

***El factor de transcripción KLF6  
regula la proliferación, fusión y  
migración de las células  
trofoblásticas***



Andrea Lis Miranda

Córdoba

2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica.

CIBICI- CONICET



*El factor de transcripción KLF6 regula  
la proliferación, fusión y migración de  
las células trofoblásticas*

TESIS DOCTORAL

Andrea Lis Miranda

Director: Graciela M. Panzetta-Dutari

Córdoba, 2021

A mi mamá Mary

A mi papá Juan Carlos

A mi hermana Jazmín

A mis abuelos Isabel y Nacho

A mis amigas Beti, Fiama y Juani

***Comisión asesora de Tesis***

Dra. Caputto Beatriz

Dra. Genti Raimondi Susana

Dra. Vivas Laura

***Evaluador externo***

Dra. Varone Cecilia

***Directora de tesis***

Dra. Panzetta Dutari Graciela M.

Este trabajo de Tesis fue realizado gracias al apoyo económico de CONICET,  
FONCyT, y SECyT-UNC

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización y finalización de esta tesis no hubiera sido posible sin la contribución de todas aquellas personas que me guiaron, acompañaron y aconsejaron durante esta etapa. Por eso quiero expresarle mi profundo agradecimiento:

A la familia científica que me acompañó en todo el trayecto de esta tesis. A mi directora, la Dra. Graciela Panzetta (mamá de ciencia) por haberme recibido en su grupo y aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Su apoyo, paciencia, dedicación y su capacidad para entenderme y guiar mis ideas han sido un aporte invaluable no solo para mi labor científica, sino también personal. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. A la Dra. Susana Genti (tía Susi) por brindarme sus conocimientos, consejos y herramientas que junto con su practicidad y capacidad resolutive contribuyeron enormemente a la realización de esta tesis y a mi formación. Además, por las numerosas ocasiones en las que nos deleitó con sus exquisiteces. A la Dra. Ana Racca, la hermana mayor, que me enseñó a desenvolverme mejor experimentalmente y trabajó conmigo durante largas jornadas purificando células placentales, a la que molesté mil veces pidiéndole un consejo, una sugerencia o una opinión y ella siempre estuvo ahí para lo que necesitará, brindándome sus conocimientos y ayuda de manera desinteresada. A mis hermanos mellizos de ciencia Lu, Lau y Mariano que hicieron de este doctorado una experiencia única, sin ellos nada hubiera sido igual. Siempre apoyando y ayudándome a ejecutar mis ideas, estuvieron para festejar cuando los experimentos salían bien o alentar cuando se presentaban dificultades, para compartir una charla científica y las no científicas, para salidas, viajes a congresos, presentaciones en la noche de los museos, asados y muchos otros momentos. A Jesi y Luci (las otras tías), por el acompañamiento durante todos estos años y el aporte de sus conocimientos y sugerencias que hicieron al desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Laura Vivas y la Dra. Betty Caputto, miembros de mi comisión asesora, por sus aportes y esfuerzo puesto en mi tesis a lo largo de estos cinco años, por su amabilidad y predisposición en cada reunión, y a la Dra. Cecilia Varone por haber aceptado la tarea de evaluar mi tesis.

Al Dr. Alexandre Borbely de la Universidad Federal de Alagoas quien me recibió cálidamente en su laboratorio, por el esfuerzo y tiempo invertido para concretar los experimentos que se vieron afectados por el inicio de la pandemia y que fueron una importante contribución a esta tesis, por su amabilidad, hospitalidad, y gentileza y por los paseos por la ciudad y la playa junto a su familia; a sus becarias y especialmente a Lays quien junto a su mamá me hospedaron en su casa, porque siempre estuvieron pendientes

de que me sintiera cómoda, por su predisposición para ayudarme a concretar mis objetivos experimentales, por las charlas en “portuñol”, los almuerzos a pura risas probando comidas típicas, y el apoyo y mensajitos de buenos deseos que me brindaron cuando tuve que emprender la repentina vuelta al país por la situación pandémica.

A los miembros del laboratorio 119-120. A los Dres. Gastón Soria, José Echenique, José Bocco, Alex Saka, Cecilia Alvaréz y Claudia Sola por facilitar la tarea diaria compartiendo tanto material de trabajo como sus conocimientos. A los becarios (Pablo, Lu Sampieri, Emi, Nico, Dani, Nubia, Ale, Cande, Lau, Flor Pansa, Flor Villafañez, Cintia, Andrés, Mirelys y Nadia) por compartir las jornadas diarias de trabajo creando un clima agradable y divertido y por las numerosas experiencias, almuerzos, charlas y *afterlabs* durante estos cinco años.

A las CPA, Gabriela Furlan, Pilar Crespo, Laura Gatica, Alejandra Romero y Paula Abadie por su predisposición para enseñarme y facilitarme el uso de equipos y material para desarrollar la parte experimental de esta tesis. También quisiera agradecer al resto de los integrantes del Departamento de Bioquímica Clínica por hacer posibles las tareas laborales diarias, la buena onda y los hermosos festejos del día de la primavera.

Finalmente quiero agradecer a mi familia a mi mamá y a mi papá por su apoyo incondicional en todo lo que hago preocupándose por que alcance mis metas y propósitos. A mi hermana Jazmín que es un pilar fundamental en mi vida, por la comprensión, la escucha y el acompañamiento, aunque sea a la distancia, durante toda esta etapa. A mi hermano Matías y su familia por que a pesar de la distancia sé que siempre puedo contar con ellos. A mi abuelo Nacho por ser un ejemplo de perseverancia y adaptación ante las situaciones más difíciles, a mi abuela Isabel, por su ejemplo de fortaleza y superación, por esa abuela compinche que me acompañó en cada etapa de mi vida y aunque ya no está físicamente sé que también me acompaña en este momento desde otro lugar.

A mis amigas y amigos Nico, Eloy, Poly, Flor, Ani, Vale, Dana, Pao, Lucia, Tamy, Nany, Dalma y Colo, que de alguna forma u otra me han acompañado a lo largo de estos cinco años, a Curi y sus alumnos por esas clases de zumba que te levantan si tuviste un día difícil, te sacan una risa, y te cargan las pilas para encarar las cosas con optimismo. Y especialmente a mis amigas Beti, Fiama y Juani que han vivido cada etapa de esta tesis conmigo brindándome su apoyo incondicional.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	2
<b>RESUMEN</b>	5
<b>ABSTRACT</b>	8
<b>INTRODUCCIÓN: Parte I</b>	11
CÉLULAS PLACENTALES Y TUMORALES	11
LA PLACENTA Y SU DESARROLLO	20
DIFERENCIACIÓN TROFOBLÁSTICA A TRAVÉS DE LA VÍA VELLOSA	21
DIFERENCIACIÓN TROFOBLÁSTICA A TRAVÉS DE LA VÍA EXTRAVELLOSA	26
COMPLICACIONES DEL EMBARAZO ASOCIADAS A UNA DIFERENCIACIÓN DEFECTUOSA DE LAS CÉLULAS PLACENTALES	28
<b>INTRODUCCIÓN: Parte II</b>	32
FACTOR TIPO KRÜPPEL 6: KLF6	32
KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA Y LA FUSIÓN DEL TROFOBLASTO VELLOSO	36
ROL DE KLF6 EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR	37
<b>HIPOTESIS</b>	40
<b>OBJETIVOS</b>	40
<b>RESULTADOS: parte I</b>	42
KLF6 Y SU IMPLICANCIA EN LA FUSIÓN CELULAR	42
GENERACIÓN DE CÉLULAS BeWo-KLF6 y BeWo-KLF6 $\Delta$ ac	42
LA SOBREENPRESIÓN DE KLF6 INCREMENTA LA FUSIÓN DE CÉLULAS BeWo	43
FUSIÓN INDUCIDA POR KLF6 E INDUCIDA POR FSK	44
KLF6 MODULA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS ASOCIADAS A DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS BeWo	46
LOS NIVELES DE KLF6 MODULAN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS BeWo HACIA UN FENOTIPO SINCICIAL	48
EL AUMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE KLF6 DISMINUYE EL CRECIMIENTO CELULAR E INCREMENTA LOS NIVELES DE p21	49
EL SILENCIAMIENTO DE p21 DISMINUYE EL ÍNDICE DE FUSIÓN DE CÉLULAS BeWo-KLF6	50
EL DOMINIO ACÍDICO DE KLF6 ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS BeWo	52
PARTICIPACIÓN DE KLF6 EN LA FUSIÓN DE CITOTROFOBLASTOS VELLOSO A ISLADOS DE PLACENTA HUMANA	54
<b>RESULTADOS: parte II</b>	60
PARTICIPACIÓN DE KLF6 EN LA MIGRACIÓN CELULAR	60

EL SILENCIAMIENTO DE KLF6 CONDUCE A UN INCREMENTO DE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS HTR8/SVneo	60
LA SOBREENPRESIÓN DE KLF6 NO MODIFICA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS EXTAVELLOSAS	62
LA DELECCIÓN DEL DOMINIO ACÍDICO DE KLF6 INCREMENTA LA MIGRACIÓN	63
MUTACIÓN EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL ADN DE KLF6 NO PRODUCE CAMBIOS EN LA MIGRACIÓN CELULAR	65
EL SILENCIAMIENTO DE KLF6 INCREMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA MIGRACIÓN	67
ORIENTACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS (MTOC) EN CÉLULAS SILENCIADAS PARA KLF6	69
TRASLOCACIÓN DE $\beta$ -CATENINA AL NÚCLEO	71
CAMBIOS MORFOLÓGICOS ASOCIADOS A LA PÉRDIDA DE FUNCIONALIDAD DE KLF6	72
LA SOBREENPRESIÓN DE KLF6 $\Delta$ ac DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	74
ANÁLISIS CELULAR Y MOLECULAR DE CÉLULAS HTR8-KLF6 $\Delta$ AC POR MÉTODOS NO INVASIVOS	75
<b>RESULTADOS: parte III</b>	85
KLF6 EN PLACENTAS PATOLÓGICAS	85
<b>DISCUSIÓN</b>	90
KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TROFOBLASTO VELLOSO	90
KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TROFOBLASTO EXTRAVELLOSO	94
KLF6 Y SU RELACIÓN CON PATOLOGÍAS PLACENTALES Y TUMORALES ASOCIADAS AL EMBARAZO	100
<b>CONCLUSIONES</b>	103
<b>PERSPECTIVAS</b>	104
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	107
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	126



# *ABREVIATURAS*

## ABREVIATURAS

ADNc: **ADN** copia

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica, *Atomic Force Microscopy*

ARNm: **ARN** mensajero

Cx43: **Conexina** 43

CK7: Citoqueratina 7, *Cytokeratin 7*

CTB: **Citotrofoblasto**

CTBv: **Citotrofoblasto** vellosos

CTBev: **Citotrofoblasto** extraveloso

CTBen: **Citotrofoblasto** endovascular

CTBin: **Citotrofoblasto** intersticial

EGF: Factor de crecimiento epidermal, *Epidermal Growth Factor*

EMT: Transición epitelio mesenquimal, *Epithelial-Mesenchymal Transition*

FSK: **Forskolin**

Gal-1: **Galectina** 1

GFP: Proteína fluorescente verde, *Green Fluorescent Protein*

GTD: Enfermedad trofoblástica gestacional, *Gestational Trophoblastic Disease*

GJIC: Comunicación Intercelular tipo Gap Junction, *Gap Junctional Intercellular Communication*

hCG: Hormona Gonadotrofina Coriónica humana, *human Chorionic Gonadotropin*

HIF-1: Factor inducible por hipoxia, *Hypoxia-inducible factor 1*

IUGR: Restricción del crecimiento intrauterino, *Intrauterine Growth Restriction*

KGM: Medio de crecimiento de queratinocitos, *Keratinocyte Growth Media*

KLF6: Factor tipo Krüppel 6, *Krüppel-like factor-6*

miR: micro ARN, *Micro RNA*

MMP: **Metaloproteasas** de **Matriz**

PE: **Preclampsia**

PCA: Análisis de componentes principales, *Principal Component Analysis*

PSG: Glicoproteínas Específicas del Embarazo, *Pregnancy Specific Glycoproteins*

qRT-PCR: Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, *quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*

ROS: Especies reactivas del oxígeno, *Reactive Oxygen Species*

siARN: **ARN** pequeño de interferencia, *Small interference RNA*

SFB: **Suero Fetal Bovino**

SCR: mezcla de ARN pequeños al azar, *Scramble*

siKLF6: **siARN** específico para **KLF6**

STB: **Sinciotrofoblasto**

Syn-1: **Sincitina-1**

TGFβ: **Factor transformante** β

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas, *Unfolded Protein Response*

uNK: células asesinas uterinas, *uterine Natural Killer*

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor

WB: *Western Blot*



# *RESUMEN*

## RESUMEN

La placenta es un órgano temporal clave durante el embarazo ya que ejerce la conexión entre la madre y el feto por lo que su correcta formación y funcionamiento es fundamental para el bienestar fetal y el progreso del embarazo. El desarrollo temprano de la placenta humana se considera, en algunos aspectos, similar a la carcinogénesis. Ambos se desarrollan en un ambiente con bajos niveles de oxígeno, su desarrollo es modulado por el sistema inmunológico, la expresión de protooncogenes, microARNs y genes supresores tumorales. Además, las células placentales y tumorales tienen una alta capacidad para proliferar, fusionarse, migrar e invadir. La principal diferencia entre la progresión del cáncer y el desarrollo de la placenta es que, en esta última, estos procesos están estrictamente regulados. La desregulación de algunos de estos procesos se asocia con complicaciones del embarazo como preeclampsia, retardo del crecimiento intrauterino, placentas cretas, entre otras.

Durante el desarrollo placentario las células progenitoras de la placenta, los citotrofoblastos (CTB), proliferan rápidamente y comienzan a diferenciarse, algunas para dar origen por fusión celular al sinciciotrofoblasto (STB) multinucleado y algunas hacia el trofoblasto extraveloso migratorio y altamente invasivo que permite anclar la placenta al útero materno.

KLF6 es un factor de transcripción ubicuo con un dominio de transactivación ácido N-terminal y un dominio de unión al ADN tipo dedos de zinc C-terminal. KLF6 es altamente expresado en la placenta. Los ratones *Klf6*<sup>-/-</sup> mueren en el día embrionario 12,5 mostrando deterioro del desarrollo de la placenta. Previamente, se demostró que KLF6 es necesario para la fusión célula-célula en cultivos primarios de citotrofoblastos vellosos (CTBv), así como en la línea celular BeWo derivada de trofoblasto y modula la expresión de la proteína inhibidora del ciclo celular p21, de sincitina-1 (Syn-1) y de la subunidad  $\beta$  de la gonadotropina coriónica humana ( $\beta$ -hCG). Además, la inmunoreactividad de KLF6 es mayor en el lecho placentario de las placentas provenientes de embarazos con preeclampsia que en las de los embarazos sin complicaciones. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual KLF6 regula la diferenciación del CTBv y no existen reportes sobre el rol de KLF6 en el proceso de migración e invasión de los citotrofoblastos extravelosos (CTBev). En contextos tumorales, KLF6 actúa como un gen supresor de tumores. De hecho, la disminución en los niveles de KLF6 aumenta la tumorigenicidad y la metástasis en numerosos tipos de cáncer. No obstante, también se ha informado el efecto contrario en células normales y cancerosas.

En esta tesis se estudió el mecanismo por el cual KLF6 participa en la diferenciación de los CTBv los cuales fusionan para formar el STB. Se demostró que KLF6 es suficiente para desencadenar la fusión de células BeWo. Además, KLF6 incrementó la expresión de moléculas importantes involucradas en este proceso, entre ellas  $\beta$ -hCG, Syn-1 y p21, y disminuyó la proliferación celular. Mientras que, una mutante de KLF6 que carece del dominio ácido, implicado en la actividad transcripcional (KLF6 $\Delta$ ac), disminuyó la sincialización *in vitro* de cultivos primarios de CTBv, así como, la expresión de Syn-1 y  $\beta$ -hCG. Además, la fusión celular desencadenada por KLF6 se redujo en células silenciadas para p21. Estos resultados sugieren que KLF6 induce la sincialización de CTBv a través de un mecanismo que involucra su dominio regulador de la transcripción de una manera dependiente de p21.

Por otro lado, se demostró que KLF6 está involucrado en la diferenciación del CTBev. La disminución en la expresión de KLF6 o la sobreexpresión de la mutante carente del dominio ácido (KLF6 $\Delta$ ac) incrementó la migración, la actividad de la metaloproteinasa 9 y la expresión de moléculas importantes involucradas en la migración y la transición epitelio-mesenquimal (EMT), como  $\beta$ -catenina, conexina-43, integrinas  $\alpha$ 5 y  $\beta$ 1. Además, provocó cambios morfológicos compatibles con la EMT confirmados por estudios de microscopía de fuerza atómica y Raman. En línea con los datos obtenidos *in vitro*, se demostró que placentas cretas, caracterizadas por ser anormalmente invasivas, poseen niveles de inmunomarcación para KLF6 más bajos con mayor localización citoplasmática en comparación con placentas normales.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que KLF6 es un regulador maestro de la diferenciación celular en la vía sincial y que su dominio de transactivación N-terminal es necesario para esta función. Mientras que, en la diferenciación de los CTBev, KLF6 actúa regulando negativamente la migración a través de la modulación de la expresión de moléculas importantes involucradas en este proceso.

En resumen, los resultados actuales permiten proponer a KLF6 como un regulador clave de la diferenciación del trofoblasto a través de la vía vellosa y extravellosa, y sugieren que la desregulación en su nivel de expresión o la pérdida de su actividad transcripcional contribuiría al desarrollo de patologías como preeclampsia y placentas cretas.



*ABSTRACT*

## ABSTRACT

The placenta is a key temporary organ during pregnancy. It establishes critical relationships between the mother and the fetus, so its correct formation and functioning is essential for fetal well-being and the outcome of the pregnancy. Early human placental development resembles carcinogenesis in otherwise healthy tissues. The placental and tumor development share numerous features. Both take place in an environment with low levels of oxygen, their development is modulated by the immune system and the expression of protooncogenes, microRNAs and tumor suppressor genes. Furthermore, placental and tumor cells have a high capacity to proliferate, fuse, migrate and invade. The main difference between cancer progression and placenta development is the tight regulation of these processes in the placenta. However, the dysregulation of these processes is associated with pregnancy complications such as preeclampsia, intrauterine growth restriction and placentas cretas, among others.

During development, placental progenitor cells, the cytotrophoblasts (CTB), rapidly proliferate and begin to differentiate, some towards the villous pathway to form the multinucleated syncytiotrophoblast (STB) by cell-cell fusion and some towards the highly invasive and migratory extravillous trophoblasts (EVT) that anchor the placenta to the uterus.

KLF6 is a ubiquitous transcription factor with an N-terminal acidic transactivation domain and a C-terminal zinc finger DNA-binding domain. KLF6 is highly expressed in placenta. *Klf6*<sup>-/-</sup> mice die at day E12.5 showing impaired placenta development. Previously, it was demonstrated that KLF6 is required for cell-cell fusion in primary culture of human villous cytotrophoblasts (vCTB) isolated from term placenta, as well as in the BeWo trophoblast-derived cell line and it modulates the expression of the cell cycle inhibitory protein p21, syncytin-1 (Syn-1), and the  $\beta$  subunit of the human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG). Additionally, KLF6 immunoreactivity is higher in the placental bed of preeclamptic pregnancies than in those of uncomplicated pregnancies. However, the mechanism by which KLF6 regulates CTBv differentiation is unknown and there are no reports about the role of KLF6 in the process of migration and invasion of the EVT. In cancer, KLF6 acts mainly as a tumor suppressor gene. Indeed, KLF6 knockdown increases the tumorigenicity and metastasis in numerous types of cancer. Nevertheless, the opposite effect has been also reported in normal and cancer cells.

In this thesis, the mechanism by which KLF6 participates in CTB differentiation through the villous and extravillous pathways was explored. It was demonstrated that KLF6 is sufficient to trigger cell fusion and to increase the expression of important molecules involved in this process, such as  $\beta$ -hCG, Syn-1 and p21, in addition, it

downregulates cell proliferation. Furthermore, a KLF6 mutant lacking the acidic domain involved in its transcriptional activity (KLF6 $\Delta$ ac) impaired the *in vitro* syncytialization of villous trophoblast cells isolated from human term placentas and decreased Syn-1 and  $\beta$ -hCG expression. Moreover, cell fusion triggered by KLF6 was reduced in cells silenced for p21. These results suggest that KLF6 induces vCTB syncytialization through a mechanism that involves its regulatory transcriptional domain in a p21-dependent manner.

Additionally, the KLF6 involvement in EVT differentiation was established. The decrease in KLF6 expression or the overexpression of the transcriptionally inactive mutant (KLF6 $\Delta$ ac) increase cell migration, metalloproteinase 9 activity, and the expression of molecules involved in migration and epithelial mesenchymal transition (EMT) such as  $\beta$ -catenin, connexin-43, integrin  $\alpha$ 5 and  $\beta$ 1. In addition, it causes morphological changes consistent with EMT, confirmed by atomic force microscopy and Raman studies. In line with the data obtained *in vitro*, it was shown that placentas cretas, characterized by being abnormally invasive, have lower KLF6 immunostaining levels and more cytoplasmic localization compared to normal placentas.

The results obtained in this thesis suggest that KLF6 is a master regulator of cell differentiation into the syncytial pathway and that its N-terminal transactivation domain is required for this function. While in EVT differentiation, KLF6 negatively regulates migration by modulating the expression of important molecules involved in this process.

In summary, current results allow proposing KLF6 as a key regulator of trophoblast differentiation through the villous and extravillous pathways and suggest that dysregulation in its expression level or the loss of its transcriptional activity may contribute to the development of pregnancy pathologies like preeclampsia and placentas cretas.



# *INTRODUCCIÓN*

## INTRODUCCIÓN: Parte I

### CÉLULAS PLACENTALES Y TUMORALES

Uno de los procesos esenciales para el éxito del embarazo y el correcto desarrollo fetal es la formación de la placenta, la cual constituye el vínculo fisiológico y mecánico entre la madre y el feto. Este vínculo se establece fundamentalmente a través de las células epiteliales de origen fetal llamadas trofoblastos (Ji et al., 2013). Se conocen numerosas patologías placentarias que conducen a complicaciones del embarazo con un impacto directo en la salud fetal y materna (Benirschke et al., 2006; Bose et al., 2006; Chiang et al., 2009; Redman and Sargent, 2009). Además, los defectos en la función placental condicionan el desarrollo de patologías en la vida adulta del niño/a por nacer y en la salud futura de la madre (Myatt, 2006; Barker and Thornburg, 2013).

Patologías asociadas al embarazo como la preeclampsia (PE), y el espectro de placentas cretas se caracterizan por una desregulación en procesos como la proliferación, migración, invasión y fusión celular conduciendo a un comportamiento anormal de las células trofoblásticas que forman la placenta (Jauniaux and Jurkovic, 2012; Costa, 2016; Jauniaux et al., 2017; Huppertz, 2018). Estas patologías suponen una carga para el sistema de salud ya que representan una amenaza para la salud materna y fetal. Otra complicación de la gestación menos común, caracterizada por la proliferación anormal del tejido trofoblástico, es la enfermedad trofoblástica gestacional (GTD, **G**estational **T**rophoblastic **D**isease). La misma incluye un amplio espectro de entidades clinicopatológicas que abarcan GTD benignas como la mola hidatiforme completa y la mola hidatiforme parcial, hasta patologías malignas como la mola hidatiforme invasiva, coriocarcinoma, tumor del sitio placentario y tumor trofoblástico epitelial (Hui, 2019; Ning et al., 2019).

El desarrollo placentario presenta varias similitudes con la carcinogénesis (Fig. 1). Ambos ocurren en ambientes que pasan por períodos con bajos niveles de oxígeno, su desarrollo es modulado por el sistema inmune, expresan protooncogenes, genes supresores de tumores y microARNs (miR) implicados en procesos similares de proliferación, fusión, migración / invasión y angiogénesis (West et al., 2018). La principal diferencia entre la progresión del cáncer y el desarrollo de la placenta es que en este último, estos procesos están estrictamente regulados espacial y temporalmente, en cambio en el cáncer el orden de los eventos es estocástico e independiente del tiempo (Ferretti et al., 2007; Holtan et al., 2009).

La comprensión de estos paralelismos y diferencias entre la placentación y la tumorigénesis es importante, por un lado, para comprender cómo el control de estos procesos puede fallar y generar diferentes patologías o complicaciones durante el embarazo, y por otro, para obtener información que no solo contribuye al estudio del trofoblasto humano, sino también del cáncer.

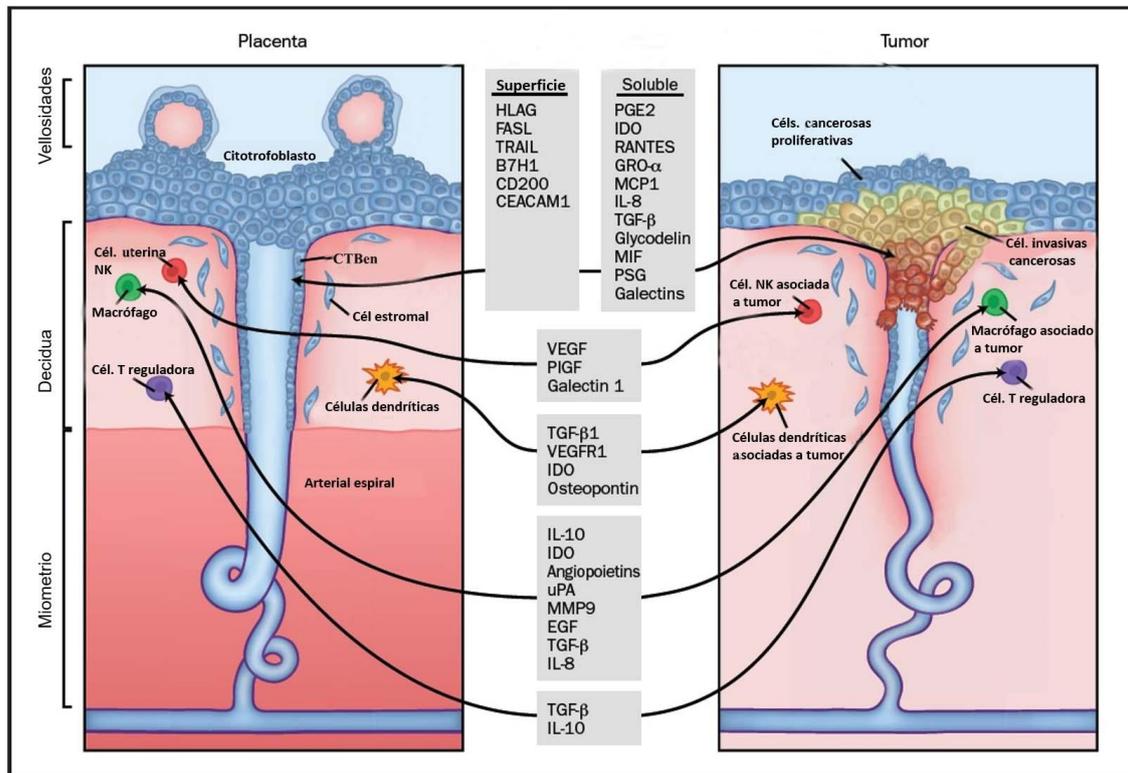


Figura 1. Esquema comparativo de las similitudes entre la interfaz materno-fetal y un tumor y su medioambiente. (Adaptado de Holtan et al., 2009).

### Respuesta inmune

La modulación de la respuesta inmune es otro aspecto esencial en el desarrollo de un embarazo saludable y en la progresión tumoral. En ambos contextos, la respuesta inflamatoria es regulada por células de la respuesta inmune innata como macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK), y por células de la respuesta inmune adaptativa, linfocitos T y B (Fig.1) (Hanahan and Weinberg, 2011; Holtan et al., 2009). En un contexto tumoral, para que el tumor no sea rechazado inmunológicamente, y en el contexto de la placenta, para evitar el rechazo del feto por el sistema inmune materno, se genera un efecto protector a través del balance de los linfocitos Th1 / Th2, generando una primera etapa pro-inflamatoria y luego una anti-inflamatoria (Holtan et al., 2009; Soeters and Grimbale, 2013). En el embarazo, la tolerancia inmunológica entre la madre y el feto depende de manera crítica de los mecanismos basados en células T supresoras / reguladoras (Treg). En la placenta

las células Treg se expanden tanto en la decidua como en la sangre periférica y una disminución de estos linfocitos se asocia con aborto espontáneo y PE (Holtan et al., 2009).

Además de los mecanismos basados en células Treg, las células trofoblásticas adoptan otras estrategias similares a las células tumorales como la expresión de moléculas no clásicas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-G, HLA-E o HLA-C), el catabolismo del triptófano por la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa y la apoptosis de células T, entre otras (Bronchud et al., 2016).

### *Hipoxia y Angiogénesis*

El oxígeno juega un rol importante en el control del desarrollo de la placenta y en el comportamiento tumoral. El desarrollo temprano de la placenta tiene lugar en un ambiente con bajo nivel de oxígeno, lo cual se cree que impide el daño oxidativo placentar en esa etapa de la gestación. Hacia el final del primer trimestre la presión de oxígeno aumenta debido al completo establecimiento de la circulación arterial materno-fetal. En cambio, en los tumores generalmente se establece una hipoxia progresiva a medida que la masa tumoral crece y el aporte sanguíneo es insuficiente (Burton et al., 2017). La baja concentración de oxígeno fisiológica (2-3% O<sub>2</sub>) al inicio de la gestación promueve el crecimiento y la proliferación del trofoblasto extraveloso. Por el contrario, la hipoxia (~ 1,5% de O<sub>2</sub>) inhibe dicho crecimiento y proliferación. La hipoxia placentaria severa puede inducir la liberación excesiva de especies reactivas del oxígeno (ROS, **R**eactive **O**xxygen **S**pecies), citocinas y factores antiangiogénicos, lo que resulta en complicaciones del embarazo, como PE y aborto espontáneo (Zhou et al., 2020).

Tanto en la placenta como en los tumores ocurren procesos muy dinámicos de formación de vasos sanguíneos mediante la diferenciación *de novo* de las células progenitoras endoteliales, en el proceso de vasculogénesis, y a partir de los vasos sanguíneos existentes, en el proceso de angiogénesis. En la placenta, la angiogénesis es de suma importancia para mantener el flujo sanguíneo requerido para el éxito del embarazo. En los tumores el establecimiento de nuevos suministros de sangre es un paso clave que impulsa la patogénesis tumoral conduciendo a metástasis y un mal pronóstico (Chen and Zheng, 2014, West et al., 2018).

Durante el tercer trimestre del embarazo se producen numerosos factores angiogénicos como VEGF (**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor), FGF2 (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor 2), PIGF (**P**lacentar **G**rowth **F**actor), TGFβ1 (**T**ransforming **G**rowth **F**actor β1), leptina, y angiopoyetinas (ANG). Por otro lado, se expresan factores antiangiogénicos, como el Receptor 1 de VEGF (VEGFR1, **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor **R**eceptor 1) y endoglina, un correceptor de TGF-β, los cuales son de vital

importancia para regular y controlar estrictamente el desarrollo de la angiogénesis en la placenta. VEGF junto con las ANG y PIGF son críticos para la remodelación de las arterias espirales durante la placentación y para el crecimiento de muchos tipos de tumores (Chen and Zheng, 2013; West et al., 2018).

#### *Protooncogenes, genes supresores de tumores y microARNs en células placentales y tumorales*

La placenta y los tumores comparten la expresión de protooncogenes como *EGFR (HER1, ERBB)*, *ERBB2 (HER2, NEU)*, *CSF1R (C-FMS)*, *MET (HGFR)* y *KIT* que codifican a los receptores con actividad tirosina quinasa c-erbB1, c-erbB2, c-fms, c-met y c-kit, respectivamente. Protooncogenes como *FOS* y *JUN* codifican a los factores de transcripción c-fos y c-jun que estimulan la invasión en ambos contextos. La familia de protooncogenes c-ras (K-RAS, N-RAS y H-RAS) juegan un papel esencial en el control de la actividad de varias vías de señalización que regulan la proliferación celular (Ferretti et al., 2007). Además, en la placenta también se expresan genes supresores de tumores involucrados en la diferenciación del **citotrofoblasto (CTB)**, como por ejemplo gastrokine-1 (*GKN1*) (Fahlbusch et al., 2013), p53 (Korkmaz et al., 2013), Maspin (**Mammary Serine Protease Inhibitor**) (Dokras et al., 2006) y *KLF6 (Krüppel Like Factor 6)* (Racca et al., 2015).

Por otro lado, en el contexto de la placenta se ha identificado una gran variedad de miR (Hayder et al., 2018), muchos de los cuales también regulan genes que controlan mecanismos moleculares necesarios para el desarrollo del cáncer como por ejemplo, el miR-210 (Bavelloni et al., 2017), miR-101 (Yao et al., 2014), miR-1301 (Liang et al., 2014). Otros como el miR-451 y el miR- 720 se encuentran altamente expresados en la placenta, pero disminuidos en líneas celulares cancerosas. La expresión ectópica de estos miR en líneas tumorales disminuye la proliferación, migración e invasión, por lo que algunos miR podrían regular y controlar los procesos oncogénicos en la placenta (Vidal et al., 2018).

#### *Proliferación*

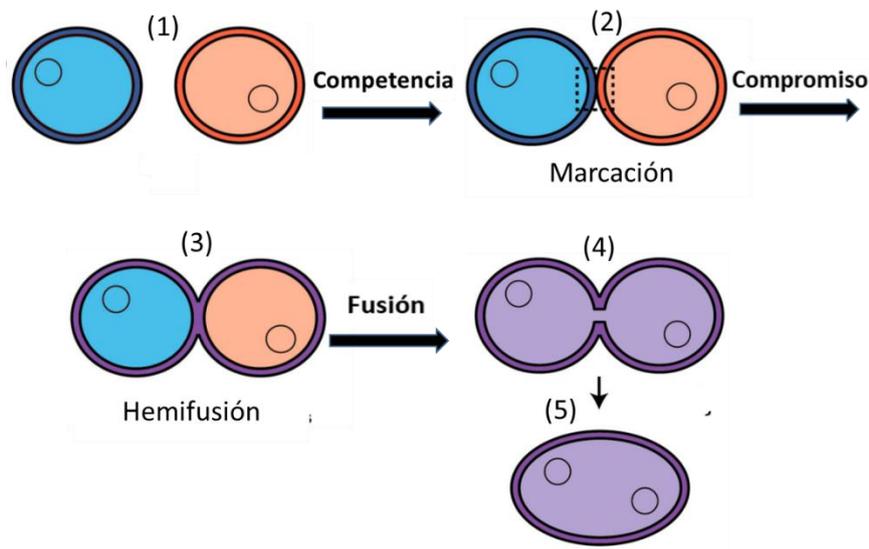
Las células del trofoblasto tienen una capacidad proliferativa muy alta al igual que las células tumorales. Un grupo de genes responsables de la proliferación son los factores de crecimiento y sus receptores (Costanzo et al., 2018). Estos factores de crecimiento se unen a los receptores tirosina quinasa induciendo la auto-dimerización para activar vías de proliferación o vías antiapoptóticas (West et al., 2018).

El inhibidor del ciclo celular p21, codificado por el gen *CDKN1A*, es un factor clave que controla varios procesos celulares como la regulación del ciclo celular, la

reparación del ADN, la apoptosis, la diferenciación, la dinámica del citoesqueleto, la migración celular, la transcripción génica y el inicio de la senescencia (Kreis et al., 2019; Shamloo and Usluer, 2019). Su principal mecanismo para frenar la progresión del ciclo celular es la inhibición de la actividad de proteínas implicadas directamente en la síntesis del ADN. Además, en el contexto tumoral, no solo funciona como supresor tumoral, sino también como oncogén, en parte dependiendo de su localización subcelular, interacción con otras moléculas y su estado de fosforilación (Shamloo and Usluer, 2019). En placenta, su expresión en **citotrofoblastos extravelosos** (CTBev) se asocia a la proliferación, diferenciación e invasión de estas células (Kreis et al., 2019), y su expresión se encuentra alterada en tumores gestacionales (Xuan et al., 2008). Este inhibidor del ciclo celular puede ser inducido por el factor de transcripción p53, el cual puede inducir la expresión de elementos involucrados en la apoptosis y en el freno del ciclo celular. p53 se sobreexpresa en diferentes líneas tumorales como JEG-3, JAR y BeWo derivadas de coriocarcinoma y también en CTB humanos (Haidacher et al., 1995). En el contexto de la placenta, se ha descrito un aumento en la expresión de p53 y de la apoptosis en placentas de embarazos que cursaron con PE; coincidentemente, se demostró *in vitro* que el silenciamiento de Mdm2 (regulador negativo de p53) conduce a un aumento de p53 y de la apoptosis (Sharp et al., 2014).

### *Fusión celular*

La fusión celular es un proceso que implica la mezcla de componentes de la membrana plasmática y el contenido celular entre dos o más células, lo que requiere de cambios en la fluidez de la membrana, la unión celular y la reestructuración del citoesqueleto. Este proceso tiene lugar en diferentes contextos biológicos como la fertilización, el desarrollo placentario, la formación del músculo esquelético, la homeostasis ósea y el progreso y metástasis tumoral (Brukman et al., 2019). La fusión puede ocurrir entre células de linaje similar, homotípicas (homocarion), como sucede durante la placentación, la formación del músculo esquelético y la resorción ósea, o entre células de orígenes diferentes, heterotípicas (heterocarion), como en el caso de la fertilización o la metástasis (Gerbaud and Pidoux, 2015). El proceso de fusión celular, se puede separar en tres etapas diferentes: competencia, compromiso y fusión celular (Fig. 2) (Aguilar et al., 2013).



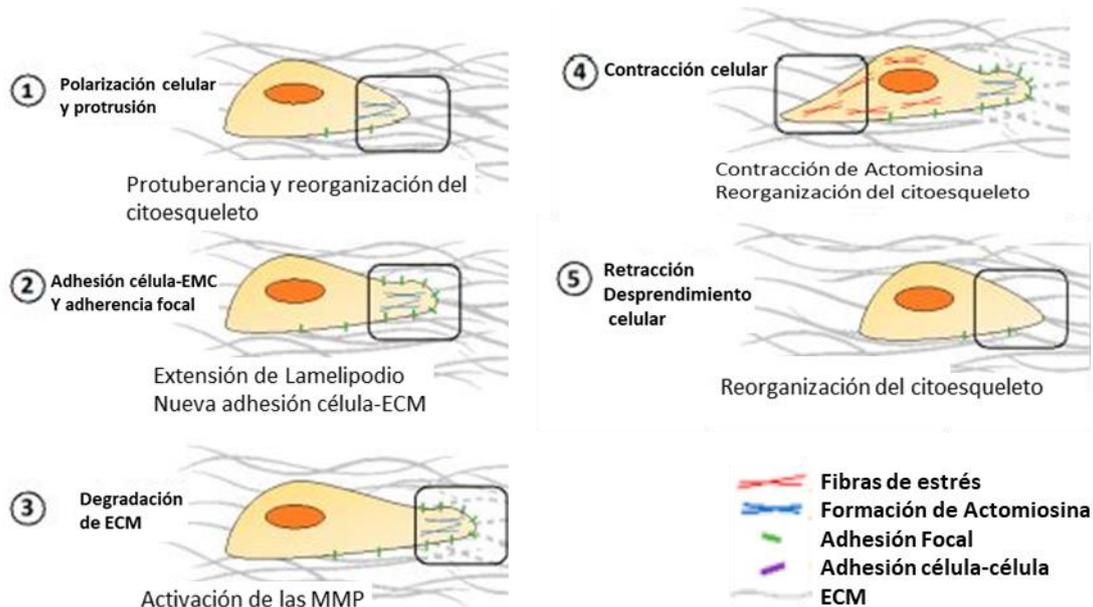
**Figura 2. Mecanismo de fusión célula-célula.** Las células listas para fusionarse (1) se reconocen, se acercan entre sí (2) y fusionan la monocapa externa de sus membranas plasmáticas (hemifusión) (3), provocando la redistribución de los marcadores lipídicos entre las membranas plasmáticas. La apertura de un poro de fusión en la estructura de la hemifusión permite la mezcla del contenido citoplasmático (4) y la expansión de los poros completa la unión de dos células en una (5). (Adaptado de Brukman et al., 2019).

Actualmente han sido bien caracterizadas dos familias de proteínas fusogénicas específicas que se localizan en la superficie celular y que son necesarias y suficientes para provocar la fusión de las membranas celulares: las sincitinas (Synt), identificadas en la placenta de los mamíferos, y las proteínas de fusión F, responsables de diversas y numerosas fusiones de células en la piel y los órganos digestivos y reproductivos de los nematodos. En los últimos años se han descrito otras proteínas con características fusogénicas como la proteína Hapless 2 (HAP2) y Myomaker/ Myomerger involucradas en la fusión de gametos de algunas especies y de células musculares respectivamente (Brukman et al., 2019).

En la placenta la fusión ocurre para generar una estructura multinucleada que va a funcionar como “barrera” entre el ambiente fetal y materno. En cambio, la fusión entre células cancerosas y entre células cancerosas y células no malignas puede contribuir al inicio y progresión del cáncer y, específicamente, a la aneuploidía o poliploidía, la resistencia a los fármacos y el potencial metastásico (Brukman et al., 2019). La fusión de células cancerosas permite que las células obtengan rápidamente material genómico y cambios en los genomas celulares en una escala mucho mayor que las mutaciones (Bastida-Ruiz et al., 2016).

## Migración / invasión

La migración celular es esencial para el desarrollo y función de los tejidos y órganos, para la homeostasis y para condiciones patológicas como la inflamación y la metástasis. Las células tumorales para diseminarse dentro de los tejidos utilizan mecanismos de migración similares a los que ocurren en procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario. El proceso de migración puede describirse como un proceso de cinco etapas (Fig. 3) (Limia et al., 2019).



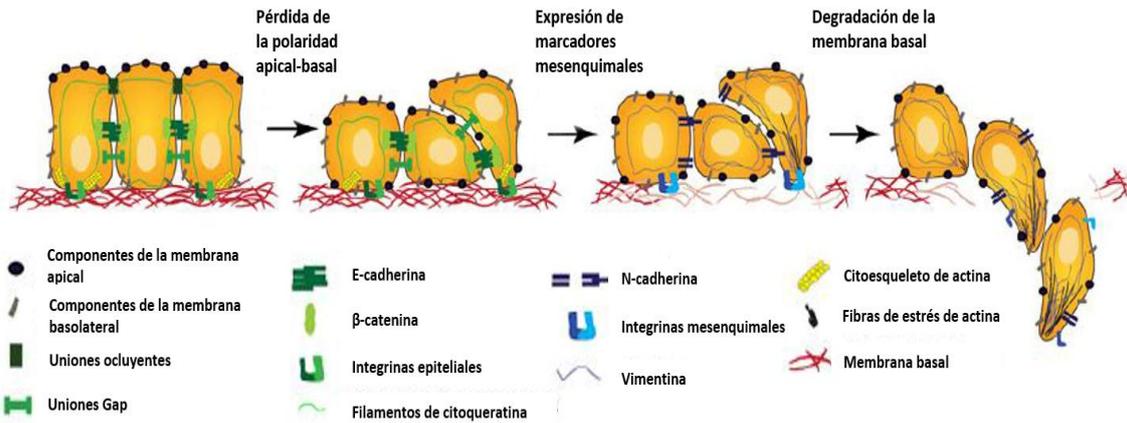
**Figura 3. Procesos celulares involucrados en la migración / invasión celular.** Las células comienzan a polarizarse (1) y generar nuevos contactos célula-matriz (2). La matriz extracelular (ECM) es degradada por las metaloproteinasas (MMP) (3). La miosina II intracelular se une a los filamentos de actina para formar actomiosina, lo que permite la contracción celular debido a una reorganización del citoesqueleto de actina (4) y las atracciones y retracciones (5) permiten el movimiento del cuerpo celular (Adaptado de Limia et al., 2019).

En la primera etapa, la célula en movimiento se polariza. En la polarización celular se activan GTPasas de la familia RHO como RAC1, RHOA y CDC42, siendo RAC1 uno de los reguladores claves de la migración (Limia et al., 2019). La polaridad de las células la proporcionan los tres componentes principales del citoesqueleto: microfilamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios. El citoesqueleto de microtúbulos se organiza espacialmente a través del centro organizador de microtúbulos (MTOC, **M**icro**t**ubule **o**rganizing **c**enter) y la célula se alarga debido a la generación de una protuberancia en el borde delantero (Fig. 3.1). El principal MTOC es el centrosoma, un orgánulo no unido a la membrana compuesto por dos centriolos rodeados de material pericentriolar que nuclea en forma radial los microtúbulos durante la interfase (Sütterlin

and Colanzi, 2010). La protuberancia generada, compuesta por filamentos de actina paralelos y reticulados, adopta varias formas como lamelipodios anchos o filopodios en forma de espiga (Limia et al., 2019). Los lamelipodios son protuberancias planas formadas por filamentos de actina largos y no ramificados que generan una red de actina muy ramificada lateralmente en el borde delantero. Los filopodios, en cambio, son una extensión en forma de varilla que consta de fibras de actina agrupadas y apretadas que penetran en el entorno circundante (Yilmaz and Christofori, 2009).

En la segunda etapa, la protuberancia alargada forma contactos focales con los componentes adyacentes de la matriz extracelular (ECM, **extracellular matrix**) (Fig. 3.2). Estas interacciones estables entre células y ECM comprenden moléculas de adhesión, principalmente receptores transmembrana de la familia de las integrinas, y otros receptores como CD44 y sindecanos (Limia et al., 2019). En un tercer paso, los componentes de la ECM como el colágeno, la fibronectina y las lamininas son degradados por metaloproteinasas (MMP) como la MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP) o MMP14, y las MMP2 y MMP9 que son secretadas por la célula (Limia et al., 2019; Yilmaz and Christofori, 2009) (Fig. 3.3). Finalmente, las contracciones celulares y las retracciones que permiten la reorganización del citoesqueleto, sincronizadas con los desprendimientos de la ECM, (Fig. 3.4 y 3.5) conducen al movimiento celular (Limia et al., 2019).

Tanto en las células tumorales como placentales el proceso de migración e invasión celular está asociado a una transición epitelio-mesenquimal (EMT, **Epithelial-Mesenchymal Transition**). En la EMT, las células epiteliales pierden su polaridad apico-basal y las uniones estrechas se disuelven permitiendo la mezcla de proteínas de la membrana apical y basolateral. Las uniones adherentes y *Gap* se desmontan y disminuye la expresión de E-cadherina, integrina  $\alpha6\beta4$ , claudinas y ocludinas. En cambio, incrementa la expresión de N-cadherina, vimentina, actina de músculo liso, integrina  $\alpha5\beta1$ , y de componentes de la ECM como colágeno  $\alpha1$  y  $\alpha2$ , y de las MMP2 y MMP9. Los elementos del citoesqueleto se reorganizan, el citoesqueleto periférico de actina se remodela en fibras de estrés que se acumulan en áreas de protuberancias celulares. En los filamentos intermedios epiteliales, las citoqueratinas son reemplazadas por vimentina. Mientras tanto, la membrana basal subyacente se degrada y la célula invade y se mueve hacia el estroma circundante (Fig. 4) (Davies et al., 2016; Ji et al., 2012; Micalizzi et al., 2010).



**Figura 4. Esquema representativo del proceso de transición epitelio-mesenquimal.** Se muestra el cambio morfológico hacia una forma alargada similar a la de los fibroblastos, el reemplazo de las proteínas E-cadherina y las integrinas epiteliales específicas (verde) por N-cadherina e integrinas específicas de los componentes extracelulares (azul) y como la célula invade el estroma circundante y pierde el contacto célula-célula. (Modificado de Micalizzi et al., 2010).

Los cambios producidos durante la EMT son producto de señales intra o extracelulares provenientes de factores de crecimiento, hormonas, citocinas, quimiocinas o proteínas que interactúan con la matriz celular. Tras la interacción con receptores tirosina quinasas, receptores acoplados a proteínas G, integrinas u otros, se activan cascadas de señalización críticas como las de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), la quinasa de adhesión focal (FAK), la vía PI3K-Akt, Janus quinasa (JAK), Wnt, RAC1 /  $\beta$ -catenina y la familia de proteínas SMAD y STAT. Estas vías de señalización convergen en factores de transcripción claves como SNAI1, SLUG (SNAI2), TWIST1, ZEB1 y ZEB2 que reprimen la expresión de marcadores epiteliales e inducen la expresión de marcadores mesenquimales. Reprimen, por ejemplo, al promotor del gen *CDH1*, que codifica a E-cadherina, en un proceso complejo que conduce a su silenciamiento por mecanismos epigenéticos (Yilmaz and Christofori, 2009). TWIST, SNAI y SLUG participan en la inducción de la EMT tanto en contextos normales como tumorales (Micalizzi et al., 2010). ZEB2 ha sido propuesto como un regulador maestro de la EMT que media la diferenciación del trofoblasto, ya que su sobreexpresión conduce a un incremento en la expresión de marcadores mesenquimales acompañado de un marcado aumento en la capacidad invasiva de células trofoblásticas (DaSilva-Arnold et al., 2019). Además, su nivel de expresión es mucho más elevado en CTBev invasivos del primer trimestre en comparación con CTB y disminuye en CTBev del tercer trimestre, los cuales tienen menor capacidad invasiva (Dasilva-arnold et al., 2015; DaSilva-Arnold et al., 2018).

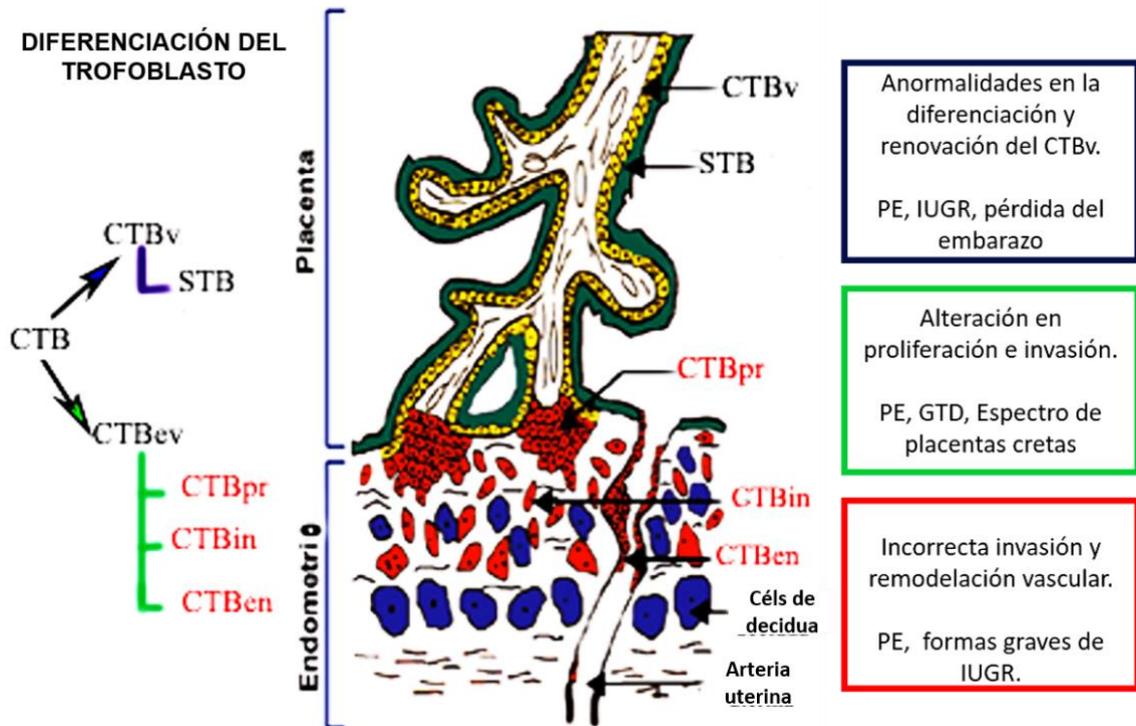
## LA PLACENTA Y SU DESARROLLO

La placenta es un órgano transitorio clave en el embarazo, ya que el éxito del mismo depende de una implantación y placentación eficiente. Es el sitio principal de transferencia materno-fetal de nutrientes, desechos y gases, actúa como una barrera que protege al feto de moléculas extrañas e infecciones y previene el rechazo del feto por el sistema inmune materno. Además, es un órgano endocrino dinámico que produce hormonas importantes que regulan el desarrollo de la unidad feto-placentaria y alteran la fisiología materna para soportar las demandas cambiantes del embarazo.

El desarrollo de la placenta es un proceso complejo y estrictamente regulado. Alrededor del día 5 después de la fertilización, la capa externa del blastocisto, el trofotodermo, se diferencia en la cubierta trofoblástica extraembrionaria, que se convertirá en la placenta, mientras que la masa celular interna continúa con el desarrollo del embrión (Davies et al., 2016). Después de la implantación, las células madre del trofotodermo generan los primeros linajes del trofoblasto, los CTB mononucleares tempranos y el sincicio primitivo multinuclear. El sincicio primitivo representa el primer tipo de célula placentaria invasiva que se expande en la decidua materna. La diferenciación de los CTB, a través de la vía vellosa y extravellosa permitirá el desarrollo y la morfogénesis de las vellosidades libres y de anclaje hasta alcanzar la estructura observada en la placenta madura. Los citotrofoblastos que diferencian a través de la vía vellosa se denominan **citotrofoblastos vellosos (CTBv)** y los que lo hacen por la vía extravellosa, **CTBev** (Fig. 5) (West et al., 2018; Knöfler et al., 2019). Anormalidades durante la diferenciación a través de la vía vellosa o extravellosa originan diferentes patologías o complicaciones del embarazo como PE, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR, **Intrauterine Growth Restriction**), placentas cretas o GTD (Fig. 5).

En el proceso de diferenciación de los CTB participan diferentes factores de transcripción. El factor inducible por hipoxia tipo 1 (HIF-1) y 2 (HIF-2), ASCL2, la proteína tumoral p63 (TP63), MYC, FOS, y la familia de factores ID están implicados en la autorrenovación de los CTBv y los CTBev, mientras que GCM1, CREB, OVOL1, PPARG, RXRA, TFAP2A, DLX3, TEAD3, ETS1, IKZF1, KLF6, FOSL1 y STAT3 están asociados a la diferenciación y función de estas células (Baines and Renaud, 2017). BCL6 es otro factor de transcripción crucial para la proliferación y supervivencia de los CTB al bloquear la apoptosis, en particular, en situaciones de estrés e hipoxia (Muschol-Steinmetz et al., 2016). Varios reportes independientes han demostrado un aumento en su expresión en placentas provenientes de embarazos con PE, aunque su rol en la fisiopatología de la enfermedad no ha sido establecido aún (Muschol-Steinmetz et al., 2016). Significativamente, BCL6 contribuye al fenotipo maligno en varios cánceres en

los cuales su expresión se encuentra incrementada, a veces, de manera asociada a la hipoxia y al factor HIF-1 (Song et al., 2018; Yu et al., 2015; Li et al., 2018).



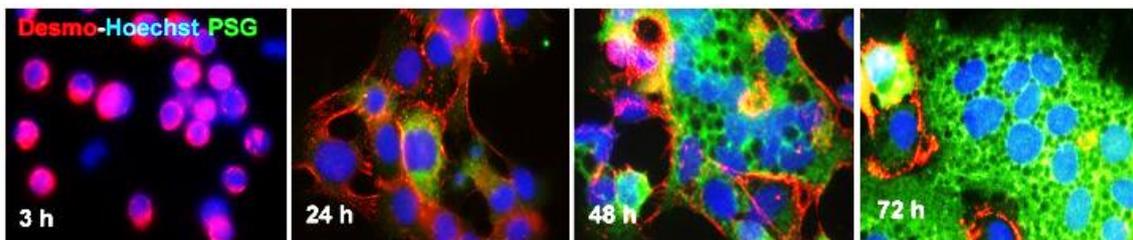
**Figura 5. Esquema de la diferenciación del trofoblasto humano, de la estructura de una vellosidad coriónica y su relación con patologías trofoblásticas.** Los citotrofoblastos vellosos (CTBv) mediante el proceso de fusión celular originan el sinciotrofoblasto (STB). Los citotrofoblastos extravellosos (CTBev) progenitores altamente proliferativos (CTBpr), migran hacia la decidua y adoptan un fenotipo invasivo (CTBin, citotrofoblastos intersticiales) o endovascular (CTBen, citotrofoblastos endovasculares). Anomalías durante estos procesos de diferenciación provocan complicaciones asociadas al embarazo. PE (Preeclampsia); IUGR (Restricción del crecimiento intrauterino); GTD (Enfermedad Trofoblástica Gestacional). (Modificado de Guibourdenche et al., 2009).

## DIFERENCIACIÓN TROFOBLÁSTICA A TRAVÉS DE LA VÍA VELLOSA

En el momento de la expansión del sincicio primitivo, los CTB proliferativos rompen la masa sincicial en expansión formando vellosidades primarias. Estas vellosidades se extienden hacia la decidua materna subyacente y, al igual que las estructuras multinucleares tempranas, erosionan los vasos sanguíneos y las glándulas uterinas. Durante los días siguientes, las vellosidades primarias se transforman en vellosidades secundarias. Al mismo tiempo, la superficie epitelial se ramifica y se expande por la proliferación continua y la fusión de los CTBv generando el sinciotrofoblasto (STB). Este constituye la capa multinucleada externa que cubre las vellosidades coriónicas flotantes y proporciona la interfaz entre la madre y el feto para

el transporte de nutrientes y el intercambio de gases (Kaufmann et al., 2003). La formación y mantenimiento del STB requiere de la división celular asimétrica de los CTBv subyacentes dando lugar, por un lado, a los CTBv que diferencian y fusionan con el sincicio preexistente y, por el otro, a CTBv que permanecen indiferenciados, mononucleados y proliferativos (Knöfler et al., 2019). El proceso de sincicialización ocurre durante todo el curso del embarazo de manera que el STB se renueva por la fusión continua y la diferenciación bioquímica de los CTBv. La incorporación de material celular fresco es balanceada por la liberación de material apoptótico (nodos sinciciales) desde el STB a la circulación materna (Huppertz, 2008). Este proceso regenerativo se encuentra alterado en patologías como la PE (Roland et al., 2016).

El proceso de fusión se puede reproducir *in vitro* a partir de CTBv purificados y cultivados en presencia de suero (Kliman et al., 1986). Los CTBv mononucleados y aislados, primero se agregan y luego fusionan formando sincicios multinucleados en los cuales aumenta también la síntesis de proteínas específicas como las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG, **P**regnancy **S**pecific **G**lycoproteins) (Fig. 6).



**Figura 6. Diferenciación *in vitro* de CTBv humanos.** Los CTBv se adhieren a la placa a las 3 horas de cultivo, luego se agregan y fusionan formando sincicios multinucleados que incrementan la síntesis de proteínas como las PSG. Cultivos teñidos para desmoplaquina (magenta), núcleos (Hoechst, azul) y proteínas específicas de embarazo (PSG, verde) (Racca et al., 2011).

La diferenciación bioquímica del STB se caracteriza por la síntesis y secreción a la circulación materna de hormonas y proteínas críticas del embarazo como la gonadotropina coriónica humana (hCG, **h**uman **C**horionic **G**onadotropin), la hormona lactógeno placentaria humana y las PSG. La glicoproteína hCG es fundamental para el desarrollo del feto y la placenta y se compone de dos subunidades, una  $\beta$  y una  $\alpha$ . 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. Además, participa de la angiogénesis en el endotelio uterino, en el mantenimiento de la quiescencia del miometrio y en la contribución a la inmunotolerancia materna (Fournier, 2016). La hCG también promueve la formación del STB. En general, la unión de la hCG

al receptor de hormona luteinizante / coriogonadotropina (LHCGR), conduce a un aumento de la fusión por activación de la vía de señalización de PKA dependiente de cAMP (Malhotra et al., 2015). En el CTBv se sintetiza principalmente una variante de hCG hiperglicosilada, la cual promueve la invasión trofoblástica (Fournier, 2016).

Como se mencionó, el proceso de fusión celular se puede dividir en tres etapas: competencia, compromiso y fusión. La primera implica una pérdida de actividad proliferativa y la diferenciación en células competentes para la fusión, que se caracteriza por una sucesión de procesos complejos que incluyen migración celular, cambios morfológicos, secreción y respuesta a señales extracelulares como factores de crecimiento, citocinas y hormonas (Gerbaud and Pidoux, 2015).

La segunda etapa de "compromiso" se caracteriza por el reconocimiento de las moléculas de fusión, y la adhesión de las células que inician la comunicación de las moléculas de unión *gap* conduciendo a la sincronización y el intercambio de señales fusogénicas. Las uniones adherentes, las uniones estrechas y las uniones *Gap* participan en esta etapa (Gerbaud and Pidoux, 2015). Las uniones *Gap* conectan dos células adyacentes a través de la alineación de dos hemicanales, cada uno compuesto por hexámeros de conexina (Cx). Los canales de unión permiten el intercambio de pequeñas moléculas, iones, metabolitos y segundos mensajeros, facilitando la coordinación, diferenciación y compartimentación espacial celular (Gerbaud and Pidoux, 2015).

La tercer y última etapa se define mediante la fusión de las membranas plasmáticas y la mezcla del contenido celular. La activación de la maquinaria fusogénica en la etapa previa desencadena la organización de complejos de proteínas que van a generar la aposición de las monocapas lipídicas externas de la membrana de las células a fusionar, la posterior apertura de un poro de fusión y la progresión hacia la fusión completa con la mezcla de los contenidos celulares (Gerbaud and Pidoux, 2015).

Durante la etapa de compromiso se generan diferentes tipos de interacciones en las cuales participan importantes proteínas. Por ejemplo, la conexina 43 (Cx43) es una de las principales proteínas involucradas en las uniones *Gap* y es expresada por CTB y el STB humano. La expresión de Cx43 se incrementa durante la sincicialización, y su silenciamiento inhibe el proceso de fusión y la diferenciación bioquímica de los CTBv (Frendo et al., 2003; Pidoux et al., 2010). Además, Cx43 colocaliza con el receptor de Syn-1, ASCT2, y modula la interacción entre este receptor y la comunicación intercelular de uniones *Gap* (Dunk et al., 2012). La E-cadherina y la cadherina-11 están implicadas en las uniones adherentes y son necesarias para la diferenciación morfológica de los CTBv, la E-cadherina en la agregación celular, y la cadherina-11 en la etapa de fusión.

Otra proteína importante es zonula occludens-1 (ZO-1), la cual está involucrada

en las uniones estrechas y permite la adhesión de las células en el paso de aposición de las membranas y establece la comunicación de las uniones *Gap*, un requisito previo para la fusión celular. Posee una alta expresión en CTBv que disminuye durante la fusión celular. El silenciamiento de ZO-1 bloquea el proceso de adhesión celular y la etapa de fusión, acompañado por una disminución en la expresión de Cx43 (Gerbaud and Pidoux, 2015).

En la tercera etapa tienen un rol importante las sincitinas, Syn-1, y Syn-2, pertenecientes a la familia de proteínas codificadas por genes de los retrovirus endógenos humanos (*HERV*). En la placenta humana, las sincitinas están involucradas en la fusión celular, ciclo celular, apoptosis y eventos de inmunosupresión. Además, su expresión se encuentra alterada en patologías placentarias y diferentes cánceres (Soygur and Sati, 2016).

Syn-1 fue la primera proteína fusogénica identificada en la formación del STB (Mi et al., 2000). Su expresión aumenta durante la diferenciación de los CTBv, se localiza fundamentalmente en la membrana basal del STB y ejerce su función fusogénica mediante la interacción con su receptor principal ASCT2 (**A**lanine/**s**erine/**c**ysteine transporter 2) (Costa, 2016). Por su parte, la proteína Syn-2 también aumenta su expresión durante la diferenciación de los CTBv y participa en el proceso de fusión interactuando con el receptor MFSD2 (**M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily **D**omain-containing 2) (Soygur and Sati, 2016). La transcripción de los genes *HERVW-1* y *HERVFRD-1* que codifican a Syn-1 y Syn-2, respectivamente, así como el de *MFSD2* está regulada por el factor GCM1/GCMA (**G**lial **C**ell **M**issing **1** o **G**lial **C**ell **M**issing **a**.) (Costa, 2016). GCM1 fue el primer factor de transcripción con un rol esencial descrito en la diferenciación del trofoblasto, tanto de la vía vellosa como extravelosa. Además, regula el equilibrio entre la proliferación y la diferenciación trofoblástica (Baczyk et al., 2009).

Se ha reportado la participación de muchas otras moléculas que promueven o inhiben el proceso de sincicialización del trofoblasto y cuya expresión y función están adecuadamente orquestadas para promover una placentación exitosa. Por ejemplo, galectina-1 (Gal-1) es un desencadenante importante de la fusión en células BeWo, e induce la formación *in vitro* de sincicios en células del trofoblasto (Fischer et al., 2010; Hutter et al., 2016). La reducción en la expresión de la chaperona GRP78 / BiP (proteína 78 regulada por glucosa o proteína de unión a inmunoglobulina) conduce a una disminución en la fusión y diferenciación celular (Fradet et al., 2012). Además, sus niveles, tanto de transcripto como de proteína, aumentan durante la fusión de células BeWo y CTBv asociados a una activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, **U**nfolded **P**rotein **R**esponse) (Bastida-Ruiz et al., 2019). El transportador de

sustratos endógenos y xenobióticos, ABCG2, actúa como un factor de supervivencia durante el proceso de diferenciación y fusión dado que su expresión incrementa durante la fusión de CTBv y de células BeWo (Evseenko et al., 2006; Schwabedissen et al., 2006), mientras que la disminución de su expresión conduce a una disminución en los niveles de transcritos de HERVW-1 y  $\beta$ -hCG en células BeWo (Evseenko et al., 2007).

Además de las proteínas mencionadas, la fusión célula-célula es regulada por numerosos factores de crecimiento como EGF, VEGF, TGF $\beta$ -1, citoquinas como LIF, TNF $\alpha$ , la externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática y la activación de la caspasa 8 (Gauster et al., 2009). Muchas de estas moléculas participan o activan diferentes vías involucradas en la sincitización, las cuales se detallan en la Fig. 7. Algunas de estas cascadas de señalización han sido ampliamente estudiadas y se conocen sus mecanismos, por ejemplo, las vías de señalización cAMP, MAPK y Wnt, estimulan la fusión celular generando un incremento en la expresión de Syn-1 a través de la activación del factor de transcripción GCMa. Mientras que, otras vías como la de JAK / STAT o la de mTOR se sabe que aumentan o inhiben la fusión celular respectivamente, pero se desconocen los detalles de los mecanismos implicados (Gupta et al., 2016).

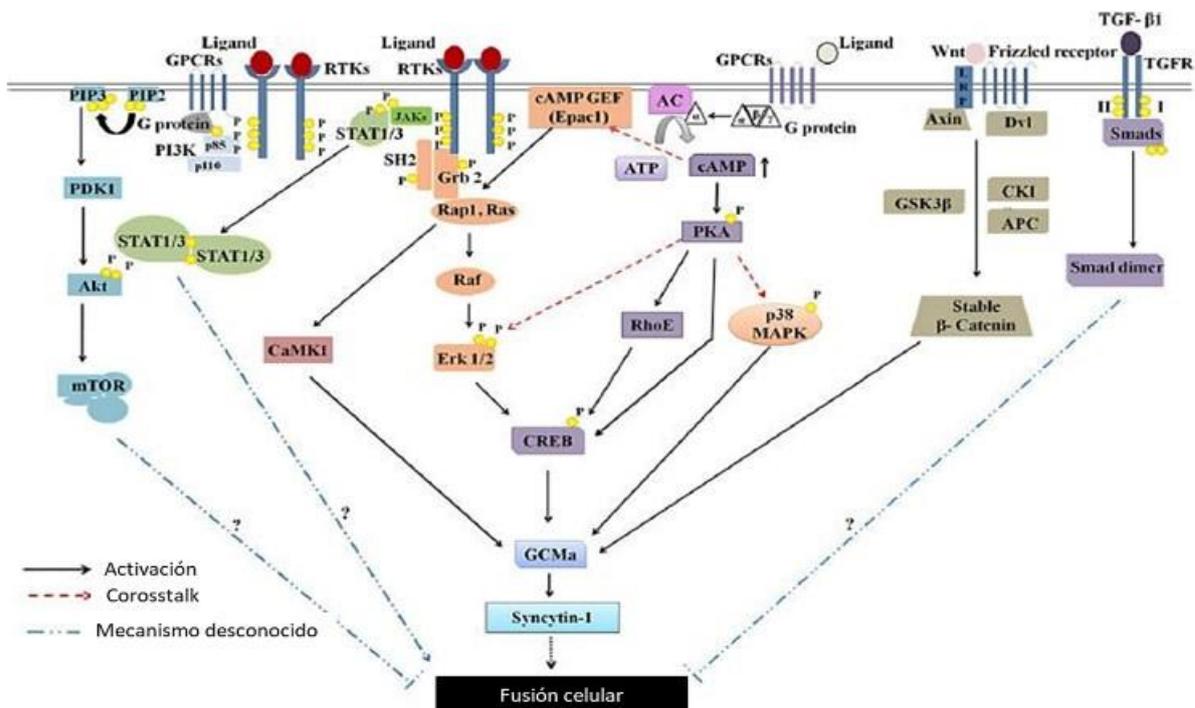


Figura 7. Vías de señalización asociadas a la fusión y diferenciación de células trofoblásticas. (Adaptado de Gupta et al., 2016).

## DIFERENCIACIÓN TROFOBLÁSTICA A TRAVÉS DE LA VÍA EXTRAVELLOSA

Los CTBev se diferencian a partir de una población de citotrofblastos indiferenciados, y forman parte de las vellosidades de anclaje que sirven para adherir la placenta a la pared uterina y crear la perfusión necesaria para mantener al feto. En las vellosidades de anclaje, se desarrollan columnas de CTB proliferativos, los cuales salen del ciclo celular y comienzan a perder sus contactos célula-célula. Al entrar en contacto con la matriz extracelular decidual, se diferencian en **citotrofblastos intersticiales** (CTBin) con un fenotipo invasivo o en **citotrofblastos endovasculares** (CTBen) con un fenotipo vascular (Ji et al., 2013). Los CTBin invaden profundamente la decidua, hasta el primer tercio del miometrio y actúan en el anclaje de la placenta al útero materno (Davies et al., 2016). Algunos de los CTBin finalmente diferencian a células gigantes multinucleadas que pierden su capacidad invasiva (Knöfler et al., 2019). Los CTBin interactúan con las células del estroma decidual, los macrófagos y las células asesinas naturales uterinas (uNK) para regular la aceptación inmunológica del aloinjerto placentario / fetal (Knöfler et al., 2019).

Tanto los CTBin como los CTBen realizan una función crucial: la remodelación de las arterias espirales maternas. Dichas arterias se transforman en canales de baja resistencia y gran calibre reemplazando el músculo liso y la matriz extracelular elástica de los vasos por una matriz fibrinoide, lo que hace que los vasos no respondan al control vasomotor materno. Esta conversión fisiológica de las arterias espirales maternas en vasos útero-placentarios de baja resistencia aumenta la perfusión placentaria, lo que facilita una mayor absorción de nutrientes por parte del feto (Davies et al., 2016). Por el contrario, una remodelación deficiente de las arterias conduce a una mala perfusión de la placenta, lo cual puede conducir a una pérdida de la función placentaria por estrés oxidativo y del retículo endoplásmico, daño al STB e hipoxemia (Burton et al., 2016). Los CTBen también forman tapones de trofoblasto durante las primeras semanas de embarazo, que ocluyen las arterias espirales en la decidua basal subyacente al sitio de implantación. Estos tapones evitan completamente el flujo sanguíneo hasta las 6–7 semanas de gestación. Como resultado, la placenta se desarrolla en un ambiente con poco oxígeno durante la mayor parte del primer trimestre (Knöfler et al., 2019).

Durante la diferenciación por la vía extravelosa, las células epiteliales polarizadas inmóviles sufren cambios bioquímicos y morfológicos característicos del proceso de EMT, adquiriendo la capacidad de migrar e invadir propia de las células mesenquimales. Si bien el proceso de EMT involucrado es similar al observado en la embriogénesis, la cicatrización de heridas y la metástasis de cáncer, presenta ciertas particularidades. A diferencia de la embriogénesis, la diferenciación de los CTBev no

genera mesénquima de un nuevo tejido y tampoco parece tener la movilidad y flexibilidad para regenerar las células epiteliales como ocurre en la metástasis. Sin embargo, tal como ocurre en los carcinomas, los CTBev diferenciados mantienen algunas características de células epiteliales mientras que adquieren características de células mesenquimales (DaSilva-Arnold et al., 2018; Davies et al., 2016).

Dentro de las proteínas asociadas a la migración y a la EMT en la placenta podemos mencionar a las integrinas. Las integrinas pertenecen a una familia de receptores heterodiméricos (compuestos por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ ) de la superficie celular que se expresan en la mayoría de las células, donde median las interacciones célula-célula y célula-ECM. Participan en diversos procesos biológicos incluyendo la organización del citoesqueleto, migración celular, homeostasis, respuestas inmunes y transducción de señales regulando numerosas funciones celulares como la supervivencia, la proliferación y el destino celular (Ginsberg, 2014). Particularmente, los niveles de expresión de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se encuentran aumentados en CTB diferenciados con un fenotipo invasivo y disminuidos en los CTB progenitores de las vellosidades flotantes (Damsky et al., 1992; Maltepe and Fisher, 2015). Otra proteína asociada a la migración e invasión de las células trofoblásticas es la MMP9 (Fan et al., 2016; Staun-ram et al., 2004). Los CTBin muestran niveles elevados de MMP9 durante el primer trimestre de embarazo, coincidiendo con la máxima invasividad (Ferretti et al., 2007). De hecho, la inhibición de MMP9 o el silenciamiento génico bloquea la invasión *in vitro* del trofoblasto (Librach et al., 1991). Además, en CTB de placentas preeclámplicas hay una disminución en los niveles de MMP9 (Graham and McCrae, 1996).

La Cx43, además de ser necesaria para la formación del STB, también está implicada en la migración de los CTBev. En células trofoblásticas los niveles de Cx43 son incrementados por TGF $\beta$  mediante la activación de las vías de señalización SMAD y ERK1/2, las cuales modulan la migración celular (Cheng et al., 2015; Gupta et al., 2016). Además, Cx43 es importante para la implantación. Mujeres con pérdida recurrente de embarazos tempranos así como con endometriosis exhiben niveles reducidos de Cx43 en la decidua (He and Chen, 2016).

Como se mencionó, E-cadherina es una proteína clave en EMT ya que es un potente supresor de invasión, así como un supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer (Strumane et al., 2004). Cuando los CTBev se diferencian en las columnas celulares y migran hacia el lecho placentario, la expresión de E-cadherina se pierde progresivamente (Ferretti et al., 2007). E-cadherina se une al citoesqueleto de actina a través de las cateninas e interacciona formando un complejo con  $\beta$ -catenina, el cual tiene un rol importante en el mantenimiento de la integridad epitelial. La alteración de

este complejo afecta a la adhesividad celular y a la vía de señalización de Wnt. Cuando el complejo se rompe, disminuye la adhesión célula-célula y aumenta la migración celular (Tian et al., 2011).

$\beta$ -catenina es una proteína multifuncional que regula eventos celulares vitales, como la proliferación, la migración y la diferenciación, al actuar como un regulador transcripcional nuclear. La vía de Wnt /  $\beta$ -catenina regula los factores de transcripción que desencadenan EMT en diferentes tipos de cáncer y tiene un rol crítico en la implantación y diferenciación trofoblástica (Knöfler and Pollheimer, 2013), ya que su activación resulta en la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo y la activación de múltiples genes involucrados en estos procesos (Pollheimer et al., 2006; Polakis, 2007). La acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina promueve la diferenciación invasiva de los CTBev y de células HTR8/SVneo (línea celular derivada de CTBev), así como la migración e invasión en diferentes tipos de cáncer (Fan et al., 2016).

La acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina y la activación de genes en respuesta a la vía canónica de Wnt requiere la activación de RAC1 (Wu et al., 2008). Además esta GTPasa puede activar proteínas de la familia STAT y estimular la polimerización de filamentos de actina conduciendo a la formación de lamelipodios y afectando la estabilidad de proteínas de uniones adherentes (Barros et al., 2009). RAC1 puede ser activado de diferentes formas, entre ellas, por el factor de intercambio de guanina para GTPasas pequeñas, VAV3. En la placenta, la actividad de RAC1 se encuentra elevada en etapas tempranas del embarazo. La vía RAC1 /  $\beta$ -catenina contribuye a la invasión de células trofoblásticas, ya que el silenciamiento de RAC1 o la inhibición de  $\beta$ -catenina afecta la activación de MMP9 y SNAI1 perjudicando la invasión de los CTBev. A su vez, en PE la actividad de RAC1 y los niveles de SNAI 1 y  $\beta$ -catenina se encuentran disminuidos (Fan et al., 2016).

## **COMPLICACIONES DEL EMBARAZO ASOCIADAS A UNA DIFERENCIACIÓN DEFECTUOSA DE LAS CÉLULAS PLACENTALES**

Como se señaló anteriormente, defectos en la diferenciación y el recambio de CTBv junto con una invasión de CTBev deficiente se asocian con la pérdida del embarazo, PE y IUGR, mientras que una invasión excesiva de los CTBev se correlaciona con el desarrollo de placentas cretas, o GTD que incluyen la mola hidatiforme y al coriocarcinoma (Maltepe and Fisher, 2015; Jauniaux et al., 2017; Ning et al., 2019). Estas condiciones representan no solo una situación de riesgo para el feto en desarrollo y la madre durante el embarazo y el parto, sino que aumentan los riesgos

de desarrollar patologías como diabetes tipo 2, hipertensión o enfermedad cardiovascular en la vida adulta (Burton et al., 2016; Bronson and Bale, 2015).

### *Preeclampsia, PE*

La PE se caracteriza por una invasión superficial de los CTB<sub>in</sub> que se reducen en número y densidad. Los CTB<sub>en</sub> también se ven afectados de manera que la remodelación vascular se encuentra reducida y esta falla se traduce en un ambiente patológicamente hipóxico. Además, la velocidad de flujo de la sangre materna que ingresa al espacio intervelloso desde las arterias inadecuadamente transformadas es mayor y se generan cambios en la perfusión fetal de órganos esenciales pudiendo llevar a una restricción del crecimiento fetal (Huppertz, 2018). En las placentas preeclámplicas, el recambio de CTB está aumentado, registrando mayores niveles de proliferación y apoptosis que en placentas normales (Ji et al., 2013). En estas placentas la formación del STB está alterada, al igual que varios mediadores de la sincialización. De hecho, los niveles de Syn-1 y Syn-2 se encuentran disminuidos, así como el factor de transcripción GCM-1 (Costa, 2016).

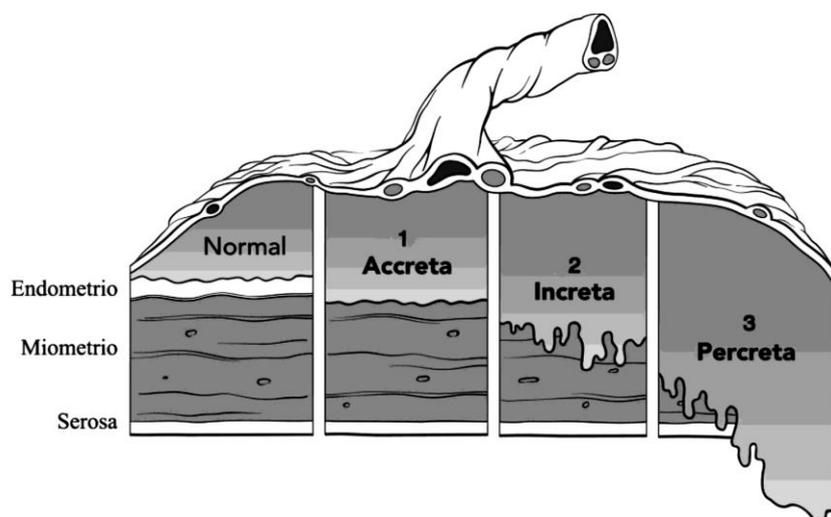
### *Retardo del crecimiento intrauterino, IUGR*

IUGR es una condición caracterizada por un crecimiento fetal disminuido. Es la principal causa de morbilidad y mortalidad perinatal y también se asocia a un aumento en el riesgo de padecer problemas cardiovasculares, metabólicos y neurológicos en la vida adulta. La principal causa es la insuficiencia placentaria, que dificulta el aporte de nutrientes y oxígeno al feto. De manera similar a la PE, los CTB<sub>v</sub> aislados de placentas con IUGR muestran una sincialización *in vitro* deficiente, con una expresión disminuida de sincitinas (Costa, 2016).

### *Espectro de placentas cretas*

Las placentas cretas, o *anormalmente invasivas*, constituyen un espectro de complicaciones obstétricas complejas que aparecen fundamentalmente como consecuencia de un daño en la interfaz endometrio-miometrio de la pared uterina. En este tipo de placentas hay una remodelación en la profundidad de las arterias miometriales mucho más allá de la invasión normal de la arteria espiral. La ausencia total o parcial de decidua es el rasgo histológico característico de la placenta creta. Los CTB<sub>ev</sub> que invaden la pared uterina a una mayor profundidad son hipertróficos y su número aumenta, mientras que el número de células multinucleadas de trofoblasto gigante se reduce. El espectro de placenta creta se clasifica en diferentes categorías según el grado de invasión (Fig. 8): a) placenta acreta, cuando las vellosidades

simplemente se adhieren al miometrio: b) placenta increta, cuando las vellosidades invaden profundamente el miometrio; y c) placenta percreta, cuando las vellosidades invaden todo el grosor del miometrio hasta la serosa pudiendo invadir órganos adyacentes en el abdomen (Jauniaux et al., 2017). Las formas más graves de placenta creta requieren histerectomía y con frecuencia procedimientos quirúrgicos complejos para reparar el daño extrauterino. En las placentas anormalmente invasivas se encuentra una mayor expresión de genes asociados a un fenotipo más mesenquimal, lo cual está asociado con este incremento en la invasividad (DaSilva-Arnold et al., 2018).



**Figura 8. Diagrama de los grados de invasión placentar anormal en comparación con la situación normal.** Modificado de Reitman et al., 2011.

#### *Enfermedad Trofoblástica Gestacional, GTD*

GTD es un grupo heterogéneo de tumores asociados con el embarazo que surgen de las células trofoblásticas vellosas y extravelosas.

Las molas hidatiformes se asocian con gametogénesis y fertilización anormal. Se caracterizan por placentas inmaduras edematosas, cambios hidrónicos, formación de cisternas, trofoblasto excesivo, distribución anormal del trofoblasto y la presencia de inclusiones trofoblásticas. En las molas hidatiformes completas el trofoblasto tiene diversos grados de atipia y los capilares vellosos están ausentes. No hay presencia de tejido fetal o embrión. En una mola parcial, las vellosidades placentarias tienen edema focal y áreas desnaturalizadas de tamaño y forma variables y proliferación patológica de células trofoblásticas. Hay presencia de tejido fetal o un embrión reconocible, pero la mayoría de las veces, el feto no es viable (Ning et al., 2019).

El coriocarcinoma gestacional se desarrolla en el útero a partir de los CTBv y se presenta con masas uterinas voluminosas. Producen altos niveles de factores de crecimiento angiogénicos que pueden remodelar la vasculatura y conducir a una perforación uterina y hemorragia (Ning et al., 2019; Hui, 2019). Histológicamente, el coriocarcinoma muestra infiltración difusa o crecimiento destructivo sólido que involucra al endometrio. Las células en proliferación se organizan en patrones de crecimiento bifásicos a trifásicos: láminas o cordones de células tumorales mononucleares de diferentes tamaños bordeados por capas de células multinucleares sinciciotrofoblásticas. Además, se caracterizan por un pleomorfismo citológico marcado, agrandamiento nuclear con una elevada actividad mitótica. Las pacientes cursan con elevados niveles de hCG en suero (Hui, 2019). Por lo general, el coriocarcinoma puede desarrollarse después de un embarazo molar, un aborto espontáneo o un embarazo ectópico, pero también puede ocurrir después de un embarazo normal a término.

## INTRODUCCIÓN: Parte II

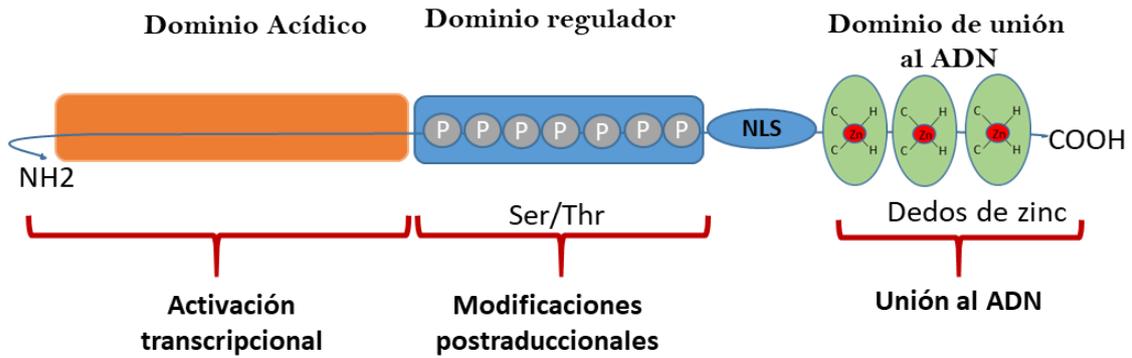
### FACTOR TIPO KRÜPPEL 6: KLF6

El factor de transcripción KLF6 pertenece a la familia de los factores tipo Krüppel (KLF), los cuales contienen tres motivos estructurales de dedos de zinc tipo C2H2 en la región carboxilo-terminal (C-terminal). Estos se unen a secuencias consenso similares, (elementos CACCC, GC o GT) ubicadas en la región promotora o reguladora de genes diana (Pearson et al., 2008). Los dominios de dedos de zinc contienen señales de localización nuclear, y el dominio N-terminal tiene regiones que interactúan con otras proteínas. Las modificaciones postraduccionales de los KLF, así como las proteínas con las que interactúan, alteran su actividad transcripcional o localización subcelular (Pollak et al., 2018).

Hasta el momento se conocen 18 miembros de la familia de KLF, con un amplio perfil de expresión en varios tejidos e implicados en una gran variedad de procesos biológicos como proliferación, diferenciación, apoptosis, y desarrollo (Pollak et al., 2018; Pearson et al., 2008). Los miembros de la familia KLF se agrupan dependiendo de sus características estructurales y roles transcripcionales. El factor KLF6 junto con KLF1, KLF2, KLF4, KLF5 y KLF7 están dentro del grupo de factores que funcionan principalmente como activadores transcripcionales, pero también se ha reportado que pueden reprimir la transcripción (Pollak et al., 2018).

El ADNc de KLF6 fue aislado e identificado en el laboratorio donde se realizó esta tesis mediante el rastreo de una librería de expresión de placenta (Koritschoner et al., 1997). KLF6, posee una estructura proteica de 283 aminoácidos conformada por un dominio ácido N-terminal, una región central rica en serinas y treoninas y la región de unión al ADN compuesta por los tres dedos de zinc en la región C-terminal (Fig. 9).

El gen *KLF6* codifica para la proteína de largo completo, denominada KLF6. Además, a través del proceso de splicing alternativo, puede dar origen a 3 variantes de empalme: KLF6 SV1 (195 aa), KLF6 SV2 (241 aa) y KLF6 SV3 (237 aa). Las variantes SV1 y SV2 carecen de la señal de localización nuclear (NLS, nuclear localization signal); la variante SV1 posee un carboxilo terminal muy corto carente del dominio de unión al ADN, mientras que la SV2 carece del primer dominio tipo dedos de zinc. La variante SV3 conserva la NLS y el primer dominio tipo dedos de zinc (Rodríguez et al., 2010; Narla et al., 2005). Si bien se ha descrito la expresión de estas variantes en algunos tumores, las mismas no se han identificado en las células trofoblásticas (resultados del laboratorio, no publicados).



**Figura 9. Representación esquemática de la estructura proteica del Factor de Transcripción Tipo Krüppel 6 humano.** Se indican el dominio ácido de activación localizado en el extremo amino-terminal, el dominio central rico en serinas y treoninas, blanco de modificaciones postraduccionales como fosforilación, y la porción carboxilo terminal que contiene el dominio de unión al ADN conformado por tres dedos de zinc. Señal de localización nuclear (NLS, nuclear localization signal).

Inicialmente KLF6 fue considerado un supresor tumoral ya que su inactivación génica o la expresión de sus variantes de empalme más cortas se asocian al desarrollo de algunas neoplasias como cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, gliomas y carcinoma hepatocelular (Syafuruddin et al., 2020). Sin embargo, en otros contextos KLF6 ejerce funciones antagónicas. Por ejemplo, el silenciamiento de KLF6 en líneas celulares de hepatocarcinoma provoca una disminución en la progresión del ciclo celular (D'Astolfo et al., 2008). De igual manera se observa una disminución de la capacidad proliferativa en embriones de ratones deficientes en *Klf6* y durante la diferenciación de células madre *Klf6*<sup>-/-</sup> (Matsumoto et al., 2006).

Múltiples estudios han demostrado que KLF6 es un regulador transcripcional que, dependiendo del contexto, puede activar o reprimir la expresión de genes involucrados en procesos fisiológicos como la diferenciación y proliferación celular, la respuesta inmune e inflamatoria, la cicatrización de heridas y el metabolismo. Algunos de los blancos moleculares de KLF6 se muestran en la **Tabla I**.

**Tabla I.** Genes regulados por KLF6, agrupados según los procesos en los que se encuentran involucrados.

<b>Proceso biológico</b>	<b>Genes regulados</b>
<b>Crecimiento celular</b>	p21 Ciclina D1 c-Myc c-Jun p53 DAPK2 ATF3 NOXA
<b>Reparación de heridas. Migración</b>	Queratinas 4 y 12 Colágeno tipo 1 Laminina $\alpha$ 1 Metaloproteinasa de matriz -14 (MMP14) MMP9 TGF $\beta$ 1 Receptores de TGF $\beta$ tipo I y II (TGF $\beta$ R1 y TGF $\beta$ R2) Endoglina Activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) VEGF ATG7 Beclina 1
<b>Metabolismo</b>	MDR1B MRP3 Ceramidasa ácida
<b>Respuesta inmune e inflamación</b>	Alfa 1-antitripsina ( $\alpha$ 1-PI) Leucotrieno C4 sintetasa BCL6 HIF-1 PPAR $\gamma$ iNOS HSP70
<b>Diferenciación</b>	Importina $\alpha$ 5 Dlk1 PSG $\beta$ -hCG E-cadherina TFPI-2 VAV3 IGF1R HSP 47 KLF4 Sp1 PTT1

KLF6 ha sido implicado en procesos de diferenciación de varios sistemas celulares, incluyendo diferenciación de mioblastos (Dionyssiou et al., 2013), hematopoyesis y vasculogénesis (Matsumoto et al., 2006; Adelman et al., 2019) y en la diferenciación trofoblástica (Racca et al., 2011). KLF6 participa en la expansión y el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y las células progenitoras, así como en el desarrollo de órganos derivados del endodermo, incluido el hígado (Syafruddin et al., 2020). Además, su expresión se induce durante la adipogénesis, donde reprime la actividad de la proteína transmembrana Dlk-1 para inducir la diferenciación de preadipocitos a adipocitos (Li et al., 2005b). En el sistema nervioso central, KLF6 participa en la activación de la expresión de importina  $\alpha 5$ , necesaria para la diferenciación de células progenitoras de oligodendrocitos y la mielinización (Laitman et al., 2016). En el páncreas, KLF6 facilita la adaptación de las células pancreáticas al estrés metabólico, tanto promoviendo como previniendo la proliferación de las células  $\beta$  y la desdiferenciación / transdiferenciación inducida por la resistencia a la insulina en células productoras de glucagón, respectivamente (Dumayne et al., 2020). Durante la miogénesis esquelética, KLF6 participa en la proliferación y supervivencia de mioblastos (Dionyssiou et al., 2013), regula la expresión del gen queratina-4 asociada a la diferenciación del epitelio escamoso estratificado (Okano et al., 2000), e inhibe la expresión del proto-oncogén PTT1 contribuyendo a la diferenciación de células mieloides (Chen et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado que KLF6 puede desencadenar senescencia celular tanto en contextos normales como tumorales (Sabatino et al., 2019).

Se ha reportado que KLF6 controla la proliferación celular incrementando la expresión de p21, inhibiendo al oncogén c-Jun, disminuyendo la expresión de ciclina D1 o la actividad del complejo ciclina D1/cdk4 (Andreoli et al., 2010; DiFeo et al., 2009). Además, se ha descrito que la deprivación de glucosa y la administración de agentes miméticos de restricción energética conducen a la activación transcripcional de KLF6 a través de modificaciones epigenéticas contribuyendo así a la apoptosis celular y a la supresión de la proliferación tumoral (Chen et al., 2011). En el mismo sentido, se demostró que la expresión de KLF6 responde a señales de activación oncogénica mediadas por RAS y conduce a una disminución en la proliferación celular y la tumorigenicidad inducida por RAS (Trucco et al., 2014). Sin embargo, en otros contextos celulares normales y tumorales, es la disminución en la expresión de KLF6 la que conduce al arresto del ciclo celular mediado por la desfosforilación de la Ser795 de la proteína Rb y una disminución en la expresión de ciclina D1/cdk4 (Andreoli et al., 2010).

En relación a la respuesta inmune e inflamatoria, se ha reportado que KLF6 modula la expresión de HIF-1 y el programa de transcripción de respuesta hipóxica en

macrófagos (Kim et al., 2020), como así también la polarización al fenotipo M1 y la expresión de genes proinflamatorios cooperando con NF- $\kappa$ B y suprimiendo la expresión de BCL6 y del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) (Gun-dong Kim et al., 2016). Además, KLF6 participa en la regulación de la producción de óxido nítrico mediante la transactivación directa de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en respuesta a estímulos ambientales (Syafruddin et al., 2020).

KLF6 se induce como un gen de respuesta temprana en varios contextos, incluyendo la activación de las células estrelladas luego de daño hepático o tras heridas en el endotelio vascular (DiFeo et al., 2009). Participa en la reparación tisular regulando genes relacionados con la reparación de tejidos, como el factor TGF $\beta$ 1, el receptor de TGF $\beta$  (TGF $\beta$  R), colágeno tipo 1 alfa 1 (COL1A1), el activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA), endoglina (ENG), la quinasa similar al receptor de activina 1 (ALK1) y MMP14.

Si bien KLF6 es un factor de transcripción ubicuo, su expresión se encuentra muy enriquecida en la placenta humana y murina (Koritschoner et al., 1997; Slavin et al., 1999). Ratones *knockout*<sup>-/-</sup> para KLF6 mueren al día 12,5 de gestación, caracterizados por un desarrollo placentar deficiente y disminución en la diferenciación hematopoyética en el saco vitelino (Matsumoto et al., 2006). En el contexto de la placenta humana, KLF6 se expresa tanto en el CTBv como en el CTBev, en la línea celular HTR8/SVneo derivada de CTBev de placenta de primer trimestre, y en las líneas JEG-3 y BeWo ampliamente usadas y aceptadas como modelos para estudiar diferentes aspectos del desarrollo y función del trofoblasto humano (Racca et al., 2015). Los niveles proteicos de KLF6 son tempranamente regulados por hipoxia de forma parcialmente dependiente de HIF-1 $\alpha$  (Racca et al., 2016), y aumentan en células JEG-3 expuestas al tóxico clorpirifos el cual induce un desbalance redox (Chiapella et al., 2013; Ridano et al., 2014). Además, en placentas preeclámpicas KLF6 presenta una expresión diferencial respecto a placentas normales (Racca et al., 2016).

## **KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN BIOQUÍMICA Y LA FUSIÓN DEL TROFOBLASTO VELLOSO**

A la fecha no hay evidencia reportada acerca de la participación de KLF6 en el proceso de fusión célula-célula durante el desarrollo y/o metástasis tumoral. En la placenta, aportes importantes acerca de KLF6 y su rol en la diferenciación bioquímica y morfológica del trofoblasto vellosos han sido reportados por el laboratorio donde se realizó esta tesis.

KLF6 se expresa a lo largo de todo el proceso de diferenciación del CTBv recapitulado *in vitro*. Posee un patrón de expresión con un máximo en las primeras horas seguido de una disminución a las 16 horas y un incremento progresivo, aunque menor al inicial, hacia el final del proceso de fusión, conservando el patrón de expresión nuclear y citoplasmático (Racca et al., 2011). El aumento en su expresión precede a la fusión celular y a la expresión de los genes PSG y  $\beta$ hCG, cuyos promotores regula positivamente (Racca et al., 2011) (Tabla I). Estudios complementarios demostraron la participación de señales epigenéticas implicadas en su localización nuclear y su actividad sobre el promotor PSG5 (Camolotto et al., 2013). Posteriormente, se demostró que el silenciamiento de KLF6 mediante siARN específico, disminuye la fusión en células BeWo inducidas a diferenciar con forskolin (FSK) y en CTBv aislados de placentas humanas a término (Racca et al., 2015). La disminución en la capacidad fusogénica es acompañada de una disminución en la expresión de la proteína Syn-1 y del inhibidor del ciclo celular p21 (Racca et al., 2015). En cambio, la sobreexpresión transiente de KLF6, incrementa los niveles de los transcritos de Syn-1, Syn-2, Cx43 y ZO-1 en células JEG-3, las cuales no fusionan espontáneamente y lo hacen pobremente cuando son tratadas con metotrexato. Más aún, la sobreexpresión de KLF6 conduce a un aumento significativo de Syn-2 y Cx43 en CTBv los cuales en cultivo inmediatamente inician el proceso de diferenciación y, por lo tanto, la expresión de los cuatro genes mencionados se encuentra endógenamente activada (Racca et al., 2015).

Estos antecedentes revelan la participación de KLF6 en la diferenciación de las células trofoblásticas vellosas de la placenta. Sin embargo, se desconoce si KLF6 *per se* induce la fusión y diferenciación bioquímica del trofoblasto vellosos, así como, si requiere de su dominio de unión al DNA y/o de su dominio activador N-terminal para modular la fusión y la expresión de genes asociados a la diferenciación.

## **ROL DE KLF6 EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR**

En numerosos tipos de cáncer se ha demostrado la participación de KLF6 en la migración e invasión celular regulando la expresión de importantes genes involucrados en estos procesos. Por ejemplo, KLF6 disminuye la invasión de células de cáncer oral inhibiendo la expresión de MMP9 y de marcadores mesenquimales, como SNAI1, SLUG y vimentina. Además, inhibe la proliferación celular e induce apoptosis, por lo que el tamaño y progresión tumoral se asocian de manera inversa a la cantidad de KLF6 nuclear (Hsu et al., 2017). En células de osteosarcoma, la sobreexpresión de KLF6 inhibe la capacidad invasiva de estas células, reprimiendo la expresión de MMP9. Además, genera un incremento en la expresión de p21 y la apoptosis, acompañado de

una disminución en la viabilidad y proliferación celular. Efectos inversos se observan en estas células cuando presentan niveles bajos de KLF6 (Jianwei et al., 2013). La disminución de KLF6 en carcinoma de células renales claras (ccRCC) incrementa la migración e invasión celular a través de la inducción de la expresión del factor E2F1. Además, genera disminución en los niveles de E-cadherina e incremento en la expresión de N-cadherina y vimentina, promoviendo así la EMT y favoreciendo la transformación metastásica (Gao et al., 2017). La disminución en los niveles de KLF6 es un evento temprano en la hepatocarcinogenesis que contribuye al aumento en la proliferación, migración y la invasión vascular. La sobreexpresión, por el contrario, inhibe el crecimiento al mismo tiempo que disminuye los niveles de  $\beta$ -catenina y ciclina D1 y aumenta los de E-cadherina (Kremer-tal et al., 2007). Además, KLF6 regula la proliferación, invasión y metástasis en carcinoma hepatocelular mediante la interacción con el factor de transcripción Sp1 mediada por la expresión de la proteína inductora de metaloproteinasas de matriz extracelular, basigina-2 (Kong et al., 2016).

Por otro lado, se ha asociado a KLF6 con la migración / invasión celular a través de su interacción con diferentes micro ARNs. Por ejemplo, en cáncer de ovario epitelial la disminución en los niveles de KLF6 provocada por la sobreexpresión del micro ARN 630 (miR-630) promueve la proliferación, migración e invasión celular (Zhang et al., 2017). El micro ARN 181a (miR-181a) inhibe la expresión de KLF6 en células endoteliales de glioma (Yao et al., 2014) y en células de cáncer gástrico (Zhang et al., 2012). En las primeras, esto afecta la regulación de la permeabilidad de la barrera de los tumores sanguíneos y la expresión de ZO-1, ocludina y claudina-5 (Yao et al., 2014), mientras que en las células de cáncer gástrico inhibe la apoptosis y promueve la proliferación, formación de colonias, migración e invasión (Zhang et al., 2012). Contrariamente, en células madres de glioblastoma, la disminución en la expresión de KLF6 debida a la sobreexpresión del miR-101 reduce la proliferación, migración, invasión y promueve la apoptosis, sugiriendo que en este contexto KLF6 ejerce una función pro-oncogénica (Yao et al., 2015).

Estos resultados demuestran que KLF6 está implicado en el proceso de migración e invasión celular de un gran número de células cancerosas y que su rol es dependiente del tipo celular en el que se expresa y de las moléculas con las que interacciona. Sin embargo, no hay evidencia acerca de su participación en el proceso de migración / invasión de células trofoblásticas, lo cual es objeto de estudio de esta tesis.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS**

Sobre la base de los antecedentes presentados, se postuló la siguiente hipótesis de trabajo:

*KLF6 participa en el control de la fusión y migración del tejido trofoblástico regulando la expresión de efectores claves. Por ello, su expresión y/o localización se encuentra alterada en placentas patológicas.*

Para validar dicha hipótesis, se plantearon los objetivos descritos a continuación.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

*Contribuir al conocimiento de la función de KLF6 en procesos celulares esenciales del trofoblasto humano compartidos con células tumorales.*

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- *Analizar el mecanismo molecular por el cual KLF6 participa en el proceso de fusión celular de los citotrofo blastos vellosos*
- *Evaluar la participación de KLF6 en el proceso de migración celular durante la diferenciación de los citotrofo blastos extravellosos*
- *Analizar la expresión y localización subcelular de KLF6 en placentas patológicas*



# **RESULTADOS I**

## RESULTADOS: parte I

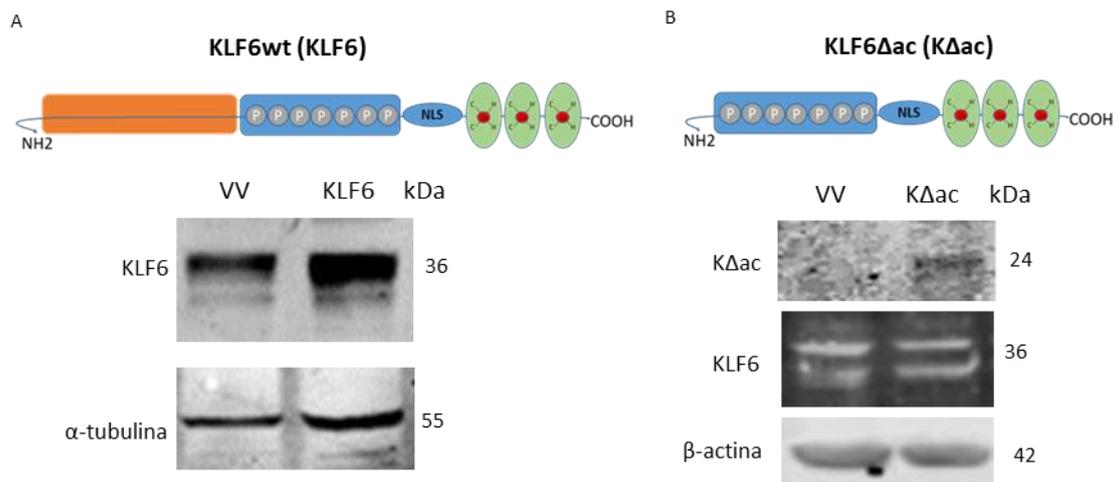
### KLF6 Y SU IMPLICANCIA EN LA FUSIÓN CELULAR

Teniendo en cuenta los antecedentes que demuestran que KLF6 está implicado en la diferenciación de CTBv a STB, y de acuerdo al primer objetivo de esta tesis, se evaluó el mecanismo molecular por el cual KLF6 participa en el proceso de fusión de células trofoblásticas. Para ello, por un lado, en células BeWo se sobreexpresó establemente KLF6 o una mutante de delección (KLF6 $\Delta$ ac) que carece del dominio ácido de regulación transcripcional; y por otro, CTBv aislados de placentas humanas a término se transdujeron con lentivirus que expresan la proteína KLF6 y KLF6 $\Delta$ ac.

#### GENERACIÓN DE CÉLULAS BeWo-KLF6 y BeWo-KLF6 $\Delta$ ac

Un modelo ampliamente utilizado para analizar la fusión celular de trofoblastos vellosos es la línea celular de coriocarcinoma BeWo. Estas células mantienen características de los CTBv humanos como la producción de hormonas placentarias (por ejemplo, hCG, progesterona, estrógenos), y la expresión de proteínas fusogénicas (Orendi et al., 2010). Estas células diferencian a estructuras de tipo sinciciales mediante la inducción del metabolismo del AMP cíclico (AMPc). La incubación con FSK causa un incremento dependiente de la dosis del AMPc intracelular produciendo una fusión coordinada que genera células que contienen varios núcleos por citoplasma, y un borde en cepillo tal como posee el STB (Wice et al., 1990).

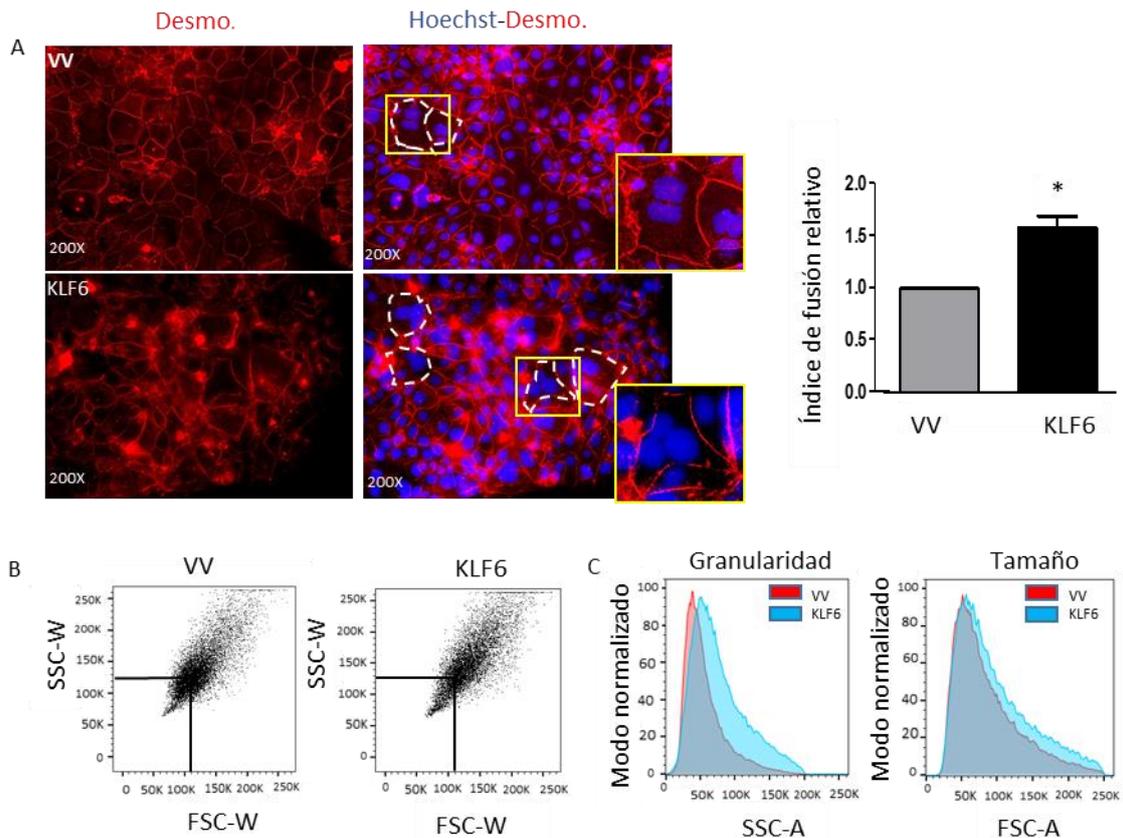
Células BeWo se transdujeron con lentivirus que expresan la proteína completa de KLF6, o la mutante de delección que carece del dominio N-terminal de transactivación, el cual contiene un alto contenido de residuos ácidos entre los aminoácidos 19 a 112 que le confieren a este dominio una interfase predominantemente negativa (carga neta = -11). Una vez transducidas, las células fueron seleccionadas con puromicina para obtener células establemente transformadas a las cuales se denominó como BeWo-KLF6 (KLF6) y BeWo-KLF6 $\Delta$ ac (KLF6 $\Delta$ ac), respectivamente. Como control se generaron células BeWo-VV (VV) que contienen el vector lentiviral vacío (sin inserto). Se verificó por Western Blot (WB) la sobreexpresión de la proteína KLF6 en las células BeWo-KLF6 (Fig. 10 A). Al igual que en varios tejidos la expresión de la proteína KLF6 se detecta como dos bandas siendo la de arriba producto de su fosforilación constitutiva (Slavin et al., 2004). De igual manera se analizó la sobreexpresión de la proteína mutada KLF6 $\Delta$ ac en las células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac y se comprobó que la expresión de esta mutante no modifica los niveles endógenos de KLF6 nativo (Fig. 10 B).



**Figura 10. Células establemente transformadas BeWo-KLF6 y BeWo-KLF6 $\Delta$ ac.** Células BeWo fueron transducidas con partículas virales que expresaban la proteína completa de KLF6 o una mutante de delección carente del dominio de regulación transcripcional, KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) o con el vector vacío (VV) como control. Luego de la transducción las células fueron seleccionadas durante dos semanas con puromicina y posteriormente se evaluó la expresión de las proteínas de interés mediante WB. **A-** Esquema de la proteína y niveles de expresión de KLF6 en células BeWo-KLF6. Se utiliza  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Esquema de la mutante KLF6 $\Delta$ ac y niveles de expresión de KLF6 $\Delta$ ac y KLF6 en células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac. Se utiliza  $\beta$ -actina como control de carga.

## LA SOBREEXPRESIÓN DE KLF6 INCREMENTA LA FUSIÓN DE CÉLULAS BeWo

Células BeWo-KLF6 o BeWo-VV fueron cultivadas en ausencia de FSK durante 72 horas para evaluar si la sola sobreexpresión de KLF6 es capaz de desencadenar la fusión. Luego se evaluó el estado de diferenciación morfológica mediante inmunofluorescencia (Fig. 11 A) y mediante citometría de flujo (Fig. 11 B y C). La aparición de estructuras de tipo sinciciales y la presencia de células de mayor tamaño y granularidad en la condición donde se sobreexpresa KLF6 demuestran una mayor diferenciación morfológica. Resultados similares se observaron analizando la fusión celular por inmunofluorescencia en células BeWo transducidas transientemente con lentivirus pLenti-KLF6 o el vector vacío (no mostrado).

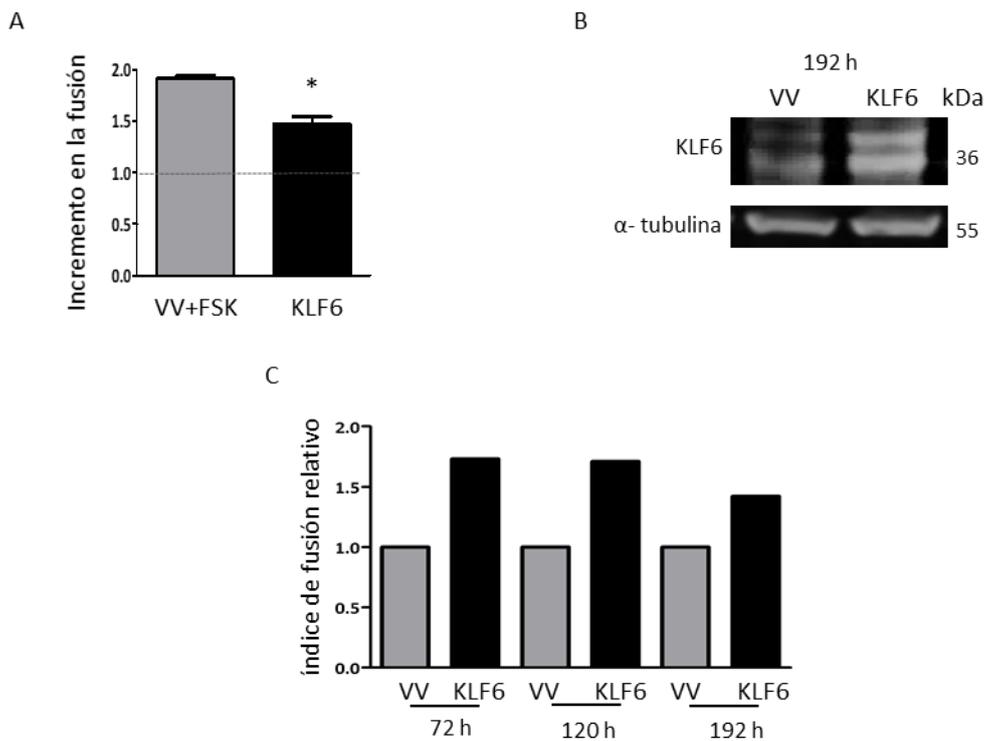


**Figura 11. La sobreexpresión de KLF6 incrementa la fusión de células BeWo.** Análisis de fusión de células BeWo transfectadas de forma estable con KLF6 o con el vector vacío (VV), sin tratamiento con el inductor de fusión celular FSK, cultivadas por 72 horas. **A-** En el panel superior se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de desmoplaquina (Desmo, señal roja) y tinción de núcleos con Hoechst. Estructuras sinciciales delimitadas por las líneas punteadas blancas. A la derecha se muestran imágenes ampliadas de los recuadros amarillos. Para cada condición se contaron como mínimo 7 campos al azar en tres experimentos independientes. El gráfico de barras muestra la cuantificación del índice de fusión, calculado a partir de las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas para cada experimento, expresado como índice de fusión relativo a la fusión espontánea (VV). Se muestra la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, \*  $p < 0,05$ , one sample t-test. **B-** Gráfico de puntos del ancho de dispersión frontal (FSC-W) frente al ancho de dispersión lateral (SSC-W) de las células control BeWo-VV (izquierda) y BeWo-KLF6 (derecha) analizadas por citometría de flujo. **C-** Histogramas de ambos tipos celulares comparando la granularidad de las células determinada por la dispersión lateral (SSC) (izquierda) y el tamaño dado por la dispersión frontal (FSC) (derecha).

## FUSIÓN INDUCIDA POR KLF6 E INDUCIDA POR FSK

Como se mencionó, la incubación con FSK causa en las células BeWo un incremento de la fusión celular dependiente de AMPc intracelular. Los resultados anteriores muestran que en ausencia de este inductor el aumento en la expresión de

KLF6 es capaz de inducir la fusión. A continuación, se analizó el índice de fusión inducido por la sola sobreexpresión de KLF6 (BeWo-KLF6) respecto al inducido por FSK. Los resultados mostraron un índice de fusión relativo menor en las células BeWo-KLF6 respecto al inducido por FSK en células BeWo-VV (Fig. 12 A). Posteriormente, células BeWo-KLF6 fueron mantenidas en cultivo ocho días (192 horas) al cabo de los cuales se confirmó que continuaban sobreexpresando la proteína KLF6 (Fig.12 B). Sin embargo, el índice de fusión no incrementó a lo largo del tiempo respecto al control (BeWo-VV no tratadas) (Fig. 12 C). Estos resultados indican que el aumento en la expresión de KLF6 no sería suficiente para completar el proceso que conduce a la formación de sincicios maduros.



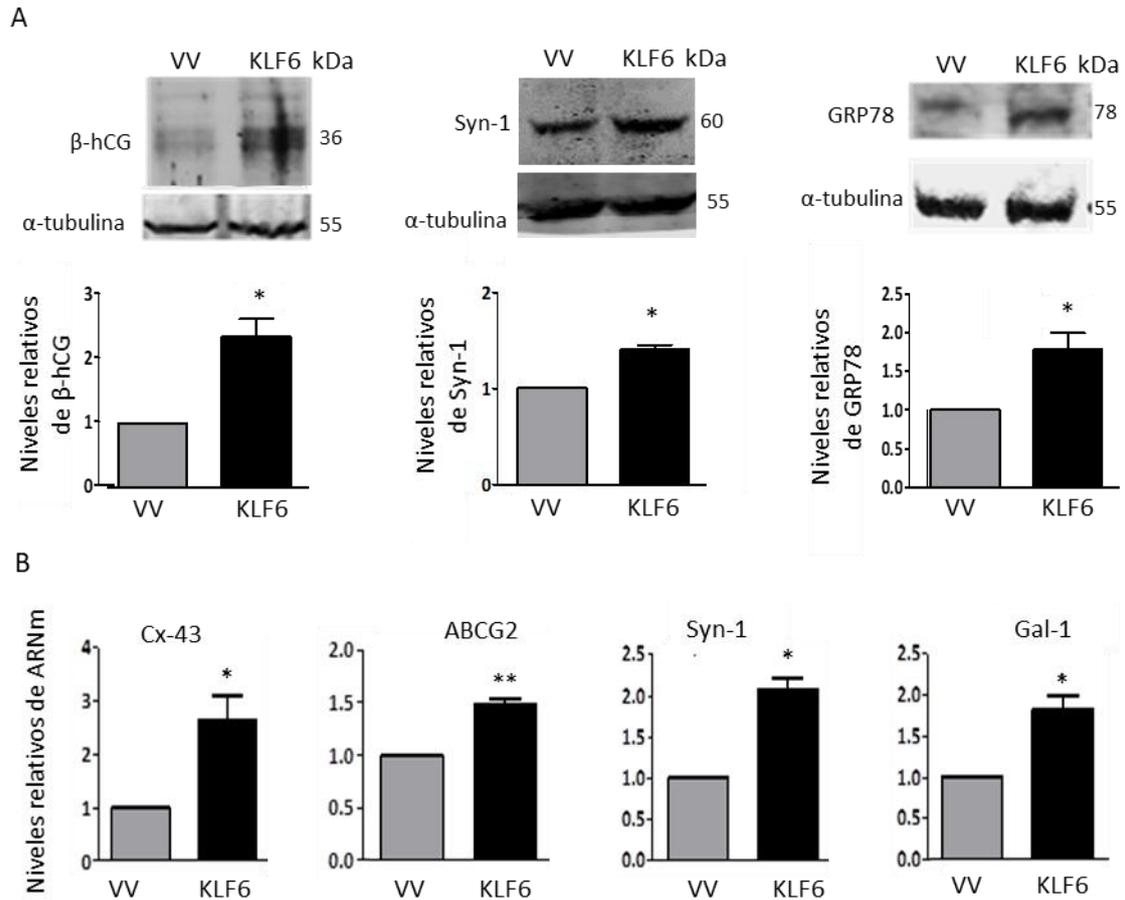
**Figura 12. El índice de fusión en células BeWo-KLF6 es menor que el inducido por FSK.**  
**A-** Índice de fusión relativo de células BeWo-VV tratadas con FSK (VV+FSK) y de células BeWo-KLF6 expresado como índice relativo que establece la fusión espontánea observada en células BeWo-VV como 1 (línea punteada). Media  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ , t-test. **B-** Niveles de expresión de KLF6 en células BeWo-KLF6 luego de 192 horas de cultivo. Se utiliza  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **C-** Fusión inducida por KLF6 en ausencia de FSK a través del tiempo de cultivo, representado como índice de fusión relativo que establece la fusión espontánea (VV) a cada tiempo como 1.

## **KLF6 MODULA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS ASOCIADAS A DIFERENCIACIÓN EN CÉLULAS BeWo**

Como fue antes mencionado, la formación y mantenimiento del sinciotrofoblasto humano ocurre por la fusión continua y regulada y la diferenciación bioquímica de los CTBv. Se ha demostrado que KLF6 regula transcripcionalmente a los genes que codifican a las proteínas PSG y  $\beta$ -hCG, las cuales son marcadores de diferenciación del trofoblasto y son requeridas para el desarrollo de un embarazo saludable (Racca et al., 2015). Además, en células de coriocarcinoma JEG3, KLF6 aumenta la expresión de los transcritos que codifican las proteínas involucradas en la fusión celular: Syn-1, Syn-2, Cx43 y ZO-1 (Racca et al., 2015).

Por ello, para indagar sobre las características de la fusión inducida por KLF6 en las células BeWo se analizó si la misma se acompaña de un aumento en la expresión de las proteínas  $\beta$ -hCG y Syn-1 y de la chaperona GRP78. Además, se evaluó la expresión de los transcritos de Cx43, Syn-1, Gal-1, y el transportador ABCG2. Como se señaló en el capítulo Introducción, estas moléculas tienen una reconocida participación en la fusión y/o diferenciación del trofoblasto vellosos (Hutter et al., 2016; Fradet et al., 2012; Evseenko et al., 2007).

Células BeWo-KLF6 y BeWo-VV fueron cultivadas durante 72 horas y luego se obtuvieron extractos celulares para análisis por Western Blot y qRT-PCR. Los niveles proteicos de  $\beta$ -hCG, Syn-1 y GRP78 (Fig. 13 A), mostraron un incremento respecto al control. Además, también se vieron incrementados los niveles de los transcritos de ABCG2, Syn-1, Gal-1 y Cx43 (Fig. 13 B). Estos resultados indican que KLF6 estimula la expresión de marcadores bioquímicos y morfológicos de diferenciación. Así mismo, sugieren que su función como inductor de la diferenciación podría deberse a la regulación directa o indirecta de la expresión de estas proteínas claves para la diferenciación del trofoblasto vellosos.

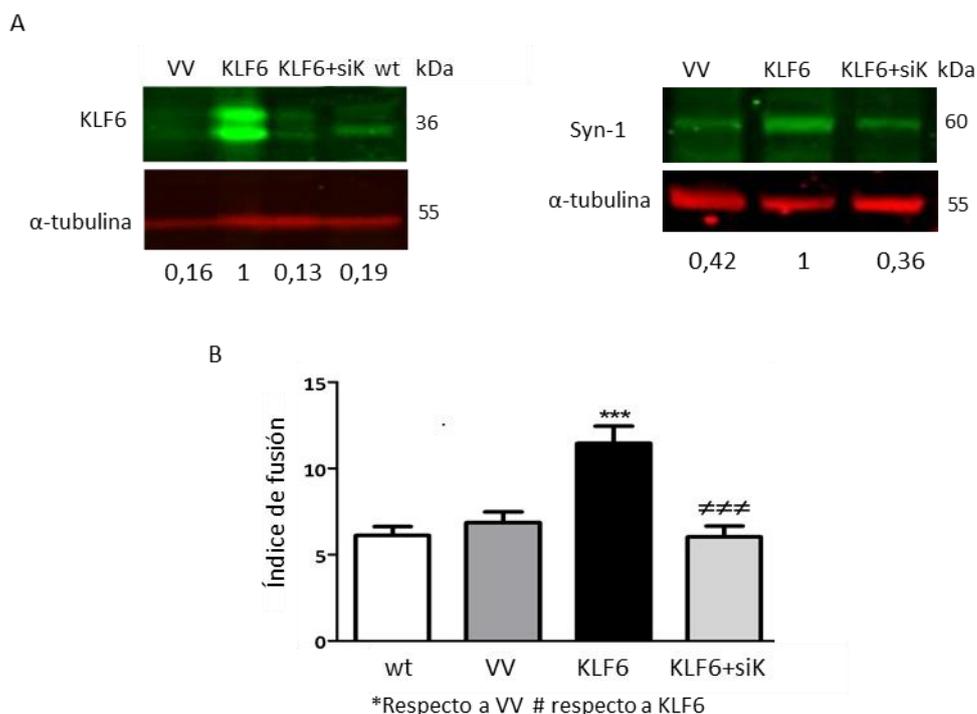


**Figura 13. KLF6 modula la expresión de moléculas asociadas a diferenciación en células BeWo.** Células BeWo-KLF6 y células control (VV) fueron cultivadas durante 72 horas y luego se evaluó la expresión de marcadores de diferenciación. **A-** Niveles de expresión de las proteínas β-hCG, Syn-1 y GRP78. En el panel superior se muestran imágenes representativas de WB para cada proteína analizada, utilizando α-tubulina como control de carga y en el panel inferior, la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas normalizadas con la señal de α-tubulina y relativizada a la condición control considerada como 1. Las barras representan la media ± SEM de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , one sample t-test. **B-** Niveles de ARNm determinados mediante qRT-PCR a partir de ARN total. El gráfico representa la media ± SEM de los niveles relativos de cada transcripto (normalizado con ciclofilina A) respecto a la condición control (VV) de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , one sample t-test.

## LOS NIVELES DE KLF6 MODULAN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS BeWo HACIA UN FENOTIPO SINCICIAL

Con el fin de confirmar que el aumento en la expresión de la proteína KLF6 es el responsable de la diferenciación observada en las células BeWo-KLF6 y que no es producto de un efecto no específico asociado a la transformación estable de las células, se disminuyeron los niveles de KLF6 en estas células y se evaluó la fusión celular. Para tal fin, células BeWo-KLF6 (KLF6) fueron transfectadas o no con un siARN específico para KLF6 (siK), como controles se usaron las células BeWo-VV y las células BeWo de tipo salvaje (wild type, wt). A partir de este diseño experimental se analizó la fusión celular en cada condición. Como control de especificidad del efecto se determinaron los niveles de expresión de KLF6 y Syn-1.

El tratamiento con siK redujo los niveles de KLF6 expresados por las células BeWo-KLF6 hasta niveles similares a los observados en la línea BeWo-VV y en células BeWo wt (Fig. 14 A); del mismo modo se redujeron los niveles de la proteína fusogénica Syn-1 a los niveles observados en la línea BeWo-VV (Fig. 14 A). Esta disminución en los niveles de expresión de KLF6 generó una disminución en el índice de fusión de las células BeWo-KLF6 (Fig. 14 B). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las células BeWo salvajes (wt) y VV, demostrando que la transducción con lentivirus y posterior selección con puromicina no modifica el índice de fusión basal de las células BeWo.



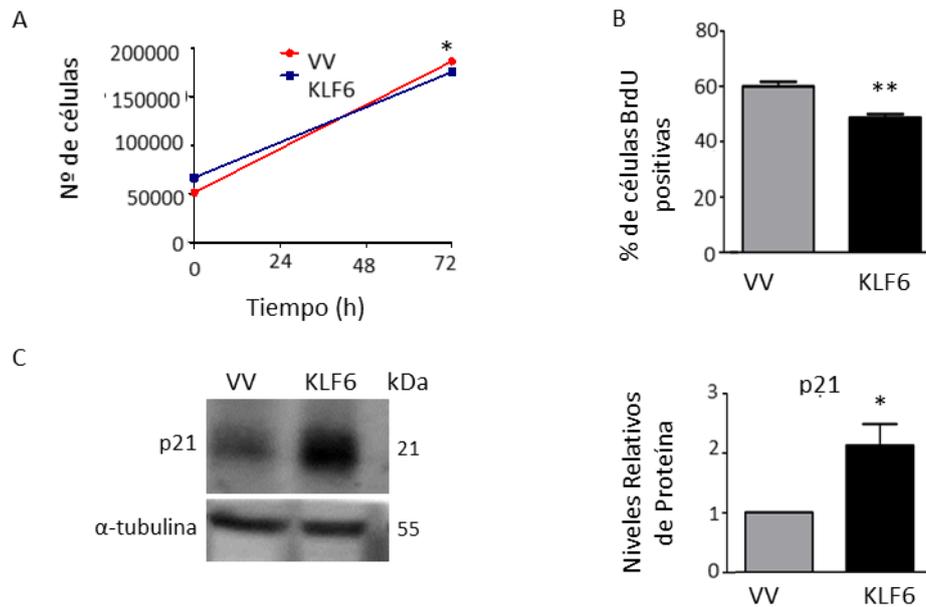
**Figura 14. Los niveles de KLF6 modulan la diferenciación de células BeWo hacia un fenotipo sincicial.** Células BeWo-KLF6 fueron transfectadas o no con siARN específico para KLF6 (siK) durante 72 horas. Como controles se utilizaron células BeWo-KLF6 sin transfectar, células BeWo salvajes (wt) y BeWo-VV. **A-** Niveles proteicos de KLF6 y Syn-1 analizados mediante WB. Se utiliza  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Debajo se muestran los valores de la cuantificación densitométrica para cada proteína normalizada a  $\alpha$ -tubulina y expresada en relación con el nivel de proteína relativizado a las células BeWo-KLF6 sin transfectar (KLF6) como 1. **B-** Fusión celular analizada mediante inmunofluorescencia, se muestra la cuantificación de al menos 7 imágenes tomadas de campos al azar para cada condición. El gráfico representa la media  $\pm$  SEM del índice de fusión para cada condición. \*\*\* $p < 0,0005$ ; ### $p < 0,0005$ , ANOVA, post-test comparación múltiple de Tukey.

## **EL AUMENTO EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE KLF6 DISMINUYE EL CRECIMIENTO CELULAR E INCREMENTA LOS NIVELES DE p21**

La proliferación es un proceso que en el contexto de la placenta está altamente controlado. Al momento de diferenciar las células, con una alta capacidad proliferativa, frenan su tasa de proliferación para dar lugar al proceso de diferenciación, ya sea a través de la vía vellosa o extravellosa.

El factor de transcripción KLF6 posee diversos roles en la regulación de la proliferación, uno de los cuales es a través de la regulación del inhibidor del ciclo celular p21. KLF6 activa p21 de manera independiente de p53 (Narla et al., 2001). La expresión ectópica de KLF6 produce una disminución de la proliferación celular, asociada a un arresto del ciclo celular promovido por la inducción de p21 (Trucco, 2014) y en carcinomas hepáticos se ha demostrado una transactivación directa de KLF6 sobre el promotor de p21 (Narla et al., 2007).

En base a estos antecedentes se analizó el efecto que tiene la sobreexpresión de KLF6 sobre el crecimiento celular y los niveles de p21 en células BeWo. La tasa de proliferación de células BeWo-KLF6 y BeWo-VV fue estimada luego de 72 horas de cultivo mediante recuento de células viables (Fig. 15 A) e incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) (Fig. 15 B). Por ambas técnicas se observó que altos niveles de KLF6 generan una disminución en la proliferación celular. A su vez, esta disminución fue acompañada de un incremento en los niveles de expresión de p21 (Fig.15 C).



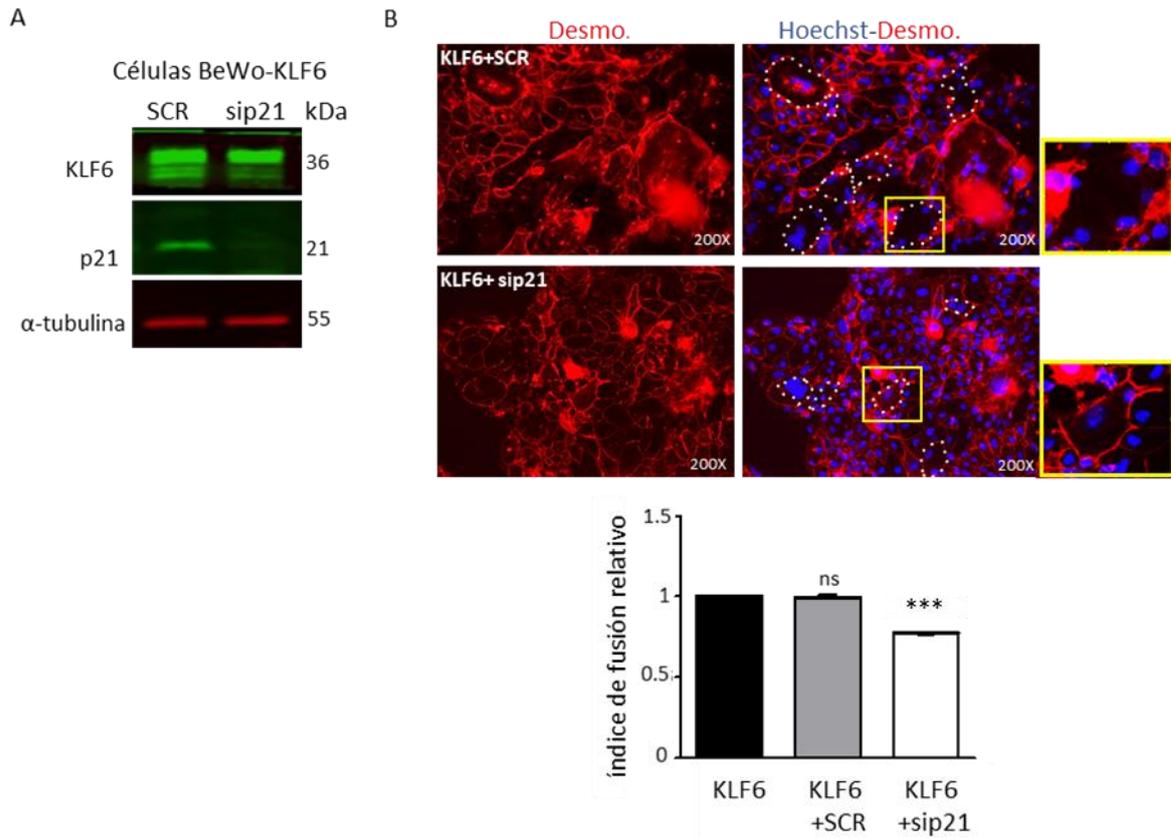
**Figura 15. El aumento en los niveles de expresión de KLF6 disminuye el crecimiento celular e incrementa los niveles proteicos de p21.** En células BeWo que sobreexpresan establemente KLF6 y células control (VV) se analizó la proliferación celular. **A-** Velocidad de crecimiento determinada mediante recuento celular. Luego de 24 horas de plaqueadas, las células fueron contadas y esta cantidad se registró como la cantidad de células inicial, luego se cuantificó el número de células a las 72 horas. Cada ensayo fue realizado por triplicado y el gráfico representa los resultados de dos experimentos independientes. **B-** Proliferación celular evaluada mediante incorporación de BrdU. Se muestra el porcentaje de células BrdU positivas en cada condición, expresado como la media  $\pm$  SEM de dos ensayos independientes. \*\* $p < 0,005$ , t-test. Para cada condición se contaron un total de al menos 1000 células de diferentes campos al azar. **C-** Niveles de expresión de p21. A la izquierda, imagen representativa de WB de p21 y  $\alpha$ -tubulina como control de carga. A la derecha, cuantificación del nivel de proteína p-21 normalizada a  $\alpha$ -tubulina y expresada en relación con el nivel de proteína relativizado a las células control definidas como 1. Los valores se expresan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ , one sample t-test.

## EL SILENCIAMIENTO DE p21 DISMINUYE EL ÍNDICE DE FUSIÓN DE CÉLULAS BeWo-KLF6

Como se mencionó, una de las acciones más destacadas en cuanto al control de la proliferación celular por parte de KLF6 es a través de la inducción de p21.

Con el objetivo de estudiar si la fusión inducida por KLF6 depende de los niveles de expresión de p21, células BeWo-KLF6 fueron silenciadas para esta proteína mediante siARN específico (sip21) (Fig.16 A) y se evaluó la fusión celular mediante inmunotinción de desmoplaquina (Fig. 16 B). Los resultados mostraron una reducción

en los niveles de expresión de p21 en las células tratadas con sip21 respecto al control y una disminución en el índice de fusión celular cuando los niveles de p21 disminuyen, lo que indica que la fusión inducida por KLF6 es dependiente, al menos en parte, de los niveles de expresión de p21.



**Figura 16. El silenciamiento de p21 disminuye el índice de fusión de células BeWo-KLF6.** Células BeWo-KLF6 fueron transfectadas durante 72 horas con un siARN específico para p21 (sip21) o con la secuencia Scramble (SCR); como control de efecto específico las células no se transfectaron (KLF6). **A-** Niveles de expresión de p21 evaluados mediante WB utilizando  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Fusión celular analizada mediante inmunodetección de desmoplaquina (Desmo, señal roja) y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul). Imágenes representativas de algunas estructuras sinciciales delimitadas por líneas punteadas blancas. A la derecha se muestran imágenes ampliadas de los recuadros amarillos. Para cada condición se contaron como mínimo 7 campos al azar. La cuantificación de dichas imágenes se observa en el gráfico de barras expresada como el índice de fusión relativo a la fusión inducida por KLF6 (KLF6) como 1. Se muestra la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0,0005$ , ANOVA, post-test comparación múltiple de Tukey, ns: no significativo.

## EL DOMINIO ACÍDICO DE KLF6 ES NECESARIO PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS BeWo

La influencia que ejerce KLF6 sobre los procesos celulares es realizada principalmente a través de la activación o, en algunos casos, la represión de la expresión de sus genes blanco (Andreoli et al., 2010). En este sentido, la función reguladora de KLF6 requiere de sus tres dominios conservados de dedos de Zn presentes en su región C-terminal para unirse a las secuencias blanco en el ADN y de la porción acídica amino-terminal la cual posee el dominio de activación transcripcional.

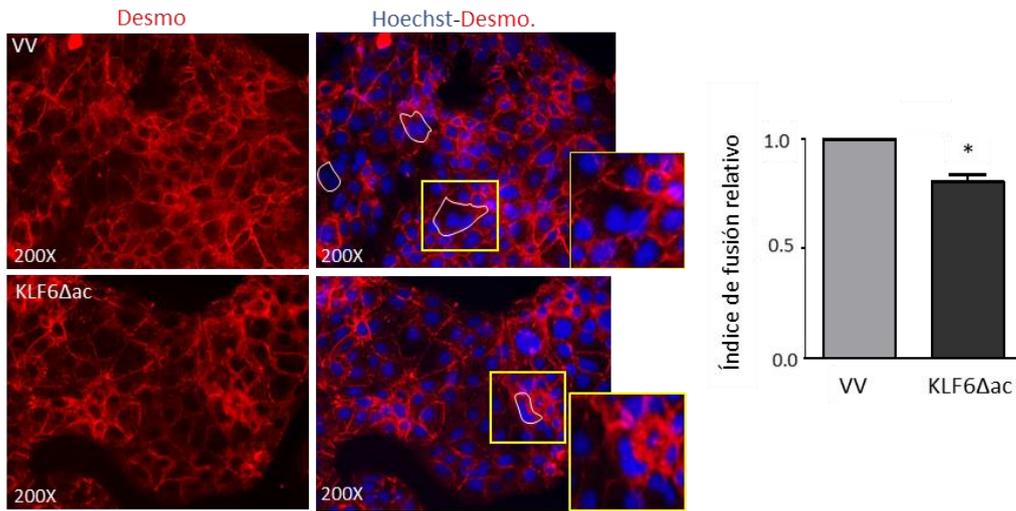
Los resultados presentados hasta el momento en esta tesis demuestran que KLF6 aumenta la fusión celular y modifica la expresión de moléculas con conocida participación en el proceso de diferenciación del trofoblasto veloso. Con el objetivo de profundizar en el mecanismo mediante el cual KLF6 está involucrado en este proceso se evaluó si requiere de su dominio acídico de transactivación. Con este fin, se analizó la fusión celular y la expresión de  $\beta$ -hCG y Syn-1 en células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac y BeWo-VV cultivadas durante 72 horas. Interesantemente, no se observó incremento en la fusión y expresión de los marcadores analizados, más aún, se observó una disminución en el índice de fusión y en los niveles de las proteínas  $\beta$ -hCG y Syn-1 en las células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac respecto al control (VV) (Fig. 17 A y B). Estos resultados indican que KLF6 requiere de su dominio acídico para inducir la diferenciación en este modelo celular y que la sobreexpresión de la mutante carente de ese dominio interfiere con la fusión y expresión basal de  $\beta$ -hCG y Syn-1 en las células BeWo.

Posteriormente se evaluó si la mutante KLF6 $\Delta$ ac interfiere con la fusión inducida por FSK. Células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac o BeWo-VV luego de 24 horas de sembradas fueron tratadas con 30  $\mu$ M de FSK o el vehículo DMSO y a las 72 horas se determinó el índice de fusión. Coincidente con lo esperado, el tratamiento con FSK aumentó el índice de fusión; sin embargo, la fusión observada en las células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac fue menor que en BeWo-VV (Fig. 17 C). Estos resultados indican que en ausencia de su dominio N-terminal, KLF6 interfiere en la fusión inducida por FSK.

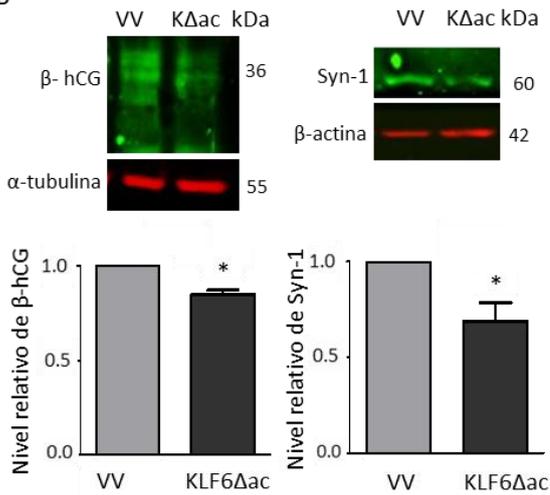
Para confirmar el rol del dominio acídico de KLF6 en la diferenciación de células BeWo se realizó un ensayo empleando células BeWo-KLF6 las cuales fueron transducidas con partículas virales pLenti-KLF6 $\Delta$ ac durante 72 horas. El análisis de la fusión celular mediante inmunofluorescencia demostró que la presencia de la variante de delección carente del dominio acídico interfiere con la inducción de la fusión celular mediada por KLF6 (Fig. 17 D). La sobreexpresión de la mutante de KLF6 se verificó mediante Western blot (Fig. 17 D).

En resumen, se demostró que la expresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac, que carece de su dominio activador N-terminal, pero mantiene su dominio de reconocimiento y unión a secuencias consenso en el ADN, disminuye la expresión de Syn-1 y  $\beta$ -hCG, interfiere en la fusión inducida por FSK y bloquea el aumento en la fusión que se inducía al sobreexpresar KLF6. Estos resultados en conjunto revelan que la función de KLF6 en el proceso de diferenciación a través de la vía vellosa requiere de su dominio de transactivación.

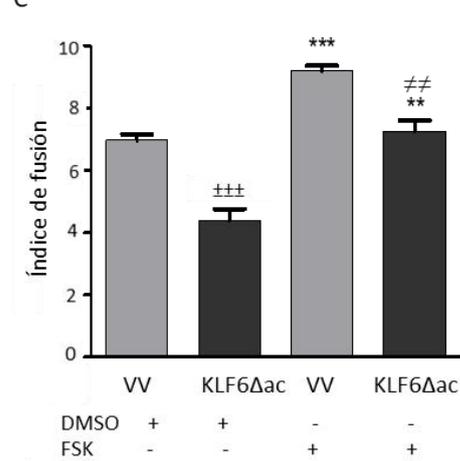
A



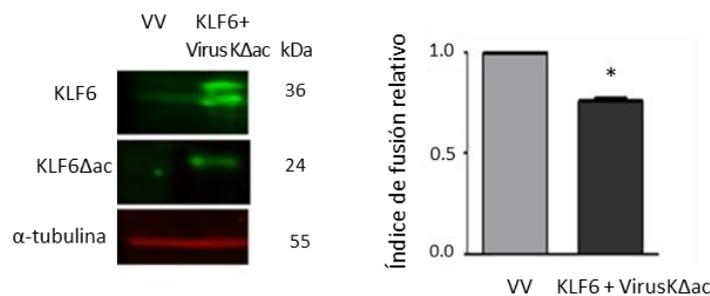
B



C



D



**Figura 17. El dominio ácido de KLF6 es necesario para la diferenciación de células BeWo.**

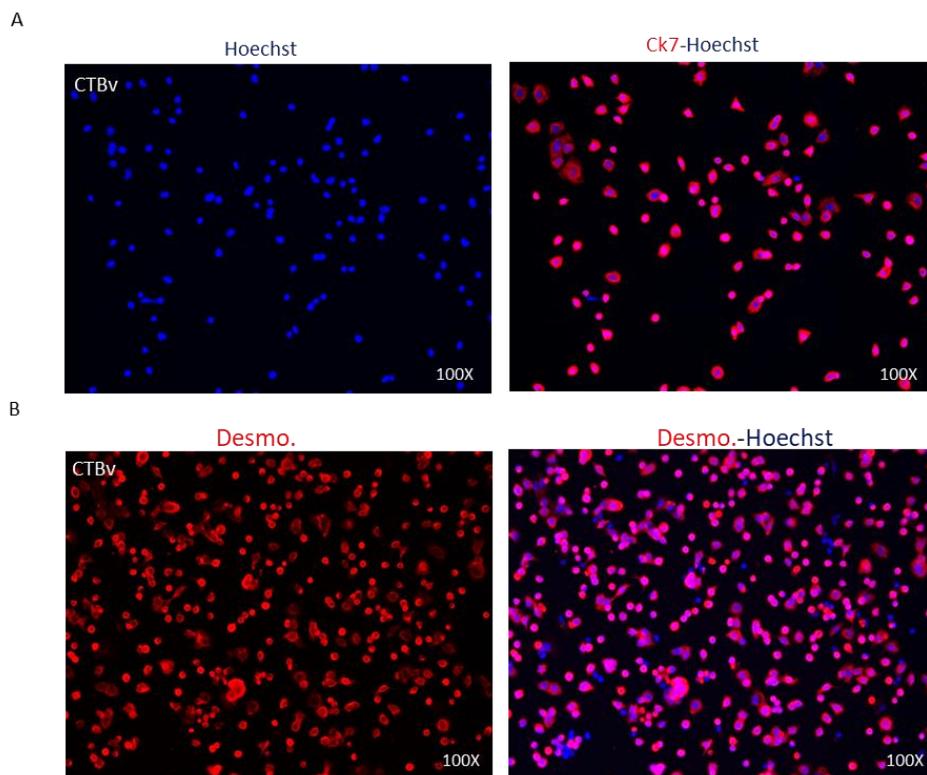
**A-** Fusión de células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac y BeWo-VV analizada luego de 72 horas de cultivo mediante inmunodetección de desmoplaquina (Desmo, señal roja) y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul). El recuadro es una imagen ampliada del cuadro amarillo. Para cada condición se contaron como mínimo 7 campos al azar. A la derecha se observa la cuantificación de la fusión celular expresada como índice de fusión celular relativo a la fusión espontánea del control (VV) como 1. Se graficó la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , one sample t-test. **B-** Niveles de expresión proteicos de  $\beta$ -hCG y Syn-1 en células BeWo-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y BeWo-VV (VV) analizados luego de 72 horas de cultivo (panel superior). Cuantificación densitométrica de los niveles relativos respecto al control normalizados con  $\alpha$ -tubulina (panel inferior) de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , one sample t-test. **C-** Índice de fusión de células BeWo- KLF6 $\Delta$ ac y BeWo-VV tratadas o no con FSK. Las células fueron sembradas y a las 24 horas tratadas durante 48 horas con FSK o DMSO como control. Se muestra la cuantificación de un experimento realizado por triplicado, representativo de tres experimentos independientes con resultados equivalentes. \*\* $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  vs las mismas células tratadas con DMSO; ## $p < 0,005$  vs VV tratada con FSK; +++  $p < 0,0005$  vs VV tratada con DMSO, ANOVA, post-test comparación múltiple de Tukey. **D-** Células BeWo-KLF6 fueron transducidas con el lentivirus KLF6 $\Delta$ ac y a las 72 horas se evaluó la fusión por inmunofluorescencia y la expresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) por WB (panel izquierdo). En paralelo se analizó la fusión de células control (VV). El gráfico representa el Índice de fusión relativo que establece la fusión espontánea en VV como 1. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes, \* $p < 0,05$ , one sample t-test.

## **PARTICIPACIÓN DE KLF6 EN LA FUSIÓN DE CITOTROFOBlastOS VELLOsos AISLADOS DE PLACENTA HUMANA**

La línea celular BeWo es el modelo de citotrofoblastos vellosos más utilizado para estudiar la diferenciación y formación del sincicio ya que comparte muchas características con los CTBv. Además, se puede disponer de cantidad ilimitada de células BeWo ya que, a diferencia de los CTBs aislados de placenta, ellas proliferan en cultivo. Sin embargo, como derivan de un coriocarcinoma pueden no ser completamente representativas de los trofoblastos humanos. En este sentido, se considera que los CTBv aislados del tejido placentario vellosos reproducen mejor lo que ocurre en la placenta (Costa, 2016). Como se mencionó en la introducción, los CTBv; aislados y purificados a partir de placentas post-parto, colocados en medio de cultivo diferencian espontáneamente formando grandes sincicios.

Con la finalidad de comprobar la participación de KLF6 y la importancia de su dominio de transactivación en la diferenciación del trofoblasto vellosos se realizaron ensayos en CTBv aislados y purificados a partir de placentas humanas normales a

término (37–41 semanas de embarazo) provenientes de cesáreas. Las placentas se obtuvieron de embarazos no complicados de pacientes no identificados con la aprobación ética del Comité Asesor local de Investigación Biomédica en Humanos de Córdoba, Argentina (RePIS No. 1202, HP 4-112) y el correspondiente consentimiento informado por parte de las pacientes. Para cada una de las placentas procesadas, se verificó la pureza de las células obtenidas mediante inmunodetección de citoqueratina 7 (Ck7), proteína ampliamente utilizada para realizar este control (Maldonado-Estrada et al., 2004). En cada experimento realizado a lo largo de esta tesis, se obtuvo un porcentaje de células positivas para CK7, mayor al 95 % (Fig. 18 A), de esta forma se aseguró el origen trofoblástico de las células utilizadas. Además, se comprobó que las células aisladas corresponden a CTB mononucleares no fusionados realizando la tinción con desmoplaquina y Hoechst luego de 12 horas de cultivo, tiempo en el cual aún no se forman estructuras tipo sinciciales. En todos los casos se observaron células redondeadas con escaso citoplasma, aisladas o agregadas en pequeños grupos y ausencia de fragmentos de sincicio placentario (Fig. 18 B).

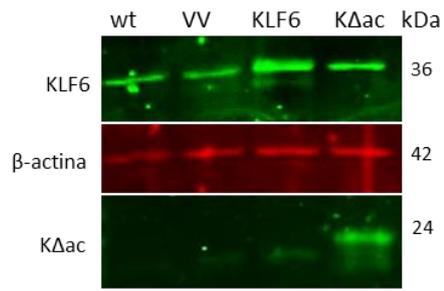


**Figura 18. Pureza de CTBv aislados y control de diferenciación.** CTBv de placentas normales a término fueron aislados, purificados y cultivados durante 12 horas y luego analizados. **A-** Pureza evaluada mediante inmunodetección de CK7 (señal roja) y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul). **B-** Presencia de células mononucleadas no fusionadas evaluada mediante inmunofluorescencia con anticuerpo anti-desmoplaquina (señal roja) y tinción de núcleos (señal azul). Se muestra una imagen representativa de ambos controles los cuales se realizaron en todas las placentas procesadas durante esta tesis.

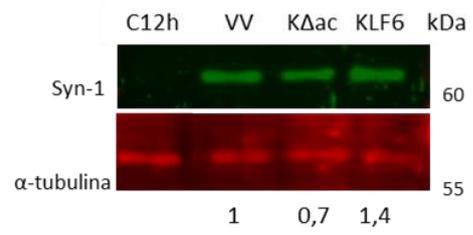
Los CTBv, luego de 4 horas de cultivo, tiempo necesario para que se adhieran a la superficie de la placa donde fueron cultivados, se transdujeron durante 72 horas con lentivirus KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac), KLF6 o con lentivirus conteniendo el vector vacío VV como control. Los niveles de expresión de las proteínas transducidas se muestran en la Figura 19 A. Se demostró que la sobreexpresión de KLF6 incrementa la expresión de la proteína fusogénica Syn-1, mientras que la transducción con K $\Delta$ ac la disminuye (Fig. 19 B). Además, la fusión de los CTBv que sobreexpresan KLF6, analizada mediante inmunofluorescencia, mostró un claro incremento en las estructuras sinciciales (Fig. 19 C). Por el contrario, las células transducidas con la mutante carente del dominio transactivador evidenciaron una clara disminución en el número de sincicios formados y en el número de núcleos por sincicio respecto a lo que se observó en los cultivos transducidos con el VV y en los cultivos de CTB no transducidos (CTBwt). Este efecto se evidencia claramente a través del cálculo del índice de fusión (Fig. 19 D).

Estos resultados indican, por un lado, que la transducción con lentivirus no modifica la capacidad fusogénica de los CTB (wt vs VV) y que los resultados obtenidos son consecuencia de la sobreexpresión de la proteína KLF6 o KLF6 $\Delta$ ac. Por otra parte, concuerdan con lo observado en el modelo de células BeWo donde KLF6 incrementa la fusión celular y la sobreexpresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac disminuye el índice de fusión. Más aún, demuestran que la fusión celular que caracteriza el proceso de diferenciación de los CTB por la vía vellosa requiere de la actividad transcripcional de KLF6. Además, sugieren que la mutante carente del dominio N-terminal actuaría como una dominante negativa que bloquea los sitios de reconocimiento de KLF6 en genes blanco impidiendo la regulación de los mismos.

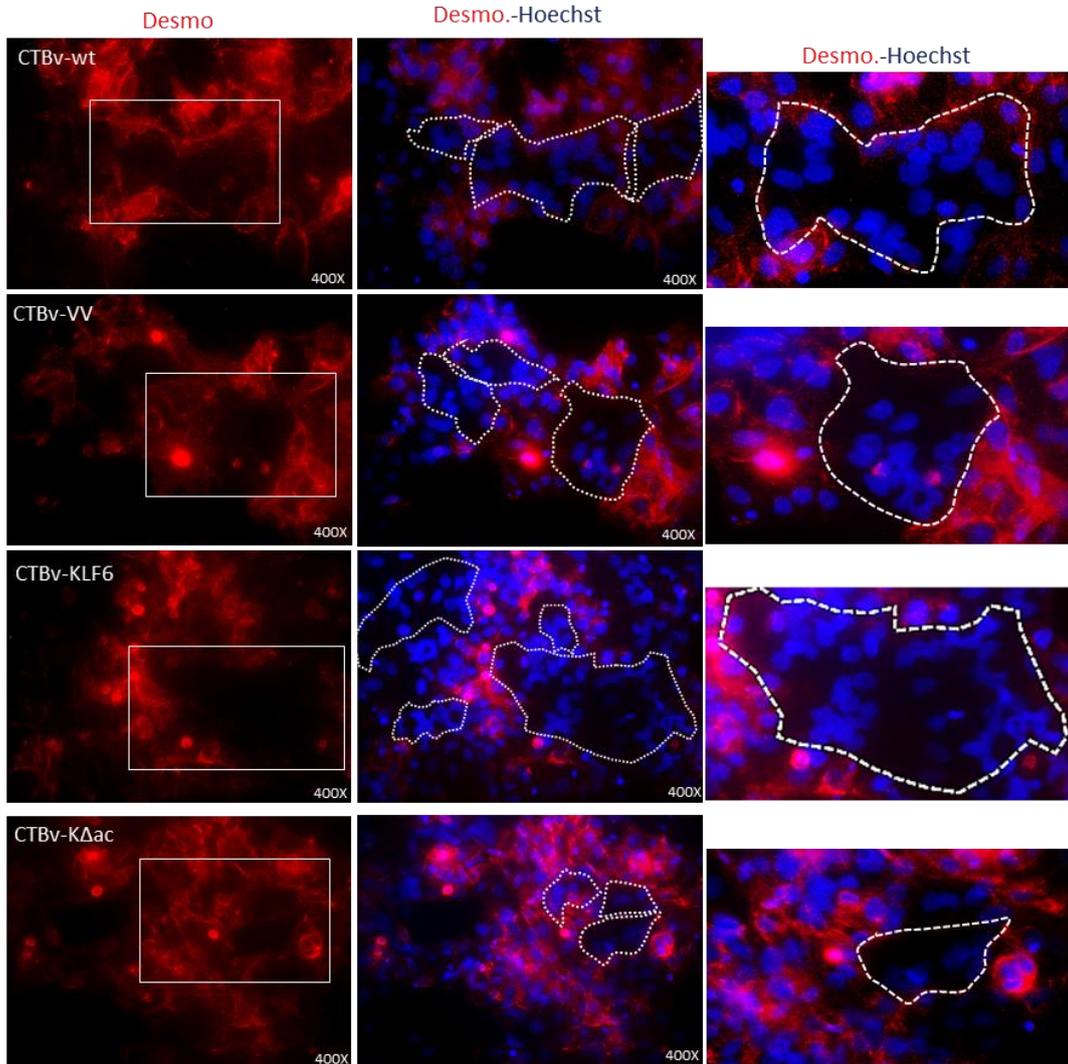
A



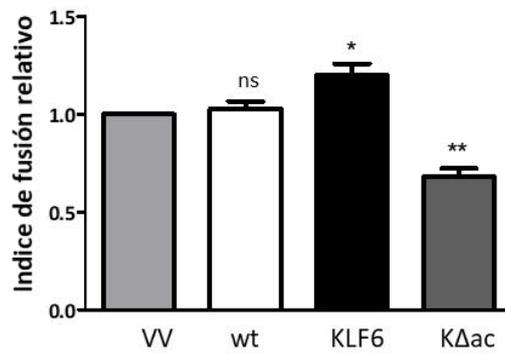
B



C



D



**Figura 19. La sobreexpresión de KLF6 favorece la formación de sincicios y la mutante carente del dominio ácido disminuye el índice de fusión de CTB vellosos.** Cultivos primarios de CTB se transdujeron con partículas virales correspondientes al control (VV), a KLF6 o KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y 72 horas post-transducción se evaluó la fusión celular y los niveles de Syn-1. **A-** Niveles de expresión de KLF6 y KLF6 $\Delta$ ac mediante WB. Se muestran imágenes de un ensayo representativo para cada proteína. Como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina. **B-** Imagen representativa de los niveles de expresión de Syn-1 medidos por WB. Se muestran los valores de la cuantificación densitométrica normalizada al control de carga ( $\alpha$ -tubulina) y expresada en relación con el nivel de proteína relativizado a las células transducidas con el vector vacío (VV) como control. C12h: control de diferenciación, CTBv no fusionados luego de 12 horas de cultivo. **C-** Fusión analizada mediante inmunodetección de desmoplaquina (desmo, señal roja) y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul). Los recuadros blancos indican las zonas de la imagen que se ampliaron a la derecha de la figura y la línea de puntos delimita estructuras sinciciales. **D-** Índice de fusión relativo a la condición VV determinado en CTBv de tipo salvaje (wt), control (VV), KLF6 y KLF6 $\Delta$ ac. Para cada condición se contaron como mínimo 10 campos al azar en tres experimentos. Se graficó la media  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ , ANOVA, post-test comparación múltiple de Tukey, ns: no significativo.

En resumen, en esta primera parte del trabajo de tesis se demostró que un aumento en la expresión de KLF6 conduce a un incremento en la fusión de células BeWo junto con un aumento en la expresión de Syn-1,  $\beta$ -hCG y otras proteínas efectoras o biomarcadoras del proceso de diferenciación vellosa. La fusión y expresión de Syn-1 y  $\beta$ -hCG en células BeWo disminuye por acción de KLF6 $\Delta$ ac, que mantiene su dominio de unión al ADN, pero carece del dominio activador. Además, KLF6 induce un incremento en la expresión de p21 y disminución en la proliferación en células BeWo, coincidente con el arresto del ciclo celular que acompaña al proceso de diferenciación.

La fusión espontánea de los CTB vellosos aislados de placenta humana a término y la expresión de Syn-1 aumentan al sobreexpresar KLF6 y disminuyen en presencia de KLF6 $\Delta$ ac. Estos hallazgos sugieren que KLF6 es un regulador maestro de la diferenciación del trofoblasto vellosa y que su dominio de transactivación N-terminal es necesario para esta función.



## **RESULTADOS II**

## **RESULTADOS: parte II**

### **PARTICIPACIÓN DE KLF6 EN LA MIGRACIÓN CELULAR**

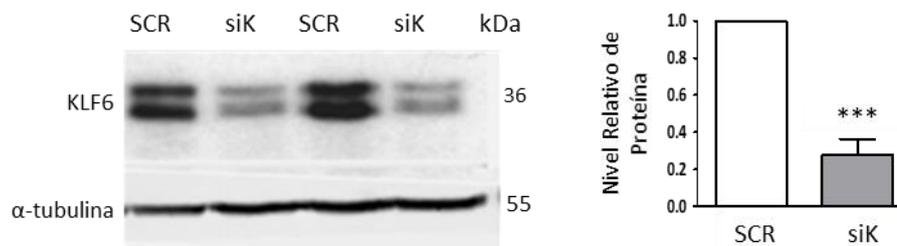
Como se mencionó, la migración celular juega un rol fundamental en el desarrollo del proceso tumoral. Así, los tumores metastásicos se caracterizan porque sus células adquieren características migratorias e invasivas más agresivas. Mientras que en la placenta la migración celular coordinada y controlada es esencial para la correcta diferenciación a través de la vía extravelosa. Anormalidades en este proceso con una capacidad migratoria deficiente se asocian con PE o IUGR, mientras patologías como GTD y placentas cretas se presentan con una mayor migración celular (Huppertz, 2018; Costa, 2016; Hui, 2019; Jauniaux et al., 2017).

En el contexto tumoral, una pérdida de funcionalidad de KLF6, ya sea por bajos niveles de expresión, o mutaciones en su secuencia se correlaciona con la progresión del cáncer, incremento en la capacidad migratoria e invasiva, y mayor agresividad (Hsu et al., 2017; Jianwei et al., 2013; Gao et al., 2017). En el contexto de la placenta se desconoce si KLF6 participa en la migración celular durante la diferenciación de citotrofoblastos extravelosos.

Como segundo objetivo de esta tesis se propuso evaluar la participación de KLF6 en la migración de células trofoblásticas extravelosas. Con esta finalidad, se realizaron estudios en condiciones de pérdida de funcionalidad de KLF6 mediante tratamiento con un siARN específico y sobreexpresión de proteínas KLF6 recombinantes carentes de sus dominios funcionales amino o carboxilo-terminal. Además, se realizaron ensayos sobreexpresando establemente el factor de transcripción KLF6 nativo.

### **EL SILENCIAMIENTO DE KLF6 CONDUCE A UN INCREMENTO DE LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS HTR8/SVneo**

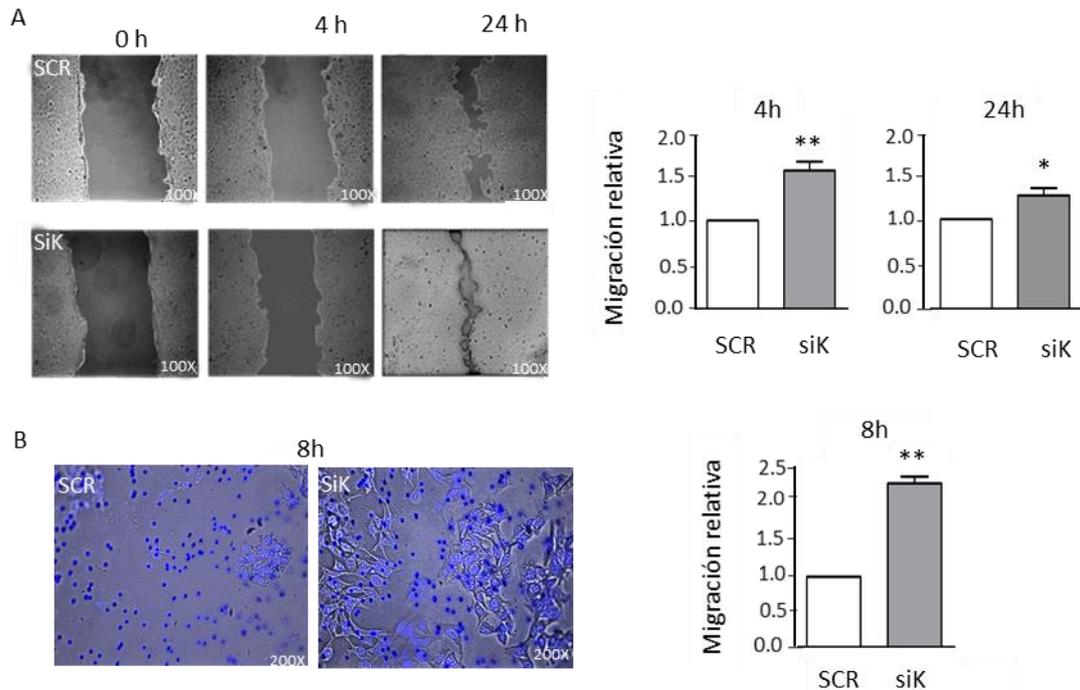
Con el fin de evaluar si KLF6 participa en la migración de células trofoblásticas se silenció KLF6 en la línea celular HTR8/SVneo que corresponde a CTBev inmortalizados (Graham et al., 1993). Estas células fueron transfectadas durante 48 horas con un siARN específico contra KLF6 (siK) y con un siRNA control o "scramble" (SCR). El nivel de silenciamiento se analizó midiendo los niveles proteicos mediante WB. Se observó que siK disminuye significativamente la expresión de KLF6 ( $72 \pm 2\%$ ) (Fig. 20).



**Figura 20. Expresión de KLF6 en células HTR8/SVneo transfectadas con siK y SCR.** A la izquierda se muestra una imagen representativa de WB realizados con extractos proteicos obtenidos de células silenciadas para KLF6 (siK) respecto a células control tratadas con SCR en diferentes experimentos. A la derecha se observa la cuantificación densitométrica de los niveles relativos de la proteína KLF6 respecto al control. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. La barra indica la media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes. \*\*\* $p < 0,0005$  one sample t-test.

La migración celular se evaluó primero a través del ensayo de cierre de herida o *Wound Healing*. Para tal fin, se realizaron heridas de tamaño similar sobre monocapas de células silenciadas o no para KLF6 y se midió el espacio acelular a tiempo 0 y el espacio acelular remanente luego de 4 y 24 horas en que las células migran para reparar las heridas. Se observó un aumento en la migración de células HTR8/SVneo silenciadas para KLF6 respecto a las células transfectadas con el control tanto a las 4 como 24 horas (Fig. 21 A). Estos resultados se confirmaron mediante ensayos de transwell donde las células en medio de cultivo con SFB 1% (v/v) sembradas en la parte superior del transwell migran a través de una membrana con microporos hacia la parte inferior que está en contacto con medio de cultivo con SFB al 10% (v/v), el cual actúa como quimioattractante. El recuento de células que atravesaron la membrana luego de 8 horas posteriores a la siembra mostró un aumento en la migración de las células silenciadas para KLF6 respecto al control (Fig. 21 B).

En conjunto, estos resultados revelan un incremento en la migración en células HTR8/SVneo cuando se disminuyen los niveles de KLF6, y sugieren que KLF6 podría actuar como un freno del proceso de migración.

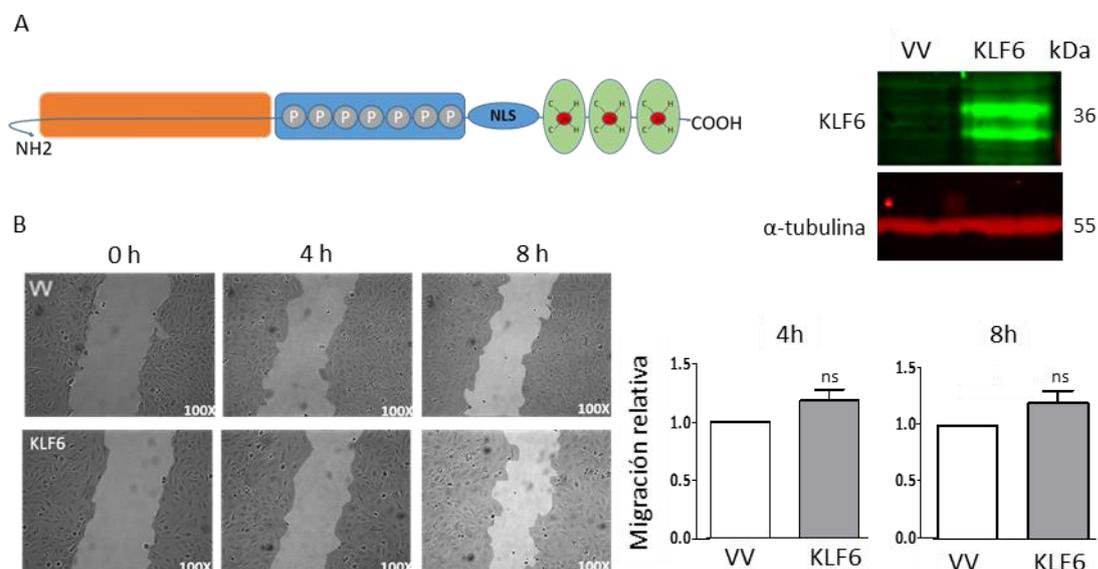


**Figura 21. El silenciamiento de KLF6 conduce a un incremento de la capacidad migratoria de células HTR8/SVneo.** Migración de células silenciadas para KLF6 (siK) o control (SCR) analizadas 48 horas post-transfección. **A-** Ensayo de cierre de la herida. A la izquierda se muestran imágenes representativas de al menos diez campos registrados por microscopía de contraste de fase a las 0, 4 y 24 horas posteriores a la realización de la herida; a la derecha, la cuantificación del área migrada calculada como la diferencia entre el área de la herida a tiempo 0 y el área remanente a las 4 y 24 horas, relativizada a la condición control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ , one sample t-test. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. **B-** Ensayo de transwell. A la izquierda se muestra una imagen representativa de las células que migraron a través del transwell para cada condición a las 8 horas, fijadas y teñidas con Hoechst. A la derecha, la correspondiente cuantificación calculada como el número relativo de células que cruzaron el transwell en la condición problema relativa a la condición control. \*\* $p < 0,005$ , one sample t-test. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

## LA SOBREENPRESIÓN DE KLF6 NO MODIFICA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS EXTRAVELLOSAS

Posteriormente, se analizó la migración en condiciones de sobreexpresión de la proteína KLF6 nativa completa. Para ello, se generaron células que expresan establemente KLF6, denominadas HTR8-KLF6, y en paralelo se prepararon células que contienen de manera estable el vector de clonado vacío, HTR8-VV, usadas como control. En ambos tipos celulares se llevó a cabo el análisis de la capacidad migratoria mediante ensayos de cierre de herida. Mediante WB se verificó la expresión de KLF6 en la línea estable HTR8-KLF6 (Fig. 22 A). Los ensayos de cierre de la herida no

mostraron cambios significativos en la capacidad migratoria de HTR8-KLF6 respecto al control en ninguno de los tiempos analizados (Fig.22 B). Por lo tanto, si bien la disminución en la expresión de KLF6 aumenta la migración, un aumento en su expresión no interfiere con la capacidad migratoria. Estos resultados sugieren una participación compleja de KLF6 en la modulación de la capacidad migratoria de estas células trofoblásticas no tumorales.



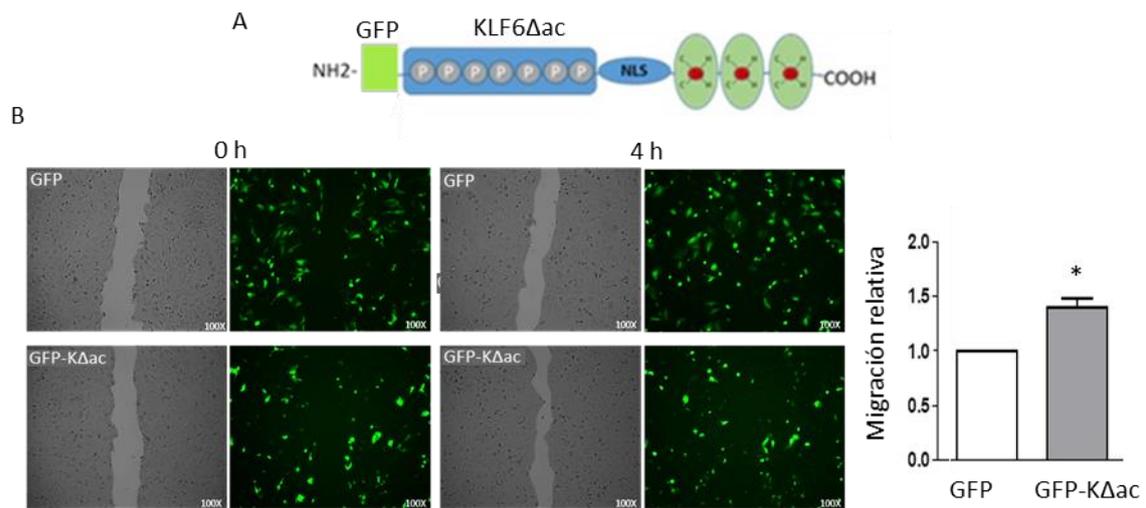
**Figura 22. La sobreexpresión de KLF6 no modifica la capacidad migratoria de células trofoblásticas extravelosas.** **A-** A la izquierda se observa la estructura de la secuencia completa de la proteína KLF6, a la cual se le evaluó el nivel de sobreexpresión mediante WB utilizando  $\alpha$ -tubulina como control de carga (derecha). **B-** Ensayo de cierre de la herida. A la izquierda se muestran imágenes representativas de al menos diez campos registrados por microscopía de contraste de fase a las 0, 4 y 8 horas posteriores a la realización de la herida; a la derecha, la cuantificación del área migrada calculada como la diferencia entre el área de la herida a tiempo 0 y el área remanente a las 4 y 8 horas, relativizada a la condición control. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. ns= no significativo.

## LA DELECCIÓN DEL DOMINIO ACÍDICO DE KLF6 INCREMENTA LA MIGRACIÓN

Como se mencionó, KLF6 posee en la región N-terminal un dominio ácido con funciones reguladoras de la transcripción de sus diferentes genes diana (Koritschoner et al., 1997). Por lo tanto, para evaluar si el aumento en la migración celular observado al silenciar KLF6 se debe a una pérdida de la regulación de genes diana de KLF6, se analizó el efecto de la delección del dominio N-terminal sobre la migración celular.

Células HTR8/SVneo se transfectaron con un plásmido recombinante que expresa la proteína de KLF6 sin su dominio N-terminal (KLF6 $\Delta$ ac) unido a la proteína fluorescente verde GFP (Green Fluorescent Protein), (GFP-K $\Delta$ ac) (Fig. 23 A). Como

control, se emplearon células transfectadas con el plásmido que expresa GFP no recombinante. La expresión de las proteínas fluorescentes se visualizó por microscopía de epifluorescencia y se comprobó que la eficiencia de transfección en ambos casos fue cercana al 30%. Luego de 48 horas post transfección se analizó la migración mediante el ensayo de Wound Healing observando un incremento en la migración a las 4 horas en las células transfectadas con GFP-K $\Delta$ ac respecto al control GFP (Fig. 23 B). Es interesante notar que el aumento en la migración ocurrió a pesar del bajo número de células transfectadas, lo cual sugiere que la pérdida de la actividad transcripcional de KLF6 podría inducir una señal “transmisibles” entre células que aumentaría la capacidad migratoria las mismas.

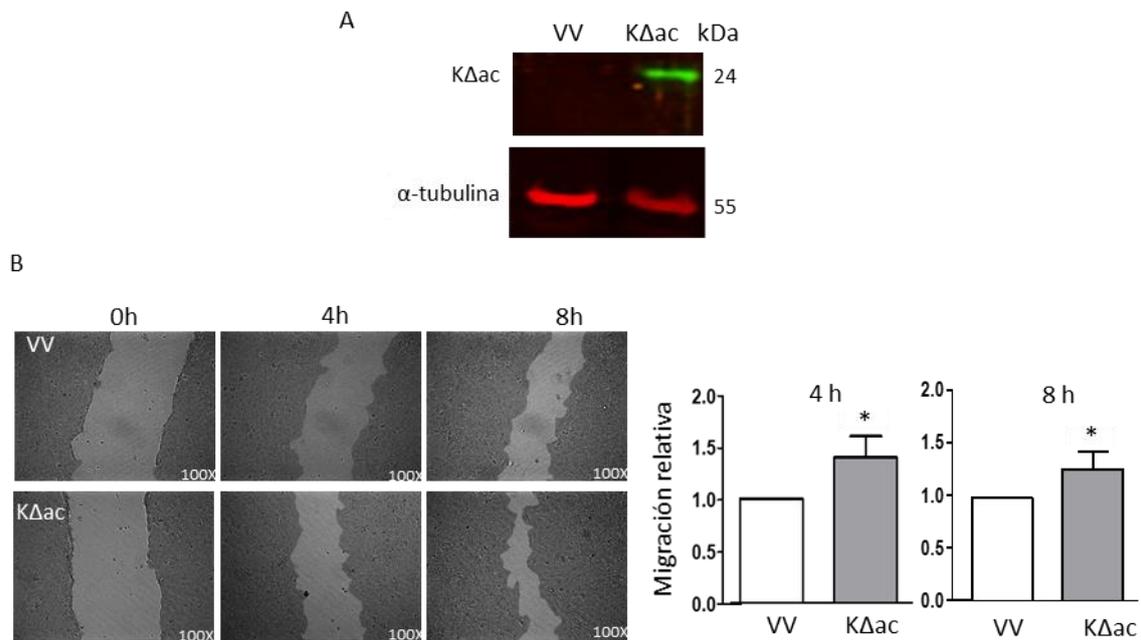


**Figura 23: La expresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac incrementa la migración de células trofoblásticas extravelosas.** Células HTR8/SVneo se transfectaron con el vector que expresa la proteína KLF6 $\Delta$ ac unida a la proteína GFP (GFP-K $\Delta$ ac) o con el vector vacío (GFP). **A-** Esquema representativo de la estructura de la proteína GFP-KLF6 $\Delta$ ac. **B-** 48 horas post-transfección se realizaron las heridas con una punta fina sobre la monocapa de células, inmediatamente después se tomaron fotografías de las heridas (tiempo 0 h) y los mismos campos se fotografiaron 4 horas más tarde. A la izquierda se muestra una imagen representativa de los diferentes ensayos realizados, donde en color verde se observan las células transfectadas que expresan la proteína GFP y GFP-KLF6 $\Delta$ ac a los diferentes tiempos analizados. A la derecha, la cuantificación del área migrada por las células que expresan la mutante de delección de KLF6 relativizada al control. Se muestra la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a las células transfectadas con GFP, one-sample t-test.

Para confirmar los resultados obtenidos en los ensayos realizados con transfecciones transientes y descartar un efecto inespecífico debido a la presencia de la fusión con GFP, se repitieron los ensayos con células que expresan de manera estable la proteína KLF6 $\Delta$ ac (HTR8- KLF6 $\Delta$ ac) y las células HTR8-VV, usadas como control. Mediante ensayos de WB se demostró la expresión de la proteína mutada KLF6 $\Delta$ ac

(K $\Delta$ ac) (Fig. 24 A). Los experimentos de cierre de la herida revelaron un aumento en la capacidad migratoria de las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac respecto al control, tanto a las 4 como 8 horas post-herida (Fig. 24 B). Estos resultados confirman que la pérdida del dominio de transactivación de KLF6 conduce a un aumento en la migración celular.

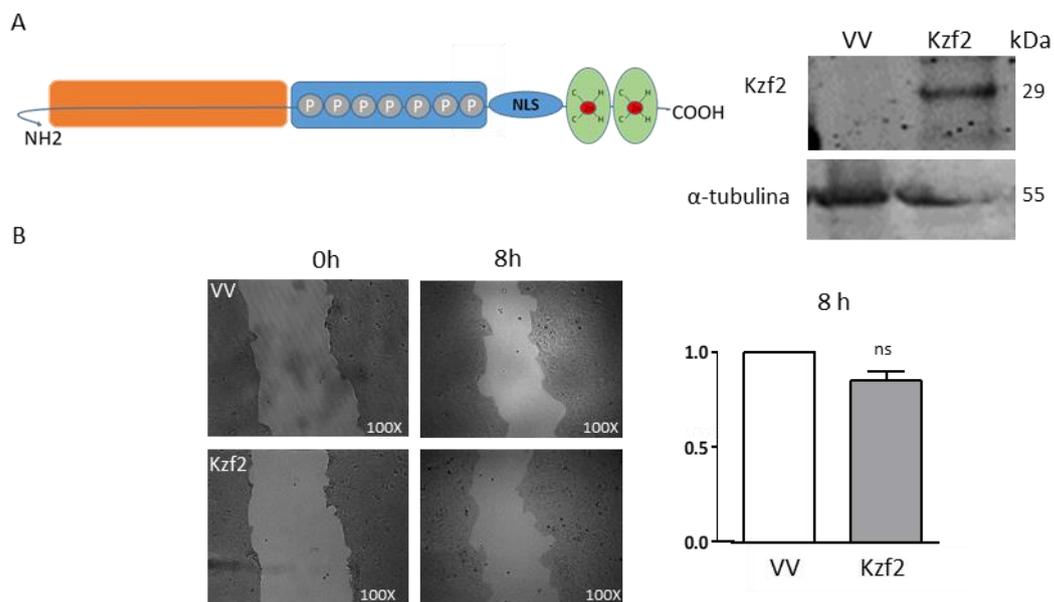
En conjunto los resultados sugieren que la pérdida de la función reguladora de KLF6 por disminución en sus niveles proteicos o por delección de su dominio regulador facilita la migración celular, probablemente por un cambio en la expresión de sus genes diana implicados en este proceso.



**Figura 24. Células HTR8/SVneo que expresan establemente la proteína mutante KLF6 $\Delta$ ac tienen una mayor capacidad migratoria.** **A-** Nivel de expresión de KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac, carril derecho) respecto del control (VV, carril izquierdo) evaluado por WB. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Ensayo de migración analizado mediante Wound Healing a las 0, 4, y 8 horas. A la izquierda se muestran imágenes representativas de las fotografías registradas por microscopía de contraste de fase en cada ensayo. La cuantificación correspondiente al área migrada para cada tiempo analizado se observa a la derecha y los valores correspondientes a las células que expresan KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) se expresan relativizados al control. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p$ <0,05 respecto al control, one-sample t-test.

### MUTACIÓN EN EL DOMINIO DE UNIÓN AL ADN DE KLF6 NO PRODUCE CAMBIOS EN LA MIGRACIÓN CELULAR

En el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica de KLF6 se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD por sus siglas en inglés) formado por tres dedos de zinc Cys2-His2. Slavin y col (2004) demostraron que la pérdida de al menos un dedo de zinc de este dominio impide la interacción de KLF6 con el ADN de sus genes diana, pero no impide su traslocación al núcleo ni su fosforilación (Slavin et al., 2004). Con el objetivo de analizar si la pérdida de al menos un motivo dedo de zinc del DBD modifica la capacidad migratoria de células trofoblásticas, se prepararon células establemente transformadas que expresan la proteína KLF6zf2 (HTR8-KLF6zf2) en la cual se deletionó el extremo C-terminal correspondiente al último dedo de zinc y como control se utilizaron células HTR8-VV. Mediante ensayos de WB se demostró la expresión de la proteína mutada KLF6zf2 (Kzf2) (Fig. 25 A). Los experimentos de migración mostraron que no hay cambios significativos en la capacidad migratoria de las células HTR8-KLF6zf2 respecto a las HTR8-VV a las 8 horas post-herida (Fig. 25 B). Estos resultados sugieren que la pérdida de un dedo de zinc del dominio DBD de KLF6 no modifica la migración celular.

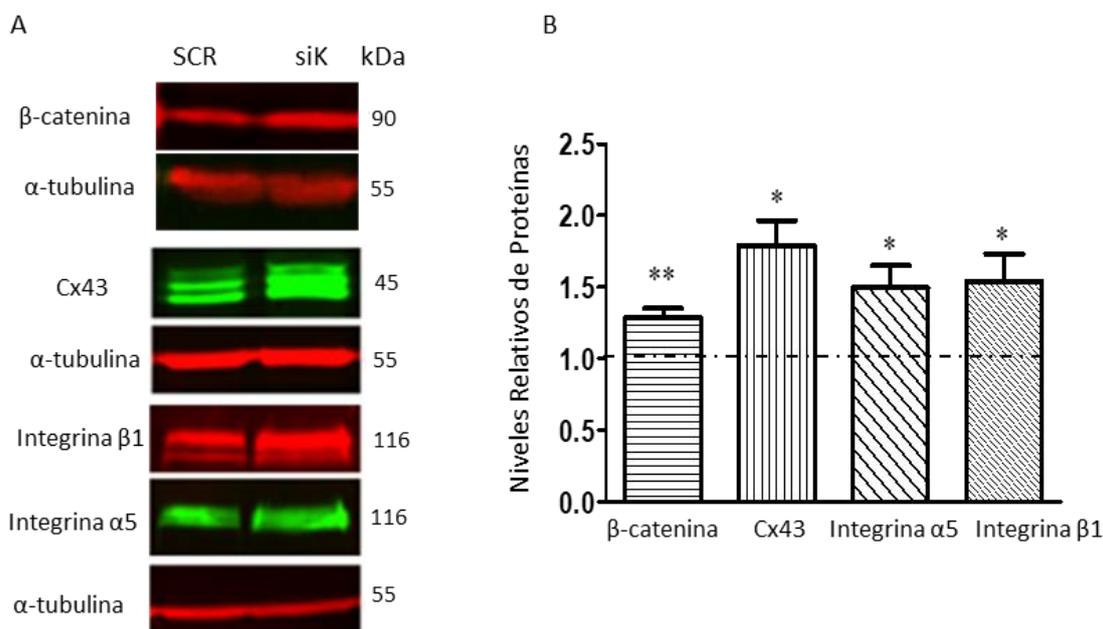


**Figura 25: La delección de un dedo de zinc del dominio DBD de KLF6 no modifica la migración de células HTR8/SVneo. A-** A la izquierda esquema de la mutante de KLF6 que presenta la delección de un dedo de zinc del dominio C-terminal. A la derecha se muestra el nivel de expresión de KLF6zf2 (Kzf2, carril derecho) respecto del control (VV, carril izquierdo) evaluado por WB. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Ensayo de migración analizado mediante Wound Healing a las 0 y 8 horas. A la izquierda se observa una imagen representativa de las fotografías de al menos diez heridas tomadas a los tiempos analizados de dos experimentos independientes. A la derecha la cuantificación del área migrada relativa a la condición control de los diferentes ensayos. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes. ns: no significativo.

## EL SILENCIAMIENTO DE KLF6 INCREMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA MIGRACIÓN

La EMT se describe como una "serie de eventos orquestados", una secuencia compleja y coordinada de procesos moleculares que permite que una célula se disocie de su arquitectura epitelial y migre a sitios distantes. Como se mencionó numerosas proteínas están involucradas en la EMT entre ellas Cx43,  $\beta$ -catenina, integrina  $\beta 1$  e integrina  $\alpha 5$ .

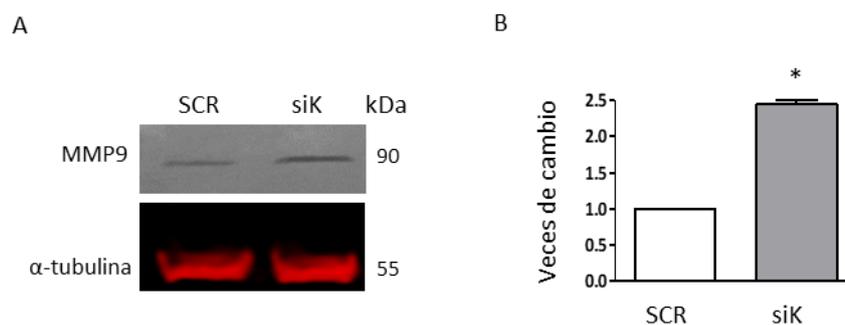
Para indagar sobre el mecanismo mediante el cual KLF6 modula la migración celular en el trofoblasto extraveloso, se evaluó mediante Western Blot el nivel de expresión de las proteínas mencionadas en células HTR8/SVneo silenciadas para KLF6 (Fig. 26). Los resultados revelaron un aumento claro y significativo en la expresión de las cuatro proteínas analizadas en las células transfectadas con siK respecto al control. Los cambios en los niveles de expresión de Cx43,  $\beta$ -catenina, integrina  $\beta 1$  e integrina  $\alpha 5$  suman evidencia a que el silenciamiento de KLF6 modula la diferenciación del trofoblasto extraveloso hacia un fenotipo migratorio.



**Figura 26. El silenciamiento de KLF6 produce un aumento en los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina, Cx43, integrina  $\alpha 5$  e integrina  $\beta 1$ .** Expresión de  $\beta$ -catenina, Cx43, integrina  $\beta 1$  e integrina  $\alpha 5$  en células HTR8/SVneo silenciadas para KLF6 y control analizadas por WB. **A-** Imágenes representativas de un ensayo. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. **B-** Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas, normalizadas con la señal de  $\alpha$ -tubulina y relativizada a la condición control SCR (línea punteada). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*p <0,05; \*\*p <0,005, one sample t-test.

Otra molécula importante en los procesos de migración de células trofoblásticas es MMP9 que es secretada al medio extracelular (Fan et al., 2016; Staun-ram et al., 2004; Wu et al., 2015). Además, se ha reportado que KLF6 actúa como un represor de la expresión de MMP9 en diferentes contextos tumorales, lo cual conduce a una disminución en la actividad proteolítica y en la migración celular (Wen et al., 2016; Jianwei et al., 2013; Das et al., 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes se evaluó la actividad de esta metaloproteínasa en el sobrenadante del medio de crecimiento de células transfectadas con siK o SCR. Para aumentar la sensibilidad de la técnica y poder detectar cambios en la actividad de MMP9 secretada sin la interferencia de las metaloproteasas del suero, los cultivos fueron privados del SFB 18 horas antes de cumplirse las 72 horas de transfección y de analizar la actividad de MMP9 mediante zimografía.

Como se muestra en la figura 27, se detectó mayor actividad de la MMP9 en el sobrenadante de las células transfectadas con siK respecto a las células transfectadas con el SCR. Coincidentemente, se ha demostrado que el silenciamiento de KLF6 en estas células conduce también a un incremento en los niveles proteicos de MMP9 medidos por WB (comunicación personal Ana Racca, dato no publicado). Estos resultados concuerdan con un aumento en la migración como consecuencia de un aumento en la expresión de MMP9 mediado por una pérdida de la regulación negativa de KLF6 sobre el gen *MMP9*.

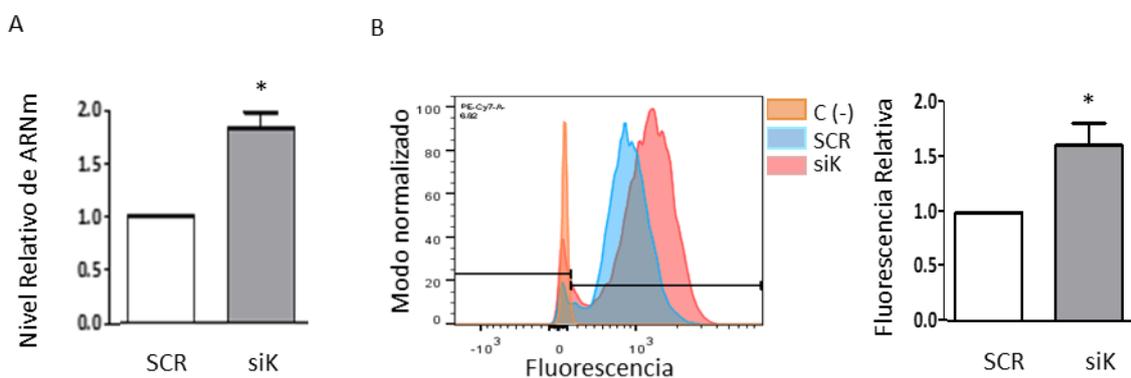


**Figura 27. El silenciamiento de KLF6 aumenta la actividad de MMP9.** Actividad de MMP9 evaluada mediante ensayo de zimografía. **A-** Imagen representativa de un gel de zimografía del sobrenadante de células transfectadas con siK o SCR, como control de carga de las muestras sembradas en el gel se utilizó  $\alpha$ -tubulina medida por WB. **B-** Cuantificación densitométrica de las bandas de MMP9 en la zimografía relativizado a  $\alpha$ -tubulina. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de dos experimentos independientes. \* $p < 0,05$  respecto a las células control, one sample t-test.

Uno de los factores de transcripción que promueve el progreso tumoral y contribuye al comportamiento maligno en varios tipos de cánceres es BCL6. Este factor es regulado negativamente por KLF6 en macrófagos (Gun-dong Kim et al., 2016) y en

células de cáncer de mama (Walker et al., 2015). En estas últimas, BCL6 induce EMT reprimiendo la transcripción de E-cadherina (Yu et al., 2015). Además, en la placenta, BCL6 es crucial para la proliferación y supervivencia de los CTB y en placentas con PE los niveles de BCL6 se encuentran incrementados (Muschol-Steinmetz et al., 2016). En base a estos antecedentes, se analizaron los niveles de transcripto (Fig. 28 A) y proteína (Fig. 28 B) de BCL6 mediante qRT-PCR y por citometría de flujo respectivamente, en células HTR8/SVneo transfectadas con siK o SCR.

Como se observa en la figura 28, los niveles de transcripto y proteína de BCL6 se encuentran incrementados en las células silenciadas para KLF6 respecto a las células control. Estos resultados demuestran que existe una modulación entre KLF6 y BCL6 en células trofoblásticas extravelosas. Además, este incremento en los niveles de BCL6 coincide con el aumento en la migración como ocurre en algunos contextos tumorales (Song et al., 2018; Yu et al., 2015).



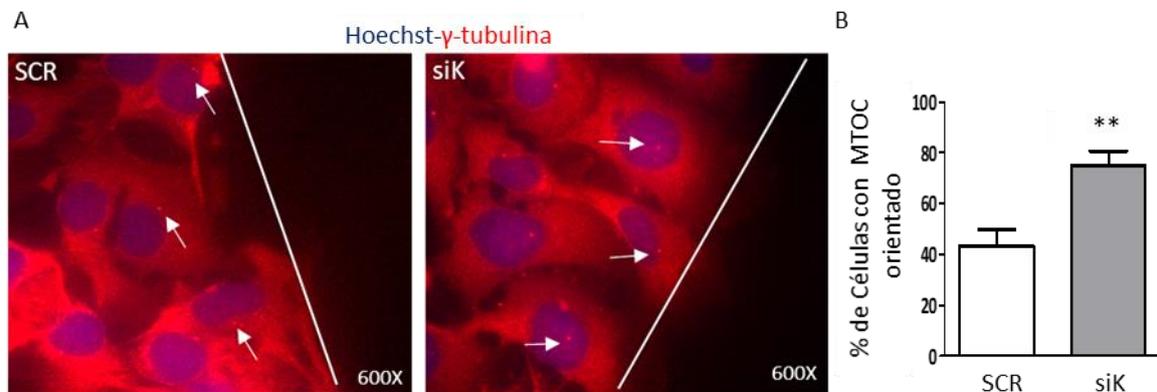
**Figura 28. El silenciamiento de KLF6 incrementa la expresión de BCL6.** **A-** Niveles relativos del transcripto de BCL6 en células silenciadas para KLF6 respecto al control analizado mediante qRT-PCR. La barra indica la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , one sample t-test. **B-** Niveles de expresión de la proteína BCL6 determinados mediante citometría de flujo. A la izquierda se muestra un histograma de un experimento representativo y a la derecha la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de células siK respecto a las células control. Los resultados se expresan normalizados a las células control SCR definidas como 1. La barra indica la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $p < 0,05$ , one sample t-test.

## ORIENTACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS (MTOC) EN CÉLULAS SILENCIADAS PARA KLF6

El MTOC localiza los extremos negativos de los microtúbulos, con funciones que incluyen nucleación, estabilización y / o anclaje de microtúbulos. El principal MTOC es el centrosoma. Los centrosomas generalmente se ubican en el centro celular cerca del núcleo, aunque esta posición central se pierde en respuesta a un estímulo de polarización que hace que los centrosomas se reorienten hacia el borde delantero de la

célula (Sütterlin and Colanzi, 2010). Durante la migración, se produce la polarización celular generando el ensamble de microtúbulos en la parte frontal de la célula y la promoción de la polimerización dinámica de actina para extender una protuberancia de la membrana.

Dado que en células trofoblásticas con un fenotipo extraveloso, el silenciamiento de KLF6 generó un aumento en la migración, se analizó si esas células estaban polarizadas a través de la orientación del MTOC. Para ello células HTR8/SVneo se transfectaron con siK o SCR, y luego de 72 horas sobre la monocapa de células crecidas se realizó una herida. La inmunotinción de  $\gamma$ -tubulina, una proteína integral del MTOC, permitió analizar su orientación en aquellas células ubicadas sobre el borde de la herida. Un porcentaje significativamente mayor de células silenciadas para KLF6 mostraron el MTOC posicionado en dirección al frente de migración comparado con las células control (Fig. 29). Este resultado indica que el silenciamiento de KLF6 genera una reorganización del citoesqueleto orientando el centro organizador de microtúbulos hacia el sentido de migración en una migración celular polarizada.

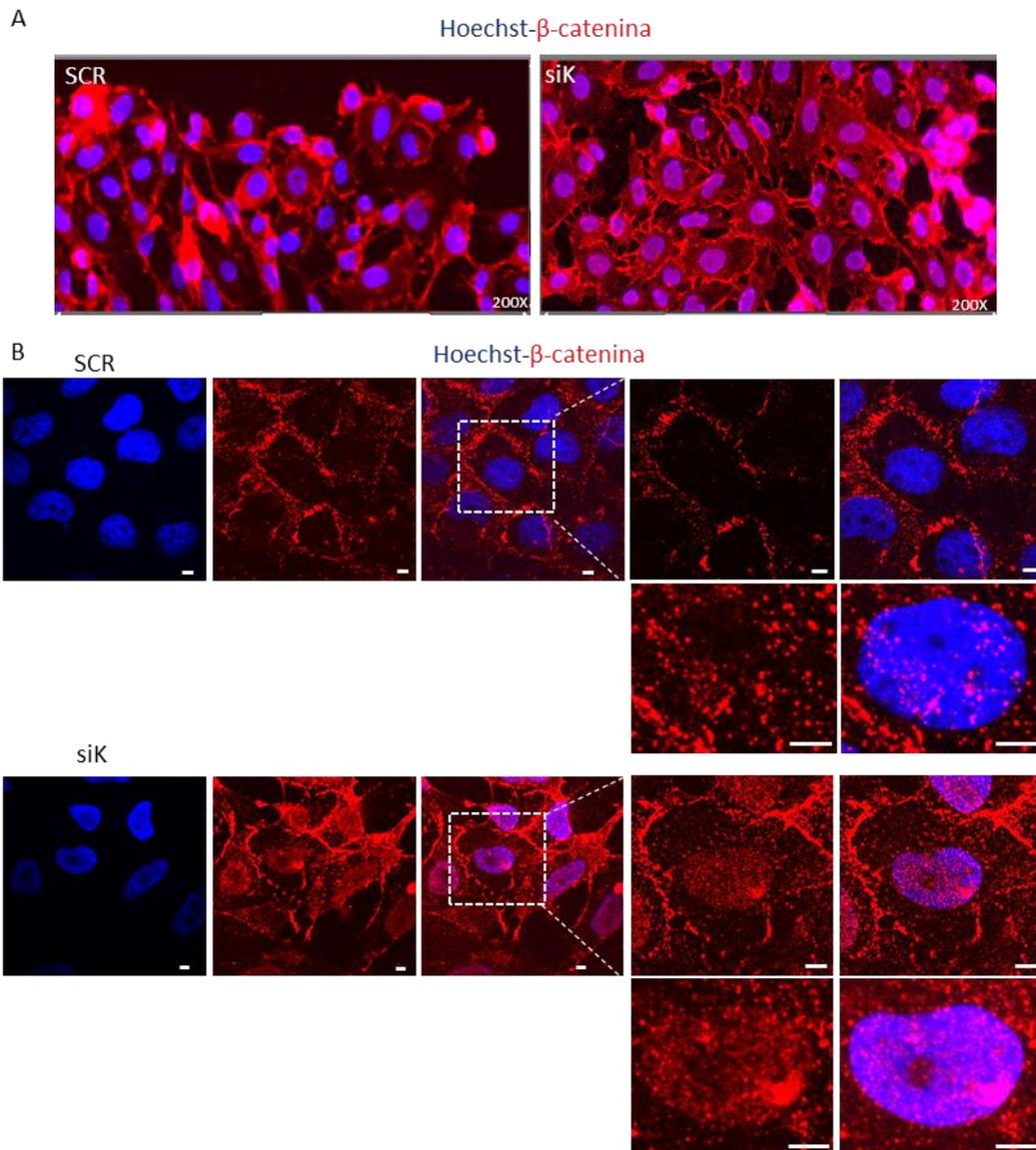


**Figura 29. El silenciamiento de KLF6 orienta al MTOC hacia el frente de migración.** Determinación de la posición del MTOC en células HTR8/SVneo transfectadas con siK o SCR. **A-** Imagen representativa de ensayo de la herida donde el MTOC (flechas blancas) se detectó mediante inmunotinción con anti- $\gamma$ -tubulina y los núcleos se tiñeron con Hoechst. Las líneas marcan el borde de la herida. Siguiendo el criterio de Francis et al., 2011 se consideró que una célula en migración tiene su MTOC correctamente localizado si el mismo se ubica dentro de un ángulo de  $120^\circ$  con respecto al frente de migración. **B-** Cuantificación del porcentaje de células situadas en el borde de la herida que mostraron el MTOC orientado hacia el frente de migración en cada condición. Media  $\pm$  SEM, \*\* $p < 0,005$ , t-test.

## TRASLOCACIÓN DE $\beta$ -CATENINA AL NÚCLEO

La  $\beta$ -catenina es una proteína que participa en la formación de uniones adherentes dependientes de E-cadherina y como un componente clave en la transducción de señales intracelulares. Para realizar esta última función  $\beta$ -catenina debe trasladarse hacia el núcleo. Se ha reportado que la señalización a través de  $\beta$ -catenina puede promover la diferenciación invasiva del trofoblasto contribuyendo a la hiperplasia trofoblástica y la invasión local (Pollheimer et al., 2006).

Habiendo demostrado previamente que el silenciamiento de KLF6 en células trofoblásticas extravelosas incrementa la migración y los niveles proteicos de  $\beta$ -catenina, se analizó si conduce a un aumento a nivel nuclear o un cambio en la localización de la misma. Para ello se realizaron ensayos de inmunodetección de  $\beta$ -catenina y tinción de núcleos con Hoechst en células HTR8/SVneo silenciadas para KLF6 (siK) y en células tratadas con el siRNA control (SCR). Las imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia sugieren un aumento de la señal fluorescente en el núcleo de las células siK respecto a las células SCR (Fig. 30 A). Este resultado fue confirmado por microscopía confocal mediante la que se realizaron varias fotografías seriadas en el plano Z para cada célula analizada. La señal de  $\beta$ -catenina se observó en ambas condiciones, pero solo en las células siK se detectó una clara marca nuclear (Fig. 30 B). Por lo tanto, el silenciamiento de KLF6 promueve la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo, lo cual contribuiría a la activación de vías o moléculas que regulan la migración.



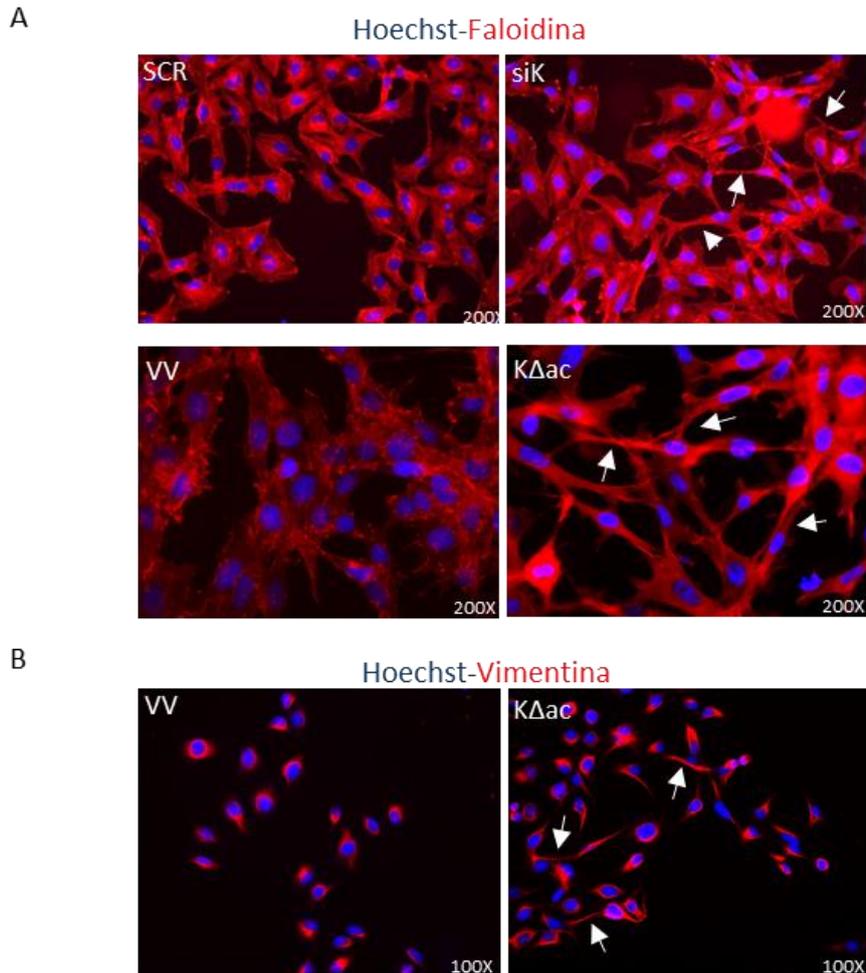
**Figura 30. La disminución de KLF6 promueve la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo.** Células HTR8/SVneo se transfectaron con siK o SCR y 72 horas después se evaluó la expresión de  $\beta$ -catenina mediante inmunofluorescencia. La inmunodetección de  $\beta$ -catenina se observa en rojo, y la tinción de núcleos con Hoechst (señal azul). **A-** Microscopía de epifluorescencia. **B-** Microscopía confocal. A la derecha se muestra una imagen ampliada de la célula que está en la zona enmarcada por el recuadro, barra = 5  $\mu$ m.

### **CAMBIOS MORFOLÓGICOS ASOCIADOS A LA PÉRDIDA DE FUNCIONALIDAD DE KLF6**

Los microfilamentos de actina proporcionan una base mecánica para los movimientos celulares, y la polimerización de microfilamentos de actina en el borde delantero de la célula proporciona el crecimiento de lamelipodios y filopodios. La formación de estructuras del citoesqueleto de actina está regulada por pequeñas

GTPasas de la familia RHO, incluidas RAC1, RHOA y CDC42 (Limia et al., 2019). La vimentina se expresa como la principal proteína de los filamentos intermedios y cumple funciones relacionadas con la migración, como la determinación de la polaridad celular, la regulación de la formación del contacto celular y la disposición y el transporte de las proteínas involucradas en la motilidad celular. La expresión de vimentina en las células cancerosas se correlaciona con su capacidad de migrar e invadir los tejidos circundantes, y su expresión es común durante la metástasis. La inhibición de la expresión de vimentina en las células tumorales conduce a disminución de la motilidad y la invasividad (Chernoivanenko et al., 2013).

Como se describió en la introducción, el proceso de migración celular involucra cambios en el citoesqueleto. Por lo tanto, se indagó si la migración inducida por la pérdida de KLF6 en células HTR8/SVneo está acompañada de cambios morfológicos asociados a EMT. En células silenciadas para KLF6, en la línea estable HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y en sus respectivas células control se inmunomarcaron los filamentos de F-actina mediante tinción con faloidina (Fig. 31 A). En las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac también se analizó la expresión de vimentina (Fig. 31 B). Como se muestra en la figura 31 A, la disminución en los niveles de KLF6 o la expresión de la mutante de KLF6 carente de su dominio ácido modifican el citoesqueleto de F-actina produciendo cambios morfológicos. Las células adoptan una forma más alargada y adquieren una apariencia fibroblástica con largas extensiones (tipo filopodios) que conectan las células entre sí. Además, las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac mostraron cambios morfológicos similares a los descritos anteriormente cuando se analizó la expresión de vimentina. Estos resultados indican que la pérdida de KLF6 genera un cambio morfológico compatible con una transformación epitelio mesenquimal.



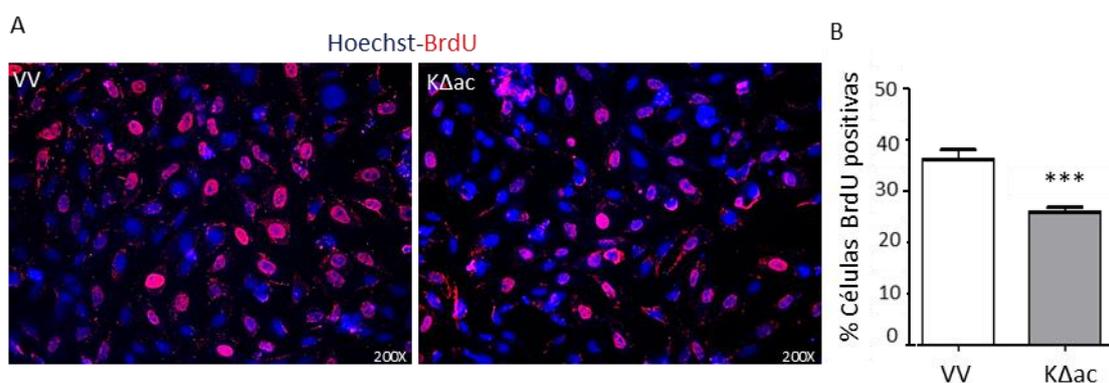
**Figura 31. La pérdida de funcionalidad de KLF6 afecta al citoesqueleto de células HTR8/SVneo. A-** En células HTR8/SVneo silenciadas para KLF6 y en células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) se analizó el citoesqueleto de filamentos de actina mediante tinción con Faloidina. Detección de F-actina (señal roja), y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul) detectado por microscopía de epifluorescencia. **B-** En células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y HTR8-VV (VV) se analizó la expresión de vimentina mediante inmunofluorescencia. Inmunodetección de vimentina (señal roja), y tinción de núcleos con Hoechst (señal azul) observado por microscopía de epifluorescencia. Las flechas blancas indican las protuberancias que parecen conectar las células entre sí.

### LA SOBREEXPRESIÓN DE KLF6 $\Delta$ ac DISMINUYE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Como ya se mencionó la proliferación es uno de los procesos estrictamente regulados durante la diferenciación de los CTB, y KLF6 regula este proceso en diferentes contextos celulares en los cuales puede desempeñar funciones antagónicas. Para evaluar si la actividad transcripcional de KLF6 participa en el control de la proliferación en el contexto del trofoblasto extraveloso, se analizó la tasa de

proliferación en células que sobreexpresan la proteína KLF6 $\Delta$ ac carente del dominio activador de KLF6.

Como se puede observar en la figura 32, el porcentaje de células que incorporaron BrdU fue menor en células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac que en las células control HTR8-VV revelando una disminución en la tasa de proliferación celular. Este resultado sugiere que KLF6 participa en el mantenimiento del estado proliferativo de estas células y que la pérdida de su función reguladora o una disminución en su expresión contribuirían al freno en la replicación para dar lugar a la diferenciación a través de la vía extravellosa.



**Figura 32. La sobreexpresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac disminuye la proliferación de células HTR8/SVneo.** En células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y HTR8-VV (VV) se evaluó la proliferación celular mediante incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). **A-** Imágenes representativas de inmunofluorescencia. La señal roja muestra las células que han incorporado BrdU y en azul los núcleos teñidos con Hoechst. **B-** Cuantificación del porcentaje de células BrdU positivas. En cada condición se contaron un total de al menos 1000 células de diferentes campos al azar, se muestra la media  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes. \*\*\* $p < 0,0005$ , t-test.

## ANÁLISIS CELULAR Y MOLECULAR DE CÉLULAS HTR8-KLF6 $\Delta$ AC POR MÉTODOS NO INVASIVOS

La microscopía de fuerza atómica (**A**tomic **F**orce **M**icroscopy, AFM) y la espectroscopía Raman son herramientas que permiten caracterizar las propiedades bioquímicas y biomecánicas celulares en muestras micrométricas (a nivel de una sola célula) *in situ*, en tiempo real y en condiciones no invasivas. Estas dos metodologías fueron utilizadas para profundizar el estudio en las células HTR8/SVneo que sobreexpresan la mutante de KLF6 carente del dominio activador.

La AFM fue llevada a cabo con el fin de comprobar los cambios morfológicos inducidos por la sobreexpresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac y evaluar si dichos cambios se acompañan de modificaciones en las propiedades mecánicas de las células. La

espectroscopía Raman se realizó, para identificar los cambios moleculares que acompañan a las modificaciones celulares observados en la línea estable HTR8-KLF6 $\Delta$ ac respecto a la línea control HTR8-VV.

Los estudios y ensayos para llevar a cabo tanto la AFM como la espectroscopía Raman se realizaron a través de una pasantía y colaboración con el profesor Alexandre Borbely de la Universidad Federal de Alagoas (UFAL), Brasil, quién utiliza estas técnicas para el análisis de células trofoblásticas (Botelho et al., 2019). Cabe destacar que la Facultad en donde se realizó esta tesis cuenta con la infraestructura necesaria para llevar a cabo dichas técnicas, pero hasta el momento de la pasantía no se utilizaban en el campo de la biología celular y molecular.

#### *Microscopía de Fuerza atómica*

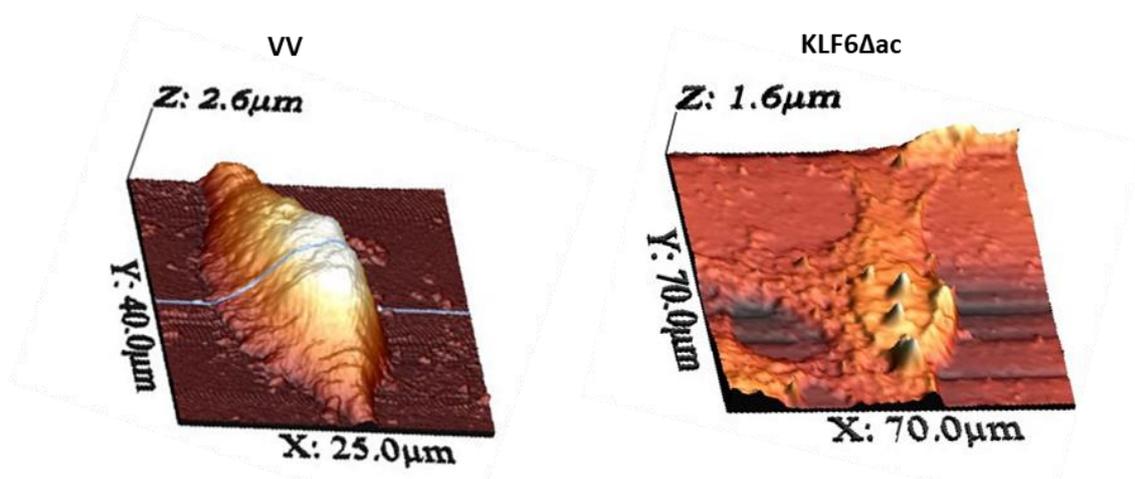
La AFM es una técnica analítica de escaneo de superficie que permite la detección y medición con resolución nanométrica de las características topográficas y morfológicas de una muestra. La AFM ofrece una serie de ventajas adicionales que la hace muy provechosa para aplicaciones biológicas: (a) la caracterización de muestras por AFM no requiere deshidratación, marcación de muestras con marcas fluorescentes o anticuerpos, o recubrimiento de superficie (por ejemplo, recubrimiento por pulverización catódica comúnmente utilizado en microscopía electrónica), (b) la AFM funciona bien tanto en aire como en líquido, lo que permite obtener imágenes de células vivas, (c) las imágenes de AFM se hacen inherentemente en 3D, donde se acompaña el plano horizontal XY por la dimensión Z (vertical), (d) los modos AFM de última generación pueden combinar información cualitativa y cuantitativa, como imágenes de alta resolución con datos de módulo, adhesión y deformación de Young, lo que convierte a AFM en una herramienta multifuncional para diversos estudios (Stylianou and Stylianopoulos, 2016).

La base de la AFM consiste en escanear una superficie con una punta muy afilada montada en una micropalanca (cantilever). Debido a las fuerzas de la superficie de la punta, la micropalanca se dobla verticalmente y un rayo láser que se enfoca en la parte posterior de la misma es desviado y detectado por un fotodetector. Como resultado, el movimiento de la punta se registra con un sistema de detección óptica y esta deformación puede traducirse directamente en una fuerza con precisión de picoNewton. Un escáner piezoeléctrico controla el movimiento de la superficie con precisión inferior al Amstrong. La desviación de la punta se traduce en una imagen tridimensional de la superficie, y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de veces (Simon and Durrieu, 2006).

Mediante esta técnica se puede medir fuerza o tomar imágenes para analizar por ejemplo rugosidad. En la modalidad de imagen, la superficie es barrida en el plano obteniendo información sobre la topografía de la muestra. Las medidas de fuerza permiten medir interacciones moleculares individuales, y obtener información de alta resolución de datos no topográficos como la elasticidad, rigidez o propiedades de adhesión de cualquier tipo de muestra (Dinarelli et al., 2018). Numerosas evidencias soportan el análisis de estas propiedades para evaluar o complementar estudios asociados a EMT, migración e invasión celular (Hu et al., 2018; Kulkarni et al., 2018; Berquand et al., 2019; Principe et al., 2017; Blaue et al., 2018).

La morfología y topografía de células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y HTR8-VV fue evaluada con un microscopio de fuerza atómica, luego de que las células fueran cultivadas durante 24 horas y fijadas con glutaraldehído al 5 % en PBS. Las imágenes tridimensionales mostraron que las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac tienen una morfología diferente en cuanto a longitud, ancho y altura respecto a las células control. Las células que expresan la proteína KLF6 $\Delta$ ac, en general, son más alargadas, más anchas y de menor altura, similares a la morfología de células fibroblásticas (Fig. 33). Esta observación concuerda con la morfología detectada al analizar proteínas del citoesqueleto por microscopía de fluorescencia (Fig. 31). Así, refuerza las evidencias a favor del rol de KLF6 en mantener un fenotipo más epitelial, ya que al interferir en su función por la sobreexpresión de la mutante carente de actividad transcripcional, las células adquieren un fenotipo compatible con características mesenquimales propias de células más migratorias.

Debido a la escasa altura de las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y las limitaciones del equipo de AFM con el que se trabajó, no se pudo realizar la adquisición de datos para medidas de fuerza y de elasticidad.



**Figura 33. Análisis de la altura y la superficie celular mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).** Se muestra una imagen representativa en 3D de una célula HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (KLF6 $\Delta$ ac) y una célula control (VV) con los valores obtenidos para el ancho (X), largo (Y) y la altura (Z), los cuales fueron muy similares entre las diferentes células analizadas del mismo tipo. Las imágenes fueron obtenidas usando una configuración de AFM estándar (Multiview 4000 <sup>TM</sup>, Nanonics, Israel), con un microscopio óptico combinado (BXFM, Olympus, Japón), y luego se procesaron con el software WSxM para la visión en 3D.

### *Espectroscopía Raman*

La espectroscopía Raman es una técnica que usa la interacción de la luz con la materia (en este caso la célula) para obtener información sobre la composición o las características de un material.

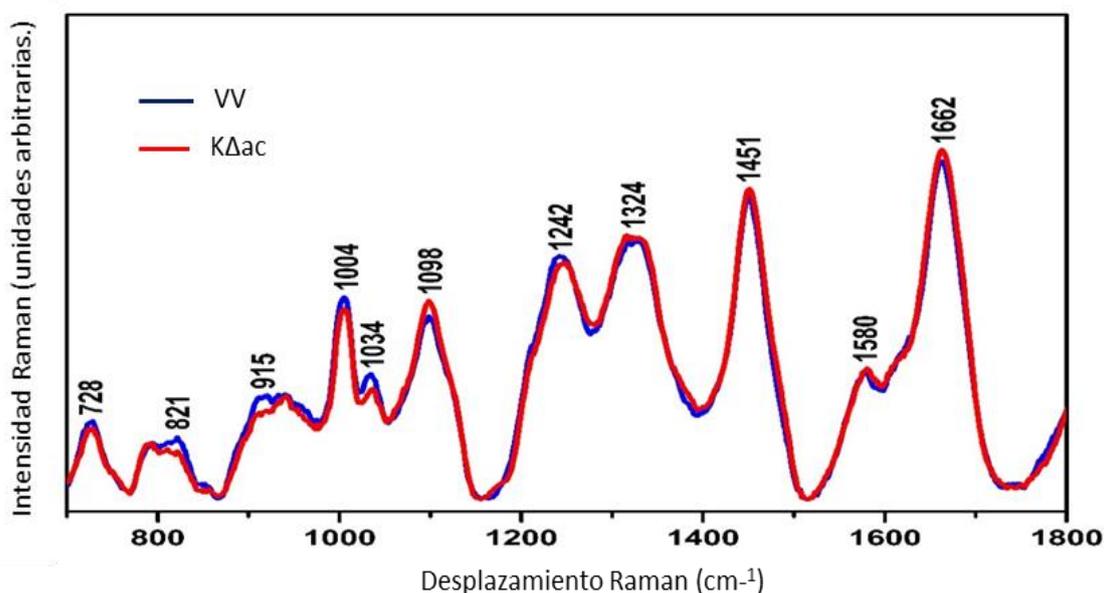
Este tipo de espectroscopía ha comenzado a ser utilizada en la caracterización molecular en células de placenta. Por ejemplo, en el estudio de variaciones moleculares en placentas preeclámpticas (Chen et al., 2014), la valoración de biomarcadores de tejido placentario normal y patológico (Pielesz et al., 2019) y para diferenciar vesículas extracelulares derivadas del trofoblasto de placenta bovina y de células mononucleadas de sangre periférica (Zhang et al., 2020).

El espectro Raman sirve como una "huella digital molecular" de una muestra proporcionando información sobre enlaces moleculares, conformaciones, e interacciones intermoleculares. Los espectros Raman son la representación gráfica de la intensidad de la señal óptica producida por la dispersión inelástica (o efecto Raman) frente al número de onda al que se produce dicha dispersión. La dispersión inelástica ocurre cuando los fotones de la luz láser excitan la molécula del medio llevando dicha molécula del estado basal al estado excitado, posteriormente, los fotones decaen del estado excitado a un estado basal diferente al estado inicial (Tu and Chang, 2012).

El espectro Raman de una célula provee información sobre su composición bioquímica, por lo que cada tipo de célula tendrá un espectro Raman asociado. Los espectros Raman de células vivas consisten en bandas correspondientes a todos los biopolímeros que se encuentran en las células. Los ácidos nucleicos se pueden identificar por los picos característicos de las vibraciones de los nucleótidos y de la cadena azúcar-fosfato cuyos picos principales se encuentran en 1095  $\text{cm}^{-1}$ , 788  $\text{cm}^{-1}$ , 813-821  $\text{cm}^{-1}$ , 782  $\text{cm}^{-1}$  y 1578  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros de las proteínas están dominados por picos correspondientes a las vibraciones amida I (1660-1670  $\text{cm}^{-1}$ ) y amida III (1200-1300  $\text{cm}^{-1}$ ), y picos que corresponden principalmente a aminoácidos que contienen grupos fenilo, como fenilalanina (1005  $\text{cm}^{-1}$ ), tirosina (854  $\text{cm}^{-1}$ ) y triptófano (760  $\text{cm}^{-1}$ ), así como vibraciones C-H (1449  $\text{cm}^{-1}$ ). Para los lípidos los picos más fuertes están presentes a 1449  $\text{cm}^{-1}$ , 1301  $\text{cm}^{-1}$  y a 1660  $\text{cm}^{-1}$  y pertenecen a las vibraciones de las

cadena de hidrocarburos. Se pueden encontrar picos Raman adicionales correspondientes a la cabeza polar de los fosfolípidos ( $719\text{ cm}^{-1}$ ). Mientras que los picos característicos de los carbohidratos debidos a la vibración del enlace glicosídico y el anillo azúcar se ubican entre  $800\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  (Notingher, 2007).

Con la finalidad de analizar cambios a nivel molecular en células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y HTR8-VV se obtuvo el espectro Raman para 60 células de cada tipo celular. Los espectros promedio obtenidos en la región entre  $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  se muestran en la figura 34. En la tabla II se describe la identidad de la vibración molecular correspondiente para cada pico observado. En general, los espectros promedios de cada tipo celular muestran características similares en la región entre  $1000\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$  con la misma cantidad de picos y similar forma de los picos para iguales números de onda. Las principales diferencias en la forma de los espectros se observan en la zona comprendida entre  $700\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ , región dónde se encuentran frecuencias de vibración correspondientes a ácidos nucleicos.



**Figura 34. Espectroscopía Raman.** Células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y HTR8-VV como control fueron analizadas en un espectrómetro Horiba XploRA acoplado a un microscopio Olympus. En las mismas condiciones, se midieron 60 espectros para cada tipo de célula en el rango espectral de  $700\text{ a }1800\text{ cm}^{-1}$ . Se muestra el solapamiento de los espectros promedios para cada tipo de célula. Los datos en color rojo corresponden a células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac) y en azul a células HTR8-VV (VV).

**Tabla II.** Características de la vibración molecular correspondiente a los picos observados en los espectros de células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y HTR8-VV.

Picos Raman (cm <sup>-1</sup> )	Modos vibracionales
722-728	Vibración del anillo de adenina <sup>b, d, e</sup>
785/788	Enlaces fosfodiéster O – P – O en el ADN y uracilo, timina y anillo de citosina ADN/ ARN <sup>a, b, d, e, f, h,</sup>
813-821	Enlaces fosfodiéster de ARN, <sup>b, f</sup>
913/915	Vibración de Ribosa del ARN <sup>b, j</sup>
1003-1005	Anillo de fenilalanina <sup>a, e, f, h, k</sup>
1033/1034	Anillo de fenilalanina <sup>a, c, e</sup>
1095/1098	(PO <sub>2</sub> -) DNA/RNA <sup>a, b, c, e, k</sup>
1200-1250	Amida III <sup>a, d, e, h</sup>
1324	Vibración CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> en las bases de purina del ADN, guanina <sup>g</sup>
1451	Vibración de flexión CH <sub>2</sub> y la deformación CH <sub>3</sub> de proteínas y lípidos <sup>a, c, e, h,</sup>
1580	Guanina, adenina (DNA/RNA) <sup>a, b, e</sup>
1662	Amida I <sup>c, d, e, h, i</sup>

<sup>a</sup>(El-hagrasy et al., 2012) ; <sup>b</sup>(Ghita et al., 2012); <sup>c</sup>(Weselucha-Birczynska et al., 2013); <sup>d</sup>(Mian et al., 2016); <sup>e</sup>(Notingher, 2007); <sup>f</sup>(Notingher et al., 2004); <sup>g</sup>(Lau et al., 2005); <sup>h</sup>(Bogliolo et al., 2013); <sup>i</sup>(Zhang & Min, 2017); <sup>j</sup>(Chan et al., 2006); <sup>k</sup>(Brauchle & Schenke-Layland, 2013).

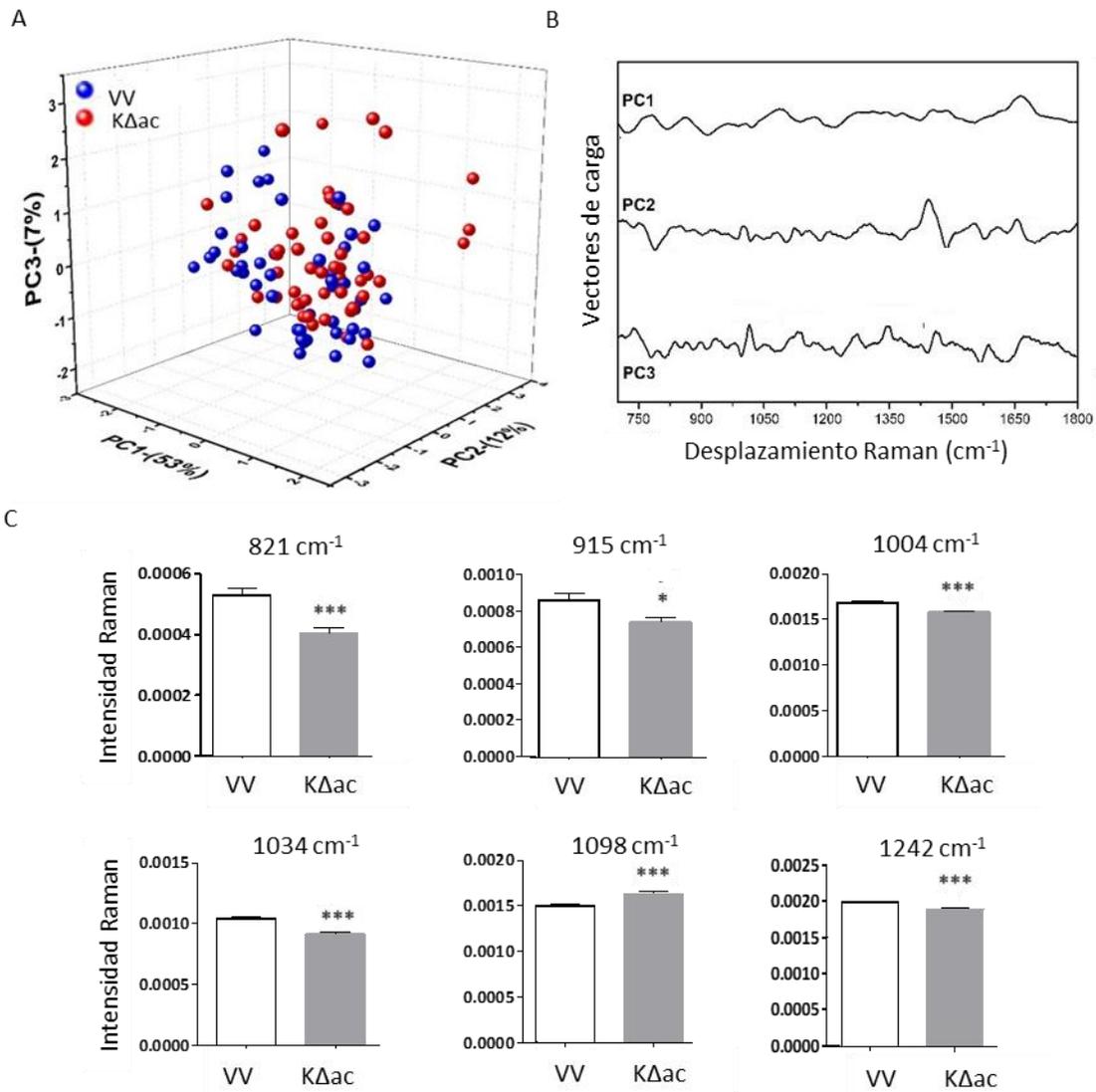
Los espectros Raman pueden entenderse como vectores de datos multidimensionales con estructuras de datos ocultos que son difíciles de evaluar mediante una simple inspección visual de los espectros. En este sentido, el análisis de datos multivariados es clave para comprender los cambios espectrales subyacentes y las diferencias en la espectroscopía Raman. Por ello, para obtener más información acerca de las características bioquímicas y moleculares de las células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac respecto a las células control, se realizó el análisis de componente principal (Principal Component Analysis, PCA). PCA es uno de los métodos más utilizados para el análisis, la reducción y el procesamiento de datos. Consiste en una reducción matemática de la dimensionalidad de la matriz de medición en menos variables (componentes principales, PC) que describen la varianza más significativa entre los datos (Notingher et al., 2004). Cada espectro Raman se expresa mediante un conjunto de vectores de carga multiplicado por puntuaciones de factores asociados. Los datos transformados están estructurados de tal manera que el primer PC representa la mayor varianza de datos; el segundo PC representa la segunda varianza de datos más alta, etc. Así, los datos multidimensionales se pueden reducir a un número de dimensiones mucho menor que los datos originales (Schie et al., 2016).

El análisis de PC fue realizado con los espectros individuales de células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y células HTR8-VV. El hecho de que en el gráfico estos dos tipos de células no se observen como dos poblaciones distintas indica que estos grupos comparten una gran cantidad de características bioquímicas (Fig. 35 A). Sin embargo, observando el gráfico de los picos que contribuyen al PC1, PC2 y PC3 se detectaron diferencias que se encuentran principalmente entre el PC1 y PC2, aportando a estas diferencias los picos entre 722-1250  $\text{cm}^{-1}$ , entre 1400-1500  $\text{cm}^{-1}$  y entre 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 35 B). En base a estos resultados se analizó la intensidad de los picos que estaban dentro de esas regiones (728, 821, 915, 1004, 1034, 1098, 1242, 1451 y 1662  $\text{cm}^{-1}$ ) y aquellos picos que presentaron una diferencia significativa en la intensidad entre ambos tipos celulares se muestran en la figura 35 C.

En conjunto estos datos permiten establecer que la expresión de la proteína de KLF6 deletada en su dominio activador genera importantes cambios en la región de frecuencias de vibraciones asociadas a la molécula de ARN (813-821  $\text{cm}^{-1}$  y 915  $\text{cm}^{-1}$ ), provoca una disminución en la intensidad de las frecuencias de vibración del anillo de fenilalanina (1004, 1034  $\text{cm}^{-1}$ ) y de amida III (1242  $\text{cm}^{-1}$ ), y produce un aumento en la de los grupos fosfatos de ácidos nucleicos (1098  $\text{cm}^{-1}$ ). Estos cambios son consistentes con las diferencias en la región de frecuencias de vibraciones de la molécula de ARN reportadas en la diferenciación de otros tipos celulares (Ghita et al., 2012; Notingher et al., 2004) y con la disminución en picos relacionados a vibraciones de proteínas observados en EMT en células cancerosas (Ng et al., 2012; Zhang and Min, 2017).

PÁGINA SIGUIENTE

**Figura 35. Análisis de diferencias entre espectros Raman de células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y control.** PCA de los espectros Raman obtenidos para cada tipo celular realizado utilizando los espectros individuales no promediados. **A-** Gráfico de las puntuaciones del PC1, PC2 y PC3. Cada punto muestra el valor medio de las puntuaciones de PC1, PC2 y PC3 para cada uno de los espectros individuales analizados en células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac (K $\Delta$ ac, rojo) y células HTR8-VV (azul). **B-** Gráfico de los vectores de carga calculados para PC1, PC2 y PC3 en la región entre 700-1800  $\text{cm}^{-1}$ . **C-** Cuantificación de la intensidad de los picos que aportan diferencias entre espectros según el análisis de PCA. Las barras indican la media  $\pm$  SEM de 60 espectros individuales para cada tipo celular. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ , Mann Whitney test.



Los hallazgos comprendidos en esta segunda sección de resultados demostraron mediante diferentes aproximaciones experimentales que la sobreexpresión de KLF6 o la expresión de la mutante carente de parte del dominio de unión al ADN no modifican la migración de células trofoblásticas extravelosas. Sin embargo, la disminución en los niveles de KLF6 o la expresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac carente del dominio transactivador incrementan la migración de dichas células e inducen cambios en la morfología y el citoesqueleto compatibles con una EMT. Además, el incremento observado en la migración polarizada de células silenciadas para KLF6 fue acompañado de un incremento en la actividad de MMP9, en la expresión de moléculas como  $\beta$ -catenina, Cx43, integrina  $\alpha$ 5, integrina  $\beta$ 1 y el factor BCL6, todos cambios implicados en una mayor migración polarizada.

En conjunto estos resultados permiten afirmar que KLF6 participa en la diferenciación trofoblástica extravellosa, particularmente en el proceso de migración celular. KLF6 actuaría como un factor que regula negativamente la migración de los CTBev a través de la modulación de la expresión de importantes moléculas involucradas en este proceso.



## **RESULTADOS III**

## **RESULTADOS: parte III**

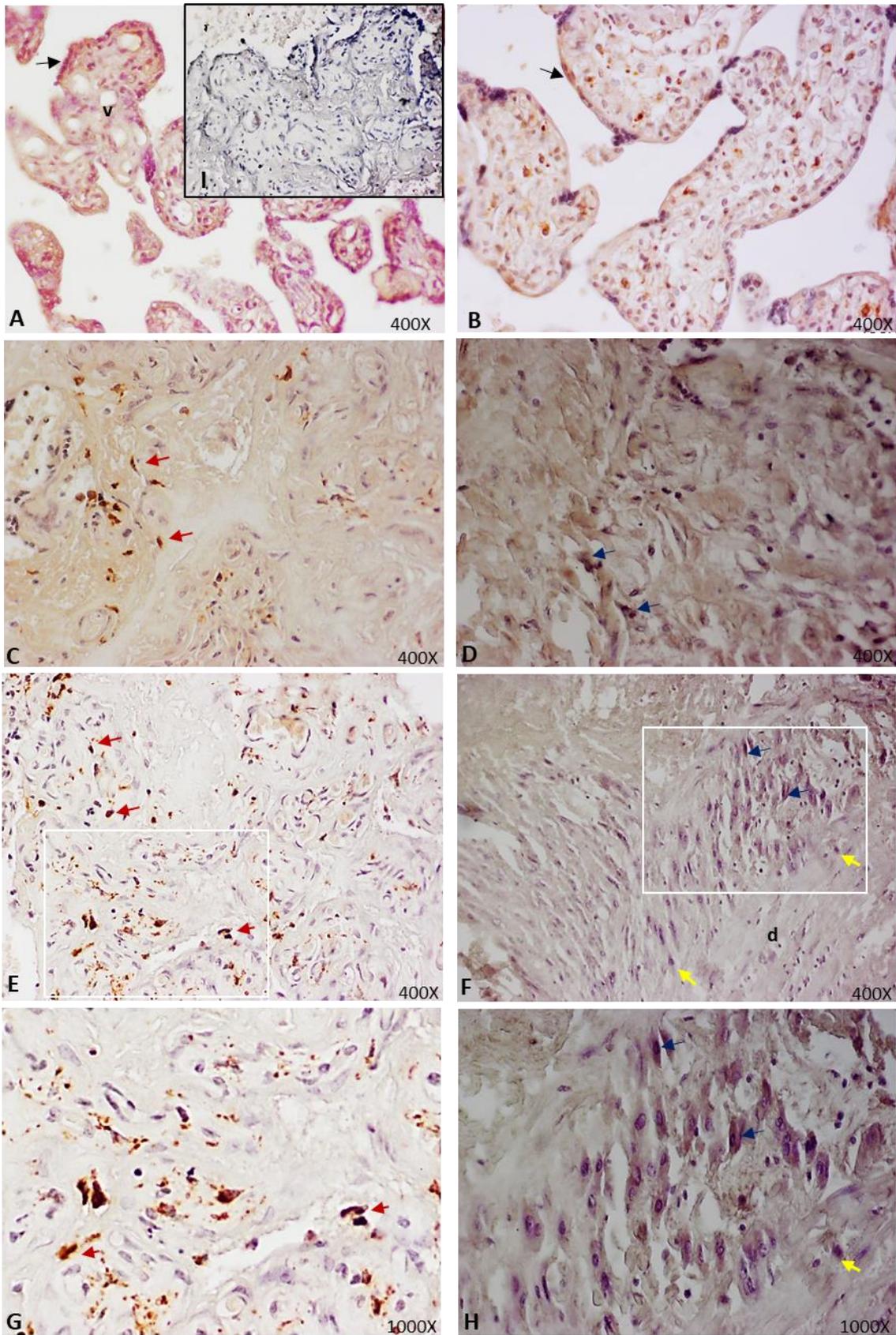
### **KLF6 EN PLACENTAS PATOLÓGICAS**

En el tercer objetivo de esta tesis se evaluaron posibles cambios en el patrón de expresión y localización de KLF6 en muestras de tejido proveniente de diferentes patologías asociadas al embarazo como GTD y placentas cretas. Para tal fin se inició una colaboración con el grupo del Dr. Alexandre Borbely de la Universidad Federal de Alagoas, Maceio, Brasil. Todas las muestras analizadas fueron obtenidas con la aprobación del correspondiente Comité de Ética y con el consentimiento de los pacientes.

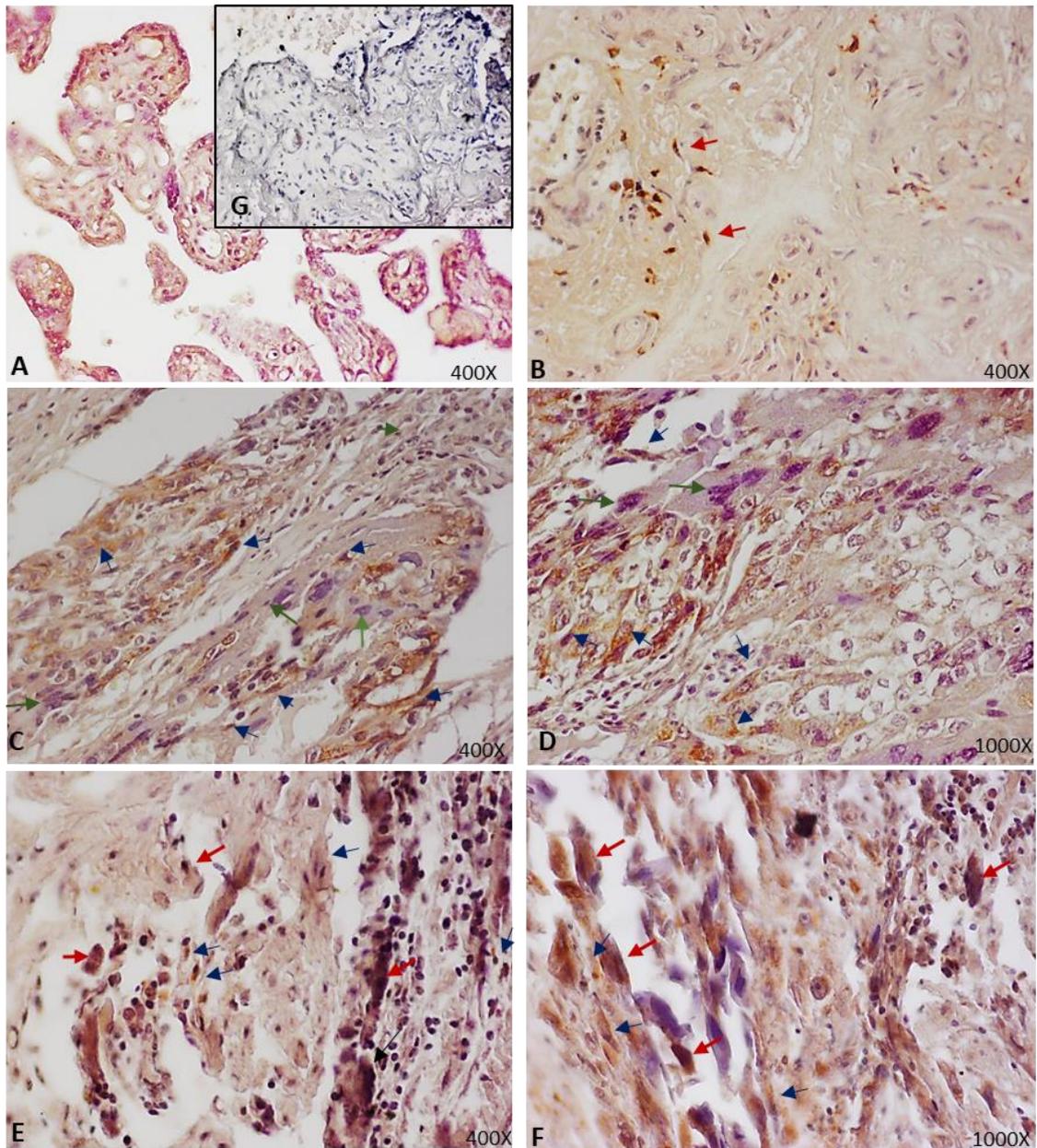
Por un lado, se evaluó la localización y expresión de KLF6 en cortes histológicos de placentas cretas, anormalmente invasivas, y se compararon con las normales. Se examinaron zonas de vellosidades libres, donde se encuentran los CTBv y el STB, así como decidua, la porción materna de la placenta donde se localizan los CTBev. En los estudios inmunohistoquímicos (IHQ) se observaron diferentes características invasivas en cada condición. En la placenta normal (Fig. 36 A, C, E y G) se detectó que los CTBev invaden la decidua y el STB rodea las vellosidades libres. El STB mostró una señal intensa para KLF6 (Fig. 36 A) y en la decidua se observó una señal positiva fuerte de KLF6 en núcleo y citoplasma (Fig. 36 C, E y G). En las placentas cretas (Fig. 36 B, D, F y H) se observó una señal más débil para KLF6 tanto en el STB (Fig. 36 B) como en las células de la decidua (Fig. 36 D, F y H), comparado con las placentas normales. En estas patologías los CTBev invadieron más allá de la decidua como puede verse en la figura 36 F y H indicado con flechas amarillas.

También se evaluó la localización y expresión de KLF6 en tejido trofoblástico de neoplasias trofoblásticas gestacionales: coriocarcinoma y molas invasivas. En coriocarcinoma las células tumorales en proliferación están organizados en patrones de crecimiento bifásicos a trifásicos: láminas o cordones de células tumorales mononucleares (trofoblastos con abundante citoplasma y / o citotrofoblastos más pequeños) rodeados por capas de células sincitiotrofoblásticas multinucleares (Hui, 2019). En las imágenes C y D de la figura 37, correspondientes a tejido de coriocarcinoma gestacional, se observó un patrón celular similar al descrito por Hui, donde en general la mayoría de las células muestran una señal positiva para KLF6 en el citoplasma. En las molas invasivas se detectó una señal fuerte positiva para KLF6 en el núcleo y citoplasma de células de mayor tamaño con una morfología más redondeada y mayor citoplasma, en comparación con las células de morfología alargada y menor

tamaño en las que se observa una señal más débil de KLF6 localizada en el citoplasma (Fig. 37 E y F).

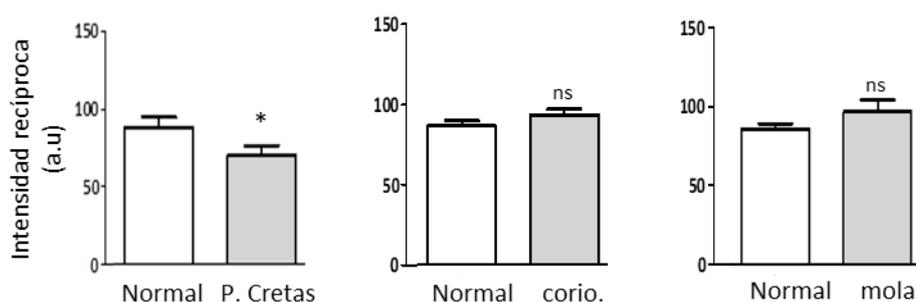


**Figura 36. Inmunodetección de KLF6 en cortes histológicos de tejido trofoblástico normal y anormalmente invasivo. A, C, E, G e I- Normal. B, D, F y H- Placentas cretas. I- Control negativo.** La señal positiva para KLF6 se observa en marrón, los núcleos en violeta. Las flechas indican señal positiva para KLF6 en el STB (negra), señal citoplasmática positiva para KLF6 (azul), señal nuclear y citoplasmática para KLF6 (roja), CTBev excesivamente invasivo (amarillo), v: tejido veloso; d: decidua. Las imágenes G y H corresponden a una ampliación de la zona delimitada por el recuadro blanco de E y F respectivamente.



**Figura 37. Inmunodetección de KLF6 en cortes histológicos de tejido trofoblástico normal y tumoral. A, B y G- Normal. C y D- coriocarcinoma. E y F- mola invasiva. G- Control negativo.** La señal positiva para KLF6 se observa en marrón, los núcleos en violeta. Las flechas indican señal positiva en el citoplasma (azul), señal nuclear y citoplasmática (roja), células multinucleadas (verde).

Además, se realizó un análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de KLF6 en placentas cretas, coriocarcinomas y molas invasivas respecto a placentas normales. En las placentas anormalmente invasivas la comparación se realizó midiendo la inmunoreactividad de KLF6 en la zona de la decidua donde se encuentran los CTBev respecto a las células de la misma zona de placentas normales. En cambio, en coriocarcinoma y mola invasiva se realizó un análisis general dada la dificultad de identificar las diferentes estructuras y tipos de células, y se comparó con la expresión de KLF6 en zona de vellosidades y decidua de placentas normales. La inmunoreactividad de KLF6 fue menor en la zona de la decidua de placentas cretas respecto a placentas normales. Mientras que no se observaron diferencias significativas en tejido de coriocarcinoma y mola invasiva respecto a tejido normal (Fig. 38).



**Figura 38. Inmunoreactividad de KLF6 en placentas cretas y neoplasias trofoblásticas gestacionales.** Se analizaron cinco placentas normales a término, cinco placentas cretas, cuatro coriocarcinomas y tres molas invasivas. El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM de la inmunoreactividad de KLF6 medida mediante el método de intensidad recíproca (ver materiales y métodos). \* $p < 0,05$ , t-test.

En este tercer capítulo, se demostró que KLF6 presenta una expresión diferencial en placentas cretas en comparación con las placentas normales. El estudio de la expresión de KLF6 en cortes histológicos de placentas cretas reveló que, en las células de la decidua, donde se encuentran los CTBev, la expresión de KLF6 se encuentra disminuida en comparación con la expresión de KLF6 en esa misma zona de placentas normales. Este hallazgo, junto con el reportado previamente en el laboratorio (Racca et al., 2016), donde se demostró que KLF6 presenta mayor nivel de expresión en lecho placentario de placentas preeclámpicas, suma importante evidencia al supuesto de que KLF6 está implicado en patologías del embarazo asociadas a una diferenciación del trofoblasto extraveloso desregulada. Además, este resultado en conjunto con los de la segunda sección de resultados, permite afirmar que la funcionalidad de KLF6 es clave durante la diferenciación trofoblástica extravelosa, particularmente en el proceso de migración celular.



## *DISCUSIÓN*

## DISCUSIÓN

Durante la gestación, las patologías con un origen principal en la placenta tales como la preeclampsia, la diabetes gestacional, el nacimiento prematuro y las placentas cretas suponen un desafío para el sistema de atención de la salud materno-fetal. Sin lugar a duda el fortalecimiento de los sistemas de salud que permitan el acceso de toda la población a la educación, prevención y detección temprana de patologías del embarazo es uno de los aspectos fundamentales en la mejora de la calidad de vida de la población. Los avances en prevención, diagnóstico y tratamiento requieren de la concurrencia de diferentes abordajes que contribuyan a comprender los procesos involucrados en la diferenciación del trofoblasto y las complicaciones asociadas al embarazo. Tanto la fusión celular y diferenciación bioquímica que permite la formación y mantenimiento del STB, como la migración celular que acompaña la diferenciación de los CTBev resultan esenciales para el desarrollo de la placenta.

En esta tesis se analizaron aspectos básicos de la biología del trofoblasto humano, profundizando en el estudio del rol de KLF6 en la proliferación, fusión, diferenciación bioquímica y migración de células trofoblásticas.

### **KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TROFOBLASTO VELLOSO**

La primera parte de esta tesis se centró en el estudio de la participación de KLF6 en la diferenciación vellosa de los CTB. Por primera vez se reportó que el aumento en la expresión de KLF6 desencadena *per se*, es decir en ausencia de otro inductor, el proceso de diferenciación de células BeWo e incrementa la fusión de CTBv placentales *in vitro*. Se observó tanto un aumento en la formación de estructuras tipo sinciciales, así como, un incremento en la expresión de Syn-1,  $\beta$ -hCG, la chaperona GRP78, Cx43, ABCG2 y Gal-1, todas moléculas involucradas en la diferenciación del trofoblasto vellosa. Estos resultados se correlacionan con el incremento observado en los niveles de transcritos de Cx43, Syn-1, Syn-2 y ZO-1 al sobreexpresar KLF6 en células JEG-3 (también de coriocarcinoma) (Racca et al., 2015). Por lo que, en dos modelos diferentes, que no diferencian espontáneamente, el incremento en la expresión de KLF6 induce la expresión de genes cuyas proteínas participan en diferentes etapas del proceso de diferenciación bioquímica o morfológica. Como se señaló, durante la diferenciación espontánea *in vitro* de CTBv aislados de placentas a término ocurre un aumento en la expresión de KLF6 a tiempos cortos, aproximadamente a las 3 horas posteriores al inicio del cultivo, el cual precede a la formación de sincicios y a la expresión de  $\beta$ -hCG; además, en este modelo la expresión exógena de KLF6 aumenta aún más los niveles

de Cx43 y Syn-2 (Racca et al., 2015). Así mismo, en células BeWo inducidas a diferenciar con FSK, el cual induce la diferenciación aumentando el AMPc intracelular por activación de la adenilato ciclasa (Orendi et al., 2010), se observa un máximo de expresión de KLF6 a las dos horas de tratamiento y luego sus niveles disminuyen (Racca et al., 2015). De manera similar, se ha descrito un aumento temprano en la expresión de KLF6 durante la diferenciación de otros tipos celulares como la de preadipocitos hacia adipocitos (Li et al., 2005b) y durante la denudación endotelial (Gallardo-Vara et al., 2016). Este incremento temprano en los niveles de KLF6 sería el responsable de desencadenar la transcripción de genes necesarios para la sincicialización como por ejemplo, Cx-43, Syn-1 y el del factor GCM1, el cual se demostró que sus niveles de transcripto se incrementan en células JEG-3 que sobreexpresan KLF6 (Racca et al., 2011). En línea con estos antecedentes, los resultados de esta tesis indican que KLF6 es necesario y suficiente para inducir la fusión y sugieren que se requiere de la activación de otra vía o factor para lograr una diferenciación completa, dado que la formación de sincicios inducido por KLF6 no incrementó con el tiempo de cultivo y el índice de fusión fue menor que el obtenido por tratamiento con FSK.

Por otro parte, en esta tesis se demostró que la sobreexpresión de KLF6 en células BeWo conduce a una disminución del crecimiento celular, acompañado de un incremento en la expresión de p21. Es sabido que las células trofoblásticas poseen inicialmente una alta capacidad proliferativa, la cual disminuye durante la diferenciación, al igual que sucede en otros tipos celulares. Los resultados obtenidos están de acuerdo con reportes anteriores que muestran aumento en el porcentaje de CTB p21 positivos durante la gestación (Genbacev et al., 2000; Korgun et al., 2006) y un incremento en la expresión de p21 en células BeWo inducidas a diferenciarse por el gene *env* del ERV-3 (human endogenous retrovirus-3) y por  $TGF\beta 1$  (Lin et al., 2000; Rama et al., 2003). En este sentido, el gen  $TGF\beta 1$  y los de sus receptores de tipo I y II, así como el gen *CDKN1A* que codifica a p21, son reconocidas dianas de KLF6 (Botella et al., 2002; Li et al., 2005a). Más aún, la activación de  $TGF\beta 1$  y *CDKN1A* es uno de los mecanismos descritos por los cuales KLF6 inhibe el crecimiento celular en varios contextos (Syafruddin et al., 2020; Slavin et al., 2004; McConnell and Yang, 2010).

Múltiples evidencias dan cuenta del rol de p21 como un activador o represor de la diferenciación celular, tanto en células normales como tumorales, dependiendo de varios factores que incluyen su nivel de expresión, modificaciones post-traduccionales, tipo celular, etapa del proceso de diferenciación y microambiente celular (Kreis et al., 2019). Por ejemplo, en oligodendrocitos se requiere un aumento de p21 para iniciar el proceso de diferenciación, sus niveles aumentan en la etapa temprana de diferenciación

de los condrocitos, promueve la diferenciación de progenitores eritroides, de monocitos de sangre periférica, de células de músculo esquelético y la diferenciación terminal de otras células en tejidos adultos, en algunos casos de manera independiente de p53. En cambio, muestra efectos contradictorios en la diferenciación de adipocitos actuando tanto como un factor proadipogénico o anti-adipogénico. Sin embargo, otros procesos de diferenciación como el de granulocitos, osteoblastos y la etapa final de la diferenciación de queratinocitos se asocian a una marcada disminución en la expresión de p21 (Kreis et al., 2019). En la placenta, la sincicialización del trofoblasto requiere del arresto del ciclo celular y se ha reportado que dicho arresto depende, al menos en parte, de la expresión de p21 la cual interactúa con GCM1 activando la expresión de la proteína fusogénica Syn2 (Lu et al., 2017). En el mismo sentido, trabajos previos del laboratorio habían demostrado que la expresión de p21 aumenta durante la sincicialización espontánea de CTBv, así como durante la fusión de células BeWo inducida por FSK, y que el silenciamiento de KLF6 conduce a una fusión célula-célula disminuida y una reducción en la expresión de p21 (Racca et al., 2015). En esta tesis se demostró que el silenciamiento de p21 en el contexto de células BeWo que sobreexpresan KLF6 provoca una reducción significativa en la fusión célula-célula inducida por KLF6. Por lo tanto, los datos publicados y los hallazgos descritos son consistentes con la participación de KLF6 como un inductor de la fusión del trofoblasto vellosos, al menos en parte, mediante el aumento en la expresión de p21.

GRP78 es la chaperona residente del retículo endoplásmico más abundante y que controla el inicio de la UPR. En esta tesis se observó un incremento en la expresión de GRP78 en células BeWo con altos niveles de KLF6 y mayor capacidad fusogénica. Este resultado concuerda con diferentes estudios donde se ha reportado un aumento en los niveles de esta chaperona durante la diferenciación tanto de células BeWo como de CTBv primarios, demostrando que sus niveles modulan este proceso (Bastida-Ruiz et al., 2019, 2020; Fradet et al., 2012). Recientemente se ha demostrado que la UPR y la autofagia están directamente implicados en la fusión celular y diferenciación de los trofoblastos vellosos y que UPR no solo se activa, sino que también sería un disparador de la sincicialización de las células BeWo (Bastida-Ruiz et al., 2019). Por lo tanto, KLF6 podría estar induciendo la diferenciación de las células BeWo mediante la activación de la UPR a través de la chaperona GRP78.

La fusión celular no se lleva a cabo solo durante la diferenciación de células trofoblásticas. Mioblastos, osteoclastos y células cancerosas son otros tipos de células que también fusionan (Bastida-Ruiz et al., 2016), y comparten entre ellas algunas características. Por ejemplo, se demostró que la autofagia se activa durante la formación del STB, pero también se estableció que aumenta y es necesaria durante la miogénesis

(McMillan and Quadrilatero, 2014). Además, se ha reportado que KLF6 está involucrado en la proliferación y diferenciación de mioblastos, pero, a diferencia de lo que ocurre en el trofoblasto veloso, la eliminación de KLF6 promueve la diferenciación e inhibe la proliferación de estas células (Kang et al., 2020).

Resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la expresión de KLF6 carente del dominio ácido transactivador (KLF6 $\Delta$ ac) provoca una reducción en el índice de fusión de CTBv aislados de placenta a término y de células BeWo, una disminución en la expresión Syn-1 y  $\beta$ -hCG, así como una disminución en la capacidad fusogénica de células BeWo que sobreexpresan la proteína KLF6 completa. Estos hallazgos indican que KLF6 requiere de su dominio de regulación transcripcional para llevar a cabo su función en la diferenciación del trofoblasto veloso. Además, muestran que la mutante KLF6 $\Delta$ ac funciona como una dominante negativa que bloquea los sitios de reconocimiento de KLF6 endógeno en genes diana que desencadenan y/o participan en el proceso de diferenciación, impidiendo la regulación de los mismos. En conjunto, los resultados obtenidos permiten concluir que KLF6 participa en la diferenciación bioquímica y morfológica del trofoblasto veloso, mediante su clásica función como factor de transcripción, aunque no necesariamente de forma directa sobre los genes estudiados.

Sin embargo, posiblemente esta no sea la única función que KLF6 lleve a cabo en este contexto, ya que KLF6 se localiza tanto en núcleo como citoplasma a lo largo de todo el proceso de sincicialización *in vitro*. En este sentido, se ha reportado que la proteína KLF6 frecuentemente se detecta en el citoplasma en varios tejidos y tipos celulares (Gehrau et al., 2010), y trasloca al núcleo en respuesta a determinados estímulos. Por ejemplo, se ha reportado que KLF6 se localiza en el citoplasma de las células endoteliales de vena umbilical humana y es traslocado al núcleo frente el daño vascular (Botella et al., 2002). A su vez, en células JEG-3 el tratamiento con tricostatina A, un inhibidor de deacetilasas de histonas, induce enriquecimiento nuclear de KLF6 (Camolotto et al., 2013), y de igual manera ocurre en células COS7 cuando estas son tratadas con el éster de forbol/ionomicina (Slavin et al., 2004). La presencia de KLF6 en el núcleo de las células trofoblásticas indica que puede cumplir allí su función clásica como factor de transcripción (Racca, 2013), pero su constante expresión citoplasmática supone que KLF6 puede, además, participar o regular algún mecanismo novedoso relacionado con esta localización. De hecho, en un modelo de cáncer de mama se ha demostrado que KLF6 citoplasmático interactúa con la proteína c-Src y de ese modo interfiere con el crecimiento celular mediado por el receptor de estrógenos alfa (Liu et al., 2010). Otros factores de transcripción como c-Fos, Fra-1, p53 y STAT3 han demostrado tener funciones citoplasmáticas, más allá de su participación como

reguladores de la transcripción (Caputto et al., 2014; Motrich et al., 2013; Green and Kroemer, 2009; Germain and Frank, 2007), lo cual sugiere que KLF6 podría actuar de manera similar.

Los resultados reportados en esta tesis permitieron profundizar en el estudio del mecanismo molecular mediante el cual KLF6 está involucrado en la diferenciación del trofoblasto veloso y permiten postular a KLF6 como un factor de transcripción clave para este proceso.

## **KLF6 Y SU ROL EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TROFOBLASTO EXTRAVELLOSO**

La segunda parte de esta tesis se centró en el estudio de la posible participación de KLF6 en el proceso de migración celular y la EMT durante la diferenciación de los CTBev.

En contextos tumorales, se ha demostrado que KLF6 actúa como un gen supresor de tumores, por lo que bajos niveles de expresión o la pérdida de su funcionalidad se asocian a mayor tumorigenicidad y metástasis. En esta tesis se demostró que KLF6 participa en el proceso de migración de células trofoblásticas extravelosas. En estas células, el silenciamiento de KLF6 y la sobreexpresión de la mutante de KLF6 carente del dominio de activación (KLF6 $\Delta$ ac) generaron un incremento en la migración celular polarizada. Mientras que, la sobreexpresión de KLF6 y de la mutante de KLF6 carente de un dedo de zinc, pero que mantiene la señal de localización nuclear (Kzf2), no mostraron diferencias significativas respecto a las células nativas en los tiempos evaluados. Si bien, no se comprobó en este trabajo de tesis, estudios previos han demostrado que la pérdida de parte del dominio C-terminal lleva a una pérdida en la capacidad de KLF6 de interactuar con su secuencia de ADN consenso (Slavin, 2002). Por lo tanto, el hecho de no observar diferencias en la migración en presencia de la mutante de KLF6 que carece de su capacidad de unión al ADN, sugiere que KLF6 actúa como un factor de transcripción que frena la migración celular a través de la represión o activación de genes que favorecen o impiden respectivamente la misma. Además, tampoco se observó una disminución en la migración cuando se sobreexpresó KLF6. Si bien este resultado parece contradictorio, hay que tener en cuenta que en las células HTR8/SVneo el gen *CDH1*, que codifica a E-cadherina, uno de los principales inhibidores de la migración e invasión, se encuentra epigenéticamente silenciado por hipermetilación de su promotor (Chen et al., 2013). Por lo tanto, si bien KLF6 activa la transcripción de *CDH1* en células epiteliales normales y en diferentes tipos de células tumorales (DiFeo et al., 2006), no podría activarlo en el contexto de las células HTR8/SVneo ni reducir la capacidad migratoria de las mismas.

El silenciamiento de KLF6 condujo a un incremento de la migración acompañado de un aumento en la expresión de moléculas implicadas en este proceso como integrina  $\alpha 5$  y  $\beta 1$ ,  $\beta$ -catenina, Cx43 y la actividad de MMP9. En concordancia, trabajos anteriores demostraron que KLF6 regula la migración celular a través de la expresión de marcadores de la EMT y la expresión de MMP9 en diferentes contextos tumorales y no tumorales (Jianwei et al., 2013; Hsu et al., 2017; Das et al., 2006). Además, se ha reportado que las integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  están asociadas a EMT en células de cáncer cervical (Lee et al., 2008) y en células epiteliales (White et al., 2007). El incremento observado en Cx43, también se correlaciona con su rol en el proceso de migración en contextos tumorales (Jin et al., 2017; Behrens et al., 2010; Qiu et al., 2015).

El aumento en los niveles de expresión de  $\beta$ -catenina y su mayor localización nuclear en células silenciadas para KLF6 sugiere que KLF6 podría modular la migración a través de  $\beta$ -catenina. Otros autores, han demostrado que la acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina favorece la diferenciación de los CTBev en la placenta humana y promueve la invasión de las células HTR8/SVneo (Pollheimer et al., 2006) mientras que, los niveles de  $\beta$ -catenina se encuentran significativamente disminuidos en los tejidos placentarios preeclámpticos en comparación con los normales (Zhang et al., 2013; Zhuang et al., 2015). Tal como ocurre en diferentes contextos tumorales, la GTPasa RAC1 activa a  $\beta$ -catenina la cual trasloca al núcleo y activa la expresión de MMP9 y SNAI1 promoviendo así la migración e invasión de las células trofoblásticas (Fan et al., 2016). Por otro lado, es sabido que RAC1 es activado por el factor de intercambio de guanidina VAV3, cuya amplificación genética y/o sobreexpresión proteica se correlaciona con la invasión tumoral y la metástasis (Boesch et al., 2018; Uen et al., 2015; Lin et al., 2012). Interesantemente, se ha demostrado que KLF6 es un represor transcripcional de VAV3 en células de cáncer de hígado y que la actividad de RAC1 y la migración celular aumenta en células de hepatocarcinoma con bajos niveles de KLF6 de una manera dependiente de VAV3 (Ahronian et al., 2017).

En base a estos antecedentes, y a los resultados obtenidos, se puede postular a la vía de VAV3 /RAC1 / $\beta$ -catenina como un posible mecanismo mediante el cual KLF6 modula la migración celular en el trofoblasto extraveloso. En este sentido, KLF6 actuaría como un modulador negativo de la migración reprimiendo la expresión de VAV3. Una disminución en la expresión o en la funcionalidad de KLF6 conduciría al aumento de VAV3, que activa la expresión de RAC1 con la consecuente activación y traslocación nuclear de  $\beta$ -catenina y el incremento en la actividad de MMP9, contribuyendo de esta manera a la migración celular.

El factor de transcripción BCL6 es otra de las moléculas cuya expresión, a nivel de transcrito y proteína, aumenta en las células trofoblásticas extravelosas al disminuir

la expresión de KLF6. Este resultado coincide con lo observado en diferentes contextos tumorales donde BCL6 favorece el fenotipo migratorio / invasivo. Por ejemplo, en adenocarcinoma de pulmón la expresión de BCL6 se encuentra incrementada y favorece la invasión y migración celular (Li et al., 2018), mientras que, en células de glioma la reducción de sus niveles disminuye el fenotipo maligno inhibiendo la expresión de la MMP2 y MMP9 vía AKT (Song et al., 2018). BCL6 también modula la supervivencia de células de cáncer de mama y promueve la EMT a través de la represión transcripcional de E-cadherina mediada por ZEB1 (Yu et al., 2015; Walker et al., 2015). Además en este tipo de cáncer su rol promotor hacia un fenotipo maligno se asocia con el aumento en la expresión del factor HIF-1 $\alpha$  (Bos et al., 2003). KLF6 es capaz de reprimir la expresión de BCL6 en macrófagos ya que activa transcripcionalmente a BLIM1/PRDM1 quien regula negativamente al promotor de BCL6; mientras que en células de cáncer mamario, BCL6 reprime la expresión de KLF6 (Walker et al., 2015; Kim et al., 2016). Sería interesante evaluar si, en el contexto de la placenta, una regulación negativa entre estos dos factores contribuye al proceso de migración finamente controlado durante la diferenciación del trofoblasto extraveloso.

La disminución en los niveles de expresión de KLF6 también provocó cambios morfológicos hacia un fenotipo mesenquimal y una mayor cantidad de células con el MTOC orientado hacia el frente de migración. Los cambios en el citoesqueleto de actina y en la orientación del MTOC son propios de células que migran de manera polarizada. Así mismo, la morfología más alargada similar a la de células fibroblásticas se asocia con la EMT. Los cambios morfológicos observados se correlacionan con el incremento en la expresión de Cx43 y son coincidentes con lo reportado en otros tipos celulares donde Cx43 genera aumento en la migración y cambios en el citoesqueleto de actina asociados a la generación de filopodios (Kameritsch et al., 2015).

Las células que sobreexpresan la mutante KLF6 $\Delta$ ac, y muestran mayor capacidad migratoria, también mostraron cambios morfológicos similares al de las células silenciadas para KLF6. Mediante el análisis de actina y vimentina se observó que las células que expresan la mutante carente del dominio activador de KLF6 tienen una morfología alargada adquiriendo una apariencia similar a la de los fibroblastos con largas extensiones que parecen conectar las células entre sí. A través de estudios de microscopía de fuerza atómica se confirmó este cambio morfológico. Las células que expresan la proteína KLF6 $\Delta$ ac tienen una mayor longitud, son más anchas y de menor altura que las células control, características que se asocian con un fenotipo más mesenquimal.

Por otro lado, numerosas evidencias involucran a KLF6 con la proliferación celular. En esta tesis se reportó una disminución en la proliferación celular en células

HTR8/SVneo que expresan la mutante carente del dominio ácido (KLF6 $\Delta$ ac) de KLF6, indicando que KLF6 es necesario para controlar la proliferación en células extravelosas. Coincidentemente, en el laboratorio, también se observó que células trofoblásticas extravelosas con niveles reducidos de KLF6 muestran una disminución en la proliferación celular e incremento de p21 (Kourdova et al, 2021, bajo revisión). Estos resultados son inesperados, ya que se ha documentado una asociación positiva entre KLF6, regulación positiva de p21 y proliferación celular reducida en varios contextos celulares que comprenden carcinoma hepatocelular, fibroblastos NIH3T3 de tipo salvaje y transformados con H-Ras y en la línea celular A375 de melanoma maligno cutáneo (Andreoli et al., 2010; Narla et al., 2007; Trucco et al., 2014; Zhang et al., 2016). Sin embargo, se reportó una reducción en la progresión del ciclo celular en las líneas celulares de hepatocarcinoma donde KLF6 está silenciado (D'Astolfo et al., 2008), así como en embriones de ratón  $Klf6^{-/-}$  y en la diferenciación de células madres embrionarias  $Klf6^{-/-}$ , donde la expresión de p21 no se modifica (Matsumoto et al., 2006). Esto evidencia que KLF6 puede desempeñar funciones antagónicas dependiendo del contexto o las condiciones del medioambiente celular (Andreoli et al., 2010).

La espectroscopía Raman permitió un estudio más profundo de los cambios a nivel bioquímico y molecular que genera la delección del dominio ácido de KLF6. Mediante el análisis de componentes principales y de la intensidad de picos se encontró que la delección del dominio activador de KLF6 en células HTR8/SVneo genera disminución en la intensidad de las vibraciones correspondientes a la molécula de ARN ( $813\text{ cm}^{-1}$  y  $915\text{ cm}^{-1}$ ), al anillo de fenilalanina ( $1004$  y  $1034\text{ cm}^{-1}$ ) y a la estructura de la amida III ( $1242\text{ cm}^{-1}$ ) la cual se asocia con la estructura secundaria de las proteínas. Además, se detectó un aumento en las vibraciones de los grupos fosfatos de ácidos nucleicos ( $1098\text{ cm}^{-1}$ ), el incremento de solo este pico asociado a ácidos nucleicos no se puede correlacionar directamente con un fenómeno biológico, por lo cual son necesarios más estudios para explicar las causas que generan una mayor vibración en los grupos fosfatos de estas moléculas.

Una disminución en picos asociados a la vibración del ARN junto con un aumento del tamaño celular y disminución de la actividad proliferativa o disminución del contenido de ARN nuclear durante la diferenciación fue reportado en células madre embrionarias murinas (Notingher et al., 2004; Brauchle and Schenke-Layland, 2013; Ghita et al., 2012). Ghita y col sugieren que al haber un cambio morfológico con un citoplasma más ancho, hay un aumento en el tamaño de las células que conduce a la dilución del ARN citoplasmático y, por lo tanto, a una disminución de las señales Raman específicas de ARN (Ghita et al., 2012). Por otro lado, un elevado contenido de proteínas en células diferenciadas en comparación con indiferenciadas ha sido reportado en diferentes

contextos celulares (Notingher et al., 2004; Pijanka et al., 2010; El-hagrasy et al., 2012). A diferencia de lo reportado, en este trabajo se observaron intensidades de vibración menores para picos asociados a proteínas. Sin embargo, este resultado está de acuerdo con lo reportado por Zhang and Min donde demuestran que durante la EMT hay una reducción en la síntesis de proteínas debido a la necesidad de las células que transitan hacia un fenotipo mesenquimal de restringir la biosíntesis de proteínas y lípidos (que consume energía) y de conservar la energía para su migración e invasión (Zhang and Min, 2017). Además, este resultado se correlaciona con lo reportado en placentas preeclámpticas respecto a placentas normales. En esta patología, caracterizada por una invasión deficiente y una EMT anormal de las células trofoblásticas extravelosas, se observa un incremento en picos asignados a vibraciones moleculares de proteínas y diferencias espectrales asociadas a la estructura secundaria que reflejan un desorden de la estructura proteica (Chen et al., 2014). Por lo que estos resultados refuerzan la idea de la importancia de KLF6 durante la placentación y su posible implicancia en patologías asociadas al embarazo.

Teniendo en cuenta los diferentes mecanismos que modulan la migración en distintos contextos celulares y los genes blancos conocidos de KLF6, es posible postular otras vías por las cuales KLF6 podría participar en la migración del trofoblasto extraveloso y que no han sido analizadas en este trabajo de tesis. Entre ellas, se ha descrito que un incremento en los niveles de ROS se asocian al proceso de EMT (Lu et al., 2019; Dong et al., 2019) y que la generación local de ROS por las NADPH-oxidasas (NOX) puede modular la migración celular debido a cambios en la dinámica de adhesión y señalización (Hurd et al., 2012; Tamborindéguy et al., 2018). Recientemente en el laboratorio se ha demostrado que el silenciamiento de KLF6 incrementa los niveles de ROS en células HTR8/SVneo (Kourdova et al, 2021 bajo revisión), aparentemente a través de la activación de la NOX4, lo cual representa una evidencia a favor de la acción de KLF6 por esta vía.

Otra vía posible sería la regulación de endoglina. Esta proteína es regulada positivamente por KLF6 ante injuria vascular (Botella et al., 2002) y se ha descrito que disminuye la migración e invasión en células HTR8/SVneo a través de la vía de TGF $\beta$  (Wu et al., 2019), el cual también es un blanco transcripcional de KLF6. Interesantemente, la versión soluble de endoglina ha sido postulada como un marcador de preeclampsia (Leaños-Miranda et al., 2019) y KLF6 podría estar cooperando en la liberación de endoglina soluble a través de la regulación de MMP14 como se describió en células endoteliales (Gallardo-Vara et al., 2016).

Por otro lado, se conoce que en células placentales extravelosas los niveles de KLF6 se incrementan temprana y transientemente en hipoxia, y este incremento es

dependiente de HIF-1 $\alpha$  (Racca et al., 2016). Se ha reportado que este factor inhibe la invasión del trofoblasto a través de la inducción de TGF $\beta$ 3 (Ji et al., 2013). En este sentido, es posible hipotetizar una regulación entre KLF6 y HIF-1 $\alpha$  que consecuentemente module la migración celular en condiciones de bajos niveles de oxígeno, e impacte en patologías como la PE.

Además, KLF6 podría modular la diferenciación de las células trofoblásticas extravelosas siendo blanco de regulación por miR. Actualmente se han identificado una gran variedad de miR involucrados en el desarrollo de la placenta, entre ellos los miR-210 y miR-1301 (Hayder et al., 2018; Weedon-Fekjær et al., 2014). Interesantemente, ambos miR inhiben la síntesis de KLF6 e incrementan la capacidad migratoria y angiogénica de células tumorales hepáticas (Liang et al., 2014), y su expresión se encuentra alterada en placentas preeclámpicas (Weedon-Fekjær et al., 2014; Luo et al., 2014). Por lo tanto, sería de interés evaluar la cooperación entre KLF6, miR210 y miR1310 en el control de la invasión del trofoblasto.

Numerosos trabajos reportan que el cambio hacia un perfil migratorio e invasivo va acompañado de la liberación de diferentes citoquinas que regulan esta respuesta. Por ejemplo, gastroquina 1 regula la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, activando su inhibidor y modulando la expresión de diferentes citoquinas inflamatorias en cánceres gástricos (Yoon et al., 2013). Pero, además se comporta y regula procesos similares a KLF6. Funciona como supresor de tumores mediante la inhibición de la EMT y la migración / invasión en los cánceres gástricos inactivando la vía de NF- $\kappa$ B y desregulando la GTPasa RhoA. También protege a estas células atenuando los niveles de ROS (Yoon et al., 2011; Xing et al., 2015; Yoon et al., 2017), induce senescencia y regula positivamente a p21 (Yoon et al., 2014). Además, es curioso porque KLF6 funciona como un supresor tumoral en células tumorales gástricas (Zhang et al., 2010), y gastroquina 1 se expresa en la placenta y contribuye a la regulación de la migración del trofoblasto humano (Fahlbusch et al., 2013). Por lo tanto, teniendo en cuenta la similitud, es interesante pensar en una relación entre ambos factores, y que KLF6 también module la respuesta inflamatoria y migración trofoblástica activando la vía de NF- $\kappa$ B. De hecho, en glioblastoma se reportó que KLF6 induce la expresión de I $\kappa$ B- $\alpha$ , inhibidor de NF- $\kappa$ B, bloqueando así esta vía de señalización (Masilamani et al., 2017).

Por lo tanto, los resultados de esta parte del trabajo de tesis plantean interesantes perspectivas y abre caminos a nuevos estudios en relación a los mecanismos mediante los cuales KLF6 participa en el proceso de diferenciación del trofoblasto extraveloso humano.

## **KLF6 Y SU RELACIÓN CON PATOLOGÍAS PLACENTALES Y TUMORALES ASOCIADAS AL EMBARAZO**

En colaboración con el grupo del Dr. Alexandre Borbely de la Universidad Federal de Alagoas, Maceio, Brasil, se inició un estudio para evaluar si existen cambios en la expresión de KLF6 en placentas anormalmente invasivas y en tejido trofoblástico de neoplasias trofoblásticas gestacionales como coriocarcinoma y la mola invasiva. En cortes histológicos de placentas cretas se observó un menor nivel de expresión de KLF6 en la zona de la decidua donde se localizan los CTBev respecto a placentas normales, con un patrón de expresión de KLF6 principalmente citoplasmático, en comparación con la marca nuclear y citoplasmática observada en las células de la decidua de las placentas normales. Estos resultados están de acuerdo con el incremento observado en la migración de células trofoblásticas extravelosas cuando se silencia KLF6. Por el contrario, en estudios previos se demostró una mayor inmunoreactividad de KLF6 en el lecho placentario de placentas provenientes de mujeres que cursaron con preeclampsia respecto al de placentas saludables (Racca et al., 2016). Cabe recordar que una de las causas que contribuyen al desarrollo de la PE es justamente una migración e invasión disminuida del trofoblasto en la decidua y el insuficiente remodelado de las arterias espiraladas. Por lo tanto, esto nos permite suponer que la regulación de los niveles de expresión de KLF6 durante la diferenciación de células trofoblásticas extravelosas es clave para el desarrollo de un embarazo saludable.

Por otro lado, en tejido de coriocarcinoma la mayoría de las células presentaban señal positiva para KLF6 en el citoplasma, mientras que en las molas invasivas algunas células mostraban marca de KLF6 citoplasmática mientras otras una fuerte señal en núcleo y citoplasma. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de KLF6 en ninguna de las dos condiciones patológicas respecto a placentas normales. Sin embargo, en este análisis se cuantificó la expresión de KLF6 sin distinguir tipos de células. Sería interesante profundizar el estudio identificando las células con un fenotipo tumoral y midiendo en esas células los niveles de expresión de KLF6.

En estos contextos patológicos se debe tener en cuenta, además, la posibilidad de que sea alguna de las variantes de empalme de localización citoplasmática la que se exprese. En diversas células tumorales se ha demostrado la expresión de la variante de empalme KLF6-SV1 (Narla et al., 2005), la cual carece del dominio de unión al ADN y de la señal de localización nuclear, por lo que se localiza exclusivamente en el citoplasma. Más aún, a esta variante se le han atribuido funciones oncogénicas / anti-apoptóticas, mientras que KLF6 nativo actuaría como un gen supresor de tumor, por lo cual se ha postulado que la regulación fina en la expresión de ambas variantes

contribuiría a establecer el control entre proliferación y crecimiento celular (Narla et al., 2005; Rodríguez et al., 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, y dada la importancia que tienen los niveles de expresión de KLF6 durante el desarrollo del trofoblasto, sería interesante a futuro, estudiar la expresión de algunas de las variantes de empalme de KLF6 en el trofoblasto y en complicaciones asociadas al embarazo, para profundizar en el rol de KLF6 durante el desarrollo de la placenta y las patologías asociadas. En contextos tumorales donde la variante KLF6-SV1 aumenta la tumorigénesis, principalmente al antagonizar a la variante de longitud completa de KLF6, se están buscando estrategias para inhibir esa isoforma con fines terapéuticos. Varios estudios han demostrado que la inhibición de KLF6-SV1 es eficaz para suprimir el crecimiento y la progresión del tumor tanto *in vitro* como *in vivo* (Syafuddin et al., 2020). Además, se está evaluando el uso de moduladores funcionales que pueden inhibir el empalme alternativo (Bates et al., 2016). Otra posibilidad en estudio es reintroducir o incrementar la expresión de KLF6 en aquellos tipos de cáncer donde los niveles de KLF6 se encuentran disminuidos. Esto podría lograrse potencialmente dirigiéndose a los reguladores que activan o reprimen a KLF6 en cánceres como los miR y los ARN no codificantes largos (Syafuddin et al., 2020).



**CONCLUSIONES**

**Y**

**PERSPECTIVAS**

## CONCLUSIONES

En esta tesis se planteó la siguiente hipótesis: *KLF6 participa en el control de la fusión y migración del tejido trofoblástico regulando la expresión de efectores claves. Por ello, su expresión y/o localización se encuentra alterada en placentas patológicas.*

El trabajo desarrollado aportó las siguientes evidencias a favor de la hipótesis planteada:

### Trofoblasto vellosos

- KLF6 aumenta la fusión espontánea de CTBv y de células BeWo en cultivo.
- El aumento en la fusión se acompaña de un incremento en la expresión de las proteínas Syn-1,  $\beta$ -hCG y GRP78, así como de los transcritos de ABCG2, Syn-1, Gal-1 y Cx43 todas moléculas efectoras y biomarcadores del proceso de diferenciación que conduce a la formación del sinciotrofoblasto.
- La mutante KLF6 $\Delta$ ac que mantiene su dominio de unión al ADN, pero carece del dominio activador, disminuye la fusión y expresión de Syn-1 y  $\beta$ -hCG en células BeWo.
- La fusión espontánea de los CTBv y la expresión de Syn-1 disminuye en presencia de KLF6 $\Delta$ ac, tal como ocurre con el silenciamiento de KLF6.
- En células BeWo, KLF6 induce un incremento en la expresión de p21 y disminución en la proliferación, coincidente con la regulación transcripcional positiva de KLF6 sobre p21 en otros contextos celulares.
- El silenciamiento de p21 disminuye la diferenciación inducida por KLF6.

### Trofoblasto extraveloso

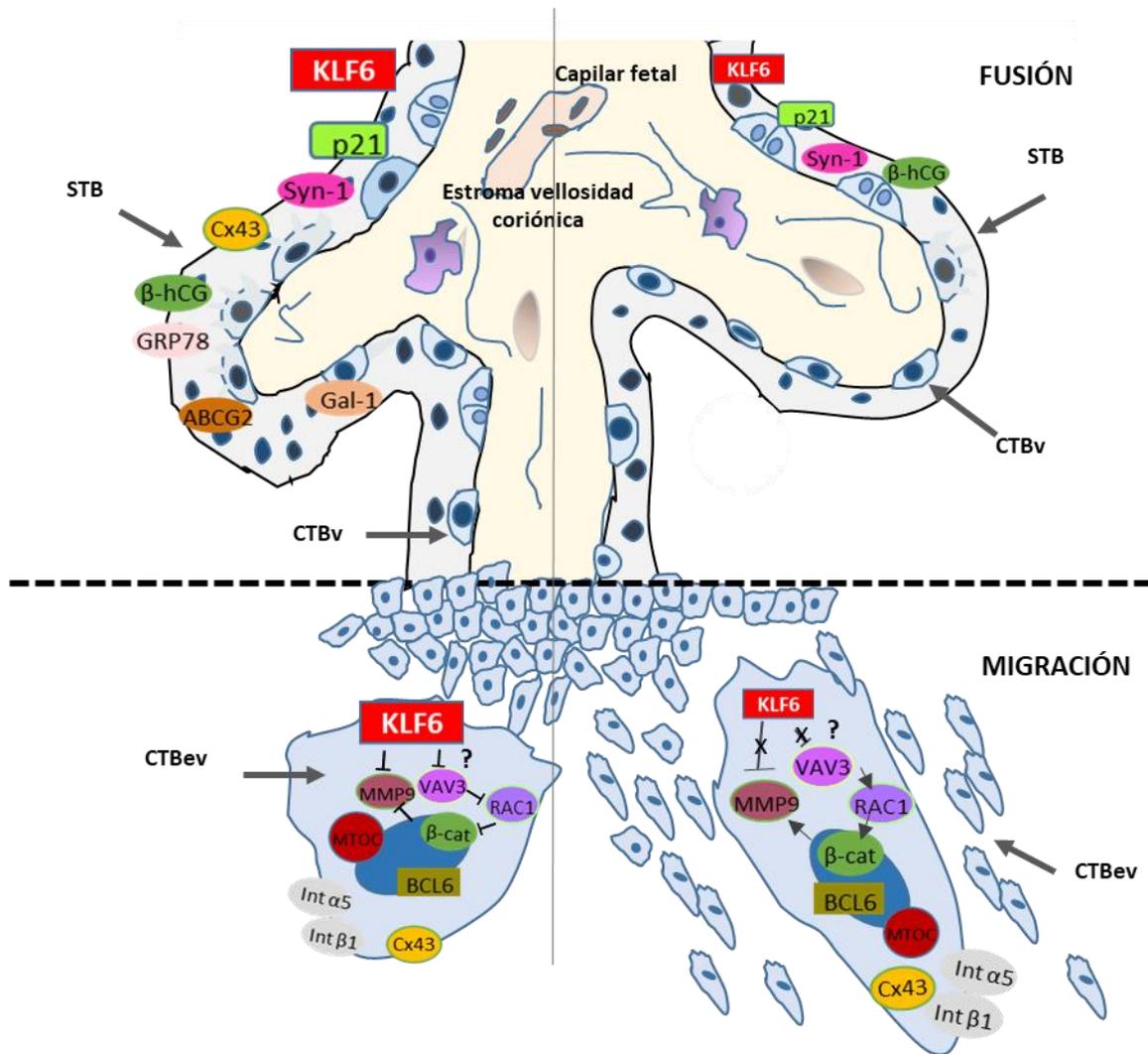
- La disminución en los niveles de KLF6 incrementa la migración de células trofoblásticas extravelosas. Sin embargo, la sobreexpresión de KLF6 no la modifica, posiblemente porque la línea celular empleada tiene silenciado epigenéticamente el gen *CDH1* por lo cual KLF6 no podría activar su expresión.
- La expresión de la mutante carente del dominio activador ácido incrementa la migración celular, en cambio la expresión de la mutante carente de parte del dominio de unión al ADN no la modifica.
- Disminución en los niveles de KLF6 aumentan la actividad de MMP9 y la expresión de moléculas involucradas en el proceso de migración.
- En células con niveles bajos de KLF6 el MTOC se posiciona frente a la dirección de migración, además estas células tienen una mayor cantidad de  $\beta$ -catenina en el núcleo.

- La disminución en la expresión de KLF6 o la expresión de la mutante KLF6 $\Delta$ ac inducen cambios en la morfología y el citoesqueleto compatibles con una transformación tipo EMT.
- La carencia del dominio activador de KLF6 genera una disminución en la proliferación de células trofoblásticas extravelosas, al igual que sucede con el silenciamiento de KLF6.
- Células de la decidua de placentas cretas expresan menores niveles de KLF6 y presentan un perfil de expresión principalmente citoplasmático a diferencia de placentas normales.

Finalmente, podemos decir que KLF6 es necesario y suficiente para desencadenar la fusión, siendo un regulador maestro de la diferenciación celular en la vía sincicial y que su dominio de transactivación es necesario para esta función; KLF6 modula la diferenciación del trofoblasto extraveloso hacia un fenotipo migratorio, dado que la disminución en su expresión o el bloqueo de su función favorecen la migración celular y la expresión de marcadores asociados a la transformación tipo epitelio-mesenquimal que caracteriza el proceso de diferenciación por la vía extravelosa. La expresión de KLF6 se encuentra aumentada en placentas de embarazos que cursaron con PE, en cambio se encuentra disminuida en placentas cretas anormalmente invasivas por lo cual, la desregulación en la expresión y/o funcionalidad de KLF6 podría contribuir al desarrollo de estas patologías del embarazo.

## **PERSPECTIVAS**

- Evaluar la participación de diferentes vías en la fusión de células trofoblásticas desencadenada por KLF6.
- Estudiar si KLF6 modula la migración de células trofoblásticas a través de la vía de VAV3 /RAC1 / $\beta$ -catenina.
- Analizar los niveles de KLF6 y de la variante de emplame KLF6-SV1 en CTBv y CTBev de placentas preeclámpticas, cretas y con IUGR para determinar si existe una correlación entre la expresión de KLF6 y dichas patologías.



**Representación del rol propuesto para KLF6 en la diferenciación del trofoblasto vellosito y extraveloso.** En el trofoblasto vellosito, KLF6 aumenta la expresión de p21, disminuye la proliferación celular e incrementa la expresión de la proteína fusogénica Syn-1. Así, contribuye al inicio del proceso de fusión de los CTBv de manera parcialmente dependiente de p21. KLF6 incrementa también la expresión β-hCG, ABCG2, Cx43, GRP78 y Gal-1, todas moléculas implicadas en el proceso de sincialización que mantiene un STB funcional. La disminución en la expresión de KLF6 o la pérdida de su actividad transcripcional disminuye la fusión, así como, la expresión de Syn-1, β-hCG y p21. Por otro lado, en el trofoblasto extraveloso, KLF6 regula negativamente la expresión de MMP9 y mantiene niveles relativamente bajos de Cx43, integrinas α5 y β1, BCL6 y β-catenina, actuando como un modulador negativo de la migración polarizada. La disminución en la cantidad o la pérdida de la actividad transcripcional de KLF6 conduce a un incremento en la actividad de MMP9 y en la expresión de Cx43, integrinas α5 y β1, BCL6 y β-catenina nuclear. Además, provoca cambios morfológicos compatibles con una transición epitelio-mesénquima, reorientación del MTOC y aumento en la migración polarizada. KLF6 podría modular la migración de los CTBev a través de la vía de VAV3 /RAC1 /β-cat, en este sentido, KLF6 es un represor transcripcional de VAV3 en algunos contextos tumorales. Además, placentas anormalmente invasivas tienen niveles de KLF6 más bajos que placentas normales. STB: sinciotrofoblasto; CTBv: citotrofoblasto vellosito; CTBev: citotrofoblasto extraveloso; Int: integrina; β-cat: β-catenina; MTOC: centro organizador de microtúbulos; Syn-1: sincitina-1; β-hCG: subunidad β de la hormona gonadotrofina coriónica humana; MMP9: metaloproteína 9; Gal-1: galectina-1.



## *MATERIALES Y MÉTODOS*

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Plásmidos

GFP-KLF6 $\Delta$ ac. El plásmido GFP-KLF6 $\Delta$ ac fue generado previamente en el laboratorio y contiene el ADNc que codifica para la proteína de KLF6 sin el dominio ácido N-terminal ( $\Delta$ ac).

pLenti CMV/TO-KLF6 (pLenti-KLF6), pLenti CMV/TO-KLF6 $\Delta$ ac (pLenti-KLF6 $\Delta$ ac), pLenti CMV/TO-KLF6zf2 (pLenti-KLF6zf2). Estos plásmidos recombinantes fueron contruidos para el desarrollo de esta tesis y contienen la secuencia que codifica a la proteína KLF6 completa, a la proteína con el extremo N-terminal delecionado, y a la proteína que carece de un dedo de zinc del dominio de unión al ADN, respectivamente. Los mismos fueron contruidos a partir del ADNc de KLF6 clonada previamente en el vector de expresión PXJ-KLF6. A partir de esta secuencia se obtuvieron las secuencias de interés mediante amplificación por PCR con cebadores específicos (Tabla III). Cada producto amplificado se subclonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y posteriormente mediante las enzimas de restricción BamHI (Invitrogen) y XbaI (Thermo Fisher) se digirió y clonó en el vector pLenti CMV TO puro empty (w175-1) (Addgene). Para ello se utilizó el plásmido pLenti-StarD7.I, el cual fue digerido previamente con las enzimas BamHI y XbaI para eliminar la secuencia de StarD7.I e incorporar la de KLF6. Los insertos contenidos en los plásmidos recombinantes se secuenciaron a través del servicio de MacroGen (Corea del Sur). Estas construcciones, junto con el vector vacío, pLenti CMV/TO puro empty (VV), se utilizaron para producir las respectivas partículas virales y la posterior generación de células establemente transformadas.

**Tabla III.** Cebadores utilizados para amplificar el ADNc de KLF6 y las mutantes. Se muestran los sitios de restricción XbaI y BamHI subrayados.

Transcriptos	Combinación de Primers utilizada	Secuencia 5'-3'
KLF6	FW PXJ	TGTAATACGACTCACTATAGGGCG
	pxj-HA_KLF6_Rev	CCTCGAGTCTAGATCAGAGGTGCCTCTTCAT
KLF6 $\Delta$ ac	DELTA AM new	CCAGGATCCTGAACTCAGATGTGTCAG
	pxj-HA_KLF6_Rev	CCTCGAGTCTAGATCAGAGGTGCCTCTTCAT
KLF6zf2	FW PXJ	TGTAATACGACTCACTATAGGGCG
	Rev ZF2-TGA	GTCTAGAGGGATCATTTAAAGGC

pMD2.G (Addgene): Plásmido de empaquetamiento utilizado en la generación de lentivirus que codifica para la expresión de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular para permitir la producción de un retrovirus con un amplio rango de huéspedes.

PsPAX2 (Addgene): Plásmido de empaquetamiento utilizado en la generación de lentivirus que contiene las secuencias *rev*, *gag* y *pol* derivadas del virus HIV, que codifican para las proteínas core requeridas para la formación de la estructura y la exportación nuclear del RNA viral y las enzimas requeridas para la replicación e integración de los lentivirus en la célula huésped.

#### *Preparación y purificación de plásmidos*

Las bacterias competentes utilizadas para transformar con los plásmidos descritos pertenecen a la cepa de *Escherichia coli*, Stbl3. Se repicó la cepa de bacterias conservadas a -80 °C en medio Luria Bertani (LB) (extracto de levadura 5 g, tripteína 10 g, NaCl 10 g, H<sub>2</sub>O c.s.p. 1000 ml) - Agar 1,5 % (p/v) y se incubó a 37 °C. Al otro día, se tomó una colonia aislada, se inoculó en 10 ml de medio LB y se incubó toda la noche a 37 °C en agitación. Luego, se tomó 1 ml de esta solución y se inoculó en 250 ml de medio LB, se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, con una densidad óptica (OD) aproximada de 0,6 medida a 600 nm. Alcanzada esta OD, el cultivo se centrifugó a 4000 x g (rcf), 15 minutos a 4 °C, y se descartó el sobrenadante suavemente. A partir de este momento, el procedimiento se realizó manteniendo las bacterias en hielo. El pellet obtenido se resuspendió en 250 ml de agua miliQ estéril a 4 °C y se centrifugó en tubos Falcon de 50 ml (4000 x g, 15 minutos a 4 °C). El lavado y la centrifugación se repitieron resuspendiendo en 125 ml y luego en 5 ml de agua miliQ estéril. Finalmente, el pellet se resuspendió en 750 µl de glicerol 10 % (v/v) a 4 °C. Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos plásticos de 1,5 ml que se almacenaron a -80 °C hasta el momento de uso.

#### *Transformación de bacterias electrocompetentes*

Para llevar a cabo este proceso se descongelaron las bacterias en hielo (50 µl de suspensión de bacterias competentes), luego se agregó 1 µg (1-3 µl) de ADN plasmídico en esterilidad y se incubó en hielo por 30 minutos. Pasado ese tiempo, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación estéril y se electroporó aplicando un pulso eléctrico de 1,4 kV durante 20 milisegundos. Inmediatamente después se agregaron 950 µl de medio LB, se transfirió a un tubo cónico estéril de 1,5 ml y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Luego se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 100 µl de medio LB estéril. Finalmente, las

bacterias transformadas se plaquearon en medio LB-Agar con antibiótico (100 µg/ml ampicilina o 40 µg/ml de kanamicina según la resistencia que codifique el plásmido).

#### *Preparaciones de ADN plasmídico*

Los plásmidos utilizados para experimentos de transfección se purificaron en pequeña escala (miniprep) utilizando el kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep (A1222, Promega).

Las purificaciones utilizadas para corroborar la identidad de los clones obtenidos se realizaron con el protocolo de miniprep en uso en nuestro laboratorio. Se aisló una colonia única, la cual se incubó toda la noche en 5 ml de medio LB-antibiótico a 37 °C en agitación. Al otro día se tomaron 1,5 ml de la suspensión en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó 30 segundos a 12000 g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de "Solución I". Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se agregaron 200 µl de "Solución II", se mezcló por inversión suavemente y se incubó entre 5-10 minutos en hielo. Pasado ese tiempo se agregaron 150 µl de "Solución III", se agitó e incubó nuevamente por 5-10 minutos en hielo. Se centrifugó a máxima velocidad, durante 5-10 minutos a 4 °C, y luego se tomaron aproximadamente 400 µl del sobrenadante evitando arrastrar restos celulares, los cuales se transfirieron a otro tubo cónico de microcentrífuga, donde se agregaron 200-300 µl de alcohol isopropílico y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 x g por 5-10 minutos y se descartó el sobrenadante cuidadosamente sin afectar al pellet de ADN formado. El pellet obtenido se lavó agregando 1 ml de etanol 70 %, se centrifugó 5 minutos a 12000 x g, se retiró el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente al menos 10 minutos. Luego se disolvió en 30 µl de agua libre de ADNasas o solución de TE 1X, se incubó por 20-30 minutos a 37 °C, y finalmente se preservó a -20 °C hasta su uso.

Soluciones:

Solución I: Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH=8.0; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM pH=8.

Para 10 ml: Glucosa 0,09 gr; 0,25 ml de Tris-HCl 1M; 0,20 ml de EDTA 0,5 M; agua deionizada c.s.p 10 ml. Filtrar y mantener a 4 °C.

Solución II: duodecil sulfato de sodio (SDS) 1 %, NaOH 0,2 N

Para 10 ml: 0,2 ml de NaOH 10 M (NaOH 0,2 M); 1 ml de SDS 10 % (p/v); agua deionizada c.s.p 10 ml. Preparar en el momento de usar y no agregar el NaOH directamente sobre el SDS concentrado.

Solución III: Acetato de sodio (NaAc) 3 M pH= 4,80

Para 50 ml: NaAc= 2,04 gr; agua deionizada 50 ml.

TE (Tris-EDTA) 1X: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM. pH= 7,9-8,1. Almacenar a 4 °C.

#### *Análisis de las preparaciones plasmídicas*

La calidad de los plásmidos se analizó a través de electroforesis en gel de agarosa y la cuantificación se realizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm (1 DO=50 µg/ml de ADN) y a 280 nm.

Los plásmidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 0,8-1,2 % (p/v) en buffer TAE (Tris-acético 0,04 M, EDTA 1 mM) con el colorante SYBR Safe (Invitrogen) a una dilución de 1:10000. Las muestras se prepararon con buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,25 % y glicerol 30 % (v/v)) y se colocaron en los correspondientes pocillos del gel. Simultáneamente, se sembró un carril con un marcador de tamaño molecular de acuerdo a las bandas que se esperaban observar, siguiendo las indicaciones del fabricante. La corrida electroforética se desarrolló en buffer TAE a 80 mV durante 20-40 minutos. Las bandas de ADN plasmídico se observaron por fluorescencia al UV.

### **Cultivo celular**

#### *Líneas celulares*

Para el desarrollo de los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares: HTR8/SVneo, BeWo y HEK293T

Las células BeWo, derivadas de coriocarcinoma humano son un modelo ampliamente utilizado para estudiar la diferenciación a través de la vía vellosa. La línea celular HTR8/SVneo es de origen extravelloso derivada de citotrofoblastos humanos de primer trimestre inmortalizados, con características invasivas. Ambos tipos celulares y las células establemente transformadas se cultivaron en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 % (v/v) a 37 °C en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-F12 (Invitrogen) suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y suero fetal bovino (SFB) al 10 % (v/v).

Las células HEK293T (Human Embryonic Kidney), se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> en DMEM alta glucosa suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml y SFB al 10 % (v/v).

Las células se repicaron por tripsinización a una confluencia aproximada del 80-90 % y posterior neutralización con medio de cultivo y SFB al 10 % (v/v).

## Ensayos de transfección

Las células se plaquearon en multiplaca de 6 pocillos,  $2 \times 10^5$  células por pocillo, y en placa de 100 mm  $1 \times 10^6$  células, para tener al otro día una confluencia del 60-80 %. Al día siguiente se realizó la transfección con el reactivo JetPRIME (Polypus Transfection) respetando los pasos y cantidades descriptas a continuación.

-Placa de 6 pocillos, cantidades por pocillo: 200  $\mu$ l de buffer del reactivo de transfección; 2  $\mu$ g de ADN plasmídico; 4  $\mu$ l de reactivo JetPRIME; medio suplementado con SFB 10 % (v/v), c.s.p. 1 ml. A las 4-6 horas se agregó 1 ml de medio suplementado con SFB 10 % (v/v) y antibiótico.

-Placa de 100 mm, cantidad por placa: 500  $\mu$ l del buffer del reactivo de transfección; 2,5  $\mu$ g de plásmidos (excepto el plásmido pMD2.G que se colocaron 0,5  $\mu$ g); 10  $\mu$ l del reactivo JetPRIME; medio suplementado con SFB 10 % (v/v) csp 10 ml.

Primeramente, se mezcló el buffer con el/los correspondientes plásmidos. La mezcla se agitó con vortex durante 10 segundos. Luego, se agregó el reactivo de transfección JetPRIME previamente agitado en vortex 5 segundos. Una vez incorporado se agitó la mezcla en vortex durante 10 segundos, se homogeneizó y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos. Mientras tanto, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) 1x y se les colocó el medio correspondiente, pasado el tiempo de incubación se agregó la mezcla a las células.

## Silenciamiento con siARN

Células HTR8/SVneo ( $1 \times 10^5$ ) o BeWo ( $1,5 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio DMEM-F12 suplementado (SFB 10 % (v/v) y penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml) en multiplaca de 6 pocillos en un volumen final de 2 ml. Después de 24 horas las células se lavaron y transfectaron con 25 nM de siKLF6-A (Ambion Silencer Select, Id# 9700) o 50 nM de sip21 (Sigma ID no 870; SASI\_Hs01 00025256 AS) o con el control (SCR) (SilencerNegative™) (AppliedBiosystems/Ambion) usando 4  $\mu$ l del reactivo comercial Lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen # 13778100) en un volumen final de 1 ml de OPTI-MEM libre de suero y antibiótico. Cuatro horas después se agregó medio DMEM-F12 suplementado a un volumen final de 2 ml y 48 horas (células HTR8/SVneo) o 72 horas (células BeWo) después del tratamiento con siKLF6 (siK), sip21 o SCR las células se prepararon para los experimentos posteriores.

siKLF6-A, secuencia 5' - 3', ubicada en la posición 455 del transcripto NM\_001300.

sentido: GGAAGAUCUGUGGACCAAATTT

antisentido: UUUGGUCCACAGAUCUUCCTG

### **Obtención de células establemente transformadas**

Se obtuvieron células BeWo y HTR8/SVneo establemente transformadas mediante transducciones con vectores lentivirales y selección con puromicina.

#### *Producción de partículas lentivirales*

Para el empaquetamiento lentiviral, las células HEK293T se transfectaron con el reactivo de transfección JetPRIME como se describió anteriormente. Después de 16 horas de transfección se cambió el medio adicionando 8 ml de medio completo (DMEM - SFB 10% (v/v), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml). A partir de este momento todo el procedimiento se realizó en una cabina de bioseguridad tipo II. El sobrenadante viral se colectó a las 48 y 72 horas post-transfección y a las células, luego de la primera recolección, se les agregó nuevamente 8 ml de medio completo. El medio celular se recogió en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para eliminar las células muertas y el debris celular. El sobrenadante se alicuotó en tubos de 1,5 ml y se conservó hasta su uso a -80 °C. Se generaron lentivirus que expresan la versión completa de KLF6, las mutantes KLF6 $\Delta$ ac y KLF6zf2 o como control el vector vacío (VV).

#### *Transducción con lentivirus*

Células HTR8/SVneo ( $1,5 \times 10^5$ ) y BeWo ( $2 \times 10^5$ ) se colocaron en multiplacas de 6 pocillos. Al otro día se transdujeron con los correspondientes sobrenadantes lentivirales suplementados con 8  $\mu$ g/ml de polybrene (Sigma). Luego de 24 horas el medio se reemplazó por medio fresco y 48 horas post-transducción las células se resuspendieron en medio nuevo y se sometieron a selección por 2 semanas con puromicina 2  $\mu$ g/ml (Sigma). Las células estables seleccionadas se denominaron: HTR8-KLF6, HTR8-KLF6 $\Delta$ ac, HTR8-KLF6zf2, BeWo-KLF6, BeWo-KLF6 $\Delta$ ac y las células control HTR8-VV y BeWo-VV.

### **Diferenciación *in vitro* de células BeWo, BeWo-VV, BeWo-KLF6 y BeWo-KLF6 $\Delta$ ac**

Células BeWo se sembraron en placa de 6 pocillos ( $1,5 \times 10^5$  células/pocillo) y se cultivaron durante 72 horas en medio suplementado (DMEM-F12; penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml; SFB 10 % (v/v)) en presencia o no de 30  $\mu$ M de forskolin (FSK, Sigma), preparado en dimetil sulfóxido (DMSO), para inducir su diferenciación (Wice et al., 1990). El medio suplementado con FSK, en caso de ser necesario, se colocó el primer día de tratamiento y se mantuvo sin renovación por las siguientes 72 horas. Los cultivos empleados como control se cultivaron en paralelo en iguales

condiciones en medio suplementado y un volumen de DMSO equivalente al de FSK empleado en el tratamiento.

### **Análisis de migración por reparación de la herida (Wound Healing)**

Las células HTR8/SVneo transformadas establemente, o previamente transformadas se crecieron en placas de 6 pocillos durante 24 horas. Luego se realizaron las heridas con una punta fina sobre la monocapa de células, se lavó 2 veces cuidadosamente con PBS para sacar las células que se desprendieron, y se colocó medio suplementado. Se realizaron tres heridas por pocillo. Se tomaron imágenes a los diferentes tiempos requeridos mediante un microscopio Leica DMI 8, con cámara monocromática, platina motorizada y el software Las-X. Las imágenes se analizaron contando el área remanente de la herida a los diferentes tiempos y el área migrada se calculó como la diferencia entre el área remanente a un determinado tiempo y el área remanente a tiempo inicial ( $t=0$ ). El resultado se informó como porcentaje de migración relativa al control.

### **Análisis de migración por transwell**

Células HTR8/SVneo se transfectaron con siKLF6-A o SCR. Cuarenta y ocho horas después, se tripsinizaron y resuspendieron en medio DMEM-F12 suplementado con SFB 1 % (v/v) y penicilina 100 U/ml, estreptomycin 0,1 mg/ml. Para cada condición se colocaron  $5 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ l de medio en la parte superior de un transwell acomodado en una placa de 24 pocillos. Dentro de cada pocillo en contacto con la parte inferior del transwell se colocaron 400  $\mu$ l de medio DMEM-F12 con SFB al 10 % (v/v) y antibiótico. La migración a través del transwell se analizó a las 8 horas. Transcurrido ese tiempo se removieron las células que no migraron del compartimento superior con un hisopo de algodón. Las células que migraron atravesando el filtro hacia la parte inferior del transwell se fijaron con metanol absoluto frío durante 15 minutos a  $-20$  °C. Luego se lavaron dos veces con PBS, y se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (5  $\mu$ g/ml en PBS) durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Luego se montó el transwell sobre un cubreobjetos y la tinción de los núcleos se observó en un microscopio Leica DMI 8 invertido utilizando la herramienta Tlescan que permite obtener una imagen completa de la parte inferior del transwell. El resultado se informó como porcentaje de migración relativa al control SCR.

### **Ensayo de recuento celular**

Células BeWo-KLF6 y BeWo-VV ( $4 \times 10^5$  células/pocillo) se colocaron en pocillos de placa de 12 pocillos por triplicado. A las 24 horas se contaron las células de tres

pocillos para cada condición mediante recuento por cámara de Neubauer, este número de células se determinó como cantidad de células a tiempo inicial (To). A las 72 horas a partir del tiempo inicial, se contaron las células de los otros tres pocillos para cada condición.

Para la determinación del número de células se empleó el método de exclusión de azul tripán. Una vez tripsinizadas se colocaron 50 µl de la suspensión celular y 150 µl de solución de azul tripán 0,4 % (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg, en PBS, pH 7,4 en 100 ml). Se colocó 10 µl de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular (N) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de la cámara entre los 5 y los 10 minutos luego del agregado del colorante. El número de células totales por ml se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{cél}{ml} = \frac{\sum n}{4} \times 10^4 \times FD$$

n= nº de células. FD= Factor de dilución.

### **Purificación de citotrofoblastos vellosos a partir de placentas humanas**

Se obtuvieron placentas humanas de pacientes no identificadas con la evaluación y aprobación ética del Comité Asesor de Investigación Biomédica en Humanos de Córdoba, Argentina, (RePIS N° 1202, HP 4-112). Dichas placentas eran normales a término (37-41 semanas de gestación) provenientes de cesáreas para evitar contaminación en el canal de parto. El tejido se procesó dentro de los 30 minutos posteriores al alumbramiento. Se retiró la membrana externa del tejido (rica en células deciduales) y se lavó con solución fisiológica estéril reiteradas veces a fin de eliminar la sangre contenida en el tejido. Se cortaron trozos de tejido de aproximadamente un centímetro cúbico, se lavaron exhaustivamente y se prosiguió seccionando hasta obtener trozos de muy pequeño tamaño libres de calcificaciones, infartos, coágulos, fibrosis y vasculatura de gran tamaño. Posteriormente se tomaron 20 g de esos explantos y se lavaron 3 veces con solución de Hank's (HBSS – KCl 400 mg/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mg/L, NaCl 8 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 120 mg/l, D-glucosa 1 g/l) libre de calcio y magnesio suplementada con antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml; Invitrogen). Se eliminó el sobrenadante y se procedió a la tripsinización la cual consistió en 3 incubaciones de 30 minutos con agitación (80 rpm) a 37 °C en buffer de digestión, de acuerdo al protocolo de Kliman (Kliman et al., 1986) con modificaciones. El primer paso de tripsinización se realizó en 70 ml de buffer y finalizado el tiempo de incubación se dejó decantar los explantos y se tomaron 35 ml de sobrenadante. A los 35 ml remanentes de la primera tripsinización se le agregaron 70 ml de buffer de

digestión y, luego de la incubación con agitación, se recuperó el sobrenadante por completo. Finalmente, la última incubación se realizó en 60 ml de buffer. En todos los casos la acción de la tripsina en los sobrenadantes se bloqueó inmediatamente por el agregado de SFB al 10 % (v/v). Los sobrenadantes neutralizados se centrifugaron por 10 minutos a 850 x 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 las células de CTBv y una fase inferior roja que contiene principalmente glóbulos rojos. Los sobrenadantes de las centrifugaciones se eliminaron y los pellets se resuspendieron en 1,5 ml de DMEM 4,5 g/l de glucosa suplementado con antibióticos. Estas resuspensiones se filtraron en una malla metálica de 100 µm a fin de eliminar agregados de células y posibles fibras remanentes y se llevaron a un volumen final de 50 ml con DMEM suplementado con antibióticos. Posteriormente se alicuotaron en 4 tubos de 12,5 ml que se centrifugaron a 850 x g a temperatura ambiente por 10 minutos. 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 sembró en un gradiente de Percoll (GE Healthcare). El gradiente se obtuvo preparando diferentes soluciones de Percoll en solución tampón Hank's enriquecida suplementada con antibióticos, con un rango de concentraciones que van del 70 % al 5 %, escalonando de 5 en 5, sembrando 2,5 ml de cada solución. Una vez obtenido el gradiente, se sembraron cuidadosamente los 3 ml de la muestra en la superficie del gradiente, y se centrifugó a temperatura ambiente por 35 minutos a 12000 x g, sin freno. En la zona del gradiente que corresponde a la concentración de un 40 % de Percoll se observó la presencia de anillos blanquecinos correspondientes a células trofoblásticas. Cuidadosamente se eliminó la parte superior del gradiente y se recuperó la porción correspondiente a los anillos (entre 8 y 10 ml) en un tubo Falcon de 15 ml llevando a volumen final con DMEM suplementado con antibióticos. Se centrifugó 10 minutos a temperatura ambiente a 850 x g y se observó un pellet blanco que se lavó 2 veces en DMEM suplementado con antibióticos y finalmente se resuspendió 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.

### **Cultivo, transducción y diferenciación espontánea *in vitro* de citotrofoblastos**

Los CTBv purificados, se cultivaron a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> 5 % (v/v) en KGM (medio de crecimiento para queratinocitos, Invitrogen) suplementado con antibióticos (estreptomocina 0,1 mg/ml, penicilina 100U/ml), SFB al 10 % (v/v) y 5 ng/ml

de factor de crecimiento epidérmico (Invitrogen). Luego de 4 horas se efectuaron 2 lavados con PBS y cambio total de medio a fin de eliminar posibles sinciciotrofoblastos presentes en la purificación o se llevó a cabo la transducción con las partículas virales correspondientes.

#### *Transducción con lentivirus*

Los CTB cultivados en multiplaca de 96 pocillos (180000 CTB/pocillo) se transdujeron con los correspondientes sobrenadantes lentivirales suplementados con 8 µg/ml de polybrene (Sigma). Al día siguiente el medio se reemplazó por medio fresco suplementado con antibióticos (estreptomicina 0,1 mg/ml, penicilina 100U/ml), SFB al 10 % (v/v) y 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Invitrogen) y 72 horas post-transducción las células se fijaron para inmunofluorescencia o se extrajeron extractos proteicos para Western Blot utilizando 30 µl por pocillo de buffer Leammli 2X/ β-mercaptoetanol (ver en Materiales y Métodos: Detección de proteínas por Western Blot).

#### **Cálculo del índice de fusión**

El cálculo del índice de fusión celular se realizó mediante la observación de las imágenes de microscopía de fluorescencia realizadas para inmunodetectar desmoplaquina y el colorante Hoechst 33258, se contaron los núcleos totales, núcleos formando parte de sincicios y número de sincicios por campo. Se analizaron las imágenes de al menos 7 campos al azar para cada condición. El cálculo del índice de fusión se realizó con la siguiente fórmula:

$$\text{índice de fusión} = \left[ \frac{N^{\circ} \text{ núcleos en sincicio} - N^{\circ} \text{ sincicios}}{N^{\circ} \text{ núcleos totales}} \right] * 100$$

#### **Purificación de ARN total de cultivos celulares**

La extracción de ARN total se efectuó a partir de cultivos celulares realizados en pocillos individuales de multiplaca de 6 pocillos, utilizando 500 µl del reactivo Tri Reagent SIGM-T9424 (Sigma Aldrich), el cual produce la lisis y liberación del contenido celular. Luego se realizó una extracción con cloroformo, obteniendo el ARN en la fase acuosa superior, el cual se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 75 % (v/v) frío, se resuspendió en agua libre de ADNasas y ARNasas (Ambion) y se guardó a -80 °C hasta su uso. La concentración del ARN purificado se estimó mediante lectura espectrofotométrica a 260 nm, sabiendo que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg/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. Se consideraron aceptables valores entre 1,8 y 2,0.

## Reacción de Transcripción Reversa

Para la síntesis de 20 µl de ADNc se utilizó 1 µg de ARN, buffer de reacción 1x comercial (Promega), 20 U finales de RNAsin (inhibidor específico de ARNsas), 25 ng totales de hexadesoxirribonucleótidos de secuencia al azar, 10 mM de ditioneitol (DTT) y agua libre de ARNsas (Ambion). Esta mezcla se incubó a 65 °C por 15 minutos (para desarmar estructuras secundarias) y se enfrió rápidamente en hielo durante 1 minuto. La reacción de síntesis del ADNc se inició con el agregado de 1 mM de cada dNTPs y 200 U totales de la transcriptasa reversa MMLV-RT (Invitrogen). La reacción se incubó 10 minutos a 25 °C, luego 50 minutos a 37 °C y finalmente se inactivó incubando a 95 °C durante 3 minutos.

## Amplificación de ADNc cuantitativa por reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (qRT-PCR).

Las secuencias de los primers utilizados se listan en la Tabla IV. El nivel de expresión de cada gen de interés se normalizó respecto al nivel del gen de referencia endógeno *ciclofilina A*. El sistema de amplificación a tiempo real utilizado fue de Applied Biosystems (ABI 7500 Sequence Detection System). Las condiciones de reacción, los primers y el tamaño de los fragmentos se seleccionaron para amplificar el gen de interés con eficiencias de amplificación comparables y mayores al 90 %. Los experimentos se realizaron usando 1X de la mezcla comercial de PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems), con las concentraciones de cebadores detalladas en la Tabla IV y 5 µl de una dilución 1/5 de ADNc en un volumen final de reacción de 15 µl. El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95 °C seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y a 60 °C por 1 minuto. La especificidad se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. Cada muestra se analizó por triplicado y el nivel de expresión relativa de los genes se calculó usando el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $[10^{(-1/a)} - 1] \times 100$  donde "a" es la pendiente de la curva estándar de cada gen amplificado.

<b>Tabla IV</b> Cebadores usados en amplificación de ADNc por PCR a tiempo real			
<b>Transcriptos</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Secuencia (5´-3´)</b>	<b>Conc.(nM)</b>
Syn-1	ERWE1-F	GCAACCACGAACGGACATC	200
	ERWE1-R	GTATCCAAGACTCCACTCCAGC	
ABCG2	ABCG2-F	CAATGGGATCATGAAACCTG	250
	ABCG2-R	CATTTATCAGAACATCTCCAGA	
BCL6	BCL6-F	GACTCTGAAGAGCCACCTG	400
	BCL6-R	CTGGCTTTTGTGACGGAAAT	
Gal-1	Gal-1F	CCTGGAGAGTGCCCTTCGAGTG	400
	Gal-1R	CTGCAACACTTCCAGGCTGG	
Cx43	Cx43F	ACTTGCCTTTTTCATTTTACTTC	200
	Cx43 R	CCTGGGCACCACTCTTTT	
PPIA (Ciclofilina A)	PPIA-F	GTTTTGCAGACGCCACCG	100
	PPIA-R	GCAAACAGCTCAAAGGAGACG	

### **Detección de proteínas por Western Blot**

Las proteínas de la multiplaca de 6 pocillos se extrajeron con 150 µl por pocillo de buffer Leammli 2X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 % (p/v), glicerol 25 % (v/v), azul de bromofenol 0,01 % (p/v) y 50 µl de β-mercaptoetanol cada 950 µl de buffer agregado al momento de usar. Las alícuotas de proteínas se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a altas revoluciones por 5 minutos. Las muestras se sembraron en geles de SDS y poliacrilamida al 10 % o 14 % (p/v) (SDS-PAGE), dependiendo el tamaño de las proteínas que se analizaron, y se corrieron a 150 V por 90 minutos en buffer de corrida. Finalizada la corrida se realizó una electrotransferencia húmeda en frío, de 60 minutos a 100 V a nitrocelulosa (Hybond-ECL de Amersham o GE). Posteriormente, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (rojo Ponceau 0,2 % (p/v), ácido tricloroacético 3 % (p/v), ácido sulfosalicílico 3 % (p/v) para determinar la cantidad y la calidad de la transferencia de las proteínas a la membrana a través del perfil proteico obtenido. Luego, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5 % (p/v) en Tris buffer salino (TBS) conteniendo 0,2 % (v/v) de Tween (TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario correspondiente con agitación durante toda la noche a 4 °C. Las soluciones de los anticuerpos primarios se hicieron en leche descremada al 5 % (p/v) en TBS-T, con las siguientes diluciones: 1/50 para anti-KLF6 (IgG de conejo, R-173 Santa Cruz) ó 1/1000 (IgG de ratón, 2c11), 1/500 para anti-βhCG (IgG de conejo, DAKO, A0231), 1/2500 anti-Cx43 (IgG de conejo, Sigma Co), 1/350 anti-integrina α5 (IgG de conejo, Santa Cruz, sc-10729), 1/350 anti-integrina β1 (IgG de ratón, Santa Cruz, sc-374429), 1/500 anti-β-catenina (IgG de ratón, Santa Cruz), 1/1000 p21 (IgG de conejo, Cell Signaling), 1/500 anti-Syn-1 (IgG de conejo, Santa

Cruz), 1/1000 anti-GRP78 (IgG de conejo, Cell Signaling Danvers, MA, USA), 1/1000 anti- $\beta$ -actina (IgG de ratón, Sigma-Aldrich, Cat# A2228) y 1/3000 para anti- $\alpha$ -tubulina (IgG de ratón, Sigma Co). Seguidamente, la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos a temperatura ambiente con TBS-T y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con una dilución 1/10000 de los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo IRDye 800CW (Li-Cor Biosciences cat no: 926-32213), o anti-IgG de conejo IRDye 680RD (Li-Cor Biosciences cat no:926-68073), anti-IgG de ratón IRDye 680RD (Li-Cor Biosciences, cat no 926-68072) o anti-IgG de ratón IRDye 800CW (Li-Cor Biosciences cat no:926-32212) con agitación suave. Finalmente, se realizaron 2 lavados con TBS-T y un lavado con TBS, con agitación. La presencia de los complejos proteína-anticuerpo se detectó con el equipo Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) y las imágenes se analizaron a través del programa Image Studio.

### **Ensayos de inmunofluorescencia**

Los ensayos se realizaron sobre células cultivadas en multiwell de 96 pocillos o portaobjetos estériles colocados en placas de cultivo previo a la siembra de las células. Luego de transcurrido el tiempo de crecimiento celular necesario acorde al experimento, los well o los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron 10 minutos en metanol a -20 °C o paraformaldehído (PFA) 3 % (p/v) por 20 minutos a temperatura ambiente, según el anticuerpo a utilizar y la proteína a detectar. Inmediatamente las células fijadas se incubaron con 10 mM de cloruro de amonio y se permeabilizaron durante 7 minutos en 0,1 % Tritón X-100 en PBS o 20 minutos con 0,2 % Nonidet P-40 (Sigma) y se hicieron 3 lavados en PBS de 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios se realizaron 2 bloqueos de 5 ó 15 minutos, el primero en 2,5 % de suero de cabra en 0,2 % de Tween-20 en PBS (PBS-T) y el segundo con 0,4 % de gelatina de piel de pescado (FSG) en PBS-T. Las células se incubaron por 1 hora en cámara húmeda a 37 °C con diluciones en FSG de los siguientes anticuerpos primarios: anti-desmoplaquina 1/100 (IgG de ratón, Abcam 16434), anti- $\beta$ -catenina 1/200 (IgG de ratón, Santa Cruz), anti-vimentina 1/50 (IgG de conejo, Abcam), anti- $\gamma$ -tubulina 1/3000 (IgG de ratón, Sigma Co) y una gota por cubreobjetos de una dilución comercial no especificada de anticuerpo monoclonal para citoqueratina 7 humana (clon OV-TL 12/30, Dako, N1626). Las células se lavaron 5 veces en PBS-T por 5 minutos y se repitió el protocolo de bloqueo. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo marcada con Alexa Flúor 488 (verde) y anti-IgG de ratón marcada con Alexa Flúor 594 (rojo) (Molecular Probes) se diluyeron 1/720 final en suero de cabra y se incubaron 1 hora a 37 °C en atmósfera húmeda. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (5  $\mu$ g/ml en PBS) durante 15 minutos. Por último, los portaobjetos se lavaron 3 veces en PBS-T

y se colocaron invertidos sobre una gota de líquido de montaje acuoso con protector de fluoróforos (Mowiol 4-88, Sigma Aldrich) o en caso de la placa de 96 pocillos, los wellles se lavaron y se dejaron con 50 ul de PBS guardados a 4°C al resguardo de la luz hasta su visualización al microscopio. Las inmunofluorescencias se visualizaron en microscopios de epifluorescencia (Nikon eclipse TE2000-U, Leica DMI 8 o spectral Olympus FluoView FV1200).

### **Coloración para analizar citoesqueleto de actina**

Las células cultivadas en cubreobjetos se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en PFA al 3 %, se incubaron con cloruro de amonio 10 mM por 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS, 3 minutos cada vez y se permeabilizaron durante 15 minutos con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en PBS. Luego, se enjuagaron con PBS, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1 % (v/v), Tween-20 al 0,05 % (v/v) en PBS durante 10 minutos, y se incubaron con Phalloidin-Alexa Fluor 680 (Thermo Fisher) por 1 hora. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 (5 µg/ml en PBS) y los portaobjetos se montaron en Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich).

### **Ensayos de Inmunohistoquímica**

Las marcaciones inmunohistoquímicas de placentas se realizaron en el laboratorio del Dr. Alexandre Borbely del Instituto de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Federal de Alagoas, con la colaboración de la Lic. Ana Mendes Silva y la Lic. M. Juliana Ramalho. Todas las muestras fueron obtenidas en el Hospital Universitario Profesor Alberto Antunes (HUPAA) con aprobación del Comité de Ética en Pesquisa (investigación) con Seres Humanos de la Universidad federal de Alagoas (UFAL), protocolo (43605515.9.0000.5013) y con el correspondiente consentimiento de los pacientes. Las muestras luego fueron procesadas según el protocolo descrito en Pires y Col 2019 (Pires et al., 2019). La incubación con anticuerpo primario se realizó durante toda la noche a 4 °C utilizando una dilución 1/50 del anticuerpo anti-KLF6 (IgG de conejo, R-173, Santa Cruz).

### *Cuantificación de la intensidad recíproca*

La inmunoreactividad de KLF6 en los cortes histológicos se midió mediante el programa de análisis de imágenes Fiji asistido por computadora. Se seleccionaron como mínimo tres campos al azar de cada muestra y las imágenes se capturaron utilizando un objetivo de 20X ó 40X. Los resultados se registraron como la mediana de la intensidad y la intensidad recíproca se calculó como se describe (Nguyen et al., 2013). El análisis histomorfológico se realizó en experimentos independientes de cinco

placentas normales, cinco placentas cretas, cuatro coriocarcinomas y tres molas invasivas.

### **Zimografía**

La actividad de la metaloproteinasa 9 (MMP9) se evaluó mediante ensayo de zimografía en sobrenadantes de cultivos de células HTR8/SVneo transfectadas con siK o SCR durante 72 horas. Las muestras se sembraron en gel SDS-PAGE copolimerizado con gelatina 1,5 mg/ml como sustrato. Dieciocho horas antes de finalizar el tiempo de transfección se cambió el medio completo por DMEM-F12 sin suero para evitar la interferencia de las metaloproteasas presentes en el suero. Al cumplirse las 72 horas del ensayo se recogió el sobrenadante en un tubo cónico y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos para separar del medio las células muertas e impurezas, transvasando el sobrenadante a otro tubo evitando arrastrar precipitado. Se guardó las muestras a -20 °C hasta su uso.

#### *Preparación de las muestras*

Se tomaron 30 µl de sobrenadante de cultivo y se agregó 3 µl de buffer de muestra 5X (Tris-HCl 0,5 M pH: 6,8, glicerol 20 %, SDS 4 %, 0,02 M azul de bromofenol). Como control positivo se utilizó sangre capilar a la cual se le agregó 10 µl de buffer de muestra 5X por cada 40 µl de sangre, para evitar la coagulación, y en gel se sembraron 8 µl de esta preparación. También como otro control se sembró un marcador de peso molecular.

#### *Corrida del gel y tinción*

Se preparó el gel de SDS y poliacrilamida al 10 % adicionando 1,5 % de gelatina (Sigma G 9382) al gel separador. La corrida se realizó a 100V durante 2 horas en hielo para evitar el aumento de temperatura del buffer de corrida, lo cual podría activar las enzimas. Una vez terminada la corrida se realizó un lavado de 15 minutos con una solución de Tritón (200 ml de H<sub>2</sub>O + 5 ml de Tritón X-100) con agitación. Luego se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con agua destilada y tres lavados de 5 minutos cada uno con el buffer de la enzima (0,05 M Tris; 0,2 M NaCl; 6,8 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; pH: 7,5-7,6). Se incubó el gel con el buffer de la enzima durante 24 – 48 horas sin agitación a 37 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno. Luego se realizó la coloración del gel con azul de Coomassie (0,1 mM azul brillante de Coomassie, 25 % etanol absoluto y 10 % ácido acético) hasta observar que el gel se coloreó completamente y se distinguen las bandas claras indicativo de la actividad enzimática. Finalmente, se lavó con la solución de

decoloración (ácido acético 10 %, 25 % de etanol absoluto) hasta ver las bandas proteicas correspondiente a la actividad proteolítica.

### **Análisis de proliferación celular por incorporación de bromodeoxiuridina**

Células BeWo-KLF6, BeWo-KLF6 $\Delta$ ac y BeWo-VV se cultivaron durante 72 horas sobre portaobjetos, y luego se incubaron con 20  $\mu$ M de bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich) durante 4 horas para evaluar proliferación celular. Pasado este tiempo se lavaron dos veces con PBS frío, se fijaron con PFA al 3 % por 10 minutos y se lavaron tres veces con PBS-T, durante 2 minutos cada vez. Luego, se permeabilizaron con 0,1 % Triton X-100 en PBS por 20 minutos. Se realizaron nuevamente los lavados con PBS-T y se trataron con HCl 2 M a 37 °C por 30 minutos. Pasado ese tiempo se lavaron dos veces con NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0,1 M durante 5 minutos cada vez y tres veces con PBS-T 2 minutos cada vez, se bloquearon con 2 % de albúmina sérica bovina en PBS-T por 30 minutos y se incubaron con una dilución 1/100 de anticuerpo anti-BrdU (IgG de ratón, Sigma Co) en 2 % de albumina sérica bovina en PBS-T durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se lavaron con PBS-T, se incubaron con una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón- Alexa Flúor 594 (rojo) por 1 hora a 37 °C protegido de la luz y los núcleos se tiñeron durante 15 minutos con Hoechst 33258 (5  $\mu$ g/ml en PBS). Se lavaron con PBS-T y los portaobjetos se montaron invertidos sobre una gota de líquido de montaje acuoso Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich). Para cada condición se tomaron al menos 5 imágenes al azar en un microscopio Leica DMI 8. Los resultados se informaron como porcentaje de núcleos positivos para BrdU respecto a la cantidad de núcleos totales.

### **Análisis por citometría de flujo**

#### *Marcación intracelular de BCL6*

Para la determinación de los niveles de expresión de BCL6 por citometría de flujo intracelular, las células se recolectaron y colocaron en pocillos de una multiplaca de 96 pocillos (3-5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo) de base cóncava. Luego se centrifugaron 5 minutos a 2000 rpm, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100  $\mu$ l de solución de fijación Foxp3 (eBioscience) durante 30 minutos a 4 °C. Pasado ese tiempo se lavaron agregando 100  $\mu$ l de solución permeabilizante (Perm, eBioscience) y centrifugando a 2000 rpm por 8 minutos a 10 °C. Se descartó el sobrenadante y se colocaron 25  $\mu$ l de una dilución 1/50 de anticuerpo anti-BCL6 (IgG de ratón, PE-Cy<sup>TM</sup>7, Clon K112-91, BD Bioscience) en Perm, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se lavaron como se indicó anteriormente y el pellet de células se resuspendió en 120  $\mu$ l de solución Perm y se trasvasó a un tubo de vidrio para citometría.

Las células marcadas se analizaron en un citómetro BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences) y el software FlowJo (TreeStar).

#### *Análisis de fusión*

Células BeWo-KLF6 y BeWo-VV luego de 72 horas de diferenciación se tripsinizaron y dicha tripsina se neutralizó con una solución de medio DMEM-F12 suplementado con antibiótico, 10%(v/v) de SFB y 40% de EDTA 12,5 mM. Luego se fijaron con 2% PFA 2% sucrosa durante 15 minutos a temperatura ambiente y pasado ese tiempo se conservaron a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro FACSCanto II (BD Biosciences). El posterior análisis de los datos se realizó con el software FlowJo (TreeStar) y según Vatish *et al.*, 2012. (Vatish *et al.*, 2012).

#### **Espectroscopía Raman y microscopía de fuerza atómica (AFM)**

Estos ensayos se realizaron en el laboratorio del Dr. Alexandre Borbely del Instituto de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Federal de Alagoas, con la colaboración de la Lic. Lays Marqués y personal del Instituto de Física, Universidad Federal de Alagoas.

Células HTR8-KLF6 $\Delta$ ac y HTR8-VV se cultivaron en placa de 12 pocillos (3 x10<sup>5</sup> células/pocillo) durante 24 horas, donde previo a la siembra de las células en cada pocillo se colocó un portaobjetos estéril. Luego se realizaron dos lavados con PBS y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con glutaraldehído al 5 % en PBS. Posteriormente se lavó dos veces con agua miliQ, se retiraron los cubreobjetos y se dejaron secar sobre papel aluminio por 1 hora, y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.

#### *Microscopía de Fuerza Atómica*

Las imágenes de morfología celular se obtuvieron utilizando una configuración estándar de AFM (Multiview 4000 <sup>TM</sup>, Nanonics, Israel), con un microscopio óptico combinado (BXFM, Olympus, Japón). Esta combinación permitió el posicionamiento lateral de la punta sobre la superficie de la célula con precisión de escala micrométrica. Los experimentos de AFM se realizaron utilizando una punta de escaneo con un radio de curvatura típico <20 nm, una micropalanca (cantiléver) de 320  $\mu$ m de largo, una constante de resorte de <1 N/m y una frecuencia nominal de 35 kHz. La constante de resorte de la micropalanca se calibró ajustando el espectro de potencia a un oscilador armónico simple y la fuerza de indentación máxima para la micropalanca se fijó en 40 nN. La topografía de la célula se grabó en modo tapping y las imágenes de AFM se procesaron con el software gratuito WSxM para la vista 3D.

### *Espectroscopía Raman*

Los espectros Raman se obtuvieron utilizando un espectrómetro Horiba XploRA acoplado a un microscopio Olympus y equipado con un láser de 532 nm que se centró en el núcleo de las células a través de un objetivo de inmersión en aceite 60 X (NA = 1,4). Se usó la misma lente objetivo para recoger la luz dispersa Raman después de la interacción con la muestra, en una geometría de retrodispersión. La calibración de frecuencia se estableció por referencia a la banda vibratoria de  $520\text{ cm}^{-1}$  de una lámina de silicio. En las mismas condiciones, se midieron 60 espectros de células para cada grupo de células en el rango espectral de 700 a  $1800\text{ cm}^{-1}$ . Para minimizar el calentamiento de las muestras inducido por láser, se usó una irradiación de menor potencia en la superficie de la muestra, alrededor de 5 mW, durante un tiempo de exposición corto (exposición con láser de 1 s para 60 acumulaciones). Se utilizó una rejilla de difracción de 1200 líneas por milímetro que produce una resolución espectral del sistema de  $1,5\text{ cm}^{-1}$ .

### **Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Para el análisis entre dos grupos de datos se utilizó el test “t” de dos colas en caso de varianzas similares o el test Mann Whitney en caso de diferentes varianzas. Para analizar los datos relativizados al control se utilizó el test “t” de una muestra (one sample t-test) para determinar si los valores eran significativamente diferentes al valor del control establecido como 1. En el análisis de más de dos grupos de datos se utilizó un test paramétrico ANOVA seguido del test de Tukey. En general se hicieron un mínimo de tres experimentos independientes. El número específico de la cantidad de datos utilizados para la estadística se especifica en la leyenda de cada figura. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .



## *BIBLIOGRAFÍA*

## BIBLIOGRAFÍA

- Adelman, E. R., Huang, H.-T., Roisman, A., Olsson, A., Colaprico, A., Qin, T., Lindsley, R. C., Bejar, R., Salomonis, N., Grimes, H. L., & Figueroa, M. E. (2019). Aging Human Hematopoietic Stem Cells Manifest Profound Epigenetic Reprogramming of Enhancers That May Predispose to Leukemia. *Cancer Discov*, *9*(8), 1080–1101.
- Aguilar, P. S., Baylies, M. K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H., & Wong, M. (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends Genet.*, *29*(7), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.01.011>. Genetic
- Ahronian, L. ., Zhu, L. J., Chen, Y.-W., Chu, H.-C., Klimstra, D. S., & Lewis, B. C. (2017). A novel KLF6-Rho GTPase axis regulates hepatocellular carcinoma cell migration and dissemination. *Oncogene*, *35*(35), 4653–4662. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.2.A>
- Andreoli, V., Gehrau, R. C., & Bocco, J. L. (2010). Biology of Kru"ppel-Like Factor 6 Transcriptional Regulator in Cell Life and Death. *IUBMB Life*, *62*(December), 896–905. <https://doi.org/10.1002/iub.396>
- 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 and Differentiation*, *16*, 719–727. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.1>
- Baines, K. J., & Renaud, S. J. (2017). Transcription Factors That Regulate Trophoblast Development and Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *145*, 39–88. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.003>
- Barker, D. J. P., & Thornburg, K. L. (2013). Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review. *Placenta*, *34*(10), 841–845.
- Barros, P., Jordan, P., & Matos, P. (2009). Rac1 Signaling Modulates BCL-6-Mediated Repression of Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(15), 4156–4166. <https://doi.org/10.1128/mcb.01813-08>
- Bastida-Ruiz, D., Van Hoesen, K., & Cohen, M. (2016). The dark side of cell fusion. *Int J Mol Sci*, *17*(5). <https://doi.org/10.3390/ijms17050638>
- Bastida-Ruiz, D., Wuillemin, C., Pederencino, A., Yaron, M., Martinez de Tejada, B., Pizzo, S. V., & Cohen, M. (2020). Activated  $\alpha$ 2-macroglobulin binding to cell surface GRP78 induces trophoblastic cell fusion. *Scientific Reports*, *10*(1), 9666. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66554-0>
- Bastida-Ruiz, D., Yart, L., Wuillemin, C., Ribaux, P., Morris, N., Epiney, M., Martinez de Tejada, B., & Cohen, M. (2019). The fine-tuning of endoplasmic reticulum stress response and autophagy activation during trophoblast syncytialization. *Cell Death and Disease*, *10*(9). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1905-6>
- Bates, D. ., Morris, J. ., Oltean, S., & Donaldson, L. (2016). Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing. *Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing*, *69*, 63–79.
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzini, M., Focaccia, E., Blalock, W., & Faenza, I. (2017). Mirna-210: A current overview. *Anticancer Research*, *37*(12), 6511–6521.

<https://doi.org/10.21873/anticanres.12107>

- Behrens, J., Kameritsch, P., Wallner, S., Pohl, U., & Pogoda, K. (2010). The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner. *European Journal of Cell Biology*, *89*(11), 828–838.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.003>
- Benirschke, K., Kaufmann, P., & Baergen, R. (2006). *Pathology of the Human Placenta*.
- Berquand, A., Meunier, M., Thevenard-Devy, J., Ivaldi, C., Campion, O., Dedieu, S., Molinari, M., & Devy, J. (2019). A gentle approach to investigate the influence of LRP-1 silencing on the migratory behavior of breast cancer cells by atomic force microscopy and dynamic cell studies. *Nanomedicine*, *18*, 359-370.
- Blaue, C., Kashef, J., & Franz, C. M. (2018). Cadherin-11 promotes neural crest cell spreading by reducing intracellular tension-Mapping adhesion and mechanics in neural crest explants by atomic force microscopy. *Semin Cell Dev Biol*, *73*, 97–106.
- Boesch, M., Sopper, S., Marth, C., Wiedemair, A., Rössler, J., Hatina, J., Wolf, D., Reimer, D., & Zeimet, A. G. (2018). Evaluation of Vav3.1 as prognostic marker in endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.*, *144*(10), 2067–2076.
- Bos, R., Van Diest, P. J., Van Der Groep, P., Greijer, A. E., Hermsen, M. A. J. A., Heijnen, I., Meijer, G. A., Baak, J. P. A., Pinedo, H. M., Van Der Wall, E., & Shvarts, A. (2003). Protein expression of B-cell lymphoma gene 6 (BCL-6) in invasive breast cancer is associated with cyclin D1 and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). *Oncogene*, *22*(55), 8948–8951.  
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206995>
- Bose, P., Kadyrov, M., Goldin, R., Hahn, S., Backos, M., Regan, L., & Huppertz, B. (2006). Aberrations of early trophoblast differentiation predispose to pregnancy failure: lessons from the anti-phospholipid syndrome. *Placenta*, *27*(8), 869–875.
- Botelho, R. M., Tenorio, L. P. G., Silva, A. L. M., Tanabe, E. L. L., Pires, K. S. N., Gonçalves, C. M., Santos, J. C., Marques, A. L. X., Allard, M. J., Bergeron, J. D., Sebire, G., Silva, E. C. O., Souza, S. T., Fonseca, E. J. S., Borbely, A. U., & Borbely, K. S. C. (2019). Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1863*(9), 1417–1428.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.012>
- Botella, L. M., Sánchez-Elsner, T., Sanz-Rodríguez, F., Kojima, S., Shimada, J., Guerrero-Esteo, M., Cooreman, M. P., Ratziu, V., Langa, C., Vary, C. P. H., Ramirez, J. R., Friedman, S., & Bernabéu, 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*(12), 4001–4010.
- Brauchle, E., & Schenke-Layland, K. (2013). Raman spectroscopy in biomedicine – non-invasive in vitro analysis of cells and extracellular matrix components in tissues. *Biotechnol. J.*, *8*, 288–297. <https://doi.org/10.1002/biot.201200163>

- Bronchud, M. H., Tresserra, F., Xu, W., Warren, S., Zantop, B., Zenclussen, A. C., & Cesano, A. (2016). *Placental immune editing switch (PIES): learning about immunomodulatory pathways from a unique case report*. 7(50), 83817–83827.
- Bronson, S. L., & Bale, T. L. (2015). The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 207–218. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.231>
- Brukman, N. G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1436–1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>
- Burton, G. J., Fowden, A. L., & Thornburg, K. L. (2016). Placental origins of chronic disease. *Physiol Rev*, 96(4), 1509–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2015>
- Burton, G. J., Jauniaux, E., & Murray, A. J. (2017). Oxygen and placental development; parallels and differences with tumour biology. *Placenta*, 56, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.130>
- Camolotto, S. A., Racca, A. C., Ridano, M. E., Genti-raimondi, S., & Panzetta, G. M. (2013). PSG Gene Expression Is Up-Regulated by Lysine Acetylation Involving Histone and Nonhistone Proteins. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055992>
- Caputto, B., Cardozo Gizzi, A., & Gil, G. (2014). c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. *Biochim Biophys Acta*, 1841(9), 1241–1246.
- Chen, C., Huang, P., Chu, P., Chen, M., Chou, C., Wang, D., Kulp, S., Teng, C., Wang, Q., & Chen, C. (2011). Energy restriction-mimetic agents induce apoptosis in prostate cancer cells in part through epigenetic activation of KLF6 tumor suppressor gene expression. *J Biol Chem*, 286, 9968–9976.
- Chen, D., & Zheng, J. (2014). Regulation of Placental Angiogenesis. *Microcirculation*, 21(1), 15–25.
- Chen, P., Yen, J., Kao, R., & Chen, J. (2013). Down-regulation of the oncogene PTTG1 via the KLF6 tumor suppressor during induction of myeloid differentiation. *PLoS ONE*, 8:e71282, e71282.
- Chen, S., Zhang, Y., Ye, X., Hu, K., Zhu, M., Huang, Y., Zhong, M., & Huang, Z. (2014). Study of the molecular variation in pre - eclampsia placenta based on micro - Raman spectroscopy. *Arch Gynecol Obstet*, 290, 943–946. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3282-9>
- Chen, Y., Wang, K., & Leach, R. (2013). 5-aza-dC treatment induces mesenchymal-to-epithelial transition in 1st trimester trophoblast cell line HTR8/SVneo. *Biochem Biophys Res Commun*, 432(1), 116–122. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Cheng, J.-C., Chang, H.-M., Fang, L., Sun, Y.-P., & Leung, P. C. K. (2015). TGF- $\beta$ 1 up-regulates connexin43 expression: a potential mechanism for human trophoblast cell differentiation. *J Cell Physiol*, 230(7), 1558–1566.
- Chernoivanenko, I. S., Minin, A. A., & Minin, A. A. (2013). Role of vimentin in cell migration. *Russian Journal of Developmental Biology*, 44(3), 144–157.

<https://doi.org/10.1134/S1062360413030016>

- Chiang, M.-H., Liang, F.-Y., Chen, C.-P., Chang, C.-W., Cheong, M.-L., Wang, L.-J., Liang, C.-Y., Lin, F.-Y., Chou, C.-C., & Chen, H. (2009). Mechanism of hypoxia-induced GCM1 degradation: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J Biol Chem*, *284*(26), 17411–174119.
- Chiapella, G., Flores-Martin, J., Ridano, M., Reyna, L., Magnarelli de Potas, G., Panzetta-Dutari, G., & Genti-Raimondi, S. (2013). The organophosphate chlorpyrifos disturbs redox balance and triggers antioxidant defense mechanisms in JEG-3 cells. *Placenta*, *34*, 792–798.
- Costa, M. A. (2016). Scrutinising the regulators of syncytialization and their expression in pregnancy-related conditions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *420*, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.010>
- Costanzo, V., Bardelli, A., Siena, S., & Abrignani, S. (2018). Exploring the links between cancer and placenta development. *Open Biology*, *8*(6). <https://doi.org/10.1098/rsob.180081>
- D'Astolfo, D. S., Gehrau, R. C., Bocco, J. L., & Koritschoner, N. P. (2008). Silencing of the transcription factor KLF6 by siRNA leads to cell cycle arrest and sensitizes cells to apoptosis induced by DNA damage. *Cell Death Differ*, *15*(3), 613–618. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402299>
- Damsky, C. H., Fitzgerald, M. L., & Fisher, S. J. (1992). Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest*, *89*(1), 210–222.
- Das, A., Fernandez-Zapico, M. E., Cao, S., Yao, J., Fiorucci, S., Hebbel, R. P., Urrutia, R., & Shah, V. H. (2006). Disruption of an SP2/KLF6 repression complex by SHP is required for farnesoid X receptor-induced endothelial cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(51), 39105–39113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607720200>
- DaSilva-Arnold, S. C., Kuo, C. Y., Davra, V., Remache, Y., Kim, P. C. W., Fisher, J. P., Zamudio, S., Al-Khan, A., Birge, R. B., & Illsley, N. P. (2019). ZEB2, a master regulator of the epithelial-mesenchymal transition, mediates trophoblast differentiation. *Mol Hum Repr*, *25*(2), 61–75. <https://doi.org/10.1093/molehr/gay053>
- Dasilva-arnold, S., James, J. L., Al-khan, A., Zamudio, S., & Illsley, N. P. (2015). Differentiation of first trimester cytotrophoblast to extravillous trophoblast involves an epithelial to mesenchymal transition. *Placenta*, *36*(12), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.10.013>
- DaSilva-Arnold, S., Zamudio, S., Al-Khan, A., Alvarez-Perez, J., Mannion, C., Koenig, C., Luke, D., Perez, A., Petroff, M., Alvarez, M., & Illsley, N. P. (2018). Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta. *Biology of Reproduction*, *99*(2), 409–421. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y042>
- Davies, J. E., Pollheimer, J., Yong, H. E. J., Kokkinos, M. I., Kalionis, B., Knöfler, M., & Murthi, P. (2016). Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation.

- Cell Adh Migr*, 10(3), 310–321. <https://doi.org/10.1080/19336918.2016.1170258>
- DiFeo, A., Narla, G., Camacho-Vanegas, O., Nishio, H., Rose, S. L., Buller, R. E., Friedman, S. L., Walsh, M. J., & Martignetti, J. A. (2006). E-cadherin is a novel transcriptional target of the KLF6 tumor suppressor. *Oncogene*, 25(44), 6026–6031. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209611>
- DiFeo, Analisa, Martignetti, J. A., & Narla, G. (2009). The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy. *Drug Resist Updat*, 12(1–2), 1–7.
- Dinarelli, S., Girasole, M., & Longo, G. (2018). FC\_analysis: A tool for investigating atomic force microscopy maps of force curves. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2265-4>
- Dionyssiou, M. G., Salma, J., Bevzyuk, M., Wales, S., Zakharyan, L., & McDermott, J. C. (2013). Krüppel-like factor 6 (KLF6) promotes cell proliferation in skeletal myoblasts in response to TGF $\beta$ /Smad3 signaling. *Skelet Muscle*, 3(1).
- Dokras, A., Coffin, J., Field, L., Frakes, A., Lee, H., Madan, A., Nelson, T., Ryu, G., Yoon, J., & Madan, A. (2006). Epigenetic regulation of maspin expression in the human placenta. *Mol Hum Repr*, 12(10), 611–617. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal074>
- Dong, Y., Wu, Z., He, M., Chen, Y., Chen, Y., Shen, X., Zhao, X., Zhang, L., Yuan, B., & Zeng, Z. (2019). ADAM9 mediates the interleukin-6-induced Epithelial-Mesenchymal transition and metastasis through ROS production in hepatoma cells. *Cancer Lett*, 1(421), 1–14.
- Dumayne, C., Tarussio, D., Sanchez-Archidona, A. R., Picard, A., Basco, D., Berney, X., Ibberson, M., & Thorens, B. (2020). Klf6 protects  $\beta$ -cells against insulin resistance-induced dedifferentiation. *Mol. Metab*, 35(100958).
- Dunk, C. E., Gellhaus, A., Drewlo, S., Baczyk, D., Pötgens, A. J. G., Winterhager, E., Kingdom, J. C. P., & Lye, S. J. (2012). The Molecular Role of Connexin 43 in Human Trophoblast Cell Fusion1. *Biology of Reproduction*, 86(4), 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096925>
- El-hagrasy, M. A., Shimizu, E., & Saito, M. (2012). Discrimination of primitive endoderm in embryoid bodies by Raman microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 1073–1081. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5554-6>
- Evseenko, D A, Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2007). The Xenobiotic Transporter ABCG2 Plays a Novel Role in Differentiation of Trophoblast-like BeWo Cells. *Placenta*, 21(28), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.12.003>
- Evseenko, Denis A, Paxton, J. W., & Keelan, J. A. (2006). ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(5), 1357–1365. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00630.2005>
- Fahlbusch, F. B., Ruebner, M., Huebner, H., Volkert, G., Zuern, C., Thiel, F., Koch, M., Menendez-castro, C., Wachter, D. L., Hartner, A., & Rascher, W. (2013). The tumor suppressor gastrokine-1 is expressed in placenta and contributes to the regulation of trophoblast migration. *Placenta*, 34(11), 1027–1035.

- <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.08.005>
- Fan, M., Xu, Y., Hong, F., Gao, X., Xin, G., Hong, H., Dong, L., & Zhao, X. (2016). Rac1/ $\beta$ -catenin signalling pathway contributes to trophoblast cell invasion by targeting snail and MMP9. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38(4), 1319–1332.  
<https://doi.org/10.1159/000443076>
- Ferretti, C., Bruni, L., Dangles-Marie, V., Pecking, A. P., & Bellet, D. (2007). Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. *Human Reproduction Update*, 13(2), 121–141.  
<https://doi.org/10.1093/humupd/dml048>
- Fischer, I., Redel, S., Hofmann, S., Kuhn, C., Friese, K., Walzel, H., & Jeschke, U. (2010). Stimulation of Syncytium Formation in vitro in Human Trophoblast Cells by Galectin-1. *Placenta*, 31, 825–832. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.06.016>
- Fournier, T. (2016). Human chorionic gonadotropin: Different glycoforms and biological activity depending on its source of production. *Annales d'Endocrinologie*, 77(2), 75–81.  
<https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.012>
- Fradet, S., Pierredon, S., Ribaux, P., Epiney, M., Ya, K., Irion, O., & Cohen, M. (2012). Involvement of membrane grp78 in trophoblastic cell fusion. *PLoS ONE*, 7(8), 1–7.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040596>
- Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C. J., Chang, S., Chatterjee, B., & Lo, C. (2011). Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026379>
- Frendo, J., Cronier, L., Bertin, G., Guibourdenche, J., & Vidaud, M. (2003). Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci*, 116, 3413–3421. <https://doi.org/10.1242/jcs.00648>
- Gallardo-Vara, E., Blanco, F. J., Roqué, M., Friedman, S. L., Suzuki, T., Botella, L. M., & Bernabeu, C. (2016). Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis*, 19(2), 155–171. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9495-8>
- Gao, Y., Li, H., Ma, X., Fan, Y., Ni, D., Zhang, Y., Huang, Q., Liu, K., Li, X., Wang, L., Gu, L., Yao, Y., Ai, Q., Du, Q., Song, E., & Zhang, X. (2017). KLF6 Suppresses Metastasis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma via Transcriptional Repression of E2F1. *Cancer Res*, 77(2), 330–342.
- Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., & Huppertz, B. (2009). Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta*, 30, 49–54.
- Gehrau, R., D'Astolfo, D., Dumur, C., Bocco, J., & Koritschoner, N. (2010). Nuclear expression of KLF6 tumor suppressor factor is highly associated with overexpression of ERBB2 oncoprotein in ductal breast carcinomas. *PLoS ONE*, 5(e8929).
- Genbacev, O., McMaster, M. T., & Fisher, S. J. (2000). A Repertoire of Cell Cycle Regulators Whose Expression Is Coordinated with Human Cytotrophoblast Differentiation. *Am J Pathol.*, 157(4), 1337–1351. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64648-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64648-2)

- Gerbaud, A., & Pidoux, A. (2015). Review: An overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion. *Placenta*, *36*(S1), S35–S42.  
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.12.015>
- Germain, D., & Frank, D. A. (2007). Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, *13*(19), 5665–5669. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2491>
- Ghita, A., Pascut, F. C., Mather, M., Sottile, V., & Notingher, I. (2012). Cytoplasmic RNA in undifferentiated neural stem cells: a potential label-free Raman spectral marker for assessing the undifferentiated status. *Anal Chem*, *84*(7), 3155–3162.
- Ginsberg, M. H. (2014). Integrin activation. *BMB Rep*, *47*(12), 655–659.
- Graham, C H, Hawley, T. S., Hawley, R. G., MacDougall, J. R., Kerbel, R. S., Khoo, N., & Lala, P. K. (1993). Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res*, *206*(2), 204–211.
- Graham, Charles H., & McCrae, K. R. (1996). Altered expression of gelatinase and surface-associated plasminogen activator activity by trophoblast cells isolated from placentas of preeclamptic patients. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *175*(3 PART I), 555–562. <https://doi.org/10.1053/ob.1996.v175.a74404>
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, *458*(7242), 1127–1130. <https://doi.org/10.1038/nature07986>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guibourdenche, J., Fournier, T., Malassiné, A., & Evain-brion, D. (2009). Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochem Cytobiol*, *47*(5), 35–40.
- Gupta, S. K., Malhotra, S. S., Malik, A., Verma, S., & Chaudhary, P. (2016). Cell Signaling Pathways Involved During Invasion and Syncytialization of Trophoblast Cells. *Am J Repr Immun*, *75*(3), 361–371. <https://doi.org/10.1111/aji.12436>
- Haidacher, S., Blaschitz, A., Dohr, G., & Desoye, G. (1995). Immunohistochemical evidence of p53 protein in human placenta and choriocarcinoma cell lines. *Mol Hum Repr*, *1*(2), 63–68. <https://doi.org/10.1093/molehr/1.2.63>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MicroRNAs: Crucial regulators of placental development. *Reproduction*, *155*(6). <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>
- He, X., & Chen, Q. (2016). Reduced expressions of connexin 43 and VEGF in the first-trimester tissues from women with recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0179-4>
- Holtan, S. G., Creedon, D. J., Haluska, P., & Markovic, S. N. (2009). Cancer and pregnancy: Parallels in growth, invasion, and immune modulation and implications for cancer therapeutic agents. *Mayo Clinic Proceedings*, *84*(11), 985–1000. <https://doi.org/10.4065/84.11.985>

- Hsu, L.-S., Huang, R.-H., Lai, H.-W., Hsu, H.-T., Sung, W.-W., Hsieh, M.-J., Wu, C.-Y., Lin, Y.-M., Chen, M.-K., Lo, Y.-S., & Chen, C.-J. (2017). KLF6 inhibited oral cancer migration and invasion via downregulation of mesenchymal markers and inhibition of MMP-9 activities. *Int J Med Sci*, *14*(6), 530–535.
- Hu, X., Zhai, Y., Shi, R., Qian, Y., Cui, H., Yang, J., Bi, Y., Yan, T., Yang, J., Ma, Y., Zhang, L., Liu, Y., Li, G., Zhang, M., Cui, Y., Kong, P., & Cheng, X. (2018). FAT1 inhibits cell migration and invasion by affecting cellular mechanical properties in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, *39*(5), 2136–2146.
- Hui, P. (2019). Gestational Trophoblastic Tumors. *Arch Pathol Lab Med*, *143*(1), 65–74.  
<https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0234-RA>
- Huppertz, B. (2008). The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol*, *61*(12), 1296–1302.
- Huppertz, B. (2018). The Critical Role of Abnormal Trophoblast Development in the Etiology of Preeclampsia. *Curr Pharm Biotechnol*, 771–780.  
<https://doi.org/10.2174/1389201019666180427110547>
- Hurd, T., DeGennaro, M., & Lehmann, R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol*, *22*(2), 107–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.11.002.Redox>
- Hutter, S., Morales-Prieto, D. M., Andergassen, U., Tschakert, L., Kuhn, C., Hofmann, S., Markert, U. R., & Jeschke, U. (2016). Gal-1 silenced trophoblast tumor cells (BeWo) show decreased syncytium formation and different miRNA production compared to non-target silenced BeWo cells. *Cell Adhesion and Migration*, *10*(1–2), 28–38.  
<https://doi.org/10.1080/19336918.2015.1089377>
- Jauniaux, E., & Jurkovic, D. (2012). Placenta accreta : Pathogenesis of a 20th century iatrogenic uterine disease. *Placenta*, *33*(4), 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.010>
- Jauniaux, Eric, Collins, S., & Burton, G. J. (2017). Placenta accreta spectrum : pathophysiology and evidence-based anatomy for prenatal ultrasound imaging. *Am J Obstet Gynecol*, *June*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.067>
- Ji, L., Brkic, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., & Wang, Y. (2013). Placental trophoblast cell differentiation : Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med*, *34*, 981–1023. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.008>
- Jianwei, Z., Enzhong, B., Fan, L., Jian, L., & Ning, A. (2013). Effects of Kruppel-like factor 6 on osteosarcoma cell biological behavior. *Tumour Biol*, *34*(2), 1097–1105.
- Jin, J., Wang, T., Wang, Y., Chen, S., Li, Z., Li, X., Zhang, J., & Wang, J. (2017). SRC3 expressed in BMSCs promotes growth and migration of multiple myeloma cells by regulating the expression of Cx43. *Inter J Oncol*, *51*, 1694–1704.  
<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4171>
- Kameritsch, P., Kiemer, F., Beck, H., Pohl, U., & Pogoda, K. (2015). Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(11), 2907–2917.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.004>

- Kang, T., Xing, W., Xi, Y., Chen, K., Zhan, M., Xiaoyin, T., Yueying, W., & Zhang, R. (2020). MiR-543 regulates myoblast proliferation and differentiation of C2C12 cells by targeting KLF6. *J Cell Biochem*, 29710.
- Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular Trophoblast Invasion : Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biol Reprod*, 7(December), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>
- Kim, G., Ng, H. P., Chan, E. R. ., & Mahabeleshwar, G. H. (2020). Kruppel-like factor 6 promotes macrophage inflammatory and hypoxia response. *FASEB J*, 34, 3209–3223.
- Kim, Gun-dong, Das, R., Goduni, L., Mcclellan, S., Hazlett, L. D., & Mahabeleshwar, G. H. (2016). Kruppel-like Factor 6 Promotes Macrophage-mediated Inflammation by Suppressing B Cell Leukemia / Lymphoma 6. *J Biol Chem Chem*, 291(40), 21271–21282. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.738617>
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., & Strauss, J. F. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118(4), 1567–1582.
- Knöfler, M., Haider, S., Saleh, L., Pollheimer, J., Gamage, T. K. J. B., & James, J. (2019). Human placenta and trophoblast development : key molecular mechanisms and model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(18), 3479–3496. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03104-6>
- Knöfler, M., & Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation : a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet*, 4(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00190>
- Kong, L., Yao, L., Lu, N., Dong, Y., Zhang, J., & Wang, Y. (2016). Interaction of KLF6 and Sp1 regulates basigin-2 expression mediated proliferation , invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(19).
- Korgun, E., Celik-Ozenci, C., Acar, N., Cayli, S., Desoye, G., & Demir, R. (2006). Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol*, 125(6), 615–624. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0160-y>.
- Koritschoner, N. P., Bocco, J. L., Panzetta-Dutari, G. M., Dumur, C. I., Flury, A., & Patrio, L. C. (1997). A novel human zinc finger protein that interacts with the core promoter element of a TATA box-less gene. *J Biol Chem*, 272(14), 9573–9580.
- Korkmaz, C., Sakinci, M., Akyol, S. N., Korgun, E. T., & Ozoğul, C. (2013). Location of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in human first trimester and term placenta. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 35(6), 335–343.
- Kreis, N., Friemel, A., Ritter, A., Roth, S., Rolle, U., Louwen, F., & Yuan, J. (2019). Function of p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Migration and Invasion of Cancer and Trophoblastic Cells. *Cancer*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/cancers11070989>
- Kremer-tal, S., Narla, G., Chen, Y., Hod, E., Difeo, A., Lee, J., Schwartz, M., Thung, S. N., Fiel, I. M., Zimran, E., Thorgeirsson, S. S., Mazzaferro, V., & Bruix, J. (2007). Downregulation

- of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. *J Hepatol*, 46(4), 645–654.
- Kulkarni, A. H., Chatterjee, A., Kondaiah, P., & Gundiah, N. (2018). TGF- $\beta$  induces changes in breast cancer cell deformability. *Phys Biol*, 14(15).
- Laitman, B. M., Asp, L., Mariani, J. N., Zhang, J., Liu, J., Sawai, S., Chapouly, C., Horng, S., Kramer, E. G., Mitiku, N., Loo, H., Burlant, N., Pedre, X., Hara, Y., Nudelman, G., Zaslavsky, E., Lee, Y. M., Braun, D. A., Lu, Q. R., ... John, G. R. (2016). The Transcriptional Activator Krüppel-like Factor-6 Is Required for CNS Myelination. *PLoS Biology*, 14(5), 1–31. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002467>
- Leaños-Miranda, A., Navarro-Romero, C. S., Sillas-Pardo, L. J., Ramírez-Valenzuela, K. L., Isordia-Salas, I., & Jiménez-Trejo, L. M. (2019). Soluble Endoglin As a Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Outcomes. *Hypertension*, 74(4), 991–997.
- Lee, M.-Y., Chou, C.-Y., Tang, M.-J., & Shen, M.-R. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation. *Clin Cancer Res*, 14(15), 4743–4750.
- Li, D., Yea, S., Dolios, G., Martignetti, J. A., Narla, G., Wang, R., Walsh, M. J., & Friedman, S. L. (2005a). Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation. *Cancer Res*, 65(20), 9216–9925.
- Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J. M., Friedman, S. L., & Walsh, M. J. (2005b). Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem*, 280(29), 26941–26952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500463200>
- Li, P., Liu, H., Li, Y., Wang, Y., Zhao, L., & Wang, H. (2018). MiR-339-5p inhibits lung adenocarcinoma invasion and migration by directly targeting BCL6. *Oncology Letters*, 16(5), 5785–5790. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9376>
- Liang, W. C., Wang, Y., Xiao, L. J., Wang, Y. B., Fu, W. M., Wang, W. M., Jiang, H. Q., Qi, W., Wan, D. C. C., Zhang, J. F., & Wayne, M. M. Y. (2014). Identification of miRNAs that specifically target tumor suppressive KLF6-FL rather than oncogenic KLF6-SV1 isoform. *RNA Biology*, 11(7), 845–854. <https://doi.org/10.4161/rna.29356>
- Librach, C. L., Werb, Z., Fitzgerald, M. L., Chiu, K., Corwin, N. M., Esteves, R. A., Grobelyny, D., Galardy, R., Damsky, C. H., & Fisher, S. J. (1991). 92-kD type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. *Journal of Cell Biology*, 113(2), 437–449. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.2.437>
- Limia, C. M., Sauzay, C., Urra, H., Hetz, C., Chevet, E., & Avril, T. (2019). Emerging roles of the endoplasmic reticulum associated unfolded protein response in cancer cell migration and invasion. *Cancers*, 11(5), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers11050631>
- Lin, K. T., Gong, J., Li, C. F., Jang, T. H., Chen, W. L., Chen, H. J., & Wang, L. H. (2012). Vav3-Rac1 signaling regulates prostate cancer metastasis with elevated Vav3 expression correlating with prostate cancer progression and posttreatment recurrence. *Cancer*

- Research*, 72(12), 3000–3009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2502>
- Lin, L., Xu, B., & Rote, N. S. (2000). The cellular mechanism by which the human endogenous retrovirus ERV-3 env gene affects proliferation and differentiation in a human placental trophoblast model, BeWo. *Placenta*, 21(1), 73–78.
- Liu, J., Du, T., Yuan, Y., He, Y., Tan, Z., & Liu, Z. (2010). KLF6 inhibits estrogen receptor-mediated cell growth in breast cancer via a c-Src-mediated pathway. *Mol Cell Biochem*, 335(1–2), 29–35.
- Lu, Q., Wang, W.-W., Zhang, M.-Z., Ma, Z.-X., Qiu, X.-R., Shen, M., & Yin, X.-X. (2019). ROS induces epithelial-mesenchymal transition via the TGF- $\beta$ 1/PI3K/Akt/mTOR pathway in diabetic nephropathy. *Exp Ther Med*, 17(1), 835–846.
- Lu, X., Wang, R., Zhu, C., Wang, H., Lin, H., Gu, Y., Cross, J., & Wang, H. (2017). Fine-Tuned and Cell-Cycle-Restricted Expression of Fusogenic Protein Syncytin-2 Maintains Functional Placental Syncytia. *Cell Rep*, 21(5), 1150–1159. <https://doi.org/doi:10.1016/j.celrep.2017.10.019>
- Luo, R., Shao, X., Xu, P., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, Y., Liu, M., Ji, L., Li, Y. X., Chang, C., Qiao, J., Peng, C., & Wang, Y. L. (2014). MicroRNA-210 contributes to preeclampsia by downregulating potassium channel modulatory factor 1. *Hypertension*, 64(4), 839–845. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03530>
- Maldonado-Estrada, J., Menu, E., Roquesd, P., Barre´-Sinoussic, F., & Chaouat, G. (2004). Evaluation of Cytokeratin 7 as an accurate intracellular marker with which to assess the purity of human placental villous trophoblast cells by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 286(1–2), 21–34.
- Malhotra, S. S., Suman, P., & Gupta, S. K. (2015). Alpha or beta human chorionic gonadotropin knockdown decrease BeWo cell fusion by down-regulating PKA and CREB activation. *Nature Publishing Group, November 2014*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep11210>
- Maltepe, E., & Fisher, S. J. (2015). Placenta : The Forgotten Organ. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 31, 523–52. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125620>
- Masilamani, A. P., Ferrarese, R., Kling, E., Thudi, N. K., Kim, H., Scholtens, D. M., Dai, F., Hadler, M., Unterkircher, T., Platania, L., Weyerbrock, A., Prinz, M., Gillespie, G. Y., IV, G. R. H., Bredel, M., & Carro, M. S. (2017). KLF6 depletion promotes NF- $\kappa$ B signaling in glioblastoma. *Oncogene*, 36(25), 3562–3575.
- Matsumoto, N., Kubo, A., Liu, H., Akita, K., Laub, F., Ramirez, F., Keller, G., & Friedman, S. L. (2006). Developmental regulation of yolk sac hematopoiesis by Krüppel-like factor 6. *Blood*, 107(4), 1357–1365. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1916>
- McConnell, B. B., & Yang, V. W. (2010). Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev*, 90(4), 1337–1381.
- McMillan, E. M., & Quadrilatero, J. (2014). Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation. *Biochem J*, 462(2), 267–277. <https://doi.org/10.1042/BJ20140312>
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Grube, M., Dreisbach, A., Jedlitschky, G., Meissner, K.,

- Linnemann, K., Fusch, C., Ritter, C. A., Völker, U., & Kroemer, H. K. (2006). Epidermal growth factor-mediated activation of the MAP kinase cascade results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). *Drug Metabolism and Disposition*, *34*(4), 524–533. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.007591>
- Mi, S., Lee, X., Li, X., M, V. G., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith Jr, J. C., & McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, *403*(6771), 785–789.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., & Ford, H. L. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer : Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 117–134. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9178-9>
- Motrich, R. D., Castro, G. M., & Caputto, B. L. (2013). Old players with a newly defined function: Fra-1 and c-Fos support growth of human malignant breast tumors by activating membrane biogenesis at the cytoplasm. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053211>
- Muschol-Steinmetz, C., Jasmer, B., Kreis, N. N., Steinhäuser, K., Ritter, A., Rolle, U., Yuan, J., & Louwen, F. (2016). B-cell lymphoma 6 promotes proliferation and survival of trophoblastic cells. *Cell Cycle*, *15*(6), 827–839. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1149273>
- Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*, *1*(572), 25–30.
- Narla, G., DiFeo, A., Reeves, H. L., Schaid, D. J., Hirshfeld, J., Hod, E., Katz, A., Isaacs, W. B., Hebring, S., Komiya, A., McDonnell, S. K., Wiley, K. E., Jacobsen, S. J., Isaacs, S. D., Walsh, P. C., Zheng, S. L., Chang, B. L., Friedrichsen, D. M., Stanford, J. L., ... Martignetti, J. A. (2005). A germline DNA polymorphism enhances alternative splicing of the KLF6 tumor suppressor gene and is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Research*, *65*(4), 1213–1222. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4249>
- Narla, G., Heath, K. E., Reeves, H. L., Li, D., Giono, L., Kimmelman, A. C., Glucksman, M. J., Narla, J., Eng, F. J., Chan, A. M., Ferrari, A. C., Martignetti, J. A., & Friedman, S. L. (2001). KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*, *294*(5551), 2563-2566.
- Narla, G., Kremer-Tal, S., Matsumoto, N., Zhao, X., Yao, S., Kelley, K., Tarocchi, M., & Friedman, S. L. (2007). In vivo regulation of p21 by the Kruppel-like factor 6 tumor-suppressor gene in mouse liver and human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *26*(30), 4428–4434.
- Ng, T. L., Leprivier, G., Robertson, M. D., Chow, C., Martin, M. J., Laderoute, K. R., Davicioni, E., Triche, T. J., & Sorensen, P. H. B. (2012). The AMPK stress response pathway mediates anoikis resistance through inhibition of mTOR and suppression of protein synthesis. *Cell Death Differ*, *19*(3), 501–510.
- Nguyen, D., Zhou, T., Shu, J., & Mao, J. (2013). Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Cancer InCytes*, *2*(1).
- Ning, F., Hou, H., Morse, A. N., & Lash, G. E. (2019). Understanding and management of

- gestational trophoblastic disease [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14953.1>
- Nottingham, I. (2007). Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. *Sensors*, 7, 1343–1358.
- Nottingham, I., Bisson, I., Bishop, A. E., Randle, W. L., Polak, J. M. P., & Hench, L. L. (2004). In situ spectral monitoring of mRNA translation in embryonic stem cells during differentiation in vitro. *Anal Chem*, 76(11), 3185–3193.
- Okano, J., Opitz, O., Nakagawa, H., Jenkins, T., Friedman, S., & Rustgi, A. (2000). The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLf coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS Lett*, 473, 95–100.
- Orendi, K., Gauster, M., Moser, G., Meiri, H., & Huppertz, B. (2010). The choriocarcinoma cell line BeWo: Syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction*, 140(5), 759–766. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0221>
- Pearson, R., Fleetwood, J., & Eaton, S. (2008). Krüppel-like transcription factors : A functional family. *Int J Bioch & Cell Biol*, 40, 1996–2001. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.018>
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Gnidehou, S., Grynberg, M., Geneau, G., Guibourdenche, J., Carette, D., Cronier, L., Evain-Brion, D., Malassiné, A., & Frenodo, J. L. (2010). ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(6), 1517–1526. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00484.2008>
- Pielesz, A., Bobiński, R., Biniaś, D., Gawłowski, A., Waksmańska, W., Ulman-Włodarz, I., & Ilczak, T. (2019). FT Raman spectroscopy in the evaluation of biomarkers of normal and pathological placenta tissue. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 458(1–2), 125–132. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03536-5>
- Pijanka, J. K., Kumar, D., Dale, T., Yousef, I., Parkes, G., Yang, Y., Dumas, P., Collins, D., Manfait, M., Sockalingum, D., Robert, N., & Sul, J. (2010). Vibrational spectroscopy differentiates between multipotent and pluripotent stem cells †. *Analyst*, 135, 3126–3132. <https://doi.org/10.1039/c0an00525h>
- Pires, K. S. N., Sun, S. Y., Gonçalves, C. M., Santos, J. C., Tenorio, L. P. G., Botelho, R. M., Silva, A. L. M., Oliveira, H. G. S., Pendeloski, K. P., Daher, S., Borbely, K. S. C., & Borbely, A. U. (2019). Versican silencing in BeWo cells and its implication in gestational trophoblastic diseases. *Histochem Cell Biol*, 151(4), 305–313.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 17(1), 45–51.
- Pollak, N. M., Hoffman, M., Goldberg, I. J., & Drosatos, K. (2018). Krüppel-Like Factors: Crippling and Uncrippling Metabolic Pathways. *JACC: Basic to Translational Science*, 3(1), 132–156. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2017.09.001>
- Pollheimer, J., Loregger, T., Sonderegger, S., Saleh, L., Bauer, S., Bilban, M., Czerwenka, K., Husslein, P., & Knöfler, M. (2006). Activation of the Canonical Wingless / T-Cell Factor Signaling Pathway Promotes Invasive Differentiation of Human Trophoblast. *American J Path*, 168(4), 1134–1147. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050686>
- Principe, M., Borgoni, S., Cascione, M., Chattaragada, M. S., Ferri-Borgogno, S., Capello, M., Bulfamante, S., Chapelle, J., Modugno, F. Di, Defilippi, P., Nisticò, P., Cappello, P.,

- Riganti, C., Novelli, S., & Francesco, L. (2017). Alpha-enolase (ENO1) controls alpha v/beta 3 integrin expression and regulates pancreatic cancer adhesion, invasion, and metastasis. *J Hematol Oncol*, *10*(1).
- Qiu, X., Jung-Chien Cheng, Ju.-C., Zhao, J., Chang, H.-M., & Leung, P. C. K. (2015). Transforming growth factor- $\beta$  stimulates human ovarian cancer cell migration by up-regulating connexin43 expression via Smad2/3 signaling. *Cell Signal*, *27*(10), 1956–1962.
- Racca, A. (2013). Expresión y función del factor de transcripción KLF6 en la placenta humana. *In Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba*.
- Racca, A. C., Camolotto, S. A., Ridano, M. E., Bocco, J. L., Genti-Raimondi, S., & Panzetta-Dutari, G. M. (2011). Krüppel-Like Factor 6 Expression Changes during Trophoblast Syncytialization and Transactivates  $\beta$ hCG and PSG Placental Genes. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022438>
- Racca, A. C., Ridano, M. E., Bandeira, C. L., Bevilacqua, E., Portari, E. A., Genti-raimondi, S., Graham, C. H., & Panzetta-dutari, G. M. (2016). Low oxygen tension induces Krüppel-Like Factor 6 expression in trophoblast cells. *Placenta*, *45*, 50–57.
- Racca, A. C., Ridano, M. E., Camolotto, S., Genti-Raimondi, S., & Panzetta-Dutari, G. M. (2015). A novel regulator of human villous trophoblast fusion : the Kru factor 6. *Mol Hum Repr*, *21*(4), 347–358. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau113>
- Rama, S., Suresh, Y., & Rao, A. J. (2003). TGF beta1 induces multiple independent signals to regulate human trophoblastic differentiation: mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*, *206*(1–2), 123-136.
- Redman, C. W. G., & Sargent, I. L. (2009). Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, *30*(Suppl A), 38–42.
- Reitman, E., Devine, P., Laifer-Narin, S., Flood, P., & Riou, B. (2011). Case Scenario: Perioperative Management of a Multigravida at 34-week Gestation Diagnosed with Abnormal Placentation. *Anesthesiology*, *115*(4), 852–857.
- Ridano, M., Racca, A., Flores-Martin, J., Reyna, L., S, G.-R., & Panzetta-Dutari, G. (2014). Assessment of mechanisms involved in trophoblast response to Chlorpyrifos (CPF) pesticide exposure. *Biocell*, *38*.
- Rodríguez, E., Aburjania, N., Priedigkeit, N. M., DiFeo, A., & Martignetti, J. A. (2010). Nucleocytoplasmic localization domains regulate Krüppel-like factor 6 (KLF6) protein stability and tumor suppressor function. *PLoS One*, *5*(9).
- Roland, C. S., Hu, J., Ren, C.-E., Chen, H., Li, J., Varvoutis, M. S., Leaphart, L. W., Byck, D. B., Zhu, X., & Jiang, S.-W. (2016). Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Mol Life Sci*, *73*(2), 365–376.
- Sabatino, M. E., Castellaro, A., Racca, A. C., González, S. C., Pansa, M. F., Soria, G., & Bocco, J. L. (2019). Krüppel-Like Factor 6 Is Required for Oxidative and Oncogene-Induced Cellular Senescence. *Front Cell Dev Biol*, *7*(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00297>

- Schie, I. W., Kiselev, R., Krafft, C., & Popp, J. (2016). Rapid acquisition of mean Raman spectra of eukaryotic cells for a robust single cell classification. *Analyst*, *141*(23), 6387–6395. <https://doi.org/10.1039/c6an01018k>
- Shamloo, B., & Usluer, S. (2019). P21 in cancer research. *Cancers*, *11*(8), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers11081178>
- Sharp, A. N., Heazell, A. E. P., Baczyk, D., Dunk, C. E., Lacey, H. A., Jones, C. J. P., Perkins, J. E., Kingdom, J. C. P., Baker, P. N., & Crocker, I. P. (2014). Preeclampsia is associated with alterations in the p53-pathway in villous trophoblast. *PLoS ONE*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087621>
- Simon, A., & Durrieu, M. C. (2006). Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron*, *37*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.06.006>
- Slavin, D. A. (2002). *KLF6 : factor de transcripción inhibidor del proceso de proliferación*.
- Slavin, D. A., Koritschoner, N. P., Prieto, C. C., López-Díaz, F. J., Chatton, B., & Bocco, J. L. (2004). A new role for the Krüppel-like transcription factor KLF6 as an inhibitor of c-Jun proto-oncoprotein function. *Oncogene*, *23*(50), 8196–8205. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208020>
- Slavin, D., Sapin, V., López-Díaz, F., Jacquemin, P., Koritschoner, N., Dastugue, B., Davidson, I., Chatton, B., & Bocco, J. L. (1999). The Kruppel-like core promoter binding protein gene is primarily expressed in placenta during mouse development. *Biology of Reproduction*, *61*(6), 1586–1591. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.6.1586>
- Soeters, P. B., & Grimble, R. F. (2013). The conditional role of inflammation in pregnancy and cancer. *Clinical Nutrition*, *32*, 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.07.010>
- Song, W., Wang, Z., Kan, P., Ma, Z., Wang, Y., Wu, Q., Yao, X., & Zhang, B. (2018). Knockdown of BCL6 Inhibited Malignant Phenotype and Enhanced Sensitivity of Glioblastoma Cells to TMZ through AKT Pathway. *Biomed Res Int*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/6953506>
- Soygur, B., & Sati, L. (2016). The role of syncytins in human reproduction and reproductive organ cancers. *Reproduction*, *152*(5), R167–R178. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0031>
- Staun-ram, E., Goldman, S., Gabarin, D., & Shalev, E. (2004). *Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 ( MMP-2 and -9 ) in human trophoblast invasion*. *13*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-59>
- Strumane, K., Berx, G., & Roy, F. Van. (2004). Cadherins in cancer. *Handb Exp Pharmacol*, *165*(69).
- Stylianou, A., & Stylianopoulos, T. (2016). Atomic Force Microscopy Probing of Cancer Cells and Tumor Microenvironment Components. *BioNanoSci*, *6*, 33–46. <https://doi.org/10.1007/s12668-015-0187-4>
- Sütterlin, C., & Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol.*, *188*(5), 621–628.
- Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., Fahmi, W., & Mohamad, W. (2020). Two Sides of the Same

- Coin : The Roles of KLF6 in Physiology and Pathophysiology. *Biomolecules*, 10(10), 1–22.
- Tamborindeguy, M., Matte, B., Ramos, G., Alves, A., Bernardi, L., & Lamers, M. (2018). NADPH-oxidase-derived ROS alters cell migration by modulating adhesions dynamics. *Biol Cell*, 110(10), 225–236.
- Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C. H., & Zheng, G. (2011). E-Cadherin /  $\beta$  -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *J Biom and Biot*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/567305>
- Trucco, L. (2014). Análisis Funcional del Factor de Transcripción KLF6 en el Control de la Proliferación Celular y Oncogénesis. In *Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas*, Universidad Nacional de Córdoba.
- Trucco, L. D., Andreoli, V., Núñez, N. G., Maccioni, M., & Bocco, J. L. (2014). Krüppel-like factor 6 interferes with cellular transformation induced by the H- ras oncogene. *FASEB J*, 28(12), 5262–5276. <https://doi.org/10.1096/fj.14-251884>
- Tu, Q., & Chang, C. (2012). Diagnostic applications of Raman spectroscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(5), 545–558. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.09.013>
- Uen, Y.-H., Fang, C.-L., Hseu, Y.-C., Shen, P.-C., Yang, H.-L., Wen, K.-S., Hung, S.-T., Wang, L.-H., & Lin, K.-Y. (2015). VAV3 Oncogene Expression in Colorectal Cancer: Clinical Aspects and Functional Characterization. *Sci Rep*, 5(9360.).
- Vatish, M., Tesfa, L., Grammatopoulos, D., Yamada, E., Bastie, C. C., & Pessin, J. E. (2012). Inhibition of akt activity and calcium channel function coordinately drive cell-cell fusion in the BeWo choriocarcinoma placental cell line. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029353>
- Vidal, D. O., Ramão, A., Pinheiro, D. G., Muys, B. R., Lorenzi, J. C. C., Alves, C. de P., Zanette, D. L., de Molfetta, G. A., Duarte, G., & Silva, W. A. (2018). Highly expressed placental miRNAs control key biological processes in human cancer cell lines. *Oncotarget*, 9(34), 23554–23563. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25264>
- Walker, S. R., Liu, S., I Xiang, M., Nicolais, M., Hatzi, K., Giannopoulou, E., Elemento, O., Cerchietti, L., Melnick, A., & Frank, D. . (2015). The transcriptional modulator BCL6 as a molecular target for breast cancer therapy. *Oncogene*, 34(9), 617–632. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.61>
- Weedon-Fekjær, M. S., Sheng, Y., Sugulle, M., Johnsen, G. M., Herse, F., Redman, C. W., Lyle, R., Dechend, R., & Staff, A. C. (2014). Placental miR-1301 is dysregulated in early-onset preeclampsia and inversely correlated with maternal circulating leptin. *Placenta*, 35(9), 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.002>
- Wen, P. H., Wang, D. Y., Zhang, J. K., Wang, Z. H., Pan, J., Shi, X. Y., Yang, H., Zhang, S. J., & Guo, W. Z. (2016). Kruppel-like factor 6 suppresses growth and invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 666–675. <https://doi.org/10.1177/0394632016655171>

- West, R. C., Bouma, G. J., & Winger, Q. A. (2018). Shifting perspectives from “ oncogenic ” to oncofetal proteins ; how these factors drive placental development. *Reprod Biol Endocrinol*, 3, 1–12.
- White, L. R., Blanchette, J. B., Ren, L., Awn, A., Trpkov, K., & Muruve, D. A. (2007). The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(2), 567–576.
- Wice, B., Menton, D., Geuze, H., & Schwartz, A. L. (1990). Modulators of cyclic AMP metabolism induce syncytiotrophoblast formation in vitro. *Exp Cell Res*, 186(2), 306–316.
- Wu, K., Liu, F., Wu, W., Chen, Y., & Zhang, W. (2019). Bioinformatics approach reveals the critical role of TGF- $\beta$  signaling pathway in pre-eclampsia development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 240, 130–138.
- Wu, L., Liu, X., & Xie, Q. (2015). Osteopontin facilitates invasion in human trophoblastic cells via promoting matrix metalloproteinase-9 in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(11), 14121–14130.
- Wu, X., Tu, X., Joeng, K. S., Hilton, M. J., Williams, D. A., & Long, F. (2008). Rac1 Activation Controls Nuclear Localization of  $\beta$ -catenin during Canonical Wnt Signaling. *Cell*, 133(2), 340–353. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.052>
- Xing, R., Cui, J.-T., Xia, N., & Lu, Y.-Y. (2015). GKN1 inhibits cell invasion in gastric cancer by inactivating the NF-kappaB pathway. *Discov Med*, 19(103), 65-71.
- Xuan, Y. H., Kim, K. H., Choi, Y. La, Ahn, G. H., Chae, S. W., Lee, H. C., Lee, O. J., & Kim, S. H. (2008). The expression of G1-S cell cycle inhibitors in normal placenta and gestational trophoblastic diseases. *Korean Journal of Pathology*, 42(2), 67–74.
- Yao, Yi-long, Ma, J., Wang, P., Xue, Y., Li, Z., Zhao, L., Li, Z., Feng, T., & Liu, Y. (2014). *miR-101 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting Kruppel-like Factor 6 in Glioblastoma Stem Cells*. 6, 40–51. <https://doi.org/10.1111/cns.12321>
- Yao, Yi-long, Ma, J., Wang, P., Xue, Y., Li, Z., Zhao, L., Li, Z., Feng, T., & Liu, Y. (2015). *miR-101 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting Kruppel-like Factor 6 in Glioblastoma Stem Cells*. *Neuroscience & Therapeutics*, 6, 40–51. <https://doi.org/10.1111/cns.12321>
- Yao, Yilong, Ma, J., Wang, P., Xue, Y.-X., Li, Z., Zhao, L.-N., Li, Z.-Q., Feng, T.-D., & Liu, Y. (2014). MiR-181a regulates blood-tumor barrier permeability by targeting Kruppel-like factor 6. *J Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(201102300), 1826–1836. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.152>
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT , the cytoskeleton , and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28, 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>
- Yoon, J. H., Cho, M. La, Choi, Y. J., Back, J. Y., Park, M. K., Lee, S. W., Choi, B. J., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Nam, S. W., Lee, J. Y., & Park, W. S. (2013). Gastrokine 1 regulates NF- $\kappa$ B signaling pathway and cytokine expression in gastric cancers. *J Cell Biochem*, 114(8), 1800–1809. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Yoon, J. H., Kang, Y. H., Choi, Y. J., Park, I. S., Nam, S. W., Jung Young Lee, Lee, Y. S., & Park, W. S. (2011). Gastrokine 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial – mesenchymal transition in gastric cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, 1697–1704.

<https://doi.org/10.1007/s00432-011-1051-8>

- Yoon, J. H., Seo, H. S., Choi, W. S., Kim, O., Nam, S. W., Lee, J. Y., & Park, W. S. (2014). Gastrokine 1 induces senescence and apoptosis through regulating telomere length in gastric cancer. *Oncotarget*, *5*(22), 11695–11708.
- Yoon, J. H., Won, C. S., Kim, O., Joon, C. B., Nam, W. S., Lee, Y. J., & Park, W. S. (2017). Gastrokine 1 inhibits gastric cancer cell migration and invasion by downregulating RhoA expression. *Gastric Cancer*, *20*(2), 274–285. <https://doi.org/10.1007/s10120-016-0617-1>
- Yu, J. M., Sun, W., Hua, F., Xie, J., Lin, H., Zhou, D. D., & Hu, Z. W. (2015). BCL6 induces EMT by promoting the ZEB1-mediated transcription repression of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer Letters*, *365*(2), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.05.029>
- Zhang, D., Li, Z., Zhang, Y., Tu, C., Huo, J., & Liu, Y. (2016). MiR-4262 promotes the proliferation of human cutaneous malignant melanoma cells through KLF6-mediated EGFR inactivation and p21 upregulation. *Oncol Rep*, *36*(6), 3657–3663.
- Zhang, H., Silva, A. C., Zhang, W., Rutigliano, H., & Zhou, A. (2020). Raman Spectroscopy characterization extracellular vesicles from bovine placenta and peripheral blood mononuclear cells. *PLoS ONE*, *15*(7).
- Zhang, L., & Min, W. (2017). Bioorthogonal chemical imaging of metabolic changes during epithelial–mesenchymal transition of cancer cells by stimulated Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, *22*(10). <https://doi.org/10.1117/1.jbo.22.10.106010>
- Zhang, Q., Tan, X., Yuan, Y., Hu, C., He, C., Wang, W., Li, J., Zhao, Q., & Liu, N. (2010). Decreased expression of KLF6 and its significance in gastric carcinoma. *Med Oncol*, *27*(4), 1295–1302.
- Zhang, S., Zhang, J., Lu, L., Wang, C., & Wang, L. (2017). *MiR-630 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via targeting KLF6*. 4542–4547.
- Zhang, X., Nie, Y., Du, Y., & Cao, J. (2012). MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. *Tumor Biol*, *33*, 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0414-3>
- Zhang, Z., Li, H., Zhang, L., Jia, L., & Wang, P. (2013). Differential expression of beta-catenin and dickkopf-1 in the third trimester placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *Reprod Biol Endocrinol*, *11*(17).
- Zhou, C., Zou, Q., Jiang, Y., & Zheng, J. (2020). Role of oxygen in fetoplacental endothelial responses: hypoxia, physiological normoxia, or hyperoxia? *J Physiol Cell Physiol*, *318*(5), C943-C953.
- Zhuang, B., Luo, X., Rao, H., Li, Q., Shan, N., Liu, X., & Qi, H. (2015). Oxidative stress-induced c/ebpbeta inhibits beta-catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia. *Placenta*, *36*, 839-846.

