

SIMPOSIO 6. FISIOPATOLOGÍA DE LA PLACENTA

MEDICINA (Buenos Aires) 2004; 64 (Supl. II): 38-40

SECUENCIAS Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN HUMANO PSG5 ESPECÍFICO DE EMBARAZO

GRACIELA M. PANZETTA-DUTARI, RODRIGO NORES Y LUIS C. PATRITO

CIBICI, CONICET. Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. Ciudad Universitaria. 5000. Córdoba.

Las glicoproteínas humanas específicas de embarazo (PSG) están codificadas por once genes transcripcionalmente activos y con elevada similitud de secuencia, ubicados en el cromosoma 19q13.2. Las proteínas PSG son sintetizadas en el sinciotrofoblasto placentar y son liberadas a la circulación materna alcanzando concentraciones de 200-400 mg/L al término de una gestación normal. Desempeñan un papel crucial en la gestación y protección del feto modulando el sistema inmune materno. Niveles séricos disminuidos de PSG se asocian a condiciones patológicas como retardo en el crecimiento intrauterino, pre-eclampsia y abortos espontáneos. La expresión de estos genes se incrementa durante el transcurso de un embarazo normal y serían los genes sujetos a la máxima activación transcripcional durante el proceso de diferenciación del citotrofoblasto en sinciotrofoblasto.

Con el propósito de revelar las bases moleculares involucradas en su transcripción, estudiamos el gen PSG5 mediante análisis de secuencia, ensayos de interacción DNA-proteínas y transfecciones transientes en células que expresan o no expresan genes PSG endógenos. La región (-254/-43) carece de secuencias promotoras consenso pero posee actividad promotora en todas las líneas celulares ensayadas. Dicha actividad es disminuida por una región represora proximal (PRR: -605/-524) y otra distal (-3204/ -706). Los genes de la familia PSG

poseen cinco elementos conservados reconocidos *in vitro* por factores proteicos. Los elementos *Core Promoter Element (CPE)* y *Footprint 1 (FP1)* contienen secuencias tipo cajas GT involucradas en la formación de complejos específicos con extractos de células placentarias y no placentarias. En la formación de estos complejos participan el factor de transcripción ubicuo SP1 y una proteína de 80 KDa, aún no caracterizada. La mutación de las secuencias *CPE* y *FP1* conducen a una disminución de la actividad transcripcional en todas las líneas celulares estudiadas. Los elementos *FP3* y *FP4*, ubicados en el segmento PRR, son reconocidos por proteínas de 142 y 71 KDa, y de 115 KDa, respectivamente. Estos complejos específicos no se observan con extractos de células placentarias. La mutación de las secuencias *FP3* y *FP4* conduce a un incremento en la transcripción del gen de manera también independiente del contexto celular. Los datos obtenidos indican que el factor Sp1 participa en la transcripción basal del gen PSG5, mientras que la región represora proximal y las proteínas que interactúan con ella mantienen reprimida la transcripción del gen en células no placentarias.

Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de los genes PSG durante el desarrollo normal de la placenta humana involucra mecanismos de anti-represión génica, mediados por la pérdida de actividades represoras.

TRANSPORTE DE AGUA Y UREA EN PLACENTA HUMANA NORMAL Y PREECLÁMPTICA

ALICIA E. DAMIANO, ELSA ZOTTA, CRISTINA IBARRA

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

El normal desarrollo y crecimiento del feto depende en forma crítica del transporte adecuado de nutriente, iones y agua a través de la placenta. Como el sinciotrofoblasto de placenta humana (STh) es una estructura continua,

multinucleada con escasas uniones estrechas, el intercambio de solutos entre la madre y el feto tiene lugar principalmente por la vía transcelular. El movimiento de agua y urea a través de STh puede ser facilitado por canales de agua

tipo acuagliceroporinas (AQPs) y/o transportadores de urea (UTs) ampliamente presentes en células y tejidos.

Nuestro objetivo fue estudiar la expresión molecular y funcional de acuagliceroporinas y transportadores de urea tipo A (UT-A) en Sth de placenta humana normal y preecláptica, a fin de dilucidar cuál es la vía implicada en el transporte de agua y solutos entre la madre y el feto y cómo se altera con esta patología.

Nuestros estudios muestran por primera vez la existencia de AQP9, AQP3, AQP7 y UT-A en placenta humana. Estas AQPs, con permeabilidad selectiva a urea y glicerol (AQP3 y AQP7) y a un amplio rango de solutos no cargados (AQP9) estarían implicadas en el rápido movimiento de solutos y agua a través del Sth y/o en la regulación del volumen celular.

Estas AQPs, localizadas en membrana apical y basal del STh, fueron funcionales en cultivos de explantos de placenta normal y en las líneas celulares BeWo modelo de trofoblasto.

Además, hemos hallado una expresión molecular aumentada de AQP9 en STh de placenta preecláptica con respecto a la normal, que no se correlaciona con los experimentos funcionales de transporte de agua, urea y manitol.

En placenta preecláptica, la AQP9 se localizó no sólo en la membrana apical y basal sino también en citoplasma. Esto sugiere la posibilidad de que la AQP9 podría acumularse en vesículas subcelulares y que su relocalización en la membrana apical y/o basal estuviera sujeta a una regulación.

En explantos de placentas preeclápticas, la incorporación de agua y manitol disminuyó y no fue sensible

a HgCl_2 . Sin embargo, la incorporación de urea aumentó significativamente en un 32 % y fue inhibible por fletina 0,5 mM en un 49% y por HgCl_2 0,3 mM en un 52 % ($n=4$; $P < 0,05$).

Estos resultados sugieren la existencia de una vía de difusión facilitada para la urea en placentas normales que se estimule en placentas preeclápticas. Los estudios orientados a explorar esta posibilidad mostraron la expresión molecular de transportadores de urea tipo UT correspondiente a las isoformas 2 y 4 del UT-A que estarían localizados en la membrana apical de STh de placentas normales y preeclápticas.

Mostramos por primera vez la existencia de UT-A funcionales en vellosidades coriónicas humanas cuya funcionalidad estaría aumentada en preeclampsia no así su expresión molecular. La presencia de UT-A en STh permitiría la eliminación facilitada de este metabolito del feto hacia la sangre materna.

En conclusión nuestros resultados sugieren que la función de AQPs y UT-A depende de las condiciones de la placenta y por ende del embarazo.

Las AQPs son funcionales en condiciones normales pero no parecen serlo durante la preeclampsia. El UT-A en cambio tendría una mayor expresión funcional en placentas preeclápticas que en normales.

La mal adaptación inmunológica, la isquemia placentaria y el estrés oxidativo, presentes en esta patología, podrían alterar la expresión de AQPs y UT-A. Posteriores estudios se requerirán para poder dilucidar el rol de estos transportadores en la etiología de la preeclampsia.

OXIDATIVE AND NITRATIVE STRESS IN THE HUMAN PLACENTA AND FUNCTIONAL EFFECTS

LESLIE MYATT, DIANE BOCKMAN, ROSE WEBSTER

*Dept of Obstetrics and Gynecology, University of Cincinnati, College of Medicine,
PO Box 670526, Cincinnati OH 45267-0526*

Development of the placenta and its vasculature occurs along a highly regulated pathway that can be impacted by environmental factors including hypoxia, oxidative stress and the hormonal milieu. In pregnancies complicated by preeclampsia or pregestational diabetes, which are both characterized by increased oxidative stress, we demonstrated the presence of nitrotyrosine residues in the placental vasculature and stroma, indicative of production and action of the powerful pro-oxidant peroxynitrite, and altered in vitro placental vascular reactivity in the placenta. This condition could be recapitulated by treatment of the normal placental vasculature with authentic peroxynitrite. Nitration of tyrosine residues results in either a gain or loss of protein function. We have adopted a proteomics ap-

proach to identify nitrated proteins in the placenta and compare protein expression in the placenta in normal pregnancies and those complicated by oxidative stress. The p38 MAP kinase family of proteins mediates signaling in response to environmental stress and cytokines and regulates the differentiation of various cell types. Targeted disruption of the p38 MAPK gene is an embryonic lethal because of severe defects in placental development including loss of the labyrinth layer and reduction of spongiotrophoblast in mice. Particularly there is a loss of vascularization in the labyrinth and increased rate of apoptosis showing p38 MAPK is required for trophoblast development and placental vascularization. In the human placenta phospho p38 MAP kinase is localized to apical

and basal surfaces of syncytiotrophoblast and in vascular endothelium. Using immunoprecipitation of nitrated proteins and cross blotting we preliminarily identified phospho p38 MAP kinase as a nitrated protein in the preeclamptic placenta and found that nitration resulted in reduced catalytic activity of phospho p38 MAP kinase. This may be linked to the altered vascular reactivity seen in the preeclamptic placenta. The identity of phospho p38 MAP kinase as a nitrated protein in the placenta has been confirmed by mass spectrometry. Nitrated proteins were isolated from preeclamptic placental homogenates by immunoprecipitation and fractionated by 1D gel electrophoresis. The band corresponding to phospho p38MAP kinase was excised from the gel and digested with trypsin. The peptides obtained were analyzed by MALDI-MS and peptide masses compared against the NCBI database to identify intact proteins and also compared against a theoretical tryptic digest of

p38 MAP kinase with serine, threonine and tyrosine residues modified by phosphorylation and nitration. Theoretical tryptic digest masses were generated using the MS-Digest program of Protein Prospector. The peptide masses obtained by MALDI-MS did not match any peptide sequences in any available database. However 8 of the peptide masses from this protein matched those of the theoretical digest masses of p38 MAP kinase modified by phosphorylation and nitration. The mass spectrometry data thus confirms our observation from double immunoprecipitation experiments that phospho p38 MAP kinase is nitrated in the placenta. Covalent modification by nitration and loss of function of this protein which is crucial to vascular development and function in the placenta could have important repercussions for overall function of the fetoplacental circulation and fetal growth.