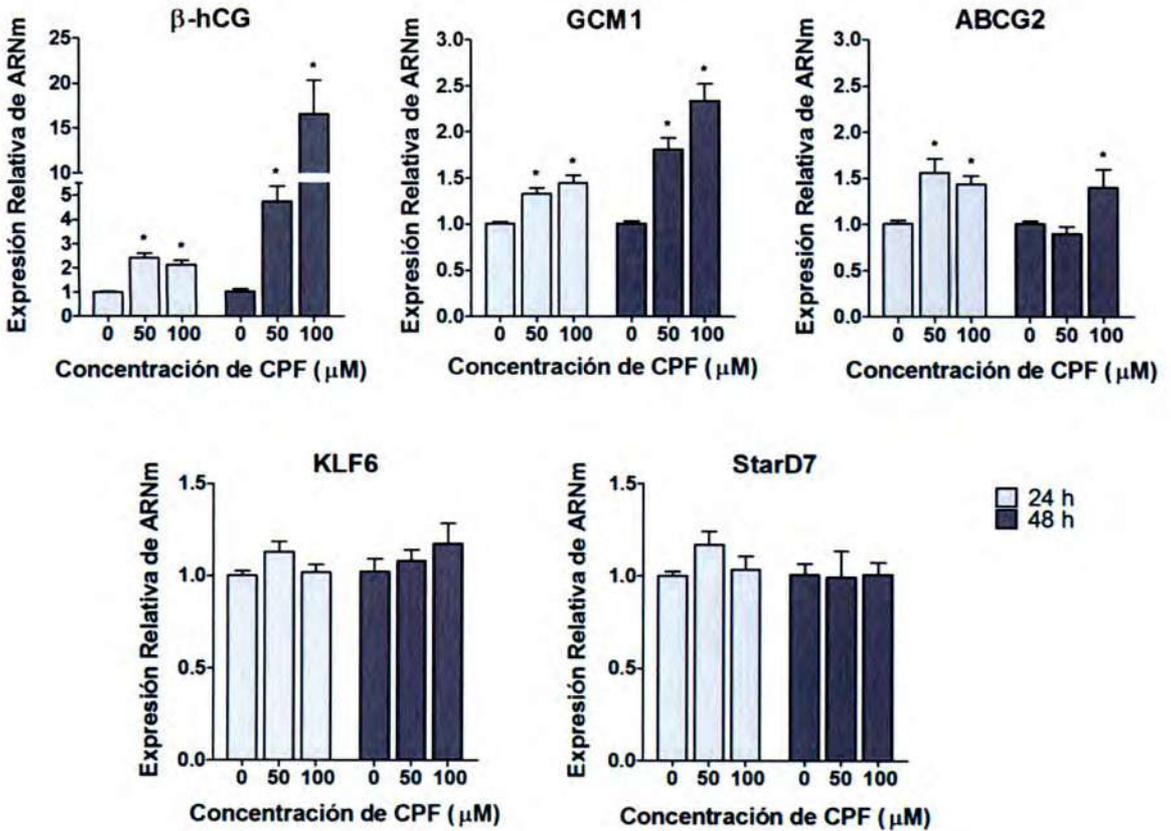
## RESULTADOS: CAPÍTULO III

### 3. Efecto de CPF sobre la expresión de genes importantes para la función placentaria

Considerando que el desarrollo de la placenta requiere de una adecuada interacción entre programas endógenos y señales externas que frecuentemente convergen en la regulación de la expresión de genes, se procedió a evaluar si en las condiciones de cultivo caracterizadas en los capítulos anteriores, en las cuales la viabilidad celular, la diferenciación trofoblástica vellosa y los procesos celulares asociados a la funcionalidad de los trofoblastos extravelosos no se encontraron marcadamente alterados, CPF modifica la expresión de genes importantes para la función placentaria.

#### 3.1. Trofoblastos vellosos

Se evaluó el efecto de CPF sobre la expresión de genes involucrados en la funcionalidad de los CTBv. Específicamente, en el modelo de la línea celular JEG-3, se estudió si CPF alteraba los niveles de ARNm de los siguientes genes: la subunidad  $\beta$  de hCG, hormona clave en el mantenimiento de un embarazo saludable (Hands Schuh et al. 2007a; Ji et al. 2013; Shi et al. 1993; Yang et al. 2003); el factor de transcripción GCM1, regulador central de la diferenciación del trofoblasto (Anson-Cartwright et al. 2000); el transportador de eflujo ABCG2, implicado en la protección del feto contra la toxicidad de múltiples drogas, xenobióticos y metabolitos (Mao 2008); el factor de transcripción KLF6, implicado en múltiples procesos celulares, cuya expresión es requerida en el desarrollo placentario (Matsumoto et al. 2006) y participa en la regulación transcripcional de los genes que codifican para las PSG y  $\beta$ -hCG y en la fusión de los CTBv (Racca et al. 2011; Racca et al. 2015); y el transportador de lípidos StarD7, cuya expresión aumenta durante la diferenciación trofoblástica y modula la proliferación, migración y diferenciación de estas células (Flores-Martin et al. 2013).

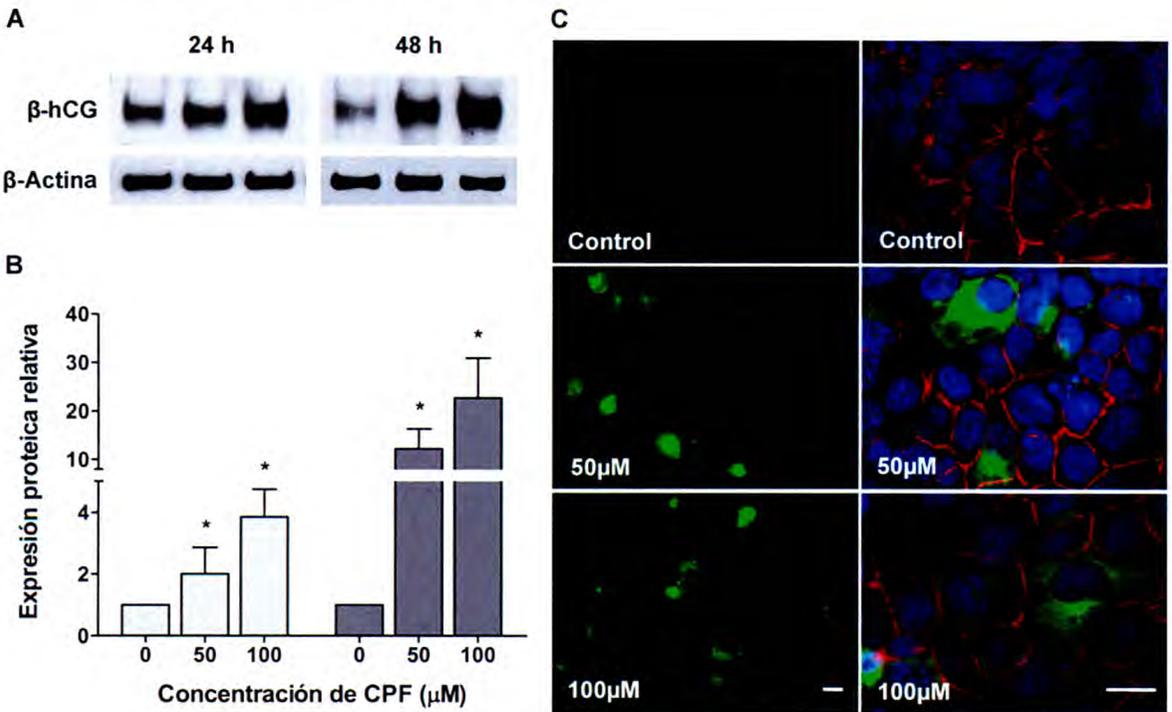


**Fig. 18. Efecto de CPF sobre los niveles de transcritos de  $\beta$ -hCG, GCM1, ABCG2, KLF6 y StarD7.** Los ARNm se cuantificaron por qRT-PCR sobre extractos de células JEG-3 expuestas a CPF durante 24 h (barras gris claro) o 48 h (barras gris oscuro) en las dosis indicadas o con el vehículo solo (0). Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos en la condición control (0). Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Como se puede observar en la Fig. 18, los niveles de ARNm de  $\beta$ -hCG aumentaron en células JEG-3 crecidas en presencia de 50 y 100  $\mu$ M de CPF durante 24 h de exposición y más de quince veces respecto a la condición control luego de 48 h. CPF también incrementó los niveles de transcritos de GCM1 en ambas concentraciones y tiempos de exposición. Luego de 24 h en presencia de CPF, las células JEG-3 presentaron niveles de ARNm de ABCG2 aumentados, los cuales permanecieron incrementados solo en presencia de la dosis de 100  $\mu$ M luego de 48 h de exposición. Sin embargo, la expresión de los transcritos de KLF6 y StarD7 no se vio afectada luego de 24 o 48 h en presencia de las dosis de CPF evaluadas (Fig. 18).

En base a los resultados anteriores, se procedió a analizar si el incremento en los niveles de transcritos de los genes estudiados se correlacionaba con el aumento de sus proteínas.

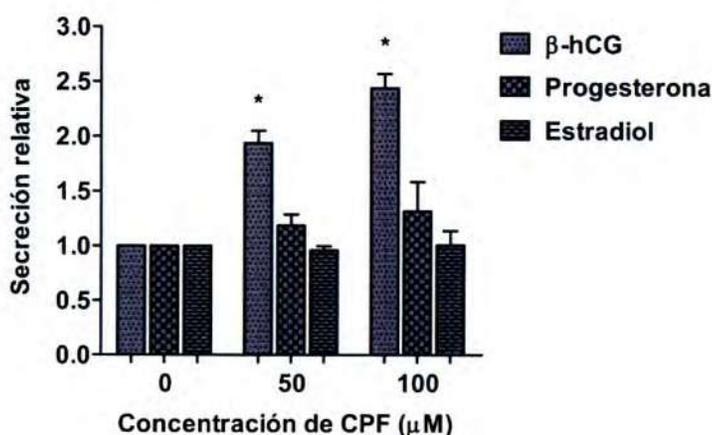
Ensayos de Western blot demostraron que los niveles proteicos intracelulares de  $\beta$ -hCG se incrementaron marcadamente en células JEG-3 expuestas a CPF en comparación a las células expuestas al vehículo solo (control). Dicho incremento fue mayor cuanto mayores fueron las dosis de CPF y el tiempo de exposición (Fig. 19 A y B). Ensayos de inmunofluorescencias con anti- $\beta$ -hCG sobre células JEG-3 cultivadas 48 h en presencia de CPF mostraron un intenso incremento de la señal verde correspondiente a la inmunodetección de  $\beta$ -hCG, la cual en el control se observó en muy bajo nivel en las mismas condiciones de exposición y captura de imagen (Fig. 19 C).



**Fig. 19. Inducción de los niveles proteicos de  $\beta$ -hCG en células JEG-3 expuestas a CPF.** (A) Ensayos representativos de Western blots realizados con anticuerpos anti- $\beta$ -hCG y anti- $\beta$ -actina sobre extractos de células JEG-3 cultivadas en presencia o no de CPF durante 24 o 48 h. (B) Relación de cuantificaciones densitométricas de bandas de  $\beta$ -hCG /  $\beta$ -actina de al menos tres experimentos independientes. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  EEM. El análisis se realizó con el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*). (C) Inmunofluorescencias de  $\beta$ -hCG (verde), desmoplaquina (rojo) y marcación nuclear con Hoechst (azul) en células JEG-3 luego de 48 h de exposición a CPF en las dosis indicadas. Panel izquierdo: Solo se muestra el canal verde, magnificación original 400X. Panel derecho: Superposición de canales, magnificación original 1000X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

CPF también incrementó la expresión de  $\beta$ -hCG en las células Bewo, aunque de manera menos marcada (datos no mostrados).

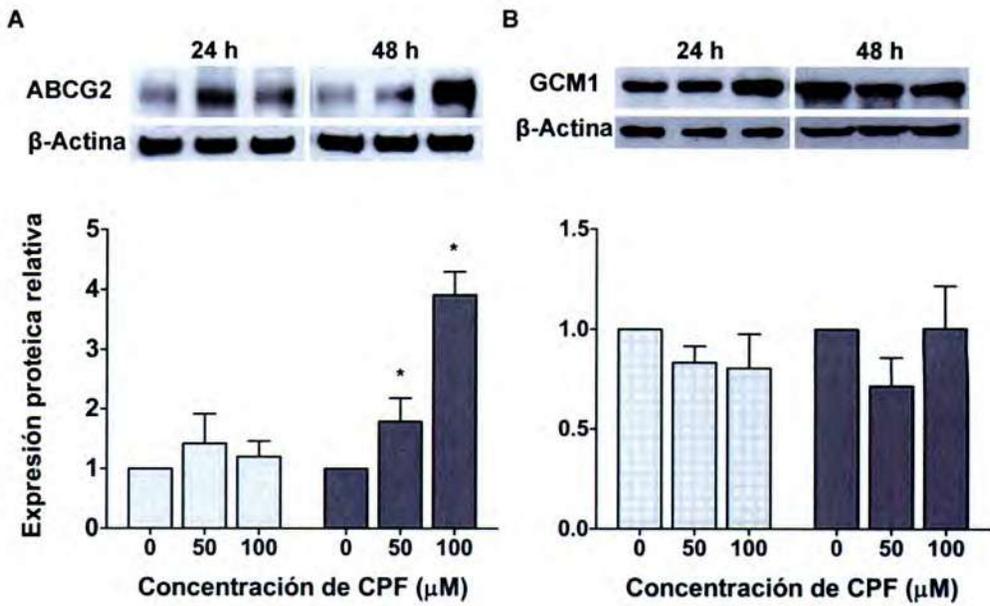
Además, se evaluó la consecuencia del tratamiento con CPF sobre la secreción de  $\beta$ -hCG así como, de progesterona y estradiol en la línea celular JEG-3. Luego de 48 h de tratamientos con 50 o 100  $\mu$ M de CPF, los ensayos de cuantificación hormonal revelaron un claro incremento en la concentración de  $\beta$ -hCG en el sobrenadante correspondiente a las 24 últimas horas de exposición de estas células. En contraste, la concentración de estradiol y progesterona secretada permaneció sin cambios estadísticamente significativos (Fig. 20).



**Fig. 20. Cuantificación de la secreción de  $\beta$ -hCG, estradiol y progesterona.** Las células JEG-3 se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0) durante 48 h. Los resultados se expresan como nivel hormonal de secreción al medio de cultivo, en las últimas 24 h de tratamiento, relativo al nivel de la condición control (0) definido como 1. En el gráfico se muestra el Valor Medio  $\pm$  EEM de al menos cuatro experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

A fin de determinar si el aumento en los niveles de transcritos de GCM1 y ABCG2 inducidos por la presencia de CPF se correlacionaban con aumentos en su síntesis proteica, se realizaron ensayos de Western blot.

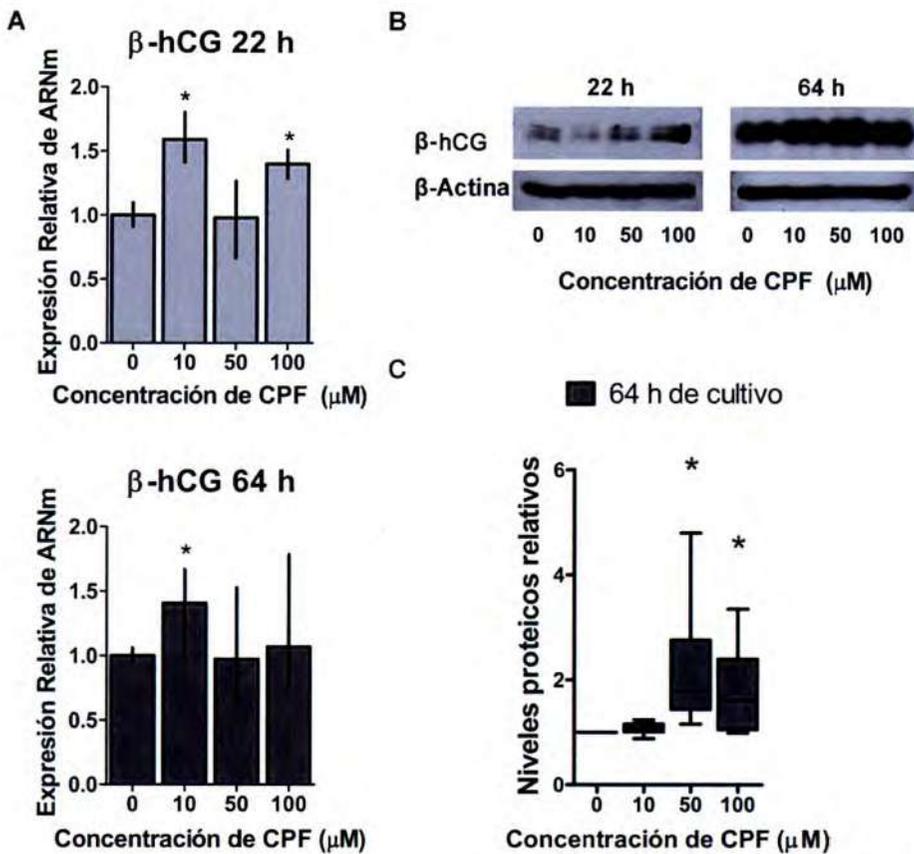
Los niveles proteicos del transportador de eflujo de xenobióticos ABCG2 se vieron significativamente aumentados en las células JEG-3 luego de 48 h de exposición a CPF (Fig. 21 A). Sin embargo, si bien el ARNm del factor de transcripción GCM1 se encontró incrementado en las células JEG-3 expuestas a CPF, no se detectaron cambios en su nivel proteico (Fig. 21 B). Inmunofluorescencias con anticuerpos anti-GCM1 tampoco mostraron cambios en la distribución e intensidad de fluorescencia en células JEG-3 cultivadas en presencia de dosis equivalentes de CPF durante al menos 24 h (datos no mostrados).



**Fig. 21. Expresión proteica de ABCG2 y GCM1 en células JEG-3 tratadas con CPF.** Se prepararon extractos proteicos a partir de células JEG-3 expuestas o no a CPF por 24 h (barras gris claro) o 48 h (barras gris oscuro) y se realizaron Western blots usando anticuerpos anti-ABCG2 (A) o anti-GCM1 (B) y anti-β-actina como normalizador. Se muestran imágenes representativas y gráficos de barras indicando la relación ABCG2 / β-actina o GCM1 / β-actina determinada por cuantificación densitométrica de tres experimentos independientes. Se indica el Valor Medio ± EEM. Los datos se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Posteriormente, se evaluó la respuesta a la presencia de CPF de los CTBv obtenidos por purificación a partir de placentas normales a término. A las 3 h de haber sembrado los CTBv aislados en el medio de cultivo, se los trató o no con CPF durante 22 o 64 h y se evaluaron los niveles de transcritos y proteínas de interés. Como se señaló anteriormente, los CTBv en cultivo diferencian hacia estructuras sinciciales, por lo cual los tiempos de tratamiento elegidos corresponden a la fase inicial (22 h) y avanzada (64 h) del proceso de diferenciación *in vitro*.

Como se observa en la Fig. 22, pese a la gran variabilidad de respuesta interplacentaria, CPF incrementó significativamente el nivel de transcritos para β-hCG a las dosis de 10 μM y 100 μM luego de 22 h y a la dosis de 10 μM luego de 64 h totales de cultivo. En el resto de las condiciones evaluadas, algunas placentas presentaron también un aumento en los niveles de ARNm de β-hCG pero no así otras, por lo cual el análisis estadístico no arrojó resultados contundentes (Fig. 22 A). Sin embargo, luego de 64 h totales de cultivo el tratamiento con 50 y 100 μM de CPF condujo a un incremento significativo en los niveles proteicos de β-hCG (Fig. 22 B y C).

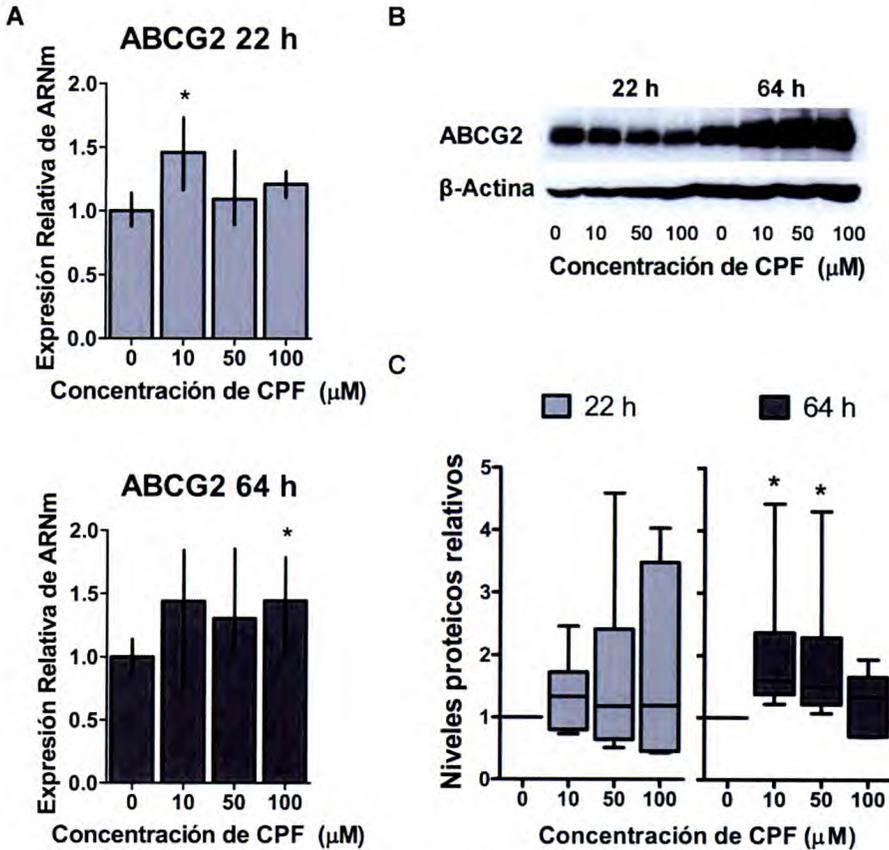


**Fig. 22. Niveles de ARNm y proteína  $\beta$ -hCG en CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0) desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 22 o 64 h totales de cultivo. (A) Cuantificación de ARNm por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Se muestra la Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% de cuatro experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por triplicado. (B) Imágenes de Western blots representativos usando anticuerpos anti- $\beta$ -hCG y anti- $\beta$ -actina. (C) Gráficos de caja representando la relación  $\beta$ -hCG /  $\beta$ -actina determinada por cuantificación densitométrica y relativa a la condición control (0). Se representa la Mediana (barras horizontales dentro de cajas), el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% (límites de cajas) y los valores mínimo y máximo encontrados en tres experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por duplicado. Los datos se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Cabe agregar, que si bien los tratamientos con CPF en este modelo celular fueron realizados en presencia de 10% de SFB, para permitir la diferenciación de los CTBv, también se observó un aumento de los niveles de transcritos de  $\beta$ -hCG cuando las células se expusieron CPF en presencia de 1% de SFB durante 22 h totales de cultivo (datos no mostrados).

En cuanto al efecto de este pesticida sobre la expresión del transportador de xenobióticos ABCG2, se observó una tendencia general a incrementar sus niveles de ARNm y proteína. Sin embargo, debido a la gran variabilidad interplacentaria sólo fue

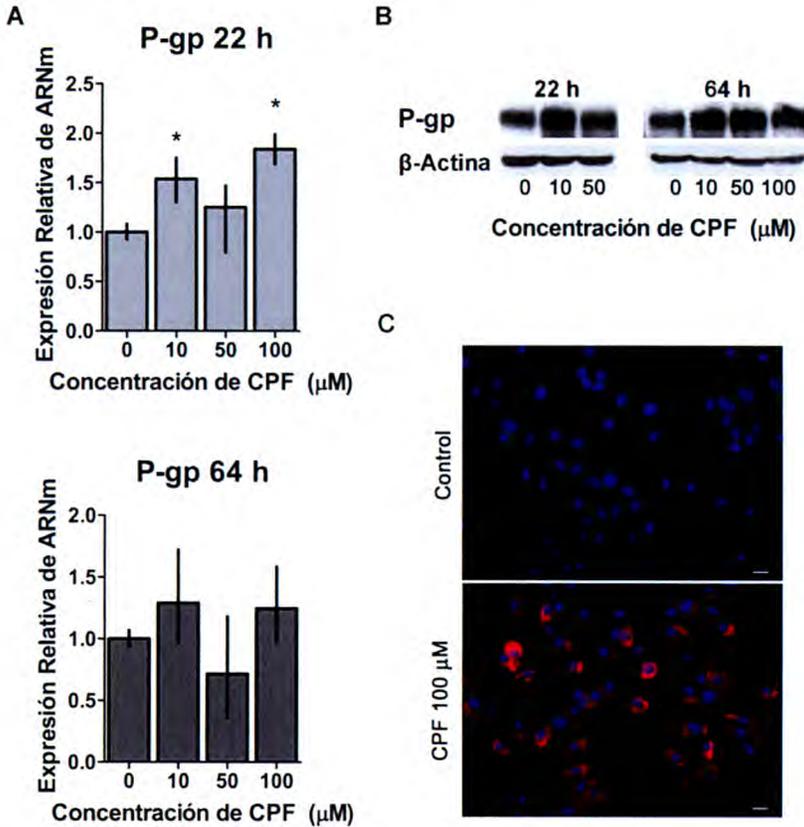
estadísticamente significativo el incremento en los niveles del transcrito ABCG2 cuando los CTBv se expusieron a 10  $\mu\text{M}$  de CPF durante 22 h y a 100  $\mu\text{M}$  durante 64 h totales de cultivo, y de los niveles proteicos cuando se trataron con 10 y 50  $\mu\text{M}$  por 64 h de cultivo (Fig. 23).



**Fig. 23. Niveles de ARNm y proteína ABCG2 en CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas o sólo con el vehículo (CPF 0) desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 22 o 64 h totales de cultivo. (A) Cuantificación de ARNm por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Se muestra la Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% de cuatro experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por triplicado. (B) Western blots representativos usando anticuerpos anti-ABCG2 y anti- $\beta$ -actina. (C) Gráficos de caja representando la relación ABCG2 /  $\beta$ -actina determinada por cuantificación densitométrica y relativa a la condición control (0). Se representa la Mediana (barras horizontales dentro de las cajas), el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% (límites de cajas) y los valores mínimo y máximo encontrados en tres experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por duplicado. Los datos se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

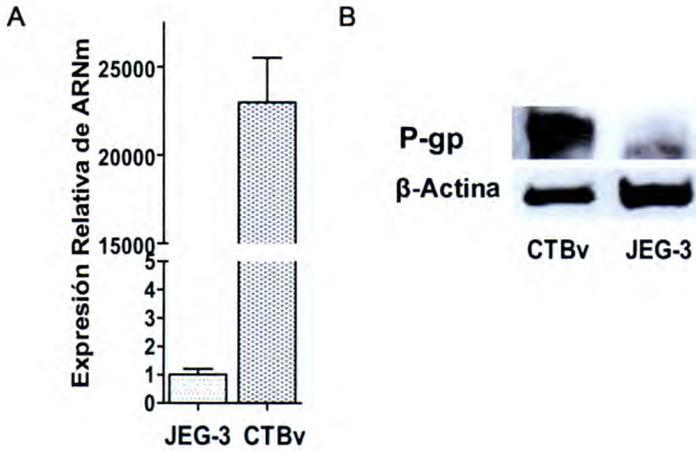
Los CTBv poseen una batería de transportadores de eflujo de xenobióticos que cooperan en su función de barrera contra tóxicos y metabolitos que arriban desde la sangre materna (Prouillac y Lecoeur 2010). El ABCG2, junto con la P-gp son los principales asociados al rol de protección fetal (Kolwankar et al. 2005). Por este motivo se procedió a evaluar si CPF también inducía la producción de la P-gp en este modelo.

CTBv expuestos a 10 y 100  $\mu\text{M}$  de CPF mostraron niveles más elevados de ARNm de P-gp respecto a CTBv cultivados en presencia solo del vehículo durante 22 h. Los transcritos de dicha glicoproteína equipararon sus valores respecto a la condición control luego de 64 h de cultivo (Fig. 24 A). En las condiciones utilizadas CPF también incrementó los niveles proteicos de este transportador de eflujo (Fig. 24 B y C).



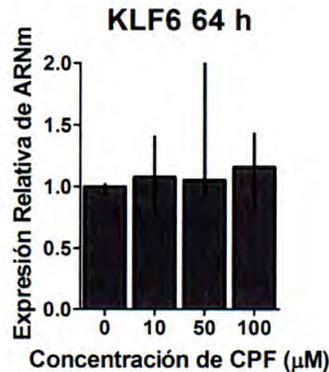
**Fig. 24. Niveles de ARNm y proteína P-gp en CTBv expuestos a CPF.** Las células se cultivaron en presencia de las concentraciones de CPF indicadas desde las 3 h post-plaqueo y hasta las 22 o 64 h totales. (A) Cuantificación de ARNm por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos control (0). Se muestra la Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% de al menos tres experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por triplicado. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*). (B) Western blots representativos de dos experimentos independientes usando anti-P-gp y anti- $\beta$ -actina. (C) Inmufluorescencia realizada con anti-P-gp (rojo) sobre CTBv de 22 h de cultivo expuestos a 100  $\mu\text{M}$  de CPF. En azul se observan los núcleos marcados con Hoechst.

Cabe agregar que los niveles de P-gp en presencia y ausencia de CPF no pudieron ser evaluados previamente en la línea celular JEG-3 ya que la misma presenta niveles despreciables de dicha glicoproteína (Fig. 25).



**Fig. 25. Niveles basales relativos de ARNm y proteína P-gp en células JEG-3 versus CTBv.** (A) Cuantificación de ARNm por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm de extractos de células JEG-3. Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  DE de un ensayo realizado por triplicado. (B) Imágenes de Western blots representativos usando anticuerpos anti-P-gp y anti- $\beta$ -actina.

Finalmente, al igual que lo observado en las células JEG-3, CPF no alteró los niveles de ARNm del factor de transcripción KLF6 en CTBv cultivados durante 64 h totales (Fig. 26).



**Fig. 26. Niveles de ARNm de KLF6 en CTBv expuestos a CPF.** Cuantificación de ARNm por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Se muestra la Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75% de cuatro experimentos independientes (placentas diferentes) realizados por triplicado. Los datos se analizaron mediante el test estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

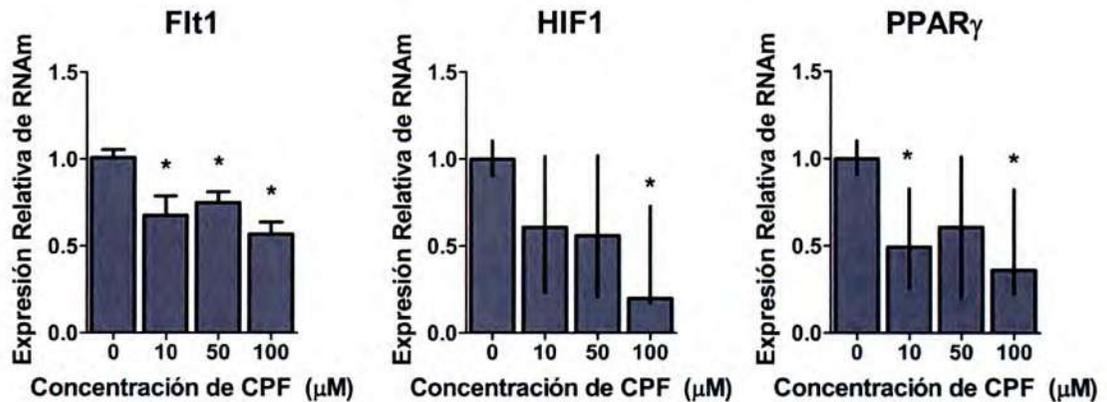
### 3.2. Trofoblastos extravelosos

Con el propósito de estudiar el impacto de CPF sobre la expresión de genes relevantes para el desarrollo adecuado de las funciones asociadas a los trofoblastos extravelosos, se realizó un screening sobre algunos genes involucrados. Como modelo

celular se utilizaron a las células HTR-8/SVneo. En los cultivos de células expuestas a CPF se analizó la expresión de los siguientes genes: Flt1, HIF-1 $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , en base a los antecedentes que se mencionan a continuación.

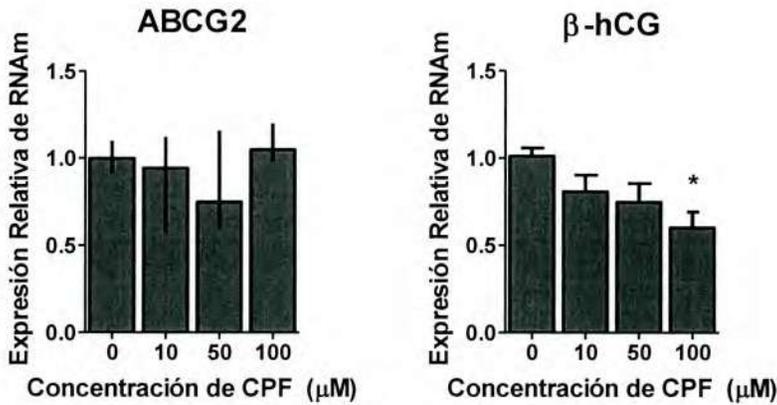
Flt1 es el receptor de VEGF, se expresa en trofoblastos extravellosos y participa en los procesos de proliferación y diferenciación endovascular de estas células (Athanasziades et al. 1998; Fukushima et al. 2005). Además su variante soluble se ha encontrado incrementada en placentas preeclámpicas mediante regulación dependiente de HIF-1 $\alpha$  (Nevo et al. 2006). HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción principalmente regulado por hipoxia, aunque también por otros mediadores en situación de normoxia (Dery et al. 2005). Más aún, diversos estímulos no-hipóxicos modifican los niveles de ARNm, proteína o actividad de HIF-1 $\alpha$  en la placenta y se ha propuesto como un mediador clave en el desarrollo y funcionalidad placentaria (Pringle et al. 2010). PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción activado mediante unión a ligando, que regula el desarrollo placentario y la invasión de los CTBev (Fournier et al. 2007; Fournier et al. 2008b). Por estos motivos también se lo ha implicado en la patogénesis de la preeclampsia.

Los experimentos realizados indicaron que la exposición a CPF durante 48 h en medio suplementado con 10% de SFB disminuyó los niveles de ARNm de Flt1 en todas las dosis analizadas, de HIF-1 $\alpha$  en la dosis máxima evaluada (100  $\mu$ M) y de PPAR $\gamma$  cuando las células se expusieron a concentraciones de 10 y 100  $\mu$ M (Fig. 27).



**Fig. 27. Efecto de CPF sobre los niveles de transcritos de Flt1, HIF-1 $\alpha$  y PPAR $\gamma$  en células HTR-8/SVneo.** Los ARNm se cuantificaron por qRT-PCR sobre extractos de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF durante 48 h en las dosis indicadas o con el vehículo solo (0). Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Los datos se representan con el Valor Medio  $\pm$  EEM o con su Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75%, según si fueron analizados con el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett o con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn, respectivamente. La elección del test se realizó de acuerdo al resultado previo del test de homogeneidad de varianzas de Bartlett. Los datos provienen de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se consideró estadísticamente diferente respecto a la condición control (0) un  $p < 0,05$  (\*).

Se procedió a medir si en estas células de origen extravelloso también se encontraba alterada la expresión de  $\beta$ -hCG y ABCG2 al igual que en los CTBv. En ninguna de las dosis y condiciones ensayadas se observaron cambios en los niveles de ARNm del transportador de eflujo ABCG2, en cambio los niveles de ARNm de  $\beta$ -hCG disminuyeron en células expuestas a 100  $\mu$ M de CPF durante 48 h (Fig. 28). Además, se observaron niveles de transcritos de  $\beta$ -hCG disminuidos cuando estas células se expusieron a 10 y 50  $\mu$ M de CPF durante 48 h de cultivo en medio suplementado con 1% de SFB (datos no mostrados).



**Fig. 28. Efecto de CPF sobre los niveles de transcritos de ABCG2 y  $\beta$ -hCG en células HTR-8/SVneo.** Los ARNm se cuantificaron por qRT-PCR sobre extractos de células HTR-8/SVneo expuestas a CPF durante 48 h en las dosis indicadas o con el vehículo solo (0). Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). Los datos se representan con el Valor Medio  $\pm$  EEM o con su Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentiles 25 y 75%, según si fueron analizados con el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett o con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunn, respectivamente. La elección del test se realizó de acuerdo al resultado previo del test de homogeneidad de varianzas de Bartlett. Los datos provienen de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado y se consideró estadísticamente diferente respecto a la condición control (0) un  $p < 0,05$  (\*).

### 3.3. Conclusiones CAPITULO III

Los resultados indican que CPF indujo la transcripción, síntesis y secreción de  $\beta$ -hCG en las células JEG-3 expuestas *in vitro* en las condiciones indicadas. La producción de  $\beta$ -hCG también se observó incrementada en las células Bewo expuestas a CPF.

Los niveles del ARNm del factor de transcripción GCM1 aumentaron ante la presencia de CPF pero no así los de su proteína, mientras que los niveles de transcripto y proteína ABCG2 se incrementaron en las células JEG-3 en presencia de este pesticida.

Si bien la respuesta de los CTBv purificados a partir de placentas normales a término expuestos *in vitro* a CPF mostró una variabilidad importante (probablemente reflejando diferentes condiciones iniciales de la placenta de origen), se observaron resultados que complementan los obtenidos en las líneas celulares. En este sentido, los CTBv incrementaron los niveles de  $\beta$ -hCG y de los transportadores de eflujo de xenobióticos ABCG2 y P-gp en respuesta a la presencia de CPF en el medio de cultivo.

En ninguno de los modelos estudiados los niveles de ARNm del factor de transcripción KLF6 se alteraron como consecuencia de la exposición a CPF durante tiempos prolongados.

Los resultados anteriores demuestran que los trofoblastos de origen vellosos responden frente a CPF induciendo la expresión de genes relevantes para su funcionalidad endócrina y protectora.

El incremento observado en los niveles de ABCG2 puede asociarse a la funcionalidad de barrera de los trofoblastos vellosos ya que su expresión no se vió alterada en células HTR-8/SVneo, de origen extravellosos, expuestas a CPF.

Células HTR-8/SVneo expuestas a CPF presentaron transcritos de Flt1 significativamente disminuídos, de HIF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -hCG también frente a la dosis más elevada y de PPAR $\gamma$  frente a las dosis de 10 y 100  $\mu$ M. Cabe citar que la hCG producida por los CTBev es diferente y posee funciones biológicas distintas a las de la hCG sintetizada por el STB, ya que principalmente participa en promover la invasión de estas células (Cole 2010; Cole 2012a; Cole 2012b; Fournier et al. 2011; Handschuh et al. 2009; Handschuh et al. 2007b)

Los resultados hasta aquí descriptos señalan que en condiciones de exposición en las cuales la viabilidad celular no se encuentra alterada, si bien CPF no altera parámetros celulares asociados a la funcionalidad de los trofoblastos, es capaz de alterar la expresión de genes relevantes para la misma.

## RESULTADOS: CAPÍTULO IV

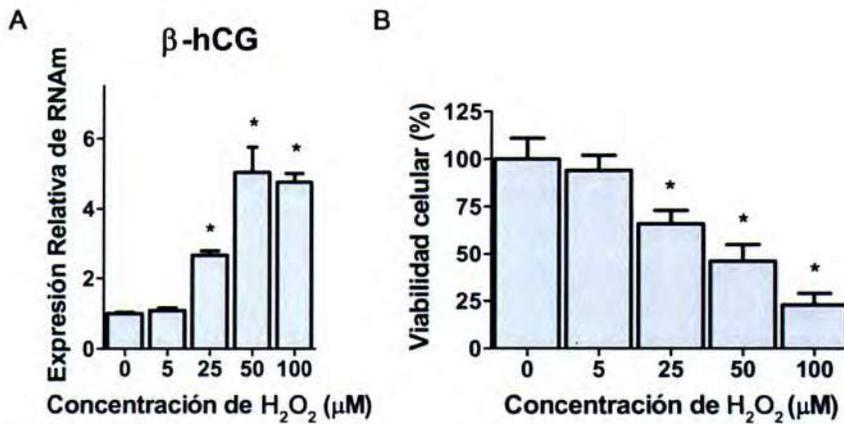
### 4. Estudio de factores moleculares potencialmente involucrados en los efectos de CPF sobre el trofoblasto veloso

En el capítulo anterior se demostró que el CPF modifica la expresión de genes importantes para la función de la placenta en concentraciones que no afectan la viabilidad celular. Los resultados hallados constituyen el primer reporte que señala a los genes  $\beta$ -hCG y ABCG2 como blancos moleculares de la exposición a CPF. Teniendo en cuenta la importancia de ambos en la función del CTBv, se inició un estudio exploratorio para identificar factores posiblemente implicados en esta respuesta del trofoblasto a la presencia del tóxico.

#### 4.1. Rol de las EROs en la producción de $\beta$ -hCG

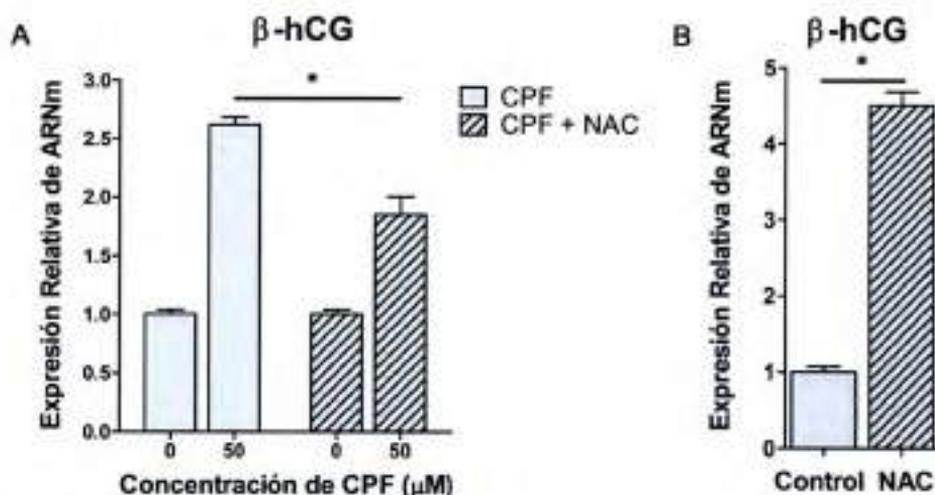
Durante este trabajo de Tesis se publicó un trabajo en colaboración en el cual se determinó que CPF aumenta la producción de EROs en células JEG-3 expuestas a 50 y 100  $\mu$ M durante 3 y 24 h (Chiapella et al. 2013). Por otro lado, estudios *in vitro* han vinculado a la secreción trofoblástica de hCG con el estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  (Kharfi Aris et al. 2007) y se ha encontrado una correlación positiva entre la concentración sérica de hCG y la producción de  $H_2O_2$  en pacientes con preeclampsia (Kharfi Aris et al. 2005).

En base a estos antecedentes se evaluó si el aumento de  $\beta$ -hCG observado en las células JEG-3 era consecuencia de las EROs generadas por CPF. Para ello, inicialmente, se determinaron los niveles de expresión de  $\beta$ -hCG y la viabilidad de células expuestas a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$  durante 24 h. Los niveles de ARNm de  $\beta$ -hCG aumentaron significativamente en las células JEG-3 expuestas a concentraciones iguales o mayores a 25  $\mu$ M de  $H_2O_2$ , sin embargo en esas condiciones la viabilidad celular se encontraba reducida, a diferencia de lo hallado en el tratamiento con CPF (Fig. 29). Este resultado indica que la expresión de  $\beta$ -hCG es inducida por  $H_2O_2$  en las células JEG-3 y sugiere que el aumento de  $\beta$ -hCG causado por CPF podría estar mediado por EROs de este tipo.



**Fig. 29. Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los niveles de transcritos de β-hCG.** Células JEG-3 se expusieron a las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas durante 24 h. (A) Los niveles de ARNm se cuantificaron por qRT-PCR y los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como transcripto de referencia endógeno y se calcularon de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (0). (B) Ensayo de MTT sobre células JEG-3 expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las condiciones indicadas. Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  DE y se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de una vía seguido del post-test de Comparación Múltiple de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

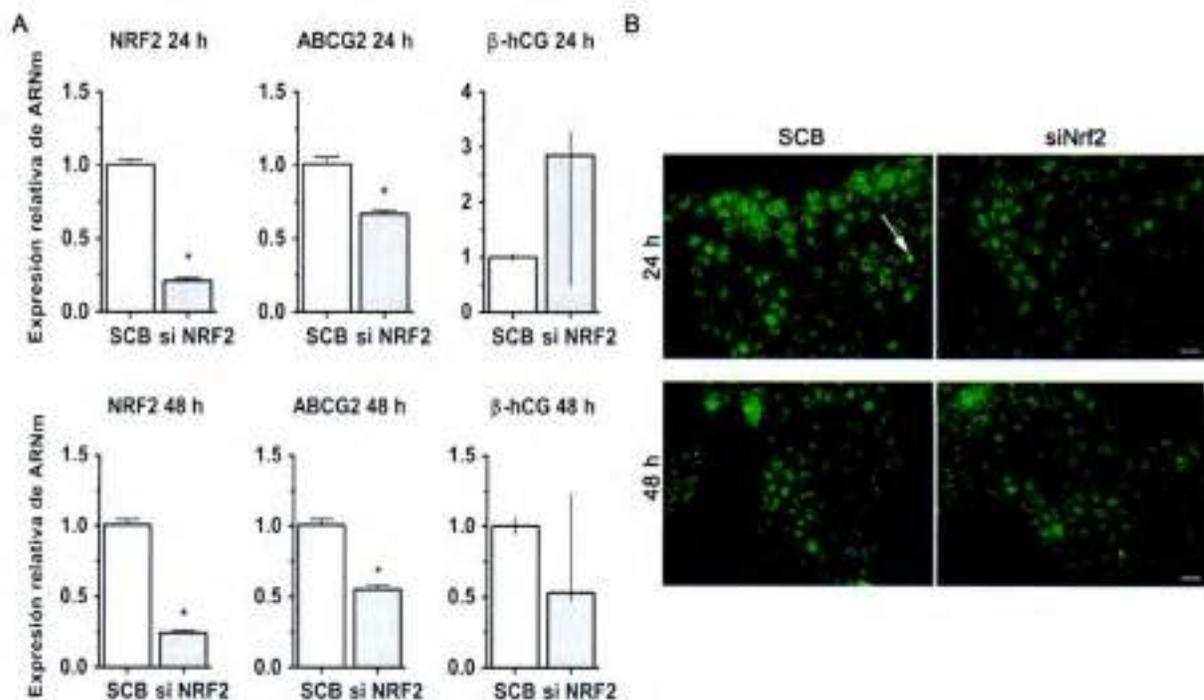
Para confirmar la hipótesis anterior, las células JEG-3 fueron tratadas durante 24 h con CPF o fueron previamente incubadas durante 2 h con el antioxidante NAC y luego tratadas 24 h con CPF en presencia de 10 mM de NAC. Este antioxidante es un precursor del GSH, fuente de grupos sulfhidrilo en las células y eliminador de EROs tales como radicales hidroxilo y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aruoma et al. 1989; Zafarullah et al. 2003). La medición de los niveles de ARNm de β-hCG reveló que el aumento inducido por 50 μM de CPF se revirtió parcialmente en presencia del antioxidante (Fig. 30 A). Sorpresivamente, la NAC por sí misma incrementó el nivel de transcripto de β-hCG comparado con la situación control en ausencia de CPF y de NAC (Fig. 30 B), siendo el aumento generado por CPF aditivo al aumento inicial generado por la NAC. Cabe señalar que la concentración utilizada de este antioxidante no afectó la viabilidad celular (datos no mostrados).



**Fig. 30. Inducción de los niveles de ARNm de  $\beta$ -hCG en células JEG-3 expuestas a CPF y al antioxidante NAC.** Células JEG-3 se expusieron a 0 ó 50  $\mu$ M de CPF durante 24 h, en presencia o ausencia de NAC. Los ARNm se cuantificaron por qRT-PCR y los resultados se normalizaron usando ciclofilina A como transcripto de referencia endógeno y se calcularon de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . (A) Se muestran niveles de transcritos  $\beta$ -hCG en células expuestas a CPF o a CPF + NAC relativos a sus respectivos controles sin CPF (0). (B) Se muestran niveles basales de transcritos de  $\beta$ -hCG (sin CPF) relativos al control sin NAC. Los datos se presentan como el Valor Medio  $\pm$  DE y se analizaron mediante el test estadístico ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni (A) o con un test t no pareado de dos colas (B). Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

#### 4.2. Participación del factor de transcripción Nrf2

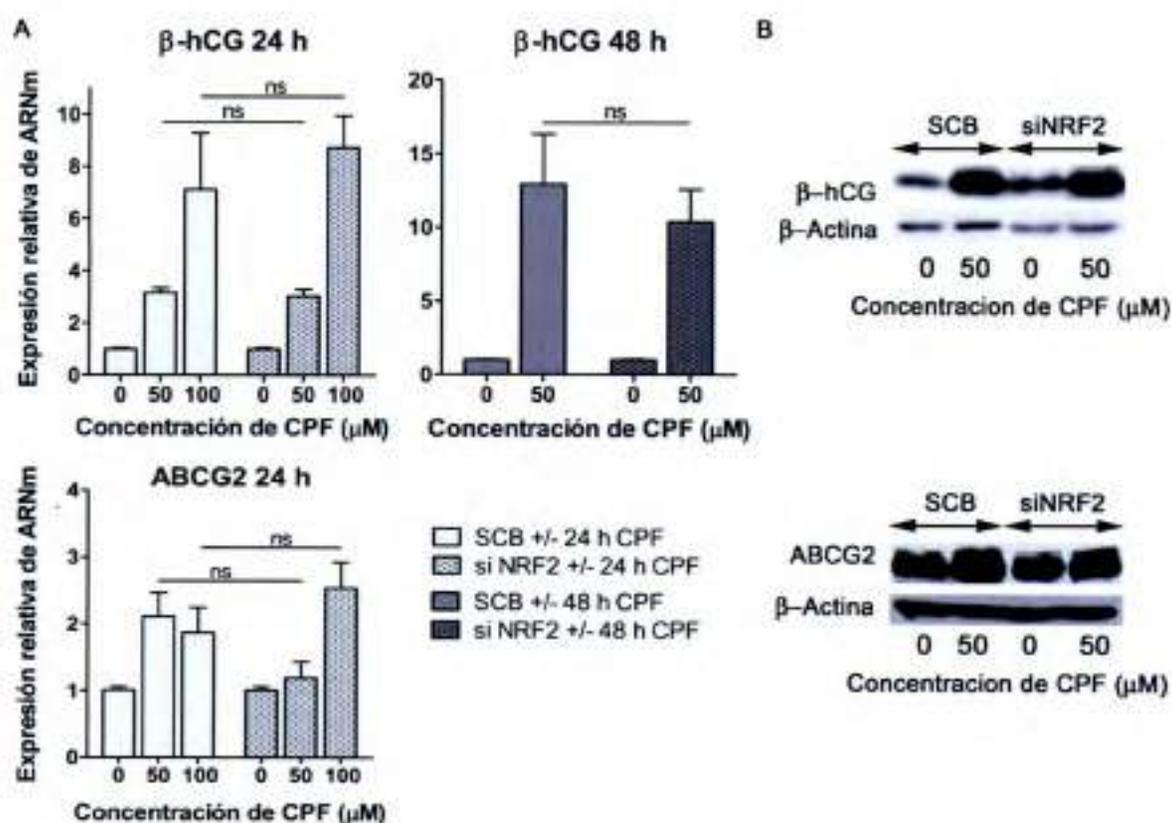
En el trabajo en colaboración mencionado previamente, se demostró que las células JEG-3 responden a las EROs generadas por CPF activando un mecanismo de defensa antioxidante, con la participación de las enzimas CAT, Glutación Reductasa y HO-1, mediado, al menos en parte, por el factor de transcripción Nrf2. Este factor incrementa su expresión y trasloca al núcleo en presencia de CPF en las condiciones evaluadas (Chiapella et al. 2013). Por lo tanto, se propuso evaluar si Nrf2 es uno de los mediadores moleculares que participa en el incremento de ABCG2 y de  $\beta$ -hCG inducido por CPF. A tal fin se realizaron experimentos de pérdida de función por silenciamiento génico con siARN específicos para el gen Nrf2 (siNRF2). Como se observa, la transfección con el siNRF2 redujo significativamente el nivel de transcripto Nrf2 tanto a las 24 como 48 h post-transfección, comparado con los niveles encontrados en células transfectadas con el siARN control (SCB). A su vez, los niveles de ARNm de ABCG2, blanco transcripcional de Nrf2 en otros modelos celulares (Hagiya et al. 2008; Ishikawa et al. 2013; Wang et al. 2014), también se encontraron disminuidos y no así los transcritos de  $\beta$ -hCG (Fig. 31 A). Además, las células transfectadas con el siNRF2 mantuvieron su viabilidad sin alteraciones en comparación con la condición control SCB (Fig. 31 B).



**Fig. 31. Silenciamiento de Nrf2.** Células JEG-3 se transfectaron con 10 nM de siNRF2 o con SCB y se cultivaron durante 24 o 48 h. (A) Niveles de ARNm de Nrf2, ABCG2 y  $\beta$ -hCG, cuantificados por qRT-PCR, normalizados usando ciclofilina A como transcripto de referencia endógeno y expresados de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición control (SCB). Los datos se representan con el Valor Medio  $\pm$  EEM o con su Mediana y el Rango intercuartil correspondiente a los percentilos 25 y 75%, según si fueron analizados con el test t o con el test no paramétrico de Mann Whitney, respectivamente. La elección del test se realizó de acuerdo al resultado previo del test F para determinar la homogeneidad de varianzas. Los datos provienen de tres experimentos independientes realizados por triplicado y se consideró estadísticamente diferente respecto a la condición control (SCB) un  $p < 0,05$  (\*). (B) Imágenes representativas de tinciones con NA y BE. Se observan escasos núcleos verdes brillantes sugerentes de apoptosis (Flecha) y no se observan núcleos rojos de células necróticas. Magnificación original 400X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

Habiendo confirmado el silenciamiento de Nrf2, su participación en el control de la transcripción basal de ABCG2 y que su disminución no altera la viabilidad en condiciones de crecimiento celular normal, se evaluó el efecto del silenciamiento en la respuesta celular a CPF. Para ello, células JEG-3 silenciadas para Nrf2 o transfectadas con el siARN control durante 24 h fueron expuestas a CPF durante 24 o 48 h y los niveles de ARNm y de proteína de ABCG2 y  $\beta$ -hCG fueron cuantificados. CPF incrementó la producción de ABCG2 y  $\beta$ -hCG tanto en células transfectadas con SCB como con siNRF2, sin cambios significativos en el incremento alcanzado. Estos resultados sugieren que este factor de transcripción no desempeña un rol clave en el aumento de ABCG2 y  $\beta$ -hCG inducido por CPF (Fig. 32). Sin embargo, observaciones preliminares sugieren que la reducción de la expresión de Nrf2

aumentaría la sensibilidad de estas células frente a la citotoxicidad de CPF (datos no mostrados).



**Fig. 32. Niveles de expresión de ABCG2 y β-hCG en células silenciadas para Nrf2 y expuestas a CPF.** Células JEG-3 se transfectaron con 10 nM de siNRF2 o con SCB y se cultivaron 24 h, posteriormente fueron expuestas a las dosis indicadas de CPF durante 24 o 48 h. (A) Gráficos representativos de niveles de ARNm de β-hCG y ABCG2 relativos a los controles (0) medidos por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron con ciclofilina A, se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y se analizaron con ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni, considerando un  $p < 0,05$  como estadísticamente diferente (\*). (B) Western blots realizados con anticuerpos anti-β-hCG, anti-ABCG2 y anti-β-actina y revelados mediante quimioluminiscencia, de células transfectadas 24 h con siNRF2 o con SCB y expuestas 48 h a CPF.

### 4.3. Participación del factor de transcripción KLF6

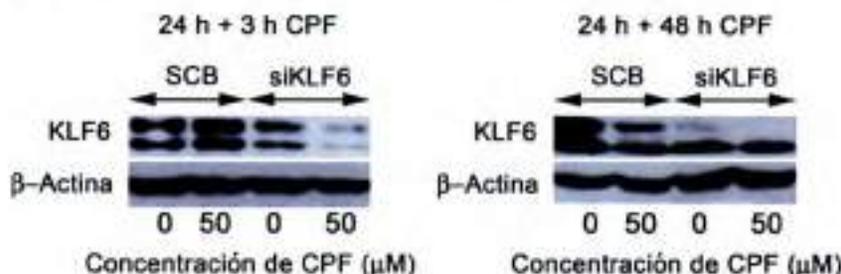
Nuestro grupo de trabajo ha determinado que KLF6 es un regulador transcripcional de β-hCG en los CTBv (Racca et al. 2011). Además se ha reportado que este factor de transcripción aumenta su expresión frente a EROs y a sustancias pro-oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el pesticida paraquat en líneas celulares hepáticas, así como por alcohol en el hígado de ratas expuestas (Urtasun et al. 2012). En base a estos antecedentes se evaluó si KLF6 es un mediador molecular que participa en el incremento de β-hCG y de ABCG2 inducido por CPF en las células JEG-3.

En diversos sistemas celulares KLF6 actúa como un gen de respuesta temprana a una injuria. Si bien no se habían observado modificaciones en los niveles de ARNm de KLF6 en las células JEG-3 expuestas a CPF durante 24 o 48 h (Ver Capítulo III), se determinó si CPF provocaba una inducción temprana de su expresión. Efectivamente, luego de 3 h de exposición a CPF se detectó un claro aumento en los niveles proteicos de KLF6 (Fig. 33), sugiriendo su participación en el control transcripcional de genes inducidos por el tóxico. Resultados similares se obtuvieron en las células BeWo (datos no mostrados).



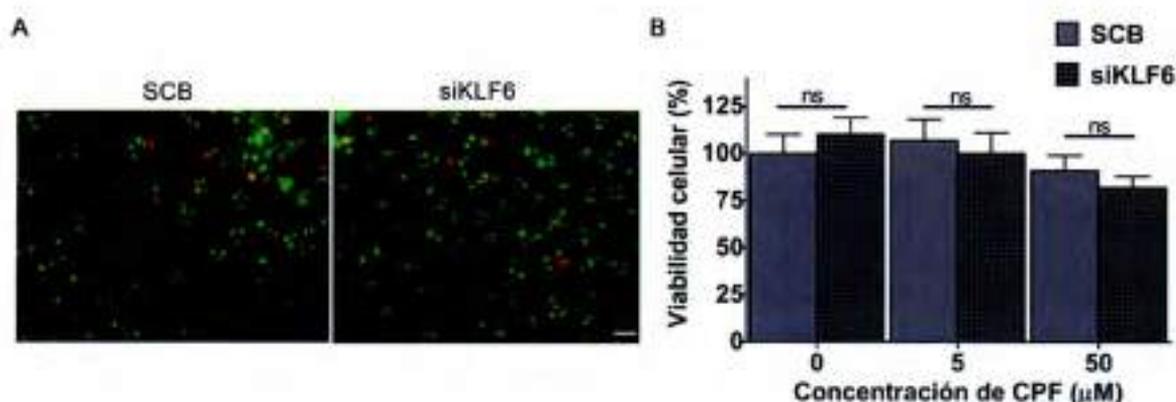
**Fig. 33. Niveles proteicos de KLF6 en células JEG-3 expuestas a CPF.** Las células fueron expuestas a CPF o a su vehículo (0) durante 3 h, sus extractos proteicos fueron sometidos a ensayos de Western blots usando anticuerpos anti-KLF6 y anti- $\beta$ -actina y revelados mediante quimioluminiscencia.

Posteriormente, células JEG-3 se transfectaron con siARN dirigido contra KLF6 (siKLF6) o con SCB y luego de 24 h se expusieron a 50  $\mu$ M de CPF durante 3 o 48 h. En las células tratadas con SCB se detectó el patrón de bandas característico para la proteína KLF6 y el incremento en la intensidad de las mismas a las 3 h de exposición a CPF. En cambio, en las células transfectadas con siKLF6 no se observó el aumento inducido por CPF y la expresión de KLF6 se mantuvo disminuida inclusive luego de 48 h de tratamiento (Fig. 34).



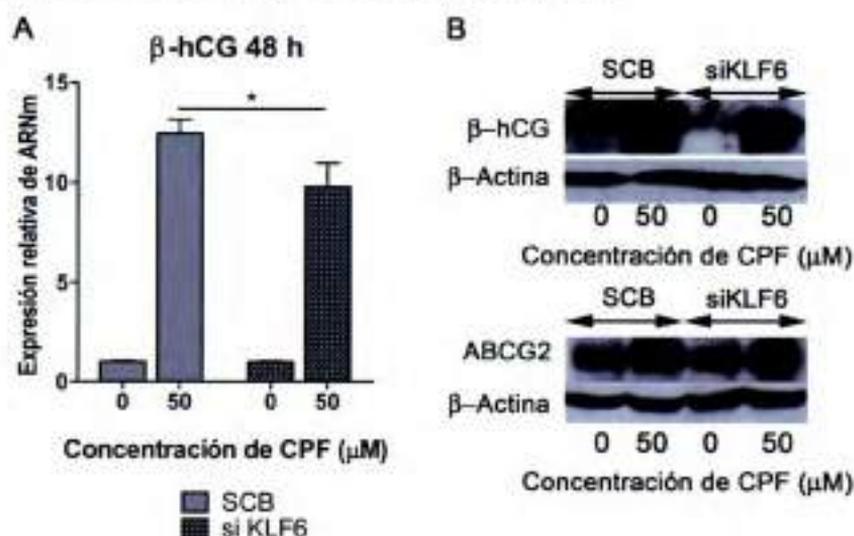
**Fig. 34. Niveles proteicos de KLF6 en células silenciadas y expuestas a CPF.** Células JEG-3 fueron transfectadas con 25 nM de siKLF6 o SCB y luego expuestas a 0 ó 50  $\mu$ M de CPF durante 3 o 48 h, sus extractos proteicos fueron sometidos a ensayos de Western blots usando anticuerpos anti-KLF6 y anti- $\beta$ -actina y revelados mediante quimioluminiscencia.

El silenciamiento de la expresión de KLF6 no alteró la viabilidad celular (Fig. 35 A y B) ni la sensibilidad de las células JEG-3 a la citotoxicidad de CPF (Fig. 35 B).



**Fig. 35. Viabilidad de células JEG-3 silenciadas para KLF6.** (A) Imágenes representativas de tinciones con NA y BE realizadas sobre células JEG-3 transfectedas con siKLF6 o con SCB durante 48 h. Magnificación original 400X. Escala de barra = 10  $\mu$ m. (B) Valor Medio  $\pm$  DE de un ensayo de MTT realizado en cuatruplicado sobre células JEG-3 silenciadas para KLF6 durante 24 h y posteriormente expuestas a las dosis de CPF indicadas durante 48 h. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni y se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*).

Finalmente se procedió a evaluar la consecuencia del silenciamiento de KLF6 sobre los niveles de expresión de  $\beta$ -hCG y ABCG2 inducidos por CPF.



**Fig. 36. Niveles de  $\beta$ -hCG y ABCG2 en células JEG-3 silenciadas para KLF6 y expuestas a CPF.** Células JEG-3 se transfectoron con 25 nM de siKLF6 o SCB, se cultivaron 24 h, y posteriormente se expusieron a 0 ó 50  $\mu$ M de CPF durante 48 h. (A) Gráfico representativo de niveles de ARNm de  $\beta$ -hCG relativos a los controles (0), medidos por qRT-PCR. Los resultados se normalizaron usando ciclofilina A, se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni, considerando un  $p < 0,05$  como estadísticamente diferente (\*). (B) Western blots realizados con anticuerpos anti- $\beta$ -hCG, anti-ABCG2 y anti- $\beta$ -actina y revelados mediante quimioluminiscencia.

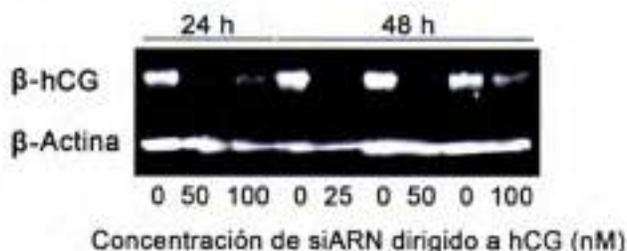
Como se observa en las figuras anteriores (Fig. 36 A y B), CPF incrementó los niveles de ARNm y proteína  $\beta$ -hCG tanto cuando las células fueron transfectedas con siKLF6 como con SCB. Sin embargo, la magnitud del incremento en los niveles de transcritos de  $\beta$ -hCG

fue menor cuando KLF6 se encontraba silenciado (Fig. 36 A). Si bien son preliminares, estos resultados sugieren que KLF6 contribuiría con la inducción de la expresión de  $\beta$ -hCG generada por CPF, aunque el aumento de su expresión no es indispensable para que se dispare el aumento de  $\beta$ -hCG. Cabe citar también que las células control (no expuestas a CPF) presentaron niveles basales de  $\beta$ -hCG menores cuando KLF6 estaba silenciado (Fig. 36 B), como es de esperar por los antecedentes citados (Racca et al. 2011).

Los niveles proteicos de ABCG2 incrementaron en presencia de CPF, en las condiciones evaluadas, de manera independiente de la expresión basal de KLF6 (Fig. 36 B), sugiriendo que este factor de transcripción no estaría participando en su inducción.

#### 4.4. Rol de $\beta$ -hCG en la viabilidad celular y homeostasis redox

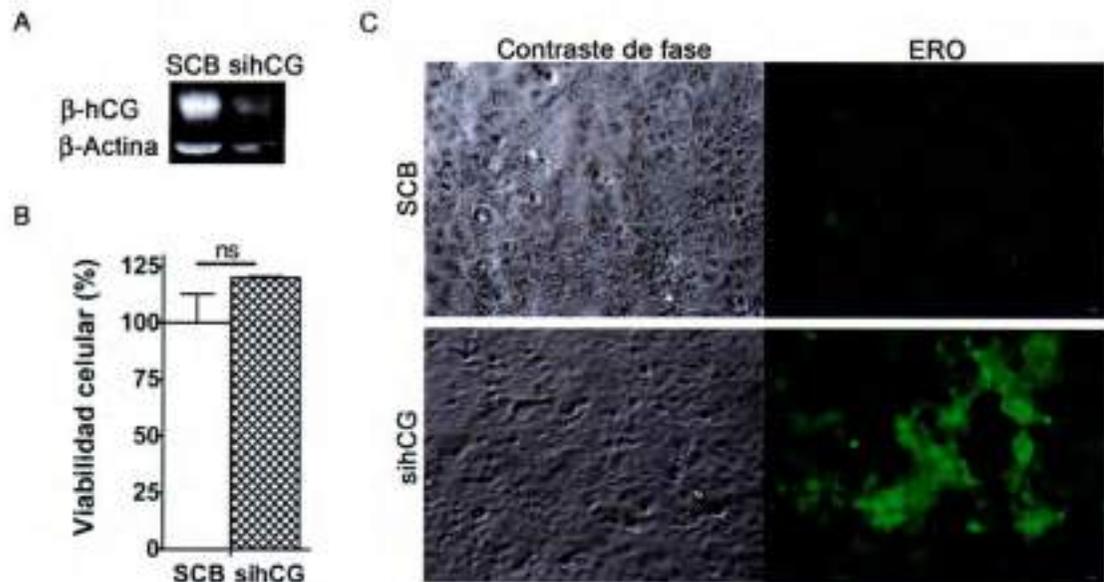
Como se mencionó, CPF genera un aumento de EROs en células JEG-3 y estas responden activando mecanismos de defensa antioxidante que restaurarían la homeostasis redox (Chiapella et al. 2013). Por otra parte, se ha reportado que hCG podría ejercer un efecto protector frente al estrés oxidativo en células del estroma endometrial y en la placenta (Kajihara et al. 2011; Kharfi Aris et al. 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la participación de  $\beta$ -hCG en la homeostasis redox y el mantenimiento de la viabilidad celular. A tal fin se realizaron ensayos de silenciamiento génico con un siARN específico para el gen  $\beta$ -hCG (sihCG). Mediante ensayos de Western Blot se comprobó la disminución en los niveles de la proteína  $\beta$ -hCG en todas las concentraciones y tiempos ensayados (Fig. 37).



**Fig. 37. Silenciamiento de  $\beta$ -hCG.** Células JEG-3 se transfectaron con las concentraciones indicadas de sihCG o con SCB (0) y se cultivaron durante 24 o 48 h. Los extractos proteicos se analizaron en ensayos de Western blots con anticuerpos anti- $\beta$ -hCG y anti- $\beta$ -actina, revelados con anticuerpos secundarios fluorescentes.

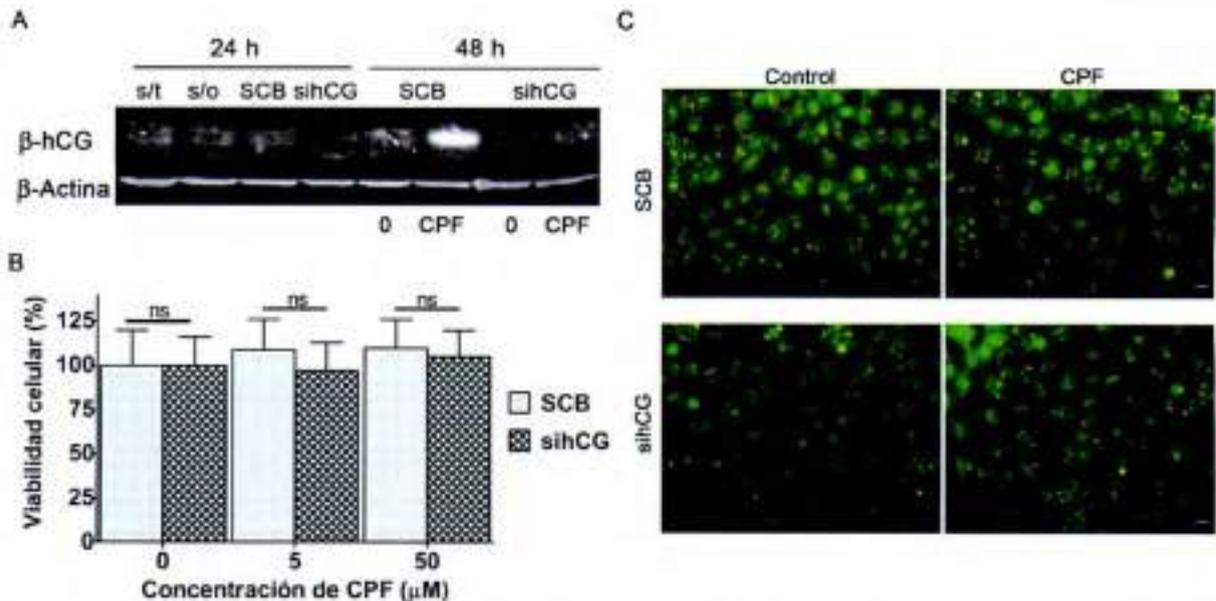
Para los ensayos siguientes se eligió una concentración de 50 nM del sihCG y se verificó que los niveles de  $\beta$ -hCG se mantenían silenciados hasta las 96 h de cultivo (Fig. 38

A). En estas condiciones, se determinó la viabilidad celular y la generación de ERO. Si bien la viabilidad celular no se afectó en las células carentes de  $\beta$ -hCG (Fig. 38 B), los niveles basales de EROs se encontraron notablemente incrementados (Fig. 38 C), sugiriendo la participación de esta hormona en la homeostasis redox.



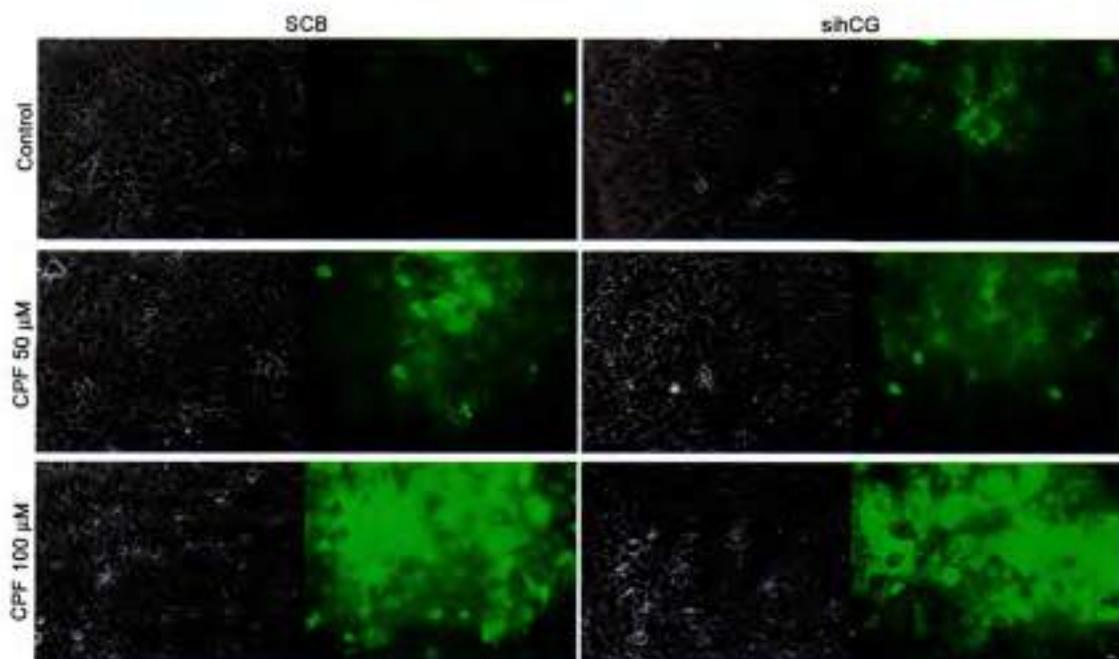
**Fig. 38. Rol de  $\beta$ -hCG en la viabilidad y homeostasis redox de las células JEG-3.** Los cultivos se transfectaron con 50 nM de sihCG o con SCB durante 96 h. (A) El silenciamiento de la proteína se verificó mediante ensayos de Western blots realizados con anticuerpos anti- $\beta$ -hCG y anti- $\beta$ -actina y revelados con anticuerpos secundarios fluorescentes. (B) Valor Medio  $\pm$  DE de un ensayo de MTT realizado por cuadruplicado. Los datos se analizaron mediante el test t de dos colas y se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*). (C) Imágenes representativas de la detección de EROs por microscopía utilizando la sonda fluorescente  $H_2DCFDA$  (verde) y sus correspondientes fotografías de contraste de fase. Magnificación original 200X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

Posteriormente, se analizó el impacto del silenciamiento de  $\beta$ -hCG en células expuestas a CPF. Para ello, 24 h luego de la transfección con el sihCG, las células se expusieron a CPF durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT y tinción vital con NA y BE. En las muestras tratadas con el sihCG, se verificó la disminución de los niveles proteicos basales de  $\beta$ -hCG tanto a las 24 h como a las 48 h; mientras que en las células tratadas con 50  $\mu$ M de CPF y con el sihCG se observó una marcada reducción en la inducción de  $\beta$ -hCG (Fig. 39 A). Sin embargo, la viabilidad celular no se modificó en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 39 B y C). Es decir, en células JEG-3 expuestas a concentraciones de hasta 50  $\mu$ M de CPF, durante 24 h, la viabilidad celular no se ve comprometida si se impide el aumento en la expresión de  $\beta$ -hCG inducido por CPF.



**Fig. 39. Viabilidad celular en JEG-3 silenciadas para  $\beta$ -hCG y expuestas a CPF.** (A) Western blots de extractos de células obtenidos después de 24 h de transfección con 50 nM sihCG, o con siARN control (SCB), o sin siARN (s/o), o sin transfectar (s/t); o de extractos obtenidos 48 h después de transfectarlas con sihCG o SCB y de tratarlas durante las últimas 24 h, con 50  $\mu$ M CPF o su vehículo (0). Se utilizaron anticuerpos anti- $\beta$ -hCG y anti- $\beta$ -actina y se revelaron con anticuerpos secundarios fluorescentes. (B) Valor Medio  $\pm$  DE de un ensayo de MTT realizado por cuadruplicado en muestras transfectadas con SCB o 50 nM sihCG y tratadas con las concentraciones indicadas de CPF. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni y se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  (\*). (C) Imágenes representativas de tinciones con NA (verde) y BE (rojo) en muestras transfectadas con sihCG o SCB y tratadas con 50  $\mu$ M CPF o su vehículo (control). Magnificación original 400X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

Finalmente, las células se silenciaron con el sihCG o se trataron con el siARN control (SCB) y luego de 48 h se expusieron a CPF o al diluyente (control) durante 3 h al cabo de las cuales se determinó la generación de EROs utilizando la sonda  $H_2DCFDA$ . En coincidencia con lo reportado previamente (Chiapella et al. 2013), las células tratadas con CPF mostraron un incremento en la generación de EROs comparado con las células en la condición control. Sin embargo, en las células transfectadas con siARN específico para  $\beta$ -hCG y expuestas a CPF se alcanzaron niveles de EROs similares a los observados en las células transfectadas con SCB y CPF (Fig. 40).



**Fig. 40. EROs en células JEG-3 silenciadas para  $\beta$ -hCG y expuestas a CPF.** Los cultivos se transfectaron con 50 nM de sihCG o con SCB en cantidad equivalente durante 48 h y luego se expusieron a 0 (Control), 50 ó 100  $\mu$ M de CPF durante 3 h. Se muestran imágenes representativas de la medición de EROs utilizando la sonda fluorescente  $H_2DCFDA$  (verde) y sus correspondientes fotografías de contraste de fase. Magnificación original 200X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

#### 4.5. Conclusiones CAPITULO IV

CPF produce EROs en las células JEG-3 (Chiapella et al. 2013). La expresión de  $\beta$ -hCG es activada por  $H_2O_2$  sugiriendo que su aumento inducido por CPF podría estar mediado por las EROs. En concordancia con ello, el antioxidante NAC revirtió parcialmente el aumento de  $\beta$ -hCG generado por CPF en estas células.

CPF desencadena una respuesta antioxidante, aumenta la expresión del factor de transcripción Nrf2 e induce su traslocación al núcleo (Chiapella et al. 2013). Sin embargo, este factor no estaría mediando el aumento de  $\beta$ -hCG y ABCG2 generado por CPF en las células JEG-3, aunque sí la transcripción basal de este último. Resultados preliminares indicarían su participación en la sobrevida de las células frente al tóxico estudiado.

Como fue reportado, el factor de transcripción KLF6 regula los niveles basales de  $\beta$ -hCG (Racca et al. 2011) y, aunque no es necesario, colabora con la inducción de su expresión frente a CPF. Además, no modifica la resistencia a la citotoxicidad en las células frente a CPF.

Finalmente,  $\beta$ -hCG no sería necesaria para la sobrevida de las células JEG-3 en ausencia o presencia de CPF en las condiciones estudiadas, pero participaría en la homeostasis redox de este sistema celular.

## RESULTADOS: CAPÍTULO V

### 5. Efectos de CPF sobre las vellosidades coriónicas

Hasta aquí hemos demostrado que los trofoblastos vellosos son resistentes a la citotoxicidad de CPF en las condiciones evaluadas. Frente al tóxico, estas células aumentan la cantidad de transportadores de eflujo de xenobióticos y refuerzan su respuesta antioxidante, sugiriendo que activan mecanismos de protección que permitirían mantener su integridad.

Los trofoblastos vellosos forman el epitelio de las vellosidades coriónicas, donde se encuentran también la matriz intravellositaria y las demás células del tejido conectivo, células inmunes y vasos sanguíneos fetales. A fin de evaluar el comportamiento de los trofoblastos en el contexto de la vellosidad coriónica y detectar células o zonas potencialmente más sensibles a los efectos de CPF, se analizaron las características histológicas de explantos de vellosidades coriónicas expuestos a CPF *in vitro*.

#### 5.1. Evaluación mediante Microscopía Óptica

Los explantos obtenidos a partir de placentas humanas a término se cultivaron 36 h en presencia o no de CPF en dosis de 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se fijaron, incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos aptos para realizar tinciones e inmunofluorescencias sobre los mismos. Este abordaje puede ser realizado gracias a la colaboración establecida con el laboratorio dirigido por el Dr. Ricardo Fretes en el Departamento de Biología Celular, Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

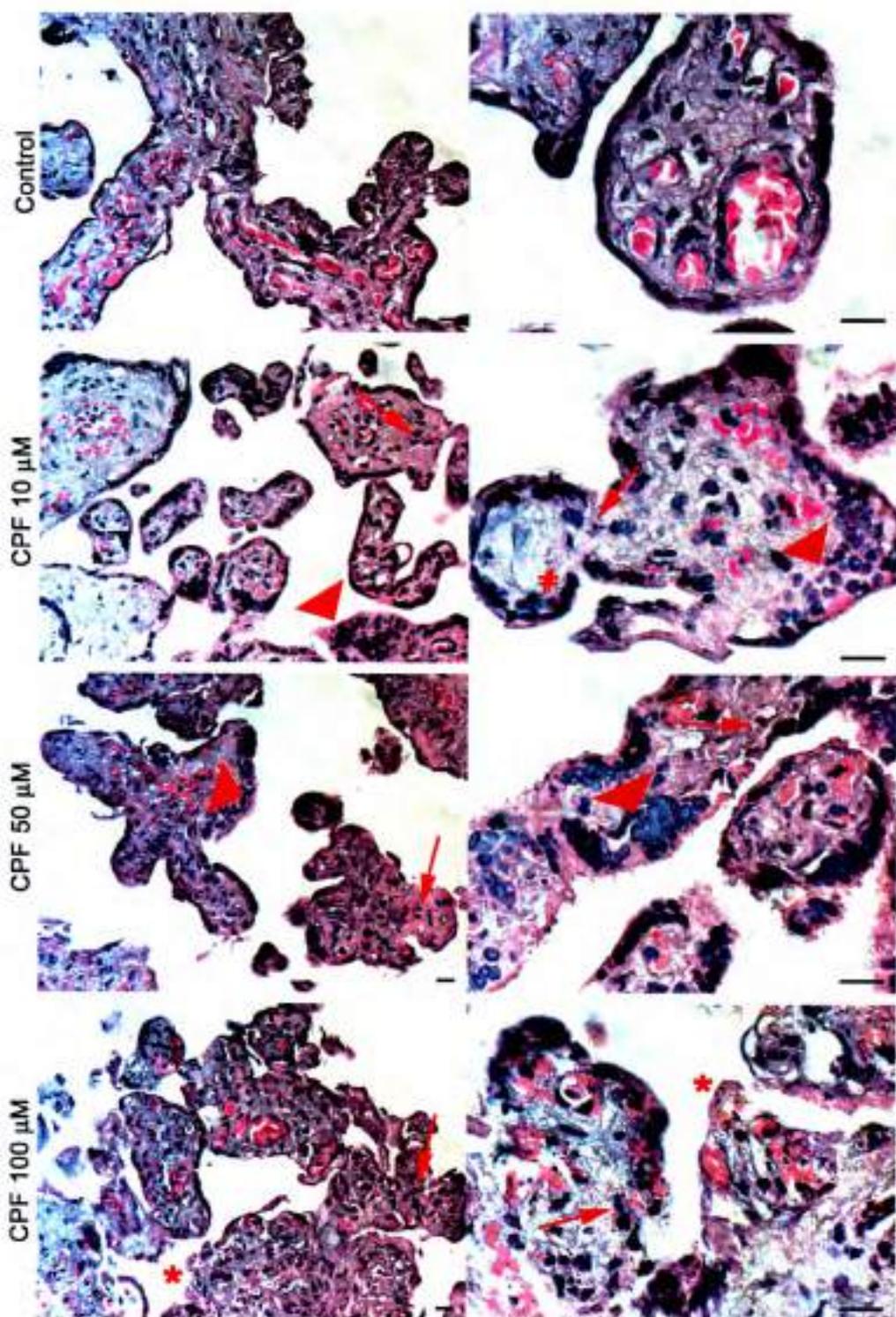
Inicialmente se realizaron tinciones con He-Eo y se analizó el impacto de CPF sobre la estructura vellositaria mediante su observación en el microscopio óptico.

Las muestras expuestas a concentraciones bajas de CPF (5 y 10  $\mu\text{M}$ ), mostraron una estructura vellositaria conservada con su núcleo central de mesénquima (en el cual se observan los vasos sanguíneos fetales), rodeado por la capa epitelial externa formada por el STB multinucleado, de manera similar al control. Sin embargo, algunos núcleos del STB presentaron alteraciones en su forma y tamaño, tendientes a la verticalización y con una cromatina más laxa que en la situación control. Además se observaron núcleos en bicapa o

en rosario e incluso algunos acúmulos dentro del STB. El patrón de tinción de la matriz intravellositaria también mostró cambios respecto a los explantos control y se observaron núcleos estromales con características apoptóticas (Fig. 41).

Si bien en las figuras presentadas se muestra el Control con DMSO (solvente de CPF) en cantidad equivalente a la que contienen los cultivos con la dosis más elevada del tóxico, se realizaron controles con cantidad de DMSO equivalente a cada una de las concentraciones de CPF empleadas. Todos los controles realizados fueron aceptables, con morfología similar a la condición control sin vehículo.

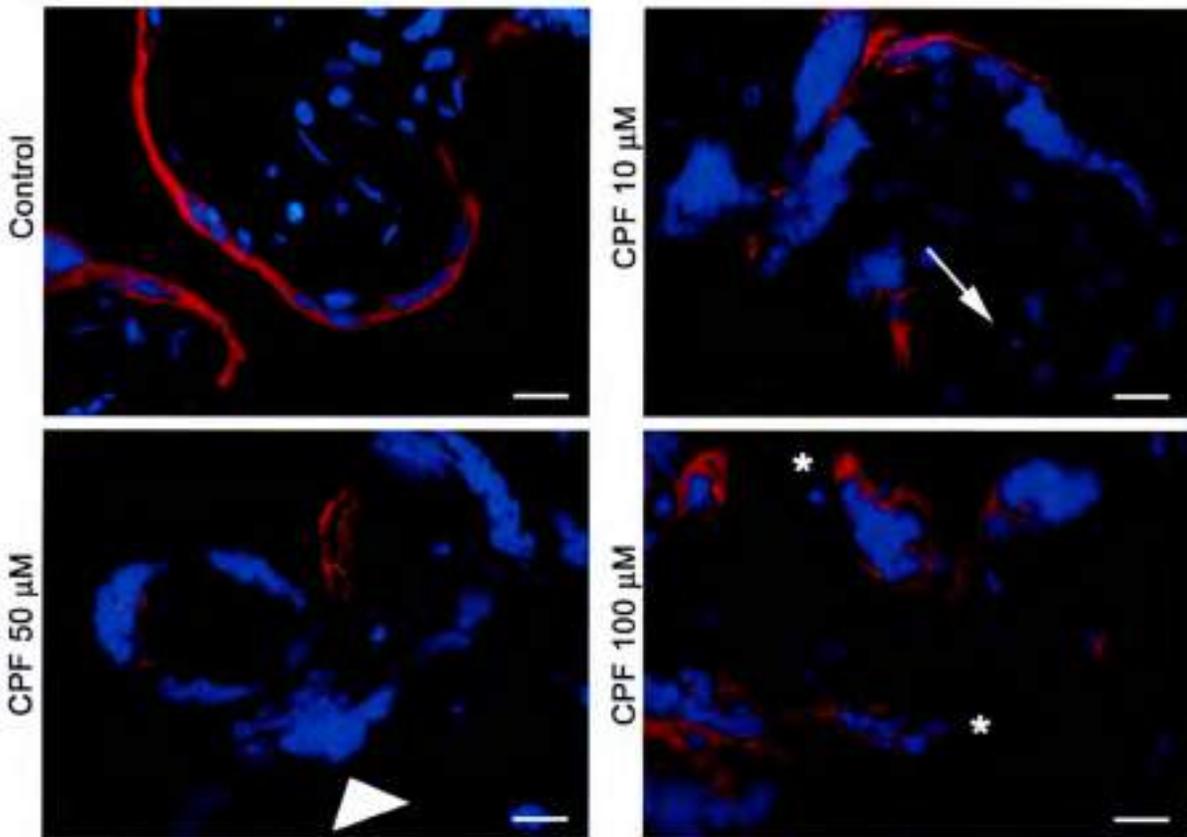
Las alteraciones del STB y del estroma intravellositario se incrementaron al tratar los explantos con dosis más elevadas de CPF (50 y 100  $\mu\text{M}$ ). En estas condiciones, se observó un aumento en la cantidad y tamaño de los acúmulos de núcleos anormales, así como, en la cantidad de células con núcleos alterados en el estroma. Además se observaron signos de muerte celular por necrosis principalmente en el STB e incluso algunas zonas parecían estar desprovistas del epitelio sincicial, mostrando una marcada alteración en la estructura de la barrera placentaria (Fig. 41).



**Fig. 41. Efecto de CPF sobre la estructura vellositaria.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a CPF o su vehículo (Control) en las dosis indicadas durante 36 h. Luego de su fijación, inclusión en parafina y cortes con micrótopo se realizaron tinciones con He-Eo. Se muestran imágenes representativas del análisis morfológico realizado en 5 experimentos independientes provenientes de placentas diferentes. Se señalan ejemplos de las siguientes alteraciones: núcleos estromales con características apoptóticas (Flechas); acúmulos de núcleos anormales (Puntas de flecha); núcleos en bicapa con alteraciones cromatinicas (#); núcleos en rosario (+); zona desprovista de STB con signos de necrosis tisular (\*). Magnificación original 400X (izquierda) y 1000X (derecha). Escala de barra = 10 µm.

A fin de profundizar en el análisis de las alteraciones observadas en la barrera placentaria, se realizaron inmunofluorescencias con anti-citoqueratina 7 (marcador de células trofoblásticas (Yagel et al. 1989)) junto con marcaciones nucleares con Hoechst. Previamente, se realizó la puesta a punto de la marcación, en la cual se realizaron los controles negativos correspondientes a fin de corroborar que la marca observada era de la proteína de interés. Como se observa en la Fig. 42, en la situación Control, la marcación de citoqueratina 7 se encuentra delimitando claramente el borde trofoblástico de la vellosidad coriónica. En cambio, en los explantos expuestos a CPF se observó un cambio en el patrón de tinción, una disminución de la marca y la pérdida completa de la misma en algunas zonas de las vellosidades de las muestras expuestas a las concentraciones más altas del pesticida, evidenciando la alteración en dicha barrera que generó este tóxico. Las tinciones con Hoechst permitieron observar claramente las alteraciones nucleares que generó CPF en las vellosidades coriónicas, caracterizadas por la presencia de núcleos picnóticos y fragmentados en el interior de las vellosidades y acúmulos de núcleos anormales en la zona del STB, como así también la verticalización y cromatina nuclear más laxa.



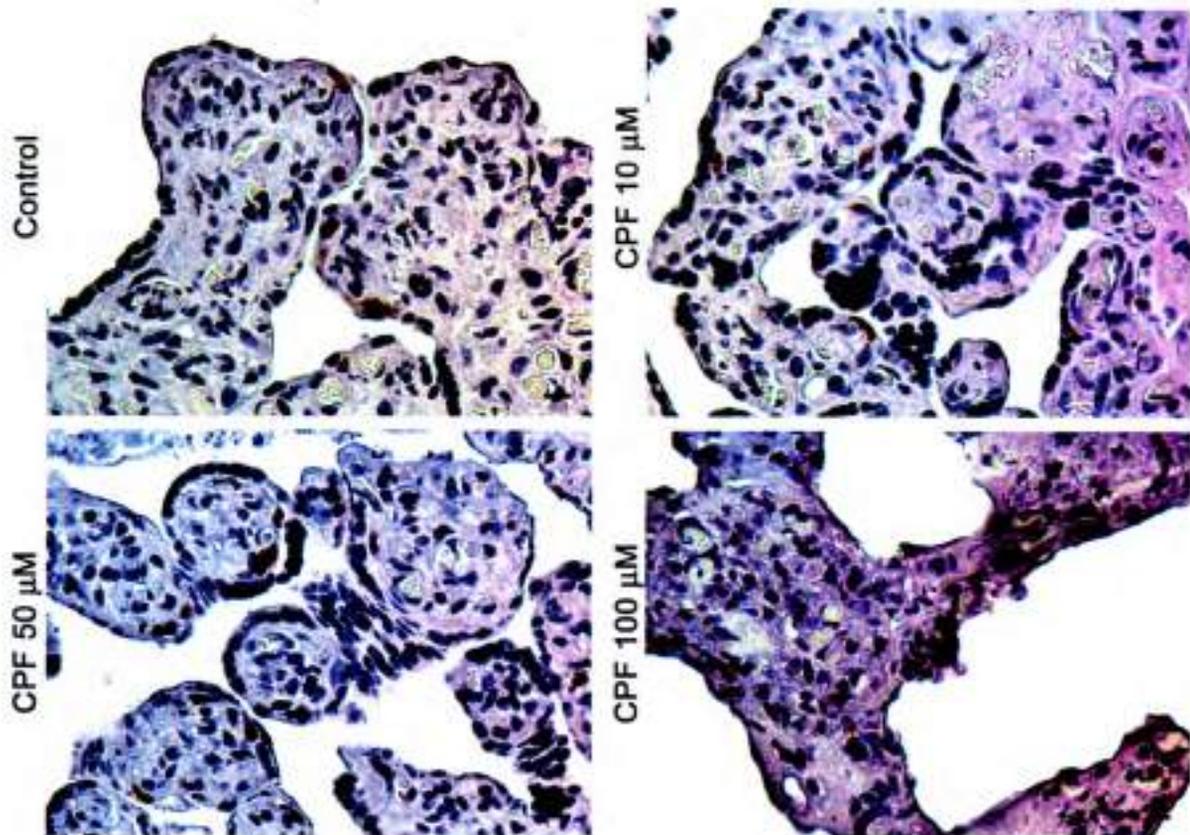


**Fig. 42. Efecto de CPF sobre la barrera trofoblástica y morfología nuclear.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a CPF o su vehículo (Control) en las dosis indicadas durante 36 h. Luego de su fijación, inclusión en parafina y cortes con micrótopo se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti-citoqueratina 7 (rojo) y tinciones nucleares con Hoechst (azul). Se muestran ejemplos de: núcleos picnóticos y fragmentados (Flecha); acúmulos de núcleos anormales en la zona del STB (Punta de Flecha); desorganización del epitelio sincicial (\*). Se observan imágenes representativas de dos inmunofluorescencias y cuatro marcaciones nucleares realizadas en experimentos independientes sobre placentas diferentes. Magnificación original 1000X. Escala de barra = 10 µm.

Los acúmulos de núcleos presentes en los explantos expuestos a CPF podrían ser consecuencia de la proliferación descontrolada de algunas células o de una reorganización en la estructura de la vellosidad. Para evaluar si CPF induce un aumento en la proliferación celular se realizaron inmunohistoquímicas para ki-67. Esta proteína nuclear se encuentra durante todas las fases del ciclo celular (G1, S y G2) pero está ausente en células arrestadas (G0).

En placentas normales a término existe un bajo porcentaje de células en proliferación (Arnholdt et al. 1991). De hecho, en los explantos cultivados en ausencia de CPF solo se detectaron algunas células ki-67 positivas. En los explantos expuestos al pesticida no se encontró un incremento significativo en el número de células positivas, sugiriendo que los

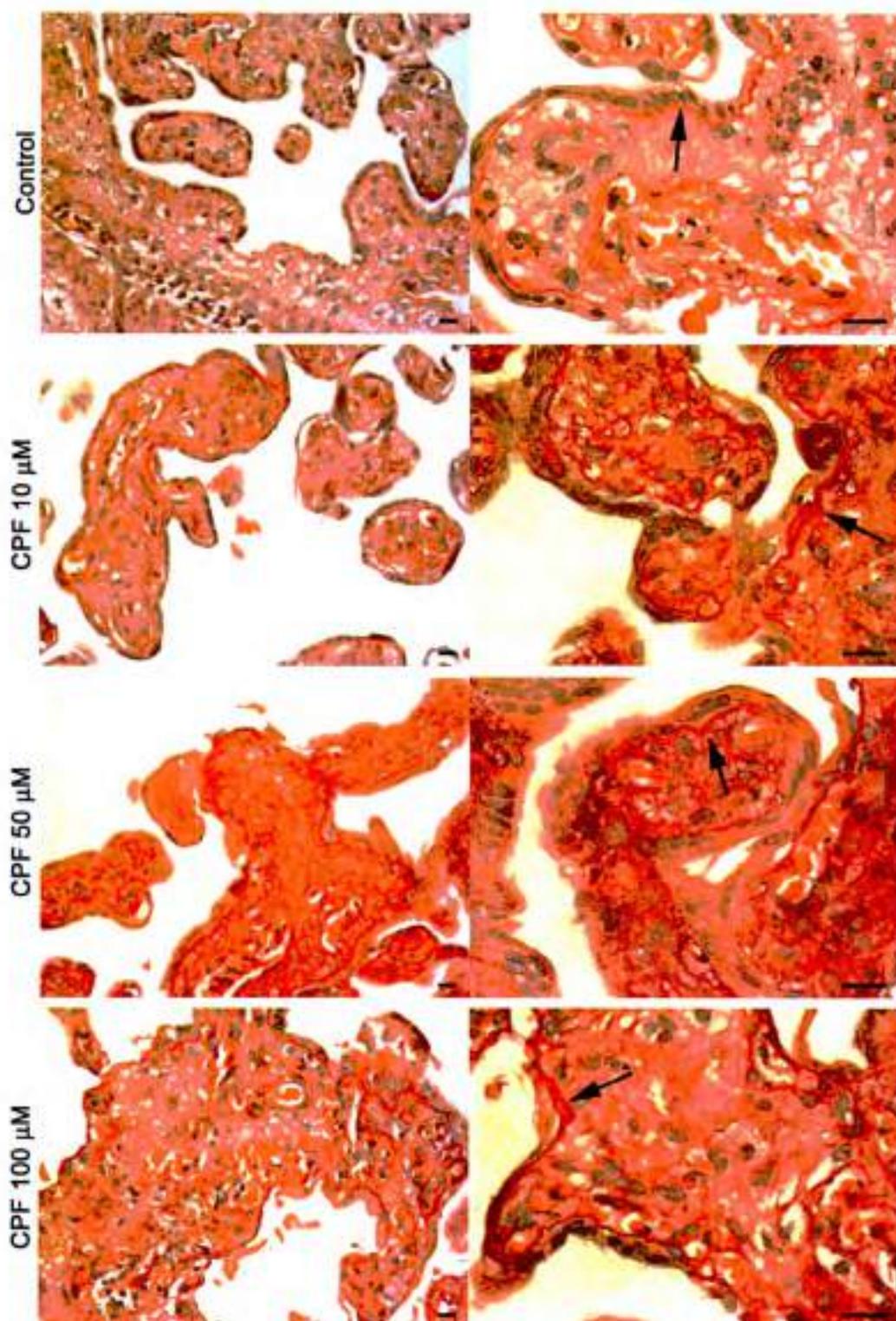
acúmulos nucleares se deben fundamentalmente a un reordenamiento de los núcleos ya presentes en la vellosidad (Fig. 43). Además, en los explantos tratados con la mayor dosis de CPF hubo una disminución en el número de células ki-67 positivas, lo cual es compatible con el aumento de muerte celular observado morfológicamente (Fig. 43 y 41).



**Fig. 43. Efecto de CPF sobre la proliferación celular.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a CPF o su vehículo (Control) en las dosis indicadas durante 36 h. Luego de su fijación, inclusión en parafina y cortes con micrótomo se realizaron inmunohistoquímicas con anticuerpos anti-ki67 (marrón) y contra coloración con He (azul). Se observan imágenes representativas. Magnificación original 400X. Escala de barra = 10  $\mu$ m.

Posteriormente se realizó una tinción con PAS. Esta marcación revela componentes celulares que contienen hidratos de carbono, presentes en las vellosidades principalmente en la membrana basal del STB y de los vasos sanguíneos, tal como se observa en la condición control (Fig. 44).

La marcación con PAS reveló un ensanchamiento de la membrana basal trofoblástica en los explantos expuestos a CPF, principalmente en donde el STB presenta alteraciones morfológicas. Además en el estroma se observó un aumento en los hidratos de carbono reactivos para esta tinción, revelando una modificación en la composición de la matriz de la vellosidad (Fig. 44).

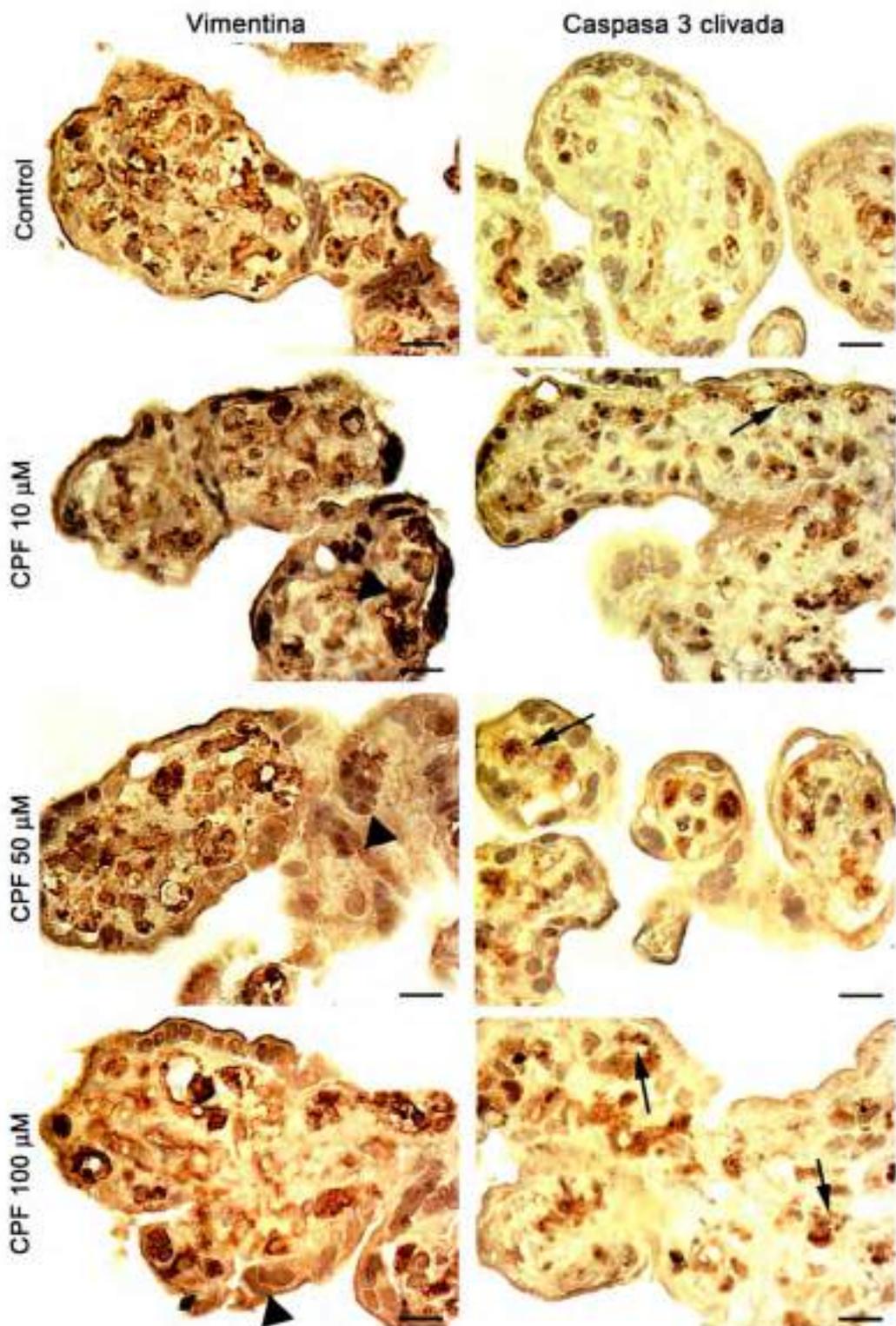


**Fig. 44. Tinción con PAS.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a CPF o su vehículo (Control) en las dosis indicadas durante 36 h. Luego de su fijación, inclusión en parafina y cortes con micrótopo se realizaron tinciones con PAS (magenta) y contra coloración con He (azul). Se observan imágenes representativas. Las Flechas muestran la membrana basal trofoblástica y su engrosamiento en las muestras expuestas a CPF. Magnificación original 400X (izquierda) y 1000X (derecha). Escala de barra = 10 µm.

A fin de profundizar en la descripción de los cambios observados en el estroma vellositario en presencia de CPF, se realizaron inmunohistoquímicas usando anticuerpos anti-vimentina, que marca las células mesenquimales (Blaschitz et al. 2000), y anti-caspasa 3 clivada para revelar células apoptóticas. Para ambas marcaciones se realizaron controles negativos, en los cuales no se colocó el anticuerpo primario, demostrando que la tinción presentada sólo representa a las proteínas de interés (datos no mostrados).

Como era esperado, casi la totalidad de las células del interior de la vellosidad coriónica fueron positivas para la marcación con vimentina, no así el STB en un todo de acuerdo con el origen epitelial de este último. Las imágenes de los ensayos de inmunohistoquímica no revelaron cambios en la marcación de esta proteína en los explantos expuestos a CPF en comparación con los controles. Además, permitieron confirmar que los cúmulos de núcleos generados por CPF no corresponden a células de origen mesenquimal, sino epitelial (Fig. 45, panel izquierdo). Estos resultados, junto con las observaciones realizadas mediante tinción con PAS sugieren que las alteraciones observadas morfológicamente en el interior de la vellosidad coriónica son principalmente debidas a cambios en la composición de la matriz estromal.

La inmunohistoquímica realizada usando el anticuerpo anti-caspasa 3 clivada confirmó la existencia de células apoptóticas (con núcleos fragmentados) en el estroma intravellositario, ya que los núcleos con dichas características fueron positivos para esta marcación (Fig. 45, panel derecho). CPF indujo un incremento de células que presentaban caspasa 3 clivada en el interior de la vellosidad, la mayoría de las cuales se encontraron en la zona más cercana a la membrana basal del epitelio trofoblástico, sugiriendo que se trataría de células mesenquimales más indiferenciadas (Ver Introducción sección 1.3).

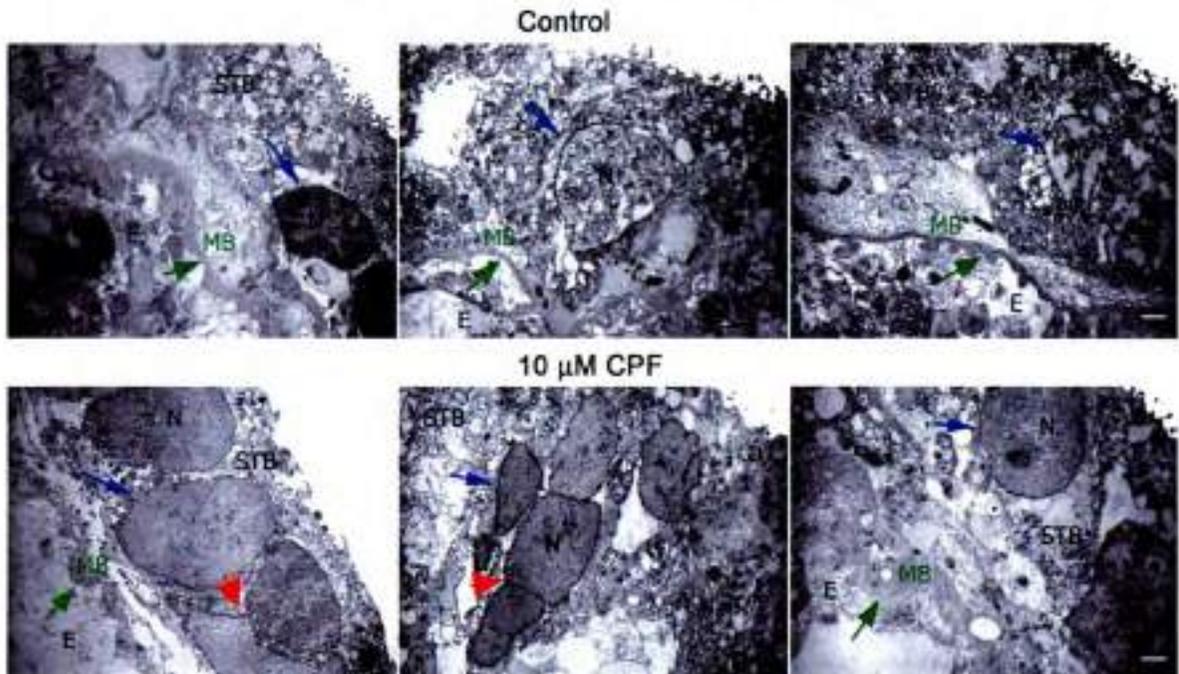


**Fig. 45. Inmunomarcaciones de Vimentina y Caspasa 3 clivada.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a CPF o su vehículo (Control) en las dosis indicadas durante 36 h. Luego de su fijación, inclusión en parafina y cortes con micrótopo se realizaron inmunohistoquímicas usando anticuerpos anti-vimentina (marrón panel izquierdo) y anti-caspasa 3 clivada (marrón panel derecha), junto con la contra coloración con He (azul). Se muestran imágenes representativas. Las Puntas de Flecha señalan cúmulos de núcleos en el STB vimentina-negativos; las Flechas indican células caspasa 3 clivada-positivas. Magnificación 1000X. Escala de barra = 10  $\mu\text{m}$ .

## 5.2. Evaluación utilizando Microscopía Electrónica

Finalmente, se realizó un estudio mediante microscopía electrónica a fin de describir con más detalle las alteraciones observadas sobre los explantos de placentas humanas a término expuestos *in vitro* a CPF en concentraciones bajas.

Las alteraciones ultraestructurales más preponderantes causadas por la exposición a 10  $\mu\text{M}$  de CPF se observaron a nivel de la capa de STB. Se corroboró la presencia de núcleos verticalizados, con cromatina más laxa respecto a la condición control (Fig. 46 Flechas azules) y dispuestos en bicapa o en acúmulos anormales (Fig. 46 Flechas rojas). Además, en concordancia con lo observado mediante la tinción con PAS, se observó un engrosamiento de la membrana basal del STB en los explantos expuestos a CPF (Fig. 46 Flechas verdes).



**Fig. 46. Microscopías electrónicas de explantos placentarios expuestos *in vitro* a 10  $\mu\text{M}$  de CPF.** Explantos de placentas normales a término se cultivaron 8 h y se expusieron a 10  $\mu\text{M}$  de CPF o su vehículo (Control: 0.004% DMSO) durante 36 h; posteriormente fueron analizados ultraestructuralmente a través de microscopía electrónica. Se muestran imágenes representativas: Núcleos del STB (Flechas azules: N), Membrana basal del STB (Flechas verdes: MB), alteraciones en la disposición nuclear dentro del STB (Flechas rojas) y estroma intravellositario (E). Magnificación original 6000X. Escala de barra = 1  $\mu\text{m}$ .

## 5.3. Conclusiones CAPÍTULO V

Explantos vellosos de placentas normales a término expuestos a CPF *in vitro* durante 36 h, presentaron notables alteraciones estructurales y ultraestructurales.

Dosis bajas de CPF (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) generaron modificaciones en la forma, condensación cromatinica y disposición nuclear del STB, engrosamiento de la membrana basal del mismo, cambios en la composición de la matriz intravellositaria y aumento del número de células estromales con núcleos apoptóticos.

A dosis altas de CPF (50 y 100  $\mu\text{M}$ ) aumentaron todas las alteraciones vellositarias anteriores, impactando notablemente en la estructura de la barrera placentaria. Además, el STB presentó zonas con acúmulos de núcleos, no generados por proliferación celular sino por cambios en su disposición, y zonas carentes de células citoqueratina 7 positivas, con cambios morfológicos compatibles con necrosis.

# CONCLUSIÓN GENERAL

## CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que los trofoblastos vellosos poseen mecanismos de resistencia a la citotoxicidad por CPF. Esto se demostró ya que no sólo las líneas celulares trofoblásticas mantuvieron su viabilidad frente a las dosis del pesticida evaluadas, sino más importante aún, los CTBv purificados de placentas humanas permanecieron viables y diferenciaron a estructuras tipo STB en presencia del tóxico en todas las situaciones evaluadas. Entre los mecanismos de resistencia asociados se pueden incluir, además de la respuesta antioxidante desencadenada, el aumento en los transportadores de eflujo ABCG2 y P-gp y, posiblemente, al incremento de la producción de  $\beta$ -hCG a fin de intentar mantener la homeostasis rédox. Sin embargo, pese a la respuesta de defensa que presentaron los trofoblastos aislados expuestos a CPF, dosis equivalentes del pesticida produjeron alteraciones marcadas en las vellosidades coriónicas provenientes de las mismas placentas. Explantos vellosos expuestos *in vitro* presentaron daños histológicos a nivel de la composición del estroma intravellositario, donde además incrementó la cantidad de células apoptóticas. En el epitelio trofoblástico, CPF alteró la disposición y morfología nuclear e indujo el engrosamiento de su membrana basal. Además, a dosis elevadas se observó una desorganización vellositaria marcada con alteraciones morfológicas compatibles con necrosis tisular. Estos resultados sugieren que existirían mediadores no trofoblásticos, celulares o no, dentro de la vellosidad coriónica, que serían más sensibles a CPF y podrían desencadenar las alteraciones de la barrera trofoblástica.

Por otro lado, también se observó que a dosis elevadas los CTBv serían más sensibles que los CTBv y, que cuando éstos mantienen su viabilidad, CPF no altera su proliferación, migración ni invasión, pero modifica la expresión de genes con roles importantes en estas células.

En conjunto, estas observaciones podrían explicar, al menos en parte, la asociación entre la exposición a pesticidas OP y las alteraciones en el embarazo reportadas, e incentivan a estudiar cuáles son los actores vellositarios y mediante qué mecanismos permiten que CPF genere daño en la barrera trofoblástica pese a la resistencia que los trofoblastos aislados poseen por sí mismos frente a este tóxico.

# DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

La formación de la placenta y su correcto funcionamiento es vital para el mantenimiento del embarazo y el desarrollo del individuo que se está gestando junto con ella. Alteraciones en este órgano se asocian a la aparición de patologías del embarazo, y también contribuyen al desarrollo de enfermedades en la vida adulta del hijo (Guttmacher et al. 2014; Rogers y Velten 2011). Durante años la placenta ha sido considerada como una barrera más bien pasiva e inerte que protege al feto de algunos compuestos tóxicos permitiendo la llegada de otros. Posteriormente, se demostró que participa en la transferencia activa y en la biotransformación de drogas y xenobióticos, determinando el nivel de exposición del individuo en gestación a tóxicos (Myllynen y Vahakangas 2013). Además, representa una matriz adecuada para evaluar la exposición intrauterina (Prouillac y Lecoeur 2010). Más aún, el delicado balance de interacciones entre programas endógenos de expresión génica y señales externas que participan en la formación y función de la placenta, puede ser modulado por contaminantes ambientales (Gupta 2012). En este sentido, la comprensión del impacto toxicológico y los cambios que ocurren en la misma como consecuencia de la exposición a drogas durante el embarazo, es un aspecto muy importante en la evaluación del riesgo que implica para la salud materno-fetal.

Los plaguicidas OP constituyen una clase importante de químicos contaminantes del medio ambiente. Luego de la disminución en el empleo de los OC debido a sus conocidos efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente, así como a su elevada persistencia, los OP se han convertido en los pesticidas de mayor uso en la actualidad (Elersek y Filipic 2011). Diversos estudios epidemiológicos han evaluado la asociación entre la exposición a OP durante la vida intrauterina y la aparición de alteraciones en el desarrollo fetal y en procesos cognitivos en niños, indicando que existe una asociación negativa entre la exposición prenatal y el neurodesarrollo y comportamiento en niños de edad escolar (Gonzalez-Alzaga et al. 2014). Otros, han reportado una disminución en el tiempo de gestación (Eskenazi et al. 2004), la talla, el peso y la circunferencia de la cabeza del neonato (Berkowitz et al. 2004; Perera et al. 2003; Whyatt et al. 2004). Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos directos que producen los pesticidas OP sobre el tejido placentario y de cómo reaccionan las células trofoblásticas ante su presencia.

En este trabajo de Tesis Doctoral se propuso evaluar la respuesta de la placenta humana frente a la exposición al pesticida CPF. Este tóxico es un OP convencional ampliamente utilizado para controlar gran variedad de plagas en la agricultura y los animales de granja (Xing et al. 2015) y ha sido frecuentemente utilizado como compuesto modelo para determinar los efectos de OP (Foxenberg et al. 2011). CPF es uno de los insecticidas de mayor producción y uso a nivel mundial (Saunders et al. 2012). Aunque su uso domisanitario se encuentra prohibido en nuestro país desde el 2009, al igual que en muchos otros países desde el 2000, continúa siendo el pesticida OP más ampliamente empleado en la producción agrícola, y aún se utiliza en actividades no agrícolas como en entornos industriales, en algunos tipos de césped como campos de golf, en productos para madera y en cebos residenciales para hormigas. Existe una creciente preocupación sobre el riesgo potencial de este plaguicida para la salud humana, especialmente sobre los posibles efectos adversos de la exposición prenatal en el desarrollo fetal y el neurodesarrollo de los niños. Como un ejemplo de esta preocupación, cabe mencionar que la EPA ha solicitado a paneles de expertos que revisen nuevos aspectos científicos de los efectos sanitarios de CPF. En general, los datos disponibles recientemente apoyan y refuerzan la conclusión a favor del probable rol de la exposición prenatal a CPF en los resultados adversos del desarrollo neurológico medido en niños (FIFRA Scientific Advisory Panel 2012).

Para evaluar los objetivos propuestos para esta Tesis, se utilizaron modelos *in vitro* representativos de CTBv y CTBev humanos, a fin de analizar la respuesta celular frente a CPF e identificar posibles blancos moleculares; y cultivos de explantos de vellosidades coriónicas de placentas humanas normales a término para evaluar el efecto sobre la estructura del tejido placentario.

Tanto las investigaciones *in vivo* como *in vitro* pueden ayudar en la provisión de conocimientos acerca de parámetros como la transferencia y el metabolismo de tóxicos a través de la placenta, sin embargo se considera un gran avance cuando los ensayos se realizan utilizando tejido humano. Los estudios de teratología en animales son sin duda útiles para determinar el efecto de una droga sobre la reproducción, pero su relevancia con respecto a la cinética humana puede ser limitada, debido a las dificultades en la extrapolación de los resultados experimentales a los seres humanos (Clark 2014; Myren et al. 2007). Además, los modelos *in vitro* tienen el potencial de reemplazar o reducir el número de animales utilizados para los test toxicológicos, lo cual se fomenta cada vez más a

nivel internacional (Knudsen 2013). Si bien no pueden explicar completamente todas las variables fisiológicas y bioquímicas de la madre, la placenta y el feto ni cómo estas variables cambian durante toda la gestación, se impulsa que los modelos *in vitro* sean los primeros a utilizar cuando se investigan los efectos tóxicos de una sustancia (Gohner et al. 2014; Myren et al. 2007).

Por razones prácticas y económicas, se propone aplicar una batería de experimentos secuenciales para el análisis de potenciales tóxicos, comenzando con el uso de líneas celulares, seguido por pruebas en explantos de tejido de placenta y células aisladas de la placenta, y, finalmente, mediante la aplicación de modelos de perfusión placentaria *ex vivo*. Los efectos tóxicos pueden ser detectados mediante la realización de ensayos de proliferación, de vitalidad y muerte celular, de expresión de proteínas y hormonas, inmunohistoquímicas o analizando la funcionalidad de vías de señalización, la expresión de genes, los mecanismos de transporte, etc. (Gohner et al. 2014). En este trabajo de tesis se abarcaron todos los modelos *in vitro* propuestos, quedando solo excluido el de la perfusión placentaria *ex-vivo*.

Inicialmente se evaluó el impacto de CPF sobre la viabilidad de los trofoblastos empleando las líneas celulares JEG-3 y BeWo, cultivos primarios de CTBv y la línea celular HTR-8/SVneo proveniente de CTBev de placenta humana de primer trimestre transformados con el antígeno T largo del virus SV-40 para lograr su inmortalización (Graham et al. 1993).

La viabilidad de las células JEG-3 no se vio significativamente reducida en tratamientos con concentraciones de CPF de hasta 100  $\mu\text{M}$  durante 48 h. En esta condición se observó un leve incremento en el porcentaje de núcleos con alteraciones compatibles con daños por apoptosis. Además, en las células BeWo, se mantuvo una viabilidad mayor al 75% en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de CPF durante 48 h.

Son escasos los trabajos que han estudiado el impacto de CPF sobre líneas celulares trofoblásticas. Guiñazú et al. reportaron que CPF induce apoptosis en las células JEG-3; si bien esta afirmación se corresponde con las alteraciones nucleares, compatibles con núcleos apoptóticos, observadas en nuestros experimentos, ellos han determinado además niveles de muerte celular elevados medidos mediante ensayos de recuentos con azul de tripán. Esta diferencia podría atribuirse a las distintas condiciones de cultivo y a la técnica para la medición de viabilidad empleada. Los autores parten de células sembradas en 1% de SFB desde el momento de su plaqueo, y además utilizan niveles del vehículo de CPF (DMSO) más

elevados (Guinazu et al. 2012). La técnica de medición empleada requiere además la tripsinización previa al recuento de las células viables. Todas estas variables podrían aumentar la sensibilidad de las células expuestas al tóxico y por otro lado, la metodología empleada es menos cuantitativa que los ensayos de reducción de MTT utilizados en este trabajo de tesis. Además, los autores encontraron diferencias entre los resultados obtenidos de los ensayos de exclusión con azul de tripán y de liberación de lactato deshidrogenasa, y obtuvieron solo un 13% de células JEG-3 positivas para la marcación con anexina V en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de CPF durante 48 h mientras que no encontraron cambios en el porcentaje de células doble positivas para anexina V e yoduro de propidio mediante citometría de flujo (Guinazu et al. 2012). El valor de DL50 determinado por los recuentos con azul de tripán para JEG-3 expuestas a CPF durante 48 h (9,2  $\mu\text{M}$ ) también difiere notablemente de los resultados recientemente obtenidos por Rieke et al. quienes realizaron tratamientos con dosis de hasta 40  $\mu\text{M}$  de CPF durante 48 h y reportaron el mantenimiento de la viabilidad celular en las condiciones empleadas (Guinazu et al. 2012; Rieke et al. 2014).

Saulsbury et al. informaron que CPF provoca una reducción de la viabilidad celular dependiente de la dosis en células JAR con un valor de DL50 de 59,1  $\pm$  1,19  $\mu\text{M}$  a las 24 h (Saulsbury et al. 2008). Aunque no podemos descartar que la diferencia observada entre ambos informes se deba a los diferentes métodos utilizados para evaluar la viabilidad celular, se debe tener en cuenta que las células derivadas de coriocarcinoma JEG-3, BeWo y JAR son distintas en varias características tales como la actividad proliferativa, grado de diferenciación y metabolismo de tóxicos (Al-Nasiry et al. 2006; Serrano et al. 2007). Por lo tanto, las discrepancias observadas podrían deberse a sus diferentes perfiles de expresión génica. Sin embargo, los resultados de esta Tesis demuestran que CPF tampoco afectó la viabilidad celular de cultivos primarios de CTBv, ni a tiempos cortos de cultivo donde las células se encuentran en su mayoría como CTB mononucleados, ni a las 64 h de cultivo donde una gran mayoría se ha fusionado formando estructuras tipo STB. Estos resultados refuerzan las evidencias a favor de la resistencia de los trofoblastos vellosos a la citotoxicidad incluso a dosis elevadas de CPF (100  $\mu\text{M}$ ). Estas observaciones son consistentes considerando que los trofoblastos vellosos constituyen parte de la barrera placentaria, la cual posee mecanismos de protección que impiden o disminuyen el acceso al feto de metabolitos tóxicos y xenobióticos que arriban a la placenta desde la sangre materna. Tirelli et al. demostraron que la línea celular Caco-2, un conocido modelo *in vitro* de barrera

intestinal, tampoco muestran efectos citotóxicos después de incubarlas 24 h con concentraciones de hasta 250  $\mu\text{M}$  de CPF (Tirelli et al. 2007). En contraste con estos resultados, en modelos de estudio de células neuronales, principal blanco conocido de OP, se ha reportado que concentraciones de CPF entre 0,8 a 100  $\mu\text{M}$  producen efectos citotóxicos evaluados empleando diferentes métodos, incluidos la medición mediante ensayos de MTT y marcadores morfológicos de apoptosis. Por ejemplo, concentraciones de 30  $\mu\text{M}$  reducen alrededor del 50% la viabilidad de neuronas corticales de rata (Caughlan et al. 2004), mientras que en neuronas granulares cerebelares de ratón se reportó una DL50 de 12  $\mu\text{M}$  (Giordano et al. 2007). Estos resultados sugieren que tanto las células epiteliales que cumplen funciones en la barrera placentaria como las de la barrera intestinal poseen mayor resistencia al efecto citotóxico de CPF que las células neuronales. Esta observación no implica que las funciones de ambas barreras se mantengan ya que CPF podría afectar la permeabilidad o estructura de las mismas. De hecho, CPF interfiere con la formación de las uniones estrechas en el modelo *in vitro* de células epiteliales intestinales (Tirelli et al. 2007). En este mismo sentido, en un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica se ha reportado que CPF altera la integridad funcional y la estructura de la misma en concentraciones de 1 a 100 nM, concentraciones mucho menores que las que provocan citotoxicidad ( $>1 \mu\text{M}$ ) (Parran et al. 2005).

En las condiciones de exposición estudiadas, CPF tampoco alteró la fusión y diferenciación bioquímica de los CTBv mononucleados a STB. Un exhaustivo análisis bibliográfico revela que este trabajo es el primer reporte en el cual se analizó el efecto de un pesticida OP sobre el proceso de diferenciación y formación del STB. Sin embargo, se ha demostrado que contaminantes ambientales de la familia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) como el benzo(A)pireno induce la diferenciación de células BeWo (Le Vee et al. 2014); mientras que, el bromodiclorometano interfiere en la formación del STB (Chen et al. 2004).

Hasta el momento no existen datos bibliográficos reportados acerca del efecto de OP sobre los CTBv. En relación al posible efecto citotóxico de CPF sobre las células HTR-8/SVneo, se observó que, en condiciones equivalentes a las utilizadas en las células JEG-3 y BeWo, estas células fueron más sensibles al tratamiento con CPF a 100  $\mu\text{M}$ . Tanto a esta dosis como a 200  $\mu\text{M}$  se obtuvieron resultados compatibles con necrosis celular, los cuales fueron revertidos con el aumento de SFB en el medio de cultivo, posiblemente debido a la

unión de CPF a las proteínas séricas, tal como ha sido reportado previamente (Qiao et al. 2001; Saulsbury et al. 2008). Como se mencionó, estas células son representativas del trofoblasto invasivo extraveloso, específicamente, de las células que proliferan y migran desde las vellosidades coriónicas infiltrándose en la decidua materna hasta invadir las arterias espiraladas (Graham et al. 1993). Los resultados hallados sugieren que en concentraciones elevadas el tóxico podría comprometer los procesos de implantación o el establecimiento del correcto flujo sanguíneo hacia la placenta. Esta observación, está en línea con los reportes que indican un aumento de abortos espontáneos asociado a la exposición a pesticidas OP (Arbuckle et al. 2001). De todos modos, a concentraciones menores de CPF y condiciones de exposición en las cuales las células mantienen su viabilidad, las células HTR-8/SVneo no mostraron alteraciones marcadas en su proliferación, migración e invasión, sugiriendo que, si bien se requieren futuros estudios para abordar más minuciosamente este aspecto, la funcionalidad de las mismas no se ve comprometida en presencia de CPF. Sin embargo, se requieren futuros estudios para profundizar este aspecto. Hasta el momento no hay trabajos que demuestren la alteración de la migración o invasión en modelos celulares a causa de algún OP, aunque sí se ha reportado que CPF altera la proliferación en líneas celulares de cáncer de mama y en astrocitos (Guizzetti et al. 2005; Ventura et al. 2012). Sin embargo, en ensayos similares a los utilizados en este trabajo de tesis se ha demostrado que otros pesticidas, como los fungicidas benomilo y carbendazim, disminuyen la migración e invasión de las células HTR-8/SVneo expuestas *in vitro* (Zhou et al. 2015).

Posteriormente, se evaluó si CPF altera la expresión de genes con roles importantes en la placenta humana, en las condiciones de exposición al tóxico donde la morfología, funcionalidad, diferenciación y la viabilidad celular no se encontraban marcadamente comprometidas.

En la línea celular JEG-3, la exposición a CPF indujo un importante aumento en la expresión del ARNm de la subunidad  $\beta$  de la hormona hCG y del transportador de eflujo ABCG2, así como, la síntesis proteica de ambos y, la secreción de  $\beta$ -hCG al medio de cultivo. Además, CPF aumentó los niveles de transcritos de GCM1 aunque no de su proteína, mientras que la expresión del ARNm del factor de transcripción KLF6 y del transportador de lípidos StarD7 se mantuvo sin cambios después de 24 y 48 h de tratamiento. Si bien se había informado que CPF modifica la expresión de genes pro-apoptóticos en la línea trofoblástica

JAR (Saulsbury et al. 2008), este trabajo fue el primer estudio en demostrar que CPF puede desregular la expresión de genes específicamente relacionados con la función y la diferenciación del trofoblasto.

GCM1 es un factor de transcripción crítico de la placenta que promueve la formación del STB y la vasculogénesis. Su expresión es altamente regulada tanto a nivel de la transcripción como de la traducción, incluyendo la ubiquitinación y degradación mediada por proteasoma (Baczyk et al. 2004; Lin et al. 2010). Esta regulación compleja y precisa puede explicar la ausencia de una correlación directa entre los efectos inducidos por CPF sobre la expresión del ARNm de GCM1 y su proteína. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de una pequeña modificación en su nivel de expresión proteica indetectable mediante los ensayos de inmunodetección utilizados.

El aumento de  $\beta$ -hCG se corroboró en las células BeWo y, más importante aún, en los CTBv purificados de placenta humana normal a término. En estas células también se observó un aumento en la expresión de ABCG2 aunque en ambos casos las inducciones fueron de menor magnitud y estadísticamente significativas para algunas de las concentraciones y tiempos ensayados. En presencia del pesticida, los CTBv presentaron además un incremento en la producción del transportador de eflujo P-gp. Cabe señalar que en las células JEG-3 se encontraron niveles despreciables de P-gp, en concordancia con resultados reportados previamente (Atkinson et al. 2003). Este transportador es considerado, junto con el ABCG2, uno de los transportadores de eflujo más importantes en el rol protector de la barrera placentaria (Kolwankar et al. 2005).

Las células de CTBv aisladas de placentas normales a término constituyen un modelo apropiado para analizar el efecto potencial de xenobióticos sobre la placenta ya que forman el epitelio de la barrera placentaria. Sin embargo, como se señaló anteriormente, el modelo presenta algunas limitaciones prácticas. Los CTBv provenientes de diferentes placentas poseen distintos niveles basales de expresión de genes asociados a estrés oxidativo y protección fetal acorde a las diferentes experiencias medioambientales a las que hayan estado expuestas las placentas *in vivo* (Pidoux et al. 2004). También se ha observado que la expresión basal placentaria de algunos genes dependen de la edad gestacional específica, del sexo del bebé y del origen étnico de los padres (Adibi et al. 2009). Esta información no ha podido ser conocida ni evaluada durante la recolección de placentas para este trabajo de tesis. La falta de control de estas variables pudo contribuir a la importante variabilidad

biológica obtenida en las mediciones realizadas sobre cultivos primarios de CTBv sometidos a las mismas condiciones de exposición *in vitro* a CPF. Además, la expresión de la proteína transportadora P-gp presenta una amplia variabilidad interindividual y está sujeta a regulación hormonal e inmunológica, además de depender de la edad (Cascorbi 2006). Los niveles de expresión basal de ABCG2 en la placenta humana también son afectados por ciertos polimorfismos genéticos, lo cual contribuye a la variabilidad interindividual de la farmacocinética de sus sustratos (Saito et al. 2013). Sin duda que aumentando el número de muestras de placentas y los criterios de inclusión y exclusión para la recolección de las mismas, los resultados obtenidos en este modelo tendrían mayor significancia estadística. De todos modos considerando las dificultades operativas del trabajo con células purificadas de placentas humanas, los resultados son alentadores ya que van en la misma dirección que los obtenidos en las células JEG-3. En resumen, sugieren que CPF induce modificaciones en la expresión específica de algunos genes importantes para el funcionamiento adecuado del trofoblasto veloso humano. Específicamente, en relación a su rol endócrino, CPF incrementa la producción de  $\beta$ -hCG y en relación a su función de barrera, induce un aumento en la expresión de los transportadores de eflujo ABCG2 y P-gp.

La hormona hCG es esencial en el establecimiento y mantenimiento de un embarazo saludable, por lo cual los test que evalúan su subunidad  $\beta$  en suero representan una herramienta importante para monitorear los efectos de factores que pueden potencialmente interferir en el embarazo (Cole 2009). Así, bajos niveles se asocian con pérdida fetal temprana (van Ravenswaaij et al. 2011) y niveles de  $\beta$ -hCG disminuidos durante el primer trimestre se asocian con embarazos ectópicos (Borrelli et al. 2003). En mujeres que cursan con preeclampsia o preeclampsia asociada a hipertensión crónica se han reportado niveles promedio más altos de hCG en suero de tercer trimestre (Kalinderis et al. 2011). Además, niveles elevados de hCG en suero materno medidos a las 15-20 semanas de gestación pueden resultar de la diferenciación acelerada de los CTBv dando lugar a alteraciones patológicas en la morfología del STB que aumentan el riesgo de preeclampsia grave y de RCIU (Fitzgerald et al. 2011). Recientemente se ha propuesto que el aumento en la concentración de ARNm de  $\beta$ -hCG en el plasma materno puede aplicarse al diagnóstico prenatal de placenta acreta (Zhou et al. 2014).

Otros tóxicos ambientales también afectan la expresión de  $\beta$ -hCG, algunos induciendo su producción y otros disminuyéndola, incluso en concentraciones no citotóxicas

para los trofoblastos (Bechi et al. 2013). En este sentido, se ha descrito una expresión aumentada de hCG en células trofoblásticas expuestas a bisfenol A, al OC DDT, al pesticida piretroide bifentrina y a compuestos de trialquilestaño (Mannelli et al. 2014; Morck et al. 2010; Nakanishi et al. 2002; Wojtowicz et al. 2007; Zhao et al. 2014). Estos datos, junto con el aumento de hCG en algunas enfermedades del embarazo, sugieren que la desregulación de su expresión podría representar un marcador de injuria placentaria.

Kharfi Aris et al. a través de estudios *in vitro* han vinculado la secreción trofoblástica de hCG con el estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  y han encontrado una correlación positiva entre la concentración sérica de hCG y la producción de  $H_2O_2$  en pacientes con preeclampsia (Kharfi Aris et al. 2005; Kharfi Aris et al. 2007). En un trabajo realizado en colaboración se determinó que CPF aumenta la producción de EROs en células JEG-3 (Chiapella et al. 2013). Mientras que, en este trabajo de Tesis se demostró que el  $H_2O_2$  induce la transcripción de  $\beta$ -hCG en estas células y que el co-tratamiento de CPF con el antioxidante NAC revierte parcialmente el aumento de  $\beta$ -hCG inducido por el pesticida. Estos hallazgos sugieren que el  $H_2O_2$  generado por CPF, podría ser uno de los mediadores involucrados en el incremento en la producción de  $\beta$ -hCG observado en las células trofoblásticas. Recientemente se ha señalado a esta pequeña molécula como mensajera química en la señalización asociada a diversas respuestas celulares (Sies 2014).

Sorpresivamente, el NAC por sí mismo también indujo marcadamente la transcripción de  $\beta$ -hCG. Otros autores han reportado en una línea celular de retina, que tanto el pesticida CPF como el antioxidante NAC inducen la producción de la enzima detoxificante PON2, crucial para la resistencia al estrés oxidativo inducido por el pesticida en ese modelo; los autores señalan que esta acción de NAC no se debería estrictamente a sus propiedades antioxidantes, sino a su capacidad de influenciar el estado redox de residuos de cisteína en moléculas de señalamiento como Raf-1, MEK y ERK (Jasna et al. 2014). Otros autores han demostrado que sustancias con propiedades antioxidantes como la vitamina C y el trolox también conducen a un aumento en la síntesis de  $\beta$ -hCG en células trofoblásticas (Chen et al. 2012; Orendi et al. 2010). Por otra parte, Kharfi Aris et al. proponen que  $\beta$ -hCG podría tener un rol antioxidante frente a niveles bajos de estrés oxidativo permitiendo la supervivencia de las células placentarias (Kharfi Aris et al. 2007). En línea con esta hipótesis, en esta Tesis se demostró que el silenciamiento génico de  $\beta$ -hCG en células JEG-3 incrementa los niveles basales de EROs, sugiriendo la participación de esta hormona en la homeostasis redox, como

ha sido descrito recientemente en otro modelo celular (Ahmad et al. 2015). Además, se ha reportado que el tratamiento con hCG recombinante confiere resistencia a la apoptosis inducida por estrés oxidativo en las células estromales decidualizadas del endometrio, induciendo la producción de enzimas antioxidantes y factores anti-apoptóticos e inhibiendo la de factores pro-apoptóticos (Kajihara et al. 2011) y también se ha propuesto un papel protector de hCG en la toxicidad mediada por arsénico en ovario y útero (Chattopadhyay y Ghosh 2010).

Hamada et al. observaron una disminución de la proliferación y un aumento de apoptosis cuando células JAR fueron tratadas con un ARN de  $\beta$ -hCG antisentido durante tiempos más prolongados (Hamada et al. 2005). Por lo que, pese a que en los ensayos de esta tesis la disminución en la expresión de  $\beta$ -hCG no alteró la viabilidad celular en ausencia o presencia de CPF, no se puede descartar que a tiempos más prolongados de silenciamiento se observen resultados similares a los obtenidos por estos autores.

Los antecedentes nombrados hasta aquí sugieren que el incremento de  $\beta$ -hCG en las células trofoblásticas expuestas a CPF podría formar parte de la respuesta celular de defensa para preservar la función de estas células en presencia del tóxico. En este sentido, también se ha reportado que las células JEG-3 expuestas a CPF activan mecanismos de defensa antioxidante a través las enzimas CAT, Glutación Reductasa y HO-1 (Chiapella et al. 2013). Otros autores proponen que el incremento sérico anormal de hCG durante el embarazo podría ser consecuencia de la diferenciación prematura y acelerada de los CTBv, dando lugar a alteraciones patológicas posteriores en la morfología del STB que aumentan el riesgo de preeclampsia severa y de RCIU (Fitzgerald et al. 2011), sin embargo, como se expuso, la exposición a CPF no alteró el índice de fusión de los CTBv en las condiciones evaluadas. Además, se ha propuesto al aumento de la producción hCG como parte de la disrupción endócrina provocada por otros tóxicos (Nakanishi et al. 2002; Zhao et al. 2014). Finalmente, si la modificación observada en la expresión génica refleja un efecto nocivo de CPF en células de la placenta o un mecanismo de defensa en presencia del tóxico, no se conoce en la actualidad.

El aumento de la expresión de ABCG2 y P-gp también podría formar parte de los mecanismos de defensa de las células trofoblásticas inducidos por la presencia de CPF. Los transportadores de eflujo de la familia ABC, son altamente expresados en los tejidos placentarios, y contribuyen a la capacidad de la placenta para reducir el paso de compuestos

terapéuticos o tóxicos para el feto (Cyglova et al. 2008), siendo la P-gp y el ABCG2 los más reconocidos por su rol de protección fetal frente a la llegada de xenobióticos (Iqbal et al. 2012). Si bien este es el primer trabajo que revela un aumento de ABCG2 inducido por CPF, se ha reportado que este pesticida interacciona con P-gp (Lanning et al. 1996), incrementa en su expresión y función en un modelo de cultivo celular de epitelio intestinal (Agarwala et al. 2004), y aumenta su expresión en órganos como riñón, hígado, intestino y estómago de ratas expuestas a CPF *in vivo* (Lanning et al. 1996).

En el trabajo en colaboración mencionado previamente, se demostró también que la defensa antioxidante activada por CPF en las células JEG-3 se generó, al menos en parte, gracias a la participación del factor de transcripción Nrf2, el cual aumenta su expresión y trasloca al núcleo en presencia del pesticida (Chiapella et al. 2013). Si bien se observó que el silenciamiento génico de dicho factor de transcripción disminuyó los niveles basales de ABCG2, blanco transcripcional de Nrf2 en otros modelos celulares (Hagiya et al. 2008; Ishikawa et al. 2013; Wang et al. 2014), no se logró revertir su inducción frente a CPF, ni la de  $\beta$ -hCG, indicando que este factor no estaría participando en estos efectos. Sin embargo, observaciones preliminares sugieren que la reducción de la expresión de Nrf2 aumentaría la sensibilidad a la citotoxicidad de CPF, revelando el rol protector esencial de esta respuesta antioxidante desencadenada por el tóxico. En este sentido, recientemente se ha propuesto a la inducción de Nrf2 como un mecanismo de defensa contra la citotoxicidad del herbicida paraquat en diversos modelos celulares (Blanco-Ayala et al. 2014).

El factor de transcripción KLF6, regulador transcripcional de  $\beta$ -hCG (Racca et al. 2011), también incrementó tempranamente su expresión en las células JEG-3 expuestas a CPF, sugiriendo su participación en la respuesta celular frente al tóxico. Se ha reportado que este factor aumenta su expresión frente a EROs y a sustancias pro-oxidantes (Urtasun et al. 2012). Los ensayos de silenciamiento génico indicaron que KLF6 no sería esencial para la sobrevivencia celular ni para la inducción de la expresión de ABCG2 en presencia del tóxico, sin embargo, participaría en el aumento de  $\beta$ -hCG generado por CPF en las células JEG-3.

En relación al impacto de CPF en la expresión de genes en CTBev, las células HTR-8/SVneo expuestas a CPF presentaron transcriptos de Flt1 significativamente disminuidos, de HIF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -hCG solo a la dosis más alta ensayada (100  $\mu$ M) y de PPAR $\gamma$  frente a las dosis de 10 y 100  $\mu$ M. Alteraciones en estas moléculas se han vinculado a patologías como la preeclampsia (Fournier et al. 2008a; McCarthy et al. 2011; Nevo et al. 2006; Saito y

Nakashima 2014). Estos factores tienen en común además su participación en el mantenimiento de un fenotipo proliferativo o invasivo de los CTBev (Athassiades et al. 1998; Fournier et al. 2008b; Fukushima et al. 2005; Knofler y Pollheimer 2012), sin embargo, como ya se dijo, no se observaron alteraciones en estos procesos cuando las células se expusieron a CPF, lo cual sugiere que en este modelo también se estaría induciendo una respuesta celular a fin de conservar la funcionalidad trofoblástica.

En particular, la hCG producida por los CTBev es principalmente hiperglicosilada (H-hCG) y posee funciones biológicas diferentes a las de la hCG sintetizada por el STB, ya que principalmente estimula la implantación mediante la invasión de estas células y el crecimiento de la placenta (Cole 2010; Cole 2012a; Cole 2012b; Fournier et al. 2011; Handschuh et al. 2009; Handschuh et al. 2007b). A su vez, concentraciones bajas de H-hCG se asocian con embarazos fallidos y elevadas con coriocarcinoma o embarazos con síndrome de Down (Cole 2012c; Choi y Smitz 2013). Si bien no se observó alteración en la invasión de las células HTR-8/SVneo frente a CPF en las condiciones evaluadas, no podemos descartar que a tiempos más prolongados de exposición la disminución de la expresión de  $\beta$ -hCG sintetizada por estas células, genere alteraciones en la capacidad invasiva de las mismas, lo cual *in vivo* tendría consecuencias sobre la implantación o el establecimiento del correcto flujo sanguíneo hacia la placenta. Alteraciones en este sentido estarían en línea con los reportes que indican un aumento de abortos espontáneos asociado a la exposición a pesticidas OP (Arbuckle et al. 2001). Estos estudios deberían ser profundizados empleando modelos de cultivos primarios de CTBev. En este sentido, recientemente se ha reportado un método de purificación de estas células a partir de placentas humanas a término, ya que hasta el momento la mayoría de los cultivos primarios utilizados en otros trabajos provenían de placentas de primer trimestre obtenidas en países en los cuales el aborto está legalizado (Borbely et al. 2014).

Hasta el momento no hay trabajos que involucren a la expresión de Ftl1 como blanco en respuesta a tóxicos medioambientales. Si bien tampoco existe literatura que vincule a HIF-1 $\alpha$  con la exposición a pesticidas, se ha reportado que la estimulación no hipóxica con la dioxina TCDD aumentó la estabilización de este factor de transcripción y la invasión de células JAR. En este contexto, TCDD también aumentó la expresión de VEGF y disminuyó la de PPAR $\gamma$  (Liao et al. 2014). En cuanto a este último receptor nuclear, existe evidencia que sugiere su interacción directa con algunos pesticidas OC (Androutsopoulos et al. 2013).

Como se indicó previamente, los factores Nrf2 y KLF6 responden rápidamente aumentando su expresión frente a la presencia de CPF en células trofoblásticas vellosas, mientras que PPAR $\gamma$  y HIF-1 $\alpha$  disminuyen su expresión en presencia del tóxico en células derivadas de CTBv. La modificación en la expresión de estos factores de transcripción podría alterar la homeostasis celular debido a un desbalance en la regulación de sus genes blanco. En este sentido, se ha observado KLF6 participa en el incremento de  $\beta$ -hCG inducido por CPF en los CTBv, y dicho aumento es promovido también por la presencia de EROs generadas por el tóxico. Sin embargo, los mecanismos moleculares específicos por los cuales CPF modifica la expresión de los genes estudiados se desconocen por el momento, aunque varias posibilidades pueden ser planteadas.

En la placenta se ha demostrado la participación de AhR, VDR y GR como xenosensores que regulan la expresión de genes ante la presencia de xenobióticos. Estos factores de transcripción activados por ligandos participan en la inducción de la expresión de enzimas metabolizantes y de transportadores de eflujo mediando una respuesta detoxificante. En este sentido AhR se ha asociado con la regulación de ABCG2, mientras que VDR y GR con la de P-gp. Sus ligandos, tanto exógenos como endógenos, son estructuralmente diversos (Pavek y Smutny 2013). Si bien no hay trabajos que revelen la activación de VDR o GR mediante OP, en un estudio que evaluó más de 200 plaguicidas como posibles ligandos de AhR, CPF mostró actividad transcripcional mediada por este receptor (Takeuchi et al. 2008). Además, recientemente se ha demostrado que tratamientos con 40  $\mu$ M de este pesticida sobre las células JEG-3 durante 48 h, inducen la transcripción de la enzima CYP1A1 a través de la activación del AhR (Rieke et al. 2014). Estos antecedentes señalan a la regulación transcripcional mediada por este receptor como posible mecanismo involucrado en la modificación de la expresión de los genes estudiados en este trabajo de tesis. En este sentido,  $\beta$ -hCG tiene sitios en su promotor putativos para la regulación con AhR. Además, se ha observado que el benzo(A)pireno, presente en algunos alimentos, induce la expresión y secreción de  $\beta$ -hCG y el ARNm de otros marcadores de diferenciación trofoblástica de manera dependiente, en parte, de la activación de la vía del AhR, implicada en la mayoría de los efectos de los PAHs (Le Vee et al. 2014).

CPF también podría activar el elemento de unión de respuesta al AMPc como se ha detectado en las neuronas (Schuh et al. 2002; Song et al. 1997) o a algunos componentes de la transducción de señal a través de la cascada de la adenilatociclasa, como se ha reportado

que ocurre en el cerebro durante el periodo de desarrollo a finales de la gestación (Meyer et al. 2003). Esta es una alternativa atractiva ya que la vía de la adenilatociclasa está implicada en la expresión de los genes de  $\beta$ -hCG, GCM1 (Delidaki et al. 2011) y ABCG2 (Natarajan et al. 2011).

El promotor de  $\beta$ -hCG también está regulado por el factor de transcripción Sp1 (Knofler et al. 2004; Nores et al. 2004) y, además, la cooperación funcional entre KLF6 y Sp1 es importante para la regulación de la transcripción de algunos genes diana comunes (Botella et al. 2002; Botella et al. 2009). Se ha reportado que la inducción en la producción de  $\beta$ -hCG como respuesta al tratamiento de células trofoblásticas con ácido ascórbico, requiere su transactivación mediante los factores Sp1 y TFAP2A (Chen et al. 2012). Además, Yang et al. demostraron que Sp1 junto con Sp3 regulan la expresión de ABCG2 en células de cáncer de pulmón (Yang et al. 2013). Si bien podrían citarse muchos factores en común involucrados en la regulación transcripcional de estos genes, Sp1 podría ser un blanco de estudio interesante en este modelo, ya que se ha reportado su participación en otros efectos mediados por CPF (Crumpton et al. 2000; Garcia et al. 2001; Jasna et al. 2014).

Otros blancos interesantes, para futuros estudios, a fin profundizar acerca de la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en los efectos de CPF, es la participación de las vías de señalización mediadas por quinasas. Estas vías tienen un rol central en la diferenciación del trofoblasto en placenta humana a término (Daoud et al. 2005) y se han asociado a efectos inducidos por CPF en otros modelos celulares (Mense et al. 2006).

Finalmente, cabe agregar que en la actualidad cada vez más trabajos señalan a las alteraciones epigenéticas como el vínculo entre el medioambiente al que está sometido un organismo y su impacto en la fisiología a través de cambios en la expresión génica y sus consecuencias en la señalización intracelular. Los tóxicos ambientales pueden impactar en los mecanismos de regulación epigenéticos, como la metilación del ADN y la expresión de microARN. Mediante el estudio de la placenta, es posible identificar adaptaciones epigenéticas que pueden alterar el curso del desarrollo de acuerdo con el paradigma de "El origen de la salud y la enfermedad adulta durante el desarrollo". Se ha sugerido que los humanos somos más susceptibles a las alteraciones epigenómicas por el medio ambiente durante el desarrollo intrauterino, y esto puede representar un mecanismo de plasticidad del organismo en respuesta a su entorno, así como un mecanismo a través del cual pueden

generarse consecuencias para la salud a largo plazo (Marsit 2015). Si bien no se sabe hasta el momento si las alteraciones moleculares trofoblásticas inducidas por CPF tienen su origen en modificaciones epigenéticas, esta área moderna de estudio es muy prometedora. Numerosas investigaciones han identificado varias clases de plaguicidas que modifican las marcas epigenéticas y estas modificaciones son similares a las encontradas en muestras de tejidos patológicos. A pesar de las limitaciones actuales, la evidencia disponible apoya el concepto de que la epigenética tiene un potencial sustancial para fomentar nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares de efectos plaguicidas en la salud, así como para predecir los riesgos relacionados con la salud debido a las condiciones de exposición ambiental y la susceptibilidad individual (Collotta et al. 2013; Tarrade et al. 2015; Vaiserman 2014).

Como en todos los estudios celulares *in vitro*, una de las principales limitaciones es que las células no están en su ambiente normal, no hay células o tejidos con los cuales interactuar e intercambiar factores importantes que podrían modificar la susceptibilidad a los tóxicos. Por este motivo se procedió a evaluar el impacto de CPF sobre las vellosidades coriónicas utilizando como modelo *in vitro* al cultivo de explantos de placentas humanas a término. Su empleo data desde hace más de cincuenta años, para estudios de transporte, metabolismo, función endócrina y enzimática, proliferación y diferenciación celular. Los explantos placentarios poseen la ventaja de poseer la microarquitectura intacta y mantener las interacciones célula-célula y la comunicación parácrina, teniendo en cuenta de esta manera la contribución de las células mesenquimales y endoteliales a los procesos metabólicos (Myren et al. 2007).

Se observó que CPF indujo alteraciones morfológicas marcadas en la histología de la vellosidad. Explantos expuestos a 10  $\mu\text{M}$  de CPF durante 36 h, mostraron alteraciones en la morfología y disposición nuclear en el STB, con un patrón anormal de su marcación de citoqueratina 7. Además, presentaron cambios en la composición de la matriz intravellositaria reflejados por el aumento del contenido de material PAS positivo (carbohidratos) y aumento de células estromales apoptóticas. A nivel ultraestructural se detectó la presencia de engrosamiento de la membrana basal trofoblástica. Se observaron también acúmulos de núcleos con marcación negativa para ki-67 y caspasa 3 clivada, algunos de ellos con características morfológicas similares a los nodos sinciciales, sin embargo, la presencia de cromatina poco condensada en los núcleos de estos acúmulos ponen en duda

la caracterización u origen de los mismos. Cuando los explantos fueron expuestos a concentraciones más elevadas de CPF, las alteraciones morfológicas anteriores se incrementaron y los tratamientos con 100  $\mu\text{M}$  de CPF generaron desorganización de la vellosidad coriónica, con signos de destrucción tisular por necrosis. Estos resultados sugieren que CPF alteraría la barrera trofoblástica, pudiendo impactar en la funcionalidad de la placenta y como consecuencia en el desarrollo del embarazo, como ha sido reportado en algunos trabajos sobre mujeres embarazadas expuestas a OP (Adhikari et al. 2011; Dabrowski et al. 2003; Eskenazi et al. 2004; Levario-Carrillo et al. 2004a; Rita et al. 1987; Stillerman et al. 2008; Whyatt et al. 2005). Sin embargo, cabe agregar que si bien los estudios a través del uso de explantos vellosos tienen las ventajas citadas anteriormente, no contemplan la influencia de otros tejidos, como la decidua materna, ni de sistemas importante como el inmunológico y circulatorio, que en conjunto contribuyen a la respuesta individual del organismo contra la exposición a tóxicos.

La placenta constituye el mejor registro de las experiencias fisio-patológicas prenatales de un individuo. Se reconoce que si luego del parto la placenta es minuciosamente examinada, provee mucha información acerca de la salud tanto de la madre como del individuo gestado. Sin embargo, pese a que varios estudios establecieron una correlación entre la exposición prenatal a pesticidas y alteraciones en el embarazo, pocos trabajos han evaluado su impacto en la morfología placentaria. Levario-Carrillo et al. describieron microinfartos recientes, microcalcificaciones y aumento de depósitos de material fibrinoide, además de una gran proporción de vellosidades con características atípicas y otras áreas desprovistas de microvellosidades (Levario-Carrillo et al. 2001). La misma autora, reportó en placenta de ratas expuestas a un OP durante el embarazo, un aumento de la congestión vascular, una notoria internalización de material por las células gigantes del trofoblasto, un aumento de la población de células degeneradas tanto en la decidua como en el trofoblasto, áreas más extensas de fibrosis, hemorragia en la decidua y la persistencia de glóbulos rojos nucleados en la circulación fetal. Estos hallazgos han sido interpretados como un mecanismo compensatorio que permitiría aumentar la salida de líquidos del sistema vascular diluyendo las moléculas tóxicas a nivel celular y aumentando la cantidad total de células a fin de reemplazar las expuestas a los pesticidas. También propone que el aumento de la actividad fagocítica y de la internalización de material por las células del trofoblasto, son mecanismos de homeostasis. Además observó infiltración leucocítica,

muerte de células deciduales y del trofoblasto, fibrosis y extensa hemorragia, lo que sugiere un efecto tóxico directo del compuesto en el metabolismo de los vasos sanguíneos uterinos (Levario-Carrillo et al. 2004b). Otro estudio de la misma autora concluyó que las alteraciones macroscópicas y microscópicas de las placentas expuestas a pesticidas son comparables a las de otros estados en donde la circulación materno-placentaria no es adecuada, lo cual podría conducir a un desarrollo anormal de las vellosidades placentarias (Levario-Carrillo et al. 2002). En un estudio piloto más reciente, se observaron similares alteraciones en la maduración de las vellosidades placentarias de madres expuestas a pesticidas durante el embarazo (Acosta-Maldonado et al. 2009; Villanueva et al. 2010). Así también, se han observado cambios histomorfológicos y ultraestructurales en placentas expuestas a otros contaminantes ampliamente utilizados en entornos industriales y médicos, como el formaldehído (Monfared 2014) e incluso por el ingreso pasivo del humo de cigarrillos (Khan et al. 2011).

Durante patologías asociadas al embarazo como la preeclampsia, el RCIU y la diabetes también se han reportado alteraciones histológicas placentarias (Gheorman et al. 2012; Jirkovska et al. 2012; Narasimha y Vasudeva 2011; Scifres y Nelson 2009; Verma et al. 2010), algunas de ellas similares a las observadas en esta tesis en los explantos expuestos a CPF *in vitro*. En placentas provenientes de embarazos complicados con preeclampsia o eclampsia, se ha informado aumento en la proliferación trofoblástica, engrosamiento de las membranas basales de las vellosidades, aumento de la cantidad de nodos sinciciales, de la fibrosis intravellositaria y presencia de necrosis tisular, entre otras alteraciones (Narasimha y Vasudeva 2011). En placentas de embarazadas con diabetes, aunque no se observaron anomalías macroscópicas significativas, la examinación microscópica reveló alteraciones, dentro de las cuales las más prominentes fueron la disposición de núcleos y aumento de nodos sinciciales en el STB, de material fibrinoide intra y extra vellositario y presencia de zonas con edema y necrosis tisular. Mediante tinciones con PAS, Gheorman et al. identificaron pequeños acúmulos de material positivo para esta marcación con localización subsincicial, en la membrana basal engrosada y en la matriz extracelular de las vellosidades terminales, que ellos señalan como depósitos de glicógeno cuya composición sería principalmente ácido hialurónico, que gracias a su capacidad de retener agua, provocaría el edema observado en las vellosidades (Gheorman et al. 2012; Verma et al. 2010). Además, otros autores caracterizaron alteraciones en los capilares y la composición

del estroma vellositario en placentas de embarazos de mujeres con diabetes tipo I (Jirkovska et al. 2012).

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis nos permiten postular que frente a la exposición a CPF los trofoblastos activan mecanismos de defensa que les confieren resistencia a la citotoxicidad aún en altas concentraciones del tóxico. Sin embargo, la vellosidad coriónica tendría células más sensibles, las cuales, posiblemente a través de mediadores moleculares, desencadenarían daño tisular incluso frente a concentraciones de CPF no citotóxicas para los trofoblastos en modelos celulares aislados.

La extrapolación de los efectos inducidos por pesticidas OP desde las condiciones de cultivo *in vitro* a las dosis de exposición *in vivo*, es una problemática reconocida en gran medida (Karalliedde et al. 2003; Needham 2005). Estimar la dosis interna de exposición *in vivo* a OP en muestras biológicas es particularmente complejo debido, en parte, a que tienen una vida media relativamente corta, son rápidamente metabolizados, y su disponibilidad y metabolización dependen de la vía de ingreso al organismo (Wessels et al. 2003). Además, durante el embarazo el flujo sanguíneo hacia la placenta incrementa notablemente y algunas evidencias permiten postular que la placenta funciona como un órgano de depósito transitorio de OP (Abu-Qare et al. 2000). Estas variables limitan la estimación certera de las concentraciones de CPF a las cuales puede estar expuesta la placenta *in vivo*.

Diversos estudios han intentado determinar los niveles de exposición a CPF en poblaciones de trabajadores y/o en mujeres embarazadas empleando diferentes matrices. Por ejemplo, se han reportado valores de exposición de 11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal/día (calculados a partir de la medición del metabolito TCP urinario) en granjeros de Sri Lanka y 26  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  en aplicadores de pesticidas de EEUU y Australia (Marasinghe et al. 2014). Asumiendo un volumen corporal de 38 litros para una persona de 70 kg, la concentración sistémica esperada para CPF sería alrededor de 0,06 y 0,14  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Otro estudio realizado en una población de granjeros aplicadores de CPF y sus esposas de Minnesota y Carolina del Sur (EEUU) ha reportado valores 0,7–2,1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso corporal (equivalente a 3,7–11  $\mu\text{M}$ ) (Alexander et al. 2006). En un importante estudio de cohorte longitudinal, Huen et al. evaluaron los niveles de CPF en el plasma de mujeres embarazadas y en sangre del cordón umbilical de una población de americanos-mexicanos del "Salinas Valley" en Monterey, reportando valores de 0,4  $\text{ng}/\text{mL}$  y 1,33  $\text{ng}/\text{mL}$  (percentilo 95), respectivamente. En ese mismo estudio, encontraron valores excepcionalmente altos de

aproximadamente 1,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (equivalentes a concentraciones de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ ) (Huen et al. 2012). Por otra parte, las mediciones de OP en meconio, que refleja a más largo plazo la exposición prenatal (Barr et al. 2005), sugieren que el feto y la placenta pueden estar expuestos a altas dosis de la CPF en las comunidades agrícolas (Ostrea et al. 2002). Sin embargo, los datos aportados en el estudio no permiten inferir cuál ha sido la concentración a la que ha estado expuesta la placenta.

En la literatura se han usado rutinariamente concentraciones de CPF de 50-150  $\mu\text{M}$  para evaluar la toxicidad *in vitro* de este pesticida tanto en modelos neuronales como no neuronales (Caughlan et al. 2004; Li et al. 2009; Oostingh et al. 2009; Slotkin y Seidler 2008). Si bien los valores usados en los modelos *in vitro* son en general mayores a los estimados como valores de exposición *in vivo*, permiten evaluar en una primera instancia posibles blancos moleculares y celulares potencialmente relevantes *in vivo* e identificar los mecanismos involucrados en sus efectos tóxicos.

Cabe citar que en esta tesis los estudios se han realizado utilizando el compuesto original CPF. Esto puede no reflejar completamente la situación *in vivo* donde CPF es metabolizado, principalmente en el hígado, a su derivado oxón, responsable de la inhibición de la AChE. Si bien el modo de acción primario de CPF, al igual que todos los OP, es la inhibición persistente de dicha enzima en las uniones sinápticas del sistema nervioso central y periférico, varios trabajos han indicado que puede influenciar la fisiología, la replicación o la diferenciación celular mediante mecanismos no relacionados con la inhibición enzimática (Eaton et al. 2008), como por ejemplo en el desarrollo del cerebro (Slotkin et al. 2007) y en las células trofoblásticas JAR (Saulsbury et al. 2008). En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo de tesis, la actividad de la AChE en las células JEG-3 disminuyó sustancialmente en presencia de 5 y 50  $\mu\text{M}$  CPF durante 24 h, lo que sugiere que se ha producido el derivado oxón en estas células (Chiapella et al. 2013). Sin embargo, no se ha estudiado hasta el momento si los efectos observados en este modelo serían dependientes o no de la acción anticolinérgica de CPF.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen a la descripción de los efectos de pesticidas OP sobre la placenta humana. Por un lado, se identificaron nuevos blancos moleculares de CPF en las células del trofoblasto veloso y extraveloso, y por el otro, se describieron alteraciones histológicas marcadas en las vellosidades coriónicas expuestas a este pesticida. Estos resultados apuntan a la placenta humana como órgano diana de OP y

revelan la necesidad de incrementar los estudios para abordar la participación de las moléculas estudiadas en la placenta de mujeres embarazadas en respuesta a la exposición a pesticidas. Además, este trabajo contribuye al conocimiento de los mecanismos protectivos que desencadenan los trofoblastos en presencia de tóxicos y revela la importancia de emplear varios modelos *in vitro* e *in vivo* a fin de estudiar los efectos de un tóxico sobre la placenta humana, ya que los resultados obtenidos en ellos se complementan entre sí dando una idea global de la respuesta de este órgano frente al mismo.

# **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

---

## TRABAJOS CIENTÍFICOS PÚBLICADOS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, parte de los resultados obtenidos fueron publicados en los siguientes trabajos científicos:

*"Chlorpyrifos modifies the expression of genes involved in human placental function"*

Ridano ME, Racca AC, Flores-Martín J, Camolotto SA, de Potas GM, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM.

Reprod Toxicol. 2012 Jun; 33 (3):331-8. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.01.003. Epub 2012 Jan 21.

*"The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells"*

Chiapella G, Flores-Martín J, Ridano ME, Reyna L, Magnarelli de Potas G, Panzetta-Dutari GM, Genti-Raimondi S.

Placenta. 2013 Sep; 34 (9):792-8. doi: 10.1016/j.placenta.2013.06.007. Epub 2013 Jul 11.

Además, se colaboró en las siguientes publicaciones:

*"Krüppel-like factor 6 expression changes during trophoblast syncytialization and transactivates  $\beta$ -hCG and PSG placental genes"*

Racca AC, Camolotto SA, Ridano ME, Bocco JL, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM.

PLoS One. 2011; 6 (7):e22438. doi: 10.1371/journal.pone.0022438. Epub 2011 Jul 22.

*"PSG Gene Expression Is Up-Regulated by Lysine Acetylation Involving Histone and Nonhistone Proteins"*

Camolotto SA, Racca AC, Ridano ME, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM.

PLoS One. 2013; 8 (2):e55992. doi: 10.1371/journal.pone.0055992. Epub 2013 Feb 13.

*"A novel regulator of human villous trophoblast fusion: the Krüppel-like factor 6"*

Racca AC, Ridano ME, Camolotto S, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM.

Mol Hum Reprod. 2014 Dec 23. pii: gau113. [Epub ahead of print]. doi: 10.1093/molehr/gau113.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Qare AW, Abdel-Rahman AA, Kishk AM, Abou-Donia MB (2000) Placental transfer and pharmacokinetics of a single dermal dose of [<sup>14</sup>C]methyl parathion in rats. *Toxicol Sci* 53:5-12
- Acosta-Maldonado B, Sanchez-Ramirez B, Reza-Lopez S, Levario-Carrillo M (2009) Effects of exposure to pesticides during pregnancy on placental maturity and weight of newborns: a cross-sectional pilot study in women from the Chihuahua State, Mexico. *Hum Exp Toxicol* 28:451-9
- Adhikari K, Ghosh A, Alauddin MD, Moitra A, Datta AK (2011) Organophosphate poisoning in pregnancy. *J Obstet Gynaecol* 31:290-2
- Adibi JJ, Hauser R, Williams PL, Whyatt RM, Thaker HM, Nelson H, Herrick R, Bhat HK (2009) Placental biomarkers of phthalate effects on mRNA transcription: application in epidemiologic research. *Environ Health* 8:20
- Agarwala S, Chen W, Cook TJ (2004) Effect of chlorpyrifos on efflux transporter gene expression and function in Caco-2 cells. *Toxicol In Vitro* 18:403-9
- Ahmad F, Ghosh S, Sinha S, Joshi SD, Mehta VS, Sen E (2015) TGF-beta-induced hCG-beta regulates redox homeostasis in glioma cells. *Mol Cell Biochem* 399:105-12
- Al-Lamki RS, Skepper JN, Loke YW, King A, Burton GJ (1998) Apoptosis in the early human placental bed and its discrimination from necrosis using the in-situ DNA ligation technique. *Hum Reprod* 13:3511-9
- Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R (2006) Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 21:193-201
- Alavanja MC, Bonner MR (2012) Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 15:238-63
- Alexander BH, Burns CJ, Bartels MJ, Acquavella JF, Mandel JS, Gustin C, Baker BA (2006) Chlorpyrifos exposure in farm families: results from the farm family exposure study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 16:447-56
- Androutsopoulos VP, Hernandez AF, Liesivuori J, Tsatsakis AM (2013) A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology* 307:89-94
- Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC (2000) The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat Genet* 25:311-4
- Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS (2001) An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* 109:851-7
- Arnholdt H, Meisel F, Fandrey K, Lohrs U (1991) Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60:365-72
- Arnold LL, Doherty TM, Flor AW, Simon JA, Chou JY, Chan WY, Mansfield BC (1999) Pregnancy-specific glycoprotein gene expression in recurrent aborters: a potential correlation to interleukin-10 expression. *Am J Reprod Immunol* 41:174-82
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6:593-7
- Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK (1998) Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 59:643-54

- Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ (2003) Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C584-91
- Aye IL, Keelan JA (2013) Placental ABC transporters, cellular toxicity and stress in pregnancy. *Chem Biol Interact* 203:456-66
- Baczyk D, Drewlo S, Proctor L, Dunk C, Lye S, Kingdom J (2009) Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death Differ* 16:719-27
- Baczyk D, Satkunaratnam A, Nait-Dumesmar B, Huppertz B, Cross JC, Kingdom JC (2004) Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta* 25:553-9
- Balin AK, Allen RG, Reimer R (1988) Human fibroblast antioxidant defense response to alteration in oxygen tension. *Basic Life Sci* 49:707-11
- Barr DB, Wang RY, Needham LL (2005) Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: requirements and issues for consideration for the National Children's Study. *Environ Health Perspect* 113:1083-91
- Bebo BF, Jr., Dveksler GS (2005) Evidence that pregnancy specific glycoproteins regulate T-Cell function and inflammatory autoimmune disease during pregnancy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:231-7
- Bechi N, Sorda G, Spagnoletti A, Bhattacharjee J, Vieira Ferro EA, de Freitas Barbosa B, Frosini M, Valoti M, Sgaragli G, Paulesu L, Ietta F (2013) Toxicity assessment on trophoblast cells for some environment polluting chemicals and 17beta-estradiol. *Toxicol In Vitro* 27:995-1000
- Belfroid AC, van Drunen M, Beek MA, Schrap SM, van Gestel CA, van Hattum B (1998) Relative risks of transformation products of pesticides for aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 222:167-83
- Benachour N, Seralini GE (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22:97-105
- Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN (2012) Pathology of the human placenta, Sixth edn. Springer Science+Business Media, Inc., 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.
- Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R (2006) Pathology of the Human Placenta, Fifth edn. Springer Science+Business Media, Inc., 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA.
- Berkowitz GS, Wetmur JG, Birman-Deych E, Obel J, Lapinski RH, Godbold JH, Holzman IR, Wolff MS (2004) In utero pesticide exposure, maternal paraoxonase activity, and head circumference. *Environ Health Perspect* 112:388-91
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R (1996) The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *BIOCHEMICA* 4:14-19
- Bhuiyan MB, Murad F, Fant ME (2006) The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Commun Signal* 4:4
- Black RM, Read RW (2013) Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. *Arch Toxicol* 87:421-37
- Blanco-Ayala T, Anderica-Romero AC, Pedraza-Chaverri J (2014) New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res* 48:623-40
- Blanco M, Lantieri MJ, Stimolo MI, Butinof M, Fernandez RA, Padró O, Diaz MP (2013) Factores condicionantes de la exposición a pesticidas de agroaplicadores por áreas ecológicas homogéneas de la provincia de Córdoba, Argentina. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicología e Meio Ambiente* 23:37-48
- Blaschitz A, Weiss U, Dohr G, Desoye G (2000) Antibody reaction patterns in first trimester placenta: implications for trophoblast isolation and purity screening. *Placenta* 21:733-41
- Bo M, Boime I (1992) Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin beta gene cluster in vivo. *J Biol Chem* 267:3179-84
- Bocco JL, Panzetta G, Flury A, Patrino LC (1989) Expression of pregnancy specific beta 1-glycoprotein gene in human placenta and hydatiform mole. *Biochem Int* 18:999-1008

- Bohn H (1971) [Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placenta and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women]. *Arch Gynakol* 210:440-57
- Bonanseia RI, Ame MV, Wunderlin DA (2013) Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere* 90:1860-9
- Borbely AU, Sandri S, Fernandes IR, Prado KM, Cardoso EC, Correa-Silva S, Albuquerque R, Knofler M, Beltrao-Braga P, Campa A, Bevilacqua E (2014) The term basal plate of the human placenta as a source of functional extravillous trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol* 12:7
- Borrelli PT, Butler SA, Docherty SM, Staite EM, Borrelli AL, Iles RK (2003) Human chorionic gonadotropin isoforms in the diagnosis of ectopic pregnancy. *Clin Chem* 49:2045-9
- Botella LM, Sanchez-Elsner T, Sanz-Rodriguez F, Kojima S, Shimada J, Guerrero-Esteo M, Cooreman MP, Ratziu V, Langa C, Vary CP, Ramirez JR, Friedman S, Bernabeu C (2002) Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood* 100:4001-10
- Botella LM, Sanz-Rodriguez F, Komi Y, Fernandez LA, Varela E, Garrido-Martin EM, Narla G, Friedman SL, Kojima S (2009) TGF-beta regulates the expression of transcription factor KLF6 and its splice variants and promotes co-operative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction. *Biochem J* 419:485-95
- Bradman A, Barr DB, Claus Henn BG, Drumheller T, Curry C, Eskenazi B (2003) Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ Health Perspect* 111:1779-82
- Bulgaroni V, Lombardo P, Rivero-Osimani V, Vera B, Dulgerian L, Cerban F, Rivero V, Magnarelli G, Guinazu N (2013) Environmental pesticide exposure modulates cytokines, arginase and ornithine decarboxylase expression in human placenta. *Reprod Toxicol* 39:23-32
- Bulgaroni V, Rovedatti MG, Sabino G, Magnarelli G (2011) Organophosphate pesticide environmental exposure: analysis of salivary cholinesterase and carboxylesterase activities in preschool children and their mothers. *Environ Monit Assess* 184:3307-14
- Caceres T, He W, Naidu R, Megharaj M (2007) Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: the influence of microbial degradation in natural water. *Water Res* 41:4497-503
- Camolotto S, Racca A, Rena V, Nores R, Patrício LC, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2010) Expression and transcriptional regulation of individual pregnancy-specific glycoprotein genes in differentiating trophoblast cells. *Placenta* 31:312-319
- Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, Post M (2000) Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 105:577-87
- Carey JL, Dunn C, Gaspari RJ (2013) Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. *Respir Physiol Neurobiol* 189:403-10
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL (2010) Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction* 140:803-13
- Cascorbi I (2006) Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112:457-73
- Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, Bordi G, Moscarini M (2013) Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 17:2198-206
- Castellucci M, Kaufmann P (2006) Basic Structure of the Villous Trees. In: Benirschke K, Kaufman P, Baergen RN (eds) *Pathology of the Human Placenta*. 5th ed. Springer-Verlag, New York, pp 50-120

- Castro JA (1985) Biotransformación de sustancias extrañas al organismo: reacciones y enzimas involucradas. *Acta Bioquím Clin Latinoam.* 19:201-13
- Caughlan A, Newhouse K, Namgung U, Xia Z (2004) Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases. *Toxicol Sci* 78:125-34
- Cavoski I, Caboni P, Sarais G, Miano T (2008) Degradation and persistence of rotenone in soils and influence of temperature variations. *J Agric Food Chem* 56:8066-73
- Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F (2006) P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol* 22:400-10
- Clark DA (2014) The use and misuse of animal analog models of human pregnancy disorders. *J Reprod Immunol* 103:1-8
- Cole LA (2009) New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol* 7:8
- Cole LA (2010) Hyperglycosylated hCG, a review. *Placenta* 31:653-64
- Cole LA (2012a) hCG, five independent molecules. *Clin Chim Acta* 413:48-65
- Cole LA (2012b) hCG, the wonder of today's science. *Reprod Biol Endocrinol* 10:24
- Cole LA (2012c) Hyperglycosylated hCG and pregnancy failures. *J Reprod Immunol* 93:119-22
- Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V (2013) Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307:35-41
- Corsini E, Sokooti M, Galli CL, Moretto A, Colosio C (2013) Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307:123-35
- Costa LG (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366:1-13
- Cross JC, Anson-Cartwright L, Scott IC (2002) Transcription factors underlying the development and endocrine functions of the placenta. *Recent Prog Horm Res* 57:221-34
- Crumpton TL, Seidler FJ, Slotkin TA (2000) Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. *Brain Res* 857:87-98
- Cygalova L, Ceckova M, Pavek P, Staud F (2008) Role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in fetal protection during gestation in rat. *Toxicol Lett* 178:176-80
- Chattopadhyay S, Ghosh D (2010) The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: modulation by hCG. *J Biochem Mol Toxicol* 24:29-41
- Chen J, Thirkill TL, Lohstroh PN, Bielmeier SR, Narotsky MG, Best DS, Harrison RA, Natarajan K, Pegram RA, Overstreet JW, Lasley BL, Douglas GC (2004) Bromodichloromethane inhibits human placental trophoblast differentiation. *Toxicol Sci* 78:166-74
- Chen L, Zhu H, Pan Y, Tang C, Watanabe M, Ruan H, Wang Y, Wang J, Yao HY, Iguchi T, Wu X (2012) Ascorbic acid uptaken by sodium-dependent vitamin C transporter 2 induces beta hCG expression through Sp1 and TFAP2A transcription factors in human choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1667-76
- Chiapella G, Flores-Martin J, Ridano ME, Reyna L, Magnarelli de Potas G, Panzetta-Dutari GM, Genti-Raimondi S (2013) The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta* 34:792-8
- Chiapella G, Genti-Raimondi S, Magnarelli G (2014) Placental oxidative status in rural residents environmentally exposed to organophosphates. *Environ Toxicol Pharmacol* 38:220-9
- Choi J, Smits J (2013) Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Mol Cell Endocrinol* 383:203-13
- Dabrowski S, Hanke W, Polanska K, Makowiec-Dabrowska T, Sobala W (2003) Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. *Int J Occup Med Environ Health* 16:31-9
- Daoud G, Amyot M, Rassart E, Masse A, Simoneau L, Lafond J (2005) ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 566:409-23

- Davis JM, Auten RL (2010) Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 15:191-5
- Delidakis M, Gu M, Hein A, Vatish M, Grammatopoulos DK (2011) Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol* 332:213-20
- Dennerly PA (2010) Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med* 49:1147-51
- Dery MA, Michaud MD, Richard DE (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37:535-40
- Devlin RB, Frampton ML, Ghio AJ (2005) In vitro studies: what is their role in toxicology? *Exp Toxicol Pathol* 57 Suppl 1:183-8
- Douglas GC, King BF (1990) Differentiation of human trophoblast cells in vitro as revealed by immunocytochemical staining of desmoplakin and nuclei. *J Cell Sci* 96 ( Pt 1):131-41
- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS (2008) Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol* 38 Suppl 2:1-125
- Elersek T, Filipic M (2011) Organophosphorous Pesticides - Mechanisms of Their Toxicity, Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure. Prof. Margarita Stoytcheva (Ed.), InTech, <http://www.intechopen.com/books/pesticides-the-impacts-of-pesticidesexposure/organophosphorous-pesticides-mechanisms-of-their-toxicity>
- Elsinghorst PW, Worek F, Thiermann H, Wille T (2013) Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opin Drug Discov* 8:1467-77
- Enders AC, Blankenship TN (1999) Comparative placental structure. *Adv Drug Deliv Rev* 38:3-15
- Enriquez A (2000) Evaluación del riesgo ambiental a la liberación de plaguicidas. Laboratorio de Ecotoxicidad. Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago de Chile
- Enserink M, Hines PJ, Vignieri SN, Wigginton NS, Yeston JS (2013) Smarter pest control. The pesticide paradox. *Introduction. Science* 341:728-9
- Environmental Protection Agency (2014). About pesticides. [http://www.epa.gov/pesticides/about/#what\\_pest](http://www.epa.gov/pesticides/about/#what_pest)
- Eskenazi B, Harley K, Bradman A, Weltzien E, Jewell NP, Barr DB, Furlong CE, Holland NT (2004) Association of in utero organophosphate pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Environ Health Perspect* 112:1116-24
- Eskenazi B, Kogut K, Huen K, Harley KG, Bouchard M, Bradman A, Boyd-Barr D, Johnson C, Holland N (2014) Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study. *Environ Res* 134C:149-157
- Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, Morga N, Jewell NP (2007) Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect* 115:792-8
- Estevan C, Vilanova E, Sogorb MA (2013) Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: considerations for embryotoxic risk assessment. *Toxicol Lett* 217:14-22
- Fattier JCW (2010) The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009, Stuttgart, Germany.
- FIFRA Scientific Advisory Panel (2012) Draft Issue Paper: Scientific Issues Concerning Health Effects of Chlorpyrifos. <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2012-0040-0002>.
- Fitzgerald B, Levytska K, Kingdom J, Walker M, Baczyk D, Keating S (2011) Villous trophoblast abnormalities in extremely preterm deliveries with elevated second trimester maternal serum hCG or inhibin-A. *Placenta* 32:339-45

- Fitzpatrick TE, Lash GE, Yanaiharu A, Charnock-Jones DS, Macdonald-Goodfellow SK, Graham CH (2003) Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor. *Exp Cell Res* 283:247-55
- Flores-Martin J, Rena V, Angeletti S, Panzetta-Dutari GM, Genti-Raimondi S (2013) The Lipid Transfer Protein StarD7: Structure, Function, and Regulation. *Int J Mol Sci* 14:6170-86
- Foo JP, Mantzoros C (2013) Early growth and development of later life metabolic disorders. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 71:75-84
- Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V, Rauwel B, Davrinche C, Evain-Brion D (2011) PPARgamma and human trophoblast differentiation. *J Reprod Immunol* 90:41-9
- Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D (2007) Involvement of PPARgamma in human trophoblast invasion. *Placenta* 28 Suppl A:S76-81
- Fournier T, Handschuh K, Tsatsaris V, Guibourdenche J, Evain-Brion D (2008a) Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. *J Reprod Immunol* 77:161-70
- Fournier T, Therond P, Handschuh K, Tsatsaris V, Evain-Brion D (2008b) PPARgamma and early human placental development. *Curr Med Chem* 15:3011-24
- Foxenberg RJ, Ellison CA, Knaak JB, Ma C, Olson JR (2011) Cytochrome P450-specific human PBPk/PD models for the organophosphorus pesticides: chlorpyrifos and parathion. *Toxicology* 285:57-66
- Fukushima K, Miyamoto S, Tsukimori K, Kobayashi H, Seki H, Takeda S, Kensuke E, Ohtani K, Shibuya M, Nakano H (2005) Tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor induce endothelial integrin repertoires, regulating endovascular differentiation and apoptosis in a human extravillous trophoblast cell line. *Biol Reprod* 73:172-9
- Garcia SJ, Seidler FJ, Crumpton TL, Slotkin TA (2001) Does the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. *Brain Res* 891:54-68
- Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B (2009) Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30 Suppl A:S49-54
- Gavriilescu M (2005) Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng Life Sci* 13:497-526
- Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ (1997) Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277:1669-72
- Gheorman L, Plesea IE, Gheorman V (2012) Histopathological considerations of placenta in pregnancy with diabetes. *Rom J Morphol Embryol* 53:329-36
- Gil Y, Sinfort C (2005) Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmospheric Environment* 39:5183-5193
- Giordano G, Afsharinejad Z, Guizzetti M, Vitalone A, Kavanagh TJ, Costa LG (2007) Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol* 219:181-9
- Gogal RM, Jr., Holladay SD (2008) Perinatal TCDD exposure and the adult onset of autoimmune disease. *J Immunotoxicol* 5:413-8
- Gohner C, Svensson-Arvelund J, Pfarrer C, Hager JD, Faas M, Ernerudh J, Cline JM, Dixon D, Buse E, Markert UR (2014) The placenta in toxicology. Part IV: Battery of toxicological test systems based on human placenta. *Toxicol Pathol* 42:345-51
- Gonzalez-Alzaga B, Lacasana M, Aguilar-Garduno C, Rodriguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M, Hernandez AF (2014) A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicol Lett* 230:104-21
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK (1993) Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res* 206:204-11

- Guinazu N, Rena V, Genti-Raimondi S, Rivero V, Magnarelli G (2012) Effects of the organophosphate insecticides phosmet and chlorpyrifos on trophoblast JEG-3 cell death, proliferation and inflammatory molecule production. *Toxicol In Vitro* 26:406-13
- Guizzetti M, Pathak S, Giordano G, Costa LG (2005) Effect of organophosphorus insecticides and their metabolites on astroglial cell proliferation. *Toxicology* 215:182-90
- Gupta RC (2012) *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Second edition, Academic Press. 1454 pp.
- Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY (2014) The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta* 35:303-4
- Ha CT, Wu JA, Irmak S, Lisboa FA, Dizon AM, Warren JW, Ergun S, Dveksler GS (2010) Human pregnancy specific beta-1-glycoprotein 1 (PSG1) has a potential role in placental vascular morphogenesis. *Biol Reprod* 83:27-35
- Hagiya Y, Adachi T, Ogura S, An R, Tamura A, Nakagawa H, Okura I, Mochizuki T, Ishikawa T (2008) Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy. *J Exp Ther Oncol* 7:153-67
- Hamada AL, Nakabayashi K, Sato A, Kiyoshi K, Takamatsu Y, Laoag-Fernandez JB, Ohara N, Maruo T (2005) Transfection of antisense chorionic gonadotropin beta gene into choriocarcinoma cells suppresses the cell proliferation and induces apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4873-9
- Handschuh K, Guibourdenche J, Cocquebert M, Tsatsaris V, Vidaud M, Evain-Brion D, Fournier T (2009) Expression and regulation by PPARgamma of hCG alpha- and beta-subunits: comparison between villous and invasive extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 30:1016-22
- Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T (2007a) Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 28:175-84
- Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, Guesnon M, Laurendeau I, Evain-Brion D, Fournier T (2007b) Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology* 148:5011-9
- Handwerger S (2009) New insights into the regulation of human cytotrophoblast cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 323:94-104
- Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA (2010) Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod* 82:235-45
- Hemauer SJ, Nanovskaya TN, Abdel-Rahman SZ, Patrikeeva SL, Hankins GD, Ahmed MS (2010) Modulation of human placental P-glycoprotein expression and activity by MDR1 gene polymorphisms. *Biochem Pharmacol* 79:921-5
- Hemberger M (2013) Immune balance at the foeto-maternal interface as the fulcrum of reproductive success. *J Reprod Immunol* 97:36-42
- Hofmann GE, Glatstein I, Schatz F, Heller D, Deligdisch L (1994) Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. *Am J Obstet Gynecol* 170:671-6
- Hubert MA, Sherritt SL, Bachurski CJ, Handwerger S (2010) Involvement of transcription factor NR2F2 in human trophoblast differentiation. *PLoS One* 5:e9417
- Huen K, Bradman A, Harley K, Yousefi P, Boyd Barr D, Eskenazi B, Holland N (2012) Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community. *Environ Res* 117:8-16
- Huppertz B (2007) The foeto-maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. *Semin Immunopathol* 29:83-94

- Huppertz B (2008) The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol* 61:1296-302
- Huppertz B (2011) Trophoblast differentiation, fetal growth restriction and preeclampsia. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health* 1:79-86
- Huppertz B, Bartz C, Kokozidou M (2006) Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* 37:509-17
- Huppertz B, Borges M (2008) Placenta trophoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475:135-47
- Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P (1998) Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 291:133-48
- Huppertz B, Weiss G, Moser G (2014) Trophoblast invasion and oxygenation of the placenta: measurements versus presumptions. *J Reprod Immunol* 101-102:74-9
- Iqbal M, Audette MC, Petropoulos S, Gibb W, Matthews SG (2012) Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* 33:137-42
- Ishikawa T, Kajimoto Y, Sun W, Nakagawa H, Inoue Y, Ikegami Y, Miyatake S, Kuroiwa T (2013) Role of Nrf2 in cancer photodynamic therapy: regulation of human ABC transporter ABCG2. *J Pharm Sci* 102:3058-69
- Janatpour MJ, McMaster MT, Genbacev O, Zhou Y, Dong J, Cross JC, Israel MA, Fisher SJ (2000) Id-2 regulates critical aspects of human cytotrophoblast differentiation, invasion and migration. *Development* 127:549-58
- Jansson T (2001) Amino acid transporters in the human placenta. *Pediatr Res* 49:141-7
- Jasna JM, Anandbabu K, Bharathi SR, Angayarkanni N (2014) Paraoxonase enzyme protects retinal pigment epithelium from chlorpyrifos insult. *PLoS One* 9:e101380
- Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL (2013) Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med* 34:981-1023.
- Jirkovska M, Kucera T, Kalab J, Jadrnicek M, Niedobova V, Janacek J, Kubinova L, Moravcova M, Zizka Z, Krejci V (2012) The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus. *Placenta* 33:343-51
- Jocelyn K (2014) Gearing up for a closer look at the human placenta. *Science* 344:1073
- Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, Itakura A, Brosens JJ, Ishihara O (2011) Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells. *Fertil Steril* 95:1302-7
- Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Giannoulis C, Karagiannis V, Tarlatzis BC (2011) Elevated Serum Levels of Interleukin-6, Interleukin-1beta and Human Chorionic Gonadotropin in Pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 66: 468-75
- Karakaya YA, Ozer E (2013) The role of Hofbauer cells on the pathogenesis of early pregnancy loss. *Placenta* 34:1211-5
- Karalliedde LD, Edwards P, Marrs TC (2003) Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. *Food Chem Toxicol* 41:1-13
- Karl PI, Harvey B, Fisher SE (1996) Ethanol and mitotic inhibitors promote differentiation of trophoblastic cells. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1269-74
- Khan HM, Khan MY, Minhas LA (2011) Effect of passive cigarette smoke on mouse placenta and the role of antioxidants. *J Pak Med Assoc* 61:676-9
- Kharfi Aris A, Giguere Y, De Grandpre P, Moutquin JM, Forest JC (2005) Human chorionic gonadotropin (hCG) may be a marker of systemic oxidative stress in normotensive and preeclamptic term pregnancies. *Clin Biochem* 38:717-21
- Kharfi Aris A, Leblanc S, Ouellet A, Moutquin JM (2007) Dual action of H2O2 on placental hCG secretion: implications for oxidative stress in preeclampsia. *Clin Biochem* 40:94-7
- Khong TY (2008) The pathology of placenta accreta, a worldwide epidemic. *J Clin Pathol* 61:1243-6
- Kingdom JC, Drewlo S (2011) Is heparin a placental anticoagulant in high-risk pregnancies? *Blood* 118:4780-8

- Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-82
- Knofler M, Pollheimer J (2012) IFPA Award in Placentology lecture: molecular regulation of human trophoblast invasion. *Placenta* 33 Suppl:S55-62
- Knofler M, Pollheimer J (2013) Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet* 4:190
- Knofler M, Saleh L, Bauer S, Galos B, Rotheneder H, Husslein P, Helmer H (2004) Transcriptional regulation of the human chorionic gonadotropin beta gene during villous trophoblast differentiation. *Endocrinology* 145:1685-94
- Knofler M, Vasicek R, Schreiber M (2001) Key regulatory transcription factors involved in placental trophoblast development—a review. *Placenta* 22 Suppl A:S83-92
- Knudsen LE (2013) Animal-free toxicology: the use of human tissue to replace the use of animals - examples from human biomonitoring and human placental transport studies. *Altern Lab Anim* 41:443-7
- Kohle C, Bock KW (2007) Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem Pharmacol* 73:1853-62
- Kohler PO, Bridson WE (1971) Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 32:683-7
- Kolwankar D, Glover DD, Ware JA, Tracy TS (2005) Expression and function of ABCB1 and ABCG2 in human placental tissue. *Drug Metab Dispos* 33:524-9
- Koritschoner NP, Bocco JL, Panzetta-Dutari GM, Dumur CI, Flury A, Patrino LC (1997) A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem* 272:9573-80
- Kweider N, Huppertz B, Kadyrov M, Rath W, Pufe T, Wruck CJ (2014) A possible protective role of Nrf2 in preeclampsia. *Ann Anat* 196:268-277
- Lala PK, Chakraborty C (2003) Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta* 24:575-87
- Lanning CL, Fine RL, Sachs CW, Rao US, Corcoran JJ, Abou-Donia MB (1996) Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein. *J Toxicol Environ Health* 47:395-407
- Le Vee M, Kolasa E, Jouan E, Collet N, Fardel O (2014) Differentiation of human placental BeWo cells by the environmental contaminant benzo(a)pyrene. *Chem Biol Interact* 210:1-11
- Leduc K, Bourassa V, Asselin E, Leclerc P, Lafond J, Reyes-Moreno C (2011) Leukemia inhibitory factor regulates differentiation of trophoblastlike BeWo cells through the activation of JAK/STAT and MAPK3/1 MAP kinase-signaling pathways. *Biol Reprod* 86:54
- Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, Gonzalez-Horta C, Corona Y, Sanin LH (2004a) Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere* 55:1421-7
- Levario-Carrillo M, Chavez-Corral D, Ramos-Martinez E, Solis F, Horta C, Sanin L (2002) Exposición de mujeres a plaguicidas organofosforados durante el embarazo y alteraciones de la placenta. *Rev Bras Toxicol* 15:79-85
- Levario-Carrillo M, Feria-Velasco A, De Celis R, Ramos-Martinez E, Cordova-Fierro L, Solis FJ (2001) Parathion, a cholinesterase-inhibiting plaguicide induces changes in tertiary villi of placenta of women exposed: a scanning electron microscopy study. *Gynecol Obstet Invest* 52:269-75
- Levario-Carrillo M, Olave ME, Corral DC, Alderete JG, Gagiotti SM, Bevilacqua E (2004b) Placental morphology of rats prenatally exposed to methyl parathion. *Exp Toxicol Pathol* 55:489-96
- Li Q, Kobayashi M, Kawada T (2009) Chlorpyrifos induces apoptosis in human T cells. *Toxicology* 255:53-7
- Liao TL, Chen SC, Tzeng CR, Kao SH (2014) TCDD induces the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  regulatory pathway in human trophoblastic JAR cells. *Int J Mol Sci* 15:17733-50

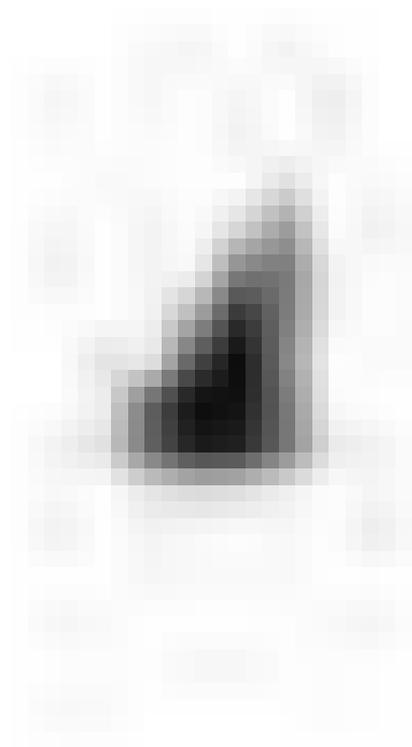
- Lin FY, Chang CW, Cheong ML, Chen HC, Lee DY, Chang GD, Chen H (2010) Dual-specificity phosphatase 23 mediates GCM1 dephosphorylation and activation. *Nucleic Acids Res* 39:848-61
- Lisboa FA, Warren J, Sulkowski G, Aparicio M, David G, Zudaire E, Dveksler GS (2011) Pregnancy-specific glycoprotein 1 induces endothelial tubulogenesis through interaction with cell surface proteoglycans. *J Biol Chem* 286:7577-86
- Lotti M, Moretto A (2005) Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Toxicol Rev* 24:37-49
- Magnarelli G, Guiñazú N (2012) Placental Toxicology of Pesticides, Recent Advances in Research on the Human Placenta. Dr Jing Zheng (Ed), InTech. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta/placental-toxicology-of-pesticides>
- Mannelli C, Ietta F, Carotenuto C, Romagnoli R, Szostek AZ, Wasniewski T, Skarzynski DJ, Paulesu L (2014) Bisphenol A alters beta-hCG and MIF release by human placenta: an in vitro study to understand the role of endometrial cells. *Mediators Inflamm* 2014:635364
- Mañas F, Peralta L, Gorla N, Bosh B, Aiassa D (2009) Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *J. of Basic and Applied Genetics* 20:9-13
- Mao Q (2008) BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm Res* 25:1244-55
- Marasinghe J, Yu Q, Connell D (2014) Assessment of Health Risk in Human Populations Due to Chlorpyrifos. *Toxics* 2:92-114
- Marcorelles P (2013) [Placental features in intrauterine growth retardation]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 42:996-1007
- Marsit CJ (2015) Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol* 218:71-79
- Martenies SE, Perry MJ (2013) Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: a systematic review. *Toxicology* 307:66-73
- Martinez FF, Cervi L, Knubel CP, Panzetta-Dutari GM, Motran CC (2013) The role of pregnancy-specific glycoprotein 1a (PSG1a) in regulating the innate and adaptive immune response. *Am J Reprod Immunol* 69:383-94
- Matsumoto N, Kubo A, Liu H, Akita K, Laub F, Ramirez F, Keller G, Friedman SL (2006) Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Kruppel-like factor 6. *Blood* 107:1357-65
- McCarthy FP, Drewlo S, English FA, Kingdom J, Johns EJ, Kenny LC, Walsh SK (2011) Evidence implicating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension* 58:882-7
- Mense SM, Sengupta A, Lan C, Zhou M, Bentsman G, Volsky DJ, Whyatt RM, Perera FP, Zhang L (2006) The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicol Sci* 93:125-35
- Meyer A, Seidler FJ, Cousins MM, Slotkin TA (2003) Developmental neurotoxicity elicited by gestational exposure to chlorpyrifos: when is adenylyl cyclase a target? *Environ Health Perspect* 111:1871-6
- Miller-Lindholm AK, LaBenz CJ, Ramey J, Bedows E, Ruddon RW (1997) Human chorionic gonadotropin-beta gene expression in first trimester placenta. *Endocrinology* 138:5459-65
- Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B (2005) Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta* 26:439-48
- Mink PJ, Kimmel CA, Li AA (2012) Potential effects of chlorpyrifos on fetal growth outcomes: implications for risk assessment. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 15:281-316
- Modi DN, Godbole G, Suman P, Gupta SK (2011) Endometrial biology during trophoblast invasion. *Front Biosci (Schol Ed)* 4:1151-71
- Monfared AL (2014) Histomorphological and ultrastructural changes of the placenta in mice exposed to formaldehyde. *Toxicol Ind Health* 30:174-81

- Morck TJ, Sorda G, Bechi N, Rasmussen BS, Nielsen JB, Ietta F, Rytting E, Mathiesen L, Paulesu L, Knudsen LE (2010) Placental transport and in vitro effects of Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 30:131-7
- Morell I, Candela L (1998) Comportamiento de los plaguicidas en suelos y aguas. En: Morell I, Candela L (eds) *Plaguicidas. Aspectos Ambientales, Analíticos y Toxicológicos*. Universitat Jaume I, Castelló, pp 9-23
- Morrish DW, Dakour J, Li H, Xiao J, Miller R, Sherburne R, Berdan RC, Guilbert LJ (1997) In vitro cultured human term cytotrophoblast: a model for normal primary epithelial cells demonstrating a spontaneous differentiation programme that requires EGF for extensive development of syncytium. *Placenta* 18:577-85
- Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B (2010) Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. *Hum Reprod* 25:1127-36
- Motrán CC, Diaz FL, Montes CL, Bocco JL, Gruppi A (2003) In vivo expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a induces alternative activation of monocytes and enhances Th2-type immune response. *Eur J Immunol* 33:3007-16
- Munoz-Quezada MT, Lucero BA, Barr DB, Steenland K, Levy K, Ryan PB, Iglesias V, Alvarado S, Concha C, Rojas E, Vega C (2013) Neurodevelopmental effects in children associated with exposure to organophosphate pesticides: a systematic review. *Neurotoxicology* 39:158-68
- Myatt L (2006) Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 572:25-30
- Myatt L, Cui X (2004) Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 122:369-82
- Myllynen P, Pasanen M, Pelkonen O (2005) Human placenta: a human organ for developmental toxicology research and biomonitoring. *Placenta* 26:361-71
- Myllynen P, Pasanen M, Vahakangas K (2007) The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3:331-46
- Myllynen P, Vahakangas K (2013) Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue. *Toxicol In Vitro* 27:507-12
- Myren M, Mose T, Mathiesen L, Knudsen LE (2007) The human placenta—an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro* 21:1332-40
- Nakanishi T, Kohroki J, Suzuki S, Ishizaki J, Hiromori Y, Takasuga S, Itoh N, Watanabe Y, Utoguchi N, Tanaka K (2002) Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2830-7
- Narasimha A, Vasudeva DS (2011) Spectrum of changes in placenta in toxemia of pregnancy. *Indian J Pathol Microbiol* 54:15-20
- Natarajan K, Xie Y, Nakanishi T, Beck WT, Bauer KS, Ross DD (2011) Identification and characterization of the major alternative promoter regulating Bcrp1/Abcg2 expression in the mouse intestine. *Biochim Biophys Acta* 1809:295-305
- Needham LL (2005) Assessing exposure to organophosphorus pesticides by biomonitoring in epidemiologic studies of birth outcomes. *Environ Health Perspect* 113:494-8
- Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I (2006) Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1085-93
- Nicholson R (2013) *The Placenta: Development, Function and Diseases*. 1<sup>st</sup> edition. Nova Science Pub Inc.
- Nores R, Blanchon L, Lopez-Diaz F, Bocco JL, Patrino LC, Sapin V, Panzetta-Dutari GM (2004) Transcriptional control of the human pregnancy-specific glycoprotein 5 gene is dependent on two GT-boxes recognized by the ubiquitous specificity protein 1 (Sp1) transcription factor. *Placenta* 25:9-19
- Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ (2001) Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 345:1400-8

- Oostingh GJ, Wichmann G, Schmittner M, Lehmann I, Duschl A (2009) The cytotoxic effects of the organophosphates chlorpyrifos and diazinon differ from their immunomodulating effects. *J Immunotoxicol* 6:136-45
- Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B (2010) Effects of vitamins C and E, acetylsalicylic acid and heparin on fusion, beta-hCG and PP13 expression in BeWo cells. *Placenta* 31:431-8
- Ostrea EM, Jr., Bielawski DM, Posecion NC, Jr., Corrion M, Villanueva-Uy E, Bernardo RC, Jin Y, Janisse JJ, Ager JW (2009) Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ Res* 109:116-22
- Ostrea EM, Morales V, Ngoumna E, Prescilla R, Tan E, Hernandez E, Ramirez GB, Cifra HL, Manlapaz ML (2002) Prevalence of fetal exposure to environmental toxins as determined by meconium analysis. *Neurotoxicology* 23:329-39
- Park PH, Lim RW, Shukla SD (2005) Involvement of histone acetyltransferase (HAT) in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:1124-36
- Parran DK, Magnin G, Li W, Jortner BS, Ehrich M (2005) Chlorpyrifos alters functional integrity and structure of an in vitro BBB model: co-cultures of bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes. *Neurotoxicology* 26:77-88
- Pasanen M (1999) The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 38:81-97
- Pattillo RA, Gey GO (1968) The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblastic cells in vitro. *Cancer Res* 28:1231-6
- Pavek P, Smutny T (2013) Nuclear receptors in regulation of biotransformation enzymes and drug transporters in the placental barrier. *Drug Metab Rev* 46:19-32
- Peiris-John RJ, Wickremasinghe R (2008) Impact of low-level exposure to organophosphates on human reproduction and survival. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:239-45
- Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, Bernert T, Garfinkel R, Tu YH, Diaz D, Dietrich J, Whyatt RM (2003) Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect* 111:201-5
- Peris-Sampedro F, Salazar JG, Cabré M, Reverte I, Domingo JL, Sánchez-Sante F, Colomina MT (2014) Impaired retention in A $\beta$ PP Swedish mice six months after oral exposure to chlorpyrifos. *Food and Chemical Toxicology* 72:289-294
- Perkins AV (2006) Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46:77-83
- Pidoux G, Gerbaud P, Cocquebert M, Segond N, Badet J, Fournier T, Guibourdenche J, Evain-Brion D (2012) Review: Human trophoblast fusion and differentiation: lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta* 33 Suppl:S81-6
- Pidoux G, Gerbaud P, Gnidehou S, Grynberg M, Geneau G, Guibourdenche J, Carette D, Cronier L, Evain-Brion D, Malassine A, Frenco JL (2010) ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:1517-26
- Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, Guibourdenche J, Bertin G, Vidaud M, Evain-Brion D, Frenco JL (2004) Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae. *Placenta* 25:469-73
- Polanska K, Jurewicz J, Hanke W (2013) Review of current evidence on the impact of pesticides, polychlorinated biphenyls and selected metals on attention deficit / hyperactivity disorder in children. *Int J Occup Med Environ Health* 26:16-38
- Pollheimer J, Knofler M (2012) The role of the invasive, placental trophoblast in human pregnancy. *Wien Med Wochenschr* 162:187-90
- Povey AC (2010) Gene-environmental interactions and organophosphate toxicity. *Toxicology* 278:294-304

- Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT (2010) Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update* 16:415-31
- Prouillac C, Lecoœur S (2010) The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos* 38:1623-35
- Qiao D, Seidler FJ, Slotkin TA (2001) Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells. *Environ Health Perspect* 109:909-13
- Racca AC, Camolotto SA, Ridano ME, Bocco JL, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2011) Krüppel-Like Factor 6 Expression Changes during Trophoblast Syncytialization and Transactivates BhCG and PSG Placental Genes. *PLoS ONE* 6: e22438
- Racca AC, Ridano ME, Camolotto S, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2015) A novel regulator of human villous trophoblast fusion: the Kruppel-like factor 6. *Mol Hum Reprod*
- Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R (2011) 7-Year Neurodevelopmental Scores and Prenatal Exposure to Chlorpyrifos, a Common Agricultural Pesticide. *Environ Health Perspect* 119:1196-201
- Recena MC, Pires DX, Caldas ED (2006) Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Sci Total Environ* 357:88-95
- Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ (2004) Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 114:744-54
- Reisinger K, Baal N, McKinnon T, Munstedt K, Zygmunt M (2007) The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? *Mol Cell Endocrinol* 269:65-80
- Richardson RJ, Hein ND, Wijeyesakere SJ, Fink JK, Makhaeva GF (2013) Neuropathy target esterase (NTE): overview and future. *Chem Biol Interact* 203:238-44
- Rieke S, Koehn S, Hirsch-Ernst K, Pfeil R, Kneuer C, Marx-Stoelting P (2014) Combination effects of (tri)azole fungicides on hormone production and xenobiotic metabolism in a human placental cell line. *Int J Environ Res Public Health* 11:9660-79
- Rita P, Reddy PP, Reddy SV (1987) Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh. *Environ Res* 44:1-5
- Roberts JM, Bell MJ (2013) If we know so much about preeclampsia, why haven't we cured the disease? *J Reprod Immunol* 99:1-9
- Robins JC, Marsit CJ, Padbury JF, Sharma SS (2011) Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. *Front Biosci (Elite Ed)* 3:690-700
- Rogers LK, Velten M (2011) Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: insights into adult cardiovascular disease. *Life Sci* 89:417-21
- Ross SM, McManus IC, Harrison V, Mason O (2013) Neurobehavioral problems following low-level exposure to organophosphate pesticides: a systematic and meta-analytic review. *Crit Rev Toxicol* 43:21-44
- Sadovsky Y, Clifton VL, Burton GJ (2014) Invigorating placental research through the "Human Placenta Project". *Placenta* 35:527
- Saito J, Hirota T, Furuta S, Kobayashi D, Takane H, Ieiri I (2013) Association between DNA methylation in the miR-328 5'-flanking region and inter-individual differences in miR-328 and BCRP expression in human placenta. *PLoS One* 8:e72906
- Saito S, Nakashima A (2014) A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia: the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling. *J Reprod Immunol* 101-102:80-8
- Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Round D (2008) Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells. *Toxicology* 244:98-110

- Saunders M, Magnanti BL, Correia Carreira S, Yang A, Alamo-Hernandez U, Riojas-Rodriguez H, Calamandrei G, Koppe JG, Krayer von Krauss M, Keune H, Bartonova A (2012) Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environ Health* 11:1:55
- Scifres CM, Nelson DM (2009) Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol* 587:3453-8
- Schuh RA, Lein PJ, Beckles RA, Jett DA (2002) Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 182:176-85
- Serrano MA, Macias RI, Briz O, Monte MJ, Blazquez AG, Williamson C, Kubitz R, Marin JJ (2007) Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28:107-17
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B, Hansen RL, Hertz-Picciotto I (2014) Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides: The CHARGE Study. *Environ Health Perspect* 112:1103-1109
- Shi QJ, Lei ZM, Rao CV, Lin J (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology* 132:1387-95
- Sies H (2014) Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem* 289:8735-41
- Slotkin TA, MacKillop EA, Ryde IT, Seidler FJ (2007) Ameliorating the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: a mechanisms-based approach in PC12 cells. *Environ Health Perspect* 115:1306-13
- Slotkin TA, Seidler FJ (2008) Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol Appl Pharmacol* 233:211-9
- Solomon KR, Williams WM, Mackay D, Purdy J, Giddings JM, Giesy JP (2014) Properties and uses of chlorpyrifos in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol* 231:13-34
- Song X, Seidler FJ, Saleh JL, Zhang J, Padilla S, Slotkin TA (1997) Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol Appl Pharmacol* 145:158-74
- Souza MS, Magnarelli de Potas G, Pechen de D'Angelo AM (2004) Organophosphorous and organochlorine pesticides affect human placental phosphoinositides metabolism and PI-4 kinase activity. *J Biochem Mol Toxicol* 18:30-6
- Souza MS, Magnarelli GG, Rovedatti MG, Cruz SS, De D'Angelo AM (2005) Prenatal exposure to pesticides: analysis of human placental acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase as biomarkers of effect. *Biomarkers* 10:376-89
- Steenland K, Dick RB, Howell RJ, Chrislip DW, Hines CJ, Reid TM, Lehman E, Laber P, Krieg EF, Jr., Knott C (2000) Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos. *Environ Health Perspect* 108:293-300
- Stillerman KP, Mattison DR, Giudice LC, Woodruff TJ (2008) Environmental exposures and adverse pregnancy outcomes: a review of the science. *Reprod Sci* 15:631-50
- Stocco C (2011) Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 77:27-35
- Storvik M, Huuskonen P, Pehkonen P, Pasanen M (2014) The unique characteristics of the placental transcriptome and the hormonal metabolism enzymes in placenta. *Reprod Toxicol* 47:9-14
- Takeuchi S, Iida M, Yabushita H, Matsuda T, Kojima H (2008) In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere* 74:155-65
- Tang Z, Abrahams VM, Mor G, Guller S (2011) Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1221:103-8



- Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A (2015) Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol* 218:50-58
- Terry AV, Jr. (2012) Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol Ther* 134:355-65
- Thiele K, Kessler T, Arck P, Erhardt A, Tiegs G (2013) Acetaminophen and pregnancy: short- and long-term consequences for mother and child. *J Reprod Immunol* 97:128-39
- Thirkill TL, Douglas GC (1997) Differentiation of human trophoblast cells in vitro is inhibited by dimethylsulfoxide. *J Cell Biochem* 65:460-8
- Tirelli V, Catone T, Turco L, Di Consiglio E, Testai E, De Angelis I (2007) Effects of the pesticide clorpyrifos on an in vitro model of intestinal barrier. *Toxicol In Vitro* 21:308-13
- Tsatsakis AM, Androutsopoulos VP, Zafiroopoulos A, Babatsikou F, Alegakis T, Dialyna I, Tzatzarakis M, Koutis C (2011) Associations of xenobiotic-metabolizing enzyme genotypes PON1Q192R, PON1L55M and CYP1A1\*2A MspI with pathological symptoms of a rural population in south Greece. *Xenobiotica* 41:914-25
- Tsatsakis AM, Zafiroopoulos A, Tzatzarakis MN, Tzanakakis GN, Kafatos A (2009) Relation of PON1 and CYP1A1 genetic polymorphisms to clinical findings in a cross-sectional study of a Greek rural population professionally exposed to pesticides. *Toxicol Lett* 186:66-72
- Urtasun R, Cubero FJ, Nieto N (2012) Oxidative Stress Modulates KLF6(Full) and Its Splice Variants. *Alcohol Clin Exp Res* 36:1851-62
- Vahakangas K, Raunio H, Pasanen M, Sivonen P, Park SS, Gelboin HV, Pelkonen O (1989) Comparison of the formation of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in vitro by rat and human microsomes: evidence for the involvement of P-450IA1 and P-450IA2. *J Biochem Toxicol* 4:79-86
- Vaiserman A (2014) Early-life Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Later-life Health Outcomes: An Epigenetic Bridge? *Aging Dis* 5:419-29
- van der Linden AM, Tiktak A, Boesten JJ, Leijnse A (2009) Influence of pH-dependent sorption and transformation on simulated pesticide leaching. *Sci Total Environ* 407:3415-20
- van Ravenswaaij R, Tesselaar-van der Goot M, de Wolf S, van Leeuwen-Spruijt M, Visser GH, Schielen PC (2011) First-trimester serum PAPP-A and beta-hCG concentrations and other maternal characteristics to establish logistic regression-based predictive rules for adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn* 31:50-7
- Venerosi A, Ricceri L, Tait S, Calamandrei G (2012) Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: the case of chlorpyrifos. *Neurotoxicology* 33:1420-6
- Ventura C, Nunez M, Miret N, Martinel Lamas D, Randi A, Venturino A, Rivera E, Cocca C (2012) Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicol Lett* 213:184-93
- Verger PJ, Boobis AR (2013) Global food supply. Reevaluate pesticides for food security and safety. *Science* 341:717-8
- Verma R, Mishra S, Kaul JM (2010) Cellular Changes in the Placenta in Pregnancies Complicated with Diabetes. *Int J Morphol* 28:259-264
- Vicovac L, Jones CJ, Aplin JD (1995) Trophoblast differentiation during formation of anchoring villi in a model of the early human placenta in vitro. *Placenta* 16:41-56
- Villaamil Lepori EC, Bovi Mitre G, Nasetta M (2013) Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. *Rev Int Contam Ambie* 29 (Número especial sobre plaguicidas):25-43
- Villanueva ME, Sanhueza V, Reyes J, Neira L (2010) Alteraciones morfológicas en placentas de madres expuestas a pesticidas. *Rev Hosp Clín Univ Chile* 21:244-8

- Wang X, Campos CR, Peart JC, Smith LK, Boni JL, Cannon RE, Miller DS (2014) Nrf2 upregulates ATP binding cassette transporter expression and activity at the blood-brain and blood-spinal cord barriers. *J Neurosci* 34:8585-93
- Wessels D, Barr DB, Mendola P (2003) Use of biomarkers to indicate exposure of children to organophosphate pesticides: implications for a longitudinal study of children's environmental health. *Environ Health Perspect* 111:1939-46
- Whyatt RM, Camann D, Perera FP, Rauh VA, Tang D, Kinney PL, Garfinkel R, Andrews H, Hoepner L, Barr DB (2005) Biomarkers in assessing residential insecticide exposures during pregnancy and effects on fetal growth. *Toxicol Appl Pharmacol* 206:246-54
- Whyatt RM, Rauh V, Barr DB, Camann DE, Andrews HF, Garfinkel R, Hoepner LA, Diaz D, Dietrich J, Reyes A, Tang D, Kinney PL, Perera FP (2004) Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. *Environ Health Perspect* 112:1125-32
- Wojtowicz AK, Augustowska K, Gregoraszczyk EL (2007) The short- and long-term effects of two isomers of DDT and their metabolite DDE on hormone secretion and survival of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Pharmacol Rep* 59:224-32
- Wortman AC, Alexander JM (2013) Placenta accreta, increta, and percreta. *Obstet Gynecol Clin North Am* 40:137-54
- Xing H, Wang Z, Wu H, Zhao X, Liu T, Li S, Xu S (2015) Assessment of pesticide residues and gene expression in common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos: Health risk assessments. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:491-498
- Yagel S, Casper RF, Powell W, Parhar RS, Lala PK (1989) Characterization of pure human first-trimester cytotrophoblast cells in long-term culture: growth pattern, markers, and hormone production. *Am J Obstet Gynecol* 160:938-45
- Yang M, Lei ZM, Rao Ch V (2003) The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144:1108-20
- Yang WJ, Song MJ, Park EY, Lee JJ, Park JH, Park K, Kim HP (2013) Transcription factors Sp1 and Sp3 regulate expression of human ABCG2 gene and chemoresistance phenotype. *Mol Cells* 36:368-75
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- Yeh CC, Chao KC, Huang SJ (2013) Innate immunity, decidual cells, and preeclampsia. *Reprod Sci* 20:339-53
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60:6-20
- Zaganas I, Kapetanaki S, Mastorodemos V, Kanavouras K, Colosio C, Wilks MF, Tsatsakis AM (2013) Linking pesticide exposure and dementia: what is the evidence? *Toxicology* 307:3-11
- Zhang Y, Han S, Liang D, Shi X, Wang F, Liu W, Zhang L, Chen L, Gu Y, Tian Y (2014) Prenatal exposure to organophosphate pesticides and neurobehavioral development of neonates: a birth cohort study in Shenyang, China. *PLoS One* 9:e88491
- Zhao M, Zhang Y, Zhuang S, Zhang Q, Lu C, Liu W (2014) Disruption of the hormonal network and the enantioselectivity of bifenthrin in trophoblast: maternal-fetal health risk of chiral pesticides. *Environ Sci Technol* 48:8109-16
- Zhou J, Li J, Yan P, Ye YH, Peng W, Wang S, Wang XT (2014) Maternal plasma levels of cell-free beta-HCG mRNA as a prenatal diagnostic indicator of placenta accrete. *Placenta* 35:691-5
- Zhou J, Xiong K, Yang Y, Ye X, Liu J, Li F (2015) Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells. *Reproductive Toxicology* 51:61-74
- Zhou Y, Gormley MJ, Hunkapiller NM, Kapidzic M, Stolyarov Y, Feng V, Nishida M, Drake PM, Bianco K, Wang F, McMaster MT, Fisher SJ (2013) Reversal of gene dysregulation in cultured cytotrophoblasts reveals possible causes of preeclampsia. *J Clin Invest* 123:2862-72

**R-T**

**572.86**

**R**

**13852**



**\*13852\***