

**“DISFUNCIÓN PLACENTARIA ASOCIADA A LA RESTRICCIÓN DEL  
CRECIMIENTO FETAL INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES.  
ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE  
CELULAR DEL TEJIDO PLACENTARIO”**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna

**ANA CLARA MARINO**

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de

**LICENCIADO EN GENÉTICA**

**UNNOBA**  
Carrera

*Reforma Universitaria*  
**LICENCIATURA EN GENÉTICA**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 16 de Julio de 2020.

**“DISFUNCIÓN PLACENTARIA ASOCIADA A LA RESTRICCIÓN DEL  
CRECIMIENTO FETAL INDUCIDO POR GLUCOCORTICOIDES. ESTUDIO DE LAS  
ALTERACIONES EN LA PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR DEL TEJIDO  
PLACENTARIO”**

Trabajo Final de Grado  
de la alumna

**ANA CLARA MARINO**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Mariana Farina  
**Evaluador**

Rosanna Ramhorst  
**Evaluador**

Natalia Ronci  
**Evaluador**

Susana Pistorale  
**Tutor**

Julieta Aisemberg  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 16 de Julio de 2020.

## AGRADECIMIENTOS

---

Gracias...

A mi directora, Juli. Por darme la posibilidad de realizar mi tesina de grado bajo tu dirección, por explicarme todo con lujo de detalles las veces que fue necesario, por confiar en mi en cada técnica realizada, y estar siempre pendiente y atenta a cada consulta que tuve. Por la paciencia, la compañía y por enseñarme tanto. Por apoyarme e incentivar me con todos los finales que me quedaban y por dejarme participar en cada congreso que se presentó en el camino. Te admiro como profesional y admiro la pasión que tenés por la investigación.

Al CEFyBO que me abrió sus puertas, pero especialmente al labo 111, el Franchi's Team, ese gran equipo que me acompañó y ayudó en todo momento. A Ana, por el hermoso grupo que formó y por los almuerzos compartidos. A Juli2, a Caro y Raque que siempre estuvieron atentas a cada pregunta y me respondieron y ayudaron con la mejor predisposición siempre, pero más agradecida estoy por su compañerismo y por esa complicidad que se generó, por hacerme pasar unos días hermosos en el labo y congreso, y por seguir apoyándome y acompañándome durante la cuarentena en toda la escritura de la tesis. Gracias Juli2 por ayudarme con la citometría unos días antes de doctorarte. A Manu por la seguidilla de PCR que me hiciste el último tiempo que estuve en el labo, por tus ocurrencias y por salvarme con cada programación y/o actualización de algún software, y Maki por siempre ayudarme cuando lo necesité, por tus cargadas que me hicieron reír mucho, por tus chistes y por musicalizar el labo. A Ana, por hacerme compañía en el estudio después de un largo día de laboratorio, por alentarnos y apoyarnos mutuamente y por sus lindas charlas. A Fer por tu buena energía cuando compartimos el laboratorio. A todos, gracias de corazón por tratarme tan bien y hacerme sentir tan cómoda desde el primer momento, gracias por tantas picadas y chocolates, por darme un cajón con mi nombre, voy a extrañar mucho el grupo.

A la UNNOBA, por formarme profesionalmente en la carrera que siempre me gustó y también como persona. Por permitirme presenciar congresos en distintas partes del país y por darme la posibilidad de realizar una movilidad de estudio en Xalapa, México. A Susi, que en su momento fue la directora de la carrera y que elegí como tutora de tesis, gracias por siempre estar presente cuando necesitamos algo y por ser tan comprensiva.

A todos mis amigos de la facultad, que definitivamente este camino logrado no hubiese sido igual sin toda su compañía, su apoyo incondicional, las largas noches de estudio y las juntadas. A Sofi, gracias infinitas por tu sinceridad, tu confianza, tu confidencia, por siempre ayudarme, por contenerme, por acompañarme, por pasar horas y horas explicándome diferentes materias, y por convertirte en mi amiga incondicional que tanto admiro. A la Colo, que nos separamos pronto pero tu amistad, comprensión, compañía y fidelidad siguen intactas en cada mensajito. A Ro, por siempre alegrar cada momento, por ser una gran amiga, compañera y confidente. A Mai, a Leo, a Eli, a todos los que me acompañaron desde un primer momento cuando daba mis primeros pasos en la universidad, por su compañía y por seguir bancándome y estando en cada detalle.

A los que se fueron sumando a lo largo de los años, a Facu por nunca decirme que no y acompañarme en todo, por las noches que te desvelaste haciéndome compañía mientras estudiábamos, que junto con Ivi se convirtieron en un enorme sostén en estos últimos años de la carrera, por acompañarme y apoyarme aun a la distancia cuando estaba en México y durante toda la tesis, por ser mis confidentes, por escucharme y aguantarme tanto, por las juntadas y por dejarme ver crecer a Valen. A Juli, por tus largas charlas y compañía de estudio, por bancarme, por enseñarme y explicarme siempre que lo necesité. A todos los que me siguen acompañando hoy en día, a Lu, a Lucho, a Ren, a Guille por abrirme las puertas de tu departamento siempre que lo necesité, a Agus y Ale que además me acompañaron en capital haciéndome sentir acompañada en la nueva ciudad. Todos sin dudas me aguantaron un montón e hicieron que este recorrido sea mucho más fácil, más lindo.

A mis amigas de siempre, a Virgi, a Caro, Mica, Mer, Maru, Giuli por entender cada vez que no me junté por algún que otro examen y los largos fines de semana que no volví, y aún así seguir estando cuando más las necesito, por escucharme y aguantarme tanto. A Juli, por alegrarte de cada uno de mis logros como si fueran propios, por estar cuando te necesito y por esos hermosos viajes a los que siempre llevaba algún apunte que sabía que nunca iba a leer, pero aún así me apoyaste e incentivaste.

A mi familia, a mi abuela Elisa, a mis tíos y primos que siempre me preguntaban cuándo rendía y cómo me había ido y se alegraban por cada logro que tenía.

A mi hermana Magui, por aguantarme, por preocuparte y escucharme cuando te contaba mis logros en la facu, por aguantar mi locura cada vez que rendía y contenerme, por escuchar mis explicaciones de la tesis aun sin ganas, y por darme el mejor regalo del mundo, a mis sobrinos, que me acompañan todos los días y están presentes en cada videollamada a la distancia, gracias a los enanos por sacarme tantas sonrisas y darme infinitas alegrías. Los quiero un montón.

Y por último, pero el agradecimiento más importante, a mis papás. A ustedes, que siempre me apoyaron desde el primer día que decidí estudiar esta carrera, y en una ciudad que no conocíamos. Por siempre estar en cada detalle y acompañarme en cada paso que doy, por ayudarme a tomar cada decisión, por enseñarme, por contenerme cada vez que fallaba en algún examen, por enseñarme que todos cometemos errores y que hay otras oportunidades, por aguantar mi estado de crisis previo a cada examen, por incentivarme siempre, por escuchar cada explicación de las técnicas del laboratorio, por darme la oportunidad de vivir una experiencia increíble durante el intercambio aunque les haya costado dejarme ir sola tan lejos, por todo eso y más. Por no soltarme nunca la mano. Los quiero infinitamente.

Licenciatura en Genética

Tesis de grado: "Disfunción placentaria asociada a la restricción del crecimiento fetal inducido por glucocorticoides. Estudio de las alteraciones en la proliferación y muerte celular del tejido placentario"

Tesinista: Anaclara Marino

**A MIS PAPAS.**

## ABREVIATURAS

---

11 $\beta$ -HSD2: *11 $\beta$ -Hydroxysteroid*

*Dehydrogenase 2*

ACTH: corticotrofina

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CRH: hormona liberadora de  
corticotrofina

Dexa: dexametasona

dNTPS: desoxirribonucleótidos  
trifosfatados

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

EE: error estándar

g: gramos

GC: glucocorticoide

h: horas

HPA: eje hipotalámico-pituitario-adrenal

KDa: kilo Daltons

mg: miligramos

Min.: minutos

mL: mililitros

PBS: *buffer* fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RCIU: restricción del crecimiento  
intrauterino

s.c.: subcutánea

s: segundos

SF: solución fisiológica

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.

T-PBS: *buffer* fosfato salino con 0,1%  
detergente *tween*

TUNEL: terminal

deoxynucleotidyltransferase (TdT) dUTP  
nick-end labeling)

UL: microlitros

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
CRECIMIENTO INTRAUTERINO.....	1
Crecimiento intrauterino en ratón.....	1
RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO .....	3
Definición .....	3
Etiología.....	3
Epidemiología y relevancia.....	5
Diagnóstico.....	6
Prevención y tratamiento .....	6
FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS .....	7
Glucocorticoides.....	8
Estrés prenatal, desarrollo y crecimiento fetal.....	10
PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS.....	10
Proliferación celular .....	11
Apoptosis.....	14
Vías de señalización.....	14
Proliferación celular y apoptosis placentaria en la RCIU.....	16
AUTOFAGIA.....	17
Vías regulatorias de la autofagia .....	19
Autofagia placentaria y RCIU .....	20
ANIMALES EN ESTUDIO.....	21
Características generales .....	21
Características reproductivas.....	22
Modelos experimentales para el estudio de RCIU.....	23
TEJIDO EN ESTUDIO: LA PLACENTA.....	24
Histología placentaria.....	24
Desarrollo y funciones principales .....	26
Placenta y RCIU .....	27
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>

HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	29
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
Drogas y reactivos.....	30
Soluciones y buffers.....	31
Animales.....	32
Modelo de RCIU .....	33
Técnicas utilizadas .....	34
Western Blot .....	34
RT-qPCR.....	37
Diseño de cebadores .....	37
Extracción de ARN .....	37
Retrotranscripción.....	38
qPCR.....	38
DNA Ladder.....	40
Citometría de flujo .....	41
Doble tinción Anexina V-FITC/Ioduro de propidio .....	41
Tinción Hematoxilina y Eosina .....	42
Fijación.....	42
Inclusión en parafina .....	42
Cortes con micrótopo.....	42
Tinción Hematoxilina y Eosina.....	42
Análisis estadístico .....	43
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
Apoptosis .....	46
Marcadores de la vía extrínseca.....	47
- Fas y Fas Ligando .....	47
Marcadores de la vía intrínseca .....	48
- Bax .....	49
- Bcl2 .....	50

Autofagia.....	54
- LC3 II B.....	54
- mTOR y fosfomTOR .....	55
Proliferación celular .....	57
Ciclinas.....	57
- Ciclina B1 .....	57
- Ciclina D3.....	58
- Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) .....	59
Inhibidores del ciclo celular.....	60
- p16 y p57 .....	60
Técnicas a partir de las cuales no obtuvimos resultados .....	62
Electroforesis de ADN o DNA Ladder .....	62
Tinción Hematoxilina y Eosina .....	62
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>76</b>

## INTRODUCCIÓN

---

### **CRECIMIENTO INTRAUTERINO**

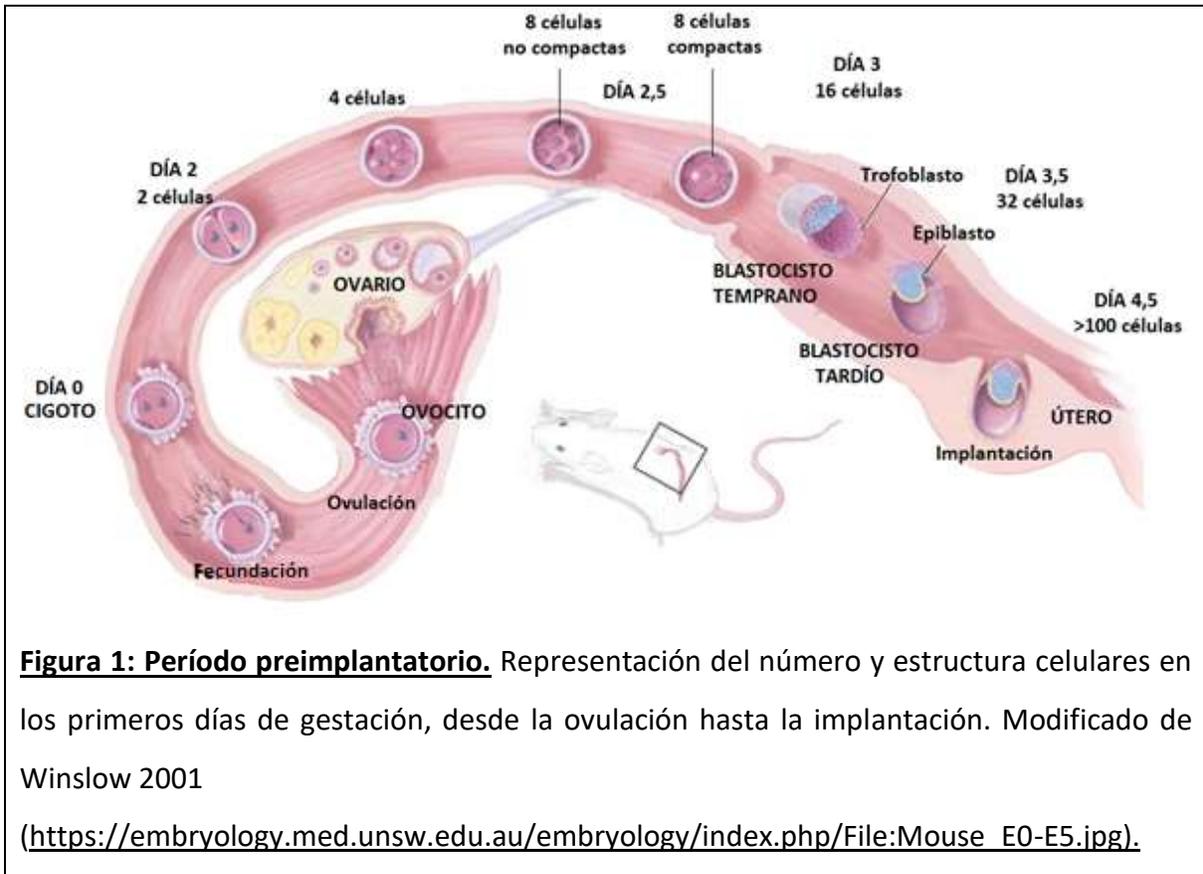
El crecimiento intrauterino es un proceso a partir del cual, luego de la formación del huevo o cigoto producida por la fecundación entre el oocito materno y el espermatozoide paterno, se forma un organismo pluricelular con órganos y tejidos bien diferenciados.

Este proceso se divide en dos períodos: la embriogénesis durante la cual se forman los diferentes órganos, y el periodo fetal en el que se produce la maduración funcional y el crecimiento hasta alcanzar la adaptación a la vida fuera del útero materno (Carrascosa, 2003).

### **Crecimiento intrauterino en ratón**

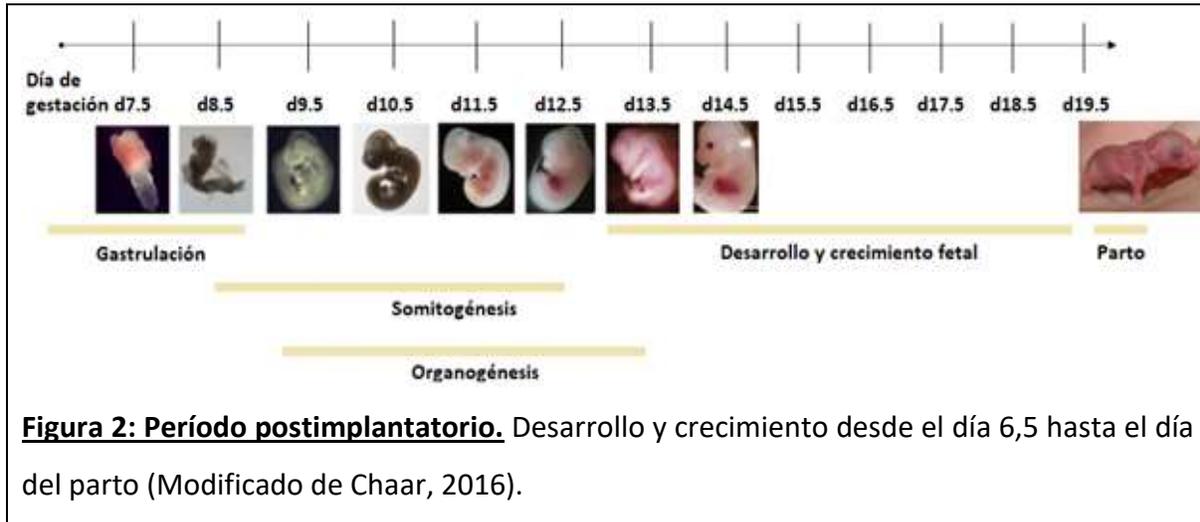
La gestación del ratón dura entre 18,5 y 19,5 días en las hembras primíparas y entre 19 y 21 días en las múltiparas, dependiendo del estado físico y la constitución genética de la hembra (Benavides & Guénet, 2003).

La gestación o desarrollo embrionario se divide en dos períodos: pre y postimplantatorio. El primer período comienza luego de la fecundación del oocito por el espermatozoide considerándose éste como el día 0 de gestación. El cigoto se dirige hacia el útero a lo largo del oviducto sufriendo sucesivas divisiones celulares dando origen al blastocisto, que se implantará en el útero en el día 4,5 de gestación (figura 1) (Hans & Bullock, 2004).



Luego de la implantación, comienza el período postimplantatorio (figura 2) que se caracteriza por una proliferación intensa y una diferenciación celular temprana generando los primeros tipos celulares. El trofoectodermo se diversificará produciendo un gran número de estructuras que darán lugar a la mayor parte de los tejidos que componen la placenta. La masa celular interna dará lugar al embrión y a algunos de los tejidos extraembrionarios (Wolpert, Cheryll & Arias, 2002). A partir del día 6,5 comienza la gastrulación, formándose las tres capas embrionarias: mesodermo, ectodermo y endodermo (Moore, 2020). Continuando con el desarrollo embrionario, comienza la organogénesis, que implica grandes cambios morfogenéticos. Al día 11 de gestación, se observan las estructuras de la mayoría de los órganos y la estructura básica del cuerpo ya está formada, mientras que en el día 12 se forma la placenta corioalantoidea definitiva. De esta manera, la organogénesis llega a su fin y comienza la etapa de crecimiento y desarrollo

fetal a partir del día 13. En esta etapa, los órganos terminan de desarrollarse y de madurar. La diferenciación celular desciende y aumenta la proliferación, el feto crece y se desarrolla hasta el día del parto (Malassiné, Frendo & Evain-Brion, 2003).



## RESTRICCIÓN DEL CRECIMIENTO INTRAUTERINO

### Definición

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) se produce cuando hay alteraciones en la trayectoria del crecimiento fetal y el peso al nacer está por debajo del percentil 10 para la edad gestacional (Díaz, 2010). Esto implica que el feto no alcanza el potencial de crecimiento esperado debido a factores genéticos y/o ambientales (Murki, 2014), manifestándose con baja talla y/o bajo peso al nacer. Con este criterio, se consideran con RCIU a los nacidos a término con un peso menor a 2500 g o, según la edad gestacional, a los nacidos con un peso/longitud corporal menor al percentil 10 (Valsamakís, Kanaká-Gantenbein, Malamitsi-Puchner & Mastorakos, 2006).

### Etiología

La restricción del crecimiento intrauterino es una condición de origen multifactorial que puede ser causada por una gran variedad de patologías a nivel materno, fetal y placentario.

Los factores maternos incluyen enfermedades hipertensivas, autoinmunes, toma de medicamentos durante el período gestacional, estrés materno, desnutrición severa y otros como el consumo de tabaco, alcohol y/o abuso de drogas. Entre los factores fetales se encuentran aneuploidía, malformaciones, síndromes relacionados con una impronta genética anormal, parto prematuro y gestación múltiple. Los factores placentarios involucran condiciones a nivel anatómico, vascular, cromosómico y morfológico de este tejido (Maulik, 2006; Pimiento Infante & Beltrán Avendaño, 2015).

Dentro de los factores maternos, los trastornos hipertensivos afectan entre un 30 a un 40% de los embarazos con RCIU, incluyendo preeclampsia e hipertensión crónica entre otros. En menor proporción, los trastornos inmunológicos y aquellos asociados al estilo de vida materno, también contribuyen al desencadenamiento de la RCIU (Ødegård, Vatten, Nilsen, Salvesen & Austgulen, 2000; Cuffe, O'Sullivan, Simmons, Anderson & Moritz 2012; Maulik, 2006).

A su vez, el exceso de glucocorticoides durante el embarazo y la sobreexposición del feto a estas hormonas ha sido asociado a la restricción del crecimiento fetal. En este sentido, las condiciones que requieren tratamiento con glucocorticoides prenatales, como la terapia obstétrica frente al riesgo de parto prematuro, el tratamiento de fetos con riesgo de hiperplasia adrenal congénita (Lajic, Nordenström & Hirvikoski, 2008) y la enfermedad inflamatoria o autoinmune materna preexistente, también son factores asociados a RCIU (Murphy y col., 2002).

Si bien la mayoría de los casos están asociados a alguno de estos factores, hay un gran porcentaje en donde la causa de la restricción del crecimiento se desconoce (Dev, 2006). Es necesario tener en cuenta la diversidad de factores que pueden afectar al período gestacional y por consiguiente causar restricción del crecimiento del feto, para poder así establecer mejores métodos predictivos, preventivos y de manejo, de los embarazos con RCIU.

## Epidemiología y relevancia

Aproximadamente 20 millones de niños y niñas nacen por año con bajo peso, representando el 16,4% del total a nivel mundial. De estos, 14 millones tienen RCIU. Los nacidos con RCIU representan el 11% de todos los recién nacidos en los países en desarrollo, variando su incidencia según el país, las poblaciones y su etnia (Blencowe y col., 2019; Murki, 2014; de Onis, Blössner & Villar, 1998). La gran mayoría nacen en Asia, hasta un 25% en África y entre un 10 a 20% en América Latina (Murki 2014; de Onis y col., 1998). La incidencia de RCIU en muchos países es desconocida, sin embargo se estima que en general entre el 3 y el 10% de todos los niños nacen con RCIU (Gluckman & Hanson, 2006).

A partir de datos obtenidos por la Organización Panamericana de la Salud, se determinó que la prevalencia del número de nacidos vivos con RCIU en Argentina sería del 7,3% (Pasqualini, 2009). Mientras que en nuestra provincia, la prevalencia documentada por el Hospital Materno Infantil Ramón Sardá fue del 6% en el año 2017, considerando como valor de corte el percentilo 10 para la edad gestacional (Scacchi *et al.*, 2019).

Nacer con RCIU se encuentra asociado a complicaciones de la salud tanto a corto plazo como a largo plazo en la vida adulta (Rybertt, Azua & Rybertt, 2016). Un 10,8% de la mortalidad infantil durante el primer año de vida está asociado directamente a bajo peso al nacer (Aspres, Bouzas & Sepúlveda, 2016). Los recién nacidos con bajo peso además tienen una elevada morbilidad asociada: pueden presentar asfixia perinatal, hipo e hiperglucemia, hipocalcemia e ictericia, entre otros. También complicaciones en el desarrollo del sistema nervioso (Murki, 2014). Estudios realizados hasta los 2 años de edad demuestran que los niños con RCIU presentan diferencias significativas en cuanto al desarrollo psicomotor (Levine y col., 2015). En la adolescencia y adultez temprana, se ha visto una asociación entre nacer con bajo peso y presentar mayores problemas de comportamiento y menor desarrollo académico (Strauss, 2000). Por su parte, durante la adultez, haber nacido con bajo peso se ha asociado con mayores riesgos de presentar patologías como hipertensión, Parkinson (Huxley, Neil & Collins, 2002), diabetes tipo II (Sugden y col., 2001), hipercolesterolemia (Owen, 2005), obesidad (Oken & Gillman, 2003) e isquemia cardíaca

(Barker, Osmond, Forsén, Kajantie & Eriksson, 2005). Estas complicaciones se consideran adaptaciones permanentes en la fisiología y el metabolismo, programadas en un período crítico de la vida (el intrauterino), lo que resulta en un mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas y cardiovasculares en la adultez, lo que se conoce como la "hipótesis de Barker" (Barker, 2006; Murki, 2014; Rybertt y col., 2016).

### Diagnóstico

Es importante la realización de controles durante la gestación ya que permiten identificar embarazos con RCIU y generar un diagnóstico etiológico. El diagnóstico puede realizarse por ultrasonido, que permite certificar la edad gestacional, el peso y la morfometría fetal con una sensibilidad del 70% (Bamfo & Odibo, 2011). También por ecografía doppler para el estudio de la circulación útero-placentaria y por cordocentesis para el diagnóstico de RCIU severo y de inicio precoz (Díaz, 2010). A su vez, es importante el diagnóstico de restricción en el recién nacido mediante la evaluación de los datos del peso al nacer, índice ponderal y el estado nutricional del neonato (Pérez Wulff y col., 2013).

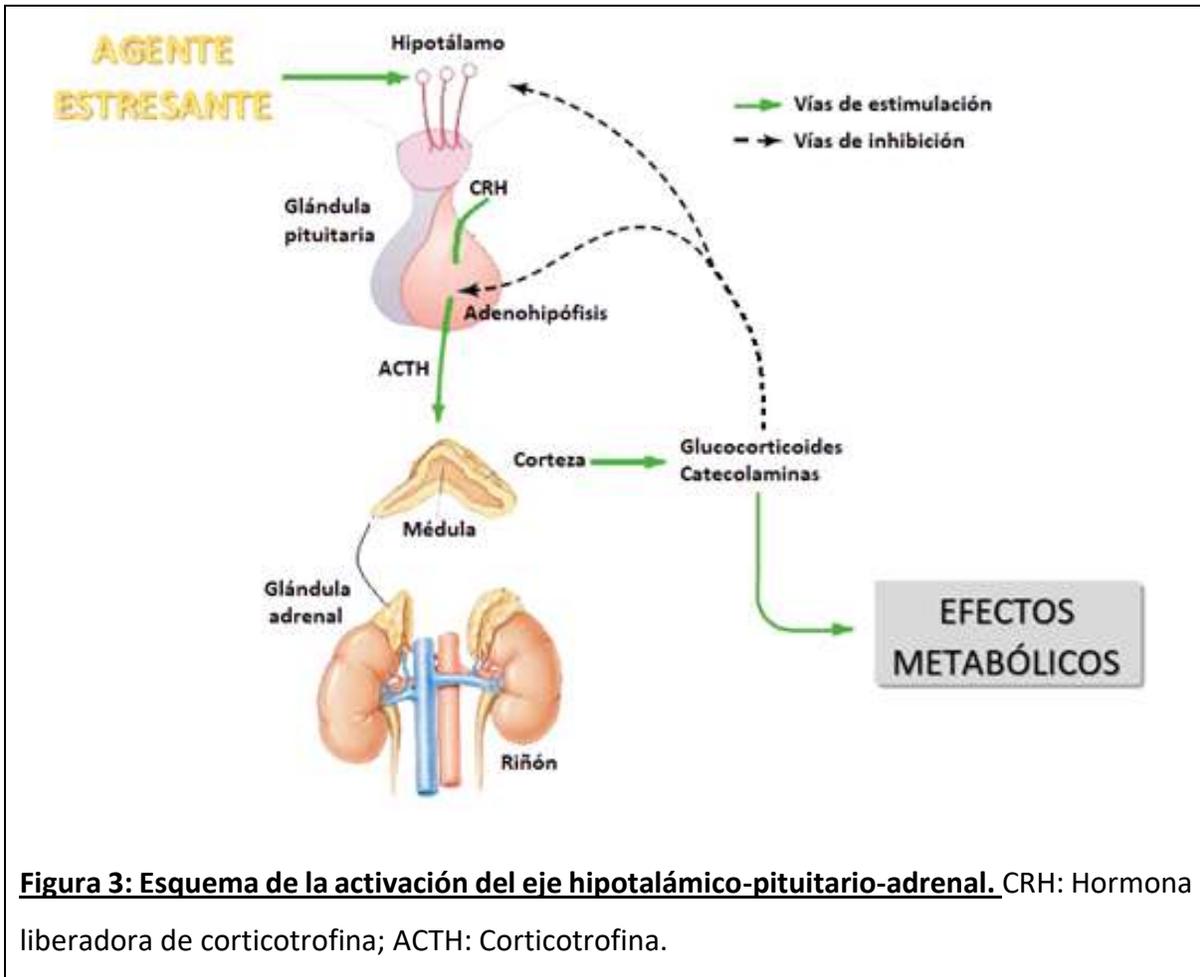
### Prevención y tratamiento

Existen algunas propuestas que apuntan principalmente a mejorar la calidad de vida durante la gestación y reducir la incidencia de RCIU (Bhutta y col., 2013), pero no se utilizan de manera estandarizada. Se propone la toma de suplementos proteínicos, de calcio u otros micronutrientes durante el embarazo (Imdad & Bhutta, 2012). También el reposo y una buena nutrición materna. El único tratamiento para la RCIU utilizado actualmente se basa en controlar el momento del parto para optimizar los resultados perinatales (Dall'Asta, Brunelli, Prefumo, Frusca & Lees, 2017).

## **FISIOLOGÍA DEL ESTRÉS**

El estrés es el conjunto de alteraciones que modifican la homeostasis y se produce en respuesta a situaciones amenazantes del medio interno o frente a alteraciones externas (Randall, Burggren, French, & Eckert, 1998).

En condiciones de estrés, el organismo genera diferentes respuestas a través del sistema nervioso central y periférico (Charmandari, Tsigos & Chrousos, 2005). En primer lugar, hay una respuesta rápida del sistema nervioso autónomo promoviendo la liberación de neurotransmisores. También la estimulación de la médula adrenal para la liberación de catecolaminas hacia el torrente sanguíneo, lo que permite aumentar el gasto cardíaco, la tasa respiratoria, la gluconeogénesis y la lipólisis (Charmandari y col., 2005). Al mismo tiempo, el hipotálamo produce la hormona liberadora de corticotropina o CRH (del inglés *Corticotropin Releasing Hormone*), que junto a la vasopresina, estimulan la glándula pituitaria para producir y liberar corticotrofina o ACTH (del inglés *AdrenoCorticoTropic Hormone*) (Schneiderman, Ironson & Siegel, 2005). La activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), inicia una cascada de reacciones que promueve la síntesis y secreción de corticoides desde la corteza de las glándulas suprarrenales. Los glucocorticoides (GC) participan en el control de la homeostasis de los organismos, siendo los efectores finales del eje HPA (Chrousos, 2009; Vegiopoulos & Herzig, 2007). Para reducir el tiempo de exposición a glucocorticoides se inicia una retroalimentación negativa que inhibe las respuestas secretoras de la CRH y la ACTH (Charmandari y col., 2005) (Figura 3).



### Glucocorticoides

Los corticosteroides son hormonas esteroideas producidas principalmente en la corteza de la glándula adrenal. Se clasifican en dos grupos: glucocorticoides y mineralocorticoides. Dentro del grupo de los GC se encuentran diferentes tipos, como la corticosterona que es el principal corticoide de los roedores y el cortisol, principal glucocorticoide en humanos. Los GC tienen numerosos efectos y pueden actuar en casi todas las células del cuerpo (Taves, Gomez-Sanchez & Soma, 2011). Estas hormonas regulan la actividad metabólica, la función inmune y el comportamiento (Sapolsky, Romero & Munck, 2000).

La indicación más común para el uso de glucocorticoides durante la gestación es como terapia obstétrica frente al riesgo de parto prematuro. Se administran GC para la madurez

pulmonar fetal, lo que reduce la incidencia del síndrome de dificultad respiratoria. También son utilizados en el tratamiento prenatal de fetos con riesgo de hiperplasia adrenal congénita o como antiinflamatorios e inmunosupresores (Crowther & Harding, 2007). Sin embargo, el tratamiento con glucocorticoides prenatales es actualmente muy debatido. A pesar de su beneficio inequívoco en la reducción de la mortalidad y la morbilidad neonatal, la administración de dosis repetidas provoca anormalidades en el crecimiento y el desarrollo, de manera que puede aumentar la mortalidad y reducir el peso al nacer (Benediktsson, Lindsay, Noble, Seckl, & Edwards, 1993; Crowley, 1996; Unek, Lindsay, Noble, Seckl & Edwards, 2012).

Los glucocorticoides son hormonas liposolubles que atraviesan la membrana celular y se unen a receptores específicos llamados receptores de glucocorticoides o GR (del inglés *Glucocorticoid Receptor*). Estos receptores se encuentran libres e inactivos en el citoplasma. La unión con la hormona provoca un cambio de conformación y su translocación hacia el núcleo, donde interactúan con elementos específicos de respuesta a glucocorticoides o GREs (del inglés *Glucocorticoid Responsive Elements*). En el núcleo inducen la transcripción de múltiples genes (Lunghi y col., 2010; Schaaf & Cidlowski, 2002).

Los glucocorticoides endógenos o naturales presentan un grupo de análogos sintéticos que se utilizan en la terapia obstétrica, como la dexametasona, la prednisona y la betametasona (Unek y col., 2012). Estos glucocorticoides sintéticos no son sustrato de la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 u  $11\beta$ -HSD2 (del inglés *11\beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase 2*), que es la encargada de inactivar su acción mediante su conversión en metabolitos inactivos (Seckl, Cleasby & Nyirenda, 2000). Se ha sugerido que el medio fetal hipocortisólico creado por la acción de la  $11\beta$ -HSD2 placentaria es crucial para la maduración del eje HPA fetal (Mune, Rogerson, Nikkilä, Agarwal & White, 1995). Asimismo, se ha observado asociación entre el bajo peso al nacer y la función reducida de la  $11\beta$ -HSD2 placentaria en bebés prematuros (Kajantie y col., 2003). La placenta protege al feto de la sobreexposición a los glucocorticoides maternos, de manera que las concentraciones de cortisol que alcanzan al feto son mucho más bajas que los niveles de hormona en la

circulación materna (Benediktsson y col., 1993). A diferencia de los glucocorticoides de baja potencia, la dexametasona puede atravesar la placenta y afectar directamente el desarrollo y crecimiento fetal (Wills, Gunn, Axelrad & Tu, 2019).

### Estrés prenatal, desarrollo y crecimiento fetal

La activación del eje HPA forma parte de las respuestas adaptativas y necesarias para la maduración y el crecimiento del feto (Sandman, Davis, Buss & Glynn, 2011). La actividad endócrina del eje está aumentada durante la gestación debido a que la placenta libera CRH, estimulando continuamente el funcionamiento del eje HPA. Los niveles de estas hormonas aumentan a medida que avanza la gestación (Brunton, Russell & Douglas, 2008).

Por otro lado, el estrés materno afecta el medio intrauterino y tiene efectos perjudiciales sobre crecimiento fetal. Patologías como RCIU y preeclampsia se encuentran asociadas a alteraciones de la enzima 11 $\beta$ -HSD2 placentaria y/o al exceso de glucocorticoides (Bertram y col., 2001). Factores de estrés como una alimentación inadecuada, alteraciones del sueño y el descanso, el estrés postraumático, la violencia o los problemas laborales pueden provocar la sobreexposición del feto al exceso de GC y causar alteraciones en su curva de desarrollo y crecimiento (Briffa y col., 2017).

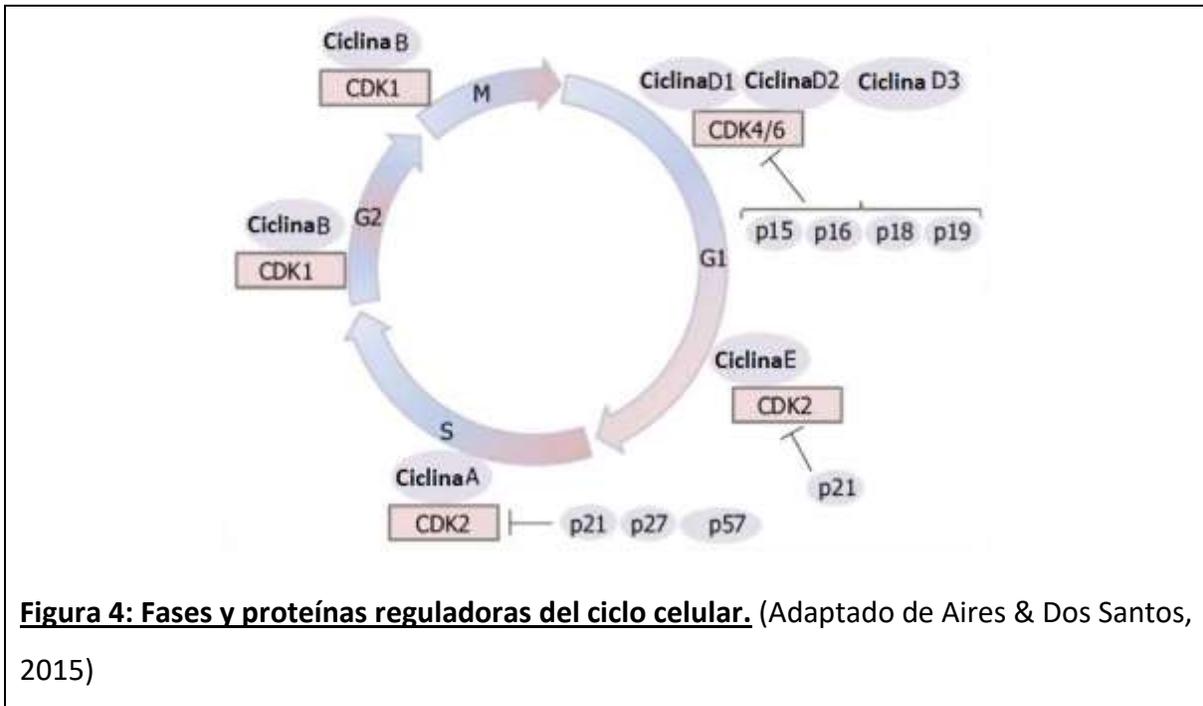
### PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS

Durante la gestación, la placenta tiene una capacidad dinámica de autorenovación, donde el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular es clave. El ciclo celular eucariota es regulado por la actividad coordinada de una familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, del inglés *Cyclin-dependent kinases*). Las quinasas son reguladas positivamente por ciclinas y negativamente por inhibidores de CDK (Sherr & Roberts, 1995). La correcta expresión y acción de los reguladores de la mitosis es muy importante ya que el desarrollo y función de la placenta requieren de una fina coordinación entre los procesos de proliferación y diferenciación celular.

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental que se produce en la placenta en situaciones tanto fisiológicas como patológicas. Estudios previos indican que en la decidua materna la apoptosis es importante para otorgar inmunidad y proteger a las células fetales, mientras que en las vellosidades participa en la regulación del crecimiento placentario (Jerzak & Bischof, 2002).

### **Proliferación celular**

El proceso por el cual las células se duplican y dan lugar a la formación de dos células nuevas se conoce como ciclo celular (ver figura 4). Se inicia con células en reposo o en fase G<sub>0</sub>, que para ingresar en el ciclo deben ser estimuladas por factores de crecimiento. El ciclo comienza con la primera fase de crecimiento (G<sub>1</sub>), en la cual la célula se prepara para dividirse. La célula evalúa las condiciones externas (adhesión o factores tróficos) e internas (correcta dotación de elementos celulares, segregación correcta de cromosomas) como punto de control para continuar el ciclo celular o detenerlo. Para hacerlo, entra en la fase S en la cual se sintetiza una copia de todo el ADN. Una vez duplicado el ADN, la célula ingresa en la fase G<sub>2</sub>, en la cual las células aumentarán en tamaño, y los centrosomas duplicados durante la fase S, se dirigirán hacia polos opuestos para formar posteriormente el huso mitótico. De esta manera, el material genético se condensa y se prepara para la división celular durante el período de mitosis (fase M). La célula se divide en dos células hijas, otorgándole una copia de su material genético a cada una. Finalmente, si las células continúan en proliferación, todo el ciclo celular comienza nuevamente para cada una de ellas (Lagunas, Mendiola & Cruz, 2015).



**Figura 4: Fases y proteínas reguladoras del ciclo celular.** (Adaptado de Aires & Dos Santos, 2015)

La división celular y el progreso del ciclo están finamente controlados por distintos mecanismos que aseguran que se produzca correctamente. Para ello, posee puntos de control estrictos en cada una de sus etapas, los cuales permiten la progresión del ciclo si no se encuentra ningún error (Bartek & Lukas, 2001).

En mamíferos, el progreso del ciclo celular depende de eventos altamente ordenados, controlados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Kastan & Bartek, 2004). Cada fase del ciclo celular requiere de la activación de al menos un complejo CDK específico a través de la unión de su subunidad reguladora complementaria conocida como ciclina. Esta unión provoca cambios conformacionales dependientes de fosforilaciones de la subunidad catalítica (Matsuoka, Kato, Fisher, Morgan & Sherr, 1994), así como la eliminación de inhibidores ubicados en el sitio activo de las CDKs (Krek & Nigg, 1991).

Dentro de los inductores del ciclo se encuentra la ciclina B1 (Wang y col., 2014). Esta ciclina se asocia a quinasas formando el complejo Ciclina B1/CDK1, que regula específicamente la entrada a la fase de mitosis (Nurse, 1990). Este complejo es capaz de sincronizar diferentes eventos en la mitosis, como la condensación de los cromosomas, la ruptura de la envoltura nuclear, la separación del centrosoma y el ensamblaje del huso polar (Takizawa & Morgan,

2000). La fosforilación de proteínas de la envoltura nuclear por el complejo de ciclina B1 hace que se disocie, comprometiendo su identidad estructural, lo que permite el acceso de los cromosomas al huso mitótico (Heald & McKeon, 1990).

Otra proteína que induce la proliferación celular es la ciclina D3, miembro de la familia de las ciclinas D. Esta ciclina funciona como una subunidad reguladora de las quinasas CDK4 o CDK6, cuya actividad es necesaria para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Inaba y col., 1992).

El factor de proliferación celular PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*), es una proteína nuclear que se sintetiza en la fase G1 temprana y que alcanza su máxima expresión en la fase S del ciclo celular (McCarty, 2007). Favorece la síntesis y reparación del ADN debido a que es un cofactor de la ADN polimerasa (Giordano y col., 1991). Por su participación en la vía de reparación de los ácidos nucleicos, se la considera una proteína antiapoptótica.

Los inhibidores de CDK (CKIs) pueden regularse en respuesta a diversas señales fisiológicas como factores de crecimiento, citoquinas, contacto célula-célula o en respuesta al daño del ADN, entre otros. Los CKIs detienen la división celular por inhibición estérica bloqueando el acceso a sustratos o por desestabilización del complejo CDK-ciclina (White & Dalton, 2005). Dentro de los CKIs se encuentra p16, que pertenece a la familia INK4 (inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 4). P16 se une a los complejos ciclina/CDK4 o ciclina/CDK6, bloqueando su actividad e impidiendo que continúe el ciclo celular entre la fase G1 y S (Tsellou, Michailidi, Pafiti & Troungos 2008). Mientras que, la proteína 57 (p57) pertenece a la familia CIP (proteínas inhibidoras de ciclinas dependientes de quinasas), y es un potente inhibidor de las Cdk de las fases G1 y S (ciclina A/CDK2, ciclina B/CDK2 y ciclina E/CDK2). De esta manera regula la transición de las fases G1/S. En las células de mamíferos, esta proteína se localiza en el núcleo y su sobreexpresión provoca una detención completa del ciclo celular en la fase G1 (Lee, Reynisdottir & Massague, 1995).

## **Apoptosis**

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fundamental para el mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares (Erel, Dane, Calay, Kaleli & Aydinli, 2001). Además de ser un mecanismo activo en condiciones normales, también está asociada a ciertas patologías.

Los cambios morfológicos celulares característicos de la apoptosis son: la fragmentación y condensación de la heterocromatina, y la formación de cuerpos apoptóticos que contendrán el ADN, las organelas y el citoplasma celular. Estos cuerpos apoptóticos son múltiples, esféricos y rodeados de membrana (Kerr & Wyllie, 1972; Spanos y col., 2002), que son luego fagocitados por células vecinas (Hardy, 1999). La apoptosis también involucra cambios bioquímicos como la activación de caspasas y cambios a nivel de la membrana celular. Por ejemplo, la exposición del fosfolípido fosfatidilserina (PS) hacia el lado externo de la membrana celular permite el reconocimiento temprano de las células apoptóticas por parte de los macrófagos, resultando en la fagocitosis sin liberación de componentes proinflamatorios. Luego de este evento, ocurre la ruptura del ADN y la formación de los cuerpos apoptóticos (Daniel, 2012; Kummar y col., 2010).

### **Vías de señalización**

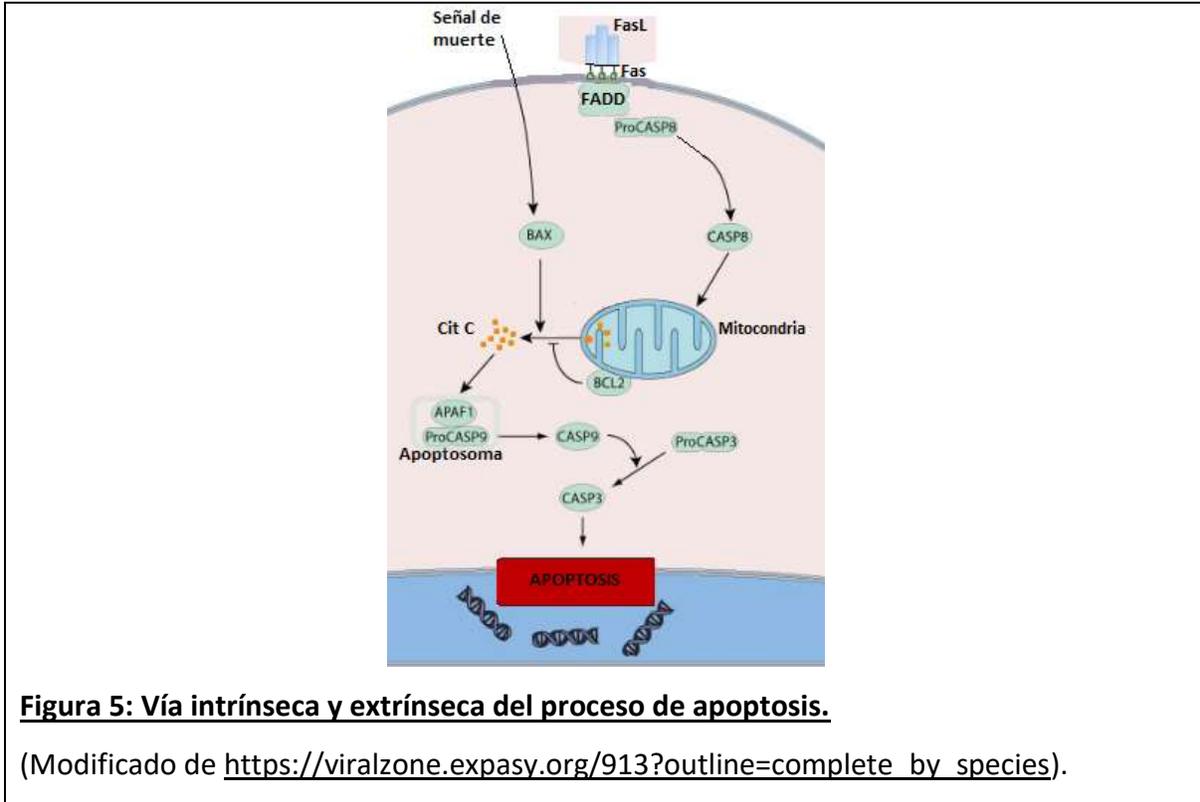
La apoptosis puede ser iniciada por dos vías (ver figura 5), intrínseca o extrínseca. Ambas vías dependen de la activación secuencial de un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de cisteína-proteasas específicas de ácido aspártico, conocidas como caspasas. Las caspasas activas clivan proteínas celulares y rompen la estructura nuclear y el citoesqueleto, así como también activan a las DNAsas (Daniel, 2012). Las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) se activan durante la etapa temprana de la apoptosis mientras que sus blancos moleculares o caspasas efectoras (3, 6 y 7) lo hacen al final (Heazell & Crocker 2008; Kadyrov, Kingdom, & Huppertz, 2006).

La vía de señalización extrínseca se activa a partir de ligandos, como el ligando Fas o el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  (del inglés *Tumor Necrosis Factor*), que interactúan con

receptores transmembrana que pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF (Sharp Heazell, Crocker & Mor 2010). Estos últimos, tienen un dominio de muerte intracelular que recluta proteínas adaptadoras, las cuales a su vez reclutan caspasas. En el sistema Fas/FasL, la unión de Fas con su ligando recluta múltiples proteínas adaptadoras como FADD, la cual se dimeriza y asocia con la procaspasa 8. La concentración de estas proteínas en este complejo proteico denominado DISC permite que la caspasa 8 se autoactive por proteólisis, para posteriormente clivar a la caspasa 3 efectora e iniciar la fase de ejecución de la apoptosis (Green & Llambi, 2015; Schneider & Tschopp, 2000).

Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial, puede ser activada por daño irreparable del ADN, hipoxia, ausencia de factores de crecimiento o estrés oxidativo severo, entre otros (Bratton & Salvesen, 2010). En este mecanismo se producen alteraciones de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que genera la formación de poros transitorios y la liberación al citoplasma de factores proapoptóticos como el citocromo c (Cit c) y Apaf-1. (Danial & Korsmeyer, 2004; Hail, Carter, Konopleva, & Andreeff, 2006). Una vez que el citocromo c se une a Apaf-1 y procaspasa-9, se forma un apoptosoma. Este complejo activa la caspasa 9 generando la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 (Green & Llambi, 2015).

Esta vía de señalización se encuentra regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl2, la cual se divide en proteínas proapoptóticas como Bax que aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y antiapoptóticas como Bcl2 que bloquea la liberación del citocromo c (Wyllie, 1995).



*Proliferación celular y apoptosis placentaria en la RCIU*

Durante la gestación, es importante una buena regulación entre proliferación celular y apoptosis tanto para el desarrollo de la placenta como del embrión. Sin embargo, en diversas situaciones patológicas, ocurren desregulaciones o alteraciones de estos procesos. Un estudio en un modelo de RCIU por administración de glucocorticoides muestra alteraciones en el desarrollo y la función placentaria, así como también modificaciones en las proteínas del ciclo celular y aumento en los niveles de apoptosis, con la consecuente reducción del peso placentario (Braun y col., 2015).

Si bien es necesaria la apoptosis de células placentarias durante la gestación (Smith, Baker, & Symonds, 1997b), se ha registrado un aumento significativo de las tasas de apoptosis en placentas de embarazos con RCIU (Vogt Isaksen, 2004). En particular se ha observado un aumento de los niveles de proteínas proapoptóticas como Bax (Karowicz Bilińska, Szczerba, Kowalska Koprek, Nawrocka Kunecka & Grzegorz, 2009), p53 (Heazell, Alexander, Sharp,

Baker & Crocker, 2011) y caspasa 3 (Endo, Okamoto, Yamada, Nikaido & Tanaka, 2005). También una disminución en los niveles de proteínas antiapoptóticas como Bcl2 (Börzsönyi y col., 2013).

Por otro lado, Greenwood y col. encontraron en un modelo en ovejas una disminución en la proliferación celular en placentas de fetos con restricción del crecimiento intrauterino (Greenwood, Slepatis, Bell & Hermanson 1999). También en seres humanos se observó una reducción en la proliferación de células del trofoblasto en placentas con RCIU (Chen, Bajoria, & Aplin, 2002). En ratas, la administración de dexametasona prenatal provoca RCIU y alteraciones en la proliferación celular placentaria. Los niveles proteicos de ciclina D3 (Nogami, Hiraoka & Aiso, 2016) y de PCNA están disminuidos en placentas de fetos provenientes de hembras tratadas con dexametasona (Ozmen, Unek & Korgun, 2017). También se observó en placentas con RCIU un aumento en los niveles de los inhibidores p57 y p27 (Er y col., 2015; Unek, Ozmen, Kipmen-Korgun & Korgun, 2012).

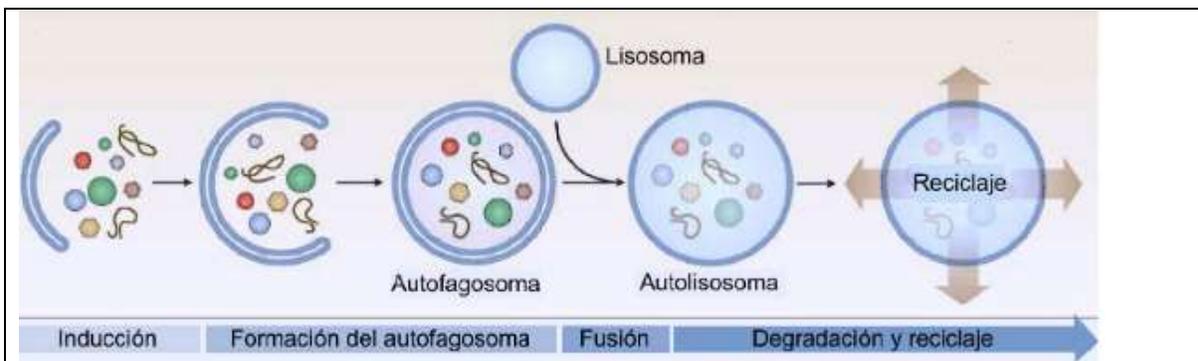
## **AUTOFAGIA**

La autofagia es un proceso celular catabólico que ocurre en casi todos los tejidos de los mamíferos (Grumati y col., 2011), que involucra la degradación de los componentes del citoplasma como organelas, proteínas y lípidos (Zhang, 2015). Las proteínas y organelas son envueltas en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales se fusionan con lisosomas generando autofagolisosomas, donde se produce la degradación del contenido intracelular (Hung y col., 2012) (ver figura 6).

Este proceso cumple un rol crítico en el desarrollo de los tejidos, la diferenciación y la homeostasis celular en condiciones fisiológicas, y su desregulación se encuentra relacionada con diversas patologías (Papáčkova & Cahová, 2014). La autofagia también puede activarse ante diferentes formas de estrés, como la deficiencia de nutrientes o la hipoxia (Levine y Klionsky 2004), como un mecanismo de protección para la supervivencia celular. Este proceso permite eliminar componentes dañados o dañinos a través del catabolismo y el reciclaje, y así mantener la homeostasis celular (Schiavi & Ventura, 2014).

Comienza con la fase de inducción, el alargamiento y la fusión de un saco de membrana denominado fagóforo, que envuelve los componentes citoplasmáticos. Se cree que diferentes compartimentos contribuyen con proteínas y lípidos, como el retículo endoplasmático rugoso, el aparato de Golgi o las mitocondrias (Papáčková & Cahová, 2014). ULK es un complejo de quinasas que participa de esta primera etapa, activando por fosforilación a la proteína Beclina 1 (o ATG6), que forma parte del complejo iniciador de la nucleación del fagóforo. Para continuar con su expansión, actúan ciertas proteínas (ATG5, ATG12, ATG16) denominadas ATGs (del inglés *autophagy-related*), y la proteína LC3 (del inglés *Microtubule-associated protein light chain 3*). Esta última, se sintetiza como pro-LC3, se convierte en su forma activa LC3 I, y luego en LC3 II al translocarse a la membrana del autofagosoma y conjugarse con el lípido fosfatidiletanolamina (PE). El PE-LC3 o LC3 II en la membrana del autofagosoma permite la fusión de las membranas lipídicas (Mizushima, 2004). Es así que la formación del autofagosoma depende al menos de dos complejos moleculares, LC3 II y ULK (Into, Inomata, Takayama & Takigawa, 2012). La detección de la proteína LC3 II se utiliza como marcador de autofagia (Mizushima, 2004).

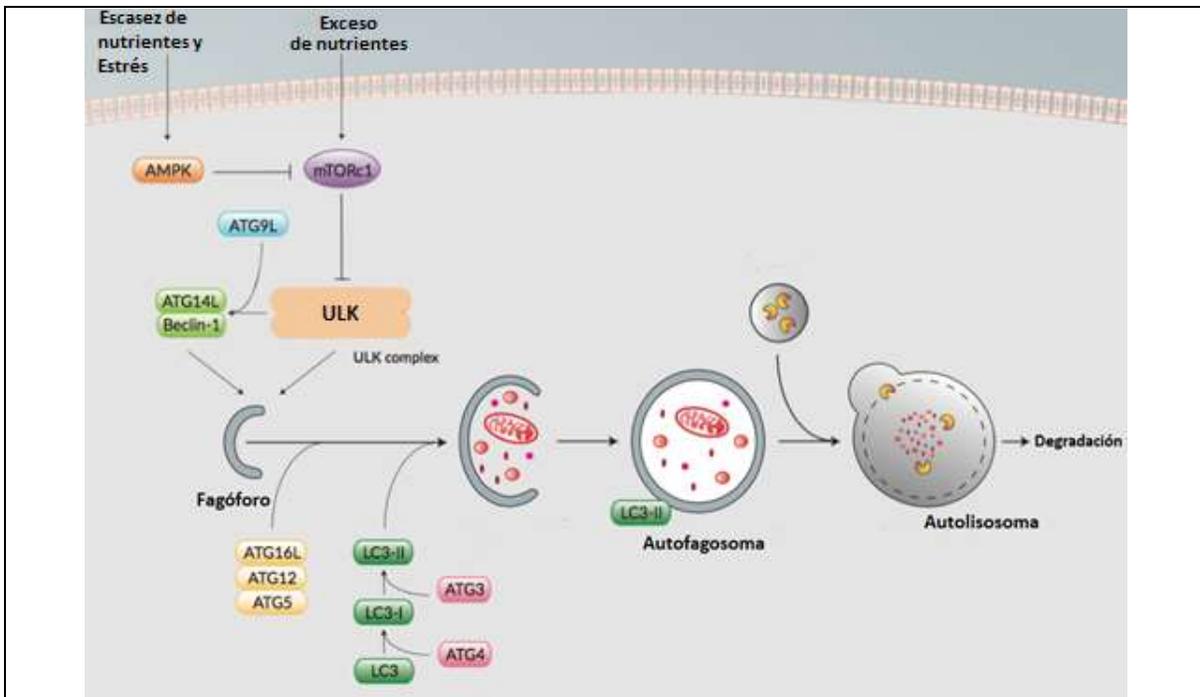
Una vez que la doble membrana se cierra por completo da lugar a la formación del autofagosoma (Pankiv y col., 2007) que madura y se fusiona con un lisosoma, orgánulo que contiene enzimas hidrolíticas que se encargan de la degradación del material celular. Finalmente, los productos finales de esta degradación, como los aminoácidos, los ácidos grasos, los azúcares y los nucleótidos, salen al citoplasma a través de transportadores, donde pueden ser reciclados y utilizados nuevamente en procesos celulares (Boya, 2017).



**Figura 6: Fases de la autofagia** (Boya, 2017).

### Vías regulatorias de la autofagia

Entre los principales eventos que una célula detecta para aumentar los niveles de autofagia se encuentran el mal plegamiento de proteínas, la presencia de organelas dañadas, la carencia de nutrientes o la hipoxia (Costas & Rubio, 2017). Existe una compleja red de vías de señalización que intervienen en la regulación del proceso de autofagia, siendo las quinasas principales mTOR (del inglés mammalian Target of Rapamycin) y AMPK (proteína activada por AMP (ver figura 7)).



**Figura 7: Regulación de la autofagia** (Modificado de <https://www.ibiantech.com/la-autofagia-la-inmunidad-innata/>).

MTOR es una serina treonina quinasa que se expresa en las células eucariotas (Brown y col., 1994). Es un sensor intracelular que integra señales metabólicas transmitidas por factores hormonales, estrés, disponibilidad de nutrientes y estado energético de la célula. Regula numerosos procesos celulares, incluyendo la transcripción génica, el metabolismo de proteínas, el ciclo celular y la organización del citoesqueleto (Schmelzle & Hall, 2000; Kahn

& Myers, 2006). mTOR forma dos complejos multiproteicos (I y II). Hay una señalización sensible a rapamicina y dependiente de nutrientes mediada por el complejo I y otra insensible a rapamicina y dependiente de insulina (vía el complejo II) (Kim y col., 2003). Cuando no hay activación de la autofagia, el complejo I (TORC1) inactiva el complejo ULK1 por fosforilación. Frente a privación de nutrientes, estrés o falta de factores de crecimiento, se inhibe mTOR y se estimula el proceso catabólico de autofagia para la obtención de energía (Shintani & Klionsky, 2004; Meijer & Codogno, 2006). En relación a esto, se ha visto que la disminución de mTOR aumenta la formación de autofagosomas inducida por rapamicina, sugiriendo que mTOR previene la autofagia (Iwamaru y col., 2007). Por otro lado, AMPK es un complejo que se activa por un aumento en la relación AMP/ATP, y frente a bajos niveles de ATP (López Alegre, 2015), cumpliendo la función de sensor del estado energético de la célula. Puede activar mecanismos de señalización para aumentar los niveles de glucosa, la glicólisis, la oxidación de ácidos grasos y colesterol, la gluconeogénesis, la síntesis de glicógeno, y la síntesis de proteínas (Hardie, Hawley & Scott, 2006). Ante falta de glucosa, AMPK promueve la autofagia activando por fosforilación directamente a ULK-1 (Kim, Kundu, Viollet & Guan, 2011) y mediante la inhibición de mTOR. Si bien Bcl2 es una conocida proteína antiapoptótica, también puede regular la autofagia. La unión de Bcl2 a la proteína Beclina-1 produce la ruptura del complejo formado por la Beclina-1 necesario para el inicio de la autofagia (Ino y col., 2012).

### Autofagia placentaria y RCIU

La autofagia es importante para mantener la supervivencia como también para inducir la muerte celular. Su equilibrio en los tejidos es importante debido a que tasas excesivamente altas o bajas pueden llevar a la muerte celular (Gong & Kim, 2014).

Estudios realizados en placentas de embarazos con RCIU muestran un aumento en las tasas de autofagia placentaria. Se han observado en estas placentas mayores niveles de LC3 II, de Beclina-1 y mayor formación de autofagosomas, así como cambios en la expresión de proteínas de la familia ATG (Curtis, Jones, Garrod, Hulme & Heazell, 2013; Hung y col.,

2012). Asimismo, niveles disminuidos de mTOR y de Bcl2 se detectaron en placentas humanas de embarazos con RCIU (Roos y col., 2007; Roos, Powell & Jansson, 2009).

## **ANIMALES EN ESTUDIO**

Los modelos animales resultan de gran importancia para la investigación científica, permitiendo el estudio de múltiples aspectos de la fisiología y patología humana. Por ejemplo, complicaciones del embarazo como pérdidas tempranas, RCIU o preeclampsia. Alrededor del 90% de los animales utilizados en investigación son roedores, principalmente ratones y ratas. Este trabajo se llevó a cabo utilizando ratones (*Mus musculus*) de la cepa albina BALB/c.

### **Características generales**

El ratón de laboratorio es uno de los modelos biológicos más utilizados en investigación debido a que cumple ciertas características útiles para su uso. Por un lado, posee un tamaño pequeño apropiado para la crianza y manipulación (de 9 a 12 cm de longitud y un peso entre 20 y 35 g según el sexo y la cepa) haciendo que los requerimientos de espacio y alimentación para su mantenimiento y reproducción sean mínimos. Por otro lado, se reproducen todo el año, y los períodos de gestación son breves (18,5 a 21 días). Se destetan a los 21 días de edad, las camadas son numerosas, son sexualmente maduros a las 8 semanas de edad, y son lo suficientemente longevos (viven en promedio 24 meses) (Phifer-Rixey & Nachman, 2015). Además, son mamíferos euterios, por lo que poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.

Este modelo de mamífero es utilizado para estudiar una amplia variedad de procesos fisiológicos y enfermedades, incluidas aquellas asociadas al metabolismo, al desarrollo y la reproducción, los trastornos neurológicos e inmunes, entre otros (Morse, 2007).

### Características reproductivas

En el laboratorio, con alimento ilimitado y buenas condiciones ambientales, las hembras pueden reproducirse durante todo el año (Firman y Simmons 2008; Morse 2007).

El ciclo reproductivo del ratón es estral. Las hembras son poliéstricas continuas, es decir, presentan ciclos consecutivos durante todo el año que sólo son interrumpidos por los períodos gestacionales. El ciclo estral dura de 4 a 6 días y se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro. El estro se define como el periodo de receptividad sexual que dura entre 8 y 12 h y finaliza con la ovulación. Los ciclos son muy sensibles a los cambios ambientales de temperatura, humedad y luz-oscuridad, ya que son dependientes de los niveles de hormonas circulantes.

Luego del coito, el espermatozoides del macho coagula dentro de la vagina formando un tapón vaginal. La presencia del tapón suele utilizarse como punto de referencia para establecer el inicio de la gestación. Nosotros particularmente definimos el día que observamos el tapón como día cero de gestación.

En la cepa utilizada en este trabajo, BALB/c, la gestación tiene una duración de 19 días (el día 0 es el día en que se observa el tapón y el día 19 el día en que se produce el parto). Como el ratón es una especie de ovulación múltiple, permite gestar varios fetos en la misma preñez. El eventual aborto de uno de los fetos no impide la llegada a término de los otros, por lo que se considera una ventaja evolutiva y permite realizar estudios sobre reproducción (Benavides & Guénet, 2003).

Luego del parto, la hembra devora la placenta, cuida y acicala las crías recién nacidas. También realiza la construcción del nido, cuida que las crías permanezcan en él otorgándoles calor, las alimenta, las limpia, las atiende y las defiende. Hay que considerar que también puede ocurrir que la hembra abandone las crías por falta de estímulo para la lactación, o que incluso se las coma.

Durante el período de lactancia ocurre el desarrollo del pelaje, la aparición de los dientes, la apertura del conducto auditivo externo y de los ojos. Entre los días 13 y 14, las crías,

comienzan a ingerir alimento sólido y agua del bebedero. Se las desteta a los 21 días de edad.

### Modelos experimentales para el estudio de RCIU

Los modelos animales de restricción del crecimiento intrauterino son muy importantes para estudiar diversos eventos que determinan el crecimiento y el desarrollo fetal. Los roedores tienen RCIU espontánea y, además, es factible modelar esta patología en rata y ratón. Estos animales son muy utilizados para estudiar la RCIU debido a que se encuentran estrechamente relacionados con el ser humano a nivel genético, bioquímico y fisiológico. Una de las maneras de modelar la RCIU es induciéndola por estrés prenatal. Por ejemplo, las hembras preñadas se someten a estrés físico a través de inmovilización, ruido y luces parpadeantes, descargas eléctricas o manipulación del animal. También al estrés psicológico a través del hacinamiento o el aislamiento social, entre otros (Huizink, Mulder, & Buitelaar, 2004; Maccari y col., 2003).

Otra manera de inducir RCIU por estrés prenatal es aumentando los niveles circulantes de las hormonas del estrés en el organismo, administrando glucocorticoides. Estos modelos son variables según el corticoide, las dosis, las vías y los días de gestación en los que se administra (Plant & Zeleznik, 2015).

Si bien se reconoce que los glucocorticoides son de gran importancia fisiológica durante el desarrollo embrionario normal (Harris & Seckl, 2011), hay una gran cantidad de datos que muestran que la exposición al exceso de glucocorticoides durante el embarazo se correlaciona con un menor peso al nacer (Meaney, Szyf & Seckl, 2007). Los modelos de administración prenatal de glucocorticoides también imitan el exceso de glucocorticoides circulantes que se produce con el tratamiento de enfermedades reumáticas e inflamatorias maternas (McDonough, Curtis & Saag, 2008) o en el caso de la terapia obstétrica para embarazadas con riesgo de parto prematuro (Kay, Bird, Coe & Dudley, 2000).

Previamente en nuestro laboratorio se desarrolló un modelo *in vivo* de RCIU en ratón por sobreexposición a glucocorticoides. El modelo consiste en la administración de 8 mg/kg/día

(s.c.) de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación. Esta dosis de dexametasona induce restricción del crecimiento fetal. En día postnatal 1 así como en los días 16, 17 y 18 de gestación, se registró un aumento en las tasas de restricción del crecimiento y una disminución en el peso promedio de los fetos y de las placentas (Arias, tesina de grado 2017).

## **TEJIDO EN ESTUDIO: LA PLACENTA**

La placenta es un órgano transitorio que se desarrolla durante la gestación. Es la conexión entre el feto y la madre, que permite el transporte de gases, nutrientes y residuos (Gong & Kim, 2014). También otorga una protección entre el feto y el sistema inmune materno, y produce y secreta hormonas, citoquinas y moléculas de señalización (Malassiné y col., 2003). Luego del nacimiento, todas estas funciones son realizadas por los distintos sistemas de órganos. De esta manera, la placenta promueve el desarrollo normal del feto, respondiendo a los requisitos nutricionales, metabólicos, endócrinos y vasculares del mismo.

### **Histología placentaria**

La placenta definitiva en ratones es de tipo discoide. En su lado materno se encuentra asociada al endometrio que se transforma en la decidua basal, y del lado fetal se encuentra unida al cordón umbilical que la conecta con el feto (Georgiades, Fergyson-Smith & Burton, 2002).

Se compone de un epitelio externo que deriva del trofoblasto, de una red vascular subyacente y del estroma. Desde el punto de vista funcional e histológico se pueden distinguir distintas capas, cada una de las cuales posee diferentes tipos de interacción materno-fetal (figura 8) (Bolton, 2014; Qu, McDonald, Whiteley, Bainbridge & Adamson, 2014; Simmons, 2014):



**Figura 8: Corte histológico de la placenta de ratón en día 17,5 de gestación.** Distinción de los cuatro compartimientos de la placenta. Se observa la decidua, la zona de unión, el laberinto y la placa coriónica separadas por una línea punteada color blanco (Modificado de Qu y col., 2014).

-Decidua: es la capa más alejada del feto que constituye el lado materno de la placenta y está formada por la decidua basal (zona de implantación del blastocisto tardío) que rodea a la zona de unión. La mayor parte de este compartimento contiene células del estroma endometrial (células deciduales), las cuales secretan hormonas, factores de crecimiento y citoquinas, y pueden funcionar como fagocitos durante la remodelación placentaria. La decidua también posee células del sistema inmune materno que brindan inmunidad (NK o células "asesinas" naturales uterinas) (Bolton, 2014; Simmons, 2014).

-Zona de unión: también conocida como capa de espongiotrofoblasto, se encuentra adyacente a la decidua y cumple funciones endócrinas muy importantes. Esta zona que carece de vasos sanguíneos fetales, pero que es atravesada por vasos sanguíneos maternos (Georgiades y col., 2002), contiene células del trofoblasto parietal, gigantes y glucogénicas (Qu y col., 2014).

-Laberinto (lado fetal): es la región donde se produce el intercambio materno-fetal (nutrientes, gases y residuos) y para tal fin contiene redes vasculares muy ramificadas (Qu y col., 2014). Los canales sanguíneos se encuentran delimitados por tres capas de células

trofoblásticas: dos capas de sincitiotrofoblasto en contacto con el endotelio fetal y una capa de citotrofoblasto que se encuentra en contacto con la sangre materna (Malassiné y col., 2003). Las vellosidades coriónicas se conectan formando una especie de laberinto (Chavatte-Palmer & Tarrade, 2016).

-Placa coriónica: se ubica adyacente a la cavidad amniótica y al cordón umbilical. Comprende la pared del corion y las vellosidades coriónicas que surgen de esa región, las cuales permiten el intercambio entre la sangre materna y fetal (Qu y col., 2014).

### Desarrollo y funciones principales

La placenta de ratón se desarrolla a partir de la unión del saco vitelino con el corion (coriovitelina), y luego evoluciona fusionándose con el alantoide para convertirse en una placenta corioalantoidea hacia el día 11,5 de gestación (Malassiné y col., 2003).

Dentro de las funciones principales de este órgano se encuentra la función de intercambio (Watson & Cross, 2005). De la madre al feto pasan sustancias nutritivas como oxígeno, glucosa, aminoácidos, vitaminas, hormonas y anticuerpos. Mientras que del feto a la madre se produce el intercambio de desechos como la urea o el dióxido de carbono (Gude, Roberts, Kalionis & King, 2004). Además, otra función importante es la producción de hormonas como lactógeno y proliferina en ratón, mientras que la placenta humana secreta gonadotropina coriónica, progesterona, estrógeno y lactógeno placentario (Roa, Smok S & Prieto, 2012). Así como permite el paso de anticuerpos desde la madre, que son importantes para generar inmunidad al feto frente a determinados antígenos, también cumple función de barrera inmunológica, brindando protección al feto frente a la respuesta inmune materna (Moffett & Loke, 2006).

Se ha demostrado que la placenta de ratón y la humana, aunque muestran diferencias morfológicas y endócrinas (Malassiné y col., 2003), presentan analogías genéticas, bioquímicas y fisiológicas (Dilworth & Sibley, 2013). Por ello, es frecuente el uso de modelos en ratón para el estudio de patologías gestacionales vinculadas a disfunción placentaria.

## Placenta y RCIU

Evidencia epidemiológica ha demostrado una asociación entre la restricción del crecimiento fetal y alteraciones placentarias a nivel estructural y funcional (Vedmedovska, Rezeberga, Teibe, Melderis & Donders, 2011). En placentas humanas de fetos con RCIU disminuye tanto el área superficial del sincitiotrofoblasto como el volumen del espacio intervelloso, además del número y el volumen de las vellosidades placentarias (Mayhew y col., 2003). A nivel molecular, se ven alterados los niveles de ciertos transportadores de aminoácidos, de glucosa, de ácidos grasos libres y los transportadores iónicos como la bomba ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Sibley y col., 2005).

Ensayos en animales en circunstancias de sobreexposición a glucocorticoides describen restricción del crecimiento placentario (reducción de tamaño y peso) y modificaciones funcionales de este órgano, cuyo grado depende del tipo de glucocorticoide, de la dosis y la duración del tratamiento (Baisden, Sonne, Joshi, Ganapathy & Shekhawat, 2007; Hahn, Counter, Lundberg, Beijersbergen, Brooks & Weinberg, 1999; Hewitt, Mark & Waddell, 2006). En este sentido, se ve afectado el recambio celular, el tamaño, y la estructura interna del órgano (Regnault y col., 2005).

Además, se ha descripto aumento en las tasas de autofagia y apoptosis placentaria, así como disminución en la proliferación celular en placentas de embarazos con RCIU y de modelos animales de restricción fetal (Fengsrud y col., 1995; Vogt Isaksen, 2004).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### HIPÓTESIS

Estudios sobre el proceso patológico de la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) han apuntado a una función anormal de la placenta como un mecanismo común. En modelos animales de estrés prenatal, donde la unidad feto-placentaria está expuesta a exceso de glucocorticoides, se ha observado no sólo restricción del crecimiento fetal, sino también alteraciones en el desarrollo, tamaño y funcionalidad placentarias (Ain, 2005; Bertram y col., 2001; Cuffe y col., 2012).

Durante la gestación, la correcta expresión y acción de los reguladores de la mitosis es muy importante ya que el desarrollo y función placentarias requieren de una fina coordinación entre los procesos de proliferación y diferenciación celular. Se han observado en algunos modelos animales de RCIU, modificaciones de ciertas proteínas del ciclo celular y un descenso de los niveles de proliferación en el tejido placentario (Baisden y col., 2007; Er y col., 2015; Nogami y col., 2016; Unek y col., 2012).

Asimismo, la placenta tiene una capacidad dinámica de autorenovación, donde el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular es clave para su correcto funcionamiento. En estudios previos en placentas humanas de fetos con RCIU se observa un aumento en los niveles tanto de apoptosis como de autofagia (Agata y col., 2009; Börzsönyi y col., 2013; Braun y col., 2015; Curtis y col., 2013; Erel y col., 2001; Waddell y col., 2000).

En base a estos antecedentes hemos propuesto la siguiente **hipótesis de trabajo**:

***Durante la gestación la sobreexposición a glucocorticoides altera el recambio celular, el tamaño y la estructura de la placenta. La reducción del tamaño del órgano es producto del desequilibrio entre los mecanismos de proliferación y muerte celular.***

## **OBJETIVOS**

Recientemente en nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo en ratón de RCIU inducido por glucocorticoides. La administración prenatal de dexametasona reduce el peso fetal y placentario. El **objetivo general** de este trabajo es estudiar en las placentas de fetos con RCIU posibles alteraciones sobre los mecanismos de proliferación y muerte celular.

Para llevarlo a cabo se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar los niveles de apoptosis en placentas de fetos con y sin RCIU. Evaluar la expresión de mediadores proapoptóticos como Bax, Fas y Fas ligando, y antiapoptóticos como Bcl2 y PCNA. También evaluar apoptosis por las técnicas de *DNA Ladder* y por citometría de flujo (Anexina V/Ioduro de Propidio).
2. Estudiar si la RCIU inducida por exposición prenatal a GC induce modificaciones en la expresión de marcadores y reguladores de autofagia en el tejido placentario. Evaluar cambios en los niveles de mTOR, fmTOR, Bcl2 y LC3 II B.
3. Estudiar la proliferación celular en las mismas placentas. Evaluar marcadores de proliferación como las ciclinas B1 y D3, y PCNA e inhibidores del ciclo celular como p16 y p57.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Drogas y reactivos

- La dexametasona fosfato sódico (Decadron) se obtuvo de SIDUS SA (Martínez, BA, Argentina).
- Las membranas de nitrocelulosa (trans-Blot de 0,45  $\mu\text{m}$ ) fueron adquiridas de laboratorios Bio-Rad Inc. (Hércules, CA, USA.) y el marcador de peso molecular fue suministrado por GE Healthcare Bio-Science Corp. (Piscataway, NJ, USA).
- Los anticuerpos fueron obtenidos de diferentes laboratorios:
  - o Anti-tubulina de DSHB (Iowa, USA);
  - o Anti-actina, anti-bcl2 y anti-bax, al igual que los anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA);
  - o Anti-LC3 II B de Abcam (Cambridge, MA, USA);
  - o Anti-mTOR y fmTOR de Cell Signaling (Danvers, MA, USA);
- El colorante Rojo Ponceau S, fue obtenido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).
- El Quick-Zol fue obtenido de Kalium Technologies (Bernal, BA, Argentina).
- Los reactivos utilizados para la retrotranscripción del ARNm ( $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura, DNAsa I, *Buffer* DNAsa y cebadores aleatorios) fueron adquiridos en Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) excepto por la M-MLV transcriptasa reversa y el buffer de M-MLV que son de Promega (Madison, WI, USA). El inhibidor de RNAsas y los dNTPs fueron suministrados por Genbiotech (CABA, Argentina).
- Los cebadores para qPCR fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- La mix 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) es de Solis BioDyne (Tartu, Estonia).
- El marcador de pares de bases fue proporcionado por Biodynamics SRL (CABA, Argentina).

- La Anexina V se obtuvo de Abcam (Cambridge, MA, USA).
- La proteinasa K utilizada para el *DNA Ladder* fue obtenida de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

### **Soluciones y buffers**

#### **-Solución fisiológica.**

NaCl 0,9%.

#### **-Buffer fosfato (PBS).**

NaCl 136,9 mM + KCl 2,68 mM +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47 mM +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8 mM.

#### **-T-PBS (solución de lavado).**

PBS + Tween 20 (0,1%).

#### **-Buffer muestra 4X para Western Blot.**

Azul de bromofenol 0,3% (p/v) + Tris 0,5 M pH=6,8 + SDS 1% (p/v) + glicerol 10% (v/v).

#### **-Buffer RIPA para homogenización de muestras para Western Blot.**

Tris-HCl 50 mM pH=7,4 + NP40 1% + NaCl 150 mM + Deoxicolato de sodio 0,25% + inhibidores de proteasas 1X.

#### **-Cóctel de inhibidores de proteasas.**

EDTA 1 mM + aprotinina 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + leupeptina 20  $\mu\text{M}$  + DTT 5 mM + STY 2 mM + ácido caproico 1 mM + benzamidina 2 mM + PBS.

#### **-Buffer de corrida para Western Blot.**

Tris-base 123,8 mM pH=8,3 + glicina 0,96 M + SDS 17,3 mM.

#### **-Buffer de transferencia para Western Blot.**

Tris 25 mM pH=8,1-8,4 + glicina 192 mM + metanol 20% (v/v).

#### **-Solución de tinción Rojo Ponceau S.**

Rojo Ponceau S (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico) 0,5% (p/v) + ácido acético 1% (v/v).

#### **-ECL (soluciones de revelado para Western Blot).**

Solución A: Ácido p-cumárico 0,4 mM + Luminol 2,5 mM + Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 + H<sub>2</sub>O bidestilada.

Solución B: Tris 0,15 M pH 8,5 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 19 mM + H<sub>2</sub>O bidestilada.

**-Buffer TAE 50X (para geles de agarosa).**

Tris-base 24,2 g + ácido acético glacial 5,7 ml + EDTA 1,861 g. Se lleva a 100 ml con agua destilada.

**-Buffer de lisis para extracción de ADN (DNA Ladder).**

NaCl 100 mM + Tris-HCl 50 mM + EDTA 4 mM + SDS 0,5% pH 8.

**-Buffer de digestión para citometría.**

DNAsa 0,4 µl + colagenasa 0,015 gr (0,5%) en 300 µl de PBS.

**-Binding buffer para citometría.**

Hepes 0,1 M pH 7,4 + NaCl 1,4 M + CaCl<sub>2</sub> 0,025 M.

## **Animales**

Para realizar este trabajo de tesis se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, adquiridos en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UBA con un régimen de 12 h luz/ 12 h oscuridad, a temperatura constante entre 23 y 25°C, con agua y alimento *ad libitum*. Las hembras fueron apareadas con machos fértiles de la misma cepa. La cópula se confirmó por la presencia del tapón mucoso vaginal a la mañana siguiente del apareamiento, considerándose éste como día cero (0) de gestación. La duración de la gestación en esta cepa y bajo las condiciones de nuestro bioterio es de 19 días.

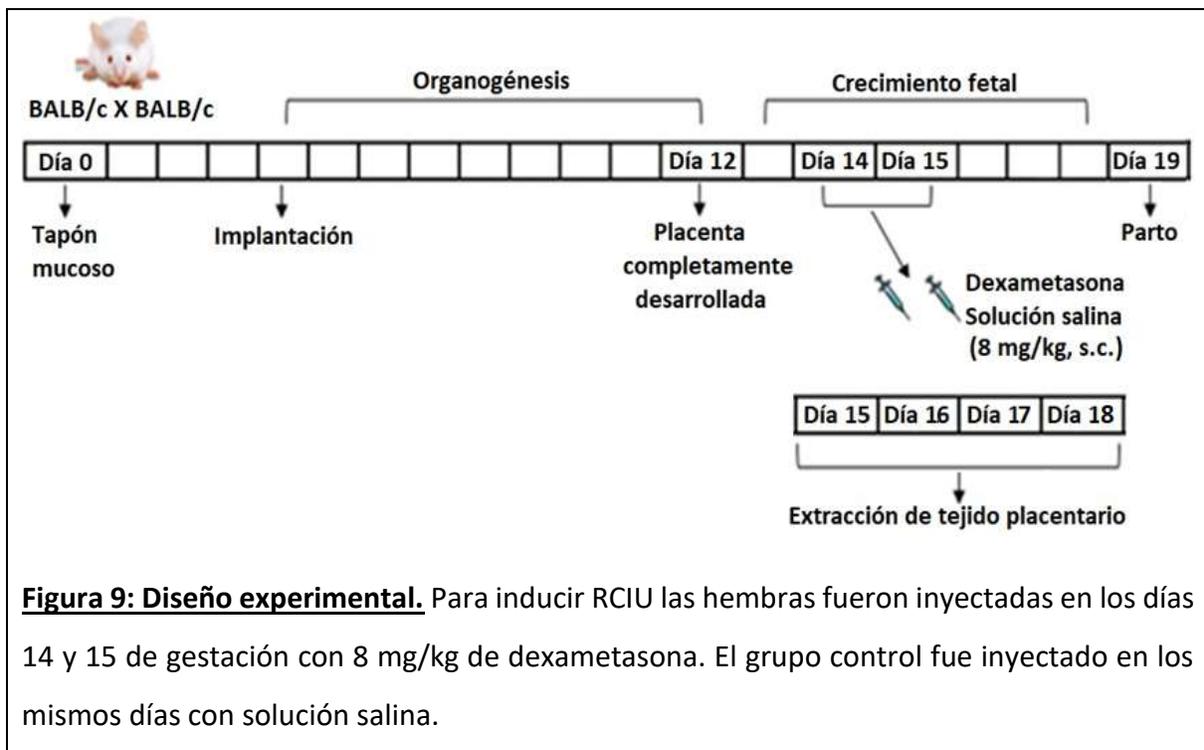
La eutanasia se llevó a cabo por dislocación cervical o en cámara con saturación de CO<sub>2</sub>.

El proyecto de este trabajo de tesis, junto con los procedimientos experimentales utilizados, fueron evaluados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de

Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Resolución 899/2016).

### Modelo de RCIU

Se inyectaron las hembras preñadas en los días 14 y 15 de gestación con 8 mg de dexametasona por kg de peso corporal (s.c.). El tratamiento con el glucocorticoide sintético induce RCIU. Los controles fueron inyectados los mismos días de gestación con el mismo volumen (100 µl) de solución salina (s.c.). La eutanasia para obtener el tejido placentario se realizó en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación (figura 9). Es decir, el mismo día 15 en el que se administra por la mañana la segunda y última dosis de dexametasona y, hasta el día 18, 24 h previas al parto.



El día de la eutanasia se realizó la extracción de los cuernos uterinos y se separó cada feto y su respectiva placenta, llevándose a cabo un registro del peso de ambos. También se registró la mortalidad intrauterina (reabsorción o muerte fetal). Los datos de los pesos de los fetos se utilizaron para determinar si tuvo RCIU. El peso por debajo del percentil 10 (ver

tabla 1) se definió como un feto con restricción del crecimiento. En el caso de las hembras tratadas con dexametasona sólo se utilizaron las placentas de los fetos con RCIU. En el caso de los controles, se usaron las placentas de los fetos con peso mayor al percentil 10.

	DÍA 15	DÍA 16	DÍA 17	DÍA 18
<b>Percentil 10 (g)</b>	0,2508	0,4218	0,6770	0,9432

**Tabla 1: Percentil 10 según el día de gestación.** Valores del percentil 10 de cada día de gestación que se utilizaron para definir los fetos con RCIU. Los percentiles se calcularon a partir del peso de los fetos que provienen de animales control para cada edad gestacional.

Una vez obtenidas las placentas, se procesaron diferencialmente dependiendo de la técnica a realizar. Para **qPCR** se homogeneizó el tejido manualmente con un homogeneizador tipo *potter* (media placenta, ≈50 mg) en 1 ml de reactivo Quick-Zol y fueron guardadas a -80°C. Para las técnicas de **DNA ladder** y **Western Blot**, se guardó la placenta entera a -80°C. Para realizar la tinción **H&E**, las placentas fueron fijadas en paraformaldehído 4%. La **citometría de flujo** se realizó con tejido fresco el mismo día de la extracción.

### Técnicas utilizadas

#### Western Blot

Para analizar los niveles proteicos de Bax (21 kDa), Bcl2 (27-29 kDa), LC3 II B (16 kDa), fmTOR y mTOR (290 kDa) en placentas, se realizó una extracción de proteínas totales del tejido. Se utilizaron placentas provenientes de fetos de madres controles y de fetos con RCIU de madres tratadas con dexametasona. Los tejidos fueron homogeneizados (en homogeneizador Ultra-Turrax T25 basic, IKA Labor Technik) en 500 µl de *buffer* RIPA (ver soluciones y *buffers*), luego se sonicaron por 10 s y se centrifugaron por 10 min a 10000 rpm a 4°C. Se recolectaron los sobrenadantes y se tomó una alícuota de cada uno para cuantificar la cantidad de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976).

Para la desnaturalización y separación electroforética de las muestras, se colocaron 80  $\mu\text{g}$  de proteína de cada placenta en *buffer* muestra (ver soluciones y *buffers*) con 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol y  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, y se hirvieron durante 5 min. Las muestras y el marcador de peso molecular fueron sembrados en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se utilizó el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli 1970) con un gel concentrador de 4,5% y un gel separador de porcentaje distinto según la proteína a evaluar. En el caso de Bcl2, al igual que Bax y LC3 II B se utilizó un gel de poliacrilamida del 15%. Para mTOR el gel utilizado fue de 6%. La corrida se realizó a temperatura ambiente en *buffer* de corrida (ver soluciones y *buffers*) durante 1 h a un voltaje constante de 55 V para que se concentre la muestra y luego el tiempo necesario para su separación a 100 V.

Finalizada la corrida, se transfirieron las proteínas en *buffer* de transferencia (ver soluciones y *buffers*) a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  utilizando el sistema de transferencia húmedo (Mini-Protean III de Bio-Rad) a voltaje constante (100 V) durante 1 h y 30 min, a 4°C. Luego, las membranas fueron teñidas con el colorante reversible Rojo Ponceau S para verificar que la transferencia se haya realizado adecuadamente. Se lavaron con abundante agua corriente y se incubaron en solución de bloqueo (5% de leche descremada en PBS), durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Finalizado el bloqueo se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con T-PBS (ver soluciones y *buffers*).

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (ver tabla 2) diluidos en PBS, en agitación durante toda la noche en cámara de frío (4°C). Las diluciones y en qué animal fueron desarrollados cada uno de ellos se detallan en la tabla 2. Al día siguiente, luego de los lavados (3 lavados de 10 min cada uno con T-PBS), las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (ver tabla 2) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados con T-PBS.

ANTICUERPO	HECHO EN	DILUCIÓN
1 <sup>ario</sup> Anti-LC3 II B	Conejo	1/3000
1 <sup>ario</sup> Anti-Bcl2	Conejo	1/200
1 <sup>ario</sup> Anti-Bax	Ratón	1/200
1 <sup>ario</sup> Anti-mTOR	Conejo	1/200
1 <sup>ario</sup> Anti-fmTOR	Conejo	1/200
1 <sup>ario</sup> Anti-Tubulina	Ratón	1/5000
1 <sup>ario</sup> Anti-Actina	Conejo	1/5000
2 <sup>ario</sup> Anti-Conejo		1/3000
2 <sup>ario</sup> Anti-Ratón		1/5000

**Tabla 2: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blot.** Detalle de los anticuerpos primarios y secundarios, indicando en qué animal se realizaron y la dilución en la que se los utilizó para cada ensayo.

El revelado consistió en la incubación de las membranas durante 1 minuto con la solución de revelado ECL (ver soluciones y *buffers*). Las membranas se introdujeron en el dispositivo Gene Gnome XRQ NM (Syngene), donde una cámara captó la luz emitida por quimioluminiscencia y digitalizó la imagen. Se identificaron las bandas de interés calculando la movilidad electroforética relativa ( $R_f$  o relación de frentes: distancia recorrida en mm por la proteína a determinar/distancia en mm del frente) de cada banda y de las bandas conocidas del marcador de peso molecular, aplicando una regresión logarítmica. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa *Image J (NIH)*. Las bandas correspondientes a Bcl2, Bax, mTOR y fmTOR se normalizaron respecto a la  $\beta$ -tubulina, mientras que las bandas de LC3 II B respecto a la  $\beta$ -actina. Los resultados se expresaron como densidades ópticas relativas de la proteína de interés y la proteína de referencia.

## RT-qPCR

### Diseño de cebadores

Se utilizó la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a partir de la cual se buscaron los transcritos correspondientes a cada gen, y se eligió el de mayor longitud. Se utilizó la misma página para diseñar los cebadores (NCBI-Primer Blast). Al momento de seleccionar los cebadores a utilizar, se buscó que el amplicón tenga una longitud de hasta 200 pares de bases, los cebadores un porcentaje de guanina-citocina (GC) de entre 40 y 60% y una temperatura de melting ( $T_m$ ) entre 55-60°C y que no difiera en más de 1°C la  $T_m$  entre el cebador sentido y antisentido. Para seleccionar el oligo a utilizar se evaluaron los  $\Delta G$  de los dímeros (intra e inter cebador) y la formación de horquillas con el programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/>). En todos los casos se seleccionaron los oligos con  $\Delta G$  pequeños, con no más de 2-3 C ó G en sus extremos 3', sin corridas ni repeticiones. Los cebadores se disolvieron en H<sub>2</sub>O ultrapura (100  $\mu$ M) y se realizó una solución de uso 10  $\mu$ M del cebador sentido más el antisentido.

### Extracción de ARN

Se homogeneizaron las placentas (de fetos provenientes de madres controles y de fetos con RCIU provenientes de madres tratadas con dexametasona) en Quick-Zol con un homogeneizador manual (*potter*), y se realizó la extracción del ARN total según el protocolo del fabricante. Se determinó la concentración del ARN y su pureza (relación 260/280 nm) utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Eppendor BioPhotometer). Se verificó la integridad del material genético mediante el patrón de migración electroforética sembrando 6  $\mu$ g de ARN en un gel de agarosa (1,5%). Una mayor integridad está relacionada con la presencia de las bandas correspondientes al ARNr18S y 28S. Para la retrotranscripción solo se utilizaron aquellas muestras de ARN con una alta integridad y con una relación de absorbancias 260/280 entre 1,8 y 2.

### Retrotranscripción

La retrotranscripción consiste en la obtención de ADNc (copia) a partir de ARNm (mensajero). Se realizó a partir de 3 µg del ARN total, en un volumen final de reacción de 20 µl. En primer lugar, el ARN fue tratado con DNAsa I (Mix 1, tabla 3) durante 15 min a temperatura ambiente. Luego, se agregó 1 µl de EDTA 25 mM y se incubaron las muestras durante 5 min a 65°C. Se agregaron los dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato: dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y los cebadores aleatorios (Mix 2, tabla 3) y se incubaron durante 5 min a 65°C. Las muestras se dejaron en hielo durante 7 min, se les agregó inhibidor de RNAsas (Mix 3, tabla 3) y se incubaron durante 10 min a 25°C, 50 min a 37°C y 15 min a 70°C. Las incubaciones se realizaron en un termociclador T21 IVEMA. Para evaluar contaminación con ADN genómico se realizó como control la reacción de retrotranscripción sin agregar la enzima M-MLV (blanco sin enzima).

MIX	COMPONENTES
1	1 µl <i>DNAsa I</i> + 2 µl <i>Buffer DNAsa</i>
2	1 µl dNTPs + 0,8 µl cebadores aleatorios
3	4 µl <i>Buffer MMLV</i> + 2 µl H <sub>2</sub> O up + 0,5 µl inhibidor de <i>RNAsas</i> + 1 µl <i>MMLV</i>

**Tabla 3:** Componentes de cada mix utilizadas para la retrotranscripción. up: ultrapura.

### qPCR

A partir de la obtención del ADNc se realizó la técnica de PCR en tiempo real para determinar los niveles de ARNm de los genes de interés (ver tabla 4) y del gen de referencia utilizado, el de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). La qPCR se llevó a cabo en un termociclador RG6000 Corvette. La composición de la mix de reacción y la secuencia de los cebadores utilizados se detallan en las tablas 4 y 5.

CEBADOR	SENTIDO 5'->3'	ANTISENTIDO 5'->3'	AMPLICIÓN (pb)
PCNA	AGATGCCGTCGGGTGAATTT	TGTTCCCATTTGCCAAGCTCT	126
P16	CGTTTCTCACCTCGCTTGT	AGTGACCAAGAACCTGCGAC	83
P57	GCGCAAACGTCTGAGATGAG	CCATCTCCGGTTCCTGCTAC	130
CICLINA B1	AGCGAAGAGCTACAGGCAAG	CTCAGGCTCAGCAAGTTCCA	141
CICLINA D3	CCTTCTAAGCTCGCCCTGAA	GCTCCATCCACTGCCATCATT	86
FAS	ATGCACACTCTGCGATGAAG	CAGTGTTTACAGCCAGGAGA	120
FAS LIGANDO	TCCGTGAGTTCACCAACCAAA	CCAGAGATCAGAGCGGTTCC	178
HPRT	AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG	AGAGGTCCTTTTACCAGCA	198

**Tabla 4:** Secuencias de los cebadores para qPCR y tamaño del amplicón.

COMPONENTES DE LA MASTER MIX	CONCENTRACIÓN
5X HOT FIREPoI EvaGreen qPCR Mix Plus (contiene el fluoróforo EvaGreen, ADN Polimerasa, dNTPs y MgCl <sub>2</sub> )	1X (2.5 µl)
Cebadores (sentido + antisentido)	0,28 µM (1 µl)
H <sub>2</sub> O ultrapura	5 µl

**Tabla 5:** Componentes de la mix de reacción para la qPCR. Se utilizan 8,5 µl de la mix para cada reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, un ciclo de activación de la polimerasa durante 12 minutos a 95°C, continuando con 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos. En el caso del gen HPRT hubo una variación solo en la temperatura de alineamiento la cual fue de 58°C.

Para obtener la eficiencia de los cebadores se realizaron curvas estándares de 5 puntos con las siguientes diluciones: 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 a partir de una mix de ADNc que contiene 5 µl de ADNc de cada muestra. Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

Los ciclos desde los que se observa amplificación (CT) fueron obtenidos a partir del umbral establecido usando la curva de fluorescencia en función de los ciclos. La eficiencia de los cebadores se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar ( $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ ). Se establecieron eficiencias de entre 0,95-1,05,  $R^2$  mayores a 0,9 y pendientes de -3,3.

Para cuantificar los niveles de ARNm se utilizó el fluoróforo *EvaGreen*. La fluorescencia se midió durante la extensión y se generaron las curvas de amplificación. Para distinguir los amplicones se graficaron las curvas de disociación, en las cuales se observó el pico correspondiente a la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) del amplicón.

En el caso de las muestras se utilizó una dilución final en el tubo de reacción de 1/100. Se colocaron para cada reacción individual, 8,5  $\mu\text{l}$  de la master mix (ver tabla 4) y 4  $\mu\text{l}$  de ADNc de una dilución 1/32 de cada muestra, alcanzando un volumen final de 12,5  $\mu\text{l}$ . Se utilizaron como calibradores para cada corrida 2 puntos de la curva estándar. En todas las corridas se realizó un blanco sin ADNc (blanco de muestra). Todas las muestras se midieron por triplicado. Para la cuantificación se utilizó el método de curva estándar. Los datos fueron procesados con el software Rotor-Gene Q series, provisto por el fabricante del termociclador.

### DNA Ladder

Se homogeneizaron las placentas (aproximadamente 20 mg del tejido) en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (ver soluciones y *buffers*) utilizando un homogeneizador manual (*potter*). Se incubaron con Proteinasa K (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 2 h 30 min a 55°C. Se realizó la precipitación de proteínas agregando acetato de potasio 1 M + cloroformo 50% para luego centrifugar a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. Se colocó la fase acuosa en otro tubo y se precipitó el ADN agregando 2,5 volúmenes de etanol absoluto y dejando las muestras durante 30 min a -80°C. Se centrifugó a 14000 rpm por 20 min a 4°C y se lavó el pellet con etanol 70%. Se guardó a -20 ° C durante toda la noche.

Al día siguiente, se volvió a lavar con etanol 70% y a centrifugar bajo las mismas condiciones por 20 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* (ADN) se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura y se

realizó la separación electroforética en geles de agarosa al 2%. El patrón de fragmentación del ADN se visualizó utilizando un transiluminador con luz ultravioleta luego de incubar el gel por 30 min con el agente intercalante Bromuro de Etidio.

### Citometría de flujo

#### *Doble tinción Anexina V-FITC/Ioduro de propidio*

El tejido fresco (1 placenta por animal control o tratado) se disgregó mediante la utilización de tijeras y se le agregó 300  $\mu$ l de buffer de digestión (ver soluciones y *buffers*). Luego se incubó durante 1 h a 37°C en baño térmico resuspendiendo con pipeta cada 15 min. La suspensión se filtró pasando por una membrana de 70  $\mu$ m con el agregado de 1 ml de PBS y se centrifugó a 400 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células se resuspendió en 500  $\mu$ l de *binding* buffer (ver soluciones y *buffers*). Para el recuento de células se realizó una dilución 1/1000 en Azul Trypan y se contó el número de células vivas en cámara de Neubauer utilizando un microscopio invertido Olympus. Se calculó el volumen de muestra para  $1 \times 10^5$  células y se llevó a un volumen final de 200  $\mu$ l con *binding buffer*. Antes de pasar las muestras por el citómetro se le agregó 1  $\mu$ l de Anexina V (0,15 mg/ml) y 1  $\mu$ l de Ioduro de propidio (250  $\mu$ g/ml).

Además de las muestras, en cada ensayo se realizaron los siguientes controles: negativo sin marca (sin Anexina V ni Ioduro de Propidio, uno por cada placenta), monomarcas (sólo con anexina V o sólo con Ioduro de Propidio), y un control positivo de muerte celular (marcado con anexina V e Ioduro de Propidio). El control positivo estaba compuesto por una mezcla de 500 mil células muertas previamente fijadas con etanol 70% y 500 mil células vivas.

Un total de 10000 células fueron adquiridas en el citómetro de flujo BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences). Este análisis discrimina las células intactas (Anexina V-/IP-), las células en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-) y las células en apoptosis tardía y necróticas (Anexina V+/IP+). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo v10 (Rieger, Nelson, Konowalchuk & Barreda, 2011).

## Tinción Hematoxilina y Eosina

### Fijación

El tejido placentario se fijó en paraformaldehído 4% durante toda la noche en heladera (4°C). Al día siguiente, se realizaron 5 lavados rápidos y 3 lavados de 45 minutos cada uno con PBS, y se hicieron pasajes de 90 minutos en concentraciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%) para la deshidratación del tejido. Las placentas se dejaron en butanol hasta el momento de la inclusión en parafina.

### Inclusión en parafina

La parafina líquida filtrada se colocó en los moldes para tacos y se dejó en estufa a 60°C toda la noche. Al día siguiente se sumergió el tejido y se dejó en la estufa por 2-3 h para que se evapore el butanol y penetre la parafina. Se hizo un pasaje a parafina nueva y se dejó reposar 2-3 h más. Luego se sacaron los moldes de la estufa y se orientó el tejido. Se dejó solidificar en mesada a temperatura ambiente. Posteriormente se moldearon los tacos (se sacó el exceso de parafina y se les dió la forma adecuada) y se montó en casetes de inclusión para poder realizar los cortes en micrótopo.

### Cortes con micrótopo

Los cortes de 5 µm de espesor se realizaron con un micrótopo Leica (Buffalo Grove, IL, USA) y se colocaron en portaobjetos silanizados. Luego se secaron en estufa a 37°C por 15-20 min.

### Tinción Hematoxilina y Eosina

La tinción de hematoxilina y eosina se realizó con el protocolo de desparafinado, hidratación, tinción y deshidratación que se detalla en la tabla 6.

REACTIVO	TIEMPO
Xilol I	5 min
Xilol II	5 min
Etanol 100 I	5 min
Etanol 100 II	5 min
Etanol 96 I	5 min
Etanol 96 II	5 min
Hematoxilina	10 min
H <sub>2</sub> O corriente	Pasaje
Litio	3 min
H <sub>2</sub> O destilada	Pasaje
Eosina	30 s
Etanol 96 III	Pasaje
Etanol 96 IV	Pasaje
Etanol 100 III	Pasaje
Etanol 100 IV	Pasaje
Xilol III	Pasaje

**Tabla 6: Reactivos y tiempos para la tinción HyE.**

Luego de la tinción, se realizó el montaje con Bálsamo de Canadá. Los cortes se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse 200, NY, USA) a distintos aumentos.

### **Análisis estadístico**

Para todas las técnicas, la unidad experimental fue la madre. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (tratamiento) en un diseño completamente aleatorizado. Las comparaciones entre los grupos se efectuaron utilizando la prueba de Tukey. Se consideraron significativas aquellas pruebas con  $p < 0,05$ . Los datos fueron expresados como los valores medios  $\pm$  error estándar de la media (EE).

Antes de verificar los supuestos del modelo se recurrió al uso de herramientas gráficas para visualizar el efecto del tratamiento, su variabilidad y los posibles *outliers*.

Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se estudiaron analíticamente mediante la prueba de Shapiro-Wilks (modificado) y la prueba de Levene respectivamente. En caso de ser necesario, los datos que no cumplieron con los supuestos mencionados fueron transformados utilizando la transformación más acorde según el comportamiento de los datos.

Las incidencias de RCIU o mortalidad se analizaron efectuando un arreglo de los datos en tablas de contingencia t. Mediante el test de chi-cuadrado se analizó la hipótesis de independencia entre el tratamiento con dexametasona y la ocurrencia de RCIU o mortalidad fetal. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2018), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Córdoba, Argentina.

## RESULTADOS

---

Comenzamos evaluando la unidad fetoplacentaria en día 15 de gestación y los efectos del tratamiento con dexametasona. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que en los días 16 a 18 del período de gestación, los fetos y las placentas de madres tratadas con dexametasona tienen restricción del crecimiento (Arias, Tesis de grado 2017).

Luego de separar cada unidad fetoplacentaria tomamos registro del peso de cada feto en los animales tratados con solución salina (grupo control). El registro obtenido permitió calcular el percentil 10 para esa edad gestacional. Luego, a partir de los datos de ambos grupos experimentales calculamos el peso promedio del feto y de la placenta, la eficiencia placentaria y las tasas de RCIU. A su vez, registramos la cantidad de fetos muertos y/o reabsorbidos por cada madre en ambos grupos.

Cabe destacar que cuando evaluamos la unidad fetoplacentaria en día 15 de gestación lo hicimos unas pocas horas luego de la segunda administración de dexametasona (ver figura 9).

El percentil 10 para el día 15 de gestación fue de 0,250 g. Esto significa que aquellos fetos que tengan un peso por debajo de 0,250 g se consideran fetos con RCIU. El porcentaje promedio de fetos con RCIU por madre en los animales control fue del 20,55%. Es decir, en promedio un 20,55% de la camada tiene un peso por debajo del percentil 10, lo que se corresponde con la RCIU espontánea en esta cepa. Mientras que, el porcentaje promedio de RCIU en los animales tratados con dexametasona fue del 35,28% dentro de la camada. También se determinó el porcentaje de mortalidad, siendo ésta del 31,85% dentro de la camada en hembras controles y del 22,76% en las tratadas con dexametasona. A partir de estos valores, y evaluando la unidad fetoplacentaria en los animales control y en los tratados con dexametasona, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 7.

TRATAMIENTO	CONTROL	DEXAMETASONA
PESO DEL FETO (g)	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01
PESO DE LA PLACENTA (g)	0,100 ± 0,003	0,100 ± 0,002
EFICIENCIA PLACENTARIA (g/g)	3,30 ± 0,05	3,10 ± 0,01
RCIU (%)	9,09	33,33
CAMADA	9 ± 1	8 ± 1
MORTALIDAD (%)	33,33	16,66

**Tabla 7: Datos de la unidad fetoplacentaria en día 15 de gestación.** Los animales fueron

inyectados con solución salina (controles) o con dexametasona (8 mg/kg) en los días 14 y 15 de gestación. Los valores de peso del feto, peso de la placenta, la eficiencia placentaria (peso del feto/peso de la placenta) y el tamaño de la camada corresponden a la media ± EE por madre. La RCIU se indica como el porcentaje promedio de madres que tuvieron restricción del crecimiento. Se consideró que una madre presentó RCIU cuando más del 20,55% de los fetos de la camada presentaron pesos menores al percentilo 10. El porcentaje de mortalidad se calculó de igual manera que el de RCIU (considerando que la mortalidad espontánea promedio en esta cepa, en día 15 de gestación, es del 31,85% del total de la camada). Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y test *a posteriori* de Tukey. La incidencia de RCIU y de mortalidad en madres se analizó utilizando tablas de contingencia  $\chi^2$  y test de Chi-cuadrado.  $p < 0,05$ ,  $n = 6-25$  por grupo experimental.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, en el día 15, para ninguno de los parámetros evaluados.

### **Apoptosis**

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que en día 16 de gestación no sólo se observa restricción fetal sino también una disminución del peso placentario en las placentas de los fetos de madres tratadas con dexametasona (Arias, Tesis de grado 2017). Decidimos evaluar, entonces, si dicho cambio en el peso se podría atribuir a un aumento en las tasas

de muerte celular en el tejido. Para llevar a cabo este objetivo, evaluamos muerte celular por apoptosis, midiendo inicialmente los niveles proteicos y los niveles de ARNm de distintos marcadores apoptóticos y antiapoptóticos en placentas de fetos control y con RCIU, mediante la técnica Western Blot y RT-qPCR. Estos análisis se realizaron en placentas obtenidas de madres, tratadas con dexametasona o solución salina, en distintos días de gestación.

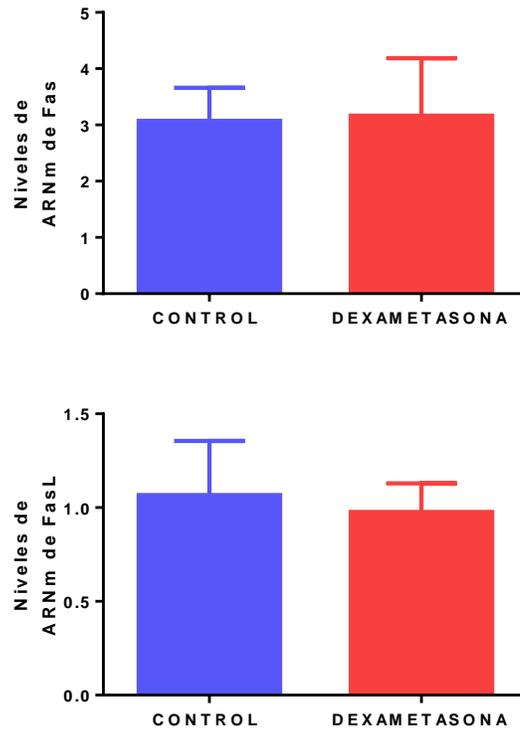
La apoptosis es un proceso que puede llevarse a cabo a través de dos vías principales de señalización. Una de ellas, desencadenada por receptores de muerte celular llamada vía extrínseca y la otra, la vía mitocondrial o intrínseca. Decidimos evaluar la expresión de mediadores involucrados en cada una de estas vías.

#### Marcadores de la vía extrínseca

##### - *Fas y Fas Ligando*

Fas es el receptor de muerte que induce la vía de señalización extrínseca, y su ligando es Fas L. La unión del ligando a su receptor da comienzo al proceso de apoptosis mediante el reclutamiento de proteínas adaptadoras, formando un complejo que activa una cascada de señalización intracelular que induce la muerte.

Se evaluaron los niveles de ARNm en el día 16 de gestación del receptor Fas y de su ligando, en placentas control y con RCIU, obteniendo los resultados observados en la figura 10.



**Figura10: Niveles de ARNm de Fas y Fas ligando en placentas de día 16 de gestación.** Los niveles de ARNm de Fas y FasL se determinaron en placentas de animales controles y en placentas de fetos con RCIU provenientes de hembras tratadas con dexametasona (8 mg/kg en los días 14 y 15 de gestación). Los valores se presentan como la media  $\pm$  EE. El gen de referencia utilizado fue HPRT. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba *a posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ .  $n = 14$ .

Los niveles de ARNm del receptor Fas y de su ligando en las placentas de día 16 de gestación, no presentaron diferencias significativas entre los grupos evaluados.

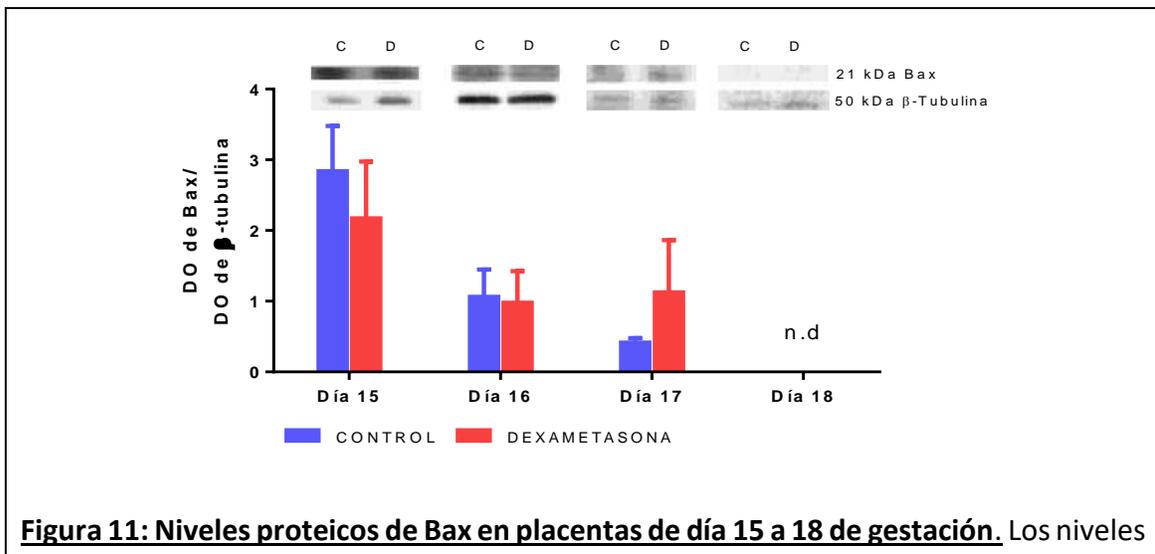
#### Marcadores de la vía intrínseca

La vía de señalización intrínseca se encuentra estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl2. Dentro del grupo se encuentra Bax, que es una proteína proapoptótica que induce la vía de señalización y da lugar a la cascada de reacciones que promueven la muerte celular. También está Bcl2, que es antiapoptótica e

inhibidora del proceso. Por lo que nos pareció importante evaluar el comportamiento de ambos tipos de proteínas, inductoras e inhibidoras de la muerte celular por apoptosis.

- Bax

Comenzamos midiendo los niveles de la proteína proapoptótica Bax en placentas, en los días de gestación 15, 16, 17 y 18. Las placentas se obtuvieron de animales tratados con dexametasona en los días 14 y 15 de gestación (con RCIU) y de animales control. El resultado obtenido se muestra en la figura 11.

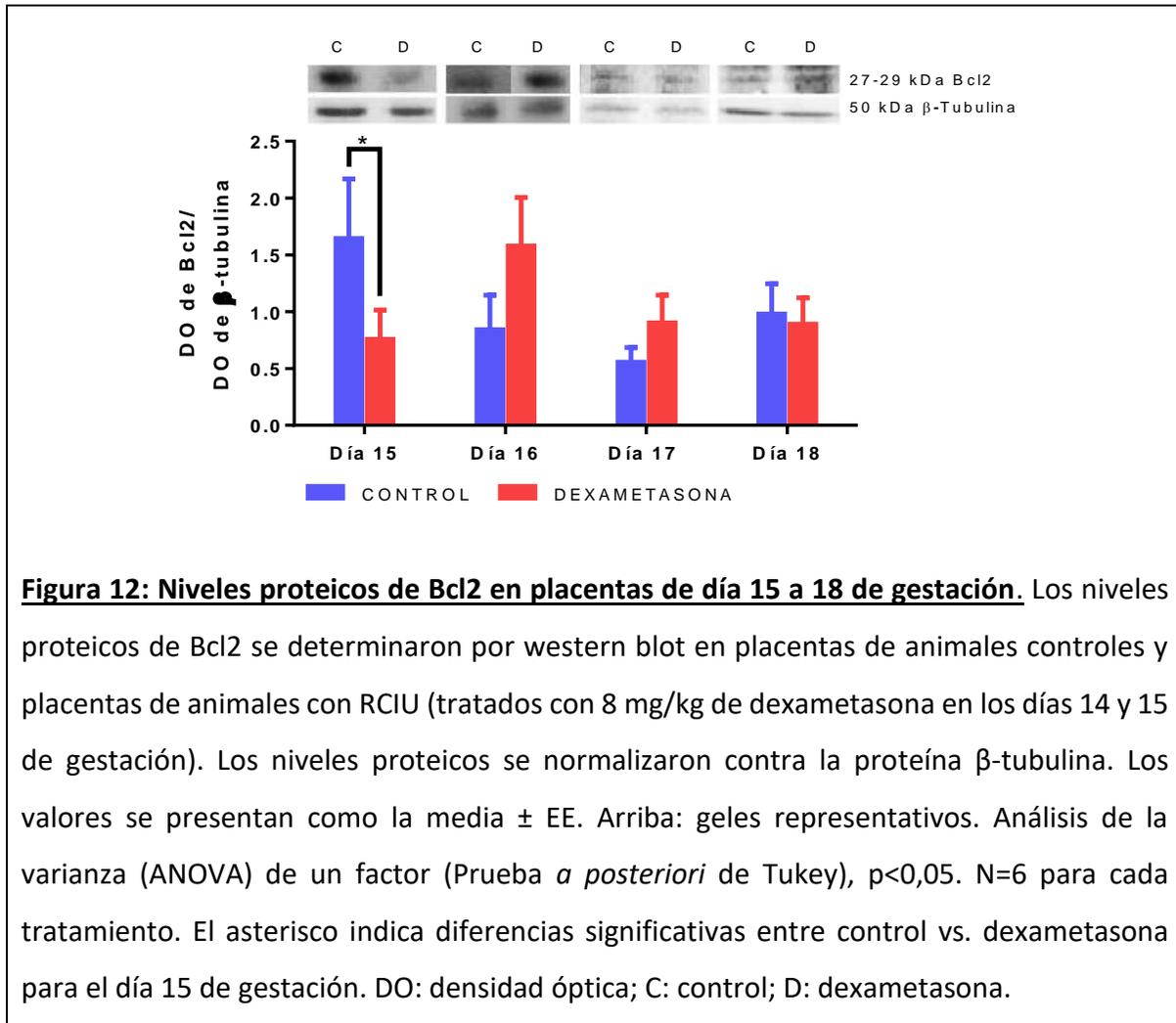


**Figura 11: Niveles proteicos de Bax en placentas de día 15 a 18 de gestación.** Los niveles proteicos de Bax se determinaron por western blot en placentas de animales controles y en placentas con RCIU (de animales tratados con 8 mg/kg de dexametasona en los días 15 y 15 de gestación). Los niveles proteicos se normalizaron contra la proteína β-tubulina. Los valores se presentan como la media ± EE. Arriba: geles representativos. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba *a posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ . N=6 para cada tratamiento. DO: densidad óptica; C: control; D: dexametasona; n.d: no detectable.

No hubo diferencias significativas en los niveles proteicos de Bax entre las placentas provenientes de fetos con RCIU y las controles en ninguno de los días evaluados. Además, en día 18 de gestación no se detectaron niveles proteicos de Bax.

- Bcl2

A su vez, evaluamos los niveles proteicos de la proteína inhibidora de la apoptosis Bcl2, obteniendo los siguientes resultados (figura 12):



**Figura 12: Niveles proteicos de Bcl2 en placentas de día 15 a 18 de gestación.** Los niveles proteicos de Bcl2 se determinaron por western blot en placentas de animales controles y placentas de animales con RCIU (tratados con 8 mg/kg de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación). Los niveles proteicos se normalizaron contra la proteína β-tubulina. Los valores se presentan como la media ± EE. Arriba: geles representativos. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba *a posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ .  $N=6$  para cada tratamiento. El asterisco indica diferencias significativas entre control vs. dexametasona para el día 15 de gestación. DO: densidad óptica; C: control; D: dexametasona.

Se observó una disminución significativa de los niveles proteicos de Bcl2 en día 15 de gestación en placentas de fetos con RCIU respecto a las placentas control.

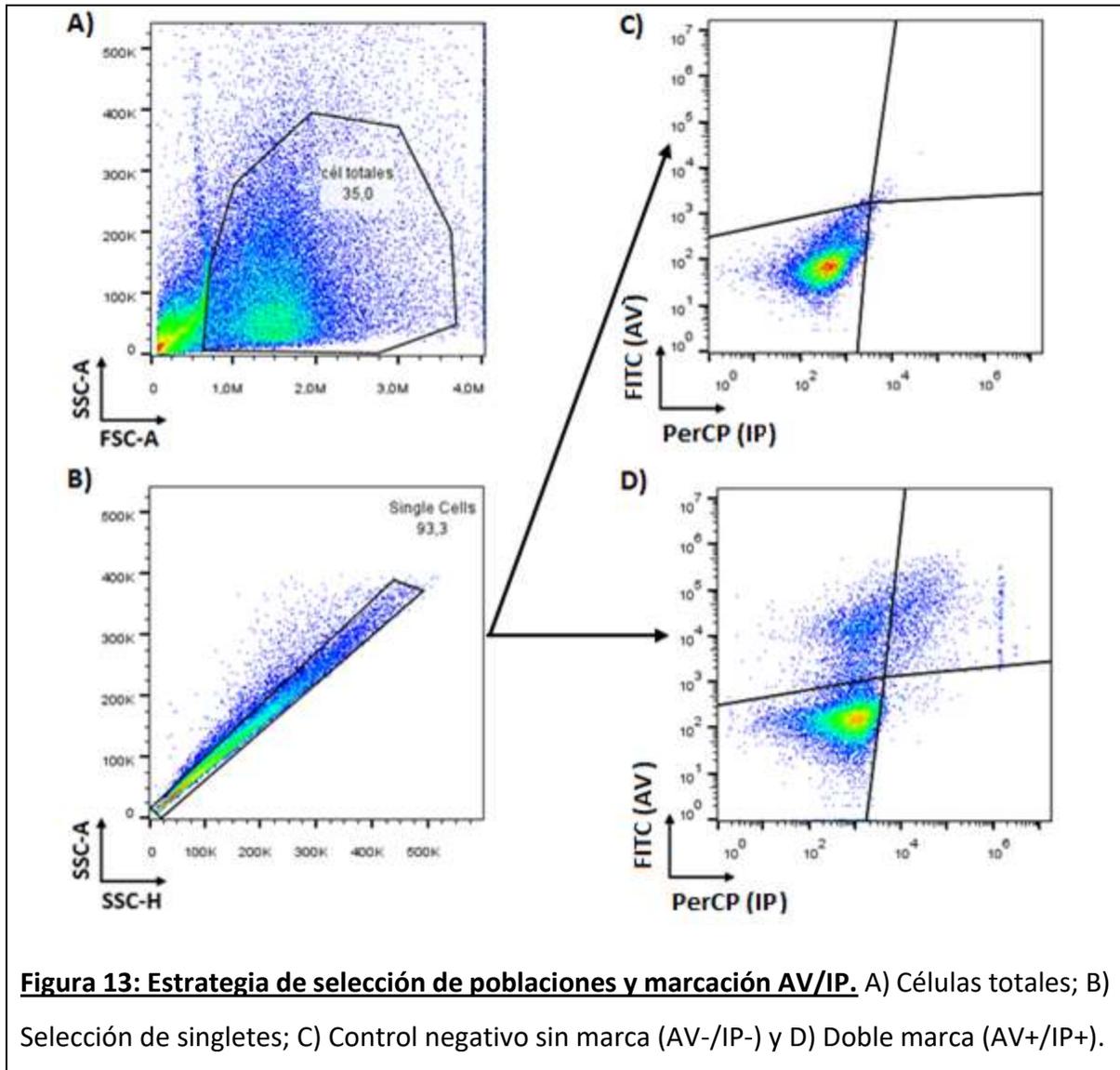
A continuación, decidimos complementar el estudio de la apoptosis realizando la marcación de Anexina V/Ioduro de propidio y analizándola por citometría de flujo.

Durante los primeros estadios de la apoptosis, ocurre la translocación de los residuos de fosfatidilserina (PS) desde la cara interna de la membrana plasmática hacia la superficie

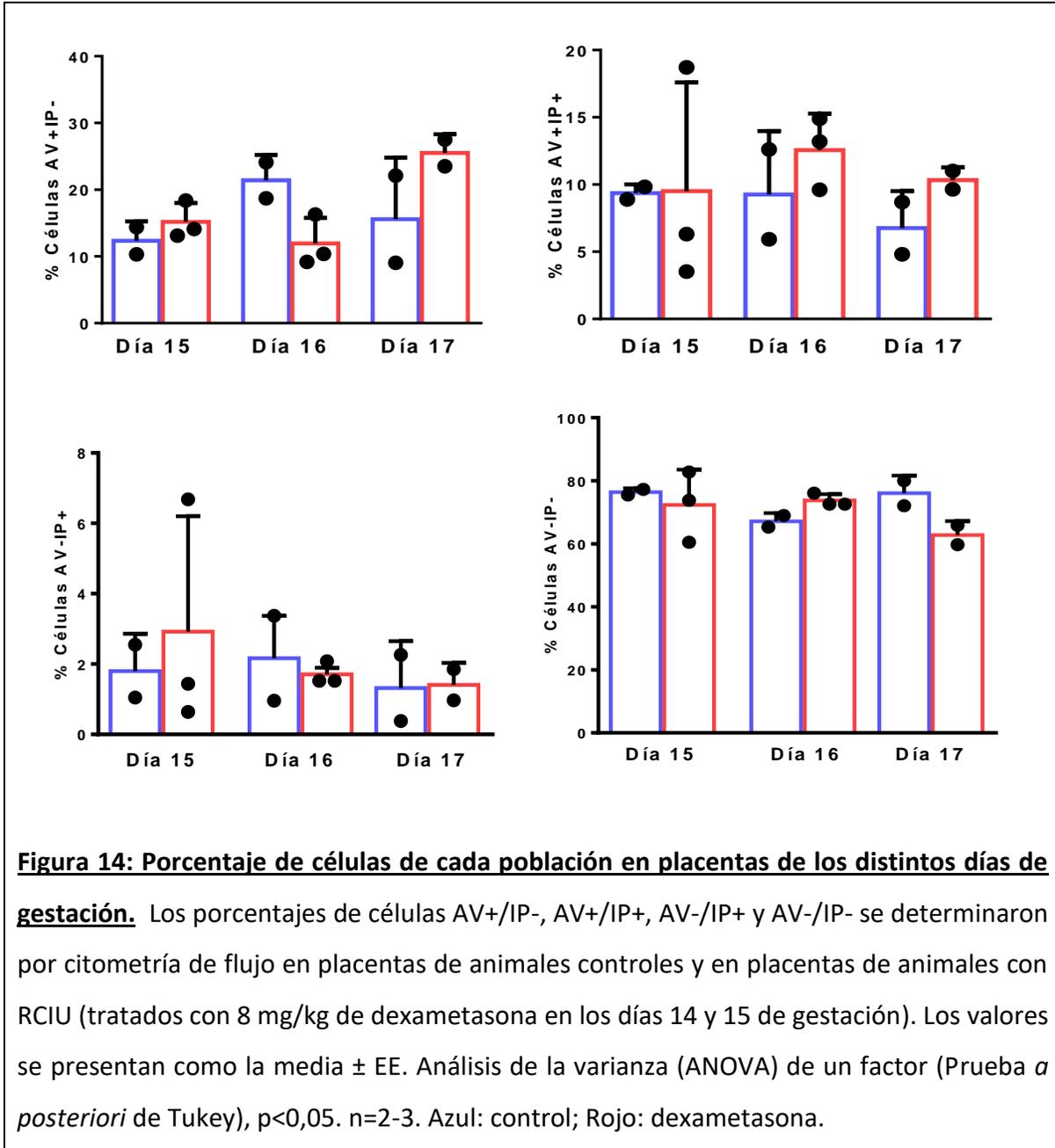
celular. La anexina V (AV) detecta los residuos de PS expuestos en la superficie celular cuando ocurre el proceso de apoptosis, permitiendo su detección en etapas tempranas.

Por otra parte, el Ioduro de propidio (IP) es un indicador de viabilidad celular ya que es un intercalante fluorescente del ADN. El ingreso de IP en la célula depende de la permeabilidad de la membrana. Las células vivas, o aquellas en apoptosis temprana no serán marcadas por el IP debido a la presencia de una membrana plasmática que aún se encuentra intacta. Cuando la célula se encuentra en una etapa tardía de apoptosis o en necrosis, la integridad de las membranas plasmática y nuclear disminuye, lo que permite su ingreso al interior celular.

Utilizando esta técnica nos propusimos identificar los procesos de apoptosis temprana, tardía y necrosis en los días 15, 16 y 17 de gestación, en placentas controles y con RCIU, según la marcación con AV y/o IP (ver figura 13).



Los resultados obtenidos por citometría de flujo se detallan en la figura 14 según los días de gestación evaluados y los tratamientos. Se muestran los porcentajes de células de cada una de las poblaciones analizadas: AV+/IP- (apoptosis temprana), AV+/IP+ (apoptosis tardía/necrosis), AV-/IP+ (necrosis), V-/IP- (células intactas) (ver figura 14).



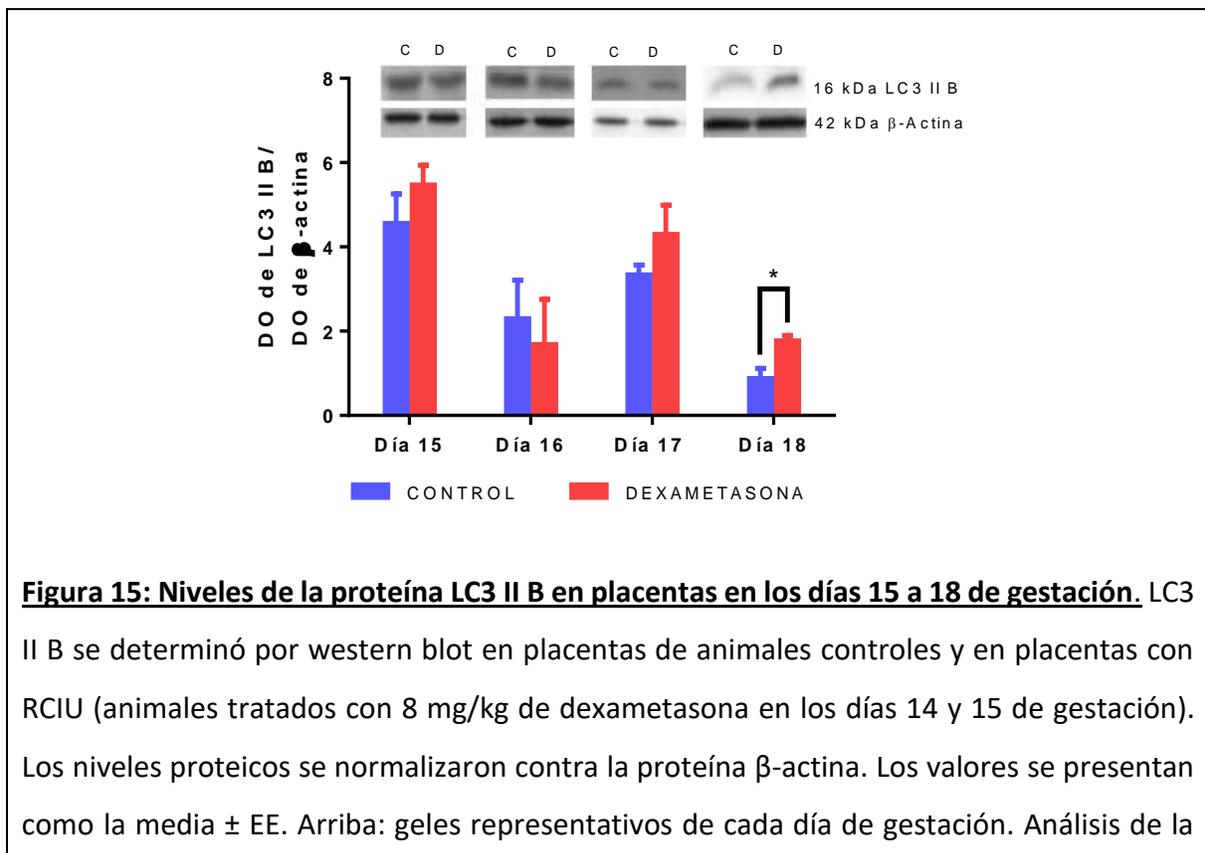
No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células de cada población en los días de gestación analizados entre las placentas control y las placentas RCIU.

## Autofagia

Continuando con la investigación, decidimos evaluar el proceso de autofagia en las placentas con RCIU. La autofagia es una vía de reciclaje celular que se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, que se encargan de endocitar material citoplasmático marcado para su degradación. Estas vesículas, se fusionan con lisosomas generando autofagolisosomas que se encargan de la degradación del contenido intracelular. Para llevar a cabo este proceso se requiere de la actividad de muchas proteínas que median las diferentes etapas.

### - LC3 II B

Evaluamos los niveles proteicos de LC3 II B en placentas entre los días 15 a 18 de gestación. LC3 II B es el componente conjugado de la proteína LC3 I, que se acopla a las membranas de los autofagosomas durante el proceso de autofagia. Es un marcador de autofagosomas y de activación de la autofagia. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.

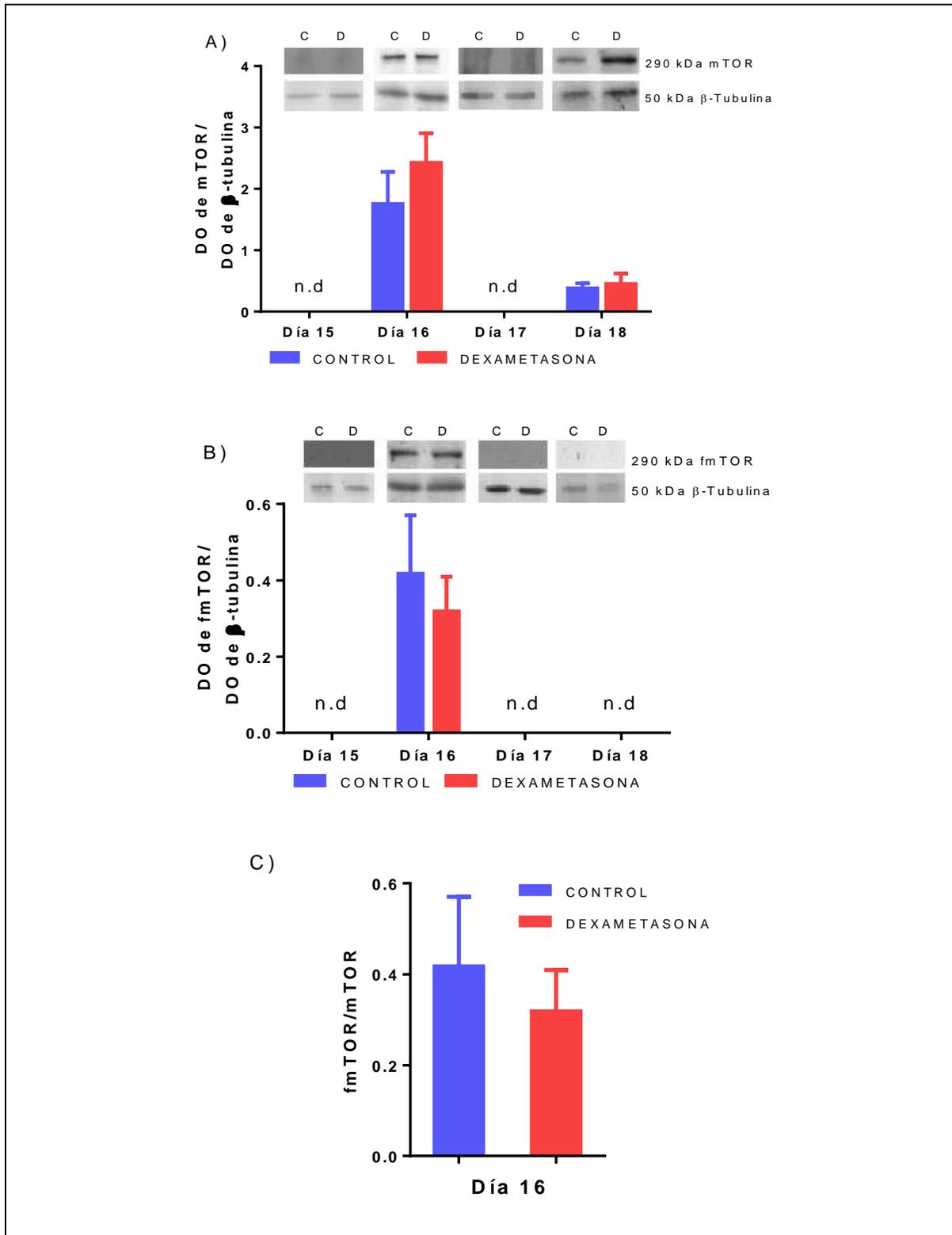


varianza (ANOVA) de un factor (Prueba a *posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ . N=6 para cada tratamiento. El asterisco indica diferencias significativas entre el control vs. Dexametasona en el día 18 de gestación. DO: densidad óptica; C: control; D: dexametasona.

Se observó un aumento significativo de los niveles proteicos de LC3 II B en las placentas de fetos con RCIU respecto a las placentas control en día 18 de gestación.

- *mTOR y fosfoTOR*

Estudiamos los niveles de la proteína mTOR debido a que es un importante inhibidor del proceso de autofagia. Este cumple un rol fundamental censando la falta de nutrientes, la hipoxia y el desbalance metabólico, siendo la isoforma fosforilada de mTOR la isoforma activa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16.



**Figura 16: Niveles de mTOR y fmTOR en placentas de los días 15 a 18 de gestación.** Las proteínas mTOR y fmTOR fueron evaluadas mediante western blot. Los niveles proteicos tanto en las placentas control como en las placentas con RCIU (animales tratados con 8 mg/kg de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación) fueron normalizadas a la expresión de la proteína  $\beta$ -tubulina. Geles representativos por encima de cada gráfico. A) **mTOR**, B) **fmTOR** y C) Relación **fmTOR/mTOR** en día 16 de gestación. Los valores se presentan como la media  $\pm$  EE. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba *a posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ . N=6 para cada tratamiento. DO: densidad óptica; C: control; D: dexametasona; n.d: no detectable.

No hay diferencias significativas entre los grupos evaluados (placentas control y con RCIU) ni para mTOR ni para su isoforma fosforilada. No se detectó mTOR en día 15 ni en día 17 de gestación. **FmTOR** solo se observó en día 16 de gestación. Tampoco observamos diferencias en la relación fmTOR/mTOR en el día 16 de gestación.

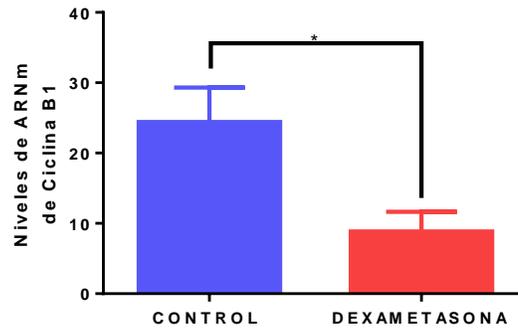
### **Proliferación celular**

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y la división celular. Este proceso se encuentra dividido en diferentes etapas, las cuales están finamente reguladas y controladas por proteínas específicas.

#### **Ciclinas**

##### - **Ciclina B1**

La ciclina B1 participa al inicio de ciclo celular y se asocia a otras proteínas formando un complejo que funciona como una quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1). Este complejo está involucrado en los primeros eventos de la mitosis, como la condensación de los cromosomas, la ruptura de la envoltura nuclear y el ensamblaje del huso polar. En este trabajo evaluamos los niveles de ARNm de la ciclina B1 en placentas de animales tratados con dexametasona y de animales control en día 16 de gestación. Los resultados se observan en la figura 17.



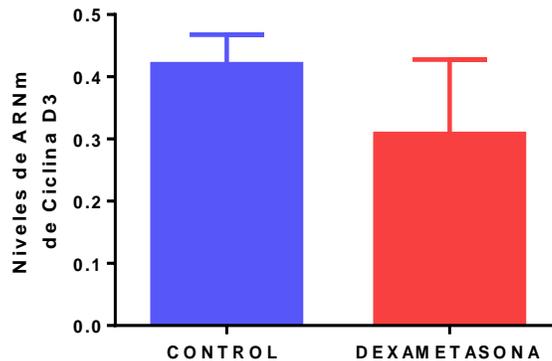
**Figura 17: Niveles de ARNm de la Ciclina B1 en placentas de día 16 de gestación.** Los niveles

de ARNm de la ciclina B1 se determinaron por RT-qPCR en placentas de animales controles y en placentas con RCIU (animales tratados con 8 mg/kg de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación). Los valores se presentan como la media  $\pm$  EE. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba a *posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ .  $N=4$  para cada tratamiento. El gen de referencia utilizado fue HPRT. El asterisco indica diferencias significativas entre grupos.

Se observaron diferencias significativas en los niveles de ARN mensajero de la Ciclina B1 en placentas de día 16 de gestación. Hay una disminución del ARNm en las placentas de fetos provenientes de madres tratadas con dexametasona respecto de las placentas control.

- Ciclina D3

La actividad de la ciclina D3 es necesaria para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular por lo que nos pareció interesante evaluar la expresión de esta ciclina en placentas de fetos con RCIU. Los resultados obtenidos sobre los niveles de ARNm de la ciclina D3 en placentas día 16 de gestación se pueden observar en la figura 18.

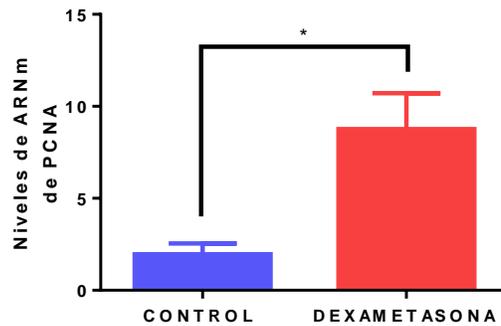


**Figura18: Niveles de ARNm de la Ciclina D3 en placentas de día 16 de gestación.** Los niveles de ARNm de la ciclina D3 se determinaron por RT-qPCR en placentas de animales controles y en placentas con RCIU (8 mg/kg de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación). Los valores se presentan como la media  $\pm$  EE. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba a *posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ . N=4. El gen de referencia utilizado fue HPRT.

No se observan diferencias significativas entre los grupos evaluados.

- Antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)

PCNA (del inglés *Proliferating cell nuclear antigen*) es una proteína que se sintetiza en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de ADN. Además, participa en la vía de reparación de los ácidos nucleicos, por lo que también se la considera una proteína antiapoptótica. En día 16 de gestación evaluamos los niveles de ARNm de PCNA por RT-qPCR, tanto en placentas control como en las placentas de fetos con RCIU. En la figura 19 se observan los resultados obtenidos.



**Figura19: Niveles de ARNm de PCNA en placentas de día 16 de gestación.** Los niveles de ARNm de PCNA se determinaron por RT-qPCR en placentas de animales controles y en placentas con RCIU (animales tratados con 8 mg/kg de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación). Los valores se presentan como la media ± EE. Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Prueba a *posteriori* de Tukey),  $p < 0,05$ .  $N=4$ . El gen de referencia utilizado fue HPRT. El asterisco indica diferencias significativas entre grupos.

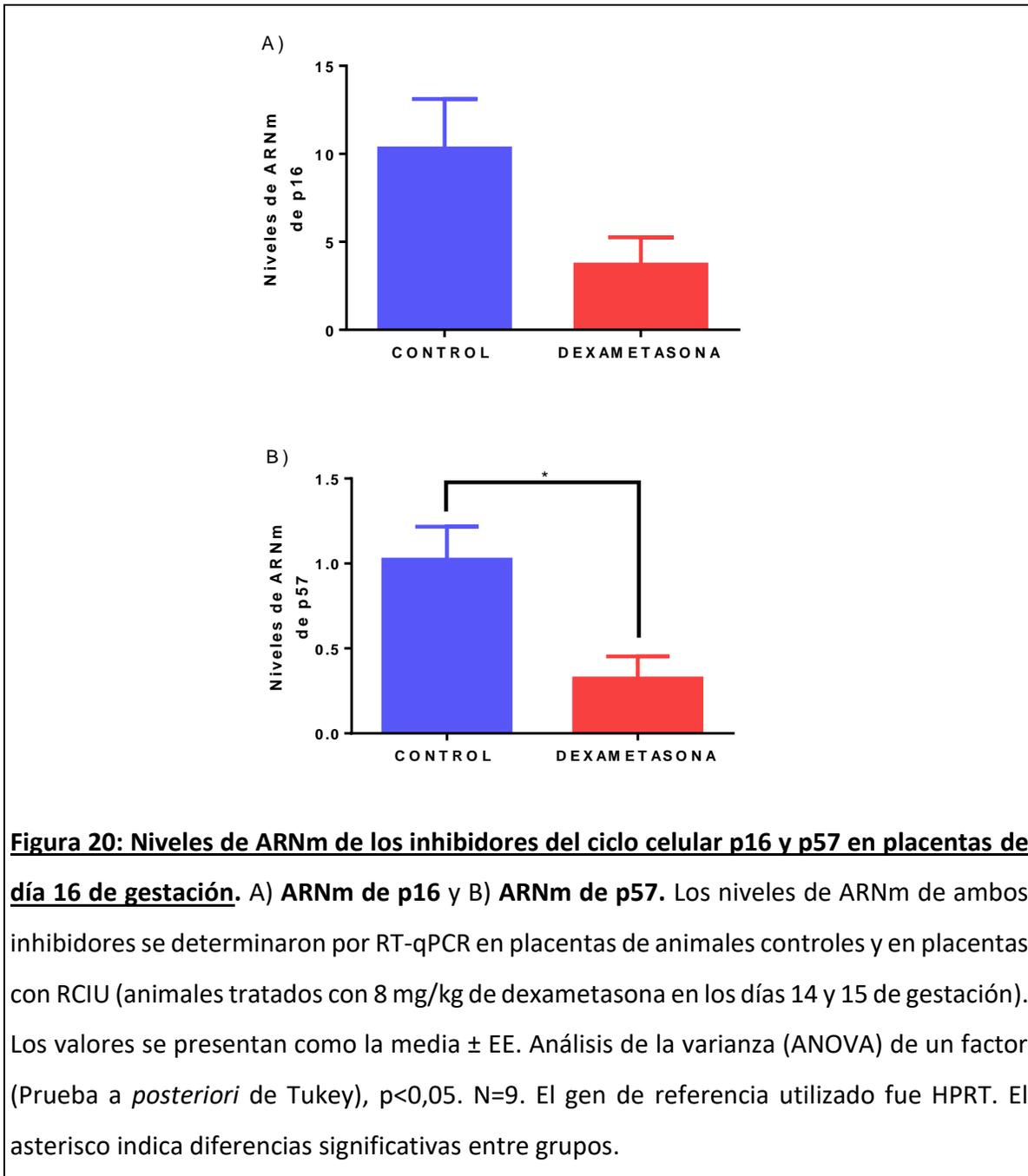
Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de ARNm de PCNA en las placentas de animales tratados con dexametasona en comparación con las placentas de los animales control.

#### Inhibidores del ciclo celular

Así como estudiamos los niveles de ARNm de proteínas que promueven la proliferación celular, como las ciclinas y PCNA, también decidimos evaluar inhibidores del ciclo celular.

##### - p16 y p57

Las proteínas p16 y p57 actúan inhibiendo la proliferación. P16 pertenece a la familia de inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 4 (INK4), bloqueando su actividad fosforilasa. P57 pertenece a la familia CIP (proteínas inhibidoras de ciclinas dependientes de quinasas), e inhibe la proliferación bloqueando la acción de las ciclinas A, B y E. Los resultados obtenidos a partir de la técnica de RT-qPCR mediante la cual evaluamos los niveles de ARNm de ambos inhibidores se pueden observar en la figura 20.



Los niveles de ARNm de p16 no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados (figura 20 A). Sin embargo, sí se registró una disminución significativa en los niveles de ARNm de p57 en las placentas de los fetos con RCIU respecto al grupo control (figura 20 B).

## **Técnicas a partir de las cuales no obtuvimos resultados**

### **Electroforesis de ADN o DNA Ladder**

Uno de los procesos asociados con la apoptosis es la degradación del ADN de forma específica. Las endonucleasas cortan el ADN a nivel internucleosomal generando fragmentos discretos del tamaño de (o múltiplos de) un nucleosoma. En una corrida electroforética del ADN de células en apoptosis, es posible observar la aparición de un patrón característico en escalera o también llamado *ladder*.

Decidimos complementar el estudio de la apoptosis placentaria en tejido de día 15, 16, 17 y 18 de gestación, realizando la extracción del ADN y su separación electroforética en geles de agarosa. Pusimos a punto varios protocolos tomados de bibliografía (Pascuali y col. 2015; Szpilbarg y col. 2016; Toro y col. 2014). También ensayamos tanto con tejido congelado como con tejido fresco. En ningún caso observamos el patrón en escalera típico que pone en evidencia el proceso de apoptosis tardía. Si observamos el patrón asociado a degradación inespecífica del ADN.

### **Tinción Hematoxilina y Eosina**

Con el objetivo de estudiar la histoarquitectura placentaria y los posibles efectos del tratamiento con dexametasona, decidimos realizar la técnica completa de fijación, inclusión, corte y tinción con HyE.

Comenzamos con la fijación del tejido placentario para posteriormente realizar la inclusión en parafina. Se armaron cada uno de los tacos y se montaron en casetes de inclusión para luego realizar los cortes en el micrótopo. Finalmente, se realizó la tinción hematoxilina y eosina, la cual cumplió con el protocolo de desparafinado, hidratación, tinción y deshidratación que se detalla en materiales y métodos. Los cortes se montaron y se observaron al microscopio óptico.

Licenciatura en Genética

Tesis de grado: "Disfunción placentaria asociada a la restricción del crecimiento fetal inducido por glucocorticoides. Estudio de las alteraciones en la proliferación y muerte celular del tejido placentario"

Tesista: Anaclara Marino

No logramos obtener cortes histológicos en los que se pudiera observar la histoarquitectura del tejido preservada debido a fallas en alguno de los pasos de la técnica.

## DISCUSIÓN

---

La restricción del crecimiento intrauterino se define como la incapacidad del feto para alcanzar su potencial de crecimiento establecido genéticamente y se manifiesta con un bajo peso y/o talla al nacer. Se consideran con RCIU a los nacidos a término con un peso menor a 2500 g o, según la edad gestacional, a los nacidos con un peso/longitud corporal menor al percentil 10. La RCIU es la segunda causa más frecuente de morbimortalidad perinatal, con una prevalencia del número de nacidos vivos con RCIU en Argentina del 7,3% (Pasqualini, 2009).

Se ha observado que el exceso de glucocorticoides prenatales puede alterar el crecimiento fetal y de esta manera inducir RCIU (Ødegård, 2000; Cuffe y col., 2012; Maulik, 2006). Niveles elevados de glucocorticoides circulantes durante el embarazo se producen frente a estrés prenatal. Por otro lado, la terapia obstétrica ante la amenaza de parto prematuro, o frente a enfermedades autoinmunes e inflamatorias maternas requieren tratamiento con glucocorticoides sintéticos. En ambos casos el feto se expone a niveles elevados de GC que pueden provocar RCIU (Kay, Bird, Coe & Dudley, 2000; Murphy y col., 2002).

La placenta conecta la madre con el feto, permitiendo el intercambio de gases, nutrientes y residuos (Malassiné y col., 2003). Como se mencionó en la introducción, los cambios en el patrón de crecimiento fetal se asocian a alteraciones en la estructura y funcionalidad de la placenta que pueden llevar, entre otras cosas, a una disminución del intercambio materno-fetal (Vedmedovska y col., 2011).

Una buena estrategia para el estudio de la RCIU, es contar con modelos animales de esta patología. Para realizar este trabajo de tesis se utilizó un modelo murino de restricción del crecimiento intrauterino por sobreexposición a glucocorticoides previamente desarrollado en nuestro laboratorio. Este modelo consiste en la administración de 8 mg/kg/día (s.c.) de dexametasona en los días 14 y 15 de gestación, simulando los efectos del exceso de glucocorticoides sobre el crecimiento fetal.

Previamente en el laboratorio se estudió la unidad fetoplacentaria durante los días 16, 17 y 18 de gestación (Arias, Tesis de grado 2017). Se encontró que las madres tratadas con dexametasona tienen restricción del crecimiento fetal, con una disminución significativa del peso promedio del feto y de la placenta. En este trabajo, evaluamos en primer lugar la unidad fetoplacentaria en día 15 de gestación, debido a que nuestro objetivo era estudiar los mecanismos de apoptosis, autofagia y proliferación celular asociados a la reducción del tamaño de la placenta observado en los fetos con RCIU. Como la disminución del peso placentario se había observado a partir del día 16 de gestación, decidimos estudiar primero la unidad fetoplacentaria en día 15 para ver si había efectos inmediatos de la dexametasona sobre el peso fetal y placentario. Por otro lado, además de los cambios macroscópicos que podía producir la dexametasona nos parecía conveniente evaluar cambios en los procesos de apoptosis, autofagia y proliferación el día previo a la reducción del tamaño placentario. Al momento de analizar los resultados de día 15, debemos tener en cuenta que, en el modelo de RCIU utilizado en este trabajo, en el día 15 se administra la segunda y última dosis del glucocorticoide sintético. Es decir, inyectamos dexametasona unas pocas horas antes de extraer y evaluar la unidad fetoplacentaria.

No se observaron cambios en el peso promedio del feto, en el peso de la placenta ni en la eficiencia placentaria en día 15 de gestación. Tampoco observamos diferencias en las tasas de RCIU ni de mortalidad entre las hembras control y las tratadas con dexametasona. Estos resultados sugieren que la dexametasona no tiene efectos inmediatos sobre el tamaño de la placenta ni sobre el crecimiento fetal. Esto podría explicarse debido a la proximidad de la última dosis del glucocorticoide que se inyecta el mismo día del análisis. Sin embargo, no podemos descartar que las placentas ya estén sufriendo cambios moleculares que lleven a que en día 16 se observe una diferencia de peso entre las placentas control y con RCIU.

La disminución en el peso de la placenta y del feto, y el aumento de la restricción del crecimiento en los días 16, 17 y 18, nos llevó a plantear una hipótesis de trabajo en la cual sugerimos que mecanismos como la apoptosis, la autofagia y la proliferación celular podrían estar alterados en las placentas de fetos con RCIU. Esto provocaría la disminución del peso

placentario, lo que llevaría a un órgano disfuncional que promueve la restricción del crecimiento fetal y el aumento en las tasas de RCIU en los animales tratados con dexametasona.

Nuestra hipótesis propone en primer lugar, que la apoptosis podría ser uno de los mecanismos que participa en el control del tamaño de la placenta en la RCIU. En bibliografía hay evidencia tanto en humanos, como en modelos animales de RCIU que indican un aumento en los niveles de apoptosis placentaria (Ain, Canham & Soares, 2005; Baisden y col., 2007; Endo y col., 2005; Erel y col., 2001; Waddell, Canham & Soares, 2000). Previamente en nuestro modelo, estudiamos los niveles proteicos de caspasa 3 clivada (caspasa efectora) y de PARP total y clivado (proteína *target* de caspasa 3) en placentas de día 18 de gestación, sin encontrar diferencias entre tratamientos (Arias, Tesis de grado 2017). Estos resultados en día 18 nos hacen pensar que como la reducción del peso placentario se observa a partir del día 16, es posible que el aumento en la apoptosis se produzca en la placenta, en días de gestación más tempranos. Para estudiar la apoptosis en este tejido, decidimos evaluar los niveles proteicos y los niveles de ARNm de distintos marcadores proapoptóticos y antiapoptóticos en placentas de fetos control y con RCIU en los días 15, 16, 17 y 18 de gestación. En primer lugar, evaluamos marcadores de la vía extrínseca directamente en placentas de día 16 de gestación.

Evaluamos Fas (receptor de muerte) y Fas ligando, debido a que cumplen un rol fundamental en la inducción de la apoptosis, expresándose durante la gestación en placentas normales (Kawamura y col., 2001). Cuando se produce la unión del ligando a su receptor se inicia el reclutamiento de proteínas adaptadoras que forman un complejo que activa la muerte celular. Decidimos evaluar la vía extrínseca debido a que otros trabajos muestran que el aumento de la apoptosis placentaria podría estar mediado por la vía de señalización de Fas en placentas humanas y de rata con RCIU (Belkacemi, Chen, Ross, & Desai, 2009; Rešić Karara, Zekić Tomas, Marušić, Roje & Kuzmić Prusac, 2016). En nuestro trabajo observamos la presencia del ARNm de ambos marcadores, Fas y FasL, tanto en las placentas de fetos con RCIU como en las placentas control, lo que sugiere que hay apoptosis

placentaria en ambas condiciones. A diferencia de lo reportado en los trabajos mencionados previamente, nosotros no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm del receptor Fas ni de su ligando entre los grupos evaluados. Es posible que esta diferencia se deba a que en dichos trabajos evaluaron los niveles proteicos de Fas y FasL por inmunohistoquímica en placenta humana a término (con RCIU), y en placentas de rata en un modelo de RCIU distinto, de restricción alimentaria durante la gestación. Nosotros estudiamos sólo los niveles de ARNm en placenta de ratón de día 16 de gestación. Otro estudio en un modelo de RCIU por administración de glucocorticoides muestra reducción del peso placentario, modificaciones en los niveles de proteínas del ciclo celular y aumento en los niveles de apoptosis (Braun y col., 2015). En un modelo similar en ratón (Baisden y col., 2007) y en dos modelos desarrollados en rata (Ain y col., 2005; Waddell y col., 2000) encuentran mayores niveles de apoptosis puntualmente en células del trofoblasto.

Decidimos continuar evaluando el proceso de apoptosis placentaria estudiando marcadores de la vía intrínseca, regulada por la familia Bcl2. En placentas de embarazos con RCIU, algunos investigadores muestran una reducción de la actividad antiapoptótica de Bcl2 asociada a menores niveles proteicos. Estos trabajos se realizaron en tejido placentario humano, y el diagnóstico de RCIU se basó en la definición estándar de peso al nacer por debajo del percentil 10 para la edad gestacional (Börzsönyi y col., 2013; Barrio y col., 2004). Otros plantean que el desequilibrio de la apoptosis en las placentas humanas con RCIU se explica por una sobreexpresión del gen Bax, observándose un aumento significativo de las tasas de apoptosis en estas placentas (Agata y col., 2009; Heazell y col., 2011).

En este trabajo realizamos un análisis en el tiempo durante los últimos 4 días de gestación con el objetivo de evaluar si ocurre y cuándo ocurre la muerte celular por apoptosis en las placentas con RCIU. Incluso, teniendo en cuenta un posible efecto rápido de la dexametasona, también evaluamos los niveles de proteínas de la vía intrínseca el último día de tratamiento, el día 15 de gestación.

Comenzamos con la proteína proapoptótica Bax, que promueve la liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol induciendo la activación de caspasas iniciadoras del proceso de apoptosis. En contraste con los estudios mencionados anteriormente (Agata y col., 2009; Heazell y col., 2011), nosotros no obtuvimos diferencias significativas en los niveles proteicos de Bax entre las placentas control y con RCIU en ninguno de los días evaluados. Además, observamos que no había niveles proteicos detectables de Bax en las placentas de día 18 de gestación. Del mismo modo, evaluamos la proteína antiapoptótica Bcl2 durante los días 15 a 18 de gestación, y encontramos una disminución significativa de los niveles proteicos en el día 15 de gestación en placentas de fetos con RCIU respecto a las placentas control. Estos hallazgos concuerdan con los de Barrio (2004) y Börzsönyi (2013) en placentas humanas (Börzsönyi y col., 2013; Barrio y col., 2004) y sugieren que la dexametasona, mediada por una reducción en los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl2, podría inducir apoptosis en las placentas con RCIU de día 15 de gestación. En referencia a esto, Börzsönyi (2013) sostiene que el aumento de la actividad apoptótica observada en las placentas con RCIU se produce por una menor expresión de Bcl2, una reducción de la actividad antiapoptótica vía Bcl2 y no por un aumento de Bax (Börzsönyi y col., 2013).

Por otro lado, quisimos complementar el estudio de la apoptosis realizando una marcación con Anexina V/Ioduro de propidio por citometría de flujo. Esta técnica se basa en alteraciones propias de la membrana celular que ocurren durante la apoptosis. La fosfatidilserina presente en la membrana se exterioriza cuando las células entran en apoptosis y la anexina (conjugada a un fluoróforo), que tiene alta afinidad por la fosfatidilserina, se une a ella y marca las células en apoptosis temprana. Por otro lado, el ioduro el propidio es un indicador de viabilidad celular debido a que es un intercalante fluorescente del ADN. Utilizamos esta técnica para detectar células en apoptosis en los días 15, 16 y 17 de gestación en las placentas de fetos control y con RCIU, y también para evaluar los procesos de apoptosis placentaria temprana, tardía y necrosis. Si bien en nuestro trabajo no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células de cada población

en las placentas control y con RCIU, en los días de gestación estudiados, es posible que esto se deba a que utilizamos un tamaño muestral pequeño (2 o 3 madres por día y por tratamiento). Es nuestra intención a futuro aumentar el número de placentas analizadas para poder corroborar que este resultado no se deba principalmente a una falta de robustez estadística. De hecho, en otros trabajos en los cuales estudiaron mediante la técnica de citometría de flujo o TUNEL (del Inglés, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) la apoptosis en este tejido, encontraron un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en las placentas con RCIU (Erel y col., 2001; Heazell y col., 2011; Smith y col., 1997).

Por otro lado, debemos tener en cuenta que nosotros únicamente analizamos factores relacionados a las vías intrínseca y extrínseca, las cuales se encuentran asociados a la vía apoptótica dependiente de caspasas. Sin embargo, el proceso de apoptosis en estas placentas podría ocurrir mediante una vía de señalización independiente de caspasas. En este sentido, otros trabajos indican que la apoptosis se inicia mediante esta vía tanto en placentas normales como en condiciones patológicas como la ruptura prematura de membranas (Riddell y col., 2012; Negara y col., 2018). Monson y col. (2017), evaluaron en un modelo de RCIU en ovejas la expresión del factor inductor de apoptosis (AIF), que es una proteína involucrada en el mecanismo de apoptosis independiente de caspasas. Observaron un aumento de los niveles proteicos de AIF en placentas con RCIU durante la gestación temprana (Monson, Wright, Galan, Reynolds & Arroyo, 2017). Sería interesante complementar el estudio de la apoptosis en las placentas con RCIU en nuestro modelo analizando también factores de la vía independiente de caspasas. Asimismo pensamos que la muerte celular podría ocurrir no solo por apoptosis, sino también por necrosis como se describe en el trabajo de Unek (2014), en el cual encontraron áreas necróticas en la decidua en placentas con RCIU (Unek y col., 2014). También se ha propuesto que la muerte celular placentaria puede ocurrir por senescencia, dado que se ha detectado aumento de este proceso en placentas con RCIU (Monson *et al.*, 2017; Sultana, Maiti, Dedman & Smith, 2018). En coincidencia con esto, Biron-Shental y col. (2014), en un estudio en placentas

humanas de embarazos con RCIU, detecta mayores focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF, del inglés *senescence-associated heterochromatin foci*) y menores niveles de ARNm de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT, del inglés *telomerase reverse transcriptase*) (Biron-Shental, y col., 2014).

En particular, respecto a la apoptosis placentaria, varios trabajos han observado un aumento de este tipo de muerte celular en regiones específicas de la placenta como en la zona del laberinto o la zona basal (Alqaryyan, Kilarkaje, Mouihate & Al-bader, 2016; Waddell y col., 2000). Creemos que, como en nuestro trabajo evaluamos por western blot o PCR la placenta entera, es probable que puedan existir cambios en estos mediadores que no son detectables. Esto podría deberse a que el proceso de apoptosis esté confinado a alguna zona o tipo celular específico y no a la totalidad del tejido placentario.

Finalmente intentamos también evaluar muerte celular programada por la técnica de *DNA ladder*, en placentas de día 15, 16, 17 y 18 de gestación de hembras tratadas con dexametasona y controles. Probamos diferentes protocolos y ensayamos con tejido congelado y fresco, sin tener éxito en el desarrollo de la técnica. Lo que observamos en cada caso fue el patrón asociado a degradación inespecífica del ADN.

Continuando con los objetivos del trabajo nos propusimos evaluar si la disminución del peso de las placentas con RCIU estaba mediada por un aumento de la autofagia en el tejido. Este proceso consiste en una vía de reciclaje celular que se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas que endocitan el material citoplasmático marcado para su degradación. La proteína LC3 II se utiliza habitualmente como marcador de autofagia (Mizushima, 2004). Curtis y col. (2013), al igual que Hung y col. (2012), demostraron que existe un aumento significativo de la proteína LC3 II y un aumento en las tasas de autofagia placentaria en estudios realizados en embarazos con RCIU (Curtis y col., 2013; Hung y col., 2012). En concordancia con estos resultados, en este trabajo se observó que las placentas de fetos con RCIU presentan un aumento significativo de la proteína LC3 II en el día 18 de gestación, en comparación con las placentas control. Este resultado sugiere que la exposición a GC tiene un efecto prolongado en el tiempo,

induciendo un aumento de la autofagia en las placentas a término. El aumento en las tasas de autofagia podría estar relacionado a la muerte celular en estas placentas, como parte del mecanismo que subyace la fisiopatología placentaria de la RCIU (Gong & Kim, 2014).

Otro factor asociado a la regulación de la autofagia es mTOR, que funciona como un regulador central del metabolismo celular, el crecimiento y la supervivencia en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes y energía. Específicamente en la placenta, mTOR responde a una gran cantidad de señales relacionadas con el crecimiento, incluidas la disponibilidad de aminoácidos, glucosa, oxígeno, ácido fólico y factores de crecimiento, regulando el transporte de nutrientes y la síntesis de proteínas, que influyen directamente sobre el crecimiento fetal (Gupta & Jansson, 2019). En un trabajo previo en placentas humanas, se detectó una reducción de la actividad placentaria de mTOR en embarazos con RCIU (Roos y col., 2007). También, mTOR disminuye en placentas con RCIU en un modelo en ovejas (Arroyo, Brown & Galan 2009). Además, como mencionamos en la introducción, mTOR inhibe la autofagia por fosforilación de ULK (activador del proceso) (Kim y col., 2011). En este trabajo evaluamos en las placentas con RCIU los niveles de la proteína mTOR y su forma fosforilada fmTOR, siendo esta última su isoforma activa. No observamos diferencias significativas en ninguno de los casos. En la mayoría de los días evaluados tanto mTOR como fmTOR no fueron detectados en placentas controles, ni en aquellas provenientes de fetos con RCIU. Sólo pudimos estudiar la relación fmTOR/mTOR en placentas día 16 de gestación y no obtuvimos diferencias significativas entre tratamientos.

Otro evento que se ha visto asociado a la disfunción placentaria en la RCIU es la desregulación del ciclo celular. De hecho, en un estudio en ovejas durante la gestación tardía, se detectó que hay una disminución de la proliferación celular en placentas de fetos con RCIU, y que esto afecta el crecimiento fetal (Greenwood y col., 1999). La placenta durante la gestación presenta una capacidad dinámica de autorenovación mediante un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (De Falco y col., 2001). Considerando que la disminución en el peso placentario podría deberse no sólo a un aumento en las tasas de apoptosis y autofagia sino también a un descenso en la proliferación celular (Habli, Jones,

Aronow, Omar & Crombleholme, 2013), nos pareció interesante medir en estas placentas genes asociados al proceso de activación e inhibición de la proliferación. Hay modelos de RCIU por administración de glucocorticoides en los cuales se han estudiado algunas de estas proteínas, y se ha observado que están reguladas favoreciendo el descenso de la proliferación en placentas de fetos con RCIU provenientes de madres tratadas con dexametasona (Baisden y col., 2007; Er y col., 2015).

Decidimos evaluar el ciclo celular en placentas de día 16 de gestación debido a que éste es el día en que se observa una disminución significativa en el peso de las placentas de fetos con RCIU, lo que podría estar asociado a alteraciones en la proliferación celular. Observamos una disminución significativa en los niveles de ARNm de la ciclina B1 en las placentas de fetos con RCIU (de madres tratadas con dexametasona). En contraste con este resultado, vimos que los niveles de ARNm de PCNA aumentan significativamente en estas placentas en el mismo día de gestación. Esto último difiere con lo reportado por Unek (2012) y Er (2015), quienes encontraron niveles disminuidos de PCNA (proteicos y de ARNm) en placentas con RCIU de hembras tratadas con dexametasona (Er y col., 2015; Unek y col., 2012). La discrepancia en los resultados puede deberse a que en estos trabajos los modelos de RCIU son en rata de la cepa Wistar y a que estudiaron los niveles proteicos de PCNA por inmunohistoquímica. Nuestro modelo de RCIU es en ratones BALB/c y nosotros evaluamos sólo niveles de ARNm. Además, en estos modelos de RCIU por exceso de GC en rata, administran dexametasona durante la última semana de gestación, a diferencia de nuestro modelo donde inyectamos el glucocorticoide sólo en día 14 y 15. Asimismo, el trabajo de Er y col., (2015) es en placentas a término, mientras que nosotros estudiamos en día 16 de gestación.

Otro mediador del ciclo celular es la ciclina D3. A diferencia de lo observado por Nogami y col., (2016) quienes mostraron una disminución de los niveles de ARNm de esta proteína en placentas con RCIU, en nuestro estudio no observamos diferencias significativas entre los tratamientos (Nogami y col., 2016). Esto podría deberse a que en dicho trabajo evaluaron

los efectos de un glucocorticoide diferente, la corticosterona, en un modelo *in vitro* en cultivo celular a diferencia de nuestro modelo *in vivo*.

Para concluir el análisis de proliferación celular estudiamos los niveles de ARNm de dos inhibidores del ciclo celular, p16 y p57. Encontramos una disminución significativa en los niveles de ARNm de la proteína p57 en las placentas de fetos con RCIU. En contraste con esto, y en asociación con un perfil antiproliferativo en este tejido, Er (2015) y Unek (2012) mostraron que existe un aumento del inhibidor p57 en placentas con RCIU (Er y col., 2015; Unek y col., 2012). Al igual que como se comentó anteriormente, en estos trabajos se determinaron niveles proteicos de los marcadores de proliferación celular en placentas de rata y se inyectó dexametasona durante la última semana de gestación. Los estudios fueron realizados en placentas a término, lo cual podría explicar también las diferencias observadas. Parte de los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que podría bajar la proliferación celular en las placentas de día 16 ya que observamos una disminución del ARNm de la ciclina B1. Sin embargo, al mismo tiempo también encontramos aumento de señales proliferativas como la disminución del inhibidor p57 y el aumento en los niveles del ARNm de PCNA. Los resultados obtenidos no nos permiten definir si la administración materna de dexametasona induce un perfil proliferativo o antiproliferativo en la placenta. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que hay una desregulación del progreso del ciclo celular en las placentas con RCIU inducida por sobreexposición a glucocorticoides. Por otro lado, en el ciclo celular participan múltiples ciclinas e inhibidores y es un proceso finamente regulado. Podríamos analizar entonces otras ciclinas e inhibidores involucrados en este proceso, además de otros días de gestación, para obtener resultados que nos permitan dilucidar qué ocurre con la proliferación celular en las placentas con RCIU.

En un trabajo en placentas de ratas tratadas con glucocorticoides, se estudió la apoptosis placentaria en distintas regiones del órgano y se encontró un aumento de la apoptosis (evaluada por la técnica de ADN Ladder) en la zona basal en las placentas con RCIU (Waddell y col., 2000). También, en un modelo en ratas de RCIU por administración de dexametasona, se observó un aumento de la apoptosis placentaria particularmente en la zona de laberinto,

mediante la evaluación de p53 y caspasa 3 (Alqaryyan y col., 2016). Estos estudios que muestran una regionalización de la apoptosis placentaria nos llevaron a querer estudiar la muerte celular programada en cortes de tejido e incluso analizar la histoarquitectura del órgano y los posibles efectos del tratamiento con dexametasona. Sin embargo, si bien realizamos los cortes y la tinción H&E, nos encontramos con cortes donde el tejido no estaba preservado, lo que no nos permitió continuar. Sería interesante repetir con el fin de mejorar los cortes histológicos y poder evaluar muerte celular en los distintos estratos placentarios.

En resumen, en nuestro trabajo se observó que la sobreexposición a glucocorticoides durante la gestación produce alteraciones asociadas a los procesos de apoptosis, autofagia y proliferación placentarias. Observamos una disminución de los niveles proteicos de Bcl2 lo cual podría sugerir un aumento de apoptosis, temprano en placentas de día 15 de gestación. Además, las placentas con RCIU presentaron mayores niveles de LC3 II B en día 18 de gestación, lo que indica un aumento de la autofagia en placentas a término por sobreexposición a GC. Por otro lado, las variaciones en la expresión de marcadores asociados a la proliferación como la ciclina B1, p57 y PCNA (día 16) en las placentas de fetos con RCIU sugieren que el tratamiento con dexametasona regula la expresión de genes asociados a la regulación del ciclo celular.

Los resultados obtenidos en este trabajo proveen información de los procesos que ocurren en la placenta, asociados a la RCIU inducida por sobreexposición intrauterina a GC. De esta forma, contribuyen a una mayor comprensión de esta patología, condición necesaria para poder, a futuro, pensar en la implementación de terapéuticas, diagnósticos y medidas de prevención de la misma.

## CONCLUSIÓN

---

En este trabajo:

- Caracterizamos la unidad fetoplacentaria en día 15 de gestación, sin encontrar diferencias en el peso fetal y placentario, ni en las tasas de RCIU y mortalidad entre tratamientos.
- Evaluamos alteraciones a nivel molecular asociadas a las vías de apoptosis, autofagia y proliferación celular en la placenta. Concluimos que la sobreexposición a glucocorticoides o el tratamiento con dexametasona produce:
  - Una disminución de los niveles proteicos del marcador antiapoptótico Bcl2 en día 15 de gestación;
  - Un aumento de los niveles del marcador de autofagia LC3 II B en día 18 de gestación;
  - Una disminución de los niveles de ARNm de ciclina B1 y p57, así como también un aumento de PCNA en día 16 de gestación.

En síntesis, a partir de los resultados obtenidos a nivel molecular podemos decir que detectamos tempranamente alteraciones en los niveles de un marcador antiapoptótico en las placentas con RCIU y una desregulación en la expresión de genes asociados a la proliferación celular. También un aumento de la autofagia en placentas a término. Estas alteraciones podrían ser parte de la patogenia a nivel placentario asociada a la RCIU.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Ain, R., Canham, L. N., & Soares, M. J. (2005). Dexamethasone-induced intrauterine growth restriction impacts the placental prolactin family, insulin-like growth factor-II and the Akt signaling pathway. *Journal of Endocrinology*, 185(2), 253–263.

Aires, MB y Dos Santos, AC (2015). Efectos de la diabetes materna en las células del trofoblasto. *World journal of diabetes*, 6 (2), 338–344.

Alqaryyan, M., Kilarkaje, N., Mouihate, A., & Al-bader, M. D. (2017). Dexamethasone-Induced Intrauterine Growth Restriction Is Associated With Altered Expressions of Metastasis Tumor Antigens and Cell Cycle Control Proteins in Rat Placentas. *Reproductive Sciences*, 24(8), 1164–1175.

Arias, A. (UNSAM). (2017). " *Desarrollo y caracterización de un modelo en ratón de restricción del crecimiento intrauterino inducido por glucocorticoides.* "

Arroyo, J. A., Brown, L. D., & Galan, H. L. (2009). Placental mammalian target of rapamycin and related signaling pathways in an ovine model of intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(6), 616.e1-616.e7.

Aspres, N; Bouzas, L; Sepúlveda, T. (2016). Organización del Seguimiento del Recién Nacido Prematuro de Alto Riesgo. *Ministerio de Salud, Presidencia de La Nación*, 56. <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000842cnt-organizacion-seguimiento-prematuros.pdf>

Baisden, B., Sonne, S., Joshi, R. M., Ganapathy, V., & Shekhawat, P. S. (2007). Antenatal Dexamethasone Treatment Leads to Changes in Gene Expression in a Murine Late Placenta. *Placenta*, 28(10), 1082–1090.

Bamfo, J. E., & Odibo, A. O. (2011). Diagnosis and management of fetal growth

restriction. *Journal of pregnancy*, 2011.

Barker, D. J. P. (2006). Adult consequences of fetal growth restriction. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 49(2), 270–283.

Barker, D. J. P., Osmond, C., Forsén, T. J., Kajantie, E., & Eriksson, J. G. (2005). Trajectories of Growth among Children Who Have Coronary Events as Adults. *New England Journal of Medicine*, 353(17), 1802–1809.

Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(6), 738–747.

Belkacemi, L., Chen, C. H., Ross, M. G., & Desai, M. (2009). Increased Placental Apoptosis in Maternal Food Restricted Gestations: Role of the Fas Pathway. *Placenta*, 30(9), 739–751.

Benavides, F., & Guénet, J. L. (2003). Biología y manejo reproductivo del ratón. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio. Principios Básicos y Aplicaciones*, 59–83.

Benediktsson, R., Lindsay, R. S., Noble, J., Seckl, J. R., & Edwards, C. R. W. (1993). Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *The Lancet*, 341(8841), 339–341.

Bertram, C., Trowern, A. R., Copin, N., Jackson, A. A., Unit, M., & Nutrition, H. (2001). *The Maternal Diet during Pregnancy Programs Altered Expression of the Glucocorticoid Receptor and Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Potential Molecular Mechanisms Underlying the Programming of Hypertension in Utero* \*. 142(7).

Bhutta, Z. A., Das, J. K., Rizvi, A., Gaffey, M. F., Walker, N., Horton, S., Webb, P., Lartey, A., & Black, R. E. (2013). Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? *The Lancet*, 382(9890), 452–477.

Biron-Shental, T., Sukenik-Halevy, R., Sharon, Y., Laish, I., Fejgin, M. D., & Amiel, A. (2014). Telomere shortening in intra uterine growth restriction placentas. *Early human development, 90*(9), 465-469.

Blencowe, H., Krasevec, J., de Onis, M., Black, R. E., An, X., Stevens, G. A., Borghi, E., Hayashi, C., Estevez, D., Cegolon, L., Shiekh, S., Ponce Hardy, V., Lawn, J. E., & Cousens, S. (2019). National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *The Lancet Global Health, 7*(7), e849–e860.

Bolon, B. (2014). Pathology Analysis of the Placenta. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Elsevier. p175-188

Bolzan, D. A., & Guimarey, L. (1998). *crecimiento intrauterino y prematuridad en dos municipios de la provincia de Buenos Aires. 96*, 155–162.

Börzsönyi, B., Demendi, C., Rigó, J., Szentpéteri, I., Rab, A., & Joó, J. G. (2013). The regulation of apoptosis in intrauterine growth restriction: A study of Bcl2 and Bax gene expression in human placenta. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, 26*(4), 347–350.

Boya, P. (2017). *Autofagia: cómo nuestras células se reciclan (Especial Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2016)*.

Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *Journal of Cell Science, 123*(19), 3209–3214.

Braun, T., Meng, W., Shang, H., Li, S., Sloboda, D. M., Ehrlich, L., Lange, K., Xu, H., Henrich, W., Dudenhausen, J. W., Plagemann, A., Newnham, J. P., & Challis, J. R. G. (2015). Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. *Reproductive Sciences, 22*(1), 47–59.

Briffa, J. F., Hosseini, S. S., Tran, M., Moritz, K. M., Cuffe, J. S. M., & Wlodek, M. E. (2017).

Maternal growth restriction and stress exposure in rats differentially alters expression of components of the placental glucocorticoid barrier and nutrient transporters. *Placenta*, 59, 30–38.

Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758.

Brunton, P J, J A Russell, and A J Douglas. 2008. "Adaptive Responses of the Maternal Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis during Pregnancy and Lactation." *Journal of Neuroendocrinology* 20(7): 764-76.

Carrascosa, A. (2003). Crecimiento intrauterino: Factores reguladores. Retraso de crecimiento intrauterino. *Anales de Pediatría*, 58(SUPPL. 2), 55–73.

Chaar 2016.  
[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse\\_Development](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Development)

Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005). Endocrinology of the Stress Response. *Annual Review of Physiology*, 67(1), 259–284.

Chavatte-Palmer, P., & Tarrade, A. (2016, June). Placentation in different mammalian species. In *Annales d'endocrinologie* (Vol. 77, No. 2, pp. 67-74). Elsevier Masson.

Chen, C.-P., Bajoria, R., & Aplin, J. D. (2002). Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth–restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(3), 764–769.

Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381.

Costas, M. A., & Rubio, M. F. (2017). Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Medicina (Buenos Aires)*, 77, 314–320.

Crowley, P. (1996). Prophylactic corticosteroids for preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).

Crowther, C. A., & Harding, J. E. (2007). Repeat doses of prenatal corticosteroids for women at risk of preterm birth for preventing neonatal respiratory disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3).

Cuffe, J. S. M., O'Sullivan, L., Simmons, D. G., Anderson, S. T., & Moritz, K. M. (2012). Maternal corticosterone exposure in the mouse has sex-specific effects on placental growth and mRNA expression. *Endocrinology*, 153(11), 5500–5511.

Curtis, S., Jones, C. J. P., Garrod, A., Hulme, C. H., & Heazell, A. E. P. (2013). Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 26(4), 339–346.

Dall'Asta, A., Brunelli, V., Prefumo, F., Frusca, T., & Lees, C. C. (2017). Early onset fetal growth restriction. *Maternal health, neonatology and perinatology*, 3(1), 2.

Daniel, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205–219.

Daniel, R. (2012). *Apoptosis Español*. 1(1), 6.

De Falco, M., De Luca, L., Acanfora, F., Cavallotti, I., Cottone, G., Laforgia, V., De Luca, B., Baldi, A., & De Luca, A. (2001). Alteration of the Bcl2: Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochemical Journal*, 33(7), 421–425.

de Onis, M., Blössner, M., & Villar, J. (1998). Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52 Suppl 1, S5–15.

Dev, M. (2006). Fetal growth restriction: The etiology. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 49(2), 228–235.

Diaz, C. (2010). Restricción del crecimiento intrauterino y resultados perinatales adversos. *Índice*, 35.

Dilworth, M. R., & Sibley, C. P. (2013). Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta*, 34(SUPPL), S34–S39.

Endo, H., Okamoto, A., Yamada, K., Nikaido, T., & Tanaka, T. (2005). Frequent apoptosis in placental villi from pregnancies complicated with intrauterine growth restriction and without maternal symptoms. *International journal of molecular medicine*, 16(1), 79-84.

Er, H., Acar, N., Kipmen-Korgun, D., Celik-Ozenci, C., Ustunel, I., Asar, M., & Korgun, E. T. (2015). Determination of PCNA, cyclin D3, p27, p57 and apoptosis rate in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restricted rat placentas. *Acta Histochemica*, 117(2), 137–147.

Erel, C. T., Dane, B., Calay, Z., Kaleli, S., & Aydinli, K. (2001). Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 73(3), 229–235.

Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W., & Seglen, P. O. (1995). Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of Autophagic Vacuoles in Isolated Hepatocytes: Effects of Vinblastine and Asparagine on Vacuole Distributions. *Experimental Cell Research*, 221(2), 504–519.

Firman, R. C., & Simmons, L. W. (2008). The frequency of multiple paternity predicts variation in testes size among island populations of house mice. *Journal of evolutionary*

*biology*, 21(6), 1524-1533.

Georgiades, P., Fergyson-Smith, A. C., & Burton, G. J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, 23(1), 3–19.

Giordano, M., Danova, M., Pellicciari, C., Wilson, G. D., Mazzini, G., Fuhrman Conti, A. M., Franchini, G., Riccardi, A., & Manfredi Romanini, M. G. (1991). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin expression during the cell cycle in normal and leukemic cells. *Leukemia Research*, 15(11), 965–974.

Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2006). The Consequences of Being Born Small – An Adaptive Perspective. *Hormone Research in Paediatrics*, 65(3), 5–14.

Gong, J. S., & Kim, G. J. (2014). The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 41(3), 97–107.

Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12), a006080.

Greenwood, P. L., Slepatis, R. M., Bell, A. W., & Hermanson, J. W. (1999). Intrauterine growth retardation is associated with reduced cell cycle activity, but not myofibre number, in ovine fetal muscle. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(5), 281.

Grumati, P., Coletto, L., Schiavinato, A., Castagnaro, S., Bertaggia, E., Sandri, M., & Bonaldo, P. (2011). Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. *Autophagy*, 7(12), 1415–1423.

Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thrombosis Research*, 114(5–6), 397–407.

Gupta, M. B., & Jansson, T. (2019). Novel roles of mechanistic target of rapamycin signaling

in regulating fetal growth. In *Biology of Reproduction* (Vol. 100, Issue 4).

Habli, M., Jones, H., Aronow, B., Omar, K., & Crombleholme, T. M. (2013). Recapitulation of characteristics of human placental vascular insufficiency in a novel mouse model. *Placenta*, 34(12), 1150–1158.

Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743), 464–468.

Hail, N., Carter, B. Z., Konopleva, M., & Andreeff, M. (2006). Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis*, 11(6), 889–904.

Hans, H., & Bullock, G. (2004). *The Laboratory Mouse*. (3rd ed.).

Hardie, D. G., Hawley, S. A., & Scott, J. W. (2006). AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The Journal of physiology*, 574(1), 7-15.

Hardy, K. (1999). Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction*, 4(3), 125–134.

Harris, A., & Seckl, J. (2011). Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior*, 59(3), 279–289.

Heald, R., & McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*, 61(4), 579–589.

Heazell, A.E.P., & Crocker, I. P. (2008). Live and Let Die – Regulation of Villous Trophoblast Apoptosis in Normal and Abnormal Pregnancies. *Placenta*, 29(9), 772–783.

Heazell, Alexander E. P., Sharp, A. N., Baker, P. N., & Crocker, I. P. (2011). Intra-uterine growth restriction is associated with increased apoptosis and altered expression of proteins in the p53 pathway in villous trophoblast. *Apoptosis*, 16(2), 135–144.

Hewitt, D. P., Mark, P. J., & Waddell, B. J. (2006). Glucocorticoids Prevent the Normal Increase in Placental Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Placental Vascularity during Late Pregnancy in the Rat. *Endocrinology*, *147*(12), 5568–5574.

Huizink, A. C., Mulder, E. J. H., & Buitelaar, J. K. (2004). Prenatal Stress and Risk for Psychopathology: Specific Effects or Induction of General Susceptibility? *Psychological Bulletin*, *130*(1), 115–142.

Hung, T. H., Chen, S. F., Lo, L. M., Li, M. J., Yeh, Y. L., & Hsieh, T. T. an. (2012). Increased autophagy in placentas of intrauterine growth-restricted pregnancies. *PLoS ONE*, *7*(7).

Huxley, R., Neil, A., & Collins, R. (2002). Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *The Lancet*, *360*(9334), 659–665.

Imdad, A., & Bhutta, Z. A. (2012). Effects of Calcium Supplementation During Pregnancy on Maternal, Fetal and Birth Outcomes. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, *26*, 138–152.

Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J., & Look, A. T. (1992). Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*, *13*(3), 565–574.

Into, T., Inomata, M., Takayama, E., & Takigawa, T. (2012). Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. *Cellular Signalling*, *24*(6), 1150–1162.

Iwamaru, A., Kondo, Y., Iwado, E., Aoki, H., Fujiwara, K., Yokoyama, T., ... & Kondo, S. (2007). Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene*, *26*(13), 1840-1851.

Jerzak, M., & Bischof, P. (2002). Apoptosis in the first trimester human placenta: The role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast

remodelling. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 100(2), 138–142.

Kadyrov, M., Kingdom, J. C. P., & Huppertz, B. (2006). Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 194(2), 557–563.

Kahn, B. B., & Myers, M. G. (2006). mTOR tells the brain that the body is hungry. *Nature medicine*, 12(6), 615-617.

Kajantie, E., Dunkel, L., Turpeinen, U., Stenman, U. H., Wood, P. J., Nuutila, M., & Andersson, S. (2003). Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(1), 493–500.

Karowicz Bilińska, A., Szczerba, A., Kowalska Koprek, U., Nawrocka Kunecka, A., & Grzegorz, B. (2009). Expression of caspase-3, Bax nad Bcl2 in placentas from pregnancies complicated by treated and non-treated fetal growth restriction. *Ginekologia Polska*, 80(9), 652–656.

Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316–323.

Kawamura, K., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Kumagai, A., & Tanaka, T. (2001). Expression of Fas and Fas ligand mRNA in rat and human preimplantation embryos. *Molecular Human Reproduction*, 7(5), 431–436.

Kay, H. H., Bird, I. M., Coe, C. L., & Dudley, D. J. (2000). Antenatal Steroid Treatment and Adverse Fetal Effects: What Is the Evidence? *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 7(5), 269–278.

Kerr JFR, Wyllie AH, C. A. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239\_257.

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., ... & Sabatini, D. M. (2003). GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*, 11(4), 895-904.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, 13(2), 132–141.

Krek, W., & Nigg, E. A. (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *The EMBO Journal*, 10(2), 305–316.

Kummar, S., Gutierrez, M. E., Gardner, E. R., Chen, X., Figg, W. D., Zajac-Kaye, M., Chen, M., Steinberg, S. M., Muir, C. A., Yancey, M. A., Horneffer, Y. R., Juwara, L., Melillo, G., Ivy, S. P., Merino, M., Neckers, L., Steeg, P. S., Conley, B. A., Giaccone, G., ... Murgo, A. J. (2010). Phase I trial of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG), a heat shock protein inhibitor, administered twice weekly in patients with advanced malignancies. *European Journal of Cancer*, 46(2), 340–347.

Lagunas, C., Mendiola, A. V., & Cruz, I. S. (2015). *Ciclo celular: Mecanismos de regulación*. 17(2), 98–107.

Lajic, S., Nordenström, A., & Hirvikoski, T. (2008). Long-term outcome of prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. In *Disorders of the human adrenal cortex* (Vol. 13, pp. 82-98). Karger Publishers.

Lee, M. H., Reynisdottir, I., & Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes &*

*Development*, 9(6), 639–649.

Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by Self-Digestion. *Developmental Cell*, 6(4), 463–477.

Levine, T. A., Grunau, R. E., McAuliffe, F. M., Pinnamaneni, R. M., Foran, A., & Alderdice, F. A. (2015). Early childhood neurodevelopment after intrauterine growth restriction: A systematic review. *Pediatrics*, 135(1), 126–141.

López Alegre, C. (2015). *Estudio de los mecanismos de regulación de la autofagia por glucosa* (Doctoral dissertation).

Lunghi, L., Pavan, B., Biondi, C., Paolillo, R., Valerio, A., Vesce, F., & Patella, A. (2010). Use of Glucocorticoids in Pregnancy. *Current Pharmaceutical Design*, 16(32), 3616–3637.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., & Reeth, O. Van. (2003). *Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones*. 27, 119–127.

Malassiné, A., Frendo, J. L., & Evain-Brion, D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update*, 9(6), 531–539.

Matsuoka, M., Kato, J. Y., Fisher, R. P., Morgan, D. O., & Sherr, C. J. (1994). Activation of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) by mouse MO15-associated kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7265–7275.

Maulik, D. E. V. (2006). Fetal growth restriction: the etiology. *Clinical obstetrics and gynecology*, 49(2), 228-235.

Mayhew, T. M., Ohadike, C., Baker, P. N., Crocker, I. P., Mitchell, C., & Ong, S. S. (2003).

Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta*, 24(2-3), 219-226.

McCarty, G. A. (2007). Proliferating cell nuclear antigen autoantibodies. In *Autoantibodies* (pp. 205–210). Elsevier.

McDonough, A. K., Curtis, J. R., & Saag, K. G. (2008). The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Current Opinion in Rheumatology*, 20(2), 131–137.

Meaney, M. J., Szyf, M., & Seckl, J. R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends in Molecular Medicine*, 13(7), 269–277.

Meijer, A. J., & Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Molecular aspects of medicine*, 27(5-6), 411-425.

Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(12), 2491–2502.

Moffett, A., & Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), 584–594.

Monson, T., Wright, T., Galan, H. L., Reynolds, P. R., & Arroyo, J. A. (2017). Caspase dependent and independent mechanisms of apoptosis across gestation in a sheep model of placental insufficiency and intrauterine growth restriction. *Apoptosis*, 22(5), 710-718.

Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (Eds.). (2020). *Embriología clínica*. Elsevier.

Morse III, H. C. (2007). Building a better mouse: One hundred years of genetics and biology. In *The Mouse in Biomedical Research* (pp. 1-11). Academic Press.

Mune, T., Rogerson, F. M., Nikkilä, H., Agarwal, A. K., & White, P. C. (1995). Human

hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nature Genetics*, 10(4), 394–399.

Murki, S. (2014). Intrauterine Growth Retardation - A Review Article. *Journal of Neonatal Biology*, 03(03).

Murphy, V. E., Zakar, T., Smith, R., Giles, W. B., Gibson, P. G., & Clifton, V. L. (2002). Reduced 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Activity Is Associated with Decreased Birth Weight Centile in Pregnancies Complicated by Asthma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(4), 1660–1668.

Negara, K. S., Suwiyoga, K., Pemayun, T. G. A., Sudewi, A. A. R., Astawa, N. M., Arijana, I. G. N. K., & Tunas, K. (2018). The role of caspase-3, apoptosis-inducing factor, and B-cell lymphoma-2 expressions in term premature rupture of membrane. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics*, 40(12), 733-739.

Nogami, H., Hiraoka, Y., & Aiso, S. (2016). Estradiol and corticosterone stimulate the proliferation of a GH cell line, MtT/S. *Growth Hormone & IGF Research*, 29, 33–38.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. In *Nature* (Vol. 344, Issue 6266, pp. 503–508).

Ødegård, R. A., Vatten, L. J., Nilsen, S. T., Salvesen, K. Å., & Austgulen, R. (2000). Preeclampsia and fetal growth. *Obstetrics & Gynecology*, 96(6), 950-955.

Oken, E., & Gillman, M. W. (2003). Fetal Origins of Obesity. *Obesity Research*, 11(4), 496–506.

Owen, C. G. (2005). Effect of Infant Feeding on the Risk of Obesity Across the Life Course: A Quantitative Review of Published Evidence. *PEDIATRICS*, 115(5), 1367–1377.

Ozmen, A., Unek, G., & Korgun, E. T. (2017). Effect of glucocorticoids on mechanisms of placental angiogenesis. *Placenta*, 52, 41–48.

Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., ... & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *Journal of biological chemistry*, 282(33), 24131-24145.

Papáčková, Z., & Cahová, M. (2014). Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging. *Physiological Research*, 63(4), 409–420.

Pasqualini, T. (2009). Implicancias de la restricción de crecimiento intrauterino sobre las enfermedades metabólicas. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 2, 15–25.

Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. W. (2015). Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *ELife*, 2015(4), 1–13.

Pimiento Infante, L. M., & Beltrán Avendaño, M. A. (2015). Restricción del crecimiento intrauterino: Una aproximación al diagnóstico, seguimiento y manejo. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 80(6), 493–502.

Plant, T. M., & Zeleznik, A. J. (Eds.). (2014). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press.

Qu, D., McDonald, A., Whiteley, K. J., Bainbridge, S. A., & Adamson, S. L. (2014). Layer-Enriched Tissue Dissection of the Mouse Placenta in Late Gestation. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (Issue Figure 1). Elsevier.

Randall, D. J., Burggren, W. W., French, K., & Eckert, R. (1998). *Eckert fisiología animal: mecanismos y adaptaciones/Fisiología animal* (No. 591.1). McGraw Hill/Interamericana de España, .

Regnault, T. R. H., Marconi, A. M., Smith, C. H., Glazier, J. D., Novak, D. A., Sibley, C. P., & Jansson, T. (2005). Placental amino acid transport systems and fetal growth restriction - A workshop report. *Placenta*, 26(SUPPL.).

Rešić Karara, J., Zekić Tomas, S., Marušić, J., Roje, D., & Kuzmić Prusac, I. (2016). Fas and FasL expression in placentas complicated with intrauterine growth retardation with and without preeclampsia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 29(7), 1154–1159.

Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, 50.

Roa, I., Smok S, C., & Prieto G, R. (2012). Placenta: Anatomía e Histología Comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1490–1496.

Roos, S., Jansson, N., Palmberg, I., Säljö, K., Powell, T. L., & Jansson, T. (2007). Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. *The Journal of Physiology*, 582(1), 449–459.

Roos, S., Powell, T. L., & Jansson, T. (2009). Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. *Biochemical Society Transactions*, 37(1), 295–298.

Rybertt, T., Azua, E., & Rybertt, F. (2016). Retardo De Crecimiento Intrauterino: Consecuencias a Largo Plazo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(4), 509–513.

Sandman, C. A., Davis, E. P., Buss, C., & Glynn, L. M. (2011). Prenatal Programming of Human Neurological Function. *International Journal of Peptides*, 2011, 1–9.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, 21(1), 55–89.

Scacchi, M. S., Van der Vel, J., Vergara, R., Rivas, M. E., Analis, S. & López Mautino, P. (2019). Guía de práctica clínica: restricción del crecimiento intrauterino.

Schaaf, M. J. M., & Cidlowski, J. A. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83(1–5), 37–48.

Schiavi, A., & Ventura, N. (2014). The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process. *Experimental Gerontology*, 56, 147–153.

Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2), 253–262.

Schneider, P., & Tschopp, J. (2000). *Apoptosis induced by death receptors* (pp. 281–286).

Schneiderman, N., Ironson, G., & Siegel, S. D. (2005). Stress and Health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annual Review of Clinical Psychology*, 1(1), 607–628.

Seckl, J. R., Cleasby, M., & Nyirenda, M. J. (2000). Glucocorticoids, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney International*, 57(4), 1412–1417.

Sharp, A. N., Heazell, A. E. P., Crocker, I. P., & Mor, G. (2010). Placental Apoptosis in Health and Disease. *American Journal of Reproductive Immunology*, 64(3), 159–169.

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development*, 9(10), 1149–1163.

Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306(5698), 990–995.

Sibley, C. P., Turner, M. A., Cetin, I., Ayuk, P., Boyd, C. R., D'Souza, S. W. & Powell, T. (2005). Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatric research*, 58(5), 827–832.

Simmons, D. G. (2014). Postimplantation development of the chorioallantoic placenta. In *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy* (pp. 143-161). Academic Press.

Smith, S. C., Baker, P. N., & Symonds, E. M. (1997a). Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *177*(6), 1395–1401.

Spanos S, Rice S, Karagiannis P y col., (2002). Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. *Reproduction*, *124*:353–363.

Strauss, R. S. (2000). of Those Born Small for Gestational Age. *Journal of the American Medical Association*, *283*(5), 625–632.

Sugden, M. C., Langdown, M. L., Munns, M. J., & Holness, M. J. (2001). Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *European Journal of Endocrinology*, *145*(4), 529–539.

Sultana, Z., Maiti, K., Dedman, L., & Smith, R. (2018). Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction?. *American journal of obstetrics and gynecology*, *218*(2), S762-S773.

Takizawa, C. G., & Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1–CDK1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(6), 658–665.

Taves, M. D., Gomez-Sanchez, C. E., & Soma, K. K. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: Evidence for local synthesis, regulation, and function. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *301*(1).

Tsellou, E., Michailidi, C., Pafiti, A., & Troungos, C. (2008). DNA methylation-independent

regulation of p16 in epithelial cells during mouse mammary gland development. *Epigenetics*, 3(3), 143–148.

Unek, G., Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., & Korgun, E. T. (2012). Immunolocalization of PCNA, Ki67, p27 and p57 in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restriction placental development in rat. *Acta Histochemica*, 114(1), 31–40.

Unek, G., Ozmen, A., Ozekinci, M., Sakinci, M., & Korgun, E. T. (2014). Immunolocalization of cell cycle proteins (p57, p27, cyclin D3, PCNA and Ki67) in intrauterine growth retardation (IUGR) and normal human term placentas. *Acta Histochemica*, 116(3), 493–502.

Valsamakis, G., Kanaka-Gantenbein, C., Malamitsi-Puchner, A., & Mastorakos, G. (2006). Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 138–147.

Vedmedovska, N., Rezeberga, D., Teibe, U., Melderis, I., & Donders, G. G. G. (2011). Placental pathology in fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 155(1), 36–40.

Vegiopoulos, A., & Herzig, S. (2007). Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1–2), 43–61.

Vogt Isaksen, C. (2004). Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatric and Developmental Pathology : The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 7(5), 433–442.

Vuguin, P. M. (2007). Animal Models for Small for Gestational Age and Fetal Programming of Adult Disease. *Hormone Research in Paediatrics*, 68(3), 113–123.

Waddell, B. J., Hisheh, S., Dharmarajan, A. M., & Burton, P. J. (2000). Apoptosis in Rat Placenta Is Zone-Dependent and Stimulated by Glucocorticoids1. *Biology of Reproduction*,

63(6), 1913–1917.

Wang, Z., Fan, M., Candas, D., Zhang, T. Q., Qin, L., Eldridge, A., Wachsmann-Hogiu, S., Ahmed, K. M., Chromy, B. A., Nantajit, D., Duru, N., He, F., Chen, M., Finkel, T., Weinstein, L. S., & Li, J. J. (2014). Cyclin B1/CDK1 coordinates mitochondrial respiration for Cell-Cycle G2/M progression. *Developmental Cell*, 29(2), 217–232.

Watson, E. D., & Cross, J. C. (2005). Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta. *Physiology*, 20(3), 180–193.

White, J., & Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, 1(2), 131–138.

Wills, R., Gunn, S., Axelrad, M., & Tu, D. (2019). *Challenges in Prenatal Treatment with Dexamethasone*. 16(1), 186–193.

Terese, W., Kibiuk, L., & Duckwall, C. (2001). The adult stem cell. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, 23-42.

Wolpert, Lewis, Cheryll Tickle, and Arias M.A. (2002). *Principles of development* (2nd ed.). Oxford university press.

Wulff, j. A. P., Contreras, d. M., Muñoz, h., Delgado, a. S., Otaño, l., & Hung, v. J. A. (2017). Restriccion de crecimiento intrauterino. *Guía clínica de la Federación Latino Americana de Sociedades de Ginecología y Obstetricia. Fed Lat Am Soc Ginecol y Obstet*, 43(2).

Wyllie, A. H. (1995). The genetic regulation of apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(1), 97–104.

Zhang, J. (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- Mechanisms and experimental approaches. *Redox Biology*, 4, 242–259.