PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Escuela de Medicina
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas

EFECTOS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA MATERNA SUPRAFISIOLÓGICA SOBRE EL TRÁFICO DE COLESTEROL EN LA PLACENTA HUMANA

Tesis presentada en la Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile para optar al grado de Doctor en Ciencias Médicas

Por
Bárbara Fuenzalida Saavedra

Tutor: Dra. Andrea Leiva

Marzo 2020
Santiago, Chile

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Dirección de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina

La Comisión Examinadora, constituida por los Profesores abajo firmantes, aprueba la Defensa Pública de la Tesis Doctoral titulada:

"EFECTOS DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA MATERNA SUPRAFISIOLÓGICA SOBRE EL TRÁFICO DE COLESTEROL EN LA PLACENTA HUMANA"

Aprobación Defensa Pública:

SRTA. BÁRBARA MARLENE FUENZALIDA SAAVEDRA

Calificándose el trabajo realizado, el manuscrito sometido y la defensa oral, con nota

(6.7) seis coma siete.

Dr. Mauricio Cuello
Director de Investigación y Doctorado
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Felipe Heusser
Decano
Facultad de Medicina, PUC

Dra. Andrea Leiva
SubJefe y Director de Tesis
Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Medicina, PUC

Dra. Eugenia Morselli
Profesor Evaluador Externo
Facultad de Ciencias Biológicas, PUC Escuela de

Dra. Dolores Busso
Profesor Evaluador Interno
Escuela de Medicina, PUC

Dr. Jorge Carvajal
Jefe
Programa Doctorado en Ciencias Médicas

Escuela de Medicina, PUC

Santiago, 17 de marzo de 2020

Agradecimientos

Es difícil describir este momento, y mucho mas difícil agradecer a cada una de las personas que estuvieron en este momento en pocas palabras, cuando lo que tengo que decir podrían ser libros completos.

Gracias a mi padre, porque sin saber en que me estaba metiendo cuando tome la decisión de hacer un doctorado, ahí estuvo siempre orgulloso de mi y siempre me motivó a ser mas de lo que yo creía poder, y sigue tan orgulloso de mi en cada cosa que hago; a mis hermanos, a Carlitos (mi hermano mayor), porque a pesar de su personalidad fría y que siempre me verá como la menor de sus hermanas, se que siempre se ha sentido orgulloso de mi, y con pocas palabras ha logrado que me sienta segura de todas las decisiones que he tomado en mi vida; a Pamela (mi hermana mayor), porque tiene esa personalidad tan linda, tan pura, tan amable, que solo con su sonrisa me hace reír y sentirme confiada de mis conocimientos y con ganas de seguir haciendo lo que me gusta; a la Paty (mi gemela y mi persona favorita), que sin ella todo seria distinto, muchas veces cuando lloraba por sentirme frustrada y estresada, ahí siempre estuvo ella, para retarme o para animarme, pero siempre sabia como hacerme sentir mejor, simplemente la amo, y gracias inmensamente solo por el hecho de ser mi gemela. A Janito (mi cuñado favorito), que con sus risas y su sencillez me motivo siempre. Gracias a mis bellas sobrinas, y a mi hermanita Fabiola, que a pesar que son muy pequeñas, no saben muy bien que hago, pero con su sonrisa y amor siempre ayudaron a motivarme, y mi sobrina mayor Evolet, que siempre le cuenta a sus compañeros y profesores que tiene una tía que es científica, no podría sentirme tan feliz y bendecida de mi familia.

Quiero agradecer obviamente a mi pequeña Sansa, para muchos será raro agradecer a un perro, pero ella para mi no es solo un perro, es “Mi Sansa”, “Mi Pequeña”, “Mi Vida”, y el único ser que siempre me espera feliz en casa para alegrarme el día, jugar conmigo, después de días tristes, estresantes, frustrantes, en los momentos donde sentía que quería dejar todo botado, ella me alegraba con su presencia, con su cariño, así que muchas gracias a mi pequeña, porque me dio las fuerzas para seguir adelante.

Quiero agradecer a mi tutora de tesis, la Dra. Andrea Leiva, empecé con ella el año 2012 en una simple pasantía de 2 semanas, luego fue mi tutora de pregrado, trabaje dos años mas en su proyecto y terminé haciendo mi tesis de doctorado con ella, en total han sido más de 7 años juntas, y nuestra relación ya no fue solo académica ni profesional, encontré una amiga, me enseño todo lo que sé hoy, no solo a trabajar en laboratorio, me enseño disciplina, confianza en mi trabajo, amor por lo que hago y pasión en mi trabajo. Definitivamente no podría ser otra persona, gracias por depositar en mi su confianza, y gracias por siempre escucharme y darme todos los sabios consejos.

Le agradezco especialmente a Eric Barros e Indira Chiarello y a sus compañeros de vida, Aldo Seguel y Jean Andreotti la amistad incondicional que encontré en ustedes y apoyo personal y profesional, han sido como mis hermanos todo este tiempo. Con Eric tuvimos la oportunidad de avanzar este camino juntos, y juntos vivimos las mismas frustraciones y emociones, gracias por la amistad tan incondicional que me ofrecieron todo este tiempo. Gracias a mis amigas de la vida Lorena Carvajal, Katherine Bugueño y Kelly Valdivia, cada una vive su etapa diferente en la vida, pero cada una supo apoyarme de la manera como mejor las caracteriza, con lindas palabras, risas y compañía. A Roberto Villalobos que aunque este en Canadá ahora haciendo su post doctorado, siempre será mi gran amigo, sencillo, humilde, alegre y siempre voy a admirarlo y también se que me admiraste todo este tiempo.

A Fabian Pardo, Jaime Gutiérrez y Robin por siempre darme alegría, apoyarme desde el primer día que llegue al laboratorio, y siempre creer en mi. A Susana Contreras, Amparo Pacheco, Claudette Cantin, Valentina Pasten y Ana del Piano, que siempre me ayudaron, apoyaron, abrazaron y alentaron durante todo este tiempo, sin ustedes todo hubiera sido distinto, gracias por creer en mi. A los nuevos amigos, Eddy, Pablo, Andreina, Javier, Ramiro, Cristi, Luis, Mario, Ingrid, porque siempre estuvieron ahí para alegrar los momentos con risas, baile, música y mucho más, gracias por el apoyo siempre, y por gracias por dejarme ser su amiga.

Gracias a los compañeros de laboratorio que ya no están, pero siguen su camino en otras universidades de Chile y el mundo, Enrique Guzmán, Rocío Salsoso, Tamara Sáez, ellos me conocieron el primer día que llegue al laboratorio, y saben todo lo que aprendí y crecí en este camino, gracias por todo, por la amistad, por el apoyo personal y profesional.

Muchas gracias a mis amigos Anita, Mary, Lore, Nicol, Ake, Juan, Correa, Pamela por siempre sentirse felices por mis logros, gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación del doctorado, Eric, Felipe, Jonathan, Fabián, Ignacio y Sergio, porque empezamos esto juntos, y juntos fuimos avanzando cada uno en su camino, gracias por todo.

Gracias al profesor Luis Sobrevia, por apoyarme en los inicios de mi doctorado, y por estar directa o indirectamente en mi crecimiento profesional.

Concluiré, agradeciendo al Programa de Doctorado en Ciencias Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, al director el Dr. Carvajal y a Debbie, por todo el apoyo. Además, quiero agradecer a la Dra. Sáez por su consideración y apoyo siempre, aunque ya no estuviera tan ligada al doctorado, siempre se preocupo por todos los alumnos, y por ser tan humana y tan linda con cada uno de nosotros. A la Escuela de Medicina, la Vicerrectoría de Investigación y Conicyt quienes han sido el sustento económico que me ha permitido dedicar con exclusividad al desarrollo de esta tesis. Finalmente, quería agradecer a los miembros de mi Comisión de Tesis, la Dra. Dolores Busso, la Dra. Eugenia Morselli, por hacerse el tiempo entre sus apretadas agendas para acompañarme en las instancias en las que han sido necesarios y especialmente por sus valiosas aportaciones para mejorar la comprensión y enriquecer el contenido de esta tesis. A todos, sinceramente, gracias

ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras ix

Índice de tablas xi

Abreviaturas xii

Abstract xviii

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA 1

1.2. UNIDAD FETO-PLACENTARIA 7

1.3. TRÁFICO DE COLESTEROL 9

1.4. COMENTARIO FINAL 15

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 17

2.1. Hipótesis 17

2.2. Objetivos generales y específicos 17

2.2.1. Objetivos generales 17

2.2.2. Objetivos específicos 17

3. MATERIALES Y MÉTODOS 19

3.1. MATERIALES 19

3.1.1. Equipos 19

3.1.2. Reactivos y materiales de uso general 20

3.1.3. Reactivos y materiales para extracción y cuantificación de proteínas 21

3.1.4. Reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida 21

3.1.5. Reactivos y materiales para western blot 21

3.1.6. Anticuerpos 22

3.1.7. Reactivos y materiales para inmunofluorescencia en tejido 23

3.1.8. Reactivos para RT-PCR 23

3.1.9. Reactivos y materiales para cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto 24

3.1.10. Reactivos y materiales para purificación y marcaje de lipoproteínas 25

3.1.11. Reactivos y materiales para captación y eflujo de colesterol 25

3.1.12. Reactivos para medición de contenido de colesterol 26

3.2. METODOS 27

3.2.1. Obtención de las muestras biológicas 27

3.2.2. Grupos de estudio 28

3.2.3. Determinación de colesterol sanguíneo y triglicéridos 28

3.2.4. Purificación de lipoproteínas de adultos y neonatos 28

3.2.5. Marcaje de lipoproteínas 31

3.2.6. Cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto 31

3.2.7. Morfología celular 36

3.2.8. Análisis de citometría de flujo para evaluar pureza celular 36

3.2.9. Ensayo de viabilidad celular 37

3.2.10. Polarización de células del sincitiotrofoblasto 37

3.2.11. Medición de TEER 40

3.2.12. Medición de Papp 40

3.2.13. Lisado celular y cuantificación de proteínas 41

3.2.14. Western blot 41

3.2.15. Inmunofluorescencia en tejido 42
3.2.16. Inmunofluorescencia en células 43
3.2.17. Extracción de RNA total y transcripción reversa 44
3.2.18. PCR Tiempo Real 45
3.2.19. Captación de colesterol 47
3.2.20. Inhibición de LDLR, SR-BI 48
3.2.21. Eflujo de colesterol 48
3.2.22. Contenido de colesterol total, colesterol esterificado y colesterol no esterificado 49
3.2.23. Tinción Filipina 50
3.2.24. Calculo de tamaño muestral 51
3.2.25. Análisis de datos 51

4. RESULTADOS 53

4.1. Características maternas y neonatales 53

4.2. Morfología celular de células del trofoblasto diferenciadas y no diferenciadas a sincitiotrofoblasto 53

4.3. Morfología de los cultivos de sincitiotrofoblastos polarizados 58

4.4. Establecimiento de la monocapa del sincitiotrofoblasto polarizado 58

4.5. Pureza celular de los cultivos de trofoblastos 62

4.6. Determinación de las membranas apicales y basales del sincitiotrofoblasto 62

4.7. Expresión de marcadores de sincitiotrofoblastos polarizados 63

4.8. Localización y expresión de receptores de lipoproteínas en placentas C y HC 69

4.9. Localización y expresión de ligandos de LDLR y SR-BI 72

4.10. Localización y expresión de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC 75

4.11. Expresión y localización de receptores de lipoproteínas en sincitiotrofoblastos polarizados 80

4.12. Inhibición de la captación de LDL-DiI y HDL-DiI en sincitiotrofoblasto 83

4.13. Captación de LDL-DiI y HDL-DiI en sincitiotrofoblastos C y HC 83

4.14. Localización y expresión de transportadores de colesterol en placentas C y HC 87

4.15. Localización y expresión de transportadores de colesterol en sincitiotrofoblastos C y HC 90

4.16. Expresión y localización de transportadores de colesterol en sincitiotrofoblastos polarizados 94

4.17. Curva de tiempo, concentración y parámetros cinéticos del eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos 97

4.18. Eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL en sincitiotrofoblastos C y HC 97

4.19. Direccionalidad del eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos polarizados 104

4.20. Contenido de colesterol total, éster y libre en placentas y sincitiotrofoblastos C y HC 107

4.21. Expresión de enzimas responsables de la síntesis y esterificación del colesterol en sincitiotrofoblastos C y HC **110**

5. DISCUSION **114**

5.1 Captación de colesterol en células del sincitiotrofoblasto **117**
5.1.1 Captación de LDL 117
5.1.2 Captación de HDL 119

5.2 Eflujo de colesterol en células del trofoblasto **121**

5.3 Niveles de colesterol en células del sincitiotrofoblasto **127**

6. CONCLUSIÓN **130**

7. PROYECCIONES **132**

8. REFERENCIAS **133**

9. PUBLICACIONES **151**

10. BECAS Y AYUDAS **153**

11. PARTICIPACION EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES **154**

Índice de figuras

Figura 1.	Purificación y abundancia proteica de ApoB y ApoA-I en lipoproteínas purificadas (LDL y HDL).	30
Figura 2.	Diagrama de la gradiente de Percoll requerida para el cultivo primario de células del citotrofoblasto	35
Figura 3.	Establecimiento de la monocapa de sincitiotrofoblastos primarios humanos confluentes en insertos Transwell® recubiertos con matrigel.	39
Figura 4.	Perfil lipídico materno y neonatal en C y HC.	56
Figura 5.	Morfología de células del trofoblasto.	57
Figura 6.	Morfología de células del sincitiotrofoblasto cultivados en filtros Transwell® recubiertos con Matrigel.	59
Figura 7.	Establecimiento de monocapa de sincitiotrofoblastos primarios humanos confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	60
Figura 8.	Permeabilidad de la monocapa de sincitiotrofoblastos humanos primarios confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	61
Figura 9.	Células positivas para marcadores específicos de células del trofoblasto.	64
Figura 10.	Control de contaminación con células endoteliales.	65
Figura 11.	Localización de marcadores apicales y basales del sincitiotrofoblasto en tejido de placenta C y HC.	66
Figura 12.	Expresión de marcadores de sincitiotrofoblastos en cultivos polarizados en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	67
Figura 13.	Localización de marcadores en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	68
Figura 14.	Localización de receptores de lipoproteínas en tejido de placenta C y HC.	70
Figura 15.	Expresión de LDLR y SR-BI en homogenizado de placenta C y HC.	71
Figura 16.	Localización y expresión de ApoB y ApoA-I en tejido de placenta C y HC.	73
Figura 17.	Expresión de ApoB y ApoA-I en tejido de placenta C y HC.	74
Figura 18.	Localización de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC.	77
Figura 19.	Localización de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC no permeabilizadas.	78
Figura 20.	Expresión de LDLR y SR-BI en células del sincitiotrofoblasto C y HC.	79
Figura 21.	Expresión de receptores de lipoproteínas en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	81
Figura 22.	Localización de receptores de lipoproteínas en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.	82

Figura 23. Inhibición en la captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto. 84
Figura 24. Captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 85
Figura 25. Localización de transportadores de colesterol en tejido de placenta C y HC. 88
Figura 26. Expresión de ABCA1 y ABCG1 en homogenizados de placentas C y HC. 89
Figura 27. Localización de transportadores de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 91
Figura 28. Localización de transportadores de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC no permeabilizadas. 92
Figura 29. Expresión de ABCA1 y ABCG1 en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 93
Figura 30. Expresión de transportadores de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel. 95
Figura 31. Localización de transportadores de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel. 96
Figura 32. Curva de tiempo y concentración para eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto humanos. 99
Figura 33. Eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 101
Figura 34. Inhibición del eflujo de colesterol vía SR-BI en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 103
Figura 35. Eflujo en sincitiotrofoblastos polarizados utilizando diferentes aceptores en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel. 105
Figura 36. Acumulación de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel. 106
Figura 37. Contenido de colesterol en placentas C y HC. 108
Figura 38. Contenido de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 109
Figura 39. Expresión de HMGCR en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 111
Figura 40. Expresión de ACAT1 en células del sincitiotrofoblasto C y HC. 112
Figura 41. Ensayo de viabilidad celular en sincitiotrofoblastos C y HC. 113
Figura 42. Modelo propuesto del tráfico de colesterol en la placenta C y HC. 131

Índice de tablas

Tabla 1. Actividad de enzimas en cada digestión. 33
Tabla 2. Concentraciones de la gradiente de Percoll 34
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para PCR tiempo real. 46
Tabla 4. Características clínicas de las embarazadas y los recién nacidos 55
Tabla 5. Parámetros cinéticos de captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto C y HC 86
Tabla 6. Parámetros cinéticos para la determinación de velocidad inicial de eflujo 100
Tabla 7. Parámetros cinéticos de eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC 102

Abreviaturas

ABCA1	*ATP binding cassette* transportador A1
ABCG1	*ATP binding cassette* transportador G1
ACAT	Acil CoA: colesterol acil transferasa
ApoA-I	Apolipoproteina A I
ApoB	Apolipoproteina B
ApoE	Apolipoproteina E
ARG	Arginasas
BCA	Ácido bicinconínico
BLT-1	Bloqueador del transporte de lípidos-1
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Control
CD31	*cluster of differentiation 31*
CE	Colesterol esterasa
CETP	proteína de transferencia de ésteres de colesterol
CK7	Citoqueratina 7
Clamp	*C-terminal Linking and Modulating Protein*
CPM	Cuentas por minuto
CT	Colesterol total
CTB	Citotrofoblasto
CTCF	Fluorescencia celular total corregida
DiI	1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina perclorato
DMEM	Medio Eagle modificado con medio Dulbecco
DMEM/12	Medio Eagle con mezcla de 12 nutrientes modificado con medio Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido dexorribonucleico
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENS	Encuesta Nacional de Salud

FFA	Ácidos grasos libres
FPN-1	Ferroportina 1
FXR	receptor X farnesoide
HBSS	Solución salina tamponada de Hank
HC	Hipercolesterolemia
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HDL-DiI	HDL marcadas con DiI
HMGCR	β-Hidroxi β-metilglutaril-CoA reductasa
hPMEC	Células endoteliales microvasculares de la placenta humana
HUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical humana
HRP	Peroxidasa de rabano
IMC	Índice de masa corporal
KBr	Bromuro de potasio
Km	Constante aparente de Michaelis-Menten
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-DiI	LDL marcadas con DiI
LDLR	Receptor de LDL
LPL	Lipoprotein lipasa
LXRs	Receptores X del hígado
LY	*Lucifer yellow*
MB	Membrana basal
MMV	Microvellosidad de la membrana apical
MPH	*Materna physiological hypercolesterolemia*
MSPH	*Materna supraphysiological hypercolesterolemia*
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio
NBCS	Suero de tercero recién nacido
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
Ox-LDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PBS	Buffer fosfato salino
Papp	Coeficiente de permeabilidad aparente

PCSK9	*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*
PFA	Paraformaldehido
PLAP	Fosfatasa alcalina placentaria
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PXR	Receptor X de pregnano
RCF	Fuerza centrífuga relativa
T	Trimestre
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
TBS-T	Tris base-Tween 20
Tg	Triglicéridos
TTGO	Test de tolerancia a la glucosa oral
SD	Desviación estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
S.E.M	Error estándar
Sg	Semanas de gestación
SLL	Suero libre de lipoproteínas
SFB	Suero fetal bovino
SPTLC	serina palmitoil-transferasa 1
SR-BI	Receptor *scavenger* clase B tipo I
SREBPs	Proteínas de unión al elemento regulador del esterol
STB	Sincitiotrofoblasto
Vi	Velocidad inicial
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
Vmax	Velocidad máxima de transporte

Resumen

Un aumento en el colesterol materno ocurre en embarazos para asegurar el desarrollo fetal, denominado como hipercolesterolemia materna fisiológica (nombrado en esta tesis como control (C)). La hipercolesterolemia materna suprafisiológica (la que en esta tesis consideraremos como hipercolesterolemia (HC)) ocurre por mecanismos desconocidos y conduce a disfunción endotelial, estrés oxidativo y ateroesclerosis en la vasculatura feto-placentaria, fenómenos que no se asocian a un aumento en los niveles de colesterol en la circulación fetal, sugiriendo que podría existir regulación del tráfico de colesterol entre la circulación materna y la fetal.

El tráfico de colesterol en la placenta, definido como captación y eflujo de este lípido desde la circulación materna a la fetal, ocurre específicamente en las células del sincitiotrofoblasto y las células endoteliales de la placenta, en la denominada barrera placentaria. En las células del sincitiotrofoblasto, el colesterol se capta desde las lipoproteínas maternas de baja (LDL) y alta (HDL) densidad principalmente por el receptor de LDL (LDLR) y el receptor de HDL (SR-BI), respectivamente. Posteriormente, el colesterol es entregado a diferentes aceptores a través de un mecanismo de eflujo (salida de colesterol) mediado principalmente por los transportadores de la super-familia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) tipo A1 (ABCA1) y G1 (ABCG1) y eventualmente SR-BI. Si bien los aceptores clásicos de colesterol para estos transportadores son del tipo HDL, los aceptores en la placenta humana no han sido descritos. Finalmente, el colesterol que ha salido del sincitiotrofoblasto se transporta a las células endoteliales y desde allí a la circulación fetal. Dado que los niveles de colesterol en la circulación fetal son similares en C y en HC y que en distintos modelos de estudio la expresión de los receptores de lipoproteínas y transportadores de colesterol es regulada en respuesta a niveles elevados de colesterol, proponemos que la HC podría modificar la expresión y actividad de LDLR, SR-BI, ABCA1 y

ABCG1, y de esta forma, el tráfico de colesterol en las células del sincitiotrofoblasto. Basado en esta información, nuestra hipótesis de trabajo es: La hipercolesterolemia (HC) altera el tráfico de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de la placenta humana disminuyendo la captación y el eflujo de este lípido hacia lipoproteínas fetales. Para evaluar la hipótesis, nuestros objetivos generales son: (1) determinar si la HC modifica la captación de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas, (2) determinar si la HC modifica el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas, (3) determinar si la HC modifica el contenido de colesterol en tejido placentario y células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas. Los resultados obtenidos muestran que tanto en el sincitiotrofoblasto de placentas HC de término como en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto purificados desde estas placentas, la captación de LDL-DiI y HDL-DiI estarían disminuidos (DiI: 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina perclorato). Si bien la abundancia proteica de LDLR no cambia, proponemos que su disponibilidad en la membrana celular es menor en sincitiotrofoblasto de placentas HC y de esta forma su función estaría disminuida. En células HC, la abundancia de SR-BI es menor, lo que también se asoció con una disminución en la captación de HDL marcadas. Adicionalmente, determinamos que SR-BI no participa en el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto, que la salida de colesterol hacia ApoA-I es mayor en placentas HC sin cambios en la abundancia proteica de ABCA1 y que la salida de colesterol hacia HDL es menor en células HC posiblemente por una menor abundancia proteica de ABCG1. Por otra parte, en tejido placentario de embarazos con HC y en células purificadas desde estas placentas determinamos que el contenido de colesterol no esterificado (colesterol libre) es mayor que en la condición C. Determinamos también que en células HC esto no se asociaría con una mayor biosíntesis de colesterol ya que la expresión de HMGCR, enzima limitante para la síntesis de colesterol, es menor

en células HC. En este modelo celular, la expresión de ACAT1, enzima que esterifica colesterol, está disminuida en células HC; lo que sugerimos se asocia al aumento determinado en la concentración de colesterol libre en células HC. En el modelo de sincitiotrofoblasto sembrados en Transwell® recubiertos con matrigel, determinamos la localización de los receptores y transportadores de colesterol, corroborando lo observado en sincitiotrofoblasto en placentas, sin embargo, no fue posible determinar la direccionalidad del eflujo (hacia polo apical o basal) debido a inconvenientes técnicos y alguna interacción colesterol-matrigel que evitaría la salida de colesterol hacia el compartimento basal. La conclusión de esta tesis es que en embarazos HC, en los que la madre presenta niveles elevados de colesterol, existiría regulación de la abundancia proteica, localización y/o función de receptores de lipoproteínas y transportadores de colesterol. En células del sincitiotrofoblasto aisladas de placentas HC sugerimos que la captación de lipoproteínas y el eflujo de colesterol está disminuido, junto a cambios en los niveles intracelulares de colesterol no esterificado y menor viabilidad celular. Todos estos cambios, se asocian con niveles de colesterol dentro de rangos normales en los hijos de estas mujeres. Proponemos de esta forma, que en el sincitiotrofoblasto de placentas HC se regula el tráfico del colesterol, posiblemente para evitar la entrada exacerbada de este lípido hacia la circulación fetal.

Abstract

Maternal physiological hypercholesterolemia (MPH) during pregnancy to ensure fetal development. Maternal supraphysiological hypercholesterolemia (MSPH) occurs by unknown mechanisms and leads to endothelial dysfunction, oxidative stress and atherosclerosis in the feto-placental vasculature, phenomena that are not associated with an increase of cholesterol levels in the fetal circulation, suggesting that there might cholesterol traffic regulation between the maternal and fetal circulation.

Cholesterol traffic in the placenta, defined as the uptake and efflux of this lipid from the maternal to the fetal circulation, occurs in the placental barrier, and more specifically in placental syncytiotrophoblast and endothelial cells. In syncytiotrophoblast cells, cholesterol is captured from maternal lipoproteins of low (LDL) and high (HDL) density by the LDL receptor (LDLR) and the HDL receptor (SR-BI), respectively. Subsequently, cholesterol is delivered through an efflux mechanism (cholesterol outlet) mediated by transporters of super-family of transporters ABC (*ATP binding cassette*) type A1 (ABCA1) and G1 (ABCG1) and eventually SR-BI transporters. While the classical cholesterol acceptors for these transporters are of the HDL type, the acceptors in the human placenta have not been described. Finally, the cholesterol that has left the syncytiotrophoblast is transported to the endothelial cells and from there to the fetal circulation. Since cholesterol levels in the fetal circulation are similar in MPH and in MSPH pregnancies, and different study models have shown that the expression of lipoprotein receptors and cholesterol transporters is regulated in response to elevated levels of cholesterol, we propose that MSPH could modify the expression and activity of LDLR, SR-BI, ABCA1 and ABCG1, and therefore, cholesterol traffic in syncytiotrophoblast cells. Based on this information, our working hypothesis

is: MSPH alters the cholesterol traffic in human placenta syncytiotrophoblast cells by decreasing the uptake and efflux of this lipid into fetal lipoproteins. To evaluate the hypothesis, our general objectives are to: (1) determine if MSPH modifies cholesterol uptake in human placental syncytiotrophoblast cells, (2) determine whether MSPH modifies cholesterol efflux in human placental syncytiotrophoblast cells, (3) determine whether MSPH modifies the cholesterol content in placental tissue and human placental syncytiotrophoblast cells. The results obtained show that both in the syncythiotrophoblast of term MSPH placentas and in primary cultures of syncytiotrophoblast cells purified from these placentas, LDL and HDL uptake would be decreased. Although the protein abundance of LDLR does not change, we propose that its availability in the cell membrane is altered and thus its function diminished. In MSPH cells, the abundance of SR-BI is lower, which was also associated with a decrease in HDL uptake. Additionally, we determined that SR-BI does not participate in the efflux of cholesterol in syncytiotrophoblast cells, that the cholesterol output towards ApoA-I is greater in MSPH placentas without changes in ABCA1 protein abundance and that the cholesterol output towards HDL is lower in MSPH cells possibly due to a lower protein abundance of ABCG1. On the other hand, we observed that the content of non-esterified cholesterol (free cholesterol) is higher in MSPH cells than in MPH cells, while cell viability is lower, a process that would not be associated with a higher cholesterol biosynthesis, considering that the expression of HMGCR, a limiting enzyme for cholesterol synthesis, is lower in MSPH cells. In this cellular model, the expression of ACAT1, an enzyme that esterifies cholesterol, is decreased in MSPH cells; the latter suggests an increase in the concentration of free cholesterol in MSPH cells. In the syncytiotrophoblast model cultured in Matrigel-coated Transwell®, we determined the location of cholesterol receptors and transporters, corroborating what was observed in placental syncytiotrophoblast , however, it was not possible

to determine the efflux directionality (towards apical or basal membrane) due to technical inconveniences, including a cholesterol-matrigel interaction that could prevent the outflow of cholesterol into the basal compartment. The conclusion of this thesis is that in MSPH pregnancies, in which the mother has elevated cholesterol levels, there is a regulation of protein abundance, location and/or function of lipoprotein receptors and cholesterol transporters. In syncytiotrophoblast cells isolated from MSPH placentas we suggest that lipoprotein uptake and cholesterol efflux is decreased, together with changes in intracellular levels of non-esterified cholesterol and less cell viability. All these changes are associated with cholesterol levels that are within the normal range in children from these women. In this way, we propose that cholesterol traffic is regulated in the placental syncytiotrophoblast from MSPH, possibly to prevent the exacerbated entry of this lipid into the fetal circulation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HIPERCOLESTEROLEMIA

La hipercolesterolemia se define como niveles elevados de colesterol sanguíneo y es una condición considerada como uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo y progreso de ateroesclerosis (enfermedad progresiva caracterizada por la formación de placas lipídicas en las arterias), y enfermedad cardiovascular (ECV) en humanos [AHA, 2018; Stone *et al.,* 2014; Benjamin *et al.,* 2017]. Si bien los valores de referencia para los niveles de colesterol sanguíneo dependen de la población y los factores de riesgo asociados, se ha establecido un valor deseable de colesterol total (CT) inferior a 200 mg/dL para la población adulta no embarazada [AHA, 2018; Stone *et al.,* 2014], siendo fundamental controlar y mantener los niveles de colesterol por debajo de este valor, de manera de disminuir el riesgo de desarrollar ECV [Martin *et al.,* 2014].

La hipercolesterolemia en la población no embarazada es una condición principalmente relacionada con mutaciones genéticas (en genes relacionados con el tráfico de colesterol, como receptores de lipoproteínas y transportadores de colesterol). Además, se encuentran los desbalances dietéticos y las alteraciones metabólicas [Grundy *et al.,* 2004; Go *et al.,* 2014; Ros *et al.,* 2014; Benjamin *et al.,* 2017; AHA, 2018]. Aunque las ECV son un síndrome normalmente diagnosticado en adultos, existe evidencia que indica que la ateroesclerosis asociada con hipercolesterolemia puede comenzar durante la vida intrauterina, con formación de lesiones tempranas en vasos fetales [Napoli *et al.,* 1999a; Skilton, 2008; Palinski *et al.,* 2009; Leiva *et al.,* 2013; Palinski, 2014]. Estos estudios enfatizan la necesidad e importancia de monitorear los

potenciales efectos adversos de la hipercolesterolemia materna durante el embarazo, sobre la vasculatura fetal [Baardman *et al.,* 2013; Wild *et al*., 2015].

1.1.1. Hipercolesterolemia en el embarazo

El embarazo es una condición fisiológica caracterizada por un aumento en el colesterol sanguíneo materno dependiente de las semanas de gestación, llegando a ser al término de la gestación 40-50% mayor que el valor inicial de gestación, denominado hipercolesterolemia materna fisiológica (en esta tesis consideraremos como control (C)) [Brizzi *et al.,* 1999; Avis *et al.,* 2009]. Es considerado una respuesta adaptativa de la madre, para satisfacer las altas demandas de colesterol para el crecimiento del feto [Basaran, 2009; Wild *et al*., 2015]. El colesterol se requiere en grandes cantidades para la síntesis de membranas celulares y de moléculas de señalización, como precursor de hormonas esteroidales, entre otros [Cortés *et al*., 2014; Wild *et al*., 2015]. Aunque no existe un consenso para establecer niveles de colesterol normal durante el embarazo, la información disponible actualmente en la literatura ha permitido estimar un valor promedio calculado de ~260 mg/dL de colesterol sanguíneo en la madre, al término del embarazo [Leiva *et al.,* 2015; Contreras-Duarte *et al*., 2019]. Basado en la carencia de información, se estableció para un grupo de embarazadas chilenas (n = 249) niveles de CT (mg/dL) 183, 230 y 260 para cada trimestre del embarazo, respectivamente [Leiva *et al.,* 2015]. Para lipoproteínas de alta (HDL-C) y baja densidad (LDL-C), los valores promedio fueron (mg/dL) 67 y 104 para el primer trimestre, 77 y 126 para el segundo y 75 y 142 para el tercer trimestre del embarazo, respectivamente [Leiva *et al.,* 2015]. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de origen desconocido, un grupo de estas mujeres presentan una alteración metabólica, denominado hipercolesterolemia materna suprafisiológica (la que en esta tesis consideraremos como hipercolesterolemia (HC))

[Montes *et al.,* 1984]. Esta condición se caracteriza por niveles de colesterol sanguíneo en la madre por sobre el valor promedio, sobre el percentil 75 de la población de embarazadas o sobre un punto de corte de 280 mg/dL para CT [Montes *et al.,* 1984; Napoli *et al.,* 1997, 1999a; Ethier-Chiasson *et al*., 2007; Liguori *et al*., 2007; Leiva *et al.,* 2013, 2015, 2016b; Zhang *et al*., 2017]. HC se ha asociado con alteraciones vasculares al nacimiento, que se mantienen incluso en la infancia y adolescencia [Palinski *et al.,* 2009; Leiva *et al*., 2016a]. No existe información con respecto a la prevalencia de HC en la población mundial, principalmente debido al hecho de que el nivel de colesterol en la sangre materna no se evalúa de forma rutinaria durante el embarazo. Sin embargo, resultados obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud del año 2016-2017 informaron que el 29 % de las mujeres presentan hipercolesterolemia, adicionalmente, el riesgo cardiovascular en mujeres es 28% [ENS MINSAL, 2016-2017]. En el grupo de embarazadas chilenas estudiadas en nuestro laboratorio, la prevalencia de HC materna fue cercana al ~30% [Leiva *et al.,* 2013, 2015]. Esta información sugiere que un número significativo de mujeres embarazadas potencialmente presentará una condición intrauterina adversa, que podría resultar en facilitar el desarrollo de alteraciones vasculares como la disfunción endotelial y la ateroesclerosis temprana en el feto en crecimiento.

1.1.2. Factores que regulan la hipercolesterolemia materna fisiológica

Entre los mecanismos implicados en la regulación fisiológica del colesterol total y lipoproteíco durante el embarazo se encuentra un aumento en la síntesis hepática y una reducción en la eliminación plasmática de lipoproteínas, como consecuencia del aumento de la resistencia a la insulina y los niveles de estrógenos que también modifican los niveles de triglicéridos durante el embarazo [Herrera, 2002]. Después de la semana 9 de embarazo, la placenta se convierte en la

principal fuente de estrógenos materna. Este órgano tiene la capacidad de producir estrógenos mediante la vía de síntesis *de novo* del colesterol [Escobar *et al.,* 2011]. Los niveles de estrógeno aumentan en promedio 100 veces durante el embarazo, comparado con periodos previos a este evento, un fenómeno que se correlaciona positivamente con los niveles elevados de CT y LDL-C durante el embarazo [Desoye *et al.,* 1987; Abbassi-Ghanavati *et al.,* 2009].

Adicionalmente, el aumento de los niveles de LDL-C durante el embarazo se relacionan con un aumento en la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), enzima que facilita el intercambio de ésteres de colesterol (CE) de HDL por triacilglicerol de lipoproteínas no-HDL como lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y LDL [Iglesias *et al.,* 1994]. Para la acción de esta enzima, durante el embarazo las LDL se enriquecen en CE y las HDL en triglicéridos, lo que se asocia con LDL más pequeñas y más densas y HDL más grandes y menos densas [Silliman *et al.,* 1993; Sattar *et al.,* 1997]. Estas LDL densas son más susceptibles a la oxidación que las más grandes; de hecho, al final del embarazo existen niveles aumentados de LDL oxidada materna (ox-LDL), uno de los principales factores implicados en el desarrollo de la disfunción endotelial y ateroesclerosis [Stocker y Keaney, 2004]. Adicionalmente, en el hígado materno, la síntesis de las lipoproteínas enriquecidas en triglicéridos aumenta debido a la síntesis hepática aumentada de apolipoproteína B (ApoB; la principal apolipoproteína y precursora de VLDL), y por la actividad reducida de la lipoproteína lipasa (LPL) que es la responsable del *clearence* plasmático de VLDL, un proceso regulado por la resistencia a la insulina [Ramos y Herrera, 1995] y el aumento de los niveles de estrógeno propios del embarazo [Knopp *et al.,* 1992].

Por otra parte, el aumento en los niveles de LDL-C durante el embarazo podría asociarse a un cambio en la actividad de la proteína *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* (PCSK9). La unión de PCSK9 al receptor LDLR conduce a la degradación lisosomal del receptor, que se

asocia con niveles elevados de LDL circulantes [Abifadel *et al*., 2003]. Diferentes factores como edad, sexo, índice de masa corporal, estado menopáusico, embarazo y niveles circulantes de lípidos y glucosa se correlacionan con los niveles de PCSK9 [Lakoski *et al*., 2009; Peticca *et al*., 2013; Seidah *et al*., 2014]. Dado que en humanos PCSK9 está fisiológicamente controlado por insulina y estrógenos [Lakoski *et al*., 2009; Persson *et al*., 2012], se ha propuesto que esta proteína podría modular también los niveles de LDL-C durante el embarazo. Si bien en embarazos con niveles de lípidos normales no hay cambios en los niveles de PCSK9 [Peticca *et al*., 2013], se desconoce si esta proteína es regulada en embarazos en los que los niveles de LDL-C se elevan más allá del rango fisiológico.

Aunque los factores previamente mencionados regulan la disponibilidad de lípidos y se asocian con la hipercolesterolemia materna fisiológica, y aun sabiendo que niveles elevados de colesterol materno se asocian con alteraciones de la vasculatura fetal, actualmente se desconocen los factores que gatillarían el desarrollo de hipercolesterolemia materna suprafisiológica [Herrera y Desoye, 2016].

1.1.3. Consecuencias de la hipercolesterolemia materna suprafisiológica sobre el feto

La hipercolesterolemia tiene efectos sobre el feto, entre los que se encuentran la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y la ateroesclerosis.

La disfunción endotelial en embarazos con HC está descrita tanto para la vasculatura materna, como para la feto-placentaria. La HC se asocia con una menor relajación dependiente del endotelio en anillos de la vena umbilical humana, lo que se correlaciona negativamente con los niveles maternos de CT y LDL-C [Leiva *et al*., 2013, 2015, 2016b]. Los mecanismos implicados en este fenómeno, que se han estudiado en células endoteliales de la vena umbilical humana

(HUVEC), incluyen alteración en las vías requeridas para la síntesis de óxido nítrico (NO) por la óxido nítrico sintasa (NOS): la vía L-arginina/NO [Leiva *et al*., 2013] y la vía arginasas (ARG)/urea [Leiva *et al*., 2013]. En paralelo, se ha demostrado que estos cambios no solo ocurren en vena de cordón umbilical, sino que también en vasos de la microvasculatura placentaria [Fuenzalida *et al*., 2018].

Otra consecuencia de HC es un aumento en los marcadores de estrés oxidativo, tanto en células de vena de cordón umbilical (HUVEC) [Leiva *et al*., 2016b] como en la sangre materna, en la neonatal y en la placenta [Liguori *et al*., 2007]. En conjunto, esta información sugiere que HC se asocia con estrés oxidativo tanto en la madre como en el feto en desarrollo, lo que podría relacionarse a la vez con la disfunción endotelial previamente descrita [Contreras-Duarte *et al*., 2019].

Finalmente, la HC se ha asociado con un aumento en el tamaño de las lesiones ateromatosas en la vasculatura fetal, tanto en la aorta [Napoli *et al*., 1997] como en la carótida [Napoli *et al*., 1999b]. Estos cambios progresan durante la niñez y es así que en niños (2-14 años) gestados en un embarazo HC el tamaño de las lesiones ateromatosas a nivel de la aorta es mayor que el de niños gestados en un embarazo C, incluso cuando los niveles de lípidos entre ambos grupos de niños son comparables [Napoli *et al*., 1999a]. Estos resultados sugieren que la exposición intrauterina a niveles elevados de colesterol materno podría favorecer un perfil pro-aterogénico fetal (niveles de lípidos, función de lipoproteínas, función endotelial, entre otros), y que el control de la dislipidemia materna durante el embarazo podría tener como beneficio la prevención temprana de la disfunción endotelial y el desarrollo o progresión de la ateroesclerosis [Palinski y Napoli, 2002; Wild *et al*., 2015; Leiva *et al*., 2016a].

Si bien se ha demostrado una asociación entre dislipidemia materna, en particular los niveles elevados de CT y LDL-C, y disfunción endotelial, estrés oxidativo y ateroesclerosis fetal [Napoli *et al*., 1997; 1999a; Leiva *et al*., 2013; 2015; 2016b], es importante considerar la presencia de la barrera placentaria que separa la circulación materna de la fetal. En este sentido, el colesterol materno debe ser transportado desde la circulación materna a la fetal a través de la placenta, para ser entregado finalmente a las lipoproteínas fetales [Palinski, 2009]. Sin embargo, si HC modifica el tráfico de colesterol a través de este órgano es algo que aún requiere ser estudiado.

1.2. UNIDAD FETO-PLACENTARIA

La placenta es una barrera física y metabólica entre la circulación fetal y materna. El desarrollo normal de la placenta y su función son cruciales para sostener el adecuado desarrollo y crecimiento fetal [Burton y Fowden, 2015]. Debido a que la placenta y el cordón umbilical carecen de inervación autónoma [Marzioni *et al.,* 2004], el equilibrio entre la síntesis, liberación y biodisponibilidad de vasoconstrictores y vasodilatadores circulantes y localmente liberados, tal como el NO, es crucial para mantener el control hemodinámico feto-placentario [Leiva *et al.,* 2016a]. Este fenómeno mantiene un correcto flujo bidireccional de nutrientes entre la madre y el feto incluyendo oxígeno, glucosa, aminoácidos y colesterol, entre otras moléculas [Burton y Fowden, 2015]. En el contexto fisiológico, diferentes patologías del embarazo están relacionadas con daño de la función placentaria, afectando el tráfico de nutrientes desde la madre al feto, fenómeno que tiene consecuencias en el feto en desarrollo, que se mantienen incluso luego de la vida prenatal y que predisponen al desarrollo de enfermedades en el adulto [Barker y Thornburg, 2013].

La placenta humana es de tipo hemocorial, es decir, la sangre materna, introducida por las arterias espirales en el espacio intervelloso, entran en contacto directo con las vellosidades trofoblásticas que contienen los capilares fetales. Existen dos capas celulares principales que separan la circulación fetal y materna en la placenta humana: el *endotelio fetal* de los capilares y las *células del trofoblasto* (citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto) [Kaufmann *et al.,* 1994]. La capa de células del sincitiotrofoblasto está soportada por una *membrana basal* subyacente. Estas tres estructuras constituyen colectivamente la barrera placentaria.

1.2.1. Células del sincitiotrofoblasto

El sincitiotrofoblasto es el epitelio transportador de la placenta humana, el sincitio es generado por la fusión de los citotrofoblastos subyacentes. En el embarazo temprano, las células citotrofoblásticas son muy abundantes, creando una capa celular continua entre el sincitio y los capilares fetales. Sin embargo, al final del embarazo las células citotrofoblásticas son menos abundantes [Jansson *et al.,* 2009]. El sincitiotrofoblasto tiene dos membranas plasmáticas polarizadas: la membrana plasmática microvellositaria apical (MMV), dirigida hacia la sangre materna en el espacio intervelloso y la membrana plasmática basal (MB) hacia el capilar fetal. Se han descrito marcadores en la placenta para MMV como la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y ferroprotina 1 (FPN-1) para MB [Rosario *et al.,* 2016; Lager *et al.,* 2016]. La naturaleza sincitial del sincitiotrofoblasto permite una función de barrera relativamente estrecha, ya que no existen espacios intercelulares disponibles para el transporte de moléculas grandes o grandes volúmenes de fluido. De otra manera, en las células del sincitiotrofoblasto se expresan de manera funcional múltiples receptores y transportadores que permiten el tráfico de macromoléculas, regulando el transporte placentario. Por lo tanto, el estudio del transporte de nutrientes en células del

sincitiotrofoblasto sin polarizar o como modelo polarizado puede proporcionar información importante sobre el transporte desde la circulación materna a la placenta, en embarazos normales y patológicos [Jansson *et al.,* 2009].

1.3. TRÁFICO DE COLESTEROL

Como ya se describió, el colesterol es una molécula requerida en altas cantidades por el feto en desarrollo, quien lo obtiene tanto de la síntesis endógena como desde las lipoproteínas maternas [Palinski, 2009; Woollett, 2011]. La relevancia fisiológica del tráfico de colesterol desde la circulación materna a la fetal a través de la placenta es apoyada por distintas líneas de evidencia, entre las que destacan: (1) fetos con una deficiencia en la síntesis de colesterol son viables y tienen esteroles en los diferentes tejidos [Merkens *et al*., 2004; Nowaczyk y Irons, 2012]; (2) la concentración de colesterol es mayor en vena umbilical que en arteria umbilical [Parker *et al*., 1983]; (3) en la placenta se expresan receptores para lipoproteínas y transportadores de colesterol [Palinski, 2009]; (4) en modelos animales infundidos con LDL y HDL marcadas es posible detectar la señal en la sangre y tejidos fetales [Yoshida y Wada, 2005; Burke *et al*., 2009] y (5) niveles elevados de colesterol materno se asocian con el desarrollo de ateroesclerosis en la vasculatura fetal [Napoli *et al*., 1997; 1999a], y niveles disminuidos de colesterol se asocian con bajo peso al nacer y microcefalia [Edison *et al*., 2007].

Si bien el feto en desarrollo requiere altas cantidades de colesterol, la acumulación intracelular puede ser letal para las células, por lo que existen mecanismos de protección para prevenir sus efectos tóxicos [Tabas, 2002]. En general, la concentración celular de colesterol se regula mediante factores de transcripción que responden a los lípidos y una serie de mecanismos post-transcripcionales y post-traduccionales, que controlan la biosíntesis, captación (ingreso),

eflujo (salida de colesterol), metabolismo oxidativo y almacenamiento de este esterol [Soffientini y Graham, 2016].

1.3.1. Biosíntesis de colesterol

La biosíntesis de colesterol, que ocurre principalmente a nivel hepático y también en otros órganos como el intestino y la placenta, ocurre enzimáticamente en múltiples reacciones a partir de acetil-CoA en el retículo endoplásmico. Una vez sintetizado, este esterol es dirigido al aparato de Golgi y membrana plasmática, o esterificado vía acil CoA: colesterol acil transferasa (ACAT1/2) y almacenado como gotas lipídicas citosólicas de CE [Khor *et al.,* 2013; Rogers *et al.,* 2015]. La reacción limitante en la biosíntesis del colesterol es la conversión de β-Hidroxi β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) en mevalonato, catalizada por la HMG-CoA reductasa. Esta enzima está estrechamente regulada, tanto a nivel transcripcional como post-traduccional, y es el blanco farmacológico de las estatinas. En la regulación transcripcional de la síntesis de colesterol participa el factor SREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a los esteroles), el que se presenta en tres isoformas: -1a, -1c y -2. SREBP-1a se expresa constitutivamente en las células como un regulador de baja especificidad del metabolismo de los ácidos grasos y del colesterol, mientras que SREBP-1c y SREBP-2 son inducibles y promueven la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo de ácidos grasos y colesterol, respectivamente [Eberle *et al.,* 2004; Ye y DeBose-Boyd, 2011; Shimano y Sato, 2017].

1.3.2. Captación de colesterol

Además de ser sintetizado intracelularmente, el colesterol se puede incorporar a las células a partir de las LDL y HDL del plasma por endocitosis mediada por receptor o captación

selectiva de colesterol en la superficie celular, respectivamente. Las LDL se unen a su receptor LDLR en la superficie celular y el complejo receptor- lipoproteína es endocitado. Posteriormente, el LDLR se recicla a la superficie celular, mientras que las partículas de LDL se hidrolizan completamente en los lisosomas para formar colesterol libre y ácidos grasos, mediante la acción de la lipasa ácida lisosomal/colesterol esterasa [Goldstein y Brown, 2015].

A diferencia de la captación de colesterol LDL, el colesterol HDL se incorpora a las células mediante un mecanismo no endocítico. Además, SR-BI es un receptor endocítico genuino ya que media la internalización de los lipopolisacáridos, así, es posible que SR-BI también medie la endocitosis de HDL. Esta conexión fue descrita por primera vez por el grupo de Tall: sus experimentos en hepatocitos polarizados y células renales mostraron que SR-BI media el transporte de HDL al compartimento de reciclaje endosomal y las regiones de la membrana apical [Silver *et al*., 2001]. Estudios del grupo de Röhrl y Stangl mostraron una endocitosis concomitante de SR-BI y HDL que fue seguida por la resecreción de partículas. La resecreción de HDL podría estar relacionada con el colesterol de eflujo, ya que las partículas de HDL secretadas se enriquecieron en colesterol celular [Pagler *et al*., 2006].

El receptor de HDL, SR-BI, es una proteína integral de membrana que se encuentra principalmente en el hígado, tejidos esteroidogénicos y la placenta. Las partículas HDL se unen directamente a SR-BI, el que facilita la transferencia selectiva de colesterol desde las HDL a la membrana plasmática, sin internalización de la lipoproteína [Rigotti *et al.,* 2003]. Las HDL con un menor contenido de colesterol se liberan nuevamente al espacio extracelular, mientras que los ésteres de colesterol transferidos se hidrolizan mediante colesterol éster hidrolasas neutras extra-lisosomales y se transportan hacia el retículo endoplásmico [Leiva *et al.,* 2011].

La captación de colesterol LDL se regula a nivel transcripcional principalmente por factores como SREBP-1a y 2, a través del aumento en la transcripción de LDLR [Shimano y Sato, 2017]. A nivel post-traduccional, la disponibilidad del receptor de LDL es regulada por la proteína PCSK9 que media la degradación lisosomal del receptor [Seidah, 2016]. La captación de HDL se regula de manera transcripcional por SREBP-1a, LXR α y β, FXR (receptor X farnesoide), PXR (receptor X de pregnano), PPAR α y γ (receptores activados por proliferadores peroxisomales) y receptores de estrógeno α y β [Leiva *et al*., 2011; Kardassis *et al*., 2015]. A nivel post-traduccional, un ejemplo de regulación es la interacción de SR-BI con la proteína CLAMP (*C-terminal Linking and Modulating Protein*) o PDZK1, la cual estabiliza la expresión del receptor en la superficie celular [Ikemoto *et al*., 2000; Kocher *et al*., 2003].

1.3.3. Eflujo de colesterol

El eflujo de colesterol hacia distintos aceptores extracelulares ocurre a través de diferentes transportadores pertenecientes a la super-familia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*). La sub-familia A de los transportadores ABC, de tipo 1 (ABCA1), media el eflujo de colesterol desde la membrana plasmática hacia precursores como HDL discoidales pobres en lípidos o ApoA-I [Wang *et al*., 2000]. Por otra parte, la sub-familia G de los transportadores ABC, de tipo 1 (ABCG1), media el eflujo de colesterol hacia partículas de HDL esféricas cargadas de lípidos (HDL maduras) [Wang *et al.,* 2004]. Adicionalmente a ABCA1 y ABCG1, se ha descrito que SR-BI también puede participar en el eflujo de colesterol hacia partículas de HDL maduras en macrófagos, hepatocitos y células reñales [Rigotti *et al*., 2003; Phillips, 2014; Pagler *et al*., 2006; de la Llera-Moya *et al*., 1999]. El eflujo vía ABCA1 y ABCG1 se regula de manera transcripcional principalmente por LXR α y β. De manera post-traduccional, la disponibilidad de ABCA1 en la

superficie celular es regulada por múltiples factores, entre los que destacan la interacción con ApoA-I [Arakawa *et al*., 2004], la proteasa calpaina [Nagao *et al*., 2012], la enzima serina palmitoil-transferasa 1 (SPTLC1) [Tamehiro *et al*., 2008] y distintas proteínas que regulan el tráfico hacia la membrana celular [Kardassis *et al*., 2015]. La regulación post-traduccional de ABCG1 incluye fosforilación y palmitoilación de la proteína, lo que regula la estabilidad del transportador en la membrana plasmática [Gu *et al*., 2013].

1.3.4. Tráfico de colesterol en la placenta

El tráfico de colesterol a través de la placenta, así como también los mecanismos involucrados y los factores que podrían regular y modular la transferencia de colesterol desde la madre al feto, se han propuesto como un evento clave en HC, ya que estos mecanismos podrían determinar la contribución de esta condición en las alteraciones vasculares anteriormente descritas [Palinski *et al.,* 2009; Zhang *et al.,* 2017]. Para que ocurra la transferencia de colesterol, este lípido materno debe cruzar las dos capas celulares principales de la placenta (sincitiotrofoblasto y endotelio), de manera de ingresar finalmente a la circulación fetal [Palinski *et al.,* 2009; Stefulj *et al.,* 2009; Aye *et al.,* 2010; Leiva *et al.,* 2013].

Las células del sincitiotrofoblasto son células polarizadas responsables del intercambio de nutrientes y otras moléculas entre la circulación materna y la fetal. Estas células presentan una membrana apical en contacto con la sangre materna y una membrana basal en contacto con las células endoteliales placentarias. Así, la expresión de proteínas, de receptores o transportadores de colesterol en uno u otra membrana de células del sincitiotrofoblasto determina la direccionalidad de las moléculas liberadas [Jansson *et al*., 2009].

Es importante destacar que hay eventos del tráfico de colesterol placentario que aún no han sido estudiados. Se ha demostrado que en células del sincitiotrofoblasto y endoteliales de la placenta se expresa LDLR [Furuhashi *et al.,* 1989; Kamper *et al*., 2017; Pecks *et al*., 2016], y SR-BI [Wadsack *et al.,* 2003; Stefulj *et al*., 2009]. Luego de ser captado por células del sincitiotrofoblasto, el colesterol sale de estas células por el proceso de eflujo vía los transportadores del tipo ABCA1 y ABCG1 [Aye *et al*., 2010]. En macrófagos, hepatocitos y células renales, SR-BI participa también en el eflujo de colesterol [Pagler *et al*, 2006; de la Llera-Moya *et al*., 1999]; sin embargo, si SR-BI participa en este proceso en células del sincitiotrofoblasto placentario, es desconocido. Por otra parte, no hay estudios que demuestren cual(es) es(son) la(s) molécula(s) que cumplen el rol de aceptor del colesterol que sale de las células del sincitiotrofoblasto [Desoye *et al*., 2011; Woolett, 2011]. Se ha demostrado que las células del sincitiotrofoblasto pueden secretar ApoB; además, se ha observado expresión de LDLR en células estromales de la vellosidad coriónica, no obstante, el rol funcional de esta lipoproteína en el proceso de tráfico de colesterol es desconocido [Kamper *et al*., 2017]. Por otra parte, se ha demostrado también que la placenta y células del sincitiotrofoblasto son capaces de secretar ApoA-I y ApoE, y esta secreción es hacia la membrana apical y basal, evaluado en el modelo de sincitiotrofoblasto sembrados en Transwell® recubiertos con matrigel [Melhem *et al*., 2019].

Dado que las células del sincitiotrofoblasto son células polarizadas que expresan las proteínas requeridas para la captación y el eflujo de colesterol, la expresión de estos receptores y transportadores en uno u otro polo celular podría relacionarse con el flujo de colesterol hacia la circulación fetal (expresión en cara basal) y también hacia la circulación materna (expresión en cara apical), lo que podría ocurrir eventualmente como una forma de protección ante los niveles elevados de colesterol materno [Aye *et al.,* 2010]. Recientemente se determinó la expresión de

ABCA1 en células del sincitiotrofoblasto polarizadas. Esto trabajo determinó su expresión en la cara apical (hacia la circulación materna), sugiriendo la participación de este transportador en el proceso de eflujo hacia la circulación materna [Kallol *et al*., 2018].

Como se mencionó anteriormente, la expresión de los receptores LDLR y SR-BI, así como también la de los transportadores ABCA1 y ABCG1, es regulada por factores que se modulan en respuesta a cambios en el contenido de esteroles intracelulares u oxiesteroles, por lo que eventualmente podrían ser regulados en respuesta a una hipercolesterolemia materna como la descrita en HC. Respecto a la regulación del tráfico de colesterol en embarazos con HC, la información es acotada e indica que esta condición se asocia con un aumento en el número de copias del mRNA para LDLR y ABCG1, sin cambios en SR-BI o ABCA1 [Zhang *et al*., 2017]. En un grupo de embarazadas con niveles elevados de CT y también niveles elevados de triglicéridos, se describió un aumento en los niveles de SREBP-2 en homogenizados de placenta [Marseille-Tremblay *et al.,* 2008] y una disminución de ~60% en la expresión proteica de LDLR, sin cambios en la expresión de SR-BI comparado con mujeres embarazadas con niveles normales de ambos lípidos [Ethier-Chiasson *et al.,* 2007]. Sin embargo, no hay trabajos que evalúen si estos cambios son inducidos específicamente por niveles elevados de CT o por el aumento en los triglicéridos, los tipos celulares (sincitiotrofoblasto o endotelio) que estarían involucrados en esta regulación, ni si los cambios en la expresión de estos receptores se correlacionan con cambios en su función o en el flujo de colesterol hacia la circulación materna o fetal.

1.4. COMENTARIO FINAL

Considerando que (1) la HC ocurre en ~30% de los embarazos, (2) que esta condición se asocia con disfunción endotelial y lesiones ateromatosas en la vasculatura feto-placentaria, (3) que

los receptores y transportadores de colesterol son modulados en respuesta a niveles elevados de esteroles, (4) que la placenta es la barrera metabólica entre la madre y el feto, y que el tráfico de colesterol desde la circulación materna a la fetal depende de este órgano, es factible sugerir que la HC podría modular el tráfico de colesterol en la placenta. Un estudio de esta naturaleza se hace relevante, considerando además que la HC no se relaciona con cambios en el perfil lipídico del recién nacido, sugiriendo la presencia de mecanismos compensatorios en la placenta que regularían el tráfico de colesterol de la madre al feto. Actualmente se desconocen cuáles son los posibles mecanismos involucrados y de qué manera la condición HC podría regular la captación y el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto [Ethier-Chiasson *et al*., 2007; Marseille-Tremblay *et al*., 2008; Leiva *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2017].

De esta forma y considerando los antecedentes expuestos, la presente tesis propone estudiar si los niveles elevados de colesterol materno podrían modular el tráfico de colesterol en la placenta humana, modificando tanto la expresión como la actividad de los receptores y transportadores involucrados en este proceso, en células del sincitiotrofoblasto.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.Hipótesis

La hipercolesterolemia materna (HC) altera el tráfico de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de la placenta humana disminuyendo la captación y el eflujo de este lípido hacia lipoproteínas fetales.

2.2.Objetivos generales y específicos

2.2.1. Objetivos generales

1. Determinar si la HC modifica la captación de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas.
2. Determinar si la HC modifica el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas.
3. Determinar si la HC modifica el contenido de colesterol en tejido placentario y células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas.

2.2.2. Objetivos específicos

Para el objetivo general 1

1.1 Determinar si la HC modifica la abundancia proteica y localización de los receptores LDLR y SR-BI en tejido placentario.

1.2 Determinar si la HC modifica la abundancia proteica y localización de los receptores LDLR y SR-BI en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

1.3 Determinar si la HC modifica la captación de LDL-DiI y HDL-DiI en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

Para el objetivo general 2

2.1 Determinar si la HC modifica la abundancia proteica y localización de los transportadores de colesterol ABCA1, ABCG1 y SR-BI en tejido placentario.

2.2 Determinar si la HC modifica la abundancia proteica y localización de los transportadores de colesterol ABCA1, ABCG1 y SR-BI en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

2.3 Determinar si la HC modifica el eflujo de colesterol en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

Para el objetivo general 3

3.1 Determinar si la HC modifica el contenido de colesterol total, esterificado y no esterificado en tejido placentario y en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

3.2 Determinar si la HC modifica la expresión de HMG-CoA reductasa y ACAT-1 en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto de la placenta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Equipos

- Balanza analítica, Adam
- Centrifuga, Herlme
- Centrifuga refrigerada para microtubos, Labnet, Prism
- Ultracentrifuga rotor 55 Ti, Beckman Coulter
- Baño termorregulador, Memmert
- Campana de bioseguridad, Faster bio48
- Incubador de cultivo celular, Shel Lab
- Microscopio óptico de luz, Leica
- Microtomo, Leica
- Vortex Mixer, FinePCR
- Agitador orbital Shaker SO3, Stuart Scientific
- Baño seco, Rocker
- pH metro, Oakton
- Lector de microplacas Multiscan EX, Thermos
- Camara de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad
- Fuente de poder Bio-Rad
- Procesador de imágenes ChemiDoc-It Imaging System, UVP

- Fluorímetro M200 Pro con módulo de control de gases y temperatura, TECAN
- Medidor de voltios-ohmios Millicell ERS-2

3.1.2. Reactivos y materiales de uso general

- Buffer fosfato salino (PBS) [NaCl 136 mM, KCl 2,7 mM, Na2HPO4 7,8 mM, KH2PO4 1,5 mM, 37°C, pH 7,4], Merck
- Etanol, Merck
- Tripsina 0,25% y 2.5%, Life technologies
- Papel aluminio
- Cámara de Neubauer
- Criotubos, Corning
- Vasos precipitados de 100 mL y 500 mL
- Matraz 100 mL, 500 mL y 1000 mL
- Probetas graduadas de 50 mL, 100 mL, 500 mL y 1000 mL
- Pipetas serológicas de 10 mL y 25 mL, Falcon
- Tubos de centrífuga de 15 mL y 50 mL, Orange Scientific
- Microtubos de centrífuga 1,5 mL y 2 mL, Axigen
- Jeringas de 1 mL y 10 mL, BD Plastipak
- Filtros para jeringas 22 µm y 45 µm, Biofil
- Placas de cultivo celular 35 mm2, 60 mm2, 100 mm2, Falcon
- Placas de cultivo 6, 12, 24 y 96 pocillos, Falcon
- Micropipetas de 2 µL, 10 µL, 20 µL, 200 µL y 1000 µL, Labnet

3.1.3. Reactivos y materiales para extracción y cuantificación de proteínas

- Buffer de lisis [Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, Tritón X-100 0,5%, SDS 1% (Winkler)]
- Kit de Micro BCA para cuantificación de proteínas, Thermo Scientific
- Reactivo de Bradford, Bio-Rad
- Albúmina de suero bovino (BSA), Winkler
- KOH 0,5 N, Winkler
- Rastrillo, Cell scraper, Falcon

3.1.4. Reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida

- Solución A [Tris-HCl 1500 mM, SDS 0,4% pH 8,8]
- Solución B [Tris-HCl 500 mM, SDS 0,4% pH 6,8]
- Acrilamida-Bisacrilamida 40%, Merck
- Persulfato de amonio, Merck
- N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (Temed), Merck
- Estándar de peso molecular pre-teñido, Thermo Scientific
- Ponceau S (Sigma Aldrich)
- Buffer de carga 5X, Thermo Scientific
- Buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS) 10X, Winkler

3.1.5. Reactivos y materiales para western blot

- Buffer de transferencia [Tris 25 mM, glicina 192 mM (Calbiochem), 10% metanol (Winkler)]
- Membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF), Thermo Scientific
- Solución de bloqueo:

-Tris base-Tween 20 (TBS-T) [TBS 1X, Tween 20 0,1% (Bio-Rad), leche descremada 5% (Calo)]

-TBS-T BSA 3%, sin leche

-Solución Blotto [Tris 50 mM, NaCl 101 mM, Tween 20 0,1%]

- Sistema de quimioluminiscencia SuperSignal West Femto Chemiluminiscence, Thermo Scientific
- Sistema de quimioluminiscencia SuperSignal West Dura Chemiluminiscence, Thermo Scientific

3.1.6. Anticuerpos

- Anticuerpos primarios para proteínas humanas: *anti*-Apolipoproteína A I (ApoA-I) hecho en conejo (abcam), *anti*-ApoB hecho en conejo (abcam), *anti*-LDLR hecho en conejo (Novus Biologicals), *anti*-SR-BI hecho en conejo (Novus Biologicals), *anti*-ABCA1 hecho en conejo (Novus Biologicals), *anti*-ABCG1 hecho en conejo (Novus Biologicals), *anti*-HMGCR hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnologies), *anti*-Plap hecho en conejo (BioCare Medical), *anti*-FPN1 hecho en conejo (Invitrogen), *anti*-citoqueratina 7 hecho en ratón (Dako), *anti*-β-actina hecho en ratón (Sigma-Aldrich).
- Anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP): anti-IgG de ratón (Sigma-Aldrich) y anti-IgG de conejo (Sigma-Aldrich). Anticuerpos conjugados a fluoróforos: anti-IgG de conejo Alexa 488 (Invitrogen), anti-IgG de conejo Alexa 568 (Invitrogen), anti-IgG de ratón Alexa 488 (Invitrogen).
- Cócteles de anticuerpos *anti*-CK7, marcado con Alexa Fluor 488® más *anti*-vimentina etiquetado con Alexa Fluor 647®.

3.1.7. Reactivos y materiales para inmunofluorescencia en tejido

- Formalina 10%, Sigma-Aldrich
- Parafina Histoplast, Thermo scientific
- Xileno, Winkler
- Alcohol 100%, 98%, 75%, y 50%, Merck
- Buffer de citrato (Ácido cítrico 10 mM, pH 6.0)
- Buffer de bloqueo [Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, Triton x-100 0,05% (Merck) y BSA 5%
- Dapi, Invitrogen
- Medio de montaje acuoso Fluoromount, Sigma
- Portaobjetos cargados positivamente (*Super frost Plus*, Thermo Scientific)
- Cubreobjetos, TCL

3.1.8. Reactivos para RT-PCR

- Agua libre de nucleasas (Ultrapure™ DNAse/RNAse-Free Distilled Water, Invitrogen)
- Trizol (Thermo Scientific)
- Kit para transcripción reversa (High-Capacity sDNA Reverse Transciption Kit, Applied Biosystem)
- Master mix para la reacción de PCR tiempo real (Fast SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystem)
- Placas para PCR tiempo real (MicroAmp™ Fast Optical 48-well Reaction Plate, 0,1 mL, thermo Scientific)

- Film adhesivos para placas de PCR tiempo real (MicroAmp™ Optical Ahesive Film, Thermo Scientific)

3.1.9. Reactivos y materiales para cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto

- Solución salina 0,9% [Hepes-Tris 10 mM pH 6,95 (Calbiochem), NaCl 153 mM (Merck)]
- Solución salina tamponada de Hank (HBSS) pH 7,4 [CaCl2 1,26 mM (Sigma), MgSO4·7H2O 0,81 mM (BDH AnalaR), HBSS 10X [KCl 53,7 mM (Winkler), KH2PO4 4,41 mM (Winkler), NaCl 1369 mM, Na2HPO4 3,38 mM (Merck), glucosa 55,5 mM (BDH AnalaR)], Hepes 1000 mM (Calbiochem)]
- DNAsa tipo I, Wortington
- Tripsina 2,5%, Life technologies
- NBCS, Life Technologies
- Medio Eagle modificado con medio Dulbecco (DMEM) alto en D-glucosa, Life Technologies, suplementado con NaHCO3 44 mM, Winkler
- Percoll, GE Healthcare Life Sciences
- Medio Eagle con mezcla de nutrientes 12 modificado con medio Dulbecco (DMEM/F12), Life Technologies, suplementado con NaHCO3 14,3 mM, 10% SFB y 1% penicilina-estreptomicina
- Filtros, Cell strainer 100 μm, Falcon
- Gasa, Primus Medical
- Embudo de filtración
- Tubos de centrífuga Ultra-Clear (25 x 89 mm), Beckman Coulter
- Insertos Transwell®, Falcon
- Matrigel suplementado con factores de crecimiento, Corning

3.1.10. Reactivos y materiales para purificación y marcaje de lipoproteínas

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM pH 7,4, Gibco
- Aprotinina 2 μg/mL en agua, Santa Cruz
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM en etanol, Merck
- 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina perclorato (DiI; DiIC18), Life Technologies
- Dimetilsufóxido anhidro, Life Technologies
- KBr, Merck
- Solución de diálisis 10X, pH 7,4 [NaCl 1500 mM, EDTA 3,42 mM en agua destilada (dH2O)]
- Solución de tinción con azul de Coomassie [Coomasie R250 0,2% (Bio-Rad), isopropanol 25%, ácido acético 10%]
- Algodón, Pharma Chile
- Agujas pericraneales (mariposa), Terumo
- Tubos para extracción de sangre por sistema de vacío BD Vacutainer
- Tubos de centrífuga Ultra-Clear (13 x 51 mm), Beckman Coulter
- Membranas de diálisis, Spectrum Labs
- Cierres para bolsas de diálisis, Spectrum Labs

3.1.11. Reactivos y materiales para captación y eflujo de colesterol

- BSA libre de ácidos grasos (FFA), US Biological
- Bloqueador del transporte de lípidos-1 (BLT-1), Sigma
- Buffer hipotónico [50% dH2O, 50% medio DMEM alto en glucosa sin SFB]

- Buffer isotónico libre de potasio [NaCl 140 mM - Hepes 20 mM (pH 7,4), CaCl2 1 mM, 1 mM MgCl2, glucosa 5,55 mM]
- Colesterol tritiado, [1,2-3H(N)]-cholesterol, PerkinElmer
- Tubos de centelleo
- Líquido de centelleo Ecoscint, National Diagnostic

3.1.12. Reactivos para medición de contenido de colesterol

- Kit Amplex™ Red colesterol Assay Kit
- Cloroformo (Merck)
- Metanol (Sigma aldrich)

3.2. METODOS

3.2.1. Obtención de las muestras biológicas

Este estudio incluyó embarazadas atendidas en el Hospital Clínico UC CHRISTUS (Chile, n= 48) y Lindenhofgruppe (Suiza, n=12). Se obtuvieron placentas de embarazos normales de término, las cuales al momento del parto se recolectaron y trasladaron en condiciones asépticas al laboratorio. Al momento del parto, se obtuvo adicionalmente una muestra de suero materno (5 mL) y una muestra de suero de sangre de cordón umbilical (5 mL). Inmediatamente después de la recolección de la placenta (y solo durante las primeras 4 horas posteriores al parto), se extrajo trozos representativos de toda la placenta, los cuales fueron mantenidos en solución salina estéril. Se obtuvo la información clínica de las embarazadas con apoyo del personal médico de la Maternidad del Hospital. Las mujeres embarazadas invitadas a participar en este estudio fueron seleccionadas basadas en los siguientes criterios de inclusión: cursar con embarazos únicos y de término (≥ 37 semanas de gestación) y que no presenten infecciones intrauterinas o complicaciones médicas u obstétricas. Los criterios de exclusión fueron: embarazos cursando con obesidad (índice de masa corporal (IMC) a término del embarazo >30), embarazos múltiples, malformaciones fetales, síndrome hipertensivo, preeclampsia, restricción del crecimiento uterino, diabetes mellitus gestacional y pre-gestacional, hipotiroidismo e hipertiroidismo.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada mujer embarazada incluida en el presente estudio, documento que fue previamente revisado y aceptado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile y por el Cantón de Berna en Suiza para las muestras respetivas de cada país.

3.2.2. Grupos de estudio

En este proyecto se consideraron dos grupos de estudio de acuerdo a los niveles de colesterol total (CT) materno al término del embarazo. El grupo C (control) incluyo embarazadas con niveles de CT ≤280 mg/dL y el grupo de mujeres con hipercolesterolemia suprafisiológica (HC) a embarazadas con niveles de CT >280 mg/dL [Leiva *et al.,* 2013, 2015].

3.2.3. Determinación de colesterol sanguíneo y triglicéridos

A todas las embarazadas admitidas en este estudio, se determinaron los niveles de colesterol total sanguíneo (CT), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y triglicéridos. Las mediciones fueron realizadas en suero de sangre de la vena braquial materna obtenida el día del parto.

El CT colesterol HDL y triglicéridos fueron determinados directamente con un ensayo colorimétrico enzimático estándar (Kit, Cobas Integra Colesterol (CHOLL), Cobas Integra HDL-Colesterol (HDL-C), Cobas Integra Triglicéridos (TRICL)) (Roche), en un analizador de series modular Cobas® 8000 (Roche) en el Laboratorio Clínico del Hospital Clínico UC CHRISTUS o en Lindenhofgruppe en Suiza. El colesterol LDL y VLDL fueron calculados por niveles de CT, colesterol HDL y triglicéridos, por aplicación de la ecuación de Friedewald's [Friedewald *et al.,* 1972; ATP III, 2002].

3.2.4. Purificación de lipoproteínas de adultos y neonatos

Para la purificación de lipoproteínas se utilizó un protocolo de ultra-centrifugación [Sreckovic *et al.,* 2013]. En breve, se obtuvo sangre de mujeres adultas sin patologías o embarazo, mujeres embarazadas y sangre de cordón umbilical en tubos con gel separador para obtener suero. De esta

forma, tras la obtención de las muestras, se centrifugaron los tubos (15 minutos, temperatura ambiente, 1500 RCF) y se extrajo el suero, al cual posteriormente se le añadió sacarosa (concentración final de 10%), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 10 mmol/L, pH 7,4), aprotinina (2 µg/mL) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; 1 mmol/L). Luego, se ajustó la densidad del suero con bromuro de potasio (KBr) a 1,24 g/mL con la siguiente fórmula (fórmula 1):

$$X = \frac{Vx\ (df - di)}{1 - 0{,}312\ x\ df}$$

Con X = mg de KBr; Vx = volumen requerido; df = densidad final; di = densidad inicial.

Luego, se agregó este suero con densidad ajustada a tubos de ultracentrífuga de 5 mL, sobre los que lentamente se añadió PBS (densidad = 1,006 g/mL) para la posterior generación de una gradiente de densidad. A continuación, se procedió a la ultracentrifugación (rotor SW 55 Ti, 4 horas, 15°C, 287000 RCF), se aislaron las bandas correspondientes a LDL (banda superior color amarillo pálido), HDL (banda intermedia color amarillo intenso) y el suero libre de lipoproteínas (SLL; fondo del tubo). Finalmente, se dializó cada producto por separado (LDL, HDL, SLL) a 4°C, en agitación constante por 48 horas en solución salina (mmol/L NaCl 150; EDTA 0,342; pH 7,4). Las LDL y HDL se conservaron a 4ºC en tubo sellado y saturado con nitrógeno, y el SLL se conservó a -20ºC. Se caracterizaron cada una de las fracciones obtenidas evaluando la concentración de colesterol y la expresión de ApoB y ApoA-I por western blot (Figura 1).

A

B

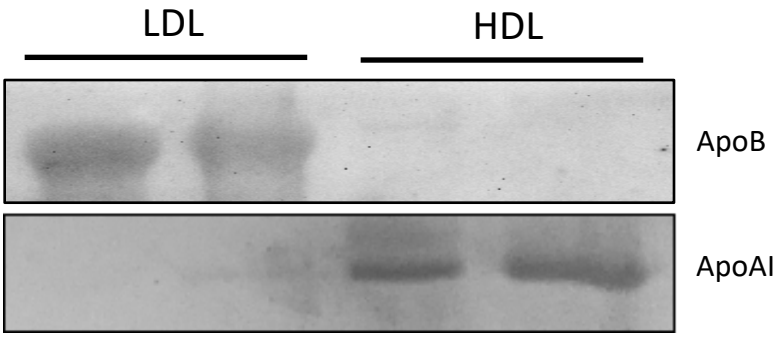

Figura 1. Purificación y abundancia proteica de ApoB y ApoA-I en lipoproteínas purificadas (LDL y HDL).

Se realizó la purificación de LDL, HDL y suero libre de lipoproteínas (A) y se determinó la expresión de ApoB y ApoA-I mediante western blot en LDL y HDL purificadas de sangre de voluntarios adultos sanos (B). Se utilizó el anticuerpo anti-ApoB y anti-apoA-I.

3.2.5. Marcaje de lipoproteínas

Las lipoproteínas LDL y HDL previamente purificadas fueron marcadas con el colorante fluorescente lipofílico DiI [Pitas *et al.,* 1981]. 1 mg de LDL o HDL purificadas se mezcló con 2 mL de SLL diluido a una concentración de 2,5 mg/mL en solución de fosfato salino (PBS; mmol/L NaCl 136; KCl 2,7; Na_2HPO_4 7,8; KH_2PO_4 1,5; pH 7,4). Luego, la mezcla fue filtrada (filtro de 0,45 µm para las LDL y de 0,22 µm para las HDL) y se adicionó 50 µL de 1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato (DiI; 3 mg/mL en DMSO) a cada tubo de reacción. La mezcla de reacción se incubó por 15 horas a 37°C en agitación suave y oscuridad. Posteriormente, la mezcla de reacción se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente a 400 RCF y se continuó trabajando con el sobrenadante, al que se le ajustó la densidad a 1,24 g/mL con KBr, según la fórmula 1. Finalmente, se ultra-centrifugaron las preparaciones en un rotor SW 55 Ti por 4 horas a 15°C a 287000 RCF. Se aislaron las bandas correspondientes a LDL y HDL, las que se dializaron y almacenaron como ya se describió en la sección anterior, obteniéndose finalmente LDL y HDL marcadas con DiI (LDL-DiI y HDL-DiI, respectivamente).

3.2.6. Cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto

Las células del citotrofoblasto (CTB) de placentas humanas de término fueron aisladas mediante un método de digestión enzimática con tripsina/DNAsa y gradiente de Percoll, adaptado de Kliman y colaboradores. Luego de 48 horas post-aislamiento, la totalidad de las células se encontraron en la forma de sincitiotrofoblasto (STB) [Kliman *et al.,* 1986; Rosario *et al.,* 2016]. Para la disección, se cortaron inicialmente secciones de la placenta con decidua y placa coriónica en cubos pequeños (3 cm^3), los que fueron lavados en solución salina (NaCl 0,9%). Posteriormente, se eliminó la decidua, la

placa coriónica, vasos sanguíneos, grasa y calcificaciones, de manera de obtener 30 gramos de tejido mecánicamente disgregado.

El tejido fue digerido enzimáticamente 3 veces consecutivas con una solución salina de Hank's con HEPES (HBSS; mmol/L KCl 5,37; KH_2PO_4 0,44; NaCl 136,9; Na_2HPO_4 0,34; glucosa 5,55; HEPES 100; $CaCl_2$ 1,26; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,81; pH 7,4), DNAsa (actividad total de 60000, 40000 y 30000, respectivamente para cada digestión) y tripsina (actividad total de 614000, 409000 y 315000, respectivamente para cada digestión) por 30 minutos a 37ºC en agitación constante (Tabla 1). Posteriormente, el sobrenadante de cada digestión enzimática fue filtrado, se le adicionará suero de ternero recién nacido (NBCS; 20%) y se centrifugó por 10 minutos (975 RCF, 20ºC). Tras esto, se removió el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio *Eagle* modificado con medio Dulbecco (DMEM) (6 mL). Luego, se adicionó esta suspensión celular a una gradiente de Percoll® preparada previamente en tubos de ultracentrífuga de 50 mL (gradiente del 10 al 70%), la que fue centrifugada por 20 minutos (1500 RCF, 20°C). Posteriormente, se colectaron en un solo tubo las células que se encontraron entre las bandas de Percoll® comprendidas entre 35 y 55% (Tabla 2) (Figura 2). Finalmente, se eliminó el Percoll® con lavados en medio DMEM y las células fueron sembradas a una densidad de 2000 células/mm^2 en medio de cultivo Medio Eagle con mezcla de nutrientes F-12 modificado con medio Dulbecco (DMEM/F12) con 10% de suero bovino fetal (SBF). Todos los ensayos serán realizados 72 horas posteriores a la siembra de las células. Para confirmar la naturaleza de los cultivos primarios obtenidos, se evaluó por microscopía de luz la aparición de células polinucleadas a partir de las 48 horas post-cultivo [Kliman *et al.,* 1986]. Adicionalmente, se evaluó por citometría de flujo las positividad de citoqueratina 7 (CK7; marcador de células epiteliales), vimentina (marcador de células mesenquimales) y CD31 (marcador de células endoteliales).

Tabla 1. Actividad de enzimas en cada digestión.

Digestión	Tripsina (actividad total; unidades BAEE)	HBSS (volumen Hank´s)	DNAsa (actividad total; unidades K)
1	614.250	138,9	60.000
2	409.500	92,6	40.000
3	315.970	69,1	30.000

Actividad total de tripsina, volumen de HBSS y actividad total de DNAsa requeridos para cada digestión del protocolo de cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas de término.

Tabla 2. Concentraciones de la gradiente de Percoll

Concentración Percoll (%)	Volumen Percoll (mL)	Agua (mL)	HBSS 10X (mL)	Volumem total (mL)
70	26,25	7,5	3,75	37,5
60	15	7,5	2,5	25
55	13,75	8,75	2,5	25
50	12,5	10	2,5	25
45	11,25	11,25	2,5	25
40	10	12,5	2,5	25
35	8,75	13,75	2,5	25
30	15	30	5	50
20	5	17,5	2,5	25
10	2,5	20	2,5	25

Volumen de Percoll, agua y HBSS requeridos para preparar las gradientes de Percoll para el protocolo de cultivo primario de células del sincitiotrofoblasto de placentas humanas de término. HBSS 10X: Solución salina tamponada de Hank concentrada diez veces.

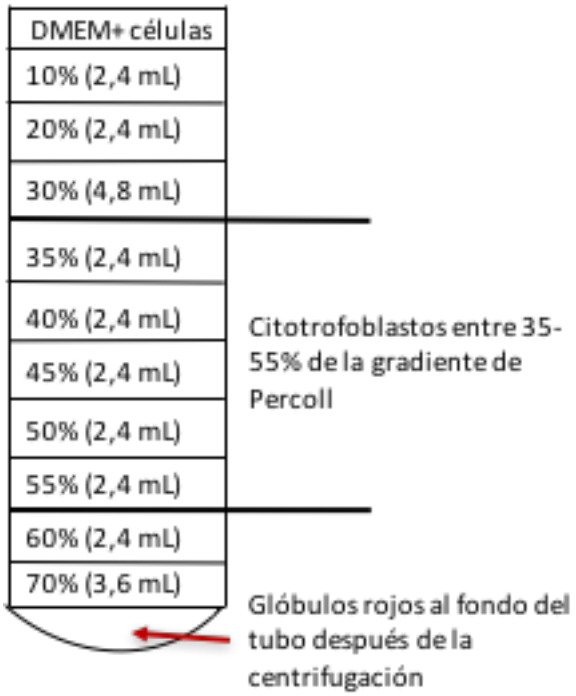

Figura 2. Diagrama de la gradiente de Percoll requerida para el cultivo primario de células del citotrofoblasto

Se indica el orden y volúmenes necesarios de cada solución de Percoll para realizar la gradiente de separación celular. En la parte superior de la gradiente, se deben adicionar las células digeridas desde la placenta humana. Se indica además las fracciones en las cuales se recuperarán las células del citotrofoblasto.

3.2.7. Morfología celular

En citotrofoblastos cultivados en placas convencionales de 24 pocillos se observó la morfología por microscopía. Después de 24, 48 y 72 horas de cultivo, se capturaron imágenes de campo claro de CTB y STB utilizando un microscopio invertido Leica. Las imágenes se procesaron con el software Leica correspondiente para comparar cambios en la morfología celular entre los días 1 y 3.

3.2.8. Análisis de citometría de flujo para evaluar pureza celular

La pureza de CTB y STB se evaluó mediante la tinción de las células del sincitiotrofoblasto con marcadores celulares específicos, seguido de un análisis de citometría de flujo. Las células se cultivaron en placas convencionales, se separaron con Tripsina (0.25%) y se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 minutos en hielo. Después de lavar con solución PBS, las células se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos a 4ºC y luego se permeabilizaron con Tween-20 al 0,5% (p/v) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para evaluar la pureza celular, se realizó una tinción doble de CTB y STB con cócteles de anticuerpos marcados directamente en la solución de bloqueo (5% de FBS, 0,1% de Tween-20 (p/v) en PBS). Los cócteles de anticuerpos contenían *anti*-CK7, marcado con Alexa Fluor 488® más *anti*-vimentina etiquetado con Alexa Fluor 647®. Las células se incubaron con el cóctel de anticuerpos respectivo durante 45 minutos en hielo, seguido de 2 lavados (1 minuto cada uno). Después de la centrifugación a 200 g durante 10 minutos a 4 °C, las células sedimentadas se suspendieron en PBS y se adquirieron por citometría de flujo. La adquisición y el análisis de datos para cada tinción se basaron en al menos 10,000 eventos y se realizaron utilizando BD FACSDiva ™ y el software FlowJo® versión 10. Dado que CTB y STB son células epiteliales, la tinción positiva para CK7 sirvió como marcador celular positivo [Maldonado-Estrada *et al*., 2004; Li *et al*., 2015]. Por otro lado, vimentina, conocida por teñir predominantemente células mesenquimales, fibroblastos y

células estromales [Maldonado-Estrada *et al*., 2004; Li *et al*., 2015; Zanetta *et al*., 2000], sirvió como marcador negativo para CTB y STB. Estos procedimientos de tinción permitieron la evaluación y cuantificación de posibles contaminaciones celulares por células mesenquimales, fibroblastos y células del estroma, respectivamente.

3.2.9. Ensayo de viabilidad celular

Se incubaron las células con medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB a 37ºC con 5% de CO_2 durante 24, 48 y 72 horas. Para el ensayo MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio) , se retiró el medio de cultivo celular y las células se lavaron tres veces con solución de PBS. El MTT se disolvió en PBS a una concentración de 5 mg/mL. A partir de esta solución madre, se agregaron 20 µL a cada placa de cultivo mas 100 µL del medio DMEM/F12 y las placas se agitaron suavemente e incubaron durante 4 horas en condiciones estándar a 37ºC con 5% de CO_2. Las células vivas, convierten el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) en el cristal de formazán de color azul oscuro no soluble, mientras que las células muertas no tienen la capacidad de convertirlo y, por lo tanto, no se tiñen. Después de 4 horas, el medio MTT se reemplazó con 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente para resolver completamente el formazán y el desarrollo del color. La absorbancia de las muestras a 570 nm fue determinada en un lector de microplacas (Tekan).

3.2.10. Polarización de células del sincitiotrofoblasto

Para lograr un cultivo polarizado, se procedió a sembrar las células de citotrofoblasto aisladas de acuerdo a la metodología anteriormente descrita (ver 3.2.6), en placas de cultivo con el inserto Transwell® con membrana de poliéster de 0,4 µm de poro, recubierto con Matrigel, como se ha

descrito [Hemmings y Guilbert, 2002; Huang *et al.,* 2016]. Se sembraron 1,2x10^6 células en placas de 12 pocillos o 4,2x10^6 células en placas de 6 pocillos (Figura 3). La confluencia celular y la formación de una monocapa polarizada fue monitorizada diariamente por la determinación de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp). Cuando el valor de TEER fue estable y el Papp disminuyó, se asumió que los cultivos están polarizados. Adicionalmente, se confirmó la monocapa por microscopía, además se determinó la polaridad utilizando marcadores de sincitiotrofoblasto y de la membrana apical de estas células: CK7 y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), respectivamente.

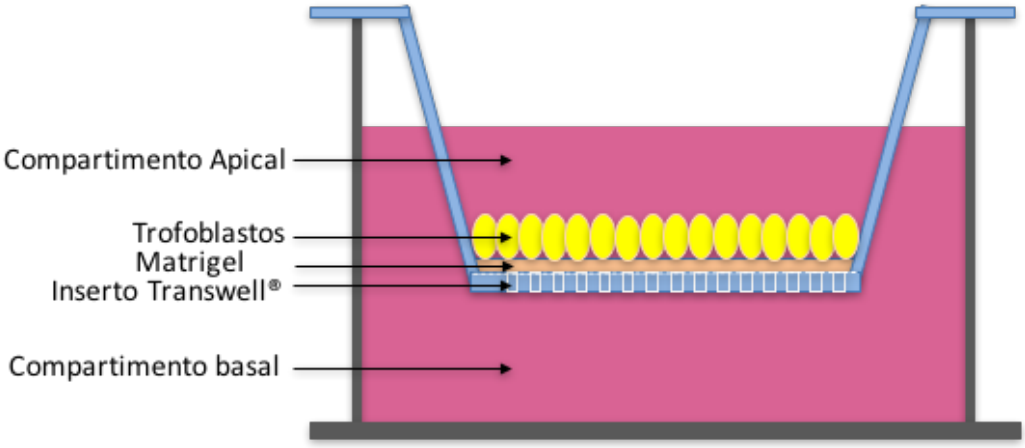

Figura 3. Establecimiento de la monocapa de sincitiotrofoblastos primarios humanos confluentes en insertos Transwell® recubiertos con matrigel.

Diagrama esquemático del modelo de Transwell® en el que se siembran células del sincitiotrofoblasto para lograr obtener un cultivo polarizado, con la membrana apical y basal (correspondientes al lado materno y fetal, respectivamente) en diferentes partes del inserto.

3.2.11. Medición de TEER

La capacidad de formación de una barrera polarizada de los sincitiotrofoblastos se evaluó midiendo la TEER de la capa celular usando a diarios un medidor de voltios-ohmios Millicell ERS-2. El valor de TEER se determinó en los filtros recubiertos con Matrigel en presencia o ausencia de células del sincitiotrofoblasto. Después de un nuevo cambio de medio, los electrodos se colocaron a ambos lados del inserto Transwell®. El experimento diario se realizó en los insertos individuales y se midió en tres posiciones diferentes (120º) por pocillo. La resistencia de monocapa para cada inserto se tomó como el promedio de las tres lecturas y se corrigió para el área de superficie ($k\Omega \cdot cm^2$) [Huang *et al*., 2016]. Cuando la TEER fue estable, se consideró que se alcanzó la formación de la monocapa celular.

3.2.12. Medición de Papp

Para evaluar las propiedades de permeabilidad de la monocapa del sincitiotrofoblasto se utilizó un marcador de vía paracelular, *Lucifer yellow* (LY) 457 Da, para determinar la tasa de transferencia pasiva de especies de peso molecular a través de la monocapa celular (Heinzen y Hackstadt, 1997; Kabir *et al*., 2005). Los insertos Transwell® se lavaron tres veces y se equilibraron en DMEM-HG (DMEM- alto en glucosa) libre de rojo fenol durante 30 minutos. Luego se añadió el colorante fluorescente (50 mM) en medio a la cámara donante (compartimento apical o basal) a 37ºC durante 2 h, y se tomaron alícuotas de 100 µl desde la cámara receptora a intervalos de 30 minutos. La difusión del marcador fluorescente se detectó a Ex/Em= 450/530 nm por un lector de microplacas de fluorescencia. El coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) se calculó con la siguiente fórmula (fórmula 2):

$$\text{Papp (cm/s)} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$$

donde dQ/dt: es la tasa de aparición del sustrato en la cámara receptora (mmol/s); A: el área de superficie de la membrana del filtro (cm^2); C_0: la concentración inicial del sustrato en la cámara del donante (mmol/ml) [Vogel, 2006]. La difusión de LY (mmol/ml) se calculó como la concentración acumulada de LY en la cámara receptora dentro de un cierto período de tiempo. La disminución del valor de Paap se consideró como parámetro indicador de la formación de la monocapa celular.

3.2.13. Lisado celular y cuantificación de proteínas

Los homogenizados de placenta y cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto fueron lisados para extraer proteínas. Para realizar western blot (ver 3.2.14) y para la determinación de colesterol celular (ver 3.2.22), las células fueron lisadas en una solución de lisis de proteínas (mmol/L Tris-HCl 50; NaCl 100; pH 7,4; Tritón X-100 0,5% y SDS 1%). Posteriormente, esta suspensión fue homogenizada mecánicamente con jeringa para luego ser incubada a 60ºC por 5 minutos. La concentración de proteínas se determinó utilizando el kit de Micro BCA® y una curva de calibración estándar de albúmina de suero bovino (BSA; 0 - 2000 µg/mL). La concentración de proteínas se estimó evaluando la absorbancia de las muestras a 620 nm.

3.2.14. Western blot

Para los estudios de western blot, se separaron 50 µg de proteínas para células del sincitiotrofoblasto y 70 µg para homogenizados de placenta por electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (6-12%) con 0,1% de SDS (SDS-PAGE) (2 horas, 100V) [Leiva *et al.,* 2013]. Los geles fueron transferidos a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; 2 horas, 0,4 A). Posteriormente, las membranas fueron incubadas por 1 hora con solución de bloqueo (mmol/L Tris-base 20; NaCl 137; Tween-20 0,05%; Leche descremada 5%; pH 7,4), para luego ser incubadas con

los anticuerpos primarios [*anti*-conejo: ApoA-I (1:1000), LDLR (1:500), SR-BI (1:1000), ABCG1 (1:2500), ABCA1 (1:1000), ApoA-I (1:500); HMGCR (1:500), ApoB (1:500), 18 horas a 4°C o *anti*-ratón: β-actina (1:5000) por 2 horas a temperatura ambiente]. Posteriormente las membranas fueron lavadas con buffer de lavado (mmol/L Tris 20; NaCl 137; Tween-20 0,05%; pH 7,4) y se incubaron con los anticuerpos secundarios dirigidos contra la IgG de la especie utilizada para el anticuerpo primario (*anti*-conejo o *anti*-ratón, según corresponda) y conjugados con HRP (1 hora a temperatura ambiente). Las bandas correspondientes a las proteínas específicas fueron detectadas y visualizadas con el equipo de adquisición de imágenes *Chemidoc-it* por quimioluminiscencia. La abundancia relativa de cada proteína se cuantificó utilizando el software *ImageJ*. Cada uno de los valores fue corregido utilizando la abundancia relativa del control de carga β-actina en cada muestra.

3.2.15. Inmunofluorescencia en tejido

Para realizar determinación de proteínas por inmunofluorescencia en tejido de placenta, se tomaron biopsias 1 cm^3, se lavó con solución PBS y se descartó las zonas con calcificaciones [Gutiérrez *et al.,* 2017]. Las biopsias fueron fijadas en paraformaldehido al 4% en solución PBS por 24 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas gradualmente mediante la exposición a concentraciones crecientes de etanol (50, 75, 98 y 100% a temperatura ambiente, 60 minutos cada una) y posteriormente xileno (100%, temperatura ambiente, 60 minutos), xileno: parafina (50% de cada uno, 60ºC, 60 minutos) y parafina (100%, 60ºC, 60 minutos). Los tejidos así incluidos fueron cortados en micrótomo en secciones de 7 μm de espesor.

Para la inmunolocalización de proteínas, se eliminó la parafina de las secciones de tejido utilizando xileno por 10 minutos. El tejido se rehidrató con una gradiente de etanol por 5 minutos (100, 98, 75 y 50%). Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica con solución citrato (citrato de

sodio 10 mmol/L; Tween-20 0,05%; pH 6,0; 95ºC; 30 minutos). Las secciones de tejido fueron incubadas 1 hora con solución de bloqueo (mmol/L Tris 50; NaCl 100; Tritón X-100 0,05%; BSA 5%; pH 7,5), para luego ser incubadas por 18 horas a 4°C con los anticuerpos primarios *anti*-conejo: LDLR (1:30), SR-BI (1:30), ABCG1 (1:30), ABCA1 (1:30), ABCA1 (1:30), FPN-1 (1:30). PLAP (1:30), ApoA-I (1:30); *anti*-ratón: CK7 (1:30), CD31 (1:30), ApoB (1:30). Posteriormente, los cortes fueron lavados e incubados por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *anti*-IgG de conejo o ratón conjugados con Alexa 488 o Alexa 568 (1:1000), según corresponda. Finalmente, los cortes de tejido fueron montados con *Fluoromount-G* y las imágenes fueron visualizadas en microscopios confocal Nikon espectral o microscopio Zeiss Ayriscan, en la Unidad de microscopia Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software *ImageJ.*

3.2.16. Inmunofluorescencia en células

Las células del sincitiotrofoblasto fueron sembradas sobre portaobjetos (con poli-L-Lisina 0,01%, previamente incubadas a 37ºC, 30 minutos) en las placas de cultivo regulares y posteriormente fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% [Aye *et al.,* 2010]. Por otra parte, las células polarizadas del sincitiotrofoblasto, sembradas en placas de cultivo con el inserto *Transwell*, se fijaron en (PFA 4%) (30 minutos) y fueron lavadas en PBS-glicina (0,1 mol/L; 15 minutos). Los insertos se cortaron en dos piezas y luego de la fijación fueron procesados de la misma forma que las células no polarizadas [Huang *et al.,* 2016]. Para la determinación de proteínas totales, las células fueron permeabilizadas con solución de bloqueo que contendrá detergente (mmol/L Tris 50; NaCl 100; Tritón X-100 0,05%; BSA 5%, pH 7,5), mientras que, para la determinación de proteínas en la superficie celular, éstas no fueron permeabilizadas y se utilizó la solución sin detergente (mmol/L Tris 50; NaCl 100; BSA 5%,

pH 7,5). Luego, las células fueron incubadas 18 horas a 4°C con los anticuerpos primarios *anti*-conejo: LDLR (1:50), SR-BI (1:50), ABCG1 (1:50), ABCA1 (1:50), ABCA1 (1:50), FPN-1 (1:50), PLAP (1:100); *anti*-ratón: CK7 (1:100), CD31 (1:50). Posteriormente, las células fueron lavadas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario *anti*-IgG de conejo o ratón conjugados con Alexa 488, Alexa 568 (1:1000), según corresponda. Finalmente, las preparaciones fueron montadas con *Fluoromount-G* y las imágenes fueron visualizadas en microscopios confocal Nikon espectral o microscopio Zeiss Ayriscan, en la Unidad de microscopia Avanzada UC de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software *ImageJ*, corregido por el fondo y el área. Se utilizó la siguiente fórmula (fórmula 3) para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF).

CTCF = densidad integrada - (área de la célula seleccionada x promedio del fondo)

3.2.17. Extracción de RNA total y transcripción reversa

El RNA total fue aislado usando el método de Chomczynski-fenol [Chomczynski y Sacchi, 1987] y cuantificado por espectrofotometría (A_{260}). La pureza del RNA fue calculada de acuerdo a la relación de absorbancia a dos longitudes de onda (A_{260}/A_{280}), a 260 nm absorben las bases nitrogenadas y a 280 absorben los residuos hidrofóbicos de las proteínas (relación optima 1.8). Alícuotas de RNA total (2 µg) fueron utilizadas para la transcripción reversa y generación de DNA complementario (cDNA). Cada muestra de RNA fue incubada con la enzima DNAsa I (1 U/µL, 37°C, 30 minutos), luego la enzima fue inactivada por adición de EDTA (25 mmol/L, 65°C, 10 minutos). Para la transcripción reversa, cada RNA se incubó con una mezcla de oligonucleótidos de deoxitimidina (0,5 µg/µL), hexanucleotidos al azar (0,2 µg/µL), dNTPs (10 mmol/L), inhibidor de ribonucleasas (40

µg/µL), la enzima transcriptasa reversa MMLV-RT (200 U/µl), el buffer de reacción de la enzima y agua libre de nucleasas [Salomón *et al*., 2012].

3.2.18. PCR Tiempo Real

Mediante PCR en tiempo real se cuantificó la expresión de HMGCR, ACAT-1 y GADPH. La amplificación se realizó con la mezcla de reacción que incluyó cDNA (diluido 1:4 con agua libre de nucleasas), Fast SYBR Green qPCR Master Mix (2X), oligonucleótidos sentido y antisentido (100 nmol/L) (Tabla 3) y agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo con una temperatura de *melting* de 60°C. La expresión génica de los targets se calculó utilizando el método de $2^{-\Delta CT}$, usando GADPH como gen de referencia.

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos para PCR tiempo real.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIAS (5'-3')
HMGCR SENTIDO	GATGGGAGGCCACAAAGAG
HMGCR ANTISENTIDO	TTCGGTGGCCTCTAGTGAGA
ACAT1 SENTIDO	ATTCCTCTGCCTCTGCTGTC
ACAT1 ANTISENTIDO	AGACCAGAGAAACCCTGCAA
GADPH SENTIDO	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
GADPH ANTISENTIDO	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

3.2.19. Captación de colesterol

La cinética de captación de colesterol LDL y colesterol HDL se realizó en cultivos de sincitiotrofoblastos, utilizando las lipoproteínas marcadas con DiI (LDL-DiI, HDL-DiI) y cuantificando la fluorescencia transferida a las células, como ya se ha descrito para LDL-DiI [Stephan y Yurachek, 1993; Rana *et al.,* 2016] y HDL-DiI [Nieland *et al.,* 2002; Dockendorff *et al.,* 2015]. El procedimiento se realizó en placas de 96 pocillos, incubando según corresponda con LDL-DiI (0 - 200 µg/mL) o HDL-DiI (0 - 50 µg/mL) de mujeres no embarazadas, por 2 horas en el caso de las LDL y por 4 horas en el caso de las HDL, a 37°C en el DMEM-F12 suplementado con 5% SFB.

Los tiempos y las concentraciones de lipoproteínas para ensayos de cinética de captación se determinaron en base a publicaciones en células hepáticas [Stephan y Yurachek, 1993; Nieland *et al.,* 2002] y sincitiotrofoblastos [Schmid *et al.,* 2003; Wadsack *et al.,* 2003], así como también a ensayos preliminares con curvas a distintos tiempos y concentraciones. Luego de la incubación, se eliminó el medio de cultivo conteniendo las lipoproteínas marcadas y las células fueron lavadas con PBS-BSA libre de ácidos grasos (FFA) (2 mg/mL). Se cuantificó la fluorescencia (excitación: 550 nm, emisión: 595 nm) en un fluorímetro. Posteriormente, las células fueron lisadas con KOH 0,5 N y se estimó la concentración de proteínas en cada muestra. Se preparó, adicionalmente, una curva estándar de LDL-DiI y HDL-DiI (0 - 2000 ng/mL) y la fluorescencia fue medida. De esta forma, los valores de fluorescencia obtenidos en las diferentes muestras se expresaron como ng/mL de LDL-DiI o HDL-DiI captado [Stephan y Yurachek, 1993], lo que fue corregido por la concentración de proteínas de cada muestra (mg/mL). Así, la captación quedó expresada como ng de lipoproteína captada/mg de proteína celular (ng HDL-DiI o LDL-DiI/mg proteína).

Los parámetros cinéticos de velocidad máxima ($V_{máx}$) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) se determinaron a partir de curvas de saturación ajustadas al modelo de cinética enzimática de

Michaelis-Menten, y se obtuvo en base a la transformación de *Eadie-Hofstee*, utilizando el programa *GraphPad Prism Software*.

Para determinar la especificidad de la captación de colesterol LDL-DiI y HDL-DiI por los receptores LDLR y SR-BI respectivamente, se estudió la captación de estas lipoproteínas inhibiendo la función de LDLR y SR-BI (ver 3.2.20). Finalmente, y como se describió anteriormente, las células fueron lavadas, la fluorescencia fue determinada y las proteínas cuantificadas.

3.2.20. Inhibición de LDLR, SR-BI

Para inhibir la función del receptor LDLR, las células fueron pre-incubadas por 5 minutos con buffer hipotónico (50% dH_2O, 50% medio DMEM alto en glucosa sin SFB) y luego por 30 minutos con buffer isotónico libre de potasio (mmol/L NaCl 140; HEPES 20; pH 7,4; $CaCl_2$ 1; $MgCl_2$ 1; glucosa 5,55) [Larkin *et al.,* 1983]. Para inhibir SR-BI, las células fueron pre-incubadas por 2 horas con el inhibidor de SR-BI, bloqueador del transporte de lípidos-1 (BLT-1; 10 µmol/L) [Nieland *et al.,* 2008].

3.2.21. Eflujo de colesterol

El eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos no polarizadas fue evaluado como la salida de colesterol tritiado desde las células hacia ApoA-I o HDL, cuantificando la radioactividad en los aceptores, como se ha descrito [Schmid *et al.,* 2003; Ji *et al.,* 2012].

Las células fueron pre-incubadas por 18 horas con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con colesterol marcado radiactivamente (colesterol tritiado, [^{3}H]-colesterol, 0,5 µCi/mL). En células no polarizadas, el procedimiento se realizó en placas de 24 pocillos, incubando según corresponda con ApoA-I (0-10 µg/mL comercial) o HDL (0 - 50 µg/mL de mujeres no embarazadas o fetales) células del sincitiotrofoblasto por 6 horas a 37°C, en el medio de cultivo suplementado con 5% de suero libre

de lipopprteínas. En células polarizadas, se incubaron las células cultivadas en el inserto Transwell® con las lipoproteínas, a las concentraciones y tiempos ya descritos, en el compartimento apical (superior) o basal (inferior), según correspondieran. Los tiempos y las concentraciones para el ensayo de eflujo se determinaron en base a publicaciones en células del sincitiotrofoblasto y endoteliales de la placenta [Schmid *et al.,* 2003; Jenkins *et al.*, 2008; Stefulj *et al.,* 2009; Aye *et al.,* 2010; Scholler *et al.,* 2012; Sreckovic *et al.,* 2014], así como también a ensayos preliminares con curvas a distintos tiempos y concentraciones (datos no mostrados). Posteriormente, los medios de cultivos fueron recuperados y las células lisadas con KOH. Se determinó la radiactividad tanto en el medio de cultivo como en los lisados celulares y se estimó el eflujo como la fracción de señal radiactiva (H^3) en el medio, comparado con la señal total en el medio y las células, según la siguiente fórmula (fórmula 4):

$$Eflujo\ (\%) = \frac{CPM\ medio}{CPM\ medio + CPM\ células} \text{ x } 100$$

CPM = cuentas por minuto.

Los parámetros cinéticos $V_{máx}$ y K_m se determinaron a partir de curvas de saturación ajustadas al modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten, y se obtuvieron en base a la transformación de *Eadie-Hofstee*, utilizando el programa *GraphPad Prism Software*.

La contribución de SR-BI en el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto se determinó incubando las células con BLT-1 como se describió en el punto 3.2.20.

3.2.22. Contenido de colesterol total, colesterol esterificado y colesterol no esterificado

La concentración del colesterol total en lisado de sincitiotrofoblastos y homogenizado de placenta fue cuantificado mediante el kit *Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit*, siguiendo las

instrucciones del proveedor. Esta técnica se basa en el ensayo enzimático de Allain [Allain *et al*., 1974], y consiste en que los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa formándose colesterol libre, el cual es luego oxidado por el colesterol oxidasa generando peróxido de hidrogeno y un producto cetónico. El peróxido de hidrogeno es luego detectado usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (reactivo Amplex™ Red). En la presencia de la peroxidasa de rabano, el reactivo Amplex ™ Red reacciona con el peróxido de hidrogeno con una estequiometria 1:1 produciendo resorufina, un producto altamente fluorescente, el cual es detectado en un lector de fluorescencia. Previo a la medición de colesterol, se realizó una extracción de lípidos de cada muestra, mediante el método de Folch [Folch *et al*., 1954]. Para eso 70 μg de extracto proteico fue secado bajo corriente de N_2. A este extracto seco, se añadió 3 mL de metanol, se mezcló en agitador tipo vortex por 10 s y luego se sometió a sonicador por 30 minutos. Después, se agregaron 6 mL de cloroformo, se agitó durante 1 min y se incubo 30 min a 50ºC. se agregó 2 mL de agua, se agito durante 2 min y se incubo toda la noche a 4ºC. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 700 rpm por 20 min a 4ºC. Luego de la centrifugación, se generaron 2 fases: una fase acuosa superior (agua/metanol) y la fase orgánica inferior (cloroformo). Se colecto la fase cloroformo (que contiene el colesterol), la cual se traspasó a un tubo de vidrio la cual se había ambientado previamente con 10 μL de Tritón X-100 al 1% en cloroformo. Se secó la fase cloroformo bajo corriente de N_2, y luego se procedió a la medición de colesterol con el kit *Amplex™ Red Cholesterol Assay Kit* siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2.23. Tinción Filipina

Las células del sincitiotrofoblasto se sembraron sobre cubreobjetos en placas de cultivo de 24 pocillos ($5x10^5$ células/pocillo) y en insertos Transwell® de 12 pocillos ($1x10^6$ células/pocillo). Las células se fijaron con PFA al 4% en solución PBS durante 15 minutos, seguido de lavado con PBS e

incubación con solución de filipina (25 μg/ml en PBS) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Después de un lavado prolongado en PBS en una cámara oscura, los cubreobjetos y los Transwell® se montaron con medio de montaje *Fluoromont G* para ser analizados. En los cubreobjetos se fijaron las células a las 72 horas post sembrado y en los insertos se hizo al día 7 después del experimento de eflujo. Las imágenes fueron visualizadas en microscopios confocal Nikon espectral o microscopio Zeiss Ayriscan, en la Unidad de microscopia Avanzada de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software *ImageJ*.

3.2.24. Calculo de tamaño muestral

Para el cálculo de tamaño muestral se utilizó la fórmula de comparación de las medias, para lograr un poder estadístico del 80% y un nivel de significancia del 5%. Así $n = [2 \times (Z\alpha + Z\beta)^2 \times S^2]/d^2$, donde n = sujetos de estudio, Zα = valor de Z correspondiente al riesgo deseado para test unilateral (1,96), Zβ = valor de Z correspondiente al poder estadístico del 80% (1,28), S = varianza del grupo control (-145), d = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (diferencia en un experimento de captación de colesterol=130). Considerando que n = 13,05, se deben incluir al menos 13 muestras por grupo de embarazos C y HC por análisis para determinar diferencia [Dhand y Khatkar, 2014].

3.2.25. Análisis de datos

Los datos clínicos (maternos y de recién nacidos) fueron expresados como promedio y desviación estándar (SD) más el rango de valores mínimos y máximos. En todos los ensayos, los valores obtenidos se representaron como promedio y error estándar (S.E.M), donde n indicó el número de cultivos y sueros utilizados. Se determinó la normalidad de los datos con el test Kolmogorov-

Smirnov. Para comprobar si existen diferencias significativas entre dos parámetros, se utilizó el análisis de comparación de medias de *t de Student* para datos paramétricos. Para comparar diferencias entre más de dos grupos, se utilizó el análisis de varianzas (ANOVA) de una o dos vías o el test de Friedman para datos paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Si ANOVA o el test de Friedman mostraron diferencias entre las variables, se realizaron análisis post hoc por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o el test de corrección de Dunns, respectivamente. Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa *GraphPad Prism Software*. Se consideró significativo un valor de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características maternas y neonatales

En este estudio se utilizaron un total de 60 muestras de placentas que fueron obtenidas de mujeres chilenas (Hospital Clínico UC-Christus. C, n=21; HC n=27) y mujeres suizas (Lindenhofgruppe. C, n=8; HC n=4) (Tabla 4). No se observaron diferencias significativas en los parámetros clínicos determinados en ambos grupos de estudio tanto parámetros maternos (edad, estatura, peso, índice de masa corporal (IMC), presión sistólica y diastólica, glicemia basal de primer trimestre, glicemias del test de tolerancia a la glucosa oral (TTGO) del segundo trimestre), como del recién nacido (sexo, edad gestacional, estatura y peso) (Tabla 4).

Se midió en la madre y el recién nacido, el CT, HDL, LDL, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y triglicéridos al término del embarazo. El colesterol total sanguíneo materno y colesterol LDL fueron más altos en HC (332 ± 39 y 199 ± 35 mg/dL, respectivamente) que en C (241 ± 27 y 125 ± 26 mg/dL, respectivamente) (Figura 4A). Mientras que el colesterol HDL, VLDL y triglicéridos, no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos.

No se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados en el perfil lipídico del recién nacido (Figura 4B).

4.2. Morfología celular de células del trofoblasto diferenciadas y no diferenciadas a sincitiotrofoblasto

Los cultivos primarios de células del trofoblasto sembradas en placas de cultivo convencionales se observaron como células nucleadas individuales con bordes bien delimitados después de 24 horas de cultivo. Morfología semejante a lo previamente publicado para citotrofoblastos (CTB) (Figura 5A) [Kliman *et al.,* 1986]. A las 48 horas de cultivo se observaron CTB iniciando el proceso de fusión, algunas células uninucleadas y otras multinucleadas (Figura 5B). Después de 72 horas de cultivo, los CTB formaron entidades celulares multinucleadas semejantes a lo previamente publicado para sincitiotrofoblasto (STB) (Figura 5C) [Kliman *et al.,* 1986]. Estas células aparecen como una capa continua sin límites intercelulares y presentan forma de isla cuando se cultivan en placas de cultivo convencionales. Las imágenes fueron visualizadas en microscopio Leica, las imágenes obtenidas en el microscopio fueron procesadas mediante el software *ImageJ*.

Tabla 4. Características clínicas de las embarazadas y los recién nacidos

Variables	C (*n* = 29)	HC (*n* = 31)
Variables maternas		
Edad (años)	32,6 ± 5,9 (23-45)	31,9 ± 6,1 (20-45)
Estatura (cm)	166,2 ± 6,2 (156-180)	161,1 ± 6,5 (148-173)
Peso (kg)		
1er trimestre	62,5 ± 5,5 (51-69)	59,1 ± 5,5 (48-69)
2do trimestre	68,5 ± 5,5 (62-79)	64,7 ± 6,2 (55-74)
3er trimestre	73,8 ± 6,7 (52-92)*	70,6 ± 6,5 (58-80)*
IMC (kg/m^2)		
1er trimestre	23,4 ±1,7 (20-27)	22,4 ± 1,6 (20-26)
2do trimestre	24,8 ± 1,8 (22-27)	22,1 ± 1,6 (23-28)
3er trimestre	27,2 ± 2 (19-30)	27,3 ± 1,9 (23-30)
Presión arterial sistólica (mmHg)		
1er trimestre	104 ± 9,7 (90-120)	108 ± 14,5 (84-135)
2do trimestre	108,4 ± 8,5 (100-170)	106 ± 13,9 (80-130)
3er trimestre	104,7 ± 7,4 (90-116)	109,6 ± 11,2 (90-130)
Presión arterial diastólica (mmHg)		
1er trimestre	64,1 ± 8,4 (55-80)	63,3 ± 8 (46-70)
2do trimestre	68,2 ± 6,1 (60-80)	63,9 ± 4,9 (60-72)
3er trimestre	66,4 ± 5,8 (60-75)	68,8 ± 6,7 (60-80)
Glicemia basal (mg/dL)	77,5 ± 5,3 (68-83)	79,6 ± 5,8 (68-85)
TTGO (mg/dL)		
Glicemia basal	77,4 ± 3,7 (72-82)	78,8 ± 5,1 (72-90)
Glicemia post carga de glucosa (2 horas)	90,6 ± 8,4 (80-102)	95,2 ± 12,9 (74-115)
Variables del recién nacido		
Sexo (hombre/mujer)	14/15	16/15
Semanas de gestación	39,4 ± 1,1 (37-41)	39,1 ± 0,9 (37-42)
Peso placenta (g)	530 ± 21,2 (508-552)	541 ± 19,5 (522-560)
Peso (g)	3427 ± 392 (2365-4340)	3459 ± 194 (2730-4440)
Estatura (cm)	50,1 ± 1,8 (47-55)	50,9 ± 1,9 (47-54)
Índice ponderal (gramos/cm^3 x 100)	2,7 ± 0,2 (2-2,9)	2,6 ± 0,5 (2,2-2,8)

Mujeres controles (C, colesterol total <280 mg/dL) o hipercolesterolemicas (HC, colesterol total ≥280 mg/dL) en el embarazo fueron incluidas. El peso, índice de masa corporal (IMC) y la presión sanguínea fueron determinados en el primer (0-14 semanas de gestación [sg]), segundo (14-28 sg) y tercer (28-40 sg) trimestre del embarazo. Los datos son promedios ± S.D (rango). TTGO indica test de tolerancia a la glucosa oral. *P<0,05 vs valores correspondientes al primer trimestre de embarazo.

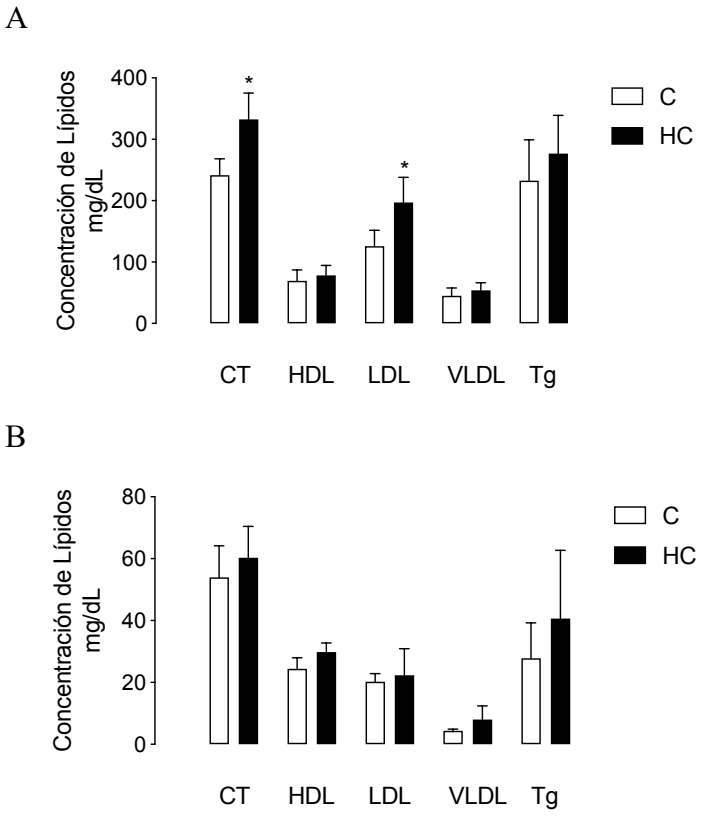

Figura 4. Perfil lipídico materno y neonatal en C y HC.

Niveles sanguíneos maternos (A) y neonatal (B) de colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos (Tg) fueron determinados al término del embarazo. C: (Control, blanco). HC: (Hipercolesterolemia, negro). Los valores son promedio ± S.D. n= 28 C; 31 HC. n= 19 C y 24 HC en el perfil neonatal. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

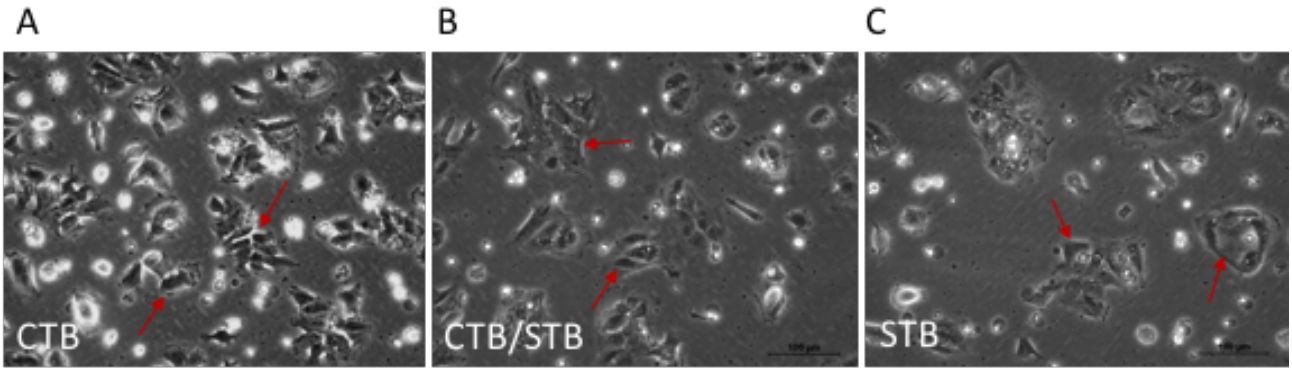

Figura 5. Morfología de células del trofoblasto.

(A) citotrofoblastos (CTB) no diferenciados primarios fueron aislados con digestiones enzimáticas con DNAsa/tripsina y posteriormente aislados en una gradiente de Percoll. Después de 24 horas las células cultivadas mostraron características de células epiteliales mononucleadas. (B) Combinación de CTB y sincitiotrofoblasto (STB) CTB/STB después de 48 horas de cultivo. Se observa la presencia de células mononucleadas y células iniciando la diferenciación. (C) A las 72 horas de cultivo, se observa principalmente CTB fusionados (STB). Las imágenes fueron capturadas en magnificación 20X. Los citotrofoblastos fueron aislados desde placentas a término. Las flechas rojas indican la presencia de CTB y STB. Barra 100 μm.

4.3. Morfología de los cultivos de sincitiotrofoblastos polarizados

Para evaluar la localización de los receptores y transportadores de colesterol, asi como también la direccionalidad de la captación y el eflujo de colesterol, se sembraron células del CTB en filtros Transwell® recubiertos con Matrigel (25 μg/cm^2) en una densidad de 1x10^6/cm^2 y se observó la morfología a los días 1, 3, 5 y 7 (Figura 6). Se determinó que las células a los diferentes días presentaron una morfología diferente sugiriendo la formación de una monocapa. Sin embargo, la formación e integridad de la monocapa polarizada de células del sincitiotrofoblasto no se puede confirmar con simple observación de la morfología, se requiere determinar la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y estimar el coeficiente de permeabilidad aparente (Paap).

4.4. Establecimiento de la monocapa del sincitiotrofoblasto polarizado

Se adquirieron valores de TEER en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto 24 horas después de la siembra celular y hasta el día 5. Se determinó un aumento gradual que alcanzó el *plateau* después de 4-5 días en cultivo, sugiriendo la formación de una monocapa confluente comparado con el control de matrigel sin células (0,269 ± 0,007 vs 0,223 ± 0,004 kΩ/cm^2, respectivamente) (Figura 7).

El Papp para amarillo de lucifer (LY) se calculó en base a la transferencia vectorial de este compuesto fluorescente a 37ºC. Al día 5 de desarrollo de la monocapa, la permeabilidad de LY disminuyó al comparar células del sincitiotrofoblasto con el control de matrigel sin células (9,1 ± 0,8 x 10^{-6} cm/s vs 2,8 ± 0,8 x 10^{-6} cm/s, respectivamente) (Figura 8). Adicionalmente, también disminuyó gradualmente la permeabilización de LY desde el día 1 al día 5 en las células del sincitiotrofoblasto (5,9 ± 1,6 x 10^{-6} vs 2,8 ± 0,8 x 10^{-6} cm/s, respectivamente) (Figura 8).

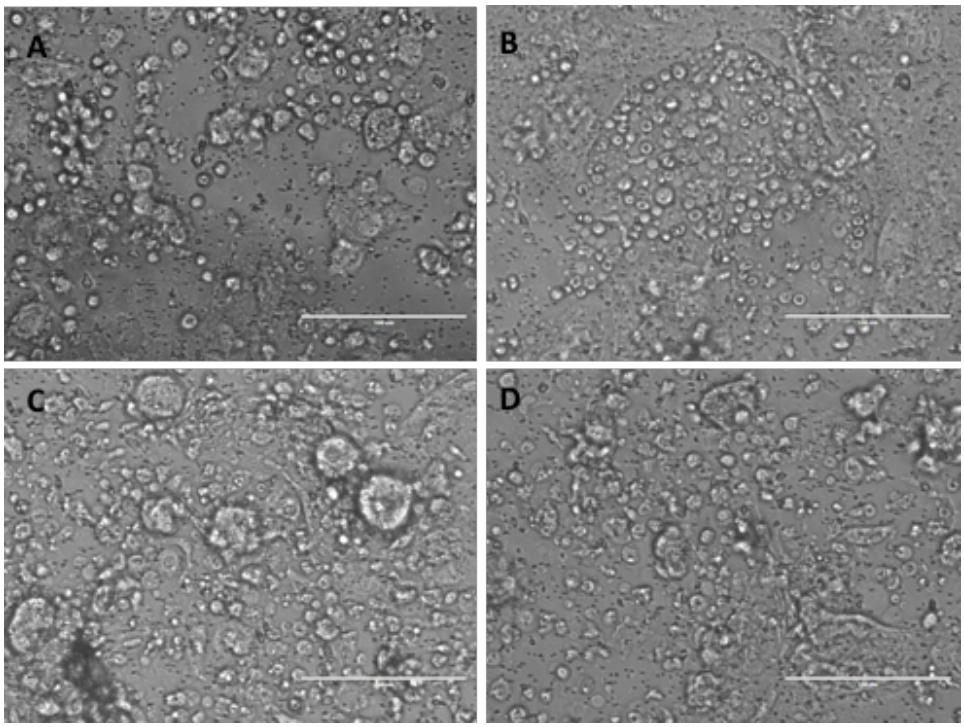

Figura 6. Morfología de células del sincitiotrofoblasto cultivados en filtros Transwell® recubiertos con Matrigel.

Sincitiotrofoblastos primarios día 1 (A), día 3 (B), día 5 (C) día 7 (D) fueron aislados con DNAsa/tripsina y gradiente de percoll, y sembradas en matrigel 25 μg/cm^2. Las imágenes fueron capturadas en magnificación 40X. Los sincitiotrofoblastos fueron aislados desde placentas a término. Barra 100 μm.

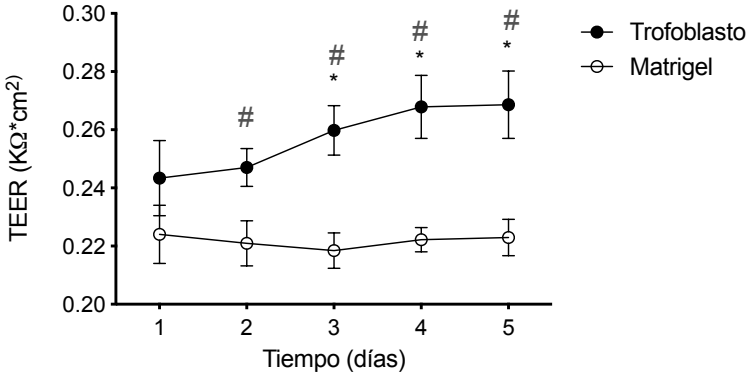

Figura 7. Establecimiento de monocapa de sincitiotrofoblastos primarios humanos confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Desarrollo de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en trofoblastos cultivados en filtros Transwell recubiertos con Matrigel. TEER se calculó multiplicando la resistencia diaria medida (kΩ) por el área de Transwell (cm^2). Los controles TEER de sincitiotrofoblastos (círculos negros) y Matrigel (círculos vacíos) fueron 3 experimentos independientes con 12 repeticiones cada uno. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3. *P<0,05 vs valores correspondientes al día 1, #P<0,05 vs valores correspondientes al control (matrigel).

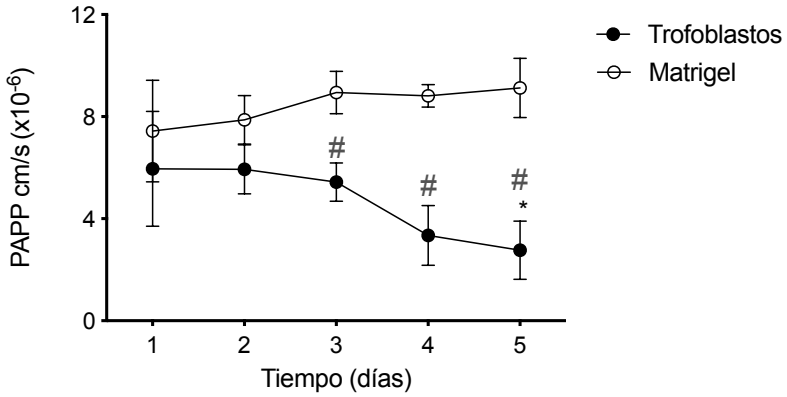

Figura 8. Permeabilidad de la monocapa de sincitiotrofoblastos humanos primarios confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Transferencia de colorante fluorescente hidrofílico en células de sincitiotrofoblasto durante el desarrollo de monocapa. El coeficiente de permeabilidad aparente (Papp, cm/s) de Amarillo de Lucifer (LY) se estimó en función de la cantidad de compuesto transportado por minuto. Los controles Papp de sincitiotrofoblastos (círculos negros) y Matrigel (círculos vacíos) fueron 3 experimentos independientes con 12 repeticiones cada uno. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3. *P<0,05 vs valores correspondientes al día 1, #P<0,05 vs valores correspondientes al control (matrigel).

4.5. Pureza celular de los cultivos de trofoblastos

La pureza de CTB fue evaluada a las 24 horas post-cultivo por el análisis de expresión celular de citoqueratina 7 (CK7: marcador de células epiteliales) y vimentina (marcador de células mesenquimales) por citometría de flujo y a las 72 horas con CD31 (marcador de células endoteliales) por inmunofluorescencia.

Como se muestra en la Figura 9, los CTB expresan altos niveles de CK7. El grado de positividad de CK7 en CTB fue 98.9% (Figura 9), lo que sugiere una alta pureza y estabilidad de los cultivos primarios de CTB. La baja abundancia de vimentina (0.76%) confirmó el carácter predominantemente epitelial de las células aisladas, indicando también la casi ausente contaminación con células mesenquimales, el mayor tipo celular presente cuando existe contaminación con otras células.

Del mismo modo, mediante inmunofluorescencia, se observó señal positiva para CK7 y señal negativa de CD31 para la presencia de células endoteliales (Figura 10), indicando ausencia de contaminación de este tipo celular en los cultivos primarios de sincitiotrofoblastos.

4.6. Determinación de las membranas apicales y basales del sincitiotrofoblasto

Para determinar la localización de los receptores y transportadores de colesterol en la placenta humana, se evaluó inicialmente mediante inmunofluorescencia, la localización de MMV y MB. Se utilizó PLAP para MMV, FPN-1 para MB, CK7 para células del sincitiotrofoblasto, CD31 para células endoteliales y para núcleo se utilizó Dapi (Figura 11). Se observó la distribución de PLAP en la MMV (indicado con flechas) en placentas C (n=3) y HC (n=3) (Figura 11A). FPN-1 se observó en la MB (indicado con puntas de flechas) y en células estromales (Figura 11B). CD31 se observó en las células endoteliales (indicado con asteriscos) (Figura 11C).

4.7. Expresión de marcadores de sincitiotrofoblastos polarizados

Se evaluó la polarización de las células del sincitiotrofoblasto mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador de células epiteliales CK7 y el marcador de MMV: PLAP (desde el día 1 al 7), determinándose la formación de una monocapa a medida que avanzan los días (Figura 12A y 12B). Adicionalmente, se determinó la localización polarizada (MMV y/o MB) de ambas proteínas utilizando las proyecciones ortogonales a través del Z-stack. Estos resultados sugieren que CK7 (rojo) se expresa en ambas membranas del sincitiotrofoblasto (Figura 13A). En cuanto a PLAP, las proyecciones ortogonales a través del Z-stack, sugieren que PLAP (rojo) se expresa predominantemente en la membrana apical, y de menor forma en la membrana basal de la monocapa del STB (Figura 13B), sugiriendo que el cultivo está polarizado. Las flechas verdes horizontales y verticales en el plano ortogonal muestran el nivel del stack seleccionado. El nivel superior del stack que se muestra con la línea verde en la esquina derecha exterior de la imagen corresponde a la membrana apical y la que se encuentra en la esquina derecha interior de la imagen corresponde a la membrana basal.

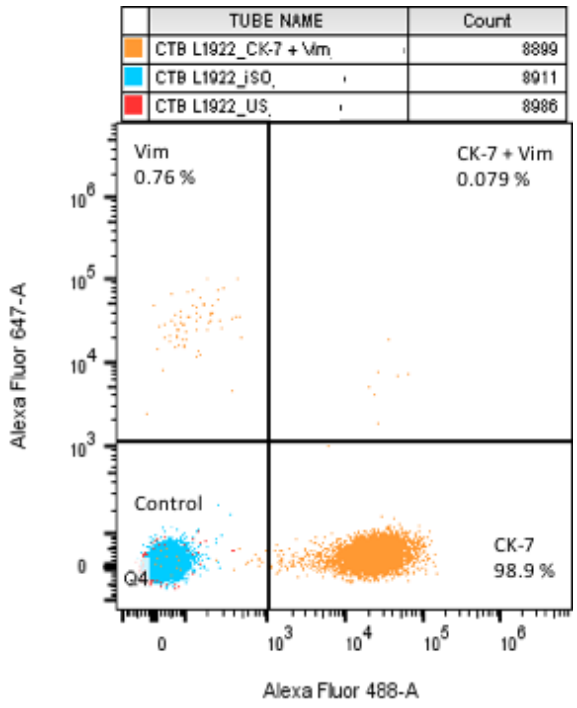

Figura 9. Células positivas para marcadores específicos de células del trofoblasto.

Expresión de proteínas citoqueratina 7 (CK-7) y vimentina (vim), marcadores específicos para células epiteliales y células mesenquimales, respectivamente. Patrones de expresión proteica representativos de CK-7 y Vim en trofoblastos aislados después de 24 h (trofoblastos indiferenciados; CTB).

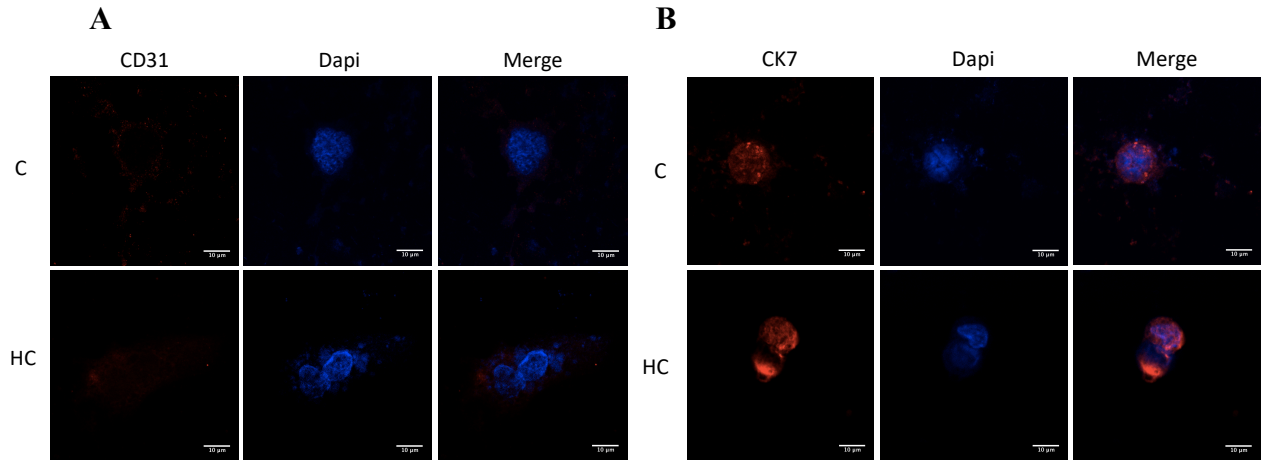

Figura 10. Control de contaminación con células endoteliales.

(A) Marcador endotelial CD31 y (B) marcador epitelial CK7 en células del sincitiotrofoblasto C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) Se incubó con *anti*-CD31 (1:30) y *anti*-CK7 (1:30), el anticuerpo secundario correspondiente y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 10µm. n=3 cultivos independientes por grupo

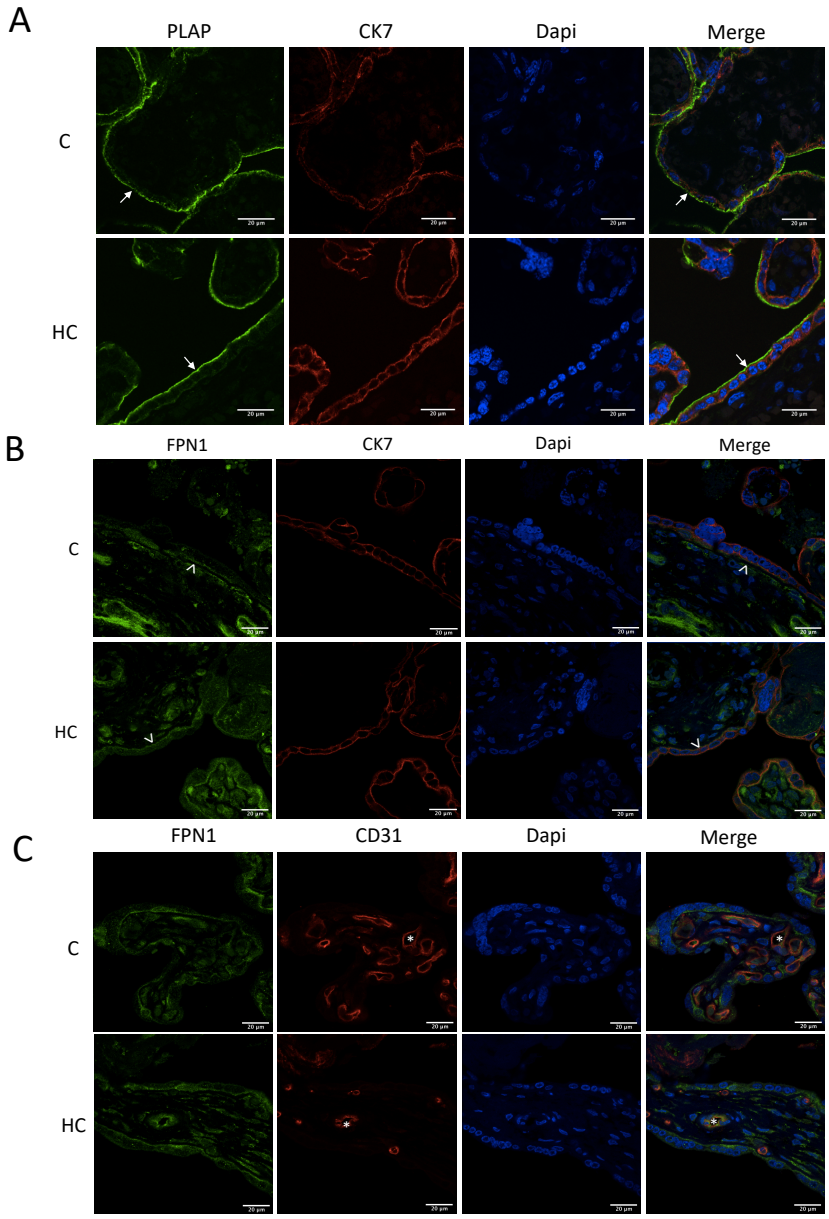

Figura 11. Localización de marcadores apicales y basales del sincitiotrofoblasto en tejido de placenta C y HC.

(A) PLAP, (B) FPN-1 y (C) CD31 en placentas de embarazos C (Control) y HC (hipercolesterolemia). Se utilizó el anticuerpo *anti*-PLAP (1:30) (verde), *anti*-FPN-1 (1:30) (verde), *anti*-CD31 (1:30) (rojo), *anti*-CK7 (1:30) (rojo) y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de CK7, Dapi y el anticuerpo correspondiente. Flecha: MMV (membrana de la microvellosidad apical), punta de flecha: MB (membrana basal), asterisco: células endoteliales en los capilares fetales. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

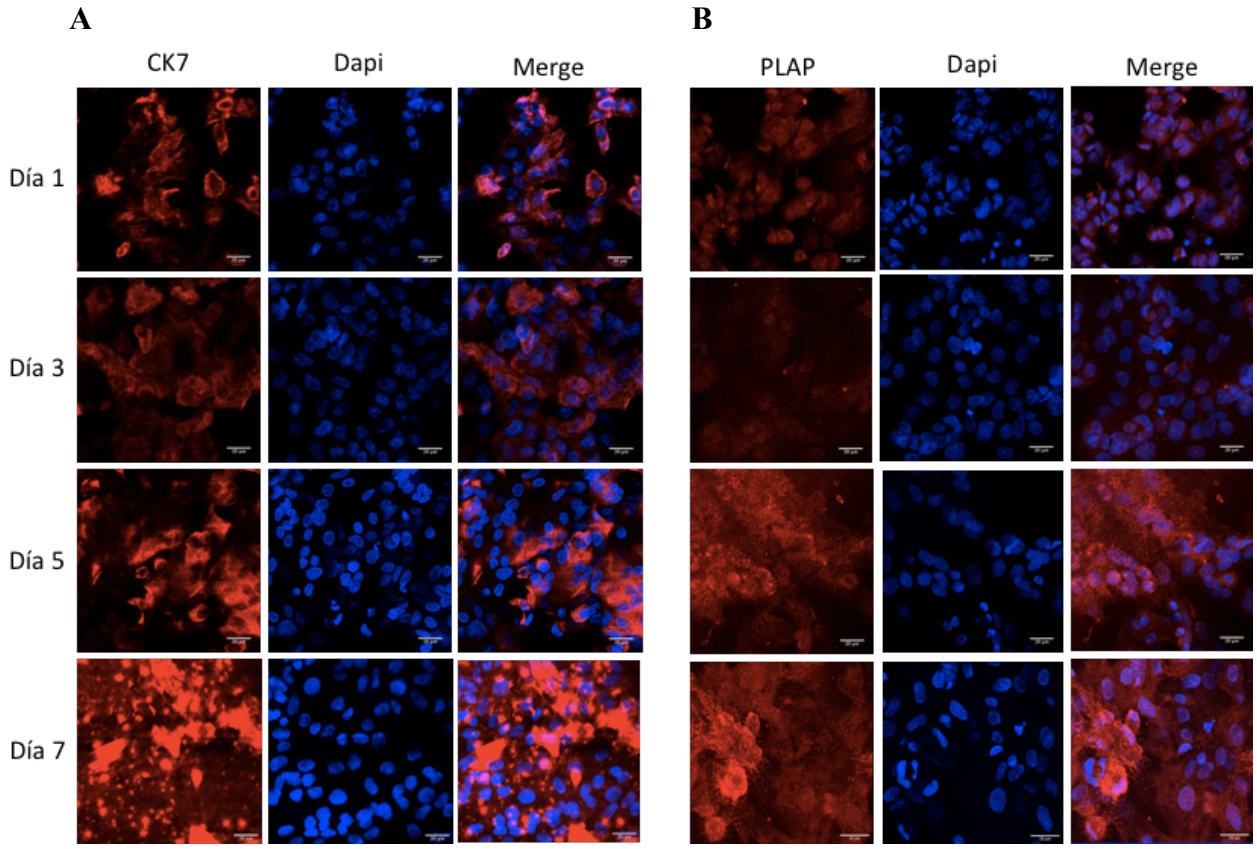

Figura 12. Expresión de marcadores de sincitiotrofoblastos en cultivos polarizados en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la expresión de (A) CK7 y (B) PLAP mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 1, 3, 5 y 7 después de sembrar las células en los Transwell®. Se utilizó el anticuerpo *anti*-CK7 (1:30) (rojo), *anti*-PLAP (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

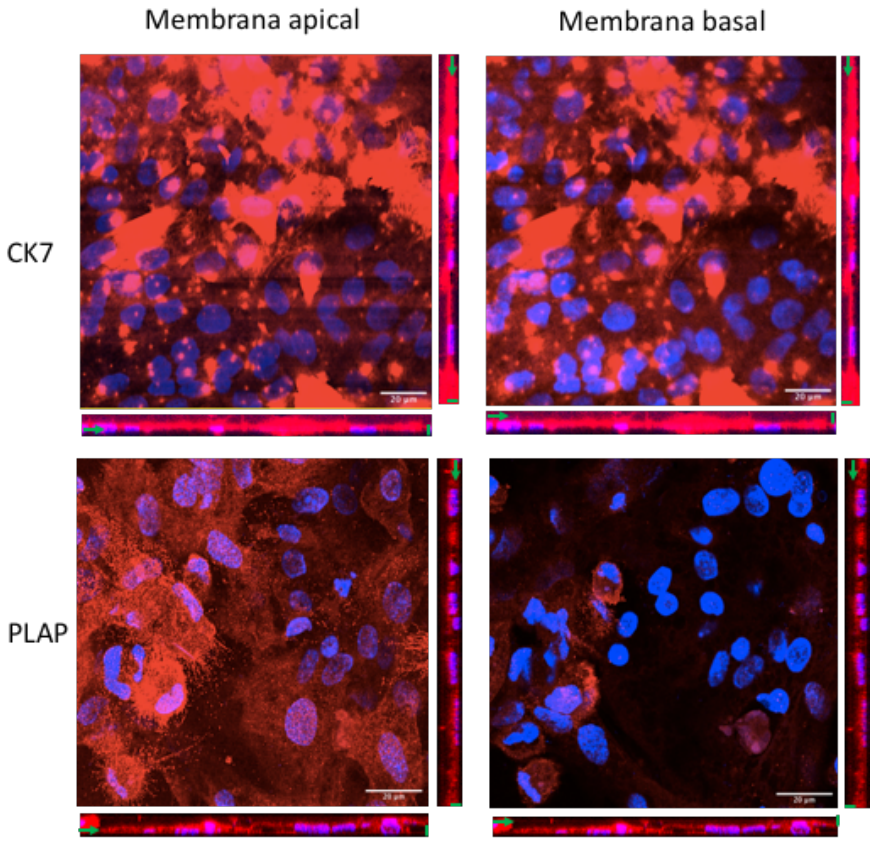

Figura 13. Localización de marcadores en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la localización apical o basal de CK7 y PLAP mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 7 después de sembrar las células. Se utilizó el anticuerpo *anti*-CK7 (1:30) (rojo), *anti*-PLAP (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas de Z stack con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

4.8. Localización y expresión de receptores de lipoproteínas en placentas C y HC

Para determinar la localización de los receptores de lipoproteínas en placentas humanas C y HC, se realizó inmunofluorescencia indirecta en muestras de placenta, fijadas con paraformaldehido e incluidas en parafina.

Se observó localización de LDLR principalmente en MMV (indicado con flechas) y células endoteliales (indicado con asteriscos) tanto en muestras C como en HC (Figura 14A). Las imágenes sugieren que en placentas HC la señal para LDLR en la superficie apical de las células del sincitiotrofoblasto es mayor que en placentas C.

En cuanto a SR-BI, este se localizó en MMV (indicado con flechas), MB (indicado con puntas de flechas) y células endoteliales (indicado con asteriscos) tanto en muestras C como HC (Figura 14B). La abundancia proteica de los receptores de lipoproteínas LDLR (Figura 15A) y SR-BI (Figura 15B) en homogenizados de placenta no mostraron diferencias significativas entre C y HC.

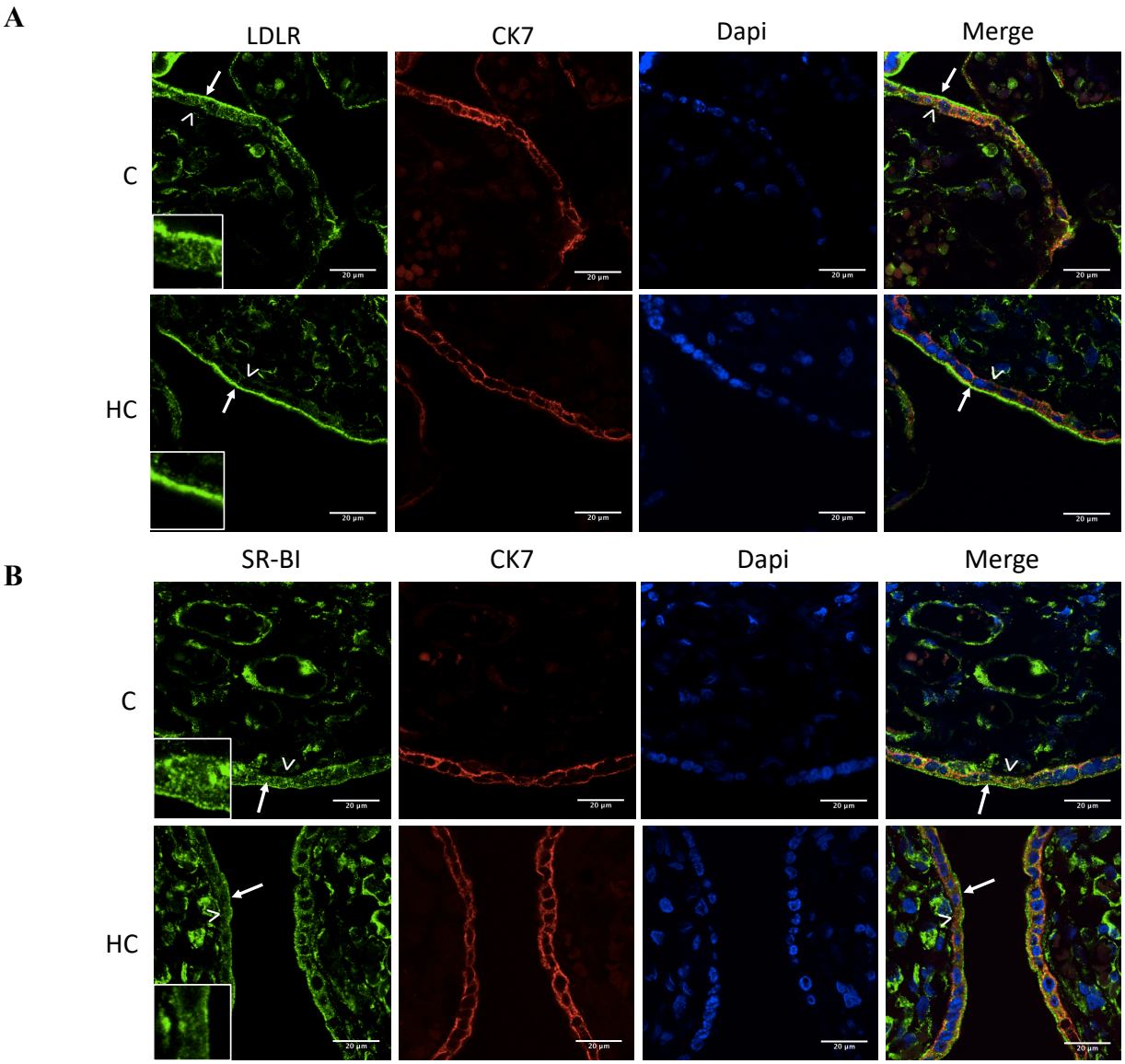

Figura 14. Localización de receptores de lipoproteínas en tejido de placenta C y HC.

Se determinó la localización de (A) LDLR y (B) SR-BI mediante inmunofluorescencia indirecta en placentas de embarazos C (Cnntrol) y HC (Hipercolesterolemia). Se utilizó el anticuerpo *anti*-LDLR (1:30) (verde), *anti*-SR-BI (1:30) (verde), *anti*-CK7 (1:30) (rojo) y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de CK7, Hoechst y el anticuerpo correspondiente. Flecha: MMV (membrana de la microvellosidad apical), punta de flecha: MB (membrana basal), asterisco: células endoteliales en los capilares fetales. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

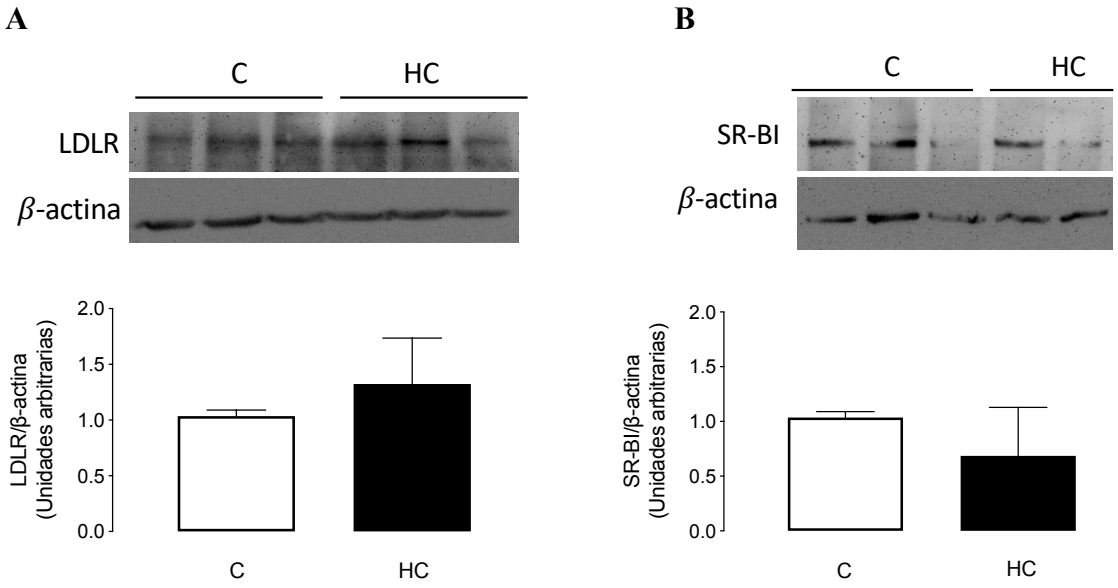

Figura 15. Expresión de LDLR y SR-BI en homogenizado de placenta C y HC.

Expresión de (A) LDLR y (B) SR-BI en homogenizado de placenta de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante Western blot, se utilizó *anti*-LDLR (1:1000), *anti*-SR-BI (1:1000), *anti*-β-actina (1:5000). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3-6 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

4.9. Localización y expresión de ligandos de LDLR y SR-BI

Se evaluó la localización y abundancia proteica de los ligandos de LDLR y SR-BI (ApoB y ApoA-I, respectivamente). Se observó la localización de ApoB en MMV (indicado con flechas) (Figura 16A), en MB (indicado con punta de flechas) y localización en endotelio (indicadas con asteriscos), tanto en muestras C como HC.

Se observó localización de ApoA-I en MMV (indicado con flechas) (Figura 16B), en MB (indicado con punta de flecha) y en endotelio (indicado con asterisco), tanto en muestras C como en HC.

Además, se evaluó la abundancia proteica de los ligandos mediante Western blot en homogenizados de placenta. La expresión de ApoB fue menor en homogenizado HC comparadas a C (0,28 ± 0,1 y 1,02 ± 0,01 unidades arbitrarias, respectivamente) (Figura 17A). La expresión de ApoA-I esta disminuida significativamente en homogenizados HC comparado a C (0,73 ± 0,1 y 1,01 ± 0,01, unidades arbitrarias, respectivamente) (Figura 17B).

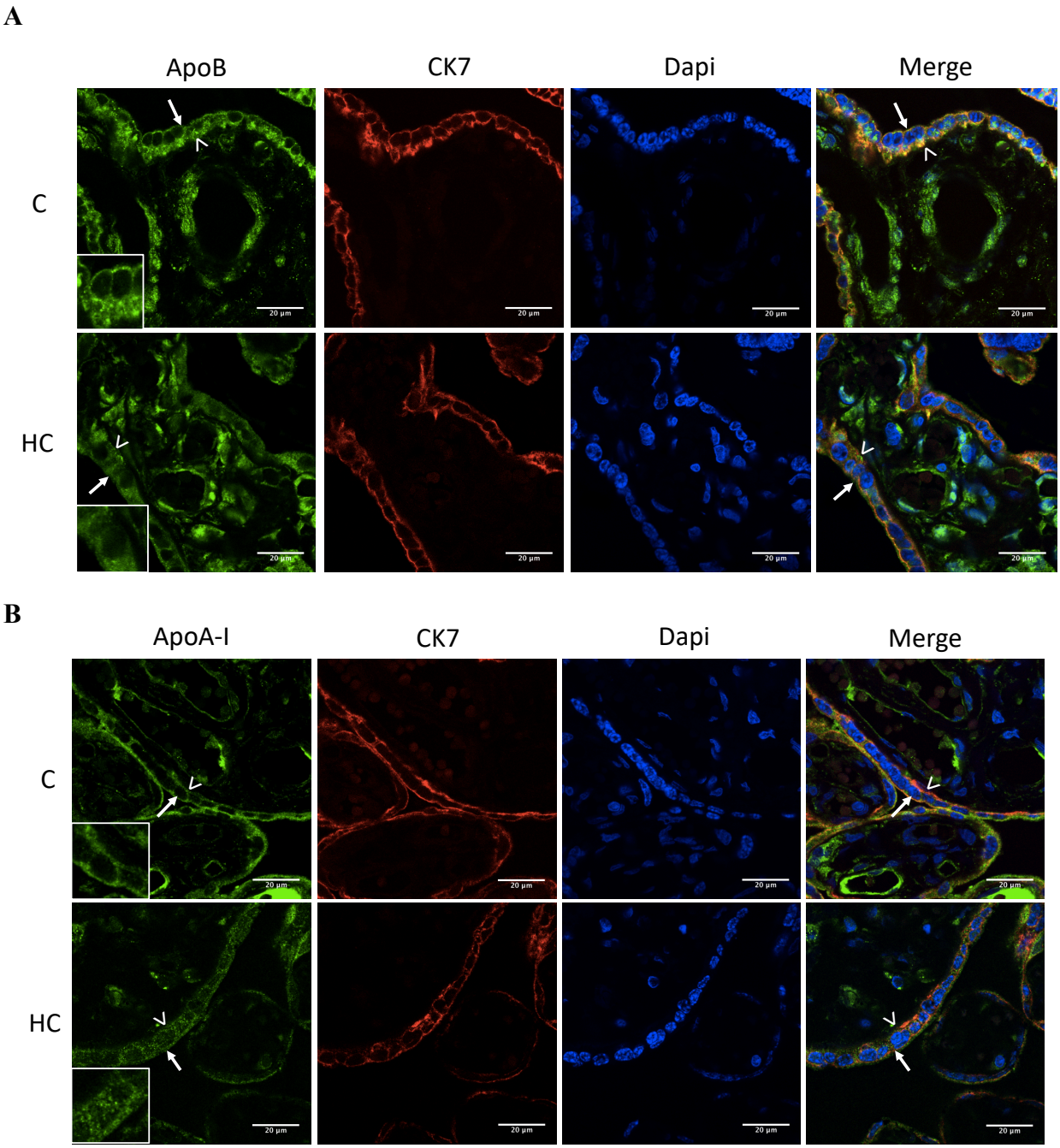

Figura 16. Localización y expresión de ApoB y ApoA-I en tejido de placenta C y HC.

(A) ApoB y (B) ApoA-I en placentas de embarazos C (Control) y HC (Hipercolesterolemia). Se utilizó el anticuerpo *anti*-ApoB (1:30), *anti*-ApoA-I (1:30), *anti*-CK7 (1:30) y Dapi (0,1 µg/mL). Merge: superposición de CK7, Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 20µm. n=3 placentas por grupo.

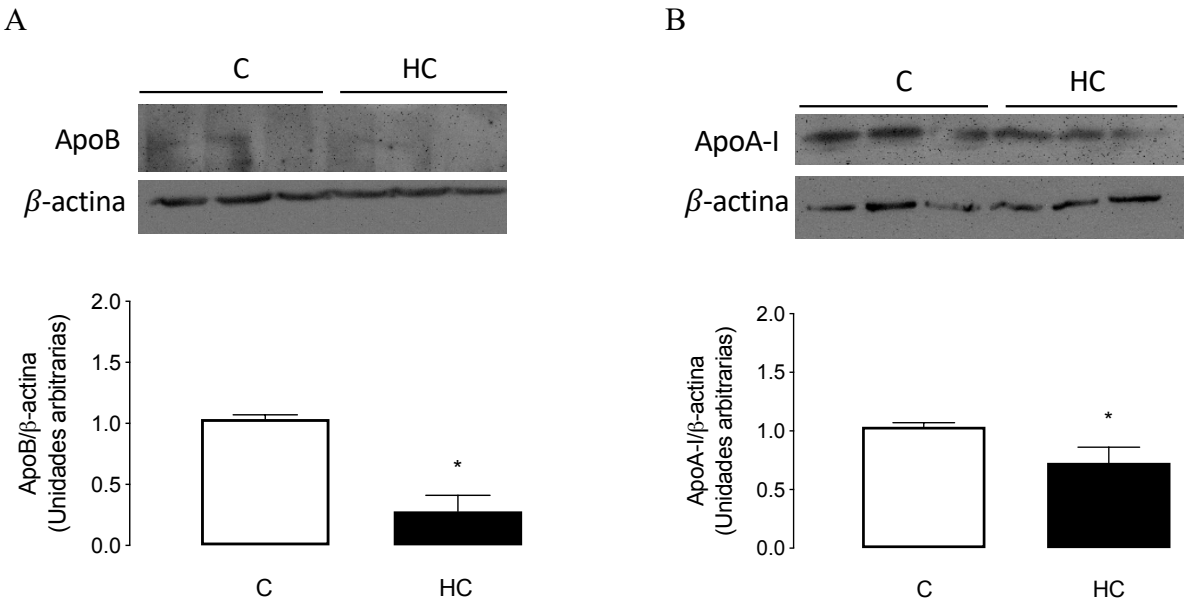

Figura 17. Expresión de ApoB y ApoA-I en tejido de placenta C y HC.

Expresión de (A) ApoB y (B) ApoA-I en tejido de placenta de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante Western blot, se utilizó el anticuerpo *anti*-ApoB (1:1000), *anti*-ApoA-I (1:1000), *anti*-β-actina (1:5000). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3-6 placentas por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

4.10. Localización y expresión de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC

Para determinar si HC modifica la localización y distribución de los receptores de lipoproteínas en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto, se determinó mediante inmunofluorescencia en células de placentas C y HC la localización de LDLR y SR-BI. Dado que los receptores de lipoproteínas pueden ser endocitados, pero se requieren que estén en la membrana celular para su actividad, se evaluó la localización y expresión de estos en células del sincitiotrofoblasto permeabilizadas (señal total) y no permeabilizadas (señal en la membrana).

En células permeabilizadas la intensidad de la señal para LDLR no fue diferente en células HC respecto a las células C (Figura 18A y 18B). En cuanto a la localización y expresión de SR-BI, la intensidad de señal fue menor en las células HC comparadas a C (Figura 18C y 18D).

Además, para determinar la expresión de los receptores en la membrana celular, se evaluó la expresión de LDLR y SR-BI en células no permeabilizadas C y HC. En estas células la intensidad de señal en LDLR en la superficie celular parece estar aumentada en células HC en comparación a C (Figura 19A y 19B), de manera similar a lo observado en tejido placentario de embarazos HC. En cuanto a SR-BI, no se observaron diferencias en la intensidad de señal en la membrana de las células C y HC (Figura 19C y 19D). En células no permeabilizadas, la técnica permite observar tinción en membrana, sin embargo, las células pueden estar parcialmente permeabilizadas, permitiendo visualizar una pequeña marca también intracelular.

Adicionalmente, se evaluó la abundancia proteica de los receptores de lipoproteínas mediante Western blot en los mismos cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto. Confirmando lo descrito por inmunofluorescencia, la expresión de LDLR (Figura 20A) no mostró diferencias significativas entre C y HC, mientras que la expresión de SR-BI (Figura 20B) fue menor en células del

sincitiotrofoblasto HC comparadas a C (0,555 ± 0,1 y 1,01 ± 0,01, unidades arbitrarias, respectivamente).

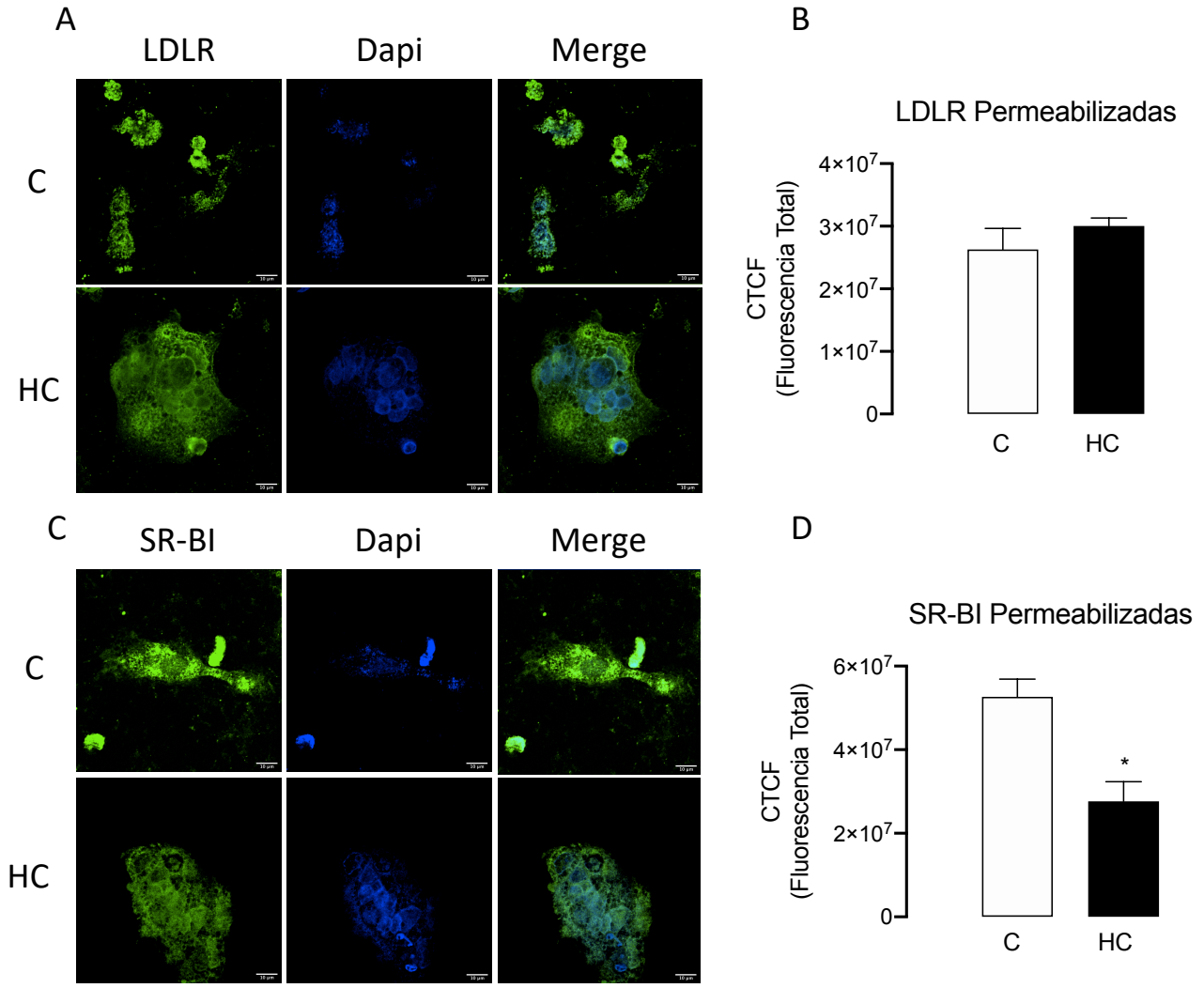

Figura 18. Localización de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

(A) LDLR y (B) cuantificación de fluorescencia total de LDLR en células del sincitiotrofoblasto C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) permeabilizadas, (C) SR-BI y (D) cuantificación de fluorescencia total de SR-BI. Se utilizó el anticuerpo anti-LDLR (1:30) y anti-SR-BI (1:30) (verde), el anticuerpo secundario correspondiente y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 10µm. n=3 cultivos independientes por grupo, se cuantificaron las imágenes en ImageJ, corregidas por el fondo. Se utilizó la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en 10-20 campos para cada cultivo celular corregida por el área. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

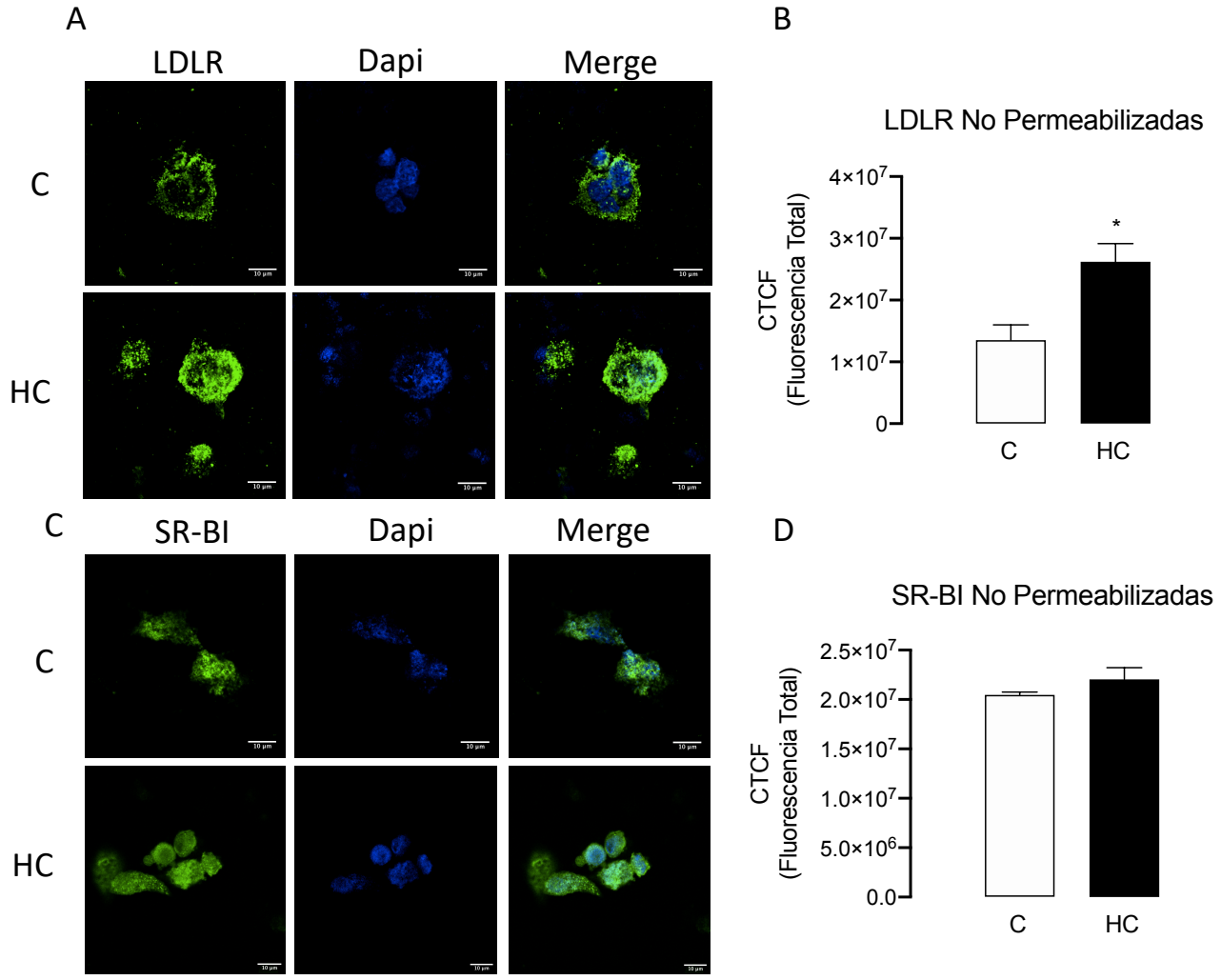

Figura 19. Localización de receptores de lipoproteínas en células del sincitiotrofoblasto C y HC no permeabilizadas.

(A) LDLR y (B) cuantificación de fluorescencia total de LDLR en células del sincitiotrofoblasto C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) no permeabilizadas, (C) SR-BI y (D) cuantificación de fluorescencia total de SR-BI. Se utilizó el anticuerpo *anti*-LDLR (1:30) y *anti*-SR-BI (1:30) (verde), el anticuerpo secundario correspondiente y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 10µm. n=3 cultivos independientes por grupo, se utilizó la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en 10-20 campos para cada cultivo celular corregida por el área. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

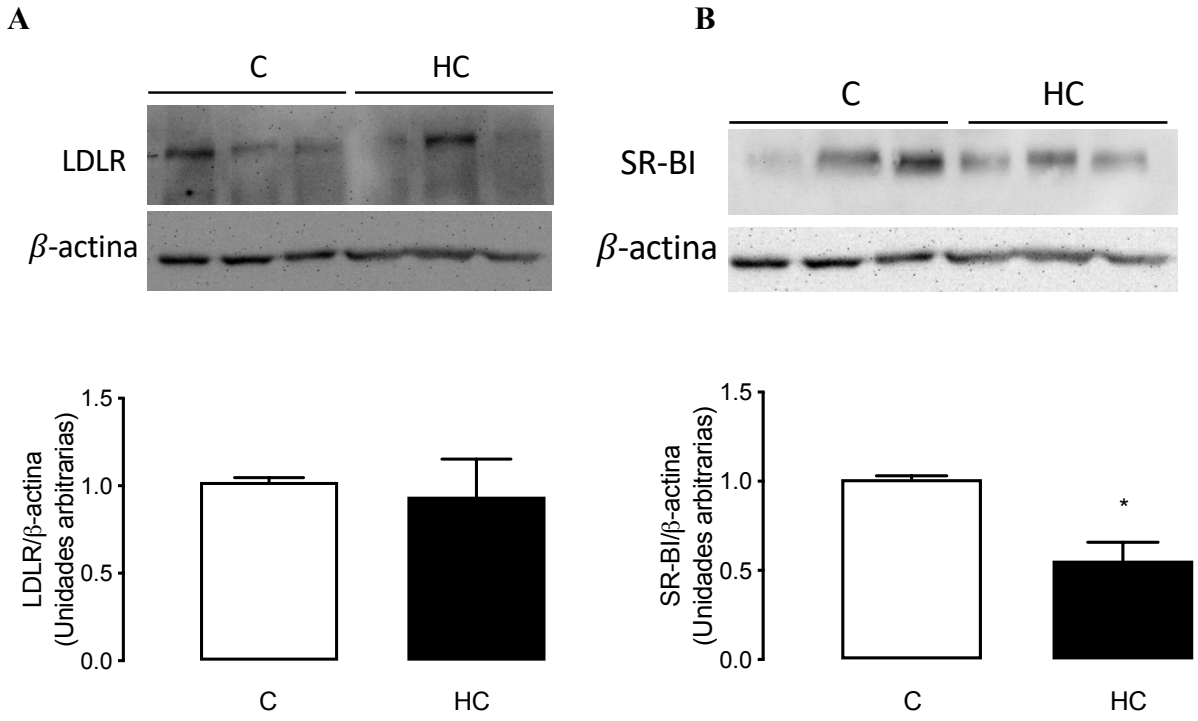

Figura 20. Expresión de LDLR y SR-BI en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Expresión de (A) LDLR y (B) SR-BI en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante Western blot, se utilizó *anti*-LDLR (1:1000), *anti*-SR-BI (1:1000), *anti*-β-actina (1:5000). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 8 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

4.11. Expresión y localización de receptores de lipoproteínas en sincitiotrofoblastos polarizados

Lugo de evaluar la localización de receptores de lipoproteínas en placenta y sincitiotrofoblasto no polarizado, evaluamos la localización de estos en el modelo de células polarizadas del sincitiotrofoblasto con el objetivo final de utilizar este moelo para detemrinar la direccionalidad del tráfico de colesterol (hacia compartimento materno o fetal). En primer lugar, determinamos la expresión de LDLR (Figura 21A) y SR-BI (Figura 21B) entre los días 1 y 7 de cultivo, durante este tiempo en que ocurre la polarización, ambas proteínas se expresaron. Además, se observaron las proyecciones ortogonales a través del Z-stack, para determinar la localización de los receptores y estos sugieren que LDLR (rojo) se expresa predominantemente en MMV, y de menor forma en la MB de la monocapa del sincitiotrofoblasto polarizado (Figura 22A). En cuanto a SR-BI, se observó una mayor señal en la membrana apical, la cual es de menor intensidad en la membrana basal (Figura 22B).

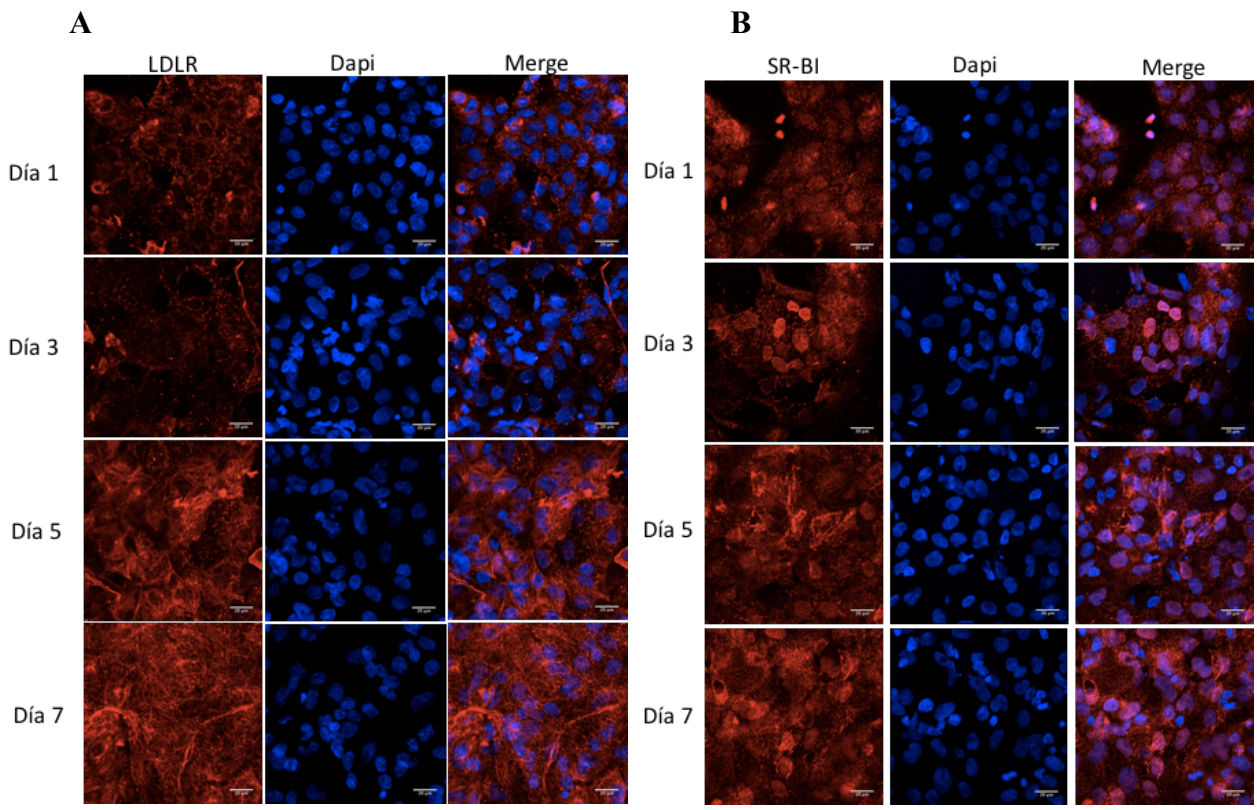

Figura 21. Expresión de receptores de lipoproteínas en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la expresión de (A) LDLR y (B) SR-BI mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 1, 3, 5 y 7 después de sembrar las células. Se utilizó el anticuerpo *anti*-LDLR (1:30) (rojo), *anti*-SR-BI (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

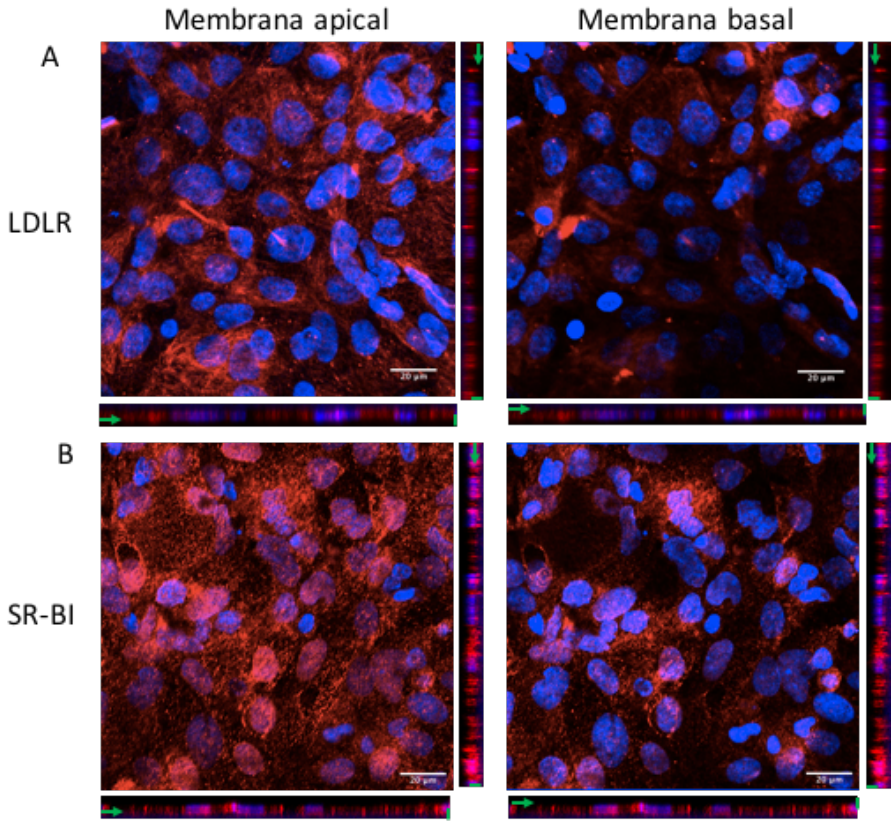

Figura 22. Localización de receptores de lipoproteínas en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la localización apical o basal de (A) LDLR y (B) SR-BI mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 7 después de sembrar las células. Se utilizó el anticuerpo *anti*-LDLR (1:30) (rojo), *anti*-SR-BI (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas de Z stack con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

4.12. Inhibición de la captación de LDL-DiI y HDL-DiI en sincitiotrofoblasto

Para evaluar si la captación de LDL-DiI ocurre de forma específica mediante LDLR, se bloqueó la endocitosis del receptor de LDL por depleción de potasio (K^+) en células del sincitiotrofoblasto incubadas con lipoproteínas marcadas (LDL-DiI).

Se observó una menor captación en las células depletadas de K^+ en comparación al control, es decir, aquellas en las que no se utilizaron inhibidores (412,8 ± 66,5 vs 1671 ± 512,7 ng/mg de proteínas, respectivamente) (Figura 23A).

Para evaluar si la captación de HDL-DiI ocurre de forma específica mediante SR-BI, se utilizó BLT-1 (inhibidor del transporte de lípidos-1) como inhibidor de SR-BI. Se observó una disminución en la captación de HDL-DiI en las células pre-incubadas con BLT-1 respecto al control (1072 ± 69,6 vs 1909 ± 274,7 ng/mg de proteínas, respectivamente) (Figura 23B).

4.13. Captación de LDL-DiI y HDL-DiI en sincitiotrofoblastos C y HC

Luego de determinar que la captación es dependiente del receptor, se incubaron por 2 horas las LDL-DiI a una concentración de 0-200 µg/mL a 37ºC. Se observó una disminución significativa en la captación de LDL-DiI (Figura 24A) en células HC comparada a C. Se determinó que la capacidad máxima de captación (Tabla 5) V_{max}/K_m está disminuida significativamente en HC respecto a C (7,2 ± 0,3 y 110,2± 41,7, ng/mg proteína /h/(µg/mL), respectivamente).

Se evaluó la actividad de SR-BI en sincitiotrofoblastos de placentas C y HC. Se marcaron lipoproteínas HDL con DiI, se incubaron por 4 horas a una concentración de 0-50 µg/mL a 37ºC. Se observó una disminución en la captación de HDL-DiI (Figura 24B) en células HC comparada a C. La capacidad máxima de captación (Tabla 5), V_{max}/K_m , está disminuida significativamente en células HC respecto a C (93,8 ± 34,6 y 339,3 ± 185, ng/mg proteína /h/(µg/mL), respectivamente).

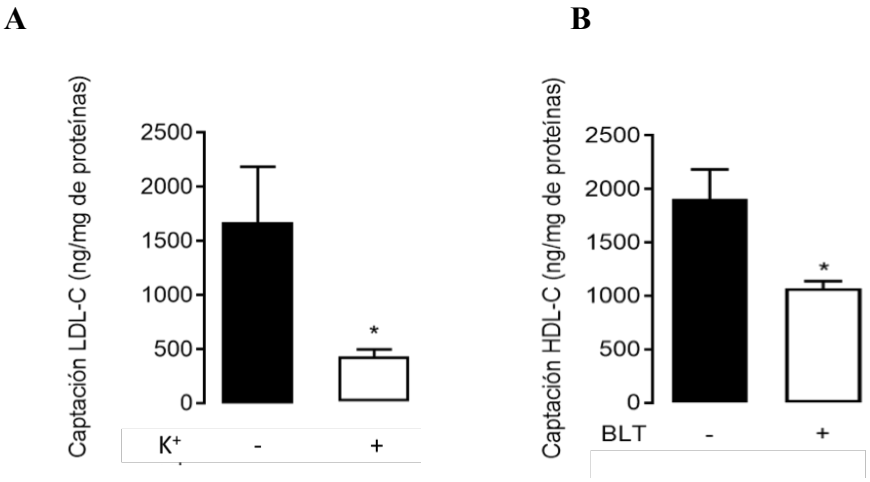

Figura 23. Inhibición en la captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto. Se analizó la inhibición en la captación de LDL y HDL marcado con el fluoróforo DiI en células BeWo, utilizando depleción de potasio (buffer hipotónico libre de potasio), incubación a 4ºC o inhibición por BLT-1 y luego 2h de incubación con LDL-DiI (0-200 µg/mL) o 4 horas de incubación con HDL-DiI (0-50 µg/mL). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes al control.

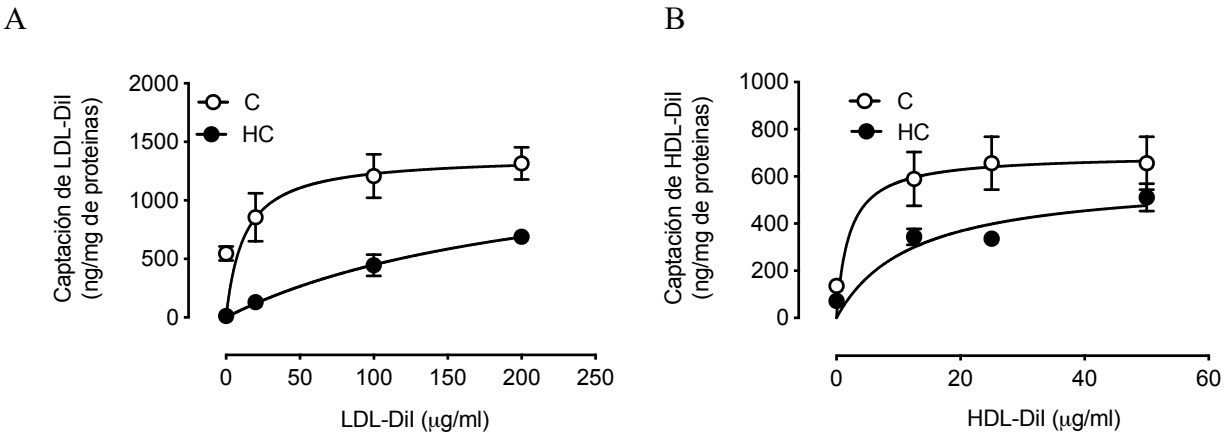

Figura 24. Captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Se analizó la captación de HDL marcado con el fluoróforo DiI en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), luego de 4 horas de incubación con HDL-DiI (0-50 μg/mL). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 9 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de captación de LDL-DiI y HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto C y HC

		V_{max} (ng/mg proteína por hora)	**K_m (µg/mL)**	**V_{max}/K_m (ng/mg proteína /hr/(µg/mL))**
Captación LDL-DiI	C	1399 ± 336	12,7 ± 7,4	110,2 ± 41,7
	HC	1324 ± 51	183,7 ± 9,8 *	7,2 ± 0,3 *
Captación HDL-DiI	C	692 ± 144	2,04 ± 1,8	339,3 ± 185
	HC	593 ± 71,7*	6,32 ± 3,9 *	93,8 ± 34,6 *

Captación de HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto aislados de placentas C (Control) y HC (hipercolesterolemia). V_{max}, velocidad máxima; K_m, parámetro de Michaelis-Menten aparente; V_{max}/K_m, capacidad máxima de captación. Los valores son promedio S.E.M, n=9 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0.05 versus valores correspondientes a C.

4.14. Localización y expresión de transportadores de colesterol en placentas C y HC

En el eflujo de colesterol se ha descrito que podrían participar los transportadores ABCA1, ABCG1 y también SR-BI. Los resultados de localización y abundancia proteica de SR-BI en tejido placentario y cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto, ya fueron descritos en los objetivos anteriores.

Para determinar la localización de los transportadores de colesterol ABCA1 y ABCG1 en placentas humanas C y HC, se realizó inmunofluorescencia indirecta en muestras de placenta, fijadas con paraformaldehido e incluidas en parafina. Se observó la localización de ABCA1 en MMV (indicado con flechas) (Figura 25A), en MB (indicado con punta de flecha) y en endotelio (indicado con asterisco), tanto en muestras C como en HC. Es posible sugerir que en placentas HC hay una mayor expresión de ABCA1 en las células endoteliales.

Se observó la localización de ABCG1 principalmente en MB (indicado con puntas de flechas) (Figura 25B), tanto en muestras C como HC.

Para determinar la expresión de los transportadores de colesterol en placentas humanas C y HC, se realizó Western en homogenizados de placenta. En concordancia con las imágenes de tejido placentario, la expresión de los transportadores de colesterol ABCA1 (Figura 26A) esta aumentada en homogenizada de placentas HC comparadas a C (1,43 ± 0,9 y 1,01 ± 0,01, unidades arbitrarias, respectivamente). Por otra parte, la abundancia proteica de ABCG1 (Figura 26B) está disminuida en homogenizados de placenta HC comparadas a C (0,76 ± 0,04 y 1,03 ± 0,01, unidades arbitrarias, respectivamente).

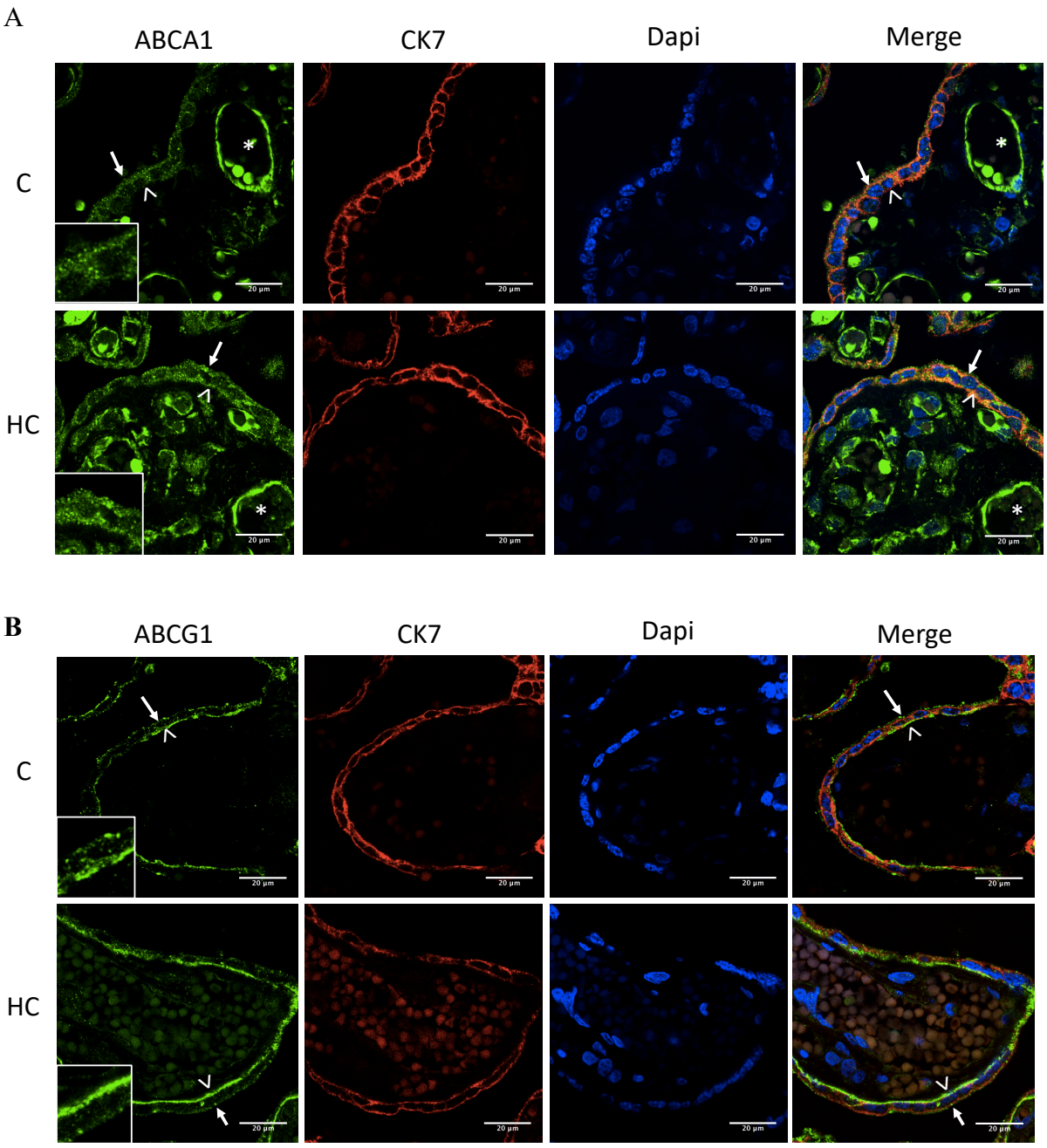

Figura 25. Localización de transportadores de colesterol en tejido de placenta C y HC.

(A) ABCA1 y (B) ABCG1 en placentas de embarazos C (Control) y HC (Hipercolesterolemia). Se utilizó el anticuerpo *anti*-ABCA1 (1:30), *anti*-ABCG1 (1:30), *anti*-CK7 (1:30) y Hoechst 33258 (0,1 µg/mL). Merge: superposición de CK7, Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

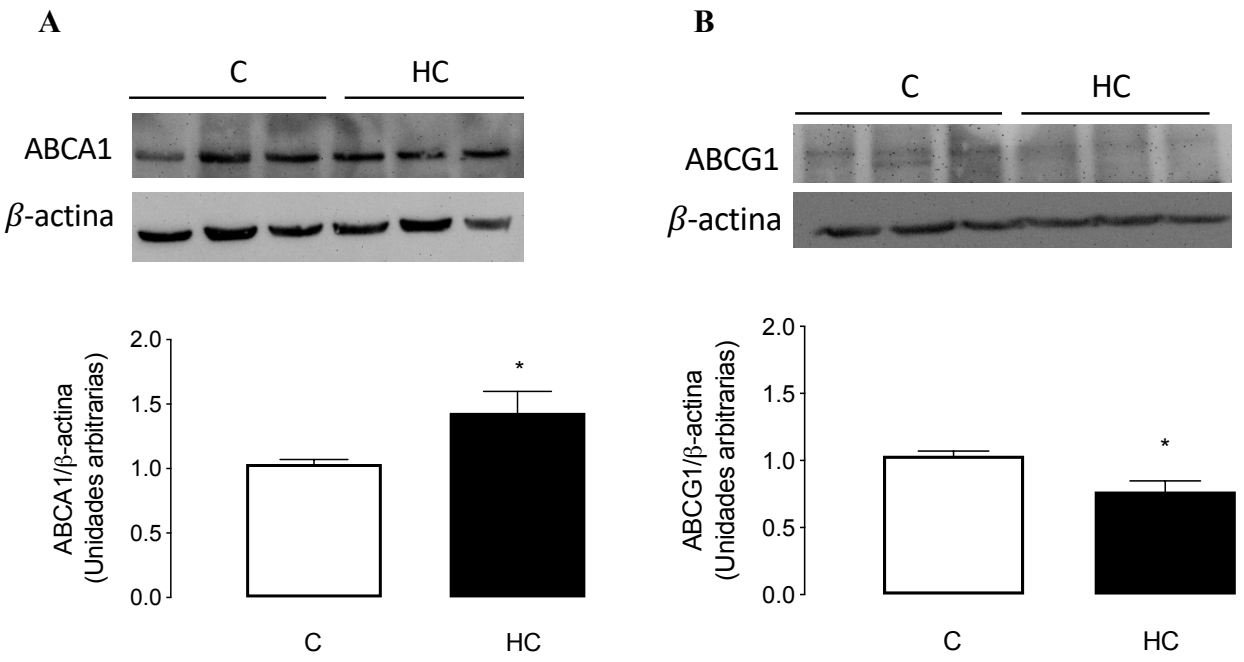

Figura 26. Expresión de ABCA1 y ABCG1 en homogenizados de placentas C y HC.

Expresión de (A) ABCA1 y (B) ABCG1 en homogenizado de placenta de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante Western blot, se utilizó anti-ABCA1 (1:1000), anti-ABCG1 (1:1000), anti-β-actina (1:5000). Los valores son promedio ± S.EM. n= 3-6, placentas por grupo. *P< 0,05 vs valores correspondientes en C.

4.15. Localización y expresión de transportadores de colesterol en sincitiotrofoblastos C y HC

Al igual que los receptores de lipoproteínas, los transportadores de colesterol también pueden ser endocitados, y se requiere que estén en la membrana celular para su actividad. Se evaluó la localización y abundancia proteica de ABCA1 y ABCG1 en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto permeabilizados (señal total) y no permeabilizados (señal en la membrana) tanto de embarazos C como HC.

En células permeabilizadas se observó ABCA1 en células C y HC y no se determinaron diferencias en la intensidad de señal entre ambos grupos de estudio (Figura 27A y 27B). En cuanto a la abundancia proteica de ABCG1, la intensidad de la señal fue menor en células HC comparado con C (Figura 27C y 28D).

En experimentos realizados con células sin permeabilizar, se determinó que ABCA1 se encuentra en la membrana celular, tanto en células C como HC, y no se observaron diferencias en la intensidad de la señal en ambos grupos de estudio (Figura 28A y 28B). En referencia a ABCG1, la intensidad de la señal fue mayor en células HC comparada a C (Figura 28C), al cuantificar la fluorescencia total, se determinó una mayor fluorescencia para ABCG1 en células del sincitiotrofoblasto HC comparada a C (Figura 28D).

Además, se evaluó la abundancia proteica de los transportadores de colesterol mediante Western blot en las mismas células, confirmando las observaciones realizadas en los experimentos de inmunofluorescencia. La abundancia proteica de ABCA1 no mostró diferencias significativas entre C y HC (Figura 29A) y la abundancia proteica de ABCG1 fue menor en células del sincitiotrofoblasto HC comparadas con C (0,32 ± 0,1 y 1,01 ± 0,01 unidades arbitrarias, respectivamente) (Figura 29B).

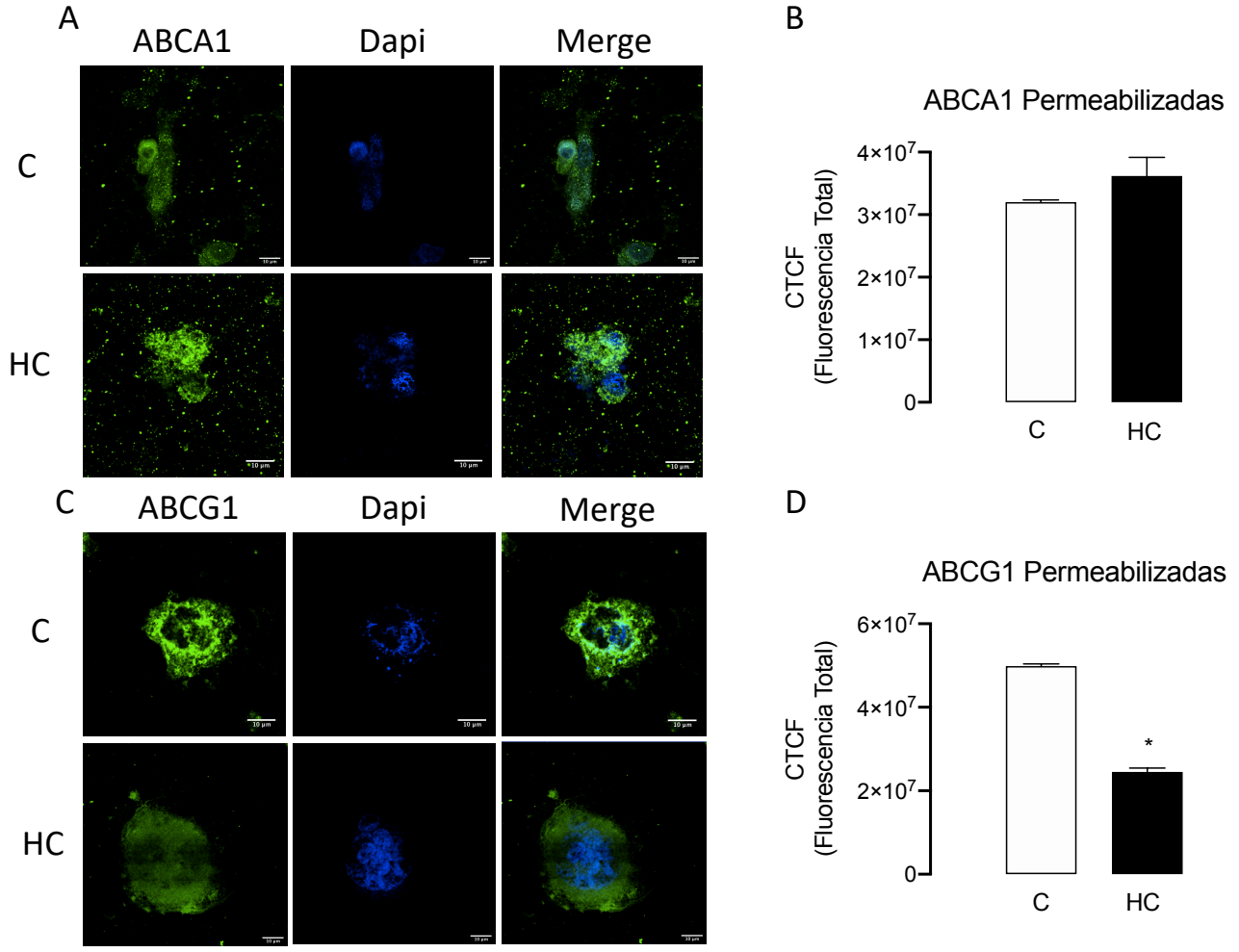

Figura 27. Localización de transportadores de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

(A) ABCA1 y (B) cuantificación de fluorescencia total de ABCA1 en células del sincitiotrofoblasto C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) permeabilizadas, (C) ABCG1 y (D) cuantificación de fluorescencia total de ABCG1. Se utilizó el anticuerpo *anti*-ABCA1 (1:30) y *anti*-ABCG1 (1:30) (verde), el anticuerpo secundario correspondiente y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 10µm. n=3 cultivos independientes por grupo, se cuantificaron las imágenes en ImageJ, corregidas por el fondo. Se utilizó la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en 10-20 campos para cada cultivo celular corregido por el área. *P< 0,05 vs valores correspondientes en C.

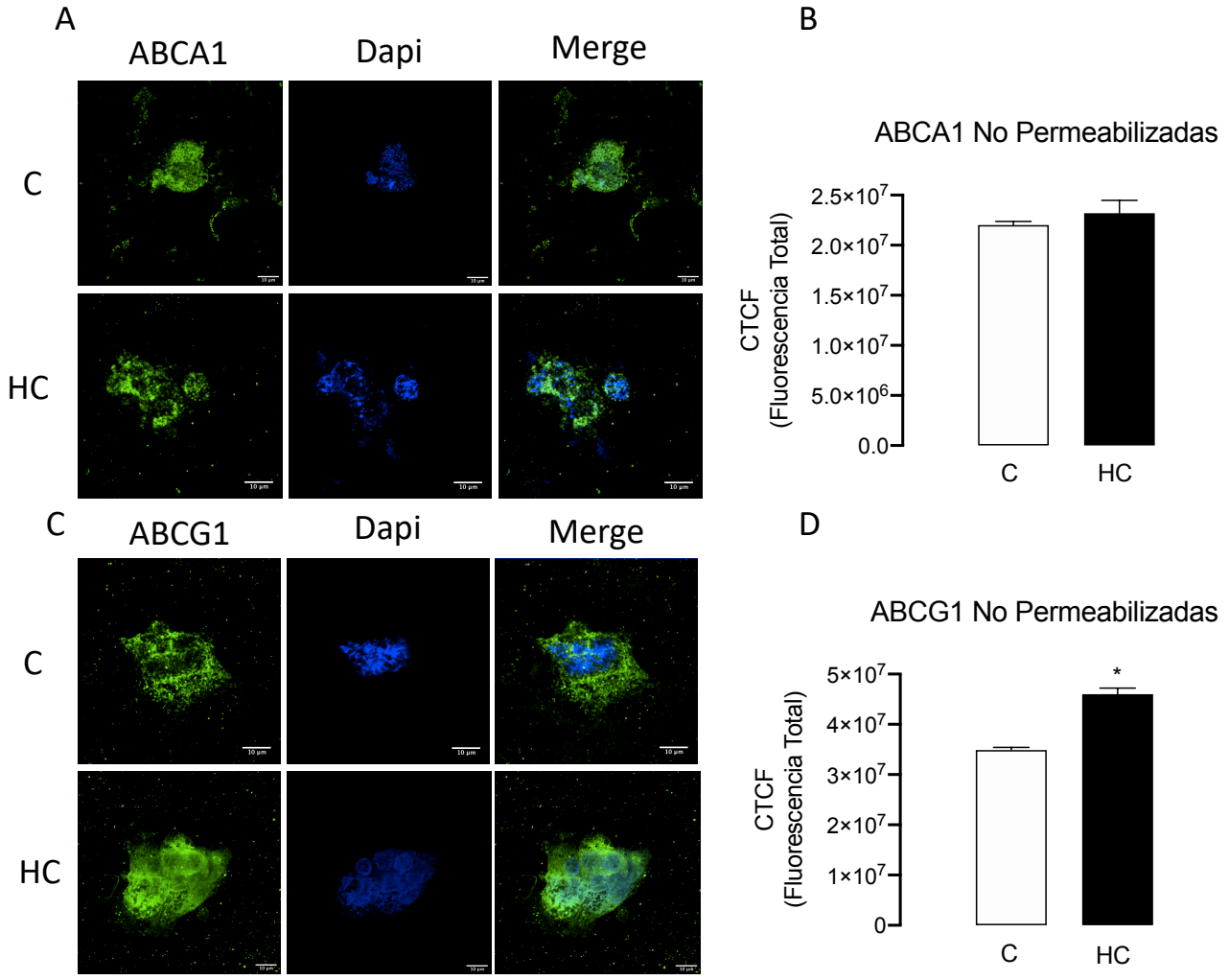

Figura 28. Localización de transportadores de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC no permeabilizadas.

(A) ABCA1 y (B) cuantificación de fluorescencia total de ABCA1 en células del sincitiotrofoblasto C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) no permeabilizadas, (C) ABCG1 y (D) cuantificación de fluorescencia total de ABCG1 Se utilizó el anticuerpo *anti*-ABCA1 (1:30) y *anti*-ABCG1 (1:30) (verde), el anticuerpo secundario correspondiente y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 60X en microscopio confocal Nikon. Barra: 10µm. n=3 cultivos independientes por grupo, se cuantificaron las imágenes en ImageJ, corregidas por el fondo. Se utilizó la fórmula para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF) en 10-20 campos para cada cultivo celular corregido por el área. *P< 0,05 vs valores correspondientes en C.

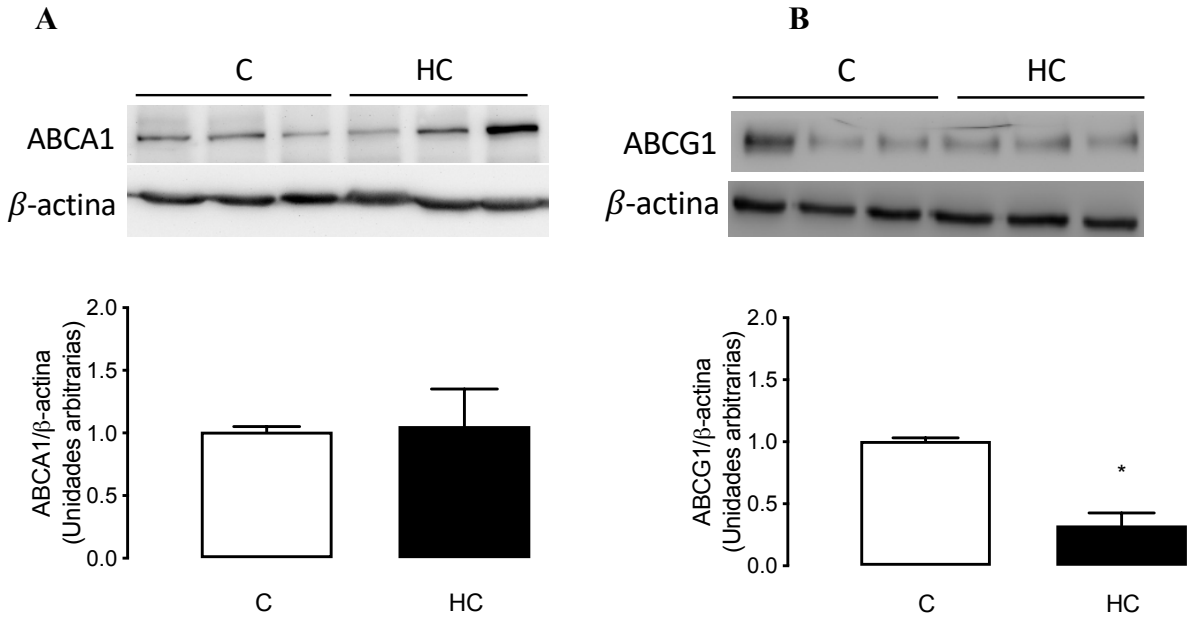

Figura 29. Expresión de ABCA1 y ABCG1 en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Expresión de (A) ABCA1 y (B) ABCG1 en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante Western blot, se utilizó *anti*-ABCA1 (1:1000), *anti*-ABCG1 (1:1000), *anti*-β-actina (1:5000). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 8 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

4.16. Expresión y localización de transportadores de colesterol en sincitiotrofoblastos polarizados

En primer lugar, se determinó que tanto ABCA1 (Figura 30A) como ABCG1 (Figura 30B) se expresan entre los días 1 y 7 de cultivo, tiempo en que ocurre la polarización. Las proyecciones ortogonales a través del Z-stack, sugieren que ABCA1 (rojo) se expresa predominantemente en la membrana apical del sincitiotrofoblasto (Figura 31A). En cuanto a ABCG1, se observó una mayor señal en la membrana basal (Figura 31B).

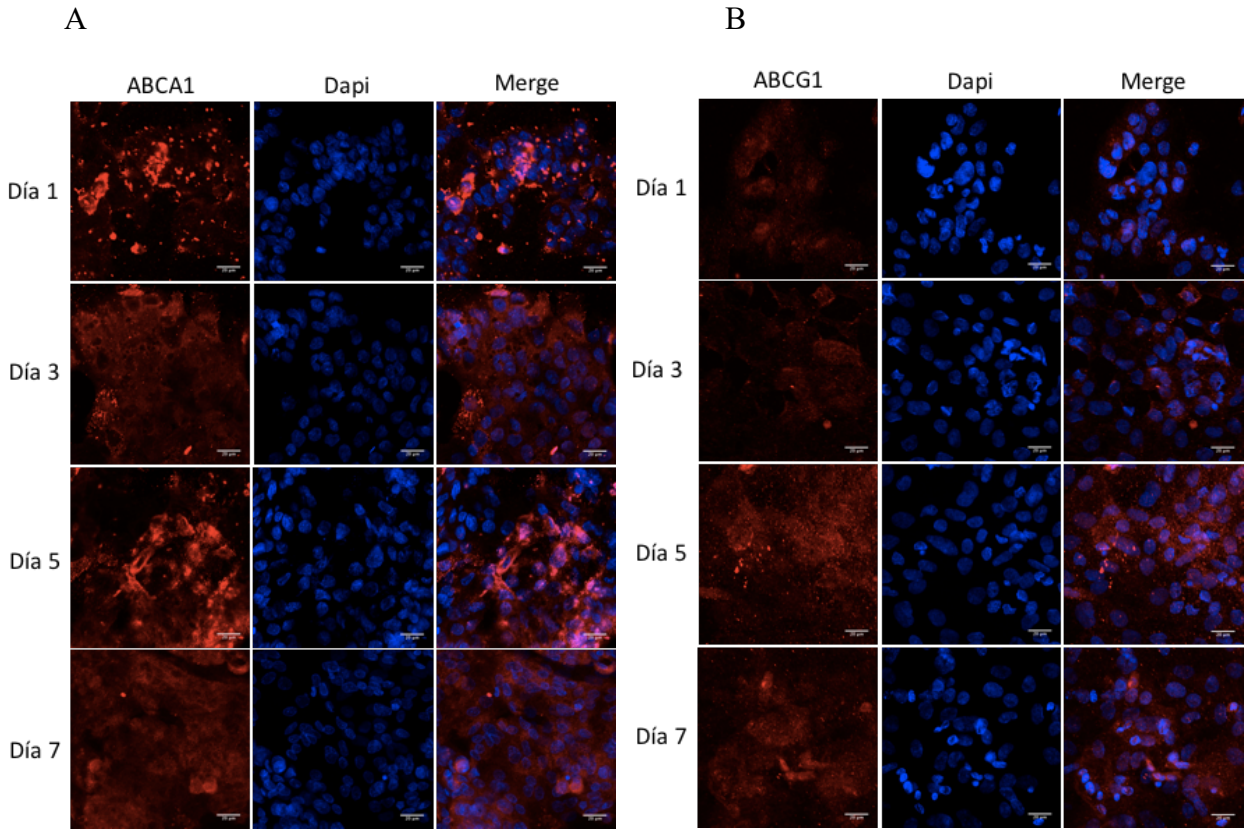

Figura 30. Expresión de transportadores de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la expresión de (A) ABCA1 y (B) ABCG1 mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 1, 3, 5 y 7 después de sembrar las células. Se utilizó el anticuerpo *anti*-ABCA1 (1:30) (rojo), *anti*-ABCG1 (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

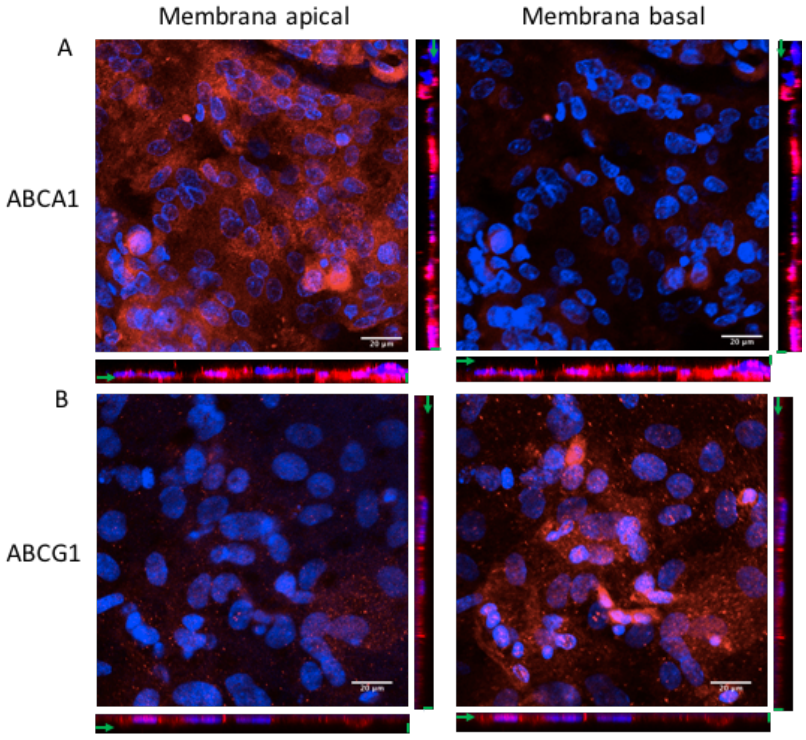

Figura 31. Localización de transportadores de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la localización apical y basal de (A) ABCA1 y (B) ABCG1 mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto polarizados al día 7 después de sembrar las células. Se utilizó el anticuerpo *anti*-ABCA1 (1:30) (rojo), *anti*-ABCG1 (1:30) (rojo), y Dapi (0,1 µg/mL) (azul). Merge: superposición de Dapi y el anticuerpo correspondiente. Imágenes representativas con objetivo 40X en microscopio confocal Ayriscan. Barra: 20µm. n=3 por grupo.

4.17. Curva de tiempo, concentración y parámetros cinéticos del eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos

Para poder calcular el tiempo óptimo de incubación con el aceptor de colesterol HDL, se realizó una curva dosis respuesta a diferentes tiempos (0-24 horas) y diferentes concentraciones de HDL (0-50 μg/ml) en células del sincitiotrofoblasto. Como se observa en la Figura 32A y Figura 32B y en la tabla 6 de cálculo de velocidad inicial, el tiempo en el cual todas las concentraciones evaluadas se encuentran en linealidad y a velocidad inicial (v_i) fue entre 3 y 6 horas, los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 6 indican que no hay diferencias significativas a esos dos tiempos evaluados. De esta forma, todos los experimentos posteriores se realizaron a 6 horas.

4.18. Eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL en sincitiotrofoblastos C y HC

Para evaluar la actividad de los transportadores de colesterol, se determinó el eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL. Cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto se pre-incubaron por 18 h con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con colesterol marcado radiactivamente, luego se incubó con ApoA-I (0 - 10 μg/mL) o HDL (0 - 50 μg/mL) por 6 h a 37°C. Posteriormente, los medios de cultivos se recuperaron y las células fueron lisadas. Se determinó la radiactividad tanto en el medio de cultivo como en los lisados celulares y se estimó el eflujo como la fracción de señal radiactiva (^3H) en el medio, comparado con la señal total en el medio y las células.

Al evaluar el eflujo hacia ApoA-I en células del sincitiotrofoblasto, observamos que existe un aumento en el eflujo de colesterol hacia este aceptor en células de mujeres embarazadas HC respecto a C (8 ± 1,7 vs 3,6 ± 0,4 %, respectivamente) (Figura 33A).

Al evaluar el eflujo hacia HDL en células del sincitiotrofoblasto, observamos que existe una disminución en el eflujo de colesterol hacia HDL en células de embarazos HC respecto a C (Figura

33B). Se observó que la capacidad máxima de eflujo (V_{max}/K_m) fue menor en HC respecto a C (0,5 ± 0,3 y 2,8 ± 0,8, % eflujo /h/(µg/mL), respectivamente) (Tabla 7).

Considerando que la contribución de SR-BI en el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto es desconocido, quisimos conocer la participación de este receptor en el eflujo de este lípido hacia HDL (50 µg/mL) en células del sincitiotrofoblasto utilizando el inhibidor farmacológico de SR-BI, BLT-1 (0-50 µg/mL). Pudimos observar que al inhibir SR-BI no disminuyó el eflujo de colesterol hacia HDL en células C o HC (Figura 34A y B).

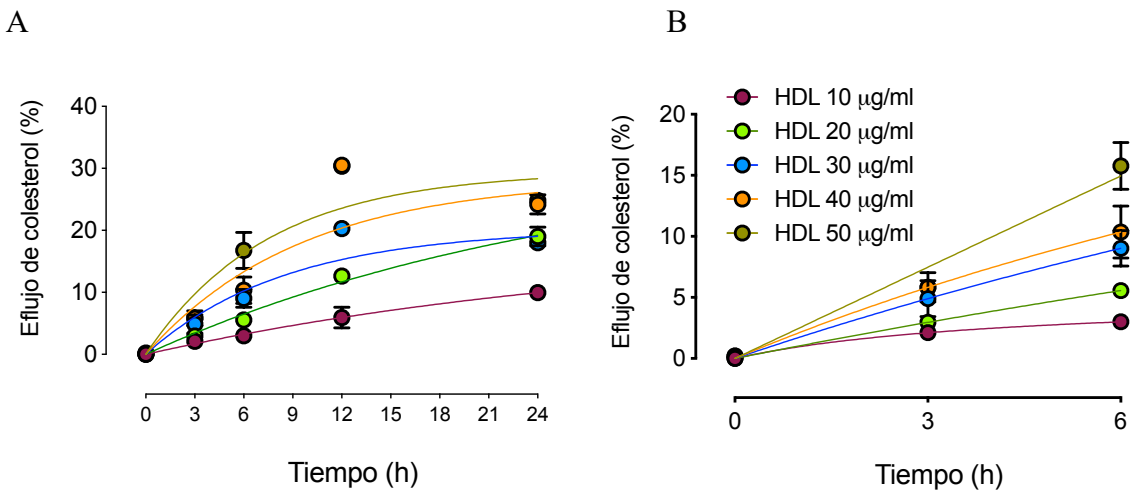

Figura 32. Curva de tiempo y concentración para eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto humanos.

Eflujo de colesterol hacia HDL en células del sincitiotrofoblasto, (A) diferentes tiempos (0-24 horas) de incubación con HDL (0-50 µg/mL). (B) Eflujo de colesterol en tiempo lineal a velocidad inicial (vi) a distintas concentraciones de HDL. Los valores son promedio S.E.M, n= 3.

Tabla 6. Parámetros cinéticos para la determinación de velocidad inicial de eflujo

	3 horas	**6 horas**
V_{max} (pmol/μg/ proteína/hora)	13,22 ± 2,05	10,51 ± 2,37
K_m (μmol/L)	0,09 ± 0,05	0,09 ± 0,07
K_D (pmol/μg proteína/hora/(μmol/L))	0,96 ± 0,14	0,78 ± 0,18
v_i (pmol/μg proteína/hora)	1,08 ± 0,16	0,70 ± 0,16
V_{max}/K_m (pmol/μg/proteína/hora/(μg/ml))	148,2 ± 22,23	118,06 ± 26,56

Eflujo de colesterol en células del V_{max}, velocidad máxima; K_m, constante de Michaelis-Menten aparente; V_{max}/K_m, capacidad máxima de captación. Los valores son promedio S.E.M, n=3.

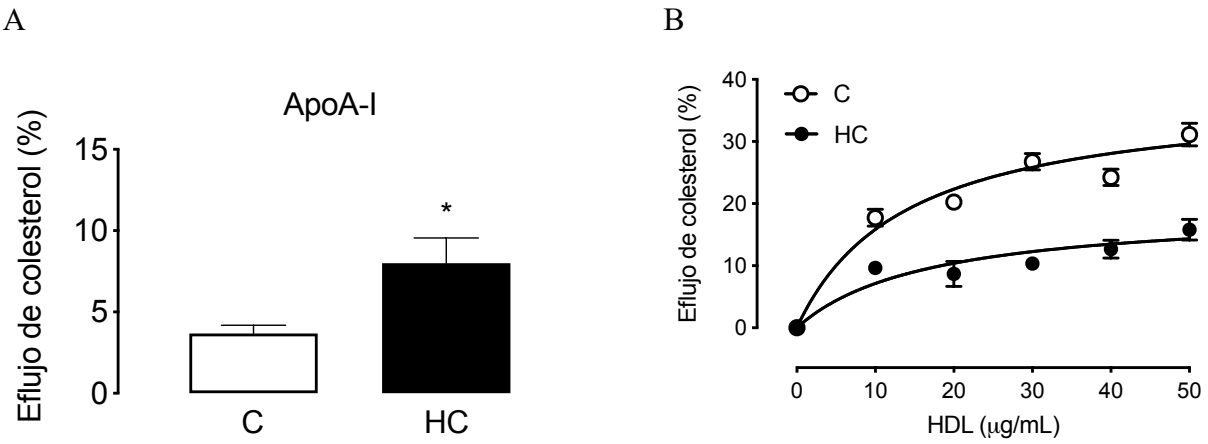

Figura 33. Eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL en células del sincitiotrofoblasto C y HC. Eflujo de colesterol hacia ApoA-I (A) y hacia HDL (B) en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), a 6 horas de incubación con ApoA-I (0-10 μg/mL) o HDL (0-50 μg/mL). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 4-8 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC

	V_{max} (% de eflujo por hora)	K_m (µg/mL)	V_{max}/K_m (% de eflujo/h/(µg/mL))
C	37,8 ± 3,6	13,4 ± 4,4	2,8 ± 0,8
HC	41,4 ± 22,2	83,9 ± 66,2 *	0,5 ± 0,3 *

Eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control) y HC (Hipercolesterolemia). V_{max}, velocidad máxima; K_m, constante de Michaelis-Menten aparente; V_{max}/K_m, capacidad máxima de captación. Los valores son promedio S.E.M, n=4 cultivos independientes por grupo. *P<0.05 versus valores correspondientes a C.

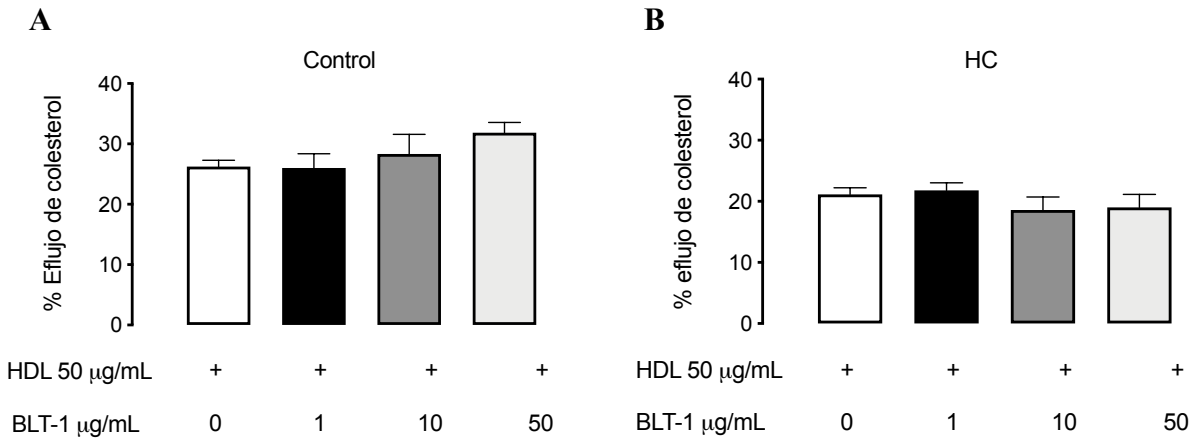

Figura 34. Inhibición del eflujo de colesterol vía SR-BI en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control) y HC (Hipercolesterolemia) mediante la inhibición de SR-BI con BLT-1, a 6 horas de incubación con HDL (50 μg/mL) y BLT-1 (0-50 μg/mL). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 8 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores con BLT-1 0 μg/mL.

4.19. Direccionalidad del eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos polarizados

Para determinar la direccionalidad del eflujo de colesterol, se evaluó en el modelo polarizado, la salida de este lípido hacia diferentes aceptores agregados el compartimento apical y/o basal (Figura 35). Se evaluó el eflujo hacia HDL adulto (Figura 35A), HDL fetal (Figura 35B), suero adulto (Figura 35C) y suero fetal (Figura 35D). Se observó eflujo de colesterol hacia los diferentes aceptores cuando estos estaban en el compartimento apical. Por el contrario, cuando los aceptores estaban en el compartimento basal, no se determinó eflujo de colesterol. Finalmente, cuando los aceptores estaban presentes en ambos compartimentos, se determinó eflujo hacia el compartimento apical en una magnitud similar a cuando el aceptor estaba solo en el compartimento apical.

En experimentos adicionales, se tiñeron con filipina células polarizadas para determinar cuanto colesterol permanecía en ellas luego del experimento de eflujo (Figura 36). En el panel izquierdo, se observa el control (Transwell® con matrigel, sin células, Figura 36A), células sin cargar con colesterol y sin aceptor (Figura 36B) y células cargadas con colesterol y sin aceptor (Figura 36C). En el panel derecho se puede observar que al adicionar HDL (adulto o fetal) en el compartimento apical (Figura 36D), la fluorescencia es similar al control sin colesterol y sin aceptor (Figura 36B), sugiriendo que el colesterol salió hacia el aceptor como se observa en las figuras 35A y 35B. Por otra parte, al adicionar los aceptores en el compartimento basal (Figura 36E), se puede observar una mayor fluorescencia, similar a la determinada en las células cargadas con colesterol y sin aceptor (Figura 36C), sugiriendo que el colesterol no sale hacia el aceptor presente en el compartimento basal aunque los transportadores de este lípido estén presentes. Por último, al adicionar los aceptores en ambos compartimentos (Figura 36F), se observa también una reducción en la fluorescencia similar a la observada en las figuras 36B y 36D, sugiriendo al igual que lo determinado en las figuras 35A y 35B, que el colesterol sale hacia los aceptores.

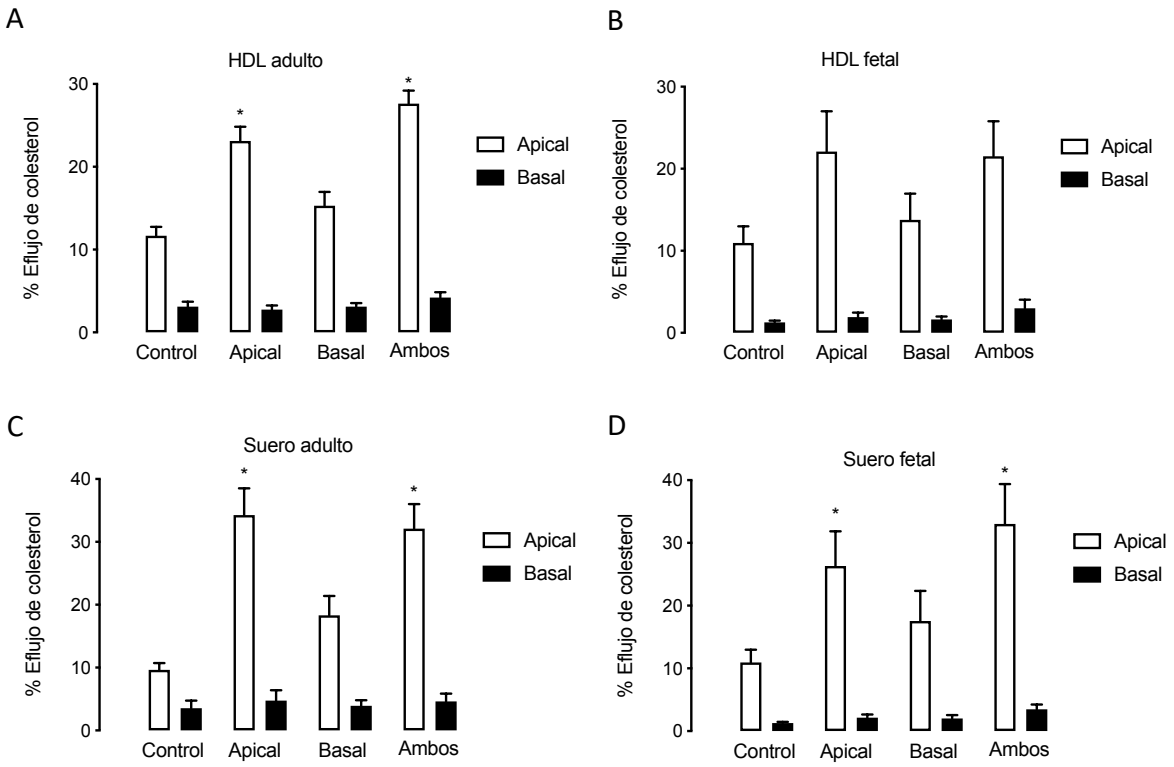

Figura 35. Eflujo en sincitiotrofoblastos polarizados utilizando diferentes aceptores en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblasto polarizadas utilizando (A) HDL adulto y (B) HDL fetal (50 µg/mL), (C) Suero Adulto y (D) Suero fetal (5%), a 6 horas. Apical y basal en las barras blancas y negras indica el área en la cual las células fueron expuestas al aceptor de colesterol. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3-7. *P<0,05 vs valores correspondientes al control apical.

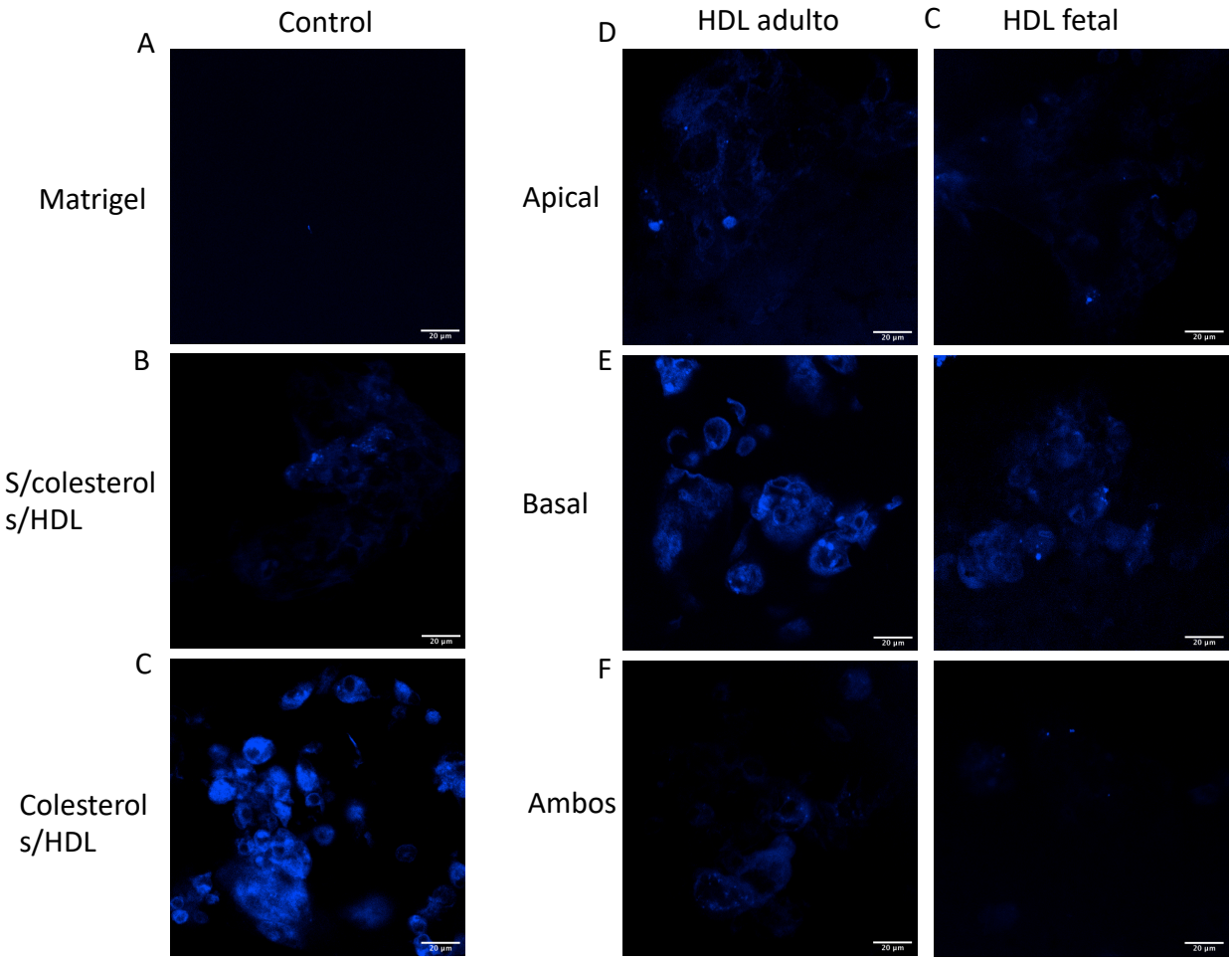

Figura 36. Acumulación de colesterol en cultivos polarizados de células del sincitiotrofoblasto humano confluentes en insertos Transwell® recubiertos con Matrigel.

Se determinó la acumulación de colesterol en (A) Matrigel y (B) células sin colesterol y sin aceptores (^{3}H), (C) células con colesterol (^{3}H) y sin aceptores, (D) células con HDL (adulto y fetal) en el compartimento apical, (E) basal o (F) ambos con tinción filipina al día 7 después de sembrar las células. La tinción de Filipina (25 µg/mL, 30 minutos) en células fijadas con PFA 4%. Imágenes representativas con objetivo 40X. n= 3. Barra 20 µm.

4.20. Contenido de colesterol total, éster y libre en placentas y sincitiotrofoblastos C y HC

Como último objetivo general, después de estudiar el proceso de captación y el proceso de eflujo, evaluamos el contenido de este lípido en homogenizado de placenta y en células del sincitiotrofoblasto de las condiciones C y HC.

Se realizó una extracción de lípidos con solución de Folch lisados proteicos de placentas C y HC. El colesterol total, éster y no éster (o libre) se determinó con el kit Amplex^{TM} Red. El colesterol total y éster no mostraron diferencias significativas entre placentas C y HC (Figura 37A y B), sin embargo, el colesterol libre fue mayor en placentas HC comparadas a C (10,1 ± 0,06 vs 5,1 ± 0,4 µg colesterol/µg de proteína, respectivamente) (Figura 37C).

De igual forma se evaluó en células del sincitiotrofoblasto el contenido de colesterol. El colesterol total no mostró diferencias significativas entre células del sincitiotrofoblasto C y HC (Figura 38A), el colesterol éster fue menor en células del sincitiotrofoblasto HC comparadas a C (3,67 ± 0,9 y 6,09 ± 0,9, µg colesterol/µg de proteína, respectivamente) (Figura 38B). El colesterol no éster, evaluado tanto por reacción enzimática como por tinción de filipina, fue mayor en células del sincitiotrofoblasto HC comparadas a C (5,75 ± 0,3 y 4,30 ± 0,4, µg colesterol/µg de proteína, respectivamente) (Figura 38C) y (273000 ± 21000 y 192000 ± 30000, fluorescencia total celular, respectivamente) (Figura 38D).

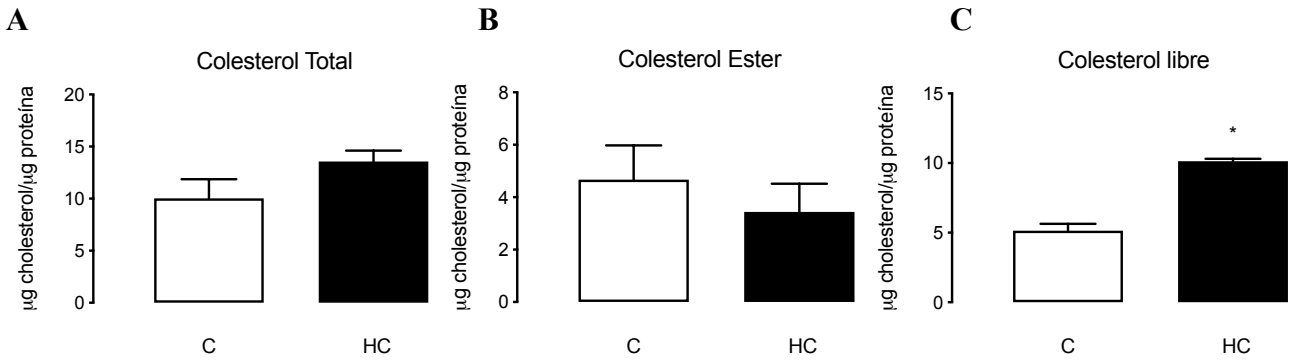

Figura 37. Contenido de colesterol en placentas C y HC.

(A) El colesterol total fue determinado en la fracción hidrofóbica obtenida luego de una extracción de Folch, en 70 µg de proteínas de lisados de placentas C o HC. El colesterol total se determinó por una reacción enzimática con colesterol esterasa (0,4 U/mL), colesterol oxidasa (0,13 U/ mL) y peroxidasa (1,3 U/mL). (B) El colesterol éster se determinó por una reacción enzimática con colesterol oxidasa (0,13 U/mL) y peroxidasa (1,3 U/mL). (C) El colesterol no éster se determinó por la resta entre ambas reacciones. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 6 placentas por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

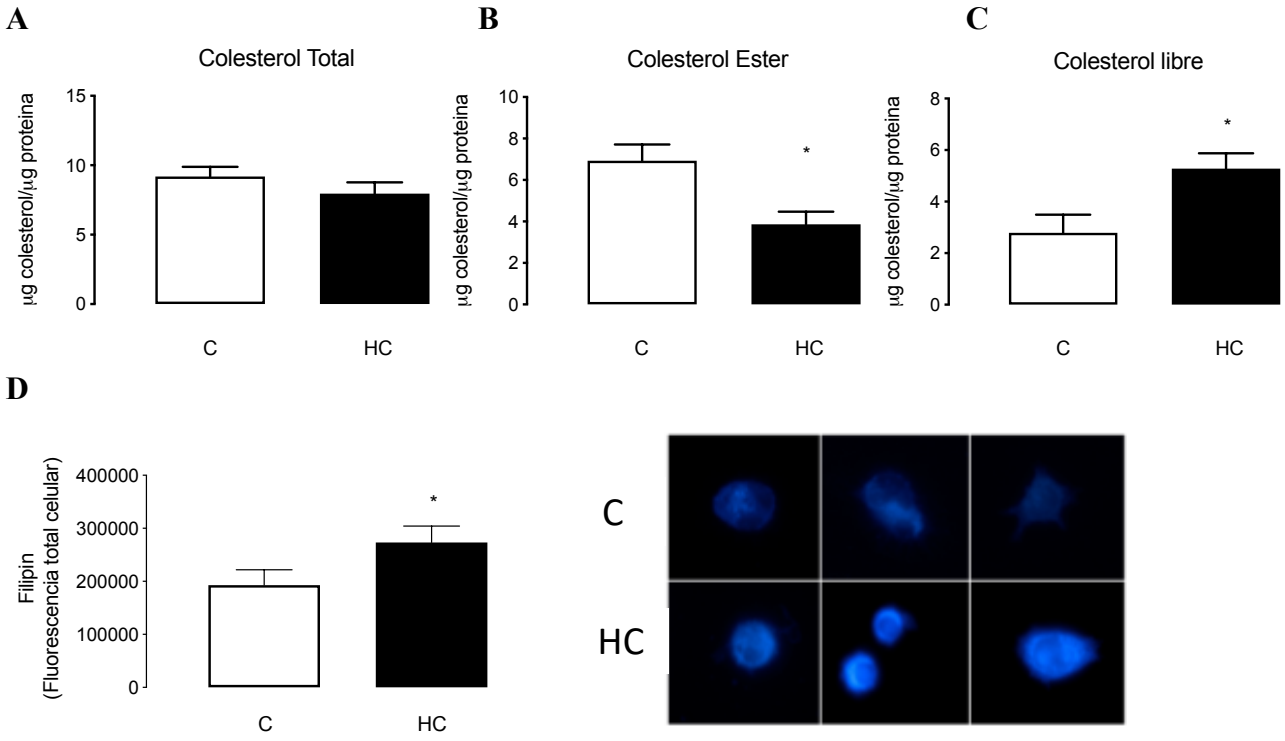

Figura 38. Contenido de colesterol en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

(A) El colesterol total fue determinado en la fracción hidrofóbica obtenida luego de una extracción de Folch, en 70 µg de proteínas de lisados de sincitiotrofoblastos C o HC. El colesterol total se determinó por una reacción enzimática con colesterol esterasa (0,4 U/mL), colesterol oxidasa (0,13 U/ mL) y peroxidasa (1,3 U/mL). (B) El colesterol éster se determinó por una reacción enzimática con colesterol oxidasa (0,13 U/mL) y peroxidasa (1,3 U/mL). (C) El colesterol no éster se determinó por la resta entre ambas reacciones y mediante (D) tinción de Filipina (25 µg/mL, 30 minutos) en células fijadas con PFA 4%. Imágenes representativas con objetivo 40X. Se realizó la cuantificación de fluorescencia total en 10-20 campos para cada cultivo celular. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 6 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C. Barra: 30µm.

4.21. Expresión de enzimas responsables de la síntesis y esterificación del colesterol en sincitiotrofoblastos C y HC

Con el objetivo de determinar si HC modifica la expresión de la enzima clave en la vía de síntesis endógena de colesterol (HMG-CoA reductasa: HMCGR), lo que podría contribuir con los niveles elevados de colesterol no éster descrita en el punto anterior, se estudió la expresión de esta enzima mediante PCR tiempo real y Western blot. Se observó que en células del sincitiotrofoblasto de la condición HC, la expresión génica (0,016 ± 0,004 vs 0,05 ± 0,01) y la abundancia proteica (0,14 ± 0,06 y 1,04 ± 0,01, unidades arbitrarias, respectivamente) de HMGCR esta disminuida al comparar con células de la condición C (Figura 39A y B).

Por otra parte, se evaluó si el aumento del colesterol libre se asocia a cambios en la expresión de una enzima encargada de esterificar el colesterol, la esterol acil transferasa (ACAT), observándose una disminución en la expresión génica de ACAT-1 en células del sincitiotrofoblasto HC comparada a C (0,006 ± 0,001 vs 0,03 ± 0,006, respectivamente) (Figura 40).

Considerando que niveles elevados de colesterol no esterificado o libre se asocian en distintos modelos celulares a muerte celular, evaluamos la viabilidad de las células cultivadas de placentas C y HC. El ensayo de viabilidad celular de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) mostró una reducida viabilidad celular en el grupo HC comparada a C (Figura 41).

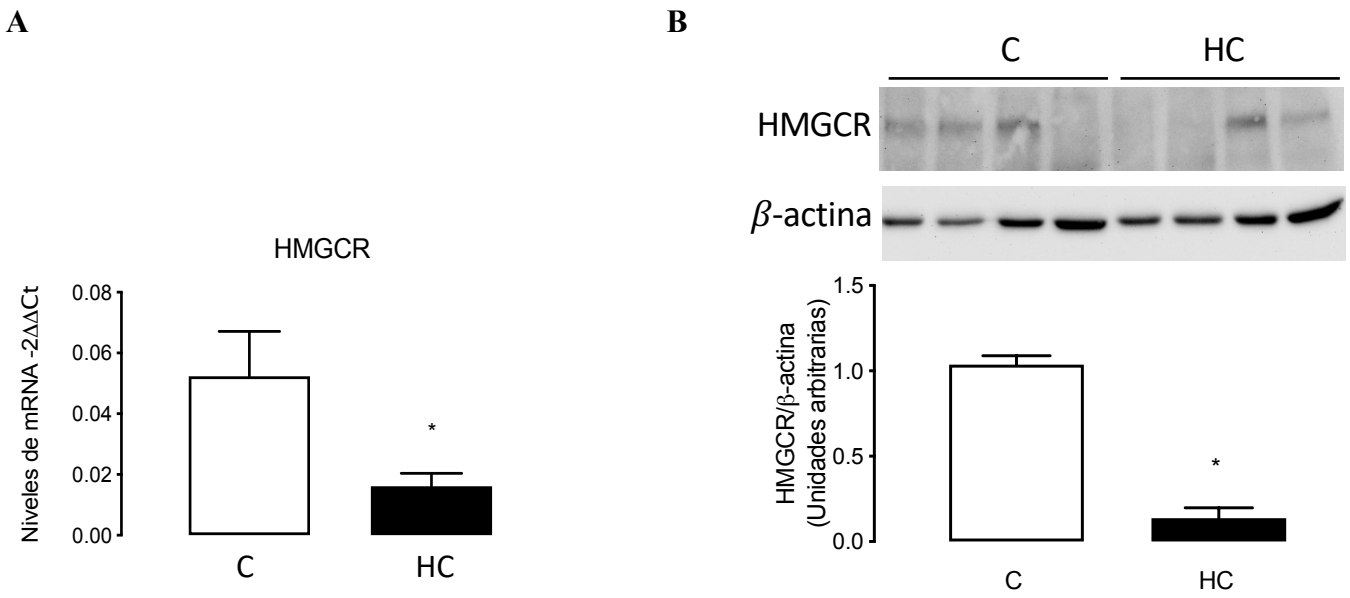

Figura 39. Expresión de HMGCR en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Expresión de HMGCR en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante (A) PCR tiempo real y (B) Western blot, se utilizó GADPH y el anticuerpo *anti*-HMGCR (1:500), *anti*-β-actina (1:5000) como controles. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 4 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

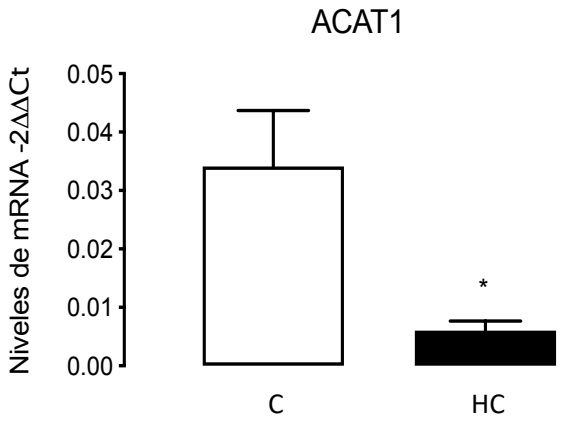

Figura 40. Expresión de ACAT1 en células del sincitiotrofoblasto C y HC.

Expresión de ACAT1 en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante PCR tiempo real, se utilizó como control GADPH. Los valores son promedio ± S.E.M. n= 4 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

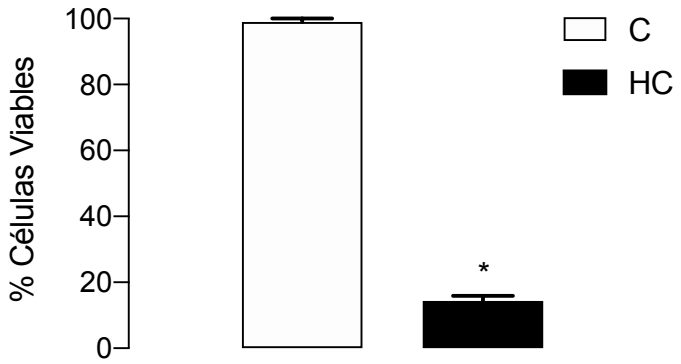

Figura 41. Ensayo de viabilidad celular en sincitiotrofoblastos C y HC.

Viabilidad celular en células del sincitiotrofoblasto de embarazos C (Control, Blanco) y HC (Hipercolesterolemia, Negro), mediante ensayo de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (5mg/mL). Los valores son promedio ± S.E.M. n= 3 cultivos celulares independientes por grupo. *P<0,05 vs valores correspondientes en C.

5. DISCUSION

El transporte de nutrientes, incluyendo el colesterol, desde la circulación materna hacia la circulación fetal a través de la placenta, es un proceso altamente regulado. Si bien el tráfico de colesterol está descrito en su mayor parte durante el embarazo [Palinski et al., 2009, Woollett, 2011], no se conoce como la HC podría estar afectando este proceso. En línea con publicaciones anteriores, este estudio confirmó que los recién nacidos de embarazos de HC tienen niveles de CT, HDL y Tg similares a los recién nacidos de mujeres C, lo que sugiere una posible regulación de tráfico de colesterol placentario materno-fetal [Leiva et al., 2013; Ethier-Chiasson et al., 2007]. Por esta razón, planteamos determinar si la condición HC se asocia con cambios en el tráfico de colesterol en la placenta humana.

Este estudio muestra por primera vez que HC está asociado con cambios en el tráfico de colesterol en las células del sincitiotrofoblasto de la placenta humana, probablemente debido a una alteración entre la captación de HDL y LDL, así como también del eflujo de colesterol.

Con respecto a los efectos de la hipercolesterolemia materna en el tráfico de colesterol placentario humano, se demostró previamente que en homogenizados totales de placentas HC existe una regulación a nivel del mensajero y a nivel proteico de los receptores y transportadores de colesterol, sin embargo, de los datos presentados en estos dos trabajos, no se ha estudiado el efecto de HC sobre la función de estas proteínas en las células placentarias responsables de la captación de lipoproteínas maternas y el eflujo de colesterol en las células del sincitiotrofoblasto.

Con el desarrollo de esta tesis comprobamos el grado de sincialización y la pureza de los citotrofoblastos. Describimos que ya desde las 48 horas post-cultivo teníamos una mezcla de células

cito y sincitiotrofoblasto, las que eran 100% sincitiotrofoblasto a las 72 horas [Jansson *et al*., 2009]. Determinamos por citometría de flujo que la contaminación de nuestros cultivos con otro tipo celular como células mesenquimales o células endoteliales, células que abundan en la placenta, fue mínima.

Además, no solo evaluamos la localización de los receptores y transportadores de colesterol en placentas y células del sincitiotrofoblastos C y HC, también pudimos corroborar la localización de estos en un modelo de células del sincitiotrofoblasto polarizados de placentas controles.

Dado que la células del sincitiotrofoblasto presentan una membrana apical y membrana basal, en la que se expresan diferentes receptores y transportadores de colesterol, es importante evaluar en un modelo de células del sincitiotrofoblasto polarizados la expresión y localización de estos, las cuales participan en el proceso de captación y eflujo de colesterol, además de evaluar la direccionalidad del eflujo de colesterol, hacia la membrana apical (circulación materna) o hacia la membrana basal (circulación fetal).

Se estandarizó un modelo in vitro eficaz del sincitiotrofoblasto humano para estudios de transporte, técnica que fue aprendida en el único laboratorio que ha logrado estandarizarlo, Universidad de Berna en Suiza con la Dra. Christiane Albrecht [Huang *et al*., 2016; Kallol *et al*., 2018]. Se observó que las células del citotrofoblasto aislados de placentas de término, pueden formar una monocapa confluente funcional del sincitiotrofoblasto en insertos Transwell® recubiertos con matrigel.

En el laboratorio de la Dra. Albrecht, se realizaron experimentos para evaluar el rol de la matriz extracelular en la morfogénesis y diferenciación del sincitiotrofoblasto, matriz que puede proporcionar resistencia mecánica y soporte estructural para la adhesión celular, la viabilidad y el crecimiento [Kallol *et al*., 2018; Huang *et al*., 2016]. La matrigel, secretada por las células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm, se asemeja al complejo entorno extracelular, que incluye laminina, colágeno IV, heparán sulfato, así como al factor de crecimiento transformante b, factor de crecimiento

epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, y representa un factor similar de composición como la membrana basal. El efecto positivo de Matrigel sobre las propiedades de adhesión se verificó mediante pruebas de viabilidad celular [Huang *et al*., 2016].

En términos de la formación de un eje apical-basal, se estudió la polaridad de la monocapa del sincitiotrofoblasto mediante el monitoreo de los valores de TEER. Cuando la resistencia eléctrica neta entre las superficies apical y basal de la monocapa alcanzó un valor constante cercana a 300 Ωcm^2, se asumió que se produjo una polarización completa del sincitiotrofoblasto [Rice-Evans y Packer, 2003; Hammarlund-Udenaes *et al*., 2013; Huang *et al*., 2016]. Se observó un patrón de crecimiento similar con un valor de *plateau* en TEER comparable durante el establecimiento de la monocapa confluente con la línea celular Caco-2 intestinal humana [Xia *et al*., 2013] y la línea celular placentaria BeWo [Heaton *et al*., 2008]. Además, el nivel de salida de LY demostró ser un compuesto adecuado para la vía de transporte paracelular, y proporcionó evidencia adicional con respecto a la formación de una capa de sincitiotrofoblasto polarizado en este modelo de Transwell®.

Además, como otro control para determinar la monocapa de células del sincitiotrofoblasto, evaluamos mediante inmunofluorescencia un marcador epitelial CK7 y un marcador apical PLAP, indicando que ambos marcadores están aumentados hasta el día 7 post siembra de las células en los Transwell® y las proyecciones ortogonales a través del Z-stack, sugiere que CK7 se expresa en ambas membranas de la monocapa del STB y PLAP predominantemente en la apical. De esta forma, con el cultivo polarizado establecido, fue factible evaluar la localización de los receptores y transportadores de colesterol y evaluar la direccionalidad del eflujo en este sistema.

Estos resultados, pueden apoyar fuertemente los resultados obtenidos en placentas y en células del sincitiotrofoblasto de placentas controles.

5.1 Captación de colesterol en células del sincitiotrofoblasto

5.1.1 Captación de LDL

LDLR se describió en la placenta [Furuhashi *et al*., 1989; Wadsack *et al*., 2007]; sin embargo, solo dos trabajos mostraron la localización *in situ* de LDLR en tejido placentario [Kamper *et al*., 2017; Pecks *et al*., 2016].

Evaluamos la abundancia proteica de LDLR en homogenizados de placenta, no observando diferencias en la expresión del receptor entre placentas C y HC, lo cual es contradictorio con lo publicado en el único trabajo que lo ha evaluado [Ethier-Chiasson *et al*., 2007]. En este trabajo se observó una disminución en la abundancia proteica de LDLR en homogenizados de placenta de mujeres hipercolesterolemicas, sin embargo, la cuantificación del resultado es cuestionable y las mujeres de dicho estudio tenían elevados también los niveles de triglicéridos.

En tejido placentario determinamos la localización del receptor en sincitiotrofoblasto, principalmente en MMV y células endoteliales, lo cual es concordante con datos en la literatura [Furuhashi *et al*., 1989; Kamper *et al*., 2017]. Las imágenes podrían sugerir que en placentas HC la intensidad de señal para LDLR en la superficie apical de las células del sincitiotrofoblasto es mayor que en placentas C (Figura 14A).

LDLR requiere ser endocitado para liberar el colesterol de las LDL en el interior celular [Goldstein *et al*., 1974, 2015], por lo que al existir mayor localización de LDLR en la superficie celular, este podría estar retenido en la membrana y de esta forma su función estaría inhibida, tal como se ha demostrado en otros modelos [Sorrentino *et al*., 2013]. Lo que sugiere que la actividad endocítica del receptor podría estar afectada. Sin embargo, esta hipótesis requiere evaluación con estudios mecanicistas detallados, considerando la diversidad de posibles proteínas involucradas relacionadas con el tráfico celular de LDLR [Tao *et al.,* 2016; van de Lsuis *et al*., 2017]. La mayoría de estas

proteínas se han reportado en la placenta, pero aún no se han estudiado funcionalmente [Garcia *et al*., 2001; Lybbert *et al.,* 2016].

Adicionalmente, evaluamos por inmunofluorescencia la abundancia proteica de LDLR en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto permeabilizadas, es decir, abundancia proteica en el total de la célula, y determinamos que no hay cambios en la intensidad de señal y tampoco en la abundancia proteica para LDLR evaluado por Western blot en células obtenidas de placentas de embarazos C y HC. Adicionalmente, evaluamos la localización de LDLR en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto no permeabilizadas (expresión en la superficie celular) y determinamos que la señal es mayor en células HC, esto podría relacionarse con lo determinado en las placentas HC, donde observamos también una mayor intensidad de señal en la superficie celular (Figura 14A).

Por primera vez, evaluamos la expresión y localización de LDLR, y SR-BI a medida que avanzan los días de cultivo (1- 7) en un modelo de cultivo polarizado en monocapa, y logramos ver que los receptores y transportadores no pierden su expresión, al contrario, aumentan de manera directa a medida que aumentan los días y ocurre la polarización.

Se pudo observar localización de LDLR, al igual que en las placentas, principalmente en la membrana apical pero también en la membrana basal. El receptor de LDL participa en la captación de colesterol en la superficie celular y por lo tanto debería estar localizado en la membrana apical, sin embargo, una vez que las LDL se unen a su receptor LDLR en la superficie celular, el complejo receptor- lipoproteína es endocitado; posteriormente, el LDLR se recicla a la superficie celular, mientras que las partículas de LDL se hidrolizan completamente en los lisosomas para formar colesterol libre y ácidos grasos, mediante la acción de la lipasa ácida lisosomal/colesterol esterasa [Goldstein y Brown, 2015]. Sugerimos que lo que observamos en la membrana basal probablemente

es una marca que se ve, debido al proceso endocítico del receptor, similar a lo que observamos en la inmunofluorescencia en tejido de placentas normales.

Finalmente, evaluamos directamente la funcionalidad del LDLR estudiando la captación de LDL-DiI en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto y determinamos que la captación es menor en células HC. Los parámetros cinéticos indicaron que la V_{max} para la captación de LDL-DiI es similar en células C y HC, y que la K_m es mayor, lo que sugiere que la actividad funcional y no un cambio en el número de receptores de LDL podría estar alterado en células HC, lo cual es concordante con las imágenes que muestran mayor señal para el receptor en la superficie celular (Figura 24A y Tabla 5). De esta forma sugerimos que en placentas HC, la captación de LDL es menor que en placentas C y que este cambio no se asocia con alteraciones en la abundancia proteica del receptor, sino que con posibles cambios en su internalización y actividad endocítica, fenómenos que requieren ser estudiados en mayor detalle.

5.1.2 Captación de HDL

La expresión de SR-BI en sincitiotrofoblasto y células endoteliales placentarias se ha informado previamente [Wadsack *et al*., 2003; Stefulj *et al*., 2009; Aye *et al*., 2010; Wadsack *et al*., 2007]. Sin embargo, solo un trabajo mostró recientemente la localización de SR-BI en el sincitiotrofoblasto de la placenta [Landers *et al*., 2018]. Los autores sugieren que SR-BI se localiza principalmente en el membrana apical del sincitiotrofoblasto, aunque en este trabajo no se usó un marcador adecuado para el sincitiotrofoblasto. En nuestros experimentos de colocalización con CK7, encontramos que SR-BI estaba localizado en el sincitiotrofoblasto y posiblemente en ambas membranas, apical y basal. Esto sugiere que el receptor de HDL podría participar en la captación de

colesterol HDL, pero también que es un posible mediador del eflujo de colesterol (ver la siguiente sección).

Además, y de acuerdo con un trabajo anterior [Ethier-Chiasson *et al*., 2007], los niveles de SR-BI fueron similares en placentas de embarazos de C y HC. La localización placentaria de SR-BI también fue comparable. Aunque clásicamente SR-BI se reconoce como un receptor de HDL que media la captación selectiva de los ésteres de colesterol unidos a HDL y no la captación completa de la macromolécula de HDL [Leiva *et al.,* 2011], Wadsack y colaboradores demostraron que en las células del sincitiotrofoblasto de placentas de término, la captación de colesterol HDL está mediada en proporciones iguales por la captación selectiva y la captación completa de HDL [Wadsack *et al*., 2003].

Para determinar directamente la captación de HDL, se estimó la captación de HDL-DiI en células del sincitiotrofoblasto C y HC. La abundancia proteica de SR-BI, así como la captación de HDL-DiI fue menor en las células HC. De acuerdo con la menor abundancia proteica de SR-BI, los parámetros cinéticos indicaron que la V_{max} para la captación de HDL-DiI se redujo en las células de C. Además, la K_m fue mayor, lo que sugiere que la cantidad de receptores y su actividad podrían reducirse (Figura 24B y Tabla 5).

En cuanto a SR-BI en el modelo de sincitiotrofoblastos polarizados, este se observó al igual que en las placentas, en ambas membranas (apical y basal) celulares. Si bien esta tesis demostró que SR-BI no partipa en el eflujo de colesterol en células del sincitiotrofoblastos sembrados en placas de cultivo convencionales (explicado en la sección siguiente), es importante estudiar la posible participación de este receptor en el eflujo de colesterol en un modelo de células del sincitiotrofoblasto polarizado, para descartar algún mecanismo compensatorio en el eflujo hacia el compartimento apical o basal. Otra razón por la que puede observarse expresión y localización del receptor de HDL en la

membrana basal, es lo postulado por Wadsack y colaboradores, quienes han sugerido que la captación de colesterol HDL está mediada en proporciones iguales por la captación selectiva y la captación completa de HDL [Wadsack *et al*., 2003].

En resumen, demostramos que la captación de LDL-DiI y HDL-DiI se reduce en las células del sincitiotrofoblasto de las placentas HC. Se ha sugerido que, a término del embarazo, la placenta puede desempeñar un papel protector para prevenir el transporte excesivo de colesterol desde la circulación materna hacia la fetal [Zhang *et al*., 2017; Kamper *et al*., 2017; Wadsack *et al*., 2003; Horne *et al*., 2019]. Teniendo en cuenta que las mujeres con HC tienen mayores niveles de colesterol circulante y que los niveles de colesterol en sus recién nacidos son comparables a los de los embarazos de C, nuestros hallazgos de reducción de la captación de lipoproteínas por el sincitiotrofoblasto están de acuerdo con esa sugerencia.

5.2 Eflujo de colesterol en células del trofoblasto

La salida de colesterol desde las células del sincitiotrofoblasto ocurre principalmente a través de mecanismos activos mediados por los transportadores de colesterol ABCA1, ABCG1 y la participación de SR-BI ha sido sugerida pero no estudiada [Aye *et al*., 2010; Chatuphonprasert *et al*., 2018]. ABCA1 estimula el eflujo de colesterol a apolipoproteínas pobres en lípidos, predominantemente a ApoA-I [de la Llera-Moya *et al*., 2010; Melhem *et al*., 2019; Harmon *et al*., 2018; Kallol *et al*., 2018], pero también a ApoE; ABCG1 promueve el eflujo de colesterol y oxiesteroles a HDL; SR-BI puede mediar el eflujo de colesterol desde células periféricas a HDL, pero no a ApoA-I libre de lípido [Phillips, 2014; Favari *et al*., 2015; Aye *et al*., 2010].

Nuestros resultados de localización *in situ* están de acuerdo con trabajos previos que describen ABCA1 en la membrana del sincitiotrofoblasto [Aye *et al*., 2010; Harmon *et al*., 2018; Albrecht *et al*.,

2007, 2010; Keelan *et al*., 2011]. De acuerdo con estos trabajos, nuestras inmunofluorescencias indican una distribución del transportador en MMV y MB de la membrana del sincitiotrofoblasto, lo que sugiere un posible rol en la salida de colesterol a la circulación materna y también hacia la fetal. Curiosamente, el western blot indicó una señal importante para ABCA1 en placentas de HC, un hallazgo que al observar la inmunolocalización asociamos a un aumento de la señal en el endotelio en lugar del sincitiotrofoblasto. Sin embargo, se requieren marcadores endoteliales específicos para confirmar la distribución espacial del endotelio (aunque está el control de inmunofluorescencia en placenta para CD31, es necesario hacer una co-localización con ABCA1). El aumento de los niveles de ABCA1 en las células endoteliales placentarias se describió recientemente en diabetes mellitus gestacional [Sun *et al*., 2018], y otros trastornos metabólicos del embarazo se han asociado con la dislipidemia materna [Contreras-Duarte *et al*., 2019]. Nuestros hallazgos en sincitiotrofoblastos confirmaron estas observaciones en la placenta y mostraron que los niveles de ABCA1 fueron similares en trofoblastos de placentas HC y C (Figura 25A).

Con respecto a ABCG1, el transportador de colesterol se localizó principalmente en la membrana basal del sincitiotrofoblasto (Figura 25B), como se describió anteriormente [Aye *et al*., 2010], lo que sugiere un rol en la salida de colesterol a la circulación fetal. En las placentas HC, los niveles reducidos de este transportador se determinaron mediante western blot, que también se confirmó en células del sincitiotrofoblasto de placentas HC.

Estos resultados fueron corroborados al observarlos también en el modelo de sincitiotrofoblasto polarizados. Para ABCA1, el resultado fue similar a lo publicado por Kallol *et al*., sugiriendo la participación del transportador en el eflujo de colesterol hacia el compartimento apical (lado materno) [Kallol *et al*., 2018], además, ellos lograron determinar la direccionalidad del eflujo hacia ApoA-I dependiente de ABCA1 hacia el compartimento apical [Kallol *et al*., 2018]. Por último,

el transportador ABCG1 fue localizado en la membrana basal, sugiriendo la participación del eflujo hacia el compartimento basal (lado fetal), lo cual fue similar a lo observado en inmunofluorescencia de placentas normales.

Una vez descrita la localización de las proteínas de interés creímos necesario evaluar el eflujo de colesterol hacia ApoA-I y en sincitiotrofoblastos. El eflujo a ApoA-I exógeno aumentó en sincitiotrofoblastos de HC en comparación con C (Figura 33A). Considerando los niveles similares de proteína de ABCA1, estos resultados sugieren que la actividad del transportador podría estar aumentada en esta condición debido a la mayor disponibilidad de colesterol, como se describe en otros modelos, incluidas las células endoteliales de la placenta [Stefulj *et al*., 2009; Brown *et al*., 2018]. Por otro lado, el eflujo a HDL fue menor en sincitiotrofoblastos de embarazos HC (Figura 33B), lo que se asoció con niveles reducidos de proteína de ABCG1. Los parámetros cinéticos para el eflujo a HDL mostraron una $V_{máx}$ reducida y K_m comparable, lo que sugiere que los cambios podrían estar relacionados con niveles más bajos de este transportador en lugar de cambios en su actividad (Tabla 7).

Además de los cambios en la tasa de eflujo en las células HC, la proporción de eflujo a ApoA-I y HDL fue diferente en las células del sincitiotrofoblasto. En nuestro modelo, el eflujo a ApoA-I (10 µg/ml, 6 h) fue del 4%, en comparación con el 30% a HDL (50 µg/ml, 6 h). Este hallazgo fue diferente de los descritos por Aye *et al*., quienes mostraron porcentajes comparables de eflujo (10%) a ApoA-I (20 µg / mL, 6 h) y HDL (50 µg / mL, 6 h) en sincitiotrofoblastos de embarazos normales [Aye *et al*., 2010]. Además, nuestros resultados fueron comparables a los resultados publicados recientemente por Harmon y colaboradores en sincitiotrofoblastos de embarazos normales [Harmon *et al*., 2018] que muestran eflujo a ApoA-I (30 µg/ml, 6 h) del 5%, en comparación con 25% a HDL (50 µg/ml, 6 h) [Harmon *et al*., 2018]. El grupo de Harmon y colaboradores no discutió las diferencias en la tasa de

eflujo a HDL y ApoA-I, incluso considerando la expresión reducida de ABCA1 informada en su estudio o la expresión y función de ABCG1 descrita previamente en sincitiotrofoblastos. En línea con estos y nuestros resultados, proponemos que, en sincitiotrofoblastos, la contribución de ABCG1 al eflujo total podría ser mayor que la de ABCA1, lo que requiere la confirmación de la inhibición del eflujo mediado por ABCA1 y ABCG1 en nuestro sistema.

Además de ABCA1 y ABCG1, otro transportador que podría contribuir al eflujo de colesterol en sincitiotrofoblastos es SR-BI, que tiene un papel activo en el eflujo de colesterol en células como los macrófagos, hepatocitos y células renales [Phillips, 2014; Linton *et al*., 2017]. En las células endoteliales de la placenta, SR-BI no contribuye al eflujo de colesterol [Stefulj *et al*., 2009]. A pesar de eso y considerando que el receptor se describe en las células del sincitiotrofoblasto placentario [Wadsack *et al*., 2003; Aye *et al*., 2010], su participación en el eflujo de colesterol solo se ha sugerido, y su contribución real al proceso es desconocida [Aye *et al*., 2010]. Para determinar la posible contribución de SR-BI al eflujo de colesterol, el receptor se inhibió con BLT-1, y el eflujo se determinó como se describe en las células endoteliales placentarias [Stefulj *et al*., 2009; Aye *et al*., 2010]. La inhibición de SR-BI con BLT-1 no se asoció con cambios en el eflujo de colesterol, lo que sugiere por primera vez que, como en las células endoteliales placentarias, SR-BI no participa en el eflujo de colesterol en las células del sincitiotrofoblasto (Figura 34). Sin embargo, sugerimos que es necesario determinar el eflujo mediado por SR-BI en sincitiotrofoblastos polarizado para excluir la posibilidad de cambios compensatorios en el eflujo apical y basal en presencia de BLT-1.

En resumen, sugerimos que, en sincitiotrofoblastos, el colesterol se entrega por eflujo a aceptadores como HDL y ApoA-I; sin embargo, HDL es el aceptor con una contribución predominante a la salida de colesterol en estas células, un proceso que podría estar mediado por ABCG1 y ABCA1 y no por SR-BI. Con respecto a HC, el sincitiotrofoblasto aislado de placentas con esta afección

materna mostró un eflujo reducido a HDL y un eflujo aumentado a ApoA-I, lo que sugiere alteraciones en la liberación de colesterol a la circulación materna o fetal.

Teniendo en cuenta que las células del sincitiotrofoblasto están polarizadas y que el eflujo de colesterol se produce hacia el lado materno y/o fetal, estimamos necesario determinar las tasas de eflujo en sincitiotrofoblastos cultivados en condiciones que permitan obtener una monocapa polarizada, lo que permitiría mejorar nuestra comprensión de la direccionalidad del eflujo de colesterol (a nivel apical/materno o basal/fetal) [Melhem *et al*., 2019; Kallol *et al*., 2018], experimentos que se realizaron luego de una pasantía en el extranjero pero que por razones técnicas no pudieron desarrollarse totalmente. Basado en la localización de los transportadores y en evidencia reciente que muestra que el eflujo hacia ApoA-I en sincitiotrofoblastos es principalmente hacia la membrana apical [Melhem *et al*., 2019; Kallol *et al*., 2018], especulamos que en sincitiotrofoblastos desde placentas de HC, el aumento en el eflujo hacia ApoA-I y la disminución en el eflujo hacia HDL está destinado a controlar el eflujo de colesterol a la circulación fetal. Para evaluar la direccionalidad del eflujo de colesterol, se realizó en células del sicitiotrofoblasto polarizados, utilizando diferentes aceptores en el compartimento apical (lado materno), como en el compartimento basal (lado fetal). La importancia de la vía HDL/ABCG1 y ApoA-I/ABCA1 en el transporte de colesterol transplacentario esta bien documentada [Aye *et al*., 2010; Stefulj *et al*., 2009; Melhem *et al*., 2019; Harmon *et al*., 2018; Kallol *et al*, 2018], sin embargo, a pesar que fue publicado en que medida esta involucrada la salida de colesterol por la vía ApoA-I/ABCA1 [Kallol *et al*., 2018], e indica que el eflujo ocurre principalmente hacia el compartimento apical, sugiriendo una forma de defensa hacia el feto, evitando la alta entrada de colesterol al feto al término del embarazo, se desconoce en que medida o de que manera estaría ocurriendo el eflujo de colesterol por la vía HDL/ABCG1. Por lo tanto, se analizó la direccionalidad del transporte de colesterol externo mediado por HDL/ABCG1. Utilizamos cuatro aceptores, HDL de

mujer adulto sin embarazo, HDL fetal, suero de mujer adulto sin embarazo y HDL fetal, los cuales se colocaron en el compartimento apical, basal y en ambos compartimentos. Sorpresivamente, encontramos que ocurre eflujo solamente hacia el compartimento apical, y no existe eflujo hacia el compartimento basal con los diferentes aceptores. Este modelo ya ha sido validado como un sistema útil para estudiar el transporte de nutrientes transplacentarios [Huang *et al*., 2016], en el que se evaluó el transporte de glucosa y se observó eflujo hacia ambos compartimentos, además, al evaluar el amarillo de lucifer, también se observa salida en ambos compartimentos, sin embargo la salida de colesterol hacia la zona basal en el modelo estudiado no se ha determinado. Se podría pensar en alguna interacción matrigel-colesterol que podría estar evitando la salida del colesterol por el compartimento basal, el que podría estar acumulándose en la matrigel. Anteriormente se ha reportado que el eflujo de colesterol en células BeWo en Transwell® pero sin matrigel (no lo requieren) se asocia con eflujo hacia ambos compartimentos [Schmid *et al*., 2003]. Debido a esto, quisimos evaluar la acumulación de colesterol libre en el Transwell® mediante la tinción Filipina, y logramos ver que al ubicar los aceptores solamente en el compartimento basal, no ocurre salida y éste se acumulado en la célula. Asumimos que esto no ocurre en el lado apical ya que las células tienen contacto directo con el medio en el compartimento apical, a diferencia del compartimento basal en que las células están en contacto con la matrigel y el filtro Transwell®, por lo que habría un menor acceso a los aceptores de colesterol. Para mejorar este inconveniente se podrían sugerir algunos cambios en la concentración de la matrigel, o modificar la concentración de los aceptores, los cuales podrían ser diferentes en el sistema Transwell® a los utilizados en el eflujo de colesterol de placas convencionales, e incluso cambiar el tipo de matrigel que se utiliza, o aumentar el tiempo del eflujo de colesterol a mas de 6 horas. Además, se podría sugerir, que al no estar el modelo completo de la barrera placentaria (STB-estroma-células

endoteliales), el eflujo no podría ocurrir de manera natural, o evitaría la salida hacia el compartimento basal.

Sin embargo, a pesar que no se logró determinar la direccionalidad del eflujo, pudimos corroborar que el eflujo de colesterol en este modelo estaría trabajando hacia todos los aceptores en el compartimento apical. Además, se logró determinar la localización de los receptores y transportadores de colesterol en el inserto Transwell®, lo cuales estuvieron relacionados a lo observado en placentas.

Finalmente, los resultados obtenidos para el eflujo de colesterol en la condición HC, al igual que lo descrito para la captación de LDL y HDL nos permiten sugerir que en esta condición del embarazo, las células del sincitiotrofoblasto en la placenta regularían la expresión y función de las proteínas encargadas de regular el tráfico de colesterol, posiblemente para evitar la entrada exacerbada de colesterol hacia la circulación fetal para proteger al feto de una carga excesiva de colesterol favoreciendo un menor ingreso de colesterol hacia el sincitiotrofoblasto y una menor salida de este lípido desde los sincitiotrofoblastos (Figura 42). Estos resultados son concordantes con el hecho de que el perfil lipídico de los recién nacidos HC es comparable al de los C (Figura 4B).

5.3 Niveles de colesterol en células del sincitiotrofoblasto

Teniendo en cuenta la captación reducida de LDL y HDL, así como los cambios en el eflujo de colesterol en las células del sincitiotrofoblasto de los embarazos HC, se determinaron los niveles de colesterol en placentas y en sincitiotrofoblastos. Aunque los niveles de colesterol total fueron similares en placentas y sincitiotrofoblastos de C y HC, los niveles de colesterol libre aumentaron en HC en comparación con C (Figura 37 y 38). Para determinar indirectamente si HC induce un aumento de la síntesis de colesterol, se estimó el nivel de HMGCR a nivel del mensajero y proteico, la enzima limitante para la síntesis de colesterol. En sincitiotrofoblastos HC, la expresión de la enzima y la

abundancia de proteínas se redujo, lo que sugiere que en nuestro modelo no se produce un aumento de la síntesis de colesterol (Figura 39). Además, evaluamos la expresión de la enzima asociada con la esterificación del colesterol libre (es decir, acil-coenzima A: colesterol aciltransferasas, ACAT), observamos que esta está disminuida en sincitiotrofoblastos HC (Figura 40, lo que podría asociarse con una menor esterificación del colesterol y de esta forma con la acumulación de colesterol libre en las células del sincitiotrofoblasto HC.

Clásicamente, el aumento de los niveles de colesterol libre se asocian a la activación de los factores nucleares LXR, y así a un aumento de la salida de colesterol y la inhibición de la síntesis y absorción de colesterol [Brown *et al*., 1999]. Aunque en este trabajo no evaluamos directamente la activación de LXR en placentas HC, sugerimos que LXR no se activaría ya que no encontramos aumento de ABCA1/ABCG1 ni reducción de la abundancia de proteínas LDLR en esas placentas o en sincitiotrofoblastos aislados. Aunque la activación de LXR en las células del sincitiotrofoblasto no se ha estudiado en detalle, la activación de LXR se ha asociado con una reducción de la diferenciación celular y la supervivencia celular, dependiendo de la fuente del ligando (exógeno versus endógeno). En nuestros cultivos celulares no observamos alteraciones evidentes en la diferenciación de células HC [Aye *et al*., 2010; Harmon *et al*., 2018; Weedon-Fekjaer *et al*., 2005; Fournier *et al*., 2008; Aye *et al*., 2011; Larkin *et al*., 2014], pero si se vio una disminución en la viabilidad de células HC medida con MTT (Figura 30), ensayo que mide la reducción de un componente de tetrazolio (MTT) en un producto de formazán insoluble por las mitocondrias de células viables. Como se mencionó en la introducción, se ha descrito que en placentas HC hay un aumento en el estrés oxidativo (Liguori *et al*., 2007), el que podría ser consecuencia de una disminución en la viabilidad celular en este tipo celular, producto además, de una acumulación del colesterol libre. Sin embargo, aunque no vimos una diferencia en la morfología o en el numero de células a nivel microscópico, podríamos sugerir que este

ensayo no es suficiente para determinar la viabilidad celular, ya podría estar midiendo la actividad de las mitocondrias viables y no así de la muerte celular, por lo que se requieren otros ensayos para determinar viabilidad celular.

En consecuencia, una posible línea de seguimiento de este estudio podría ser determinar la activación de LXR, así como los niveles de posibles ligandos como los oxiesteroles en sincitiotrofoblastos HC. En el contexto de las células placentarias, en las células endoteliales aisladas de placentas DMG, se confirmó que la activación de LXR por los oxisteroles estaba relacionada con una mayor expresión de ABCA1 y ABCG1 y el eflujo de colesterol, que, a diferencia de las células del sincitiotrofoblasto, se sugirió como un mecanismo para mantener una función celular adecuada [Sun *et al*., 2018], como se describe en otros modelos celulares [Lie *et al*., 2013].

6. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta tesis entregan información clave para entender la regulación del transporte de colesterol en la placenta de embarazos con niveles elevados de CT y LDL. Hemos determinado que en placentas HC la captación de LDL y HDL desde la circulación materna estarían disminuidos, lo cual fue confirmado en cultivos primarios de células del sincitiotrofoblasto purificadas desde estas placentas. Adicionalmente, demostramos que el eflujo de colesterol hacia HDL desde las células del sincitiotrofoblasto está disminuido y hacia ApoA-I esta aumentado en la condición HC. Si bien, la entrada y salida de colesterol es regulada, determinamos que en células HC el contenido de colesterol libre es mayor que en células C, un proceso que no se asocia con una mayor biosíntesis de este esterol, pero si podría asociarse a una disminución de ACAT1, enzima encargada de esterificar el colesterol. Además, logramos verificar la localización y expresión de los receptores y transportadores de colesterol en placentas, sincitiotrofoblasto, y sincitiotrofoblasto polarizado. Estos resultados nos permiten sugerir que, en ésta condición del embarazo, las células del sincitiotrofoblasto en la placenta regularían la expresión y función de proteínas encargadas de regular el metabolismo del colesterol, posiblemente para evitar la entrada exacerbada de colesterol hacia la circulación fetal para proteger al feto de una carga excesiva de colesterol. Estos resultados son concordantes con el hecho de que el perfil lipídico de los recién nacidos HC es comparable al de los C (Figura 42).

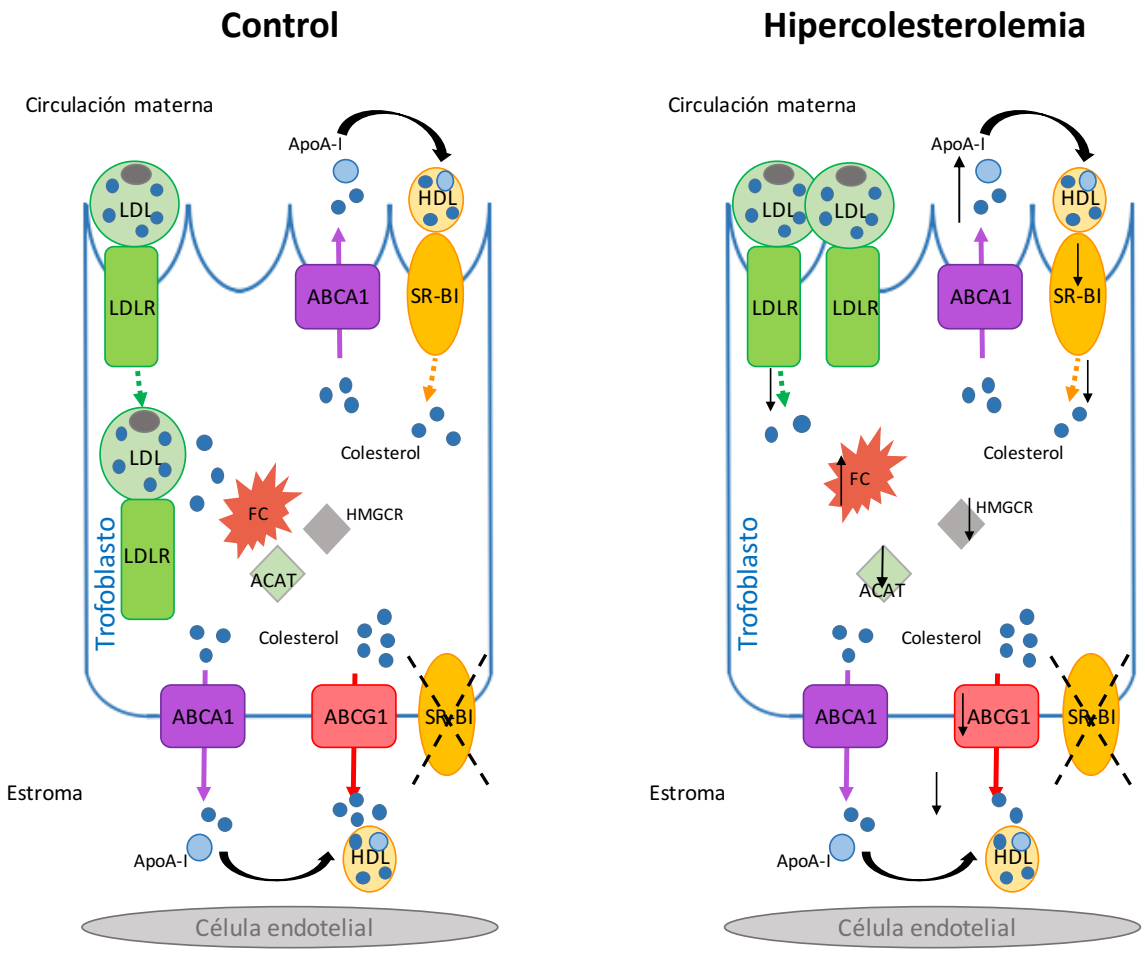

Figura 42. Modelo propuesto del tráfico de colesterol en la placenta C y HC.

En las células del sincitiotrofoblasto de embarazos con hipercolesterolemia (HC) se produce una disminución en la captación de lipoproteínas de baja (LDL) y de alta densidad (HDL), así como también una disminución en la abundancia proteica del receptor scavenger clase B tipo I (SR-BI) y un cambio en la localización de LDLR. A su vez en HC hay una disminución en el eflujo de colesterol y una menor abundancia proteica del transportador de unión a ATP (ABCG1). En células del sincitiotrofoblasto, SR-BI no participa en el eflujo de colesterol hacia HDL. Adicionalmente, se describe un aumento en el colesterol no esterificado o libre (FC) en células HC y una disminución en la abundancia proteica de la enzima clave para la biosíntesis de colesterol (HMGCR), sugiriendo que no hay mayor biosíntesis de este esterol y si menor esterificación del colesterol, responsable de ACAT1. Finalmente, describimos la presencia de ApoA-I en células del sincitiotrofoblasto y en el estroma celular, la que podía participar como aceptor de colesterol.

7. PROYECCIONES

Este estudio puede contribuir al conocimiento general referente al tráfico de colesterol en la placenta y específicamente a como éste proceso es regulado por niveles elevados de colesterol durante el embarazo. Es importante destacar que el colesterol es importante para el desarrollo del feto en muchas formas, incluyendo para el desarrollo cerebral. Estos resultados son relevantes para demostrar que la condición HC se podría asociar con una alteración del tráfico placentario de colesterol materno. Las consecuencias de un cambio en el tráfico de colesterol necesitan ser estudiadas, sin embargo, la función placentaria podría verse alterada, así como también la disponibilidad de colesterol hacia la circulación fetal, fenómeno que podría tener consecuencias en la fisiología fetal (vascular y hepática), debido a las altas concentraciones de colesterol hacia el feto. De esta forma, podríamos proponer como una proyección directa, la necesidad de monitorear el perfil lipídico materno durante el embarazo para prevenir estos efectos, así como también el manejo a nivel clínico de esta condición incluyendo dietas como por ejemplo dieta mediterránea, que se ha demostrado tener efectos positivos en disminuir diferentes parámetros en condiciones similares. Además, es importante destacar que este estudio fue realizado en placentas de término, evitando conocer la dinámica del proceso de adaptación placentaria a la HC materna. Adicionalmente, se abren nuevos temas de investigación referentes a las consecuencias de las alteraciones del tráfico de colesterol placentario sobre el feto en desarrollo así también como las consecuencias de la hipercolesterolemia en la madre durante todo este proceso, aunque sea solo un proceso transitorio.

8. REFERENCIAS

Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. Obstet Gynecol. 2009, 114, 1326-31.

Abifadel M, Varret M, Rabes J-P, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat Genet. 2003, 34, 154-6.

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974, 20, 470.5.

Albrecht C, Soumian S, Tetlow N, Patel P, Sullivan MH, Lakasing L, Nicolaides K, Williamson C. Placental ABCA1 expression is reduced in primary antiphospholipid syndrome compared to pre-eclampsia and controls. Placenta. 2007, 28, 701-708.

Albrecht C, Nikitina L, Wenger F, Baumann M, Surbek D, Körner M. Localisation of ABCA1 in first trimester and term placental tissues. Placenta. 2010, 31, 741-742.

Arakawa R, Hayashi M, Remaley AT, Brewer BH, Yamauchi Y, Yokoyama S. Phosphorylation and stabilization of ATP binding cassette transporter A1 by synthetic amphiphilic helical peptides. J Biol Chem. 2004, 279, 6217-6220.

Avis HJ, Hutten BA, Twickler MTB, Kastelein JJP, van der Post JAM, Stalenhoef AF, et al. Pregnancy in women suffering from familial hypercholesterolemia: a harmful period for both mother and newborn? Curr Opin Lipidol. 2009, 20, 484-490.

Aye ILMH, Waddell BJ, Mark PJ, Keelan JA. Placental ABCA1 and ABCG1 transporters efflux cholesterol and protect trophoblasts from oxysterol induced toxicity. Biochim Biophys Acta. 2010, 1801, 1013-1024.

Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RMF, Bakker MK, Hofstra RMW, Plosch T. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. Biol Reprod. 2013, 88:24.

Barker DJP, Thornburg KL. Placental programming of chronic diseases, cancer and lifespan: a review. Placenta. 2013, 34, 841-845.

Basaran A. Pregnancy-induced hyperlipoproteinemia: review of the literature. Reprod Sci. 2009, 16, 431-437.

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 2017, 135, e146-603.

Brizzi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M, et al. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1999, 181, 430-434.

Brown M. S. & Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1999, 96, 11041-11048.

Brown M. S., Radhakrishnan, A. & Goldstein, J. L. Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of Scap. Annu Rev Biochem. 2018, 87, 783-807.

Burke KT, Colvin PL, Myatt L, Graf GA, Schroeder F, Woollett LA. Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster. J Lipid Res. 2009, 50, 1146-1155.

Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015, 370, 20140066.

Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I. Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. Front Pharmacol. 2018, 12, 9:1027.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-cloroform extraction. Anal Biochem. 1987, 162, 156-159.

Contreras-Duarte S, Carvajal L, Fuenzalida B, Cantin C, Sobrevia L, Leiva A. Maternal Dyslipidaemia in Pregnancy with Gestational Diabetes Mellitus: Possible Impact in the Foetoplacental Vascular Function and the Lipoprotein in the Neonatal Circulation. Curr Vasc Pharmacol. 2019, 17, 52-71.

Cortes VA, Busso D, Maiz A, Arteaga A, Nervi F, Rigotti A. Physiological and pathological implications of cholesterol. Front Biosci (Landmark Ed.). 2014, 19, 416-428.

Dhand N, Khatkar M. Statulator: An online statistical calculator. Sample Size Calculator for Comparing Two Independent Means (2014).

Desoye G, Schweditsch MO, Pfeiffer KP, Zechner R, Kostner GM. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. J Clin Endocrinol Metab. 1987, 64, 704-712.

Desoye G, Gauster M, Wadsack C. Placental transport in pregnancy pathologies. Am J Clin Nutr. 2011, 94, 1896S-1902S.

Dockendorff C, Faloon PW, Germain A, Yu M, Youngsaye W, Nag PP, et al. Discovery of bisamide-heterocycles as inhibitors of scavenger receptor BI (SR-BI)-mediated lipid uptake. Bioorg Med Chem Lett. 2015, 25, 2594-2598.

Edison RJ, Berg K, Remaley A, Kelley R, Rotimi C, Stevenson RE, et al. Adverse birth outcome among mothers with low serum cholesterol. Pediatrics. 2007, 120, 723-733.

Escobar JC, Patel SS, Beshay VE, Suzuki T, Carr BR. The human placenta expresses CYP17 and generates androgens de novo. J Clin Endocrinol Metab. 2011, 96, 1385-1392.

Ethier-Chiasson M, Duchesne A, Forest J-C, Giguere Y, Masse A, Mounier C, et al. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. Biochem Biophys Res Commun. 2007, 359, 8-14.

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. Biochimie. 2004, 86, 839-848.

de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos BF, Cuchel M, Rader DJ, Rothblat GH. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010, 30, 796-801.

Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Handb Exp Pharmacol. 2015, 224, 181-206.

Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of biological chemistry. 1957, 226, 497-509.

Fournier T., Handschuh, K., Tsatsaris, V., Guibourdenche, J. & Evain-Brion, D. Role of nuclear receptors and their ligands in human trophoblast invasion. Journal of reproductive immunology. 2008, 77, 161-170.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972, 18, 499-502.

Fuenzalida B, Sobrevia B, Cantin C, Carvajal L, Salsoso R, Gutiérrez J. Maternal supraphysiological hypercholesterolemia associates with endotelial dysfunction of the placental microvasculature. Sci Rep. 2018, 16, 7690.

Furuhashi M, Seo H, Mizutani S, Narita O, Tomoda Y, Matsui N. Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy. Mol Endocrinol. 1989, 3, 1252-1256.

Garcia CK, Wilund K, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. Science. 2001, 292, 1394-1398.

Go GW, Srivastava R, Hernandez-Ono A, Gang G, Smith SB, Booth CJ, et al. The combined hyperlipidemia caused by impaired Wnt-LRP6 signaling is reversed by Wnt3a rescue. Cell Metab. 2014, 19, 209-220.

Goldstein JL, Brown MS. binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. J Biol Chem 1974, 249, 5153-5162.

Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. Cell. 2015, 161, 161-172.

Gu H, Li G, Gao X, Berthiaume LG, Zhang D. Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function. Biochim Biophys Acta. 2013, 1831, 1067-1078.

Gutiérrez J, Aedo A, Mora J, Maldonado J, Salsoso R, Toledo F, et al. Preeclampsia associates with RECK-dependent decrease in human trophoblasts migration and invasion. Placenta. 2017, 59, 19-29.

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CNB, Brewer HBJ, Clark LT, Hunninghake DB, et al. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2004, 44, 720-732.

Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, Thorne RG. Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches, 1st edn. New York: Springer, 2013.

Heaton SJ, Eady JJ, Parker ML, Gotts KL, Dainty JR, Fairweather-Tait SJ, McArdle HJ, Srai KS, Elliott RM. The use of BeWo cells as an in vitro model for placental iron transport. Am J Physiol. 2008, 295, C1445-C1453.

Heinzen RA, Hackstadt T. The Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuolar membrane is not passively permeable to low-molecular-weight compounds. Infect Immun 1997, 65, 1088-1094.

Hemmings DG, Guilbert LJ. Polarized release of human cytomegalovirus from placental trophoblasts. J Virol. 2002, 76, 6710-6717.

Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. Endocrine. 2002, 19, 43-55.

Herrera E, Desoye G. Maternal and fetal lipid metabolism under normal and gestational diabetic conditions. Horm Mol Biol Clin Investig. 2016, 26, 109-127.

Horne H, Holme AM, Roland MCP, Holm MB, Haugen G, Henriksen T, Michelsen TM. Maternal-fetal cholesterol transfer in human term pregnancies. Placenta. 2019, 87:23-29.

Huang X. Lüthi M, Ontsouka EC, Kallol S, Baumann MU, Surbek DV, Albrecht C. Establishment of a confluent monolayer model with human primary trophoblast cells: novel insights into placental glucose transport. Mol Hum Reprod. 2016, 22, 442-456.

Iglesias A, Montelongo A, Herrera E, Lasuncion MA. Changes in cholesteryl ester transfer protein activity during normal gestation and postpartum. Clin Biochem. 1994, 27, 63-68.

Ikemoto M, Arai H, Feng D, Tanaka K, Aoki J, Dohmae N, et al. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000, 97, 6538-6543.

Jansson T, Myatt L, Powell TL. The role of trophoblast nutrient and ion transporters in the development of pregnancy complications and adult disease. Curr Vasc Pharmacol. 2009, 7, 521-533.

Ji A, Wroblewski JM, Cai L, de Beer MC, Webb NR, van der Westhuyzen DR. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. J Lipid Res. 2012, 53, 446-455.

Kabir N, Chaturvedi K, Liu LS, Sarkar DK. Transforming growth factor-beta3 increases gap-junctional communication among folliculostellate cells to release basic fibroblast growth factor. Endocrinology 2005, 146, 4054-4060.

Kallol S, Huang X, Müller S, Ontsouka CE, Albrecht C. Novel Insights into Concepts and Directionality of Maternal–Fetal Cholesterol Transfer across the Human Placenta. Int J Mol Sci. 2018, 9, 19, pii: E2334.

Kamper M, Mittermayer F, Cabuk R, Gelles K, Ellinger I, Hermann M. Estrogen-enhanced apical and basolateral secretion of apolipoprotein B-100 by polarized trophoblast-derived BeWo cells. Biochimie. 2017, 138, 116-123.

Kardassis D, Gafencu A, Zannis VI, Davalos A. Regulation of HDL genes: transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational. Handb Exp Pharmacol. 2015, 224, 113-179.

Kaufmann P, Burton GJ. Anatomy and genesis of the placenta. In: Knobil E, Neill JD, Eds. The physiology of reproduction. New York: Raven Press 1994.

Keelan J., Aye, I., Mark, P. & Waddell, B. ABCA1 and placental cholesterol efflux. Placenta. 2011, 32, 708.

Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology. 1986, 118, 1567-1582.

Knopp, R., M. Bonet, A. Lasuncion, A. Montelongo, E. Herrera. Lipoprotein metabolism in pregnancy. In:Perinatal biochemistry. 1992 CRC Press, 19-51.

Khor VK, Shen W-J, Kraemer FB. Lipid droplet metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2013, 16, 632-637.

Kocher O, Yesilaltay A, Cirovic C, Pal R, Rigotti A, Krieger M. Targeted disruption of the PDZK1 gene in mice causes tissue-specific depletion of the high density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I and altered lipoprotein metabolism. J Biol Chem. 2003, 278, 52820-52825.

Lager S, Ramirez VI, Gaccioli F, Jang B, Jansson T, Powell TL. Protein expression of fatty acid transporter 2 is polarized to the trophoblast basal plasma membrane and increased in placentas from overweight/obese women. Placenta. 2016, 40, 60-66.

Landers KA, Li H, Mortimer RH, McLeod DSA, d'Emden MC, Richard K. Transthyretin uptake in placental cells is regulated by the high-density lipoprotein receptor, scavenger receptor class B member 1. Molecular and cellular endocrinology. 2018, 474, 89-96.

Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. J Clin Endocrinol Metab. 2009, 94, 2537-2543.

Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. Cell. 1983, 33, 273-285.

Larkin, J. C., Sears, S. B. & Sadovsky, Y. The influence of ligand-activated LXR on primary human trophoblasts. Placenta. 2014, 35, 919-924.

Lei P, Baysa A, Nebb HI, Valen G, Skomedal T, Osnes JB, Yang Z, Haugen F. Activation of Liver X receptors in the heart leads to accumulation of intracellular lipids and attenuation of ischemia–reperfusion injury. Basic research in cardiology. 2013, 108, 323.

Leiva A, Verdejo H, Benitez ML, Martinez A, Busso D, Rigotti A. Mechanisms regulating hepatic SR-BI expression and their impact on HDL metabolism. Atherosclerosis 2011, 217, 299-307.

Leiva A, de Medina CD, Salsoso R, Saez T, San Martin S, Abarzua F, et al. Maternal hypercholesterolemia in pregnancy associates with umbilical vein endothelial dysfunction: role of endothelial nitric oxide synthase and arginase II. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013, 33, 2444-2453.

Leiva A, Salsoso R, Saez T, Sanhueza C, Pardo F, Sobrevia L. Cross-sectional and longitudinal lipid determination studies in pregnant women reveal an association between increased maternal LDL cholesterol concentrations and reduced human umbilical vein relaxation. Placenta. 2015, 36, 895-902.

Leiva A, Fuenzalida B, Barros E, Sobrevia B, Salsoso R, Saez T, et al. Nitric Oxide is a Central Common Metabolite in Vascular Dysfunction Associated with Diseases of Human Pregnancy. Curr Vasc Pharmacol. 2016a, 14, 237-259.

Leiva A, Fuenzalida B, Salsoso R, Barros E, Toledo F, Gutierrez J, et al. Tetrahydrobiopterin Role in human umbilical vein endothelial dysfunction in maternal supraphysiological hypercholesterolemia. Biochim Biophys Acta. 2016b, 1862, 536-544.

Li L, Schust J.D. Isolation, purification and in vitro differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. Reprod. Biol. Endocrinol. 2015, 13, 71.

Liguori A, D'Armiento FP, Palagiano A, Balestrieri ML, Williams-Ignarro S, de Nigris F, et al. Effect of gestational hypercholesterolaemia on omental vasoreactivity, placental enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. BJOG. 2007, 114, 1547-1556.

Linton M. F., Tao, H., Linton, E. F. & Yancey, P. G. SR-BI: a multifunctional receptor in cholesterol homeostasis and atherosclerosis. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2017, 28, 461-472

Lybbert J, Gullingsrud J, Chesnokov O, Turyakira E, Dhorda M, Guerin PJ, Piola P, Muehlenbachs A, Oleinikov AV. Abundance of megalin and Dab2 is reduced in syncytiotrophoblast during placental malaria, which may contribute to low birth weight. Scientific reports. 2016, 6, 24508.

Maldonado-Estrada J, Menu E, Roques P, Barre-Sinoussi F, Chaouat G. 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 2004, 286, 21-34.

Marseille-Tremblay C, Ethier-Chiasson M, Forest J-C, Giguere Y, Masse A, Mounier C, et al. Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. Mol Reprod Dev. 2008, 75, 1054-1062.

Martin SS, Abd TT, Jones SR, Michos ED, Blumenthal RS, Blaha MJ. 2013 ACC/AHA cholesterol treatment guideline: what was done well and what could be done better. J Am Coll Cardiol. 2014, 63, 2674-2678.

Marzioni D, Tamagnone L, Capparuccia L, Marchini C, Amici A, Todros T, et al. Restricted innervation of uterus and placenta during pregnancy: evidence for a role of the repelling signal Semaphorin 3A. Dev Dyn. 2004, 231, 839-848.

Melhem H. Kallol S, Huang X, Lüthi M, Ontsouka CE, Keogh A, Stroka D, Thormann W, Schneider H, Albrecht C. Placental secretion of apolipoprotein A1 and E: the anti-atherogenic impact of the placenta. Scientific reports. 2019, 9, 6225.

Merkens LS, Connor WE, Linck LM, Lin DS, Flavell DP, Steiner RD. Effects of dietary cholesterol on plasma lipoproteins in Smith-Lemli-Opitz syndrome. Pediatr Res. 2004, 56, 726-732.

Montes A, Walden CE, Knopp RH, Cheung M, Chapman MB, Albers JJ. Physiologic and supraphysiologic increases in lipoprotein lipids and apoproteins in late pregnancy and postpartum. Possible markers for the diagnosis of "prelipemia". Arteriosclerosis. 1984, 4, 407-417.

Nagao K, Takahashi K, Azuma Y, Takada M, Kimura Y, Matsuo M, et al. ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. J Lipid Res. 2012, 53, 126-136.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. J Clin Invest. 1997, 100, 2680-2690.

Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesions in Children (FELIC) study. Lancet (London, England). 1999a, 354, 1234-1241.

Napoli C, Witztum JL, de Nigris F, Palumbo G, D'Armiento FP, Palinski W. Intracranial arteries of human fetuses are more resistant to hypercholesterolemia-induced fatty streak formation than extracranial arteries. Circulation. 1999b, 99, 2003-2010.

Nieland, T. J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M. & Kirchhausen, T. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002, 99, 15422-15427.

Nieland TJF, Shaw JT, Jaipuri FA, Duffner JL, Koehler AN, Banakos S, et al. Identification of the molecular target of small molecule inhibitors of HDL receptor SR-BI activity. Biochemistry. 2008, 47, 460-472.

Nowaczyk MJM, Irons MB. Smith-Lemli-Opitz syndrome: phenotype, natural history, and epidemiology. Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2012, 160C, 250-262.

Pagler TA, Rhode S, Neuhofer A, Laggner H, Strobl W, Hinterndorfer C, Volf I, Pavelka M, Eckhardt ER, van der Westhuyzen DR, Schütz GJ, Stangl H. SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. J Biol Chem. 2006, 281, 11193-11204.

Palinski W, Napoli C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2002,16, 1348-1360.

Palinski W. Maternal-fetal cholesterol transport in the placenta: good, bad, and target for modulation. Circ Res. 2009, 104, 569-571.

Palinski W, Nicolaides E, Liguori A, Napoli C. Influence of maternal dysmetabolic conditions during pregnancy on cardiovascular disease. J Cardiovasc Transl Res. 2009, 2, 277-285.

Palinski W. Effect of maternal cardiovascular conditions and risk factors on offspring cardiovascular disease. Circulation. 2014, 129, 2066-2077.

Parker CRJ, Deahl T, Drewry P, Hankins G. Analysis of the potential for transfer of lipoprotein-cholesterol across the human placenta. Early Hum Dev. 1983, 8, 289-295.

Pecks, U, Rath W, Maass N, Berger B, Lueg I, Farrokh A, Farrokh S, Eckmann-Scholz C. Fetal gender and gestational age differentially affect PCSK9 levels in intrauterine growth restriction. Lipids in health and disease. 2016, 15, 193.

Persson L, Henriksson P, Westerlund E, Hovatta O, Angelin B, Rudling M. Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012, 32, 810-814

Peticca P, Raymond A, Gruslin A, Cousins M, Adetola E, Abujrad H, et al. Human Serum PCSK9 Is Elevated at Parturition in Comparison to Nonpregnant Subjects While Serum PCSK9 from Umbilical Cord Blood is Lower Compared to Maternal Blood. ISRN Endocrinol. 2013, 2013, 341632.

Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. J Biol Chem. 2014, 289, 24020-24029.

Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. Arteriosclerosis. 1981, 1, 177-185.

Salomon C, Westermeier F, Puebla C, Arroyo P, Guzman-Gutierrez E, Pardo F, et al. Gestational diabetes reduces adenosine transport in human placental microvascular endothelium, an effect reversed by insulin. PLoS One. 2012, 7, e40578.

Sattar N, Greer IA, Louden J, Lindsay G, McConnell M, Shepherd J, et al. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: threshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. J Clin Endocrinol Metab. 1997, 82, 2483-2491.

Schmid KE, Davidson WS, Myatt L, Woollett LA. Transport of cholesterol across a BeWo cell monolayer: implications for net transport of sterol from maternal to fetal circulation. J Lipid Res. 2003, 44, 1909-1918.

Seidah NG, Awan Z, Chretien M, Mbikay M. PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. Circ Res. 2014, 114, 1022-1036.

Seidah NG. New developments in proprotein convertase subtilisin-kexin 9's biology and clinical implications. Curr Opin Lipidol. 2016, 27, 274-281.

Shimano H, Sato R. SREBP-regulated lipid metabolism: convergent physiology - divergent pathophysiology. Nat Rev Endocrinol. 2017, 13, 710-730.

Skilton MR. Intrauterine risk factors for precocious atherosclerosis. Pediatrics. 2008, 121, 570–574.

Silliman K, Tall AR, Kretchmer N, Forte TM. Unusual high-density lipoprotein subclass distribution during late pregnancy. Metabolism. 1993, 42, 1592-1599.

Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. J Biol Chem. 2001, 276, 25287-25293.

Soffientini U, Graham A. Intracellular cholesterol transport proteins: roles in health and disease. Clin Sci (Lond). 2016, 130, 1843-1859.

Sorrentino V1, Nelson JK, Maspero E, Marques AR, Scheer L, Polo S, Zelcer N. The LXR-IDOL axis defines a clathrin-, caveolae-, and dynamin-independent endocytic route for LDLR internalization and lysosomal degradation. J Lipid Res. 2013, 54, 2174-2184.

Sreckovic I, Birner-Gruenberger R, Obrist B, Stojakovic T, Scharnagl H, Holzer M, et al. Distinct composition of human fetal HDL attenuates its anti-oxidative capacity. Biochim Biophys Acta. 2013, 1831, 737-746.

Sun Y, Kopp S, Strutz J, Gali CC, Zandl-Lang M, Fanaee-Danesh E, et al. Gestational diabetes mellitus modulates cholesterol homeostasis in human fetoplacental endothelium. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2018, 1863, 968-979.

Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. J Lipid Res. 1993, 34, 325-330.

Stefulj J, Panzenboeck U, Becker T, Hirschmugl B, Schweinzer C, Lang I, et al. Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. Circ Res. 2009, 104, 600-608.

Stocker R, Keaney JFJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Physiol Rev. 2004, 84, 1381-1478.

Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Goff DCJ, Lloyd-Jones DM, Smith SCJ, et al. Treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: synopsis of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guideline. Ann Intern Med. 2014, 160, 339-343.

Ramos P, Herrera E. Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. Am J Physiol. 1995, 269, E858-E863.

Rana M, Kumar A, Tiwari RL, Singh V, Chandra T, Dikshit M, et al. IRAK regulates macrophage foam cell formation by modulating genes involved in cholesterol uptake and efflux. Bioessays. 2016, 38, 591-604.

Rice-Evans CA, Packer L. Flavonoids in Health and Disease, 2nd edn. Florida: CRC Press, 2003.

Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. Endocr Rev. 2003, 24, 357-387.

Rogers MA, Liu J, Song B-L, Li B-L, Chang CCY, Chang T-Y. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): Enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015, 151, 102-107.

Röhrl C, Stangl H. HDL endocytosis and resecretion. Biochim Biophys Acta. 2013, 1831, 1626-1633.

Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, Salas-Salvado J, Fito M, Martinez JA, et al. Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. Adv Nutr. 2014, 5, 330S-336S.

Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) regulates trophoblast folate uptake by modulating the cell surface expression of FR-alpha and the RFC. Sci Rep. 2016, 6, 31705.

Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest. 2002, 110, 905-911.

Tamehiro N, Zhou S, Okuhira K, Benita Y, Brown CE, Zhuang DZ, et al. SPTLC1 binds ABCA1 to negatively regulate trafficking and cholesterol efflux activity of the transporter. Biochemistry. 2008, 47, 6138-6147.

Tao, W., Moore, R., Meng, Y., Smith, E. R. & Xu, X.-X. Endocytic adaptors Arh and Dab2 control homeostasis of circulatory cholesterol. Journal of lipid research. 2016, 57, 809-817.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. Circulation. 2002, 106, 3143-3421.

Van De Sluis, B., Wijers, M. & Herz, J. News on the molecular regulation and function of hepatic LDLR and LRP1. Current opinion in lipidology. 2017, 28, 241.

Vogel HG. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays, 3rd edn. Heidelberg: Springer Berlin, 2006.

Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B, et al. Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells. Placenta. 2003, 24, 131-143.

Wadsack, C, Tabano S, Maier A, Hiden U, Alvino G, Cozzi V, Hüttinger M, Schneider WJ, Lang U, Cetin I, Desoye G. Intrauterine growth restriction is associated with alterations in placental lipoprotein receptors and maternal lipoprotein composition. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2007, 292, E476-E484.

Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J Biol Chem. 2000, 275, 33053-33058.

Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101, 9774-9779.

Weedon-Fekjaer, M., Duttaroy, A. & Nebb, H. Liver X receptors mediate inhibition of hCG secretion in a human placental trophoblast cell line. Placenta. 2005, 26, 721-728.

Wild R, Weedin EA, Wilson D. Dyslipidemia in pregnancy. Cardiol Clin. 2015, 33, 209-215.

Woollett LA. Review: Transport of maternal cholesterol to the fetal circulation. Placenta. 2011, 32, S218-S221.

Xia HJ, Zhang ZH, Jin X, Hu Q, Chen XY, Jia XB. A novel drug-phospholipid complex enriched with micelles: preparation and evaluation in vitro and in vivo. Int J Nanomedicine. 2013, 8, 545-554.

Ye J, DeBose-Boyd RA. Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011, 3.

Yoshida S, Wada Y. Transfer of maternal cholesterol to embryo and fetus in pregnant mice. J Lipid Res. 2005, 46, 2168-2174.

Zanetta, L.;Marcus, G.S.; Vasile, J.; Dobryansky,M.; Cohen, H.; Eng, K.; Shamamian, P.;Mignatti, P. Expression of vonWillebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: A potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. Int. J. Cancer 2000, 85, 281-288.

Zhang R, Dong S, Ma W-W, Cai X-P, Le Z-Y, Xiao R, et al. Modulation of cholesterol transport by maternal hypercholesterolemia in human full-term placenta. PLoS One. 2017, 12, e0171934.

9. PUBLICACIONES

Fuenzalida B, Sobrevia B, Cantin C, Carvajal L, Salsoso R, Gutiérrez J, Contreras-Duarte S, Sobrevia L, Leiva A. Maternal supraphysiological hypercholesterolemia associates with endothelial dysfunction of the placental microvasculature. *Scientific reports*, 2018; *8*(1), 7690.

Fuenzalida B, Cantin C, Kallol S, Carvajal L, Pasten V, Contreras-Duarte S, Albrecht C, Gutiérrez J, Leiva A. Cholesterol uptake and efflux are impaired in human trophoblast cells from pregnancies with maternal supraphysiological hypercholesterolemia. *Scientific reports*, 2020 *SREP-19-34920.*

Leiva A, **Fuenzalida B**, Salsoso R, Barros E, Toledo F, Gutiérrez J, Pardo F, Sobrevia L. Tetrahydrobiopterin Role in human umbilical vein endothelial dysfunction in maternal supraphysiological hypercholesterolemia. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 862:536-544.

Leiva A, **Fuenzalida B**, Barros E, Sobrevia B, Salsoso R, Sáez T, Villalobos R, Silva L, Chiarello I, Toledo F, Gutiérrez J, Sanhueza C, Pardo F, Sobrevia L. Nitric Oxide is a Central Common Metabolite in Vascular Dysfunction Associated with Diseases of Human Pregnancy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2016; 14:237-59.

Sobrevia, L., Salsoso, R., **Fuenzalida, B**., Barros, E., Toledo, L., Silva, L., Pizarro, C., Subiabre, M., Villalobos, R., Araos, J., Toledo, F., González, M., Gutiérrez, J., Farías, M., Charello, D.I., Pardo, F., and Leiva, A. Insulin is a key modulator of fetoplacental endothelium metabolic disturbances in gestational diabetes mellitus. *Front. Physiol*, 2016; 7:119.

Leiva A, Guzman-Gutierrez E, Contreras-Duarte S, **Fuenzalida B**, Cantin C, Carvajal L, Salsoso R, Gutierrez J, Pardo F, Sobrevia L, Adenosine receptors: Modulators of lipid availability that are controlled by lipid levels. *Mol Aspects Med,* 2017*,* 55:26-44.

Villalobos-Labra, R., Silva, L., Subiabre, M., Araos, J., Salsoso, R., **Fuenzalida, B**., Sáez, T., Toledo, F., González, M., Quezada, C., Gutiérrez, J., Pardo, F., Chiarello, D.I., Leiva, A., and Sobrevia L. Akt/mTOR role in human foetoplacental vascular insulin resistance in diseases of pregnancy. *J. Diabetes Research*, 2017; 2017:5947859

Contreras-Duarte S, Carvajal L, **Fuenzalida B**, Cantin C, Sobrevia L, Leiva A, Maternal dyslipidaemia in pregnancies with gestational diabetes mellitus: possible impact in the foetoplacental vascular function and the lipoprotein function in the neonatal circulation, *Current vascular Pharmacology, 2019,* 17:52-71.

Contreras-Duarte S, Carvajal L, Garchitorena MJ, Subiabre M, **Fuenzalida B**, Cantin B, Farias M, Leiva A. GDM treatment schemes modify maternal plasma cholesterol levels dependent to women weight: possible impact on feto-placental vascular function. *Nutrients, 2020-696140.*

Cantin C, **Fuenzalida B**, Leiva A. Maternal hypercholesterolemia during pregnancy: potential modulation of cholesterol transport through human placenta and lipoprotein profile in maternal and neonatal circulation. *Placenta, 2020*

10. BECAS Y AYUDAS

- Beca de Doctorado Vicerrectoría de Investigación (VRI) de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) 2016-2017.
- Beca de Doctorado Escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC) 2016-2019.
- Beca asistencia a eventos y cursos cortos para estudiantes de doctorado, Comisión Nacional de Investigación en ciencia y Tecnología (Conicyt) 2016 y 2019
- International Research Fellowship (IRF), 2017 Groningen, Holanda
- Apoyo a la participación de doctorados en eventos internacionales, VRI, 2017
- Beca congreso y alojamiento Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, Huilo-Huilo, Chile, 2017
- Beca de Doctorado Nacional (CONICYT) (2018-2019).
- Concurso apoyo para el desarrollo de tesis doctoral, JIDEMUC, Escuela de Medicina, 2019
- Elsevier New Investigator Award, International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA 2019)
- Beneficio complementario gastos operacionales Conicyt, 2019
- Beneficio complementario pasantía doctoral Conicyt, Pasantía en Berna, Suiza. 2019

11. PARTICIPACION EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Congresos nacionales

- **Fuenzalida Barbara**, Cantin Claudette, Carvajal Lorena, Contreras Susana, Sobrevia Luis, Leiva Andrea, Maternal supraphysiological hypercholesterolemia impairs fetal HDL function in humans, XXXI reunión Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas, CHILE, Huilo Huilo, 2016.
- **Fuenzalida B,** Sobrevia B, Cantin C, Carvajal L, Contreras-Duarte S, Sobrevia L, Leiva A, Human maternal supraphysiological hypercholesterolemia leads to endothelial dysfuction of the placental microvascular, Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta, CHILE, Puerto Varas, 2017.
- **Fuenzalida B**, Cantin C, Carvajal L, Contreras-Duarte S, Pardo F, Chiarello I, Sobrevia L, Leiva A, Human maternal supraphysiological hypercholesterolemia increase the efflux of cholesterol from placenta trophoblast and microvascular endothelial cells, Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta, CHILE, Puerto Varas, 2017.
- **Barbara Fuenzalida**, Claudette Cantin, Lorena Carvajal, Valentina Pasten, Susana Contreras-Duarte, Andrea Leiva, Human maternal supraphysiological hypercholesterolemia alter the traffic of cholesterol in placental trophoblast cells, Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, CHILE, Concon, 2018.
- **Barbara Fuenzalida**, Claudette Cantin, Lorena Carvajal, Susana Contreras-Duarte, Jaime Gutierrez, Andrea Leiva. Cholesterol uptake and efflux is impaired in human trophoblast cells

from pregnancies with maternal supraphysiological hypercholesterolemia. Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), Santiago, Chile, 2019.

Congresos internacionales

- **Fuenzalida B**, Cantin C, Carvajal L, Contreras-Duarte S, Sobrevia L, Leiva A, Human maternal supraphysiological hypercholesterolemia increases the efflux of cholesterol from placental trophoblast and microvascular endothelial cells to HDL, 24th edition of ISCOMS., HOLANDA, Groningen, 2017.
- **Fuenzalida B**, Cantin C, Carvajal L, Contreras-Duarte S, Sobrevia L, Leiva A, Elevated maternal lipid level increases cholesterol efflux to HDL in human trophoblast but not in placental microvascular endothelial cells, IFPA's 2017, Placenta: Journey of a lifetime, REINO UNIDO DE GB E IRLANDA DEL NORTE, Manchester, 2017.
- **Barbara Fuenzalida**, Claudette Cantin, Lorena Carvajal, Valentina Pasten, Susana Contreras-Duarte, Andrea Leiva, Cholesterol uptake and efflux is impaired in human trophoblast cells from pregnancies with maternal supraphysiological hypercholesterolemia, International Federation of Placenta Associations 2019 (IFPA2019), SANTIAGO, CHILE.