



UNIDAD ACADÉMICA DE  
**INMUNOLOGÍA**



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**  
UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad  
de Química  
UDELAR - Uruguay

Trabajo final de grado  
Licenciatura en Bioquímica

# **Estudio del papel de la transglutaminasa tisular en procesos de remodelación vascular en la interfaz materno fetal**

Victoria Nuñez

Tutora: Dra. Paula Arbildi

Área Inmunología

Departamento de Biociencias, Facultad de Química

Unidad Asociada del Instituto de Química Biológica Facultad de Ciencias

Unidad Académica del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

Universidad de la República, Uruguay

Montevideo, 2026

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutora, Paula Arbildi, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su guía, su apoyo constante y por todo el conocimiento compartido a lo largo de este proceso.

Agradezco también a la “casita de adelante” de la sección de inmunología, por haberme recibido con tanta calidez. En especial, a Ana Hernández, por haber sido el nexo inicial y abrirme las puertas a esta experiencia. Haber formado parte de este grupo ha sido, sin duda, muy enriquecedor tanto en lo académico como en lo personal.

Un agradecimiento muy especial a mi familia, mis padres, mi hermano y chloe, por su apoyo incondicional, por impulsarme cada día y por brindarme las herramientas necesarias para poder alcanzar esta meta. También a Seba, por su apoyo y constante acompañamiento a lo largo de todo este proceso.

Quiero reconocer a mis compañeros de carrera y amigos, quienes me acompañaron durante este recorrido, con quienes compartí aprendizajes, desafíos y momentos clave de esta etapa, que hicieron de este camino una experiencia más liviana y disfrutable.

Agradezco también a mis evaluadoras, Paula Faral y Florencia Festari, por su tiempo, dedicación y aportes en este trabajo.

## RESUMEN

La invasión del trofoblasto extravascular y el remodelado vascular de las arterias espirales son procesos esenciales para una placentación normal. Su alteración se asocia con complicaciones gestacionales que comprometen la salud del binomio materno-fetal. La transglutaminasa tisular (TG2) es una enzima de expresión ubicua con actividad transglutaminasa (TGasa), implicada en procesos de migración celular, adhesión y respuestas inflamatorias. Sin embargo, su rol específico en la adquisición del fenotipo invasor y endovascular por parte del trofoblasto de primer trimestre aún no está completamente dilucidado.

Con el objetivo de contribuir a la comprensión del rol de TG2 en la adquisición del fenotipo endovascular, se emplearon líneas trofoblásticas de primer trimestre (Swan-71 y HTR-8/SVneo) expuestas a un inhibidor TGasa (cistamina, CTA) bajo distintas condiciones de suero fetal bovino (FBS). Se evaluó la expresión de TG2 mediante inmunoblot e inmunofluorescencia, su actividad TGasa por citometría de flujo utilizando un sustrato biotinilado, la viabilidad celular mediante ensayo de resazurina, la migración mediante ensayos de cierre de herida, la secreción de interleuquina-6 (IL-6) por ELISA y la capacidad de formación de estructuras tubulares por ensayos de tubulogénesis en Geltrex.

Los resultados evidenciaron que TG2 se expresa de manera constitutiva en ambas líneas celulares. La inhibición con CTA redujo la actividad TGasa de forma dosis-dependiente, lo que se asoció con una disminución de la migración celular, una modulación en la secreción de IL-6 y una alteración en parámetros asociados a la tubulogénesis.

En conjunto, estos hallazgos indican que la actividad TGasa de TG2 desempeña un papel relevante en la migración, la respuesta inflamatoria y la formación de estructuras tubulares en trofoblastos de primer trimestre, sugiriendo su posible contribución a los procesos implicados en el remodelado vascular.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La placenta como interfaz materno-fetal esencial.....	1
1.2. Desarrollo de la placenta.....	2
1.2.1. Establecimiento de la interfaz materno-fetal.....	2
1.2.2. Remodelado vascular mediado por trofoblasto endovascular.....	4
1.2.3. Consecuencias patológicas de fallas en el remodelado vascular.....	7
1.3. Transglutaminasa tisular: funciones y relevancia biológica.....	7
1.3.1. Estructura y distribución de la TG2.....	7
1.3.2. Funciones catalíticas y no catalíticas.....	8
1.3.3. Regulación de la actividad, expresión y localización.....	10
1.4. TG2 en la interfaz materno-fetal.....	11
1.4.1. Expresión y función de TG2 en la interfaz materno-fetal fisiológica.....	11
1.4.2. Papel de TG2 en patologías de la gestación.....	11
1.5. Hipótesis y Objetivos.....	12
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>14</b>
2. METODOLOGÍA.....	14
2.1. Líneas celulares.....	14
2.2. Mantenimiento de cultivos celulares.....	14
2.3. Inmunofluorescencia indirecta.....	15
2.4. Western blot.....	15
2.5. Ensayo de viabilidad celular mediante resazurina.....	17
2.6. Ensayo de actividad de transamidación (TGasa).....	17
2.7. Ensayo de cicatrización de herida.....	18
2.8. Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo.....	18
2.9. Ensayo de formación de estructuras tubulares tipo endotelio.....	19
2.10 Expresión de los resultados y estadística.....	20
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>21</b>
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Evaluación de la expresión y actividad enzimática de TG2 en las líneas celulares Swan-71 y HTR-8/SVneo.....	21
3.1.1. Detección de TG2 en líneas trofoblásticas de primer trimestre.....	21
3.1.2. Evaluación de la viabilidad celular mediante resazurina.....	23
3.1.3. Evaluación de la actividad TGasa por citometría de flujo.....	24
3.2. Efecto de la modulación de la actividad de TG2 sobre procesos asociados a la adquisición del fenotipo invasor y endovascular.....	27
3.2.1. Ensayo de migración.....	27

3.2.2. Evaluación de la producción de IL-6.....	29
3.2.3. Formación de estructuras tubulares (ensayo de tubulogénesis).....	30
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>34</b>
4. DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	37
REFERENCIAS.....	39

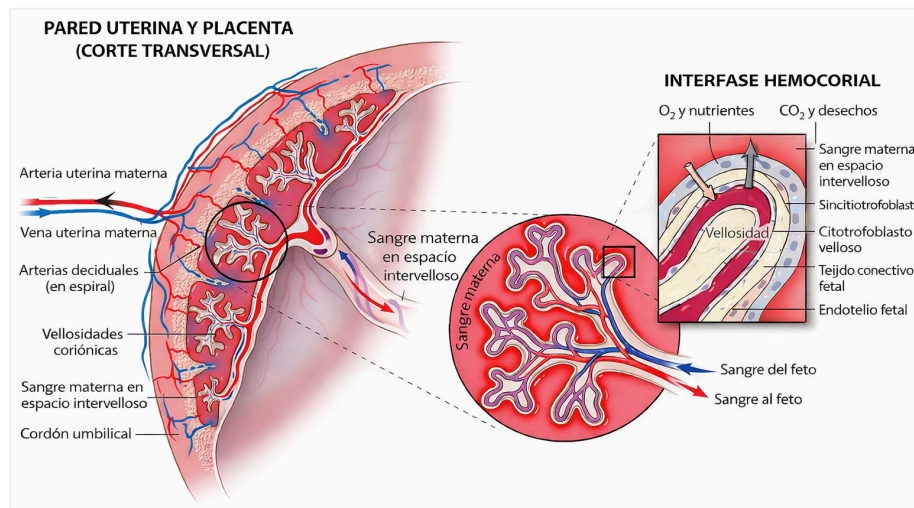
# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La placenta como interfaz materno-fetal esencial

La placenta humana, órgano fetal transitorio de tipo hemocorial, constituye la interfaz materno-fetal que media el intercambio de oxígeno, nutrientes y productos de desecho, al tiempo que modula las respuestas inmunológicas y vasculares en el útero gestante<sup>1-3</sup> (Figura 1). Las alteraciones en su formación se asocian con complicaciones obstétricas, tales como la preeclampsia (PE), restricción del crecimiento fetal y el aborto espontáneo<sup>4,5</sup>, representando un problema de salud pública global<sup>6</sup>.

Pese a avances significativos, los mecanismos moleculares que coordinan el desarrollo placentario durante el primer trimestre del embarazo aún no se comprenden por completo. Las dificultades para obtener muestras humanas tempranas y la ausencia de modelos animales que repliquen la placentación hemocorial limitan su estudio.



**Figura 1: Estructura de la placenta humana.** Se muestra la estructura de la pared uterina y las vellosidades coriónicas, donde la sangre materna circula por el espacio intervilloso y permite el intercambio de gases, nutrientes y desechos con la sangre fetal a través de la interfaz hemocorial. Tomado de “*Imaging placental function: current technology, clinical needs, and emerging modalities*”<sup>7</sup>.

## 1.2. Desarrollo de la placenta

### 1.2.1. Establecimiento de la interfaz materno-fetal

El establecimiento de la interfaz requiere una preparación endometrial previa mediante decidualización. Este proceso depende de la progesterona y transforma las células estromales en un tejido receptivo para la implantación denominado decidua <sup>1,8</sup>.

Aproximadamente seis a siete días después de la fecundación, el blastocisto, compuesto por trofoectodermo (TE) y masa celular interna (ICM), que se diferencian en placenta y embrión respectivamente (Figura 2A), contacta con el epitelio endometrial e inicia la implantación en tres fases sucesivas: aposición, adhesión e invasión del estroma endometrial <sup>9</sup>. Este proceso depende de la interacción coordinada entre las líneas trofoblásticas derivadas del TE y el endometrio decidualizado <sup>3</sup>.

La adhesión del blastocisto induce la diferenciación del TE en sincitiotrofoblasto (STB), estructura multinucleada invasiva que erosiona vasos y glándulas endometriales, originando lagunas sanguíneas primitivas que permiten la nutrición histotrófica inicial del embrión <sup>3</sup>. Por detrás del STB, los citotrofoblastos (CTB), células mononucleares progenitoras, proliferan y forman columnas celulares que atraviesan el sincitio y dan origen a las vellosidades coriónicas primarias, anclando la placenta a la decidua. Estas estructuras evolucionan a secundarias cuando el mesodermo extraembrionario invade, y finalmente a terciarias tras su diferenciación en vasos sanguíneos fetales y tejido conectivo (Figura 2B y 2C). En conjunto, el CTB y el STB conforman el trofoblasto veloso, siendo las vellosidades placentarias las unidades funcionales responsables del intercambio materno-fetal <sup>1,3,10</sup>.

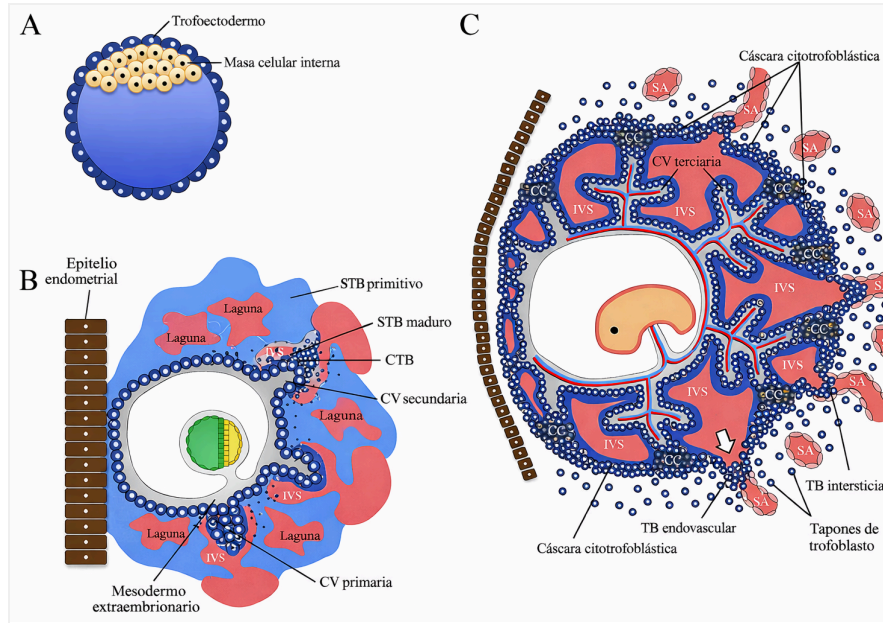
Los CTB de las columnas velosas forman estructuras estratificadas denominadas columnas celulares, que atraviesan el STB y alcanzan la decidua. En la región distal de estas estructuras, los CTB se diferencian en trofoblastos extravelosos (EVT) mediante una transición de tipo epitelio-mesenquimal. Si bien los mecanismos moleculares que regulan este proceso están poco definidos, se ha establecido que esta diferenciación depende de interacciones con la matriz

extracelular (MEC), cambios en la expresión de integrinas y la acción de metaloproteasas de matriz (MMPs) <sup>11</sup>.

Los EVT que migran hacia la decidua se denominan trofoblastos intersticiales, mientras que aquellos que invaden las arterias espirales maternas se diferencian en trofoblastos endovasculares, estos últimos son responsables de la formación de tapones trofoblásticos y del posterior remodelado vascular que ocurre en la placenta. Ambos subtipos adquieren características moleculares distintas a través de vías de diferenciación específicas que aún no están completamente esclarecidas (Figura 2C) <sup>10</sup>.

Durante el primer trimestre, los EVT generan tapones trofoblásticos en las arterias espirales, restringiendo temporalmente el flujo arterial y manteniendo hipoxia fisiológica protectora contra estrés oxidativo. Este microambiente favorece la diferenciación trofoblástica y el desarrollo vellosos <sup>12,13</sup>, mientras que su disrupción prematura induce la acumulación de proteínas mal plegadas en el STB, que comprometen su función endocrina y la viabilidad gestacional <sup>8</sup>.

La desintegración progresiva de los tapones habilita la migración intraluminal de los EVT a lo largo de la pared arterial y el reemplazo de las células endoteliales preexistentes por trofoblasto endovascular, proceso clave para el remodelado vascular. Como resultado, la interfaz placentaria adquiere un carácter de nutrición hemotrófica, dado que se facilita la comunicación entre las arterias espirales y el espacio intervilloso <sup>3,10</sup> (Figura 3).

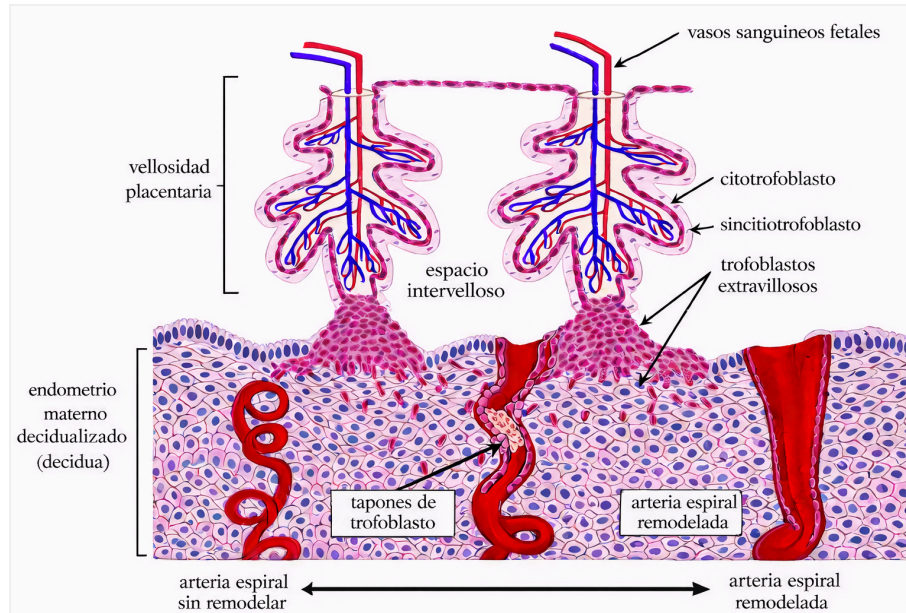


**Figura 2: Desarrollo temprano de la placenta humana y diferenciación del trofoblasto.** (A) Blastocisto humano compuesto por trofoectodermo y masa celular interna. (B) Etapa inicial de la implantación en el epitelio endometrial, donde el trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto (CTB) y sincitio trofoblástico (STB), este último genera lagunas que confluyen para establecer el espacio interveloso (SIV). Se ilustran las vellosidades coriónicas (VC primarias, secundarias). (C) Placenta en desarrollo con VC terciarias y formación del árbol veloso. Se observa la capa citotrofoblástica y la diferenciación del trofoblasto extraveloso en subtipos intersticial (TB intersticial) y endovascular (TB endovascular), responsables de la invasión del estroma materno y del remodelado de las arterias espirales maternas (SA). Tomado de “*Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling*”<sup>10</sup>.

### 1.2.2. Remodelado vascular mediado por trofoblasto endovascular

El remodelado de las arterias espirales constituye un proceso secuencial esencial que asegura una perfusión sanguínea adecuada hacia la placenta frente a las crecientes demandas fetales. Este proceso implica la transformación de vasos de alta resistencia y bajo flujo en estructuras de gran calibre, baja resistencia y escasa capacidad contráctil.

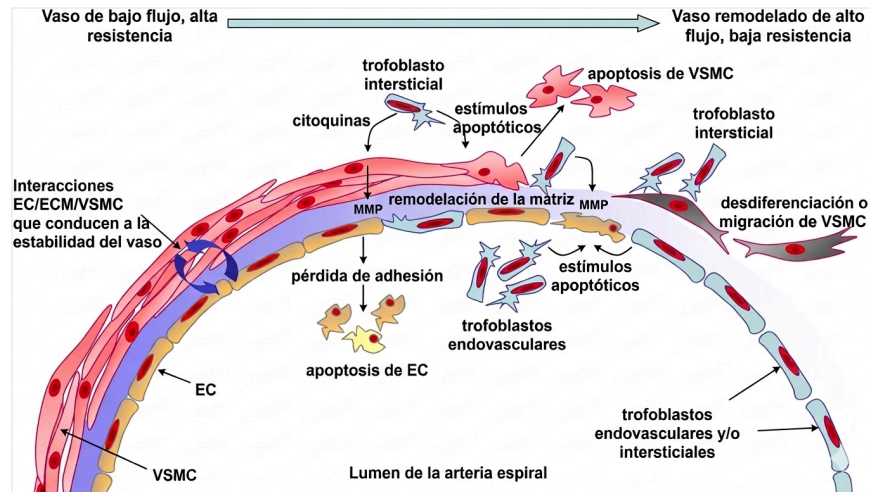
Inicialmente ocurre un remodelado dependiente de la decidua, en el que las células inmunes como las células *Natural Killer* uterinas y los macrófagos inducen la desorganización parcial de la capa muscular mediante desdiferenciación y apoptosis<sup>14</sup>. Estas células se reclutan hacia el músculo liso vascular en respuesta a citoquinas liberadas por el endotelio, cuya producción es estimulada por señales provenientes de los EVT, lo que le confiere especificidad al proceso en el lecho placentario<sup>8</sup>.



**Figura 3: Remodelado de las arterias espirales en la interfaz materno-fetal.** Los trofoblastos extravillosos invaden el endometrio decidualizado, en etapas tempranas participan en la formación de tapones de trofoblasto en las SA y posteriormente llevan a cabo el remodelado de las mismas, lo que permite regular el flujo sanguíneo hacia el espacio intervellosos y las vellosidades placentarias. Tomada de *“Establishment of maternal blood supply to the placenta: insights into plugging, unplugging and trophoblast behaviour from an agent-based model”* <sup>13</sup>.

Posteriormente, los EVT completan la transformación: el subtipo intersticial migra hacia las arterias espirales y reemplaza la capa muscular elástica por material fibrinoide amorfo, mientras que el endovascular sustituye el endotelio materno mediante la inducción de apoptosis de las células endoteliales preexistentes y modifica aún más el revestimiento muscular desde el lumen arterial <sup>10,13,14</sup>. Así, el remodelado resulta de la acción conjunta de ambas poblaciones celulares (Figura 4).

La invasión del trofoblasto es un proceso complejo que está regulado por múltiples factores del entorno. Entre ellos se encuentran citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, las MMPs y los niveles de oxígeno. Estos elementos no sólo modulan la invasión, sino que también pueden modificar el fenotipo del trofoblasto <sup>15</sup>.



**Figura 4: Mecanismos implicados en el remodelado de las arterias espirales dependiente del trofoblasto.** Previo al remodelado, las arterias espirales de bajo flujo y alta resistencia se mantienen estables mediante interacciones entre las células endoteliales (EC), matriz extracelular (ECM) y células musculares lisas vasculares (VSMC). La invasión del trofoblasto extravascular, tanto intersticiales como endovasculares, inducen apoptosis celular, remodelado de la matriz, pérdida de adhesión que permite el reemplazo del endotelio por trofoblasto. Estos procesos conducen a la formación de vasos remodelados de alto flujo y baja resistencia. Tomada de “*Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field*”<sup>15</sup>

Aunque está ampliamente reconocido que los trofoblastos endovasculares sustituyen el endotelio materno durante el remodelado de las arterias espirales, los mecanismos moleculares subyacentes permanecen insuficientemente elucidados. La evidencia actual sugiere que los EVT experimentan una reprogramación fenotípica con pérdida de rasgos epiteliales y adquisición de propiedades endoteliales (mimetismo endotelial), caracterizado por la expresión de cadherina endotelial endovascular, integrinas, metaloproteasas y factores angiogénicos<sup>16-18</sup>.

La capacidad invasiva de las células EVT comparte notables similitudes con la invasión tisular, angiogénesis y evasión inmune propias de la progresión tumoral<sup>19-21</sup>. Se ha postulado que las células cancerosas reactivan programas genéticos embrionarios donde genes placentarios clave se encuentran sobreexpresados. No obstante, la diferencia fundamental radica en la regulación, dado que en la placentación este fenotipo invasivo se limita estrictamente al sitio de implantación, mientras que en el cáncer se desregula, favoreciendo así la metástasis<sup>22</sup>.

### 1.2.3. Consecuencias patológicas de fallas en el remodelado vascular

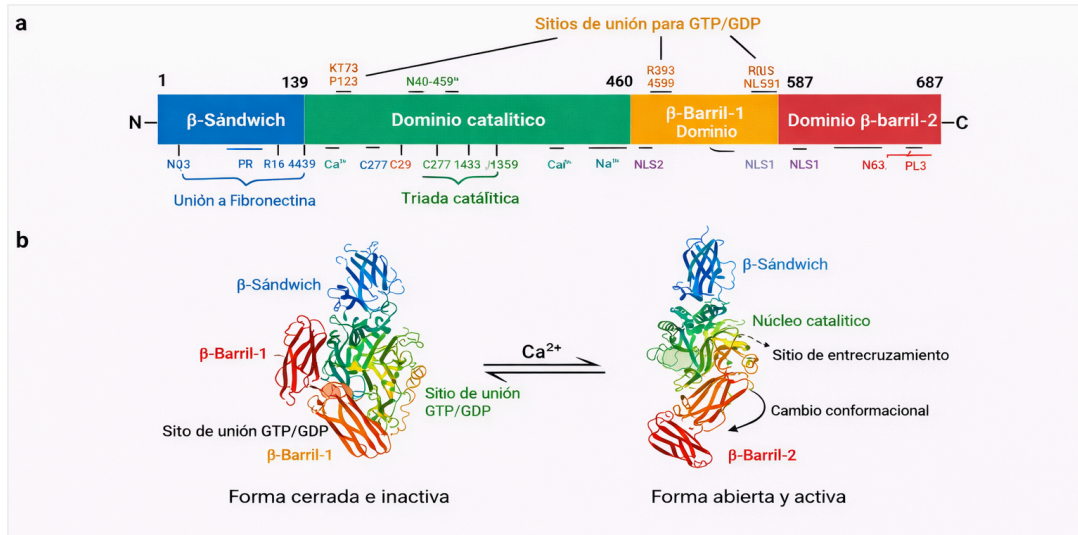
La invasión extravascular incompleta o superficial compromete el remodelado arterial, resultando en vasos de alta resistencia que pueden llevar a PE, restricción del crecimiento intrauterino y parto pretérmino, ruptura prematura de membrana y abortos espontáneos tardíos <sup>23</sup>.

## 1.3. Transglutaminasa tisular: funciones y relevancia biológica

### 1.3.1. Estructura y distribución de la TG2

La transglutaminasa tisular (TG2), codificada por el gen *TGM2*, es una proteína monomérica de aproximadamente 78 kDa (686 aminoácidos) perteneciente a la familia de transglutaminasas dependiente de calcio. Presenta cuatro dominios conservados: un dominio N-terminal tipo  $\beta$ -sándwich que contiene sitios de unión a fibronectina e integrina, un dominio catalítico que alberga la tríada catalítica responsable de su actividad transamidasa (TGasa), y dos dominios C-terminales tipo  $\beta$ -barril que regulan la unión a nucleótidos de guanina (GTP/GDP) y a otras proteínas regulatorias (Figura 5) <sup>24</sup>.

Esta proteína exhibe una amplia distribución celular, localizándose en múltiples compartimentos en donde ejerce funciones específicas. Predomina en el citosol, donde su actividad TGasa cataliza modificaciones postraduccionales que modulan la señalización celular y la estabilidad proteica. En el núcleo, interactúa con histonas y factores de transcripción para regular la expresión génica. A nivel mitocondrial, regula complejos respiratorios y participa en la apoptosis. En la membrana plasmática, se asocia con receptores acoplados a proteínas G y receptores de angiotensina II, contribuyendo a la transducción de señales <sup>24-26</sup>. Finalmente, al secretarse al espacio extracelular, interactúa con componentes de la MEC actuando como una proteína puente que modula procesos de adhesión celular, migración y remodelado tisular <sup>27</sup>.



**Figura 5: Estructura y regulación conformacional de la TG2.** (A) Organización de los dominios de TG2, incluyendo el dominio β-sándwich, el dominio catalítico y los dominios β-barril, junto con los principales sitios de unión a GTP/GDP y regiones funcionales relevantes. (B) Representación de los cambios conformacionales de TG2, la unión de calcio favorece la conformación activa mientras que la unión de GTP/GDP estabiliza la conformación inactiva. Tomada de “*Pathogenic contributions and therapeutic implications of transglutaminase 2 in neurodegenerative diseases*”<sup>26</sup>.

### 1.3.2. Funciones catalíticas y no catalíticas

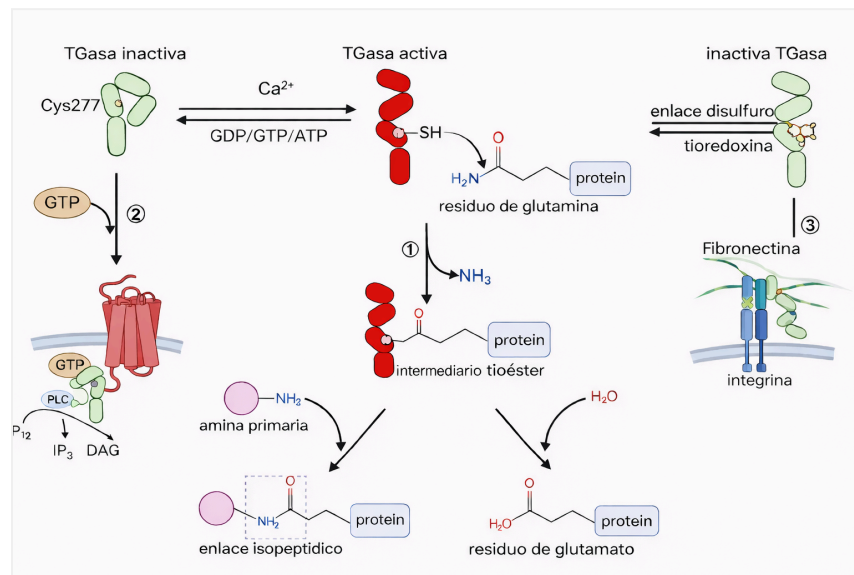
La TG2 es el miembro más ampliamente distribuido de la familia de las transglutaminasas y se caracteriza por su notable versatilidad funcional, ya que integra tanto actividades catalíticas como no catalíticas, las cuales dependen de su localización celular, su conformación y sus interacciones proteicas (Figura 6).

Su función enzimática principal es la actividad TGasa dependiente de calcio, mediante la cual cataliza modificaciones postraduccionales en proteínas sustrato. Esta actividad genera enlaces isopeptídicos inter e intramoleculares entre los grupos  $\gamma$ -carboxamida de residuos de glutamina y grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina, contribuyendo a la estabilización estructural y al remodelado de redes proteicas tanto en el espacio intracelular como en la MEC. El mecanismo catalítico se inicia con la acilación del residuo de cisteína del sitio activo por el grupo  $\gamma$ -carboxamida de una glutamina sustrato, liberando amoníaco y formando un intermediario tioéster enzima-sustrato. Posteriormente, este intermediario es atacado por un grupo amino nucleofílico, el cual puede provenir del grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina o de una amina primaria, lo que da lugar a la formación de un enlace isopeptídico estable. Alternativamente, su

hidrólisis conduce a una reacción de desamidación que convierte el residuo de glutamina en glutamato <sup>24,26</sup>.

TG2 exhibe otras actividades enzimáticas independientes de calcio, como la hidrólisis de GTP que le confiere un rol similar al de una proteína G en vías de transducción de señales así como también capacidades de proteína disulfuro isomerasa y quinasa. Complementariamente, ejerce funciones no catalíticas como proteína adaptadora o de andamiaje en la MEC, facilitando la adhesión celular y ensamblaje de la matriz al interactuar con proteínas como fibronectina e integrinas <sup>25</sup>.

Esta diversidad funcional posiciona a la TG2 como un regulador clave en procesos fisiológicos, tales como el desarrollo tisular, la angiogénesis y la respuesta al estrés celular, así como también en la participación en múltiples patologías.



**Figura 6: Representación esquemática de las principales funciones de TG2 y su regulación.** El aumento de calcio induce un cambio conformacional que activa la actividad transamidasa, permitiendo la formación de un intermediario tioéster entre el residuo catalítico y un residuo de glutamina de la proteína sustrato. Este intermediario puede resolverse en una transamidación o deamidación según el nucleófilo que ataque al intermediario. Además, TG2 puede participar en vías de señalización celular mediante su unión a GTP y en proceso de adhesión celular a través de su interacción con fibronectina e integrina. Tomada de “*Tissue transglutaminase: a multifunctional and multisite regulator in health and disease*” <sup>24</sup>.

### 1.3.3. Regulación de la actividad, expresión y localización

La actividad de la TG2 está finamente regulada por calcio, nucleótidos de guanina (GTP/GDP), el estado redox del ambiente celular y diversas modificaciones postraduccionales, los cuales inducen cambios conformacionales entre una forma cerrada e inactiva y una abierta catalíticamente activa. En el interior celular, bajas concentraciones de calcio y elevados niveles de GTP inhiben la actividad TGasa mientras favorecen su participación en la transducción de señales. No obstante, los aumentos citosólicos de calcio inducidos por estímulos celulares como estrés resultan suficientes para estimular su actividad TGasa (Figura 6).

En el medio extracelular, las elevadas concentraciones de calcio y los bajos niveles de GTP favorecen la actividad TGasa. Sin embargo, la oxidación ambiental puede inactivar su actividad al generar puentes disulfuro en su sitio catalítico, los cuales pueden revertirse por acción de la tiorredoxina presente en dicho compartimento (Figura 6). Adicionalmente, modificaciones postraduccionales como la fosforilación, nitrosilación y acetilación modulan su actividad, estabilidad y localización celular <sup>24-26</sup>.

La expresión génica de *TGM2* se encuentra regulada por diversos mecanismos que actúan a nivel epigenético, transcripcional y postranscripcional, permitiendo una respuesta precisa y adaptativa frente a estímulos tanto fisiológicos como patológicos.

A nivel epigenético, el estado de metilación del promotor y modificaciones de histonas determinan la accesibilidad transcripcional. A nivel transcripcional, el promotor contiene múltiples elementos de respuesta para factores de transcripción (ácido retinoico, NF- $\kappa$ B, HIF-1 y TGF- $\beta$ ), permitiendo inducción por inflamación, estrés oxidativo e hipoxia. En particular, citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 activan la expresión del gen mediante la vía de NF- $\kappa$ B. La TG2 y el factor NF- $\kappa$ B establecen un circuito de retroalimentación positiva, en el cual la TG2 mediante su actividad TGasa promueve la degradación del inhibidor de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ), facilitando la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. A su vez, este factor induce la expresión de *TGM2*, lo que permite la amplificación de respuestas inflamatorias. A nivel postranscripcional, el empalme alternativo genera isoformas con implicancias funcionales que requieren mayor elucidación <sup>24-26</sup>.

## 1.4. TG2 en la interfaz materno-fetal

### 1.4.1. Expresión y función de TG2 en la interfaz materno-fetal fisiológica

La TG2 se expresa ampliamente en la placenta humana, mostrando una regulación espacio temporal a lo largo del desarrollo placentario. Diversos estudios han demostrado su presencia en trofoblasto y células estromales tanto durante el primer trimestre como a término, y su expresión se encuentra regulada por la progesterona <sup>28-30</sup>.

TG2 se localiza en la superficie celular de trofoblastos extravellositarios en cultivos primarios y en líneas celulares placentarias (JEG-3 y Swan-71). Funcionalmente, contribuye a la fisiología trofoblástica mediante su actividad TGasa y también a través de funciones adhesivas independientes de esta actividad. La TG2 superficial coregula vías de señalización mediadas por integrinas y promueve el ensamblaje de complejos de adhesión celular <sup>31</sup>, mientras que su actividad enzimática estabiliza vesículas extracelulares (exosomas y micropartículas) liberadas por el STB hacia la circulación materna <sup>32</sup>.

### 1.4.2. Papel de TG2 en patologías de la gestación

Algunos estudios han reportado alteraciones en la expresión y función de TG2 en placentas de embarazos con desenlaces adversos. Investigaciones recientes de nuestro grupo, utilizando la línea trofoblástica Swan-71, en un microambiente de hipoxia e inflamación, demostraron que la hipoxia química reduce la migración celular, en forma concomitante con una disminución en la expresión de TG2 y de mediadores invasivos (IL-6 y MMP-2). Estos hallazgos indican que TG2 participa en la migración trofoblástica y sugieren su posible implicación en complicaciones gestacionales asociadas a hipoxia persistente, en donde se ve afectada la remodelación vascular <sup>33</sup>. No obstante, estos resultados provienen principalmente de modelos *in vitro* bajo condiciones experimentales específicas, lo que limita su extrapolación directa a la fisiología del trofoblasto *in vivo*.

En PE, una patología hipertensiva del embarazo caracterizada por placentación deficiente, inflamación e hipoxia, se ha demostrado que la TG2 desempeña un papel clave en su fisiopatología. Su expresión se induce por citoquinas proinflamatorias y por factor inducible por

hipoxia (HIF-1), y los pacientes presentan niveles elevados de actividad TGasa. Además, los niveles plasmáticos de TG2 se correlacionan con severidad clínica (hipertensión y proteinuria) y biomarcadores de disfunción endotelial. Por otro lado, la activación del receptor de angiotensina II (AT1R) provoca la liberación de calcio que activa la TG2, la cual puede modificar postraduccionalmente estos receptores, generando neoantígenos que inducen la producción de autoanticuerpos anti-AT1R, que exacerbaban la PE en modelos experimentales <sup>24,34</sup>.

A pesar de los avances recientes, la evidencia disponible sobre el papel de TG2 en la fisiología del trofoblasto endovascular es aún limitada. La mayoría de los estudios se han centrado en modelos tumorales o en la caracterización de su expresión, sin abordar de manera integral su función en procesos clave como la migración, la adquisición del fenotipo endovascular y la respuesta inflamatoria en la interfaz materno-fetal. Dado que la invasión trofoblástica comparte mecanismos similares con la progresión tumoral <sup>21,35</sup>, los hallazgos sobre TG2 en células cancerosas constituyen un punto de partida prometedor para explorar su función en el trofoblasto <sup>36,37</sup>. En este sentido, resulta necesario profundizar en el estudio de TG2 en modelos trofoblásticos que permitan comprender su contribución al remodelado vascular placentario.

## **1.5. Hipótesis y Objetivos**

Nuestra hipótesis de trabajo supone que la enzima TG2 está implicada en los procesos biológicos que median el remodelado vascular durante la gestación. Los cambios en la actividad de TGasa o

la interferencia de sus funciones pueden afectar el fenotipo invasivo y endovascular del trofoblasto, impactando en el desarrollo adecuado de las estructuras vasculares placentarias.

### **Objetivo General**

Evaluar el papel de la actividad TGasa de la TG2 durante el proceso de remodelado vascular en la interfaz materno-fetal.

### **Objetivos específicos:**

- i. Analizar la expresión de la enzima TG2 en líneas celulares trofoblásticas de primer trimestre y su actividad TGasa tanto en condiciones basales como en presencia de un inhibidor de dicha actividad.
  
- ii. Analizar el efecto de la modulación de la actividad TGasa de la TG2 en líneas celulares trofoblásticas de primer trimestre sobre procesos asociados a la adquisición del fenotipo invasor y endovascular.

## CAPÍTULO 2

### 2. METODOLOGÍA

Los reactivos generales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, USA a menos que sean indicados en el texto.

#### 2.1. Líneas celulares

La línea Swan-71 fue proporcionada por el Dr. Gil Mor, Universidad de Wayne (EE.UU) fue generada a partir de citotrofblastos primarios de placenta humana de primer trimestre, inmortalizados mediante transfección estable con el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa humana (hTERT), preservando así sus características fenotípicas no tumorales y capacidad de diferenciación <sup>38</sup>.

Por su parte, la línea HTR-8/SVneo fue cedida gentilmente por las Dras. María Eugenia Francia y Paula Faral del Laboratorio de Apicomplejos del Instituto Pasteur, Montevideo-Uruguay. Las células de esta línea comercial se obtuvieron de explantes de vellosidades coriónicas de placenta humana de primer trimestre mediante disociación enzimática y posterior inmortalización con transfección con ADNc codificante del antígeno T grande del virus SV40, resultando en células altamente invasivas que mantienen marcadores del trofoblasto extraveloso <sup>39</sup>.

#### 2.2. Mantenimiento de cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en botellas de 25 o 75 mm<sup>2</sup> hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia, en un incubador humidificado (Esco Lifesciences) a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La línea Swan-71 se cultivó en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM-F12, Capricorn Scientific) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Capricorn Scientific) y antibióticos (penicilina 6 mg/mL y estreptomina 10 mg/mL). Por su parte, HTR-8/SVneo se mantuvo en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Capricorn Scientific) 1640 con idéntica suplementación.

Para los ensayos, las células se despegaron mediante tripsina 2% (m/v) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 $\mu$ M en amortiguador fosfato salino (PBS). Las células se contaron utilizando cámara de Neubauer y se ajustó la densidad de siembra según los requerimientos específicos de cada ensayo descrito a continuación. Las células fueron mantenidas en cultivo hasta llegar a 10-15 pasajes.

### 2.3. Inmunofluorescencia indirecta

La localización celular y expresión de TG2 se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta siguiendo un protocolo previamente estandarizado <sup>40</sup>. Se sembraron 50 x 10<sup>3</sup> células/pozo sobre cubreobjetos xilanizados en placas de 24 pozos, permitiendo 16 horas de adhesión. Posteriormente, las células se fijaron con formaldehído al 3.7% (p/v) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (v/v) en PBS durante 15 minutos. Los sitios de unión no específicos se bloquearon incubando con una solución de BSA al 3% (p/v) y suero de cabra al 5% (v/v) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-TG2 (dilución 1:100, TGM2 D11A6 XP Rabbit mAb #3557, Cell Signalling Technology) diluido en PBS durante 24 horas a 4°C. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 594 (dilución 1:500, ab150080, Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, junto con DAPI (0.1  $\mu$ g/mL) para marcaje nuclear y faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (dilución 1:400, A12379, Thermo Fisher Scientific™) para visualización de filamentos de actina. Entre cada uno de los pasos se realizaron tres lavados con PBS-Tween-20® al 0.5% (v/v), y la especificidad de la inmunoreactividad se verificó omitiendo el anticuerpo primario. Las células se montaron con medio de montaje INOVA (508001, INOVA Diagnostics, Inc) y las imágenes se adquirieron mediante microscopía de fluorescencia (Eclipse E800, Nikon) con objetivos de 40X y 60X mediante el *software* NIS-Elements.

### 2.4. Western blot

Los extractos proteicos totales se obtuvieron de 2 x 10<sup>6</sup> células cultivadas en botellas de 75 mm<sup>2</sup>. Para ello, las células se despegaron con tripsina-EDTA, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se lavaron con PBS y se lisaron en 100  $\mu$ L de una solución de lisis (Tris 5 mM

pH 6.8; EDTA 20 mM; SDS 0,1% p/v; NP-4O 1% v/v) suplementado con 14  $\mu$ L de cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete™ 7X protease inhibitor cocktail, Roche) en hielo durante 15. Tras la centrifugación a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a - 20°C en buffer de carga (20  $\mu$ L de solución 6X: Tris-HCl 75 mM pH 7,1; SDS 3%;  $\beta$  - mercaptoetanol 3%; glicerol 15%; EDTA 0,15 M; azul bromofenol 0,15%) hasta su uso.

La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% bajo condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las muestras, en buffer de carga, se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalización proteica. Se cargaron 20  $\mu$ L de extracto por carril, junto con 6  $\mu$ L del marcador de peso molecular preteñido (Pierce™ Prestained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific™) y 5  $\mu$ L de TG2 de cobayo como control positivo. La migración se efectuó en buffer de corrida (Tris 11 mM, glicina 100 mM, SDS 1%) a 90V constante hasta atravesar el gel de concentración, y luego a 120V hasta completar la corrida.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Brevemente, la membrana se hidrató con metanol y se equilibraron tanto la membrana como el gel de acrilamida en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 15%). La transferencia se realizó en sistema semiseco durante 45 minutos a un amperaje constante de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de membrana. Posterior a la transferencia, las membranas se bloquearon con PBS-Tween 0.5% durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y se incubaron durante 16 horas a 4°C con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-TG2 (dilución 1:500, D11A6, #3557, Cell Signalling Technology) preparado en PBS-BSA 1% (p/v) Tween-20® 0.05% (v/v). Tras tres lavados con PBS-Tween 0.05%, se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado a peroxidasa (1:2000, #65-6120, Invitrogen) en PBS-BSA 1% (p/v) Tween-20® 0.05% (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante un sistema quimioluminiscente (RPN2232, Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, Cytiva) y las imágenes se adquirieron mediante el equipo GBOX Chemi System (SYNGENE) utilizando el *software* GeneSys.

## 2.5. Ensayo de viabilidad celular mediante resazurina

La actividad metabólica de las células se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de resazurina, que mide la capacidad reductasa mitocondrial de las células viables mediante la reducción de resazurina (sustrato azul, abs 600 nm) a resorufina (producto rosado, abs 570 nm). Se sembraron  $50 \times 10^3$ /pozo en placas de 48 pozos y se incubaron durante 24 horas para adhesión completa. Posteriormente, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco suplementado con un inhibidor específico de la actividad TGasa, dihidrocloruro de cistamina (CTA), en concentraciones finales de 1 mM y 3 mM, incubando durante 24 horas adicionales a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de tratamiento y se adicionaron 150 µL/pozo de una solución de resazurina preparada a 50 µg/mL en PBS. Las placas se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, se transfirieron 100 µL del sobrenadante de cada pozo a una placa de 96 pozos apta para la lectura espectrofotométrica, donde se midió la absorbancia a 560 nm y 600 nm en un lector de placas (Labsystem multiskan MS).

El cálculo del índice metabólico se realizó mediante el cociente de absorbancia 560 nm / absorbancia 600 nm, siendo proporcional al número de células metabólicamente activas. La viabilidad relativa se expresó como % viabilidad = [(índice metabólico del tratamiento) / promedio del índice metabólico del control) x 100].

## 2.6. Ensayo de actividad de transamidación (TGasa)

La actividad TGasa se cuantificó mediante un ensayo basado en la capacidad de TG2 de incorporar aminas primarias a proteínas sustrato. Para ello, se utilizó un sustrato específico biotilado, que aporta un grupo amino y una biotina. La enzima incorpora el grupo amino de este sustrato a las proteínas, quedando estas marcadas con biotina, lo que permite su detección posterior mediante estreptavidina conjugada a un fluorocromo (PE-Cy5) y su cuantificación por citometría de flujo a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI).

Se sembraron  $100 \times 10^3$ /pozo en placas de 12 pozos y se cultivaron durante 24 horas para permitir su adhesión. Las células se incubaron durante 6 horas en condiciones sin suero, en presencia o ausencia de CTA (1 o 3 mM). Durante los últimos 30 minutos de incubación, se añadió 1 mM de 5-(biotinamido)-pentilamina (BP; Thermo Fisher Scientific™) como sustrato específico de TG2. Se incluyeron controles sin BP para evaluar la biotina endógena.

Las células se cosecharon con Accutase (Thermo Fisher Scientific™), se marcaron con una sonda de viabilidad (dilución 1:500 Zombie Green®, Biolegend) durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz, y se fijaron/permeabilizaron con el sistema *FCM Permeabilization System* (Santa Cruz Biotechnology) según las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se incubaron con estreptavidina-PE-Cy5 (BioLegend) durante 30 minutos en hielo para detectar el BP incorporado.

Tras lavados finales con solución FACS (PBS con EDTA 2 mM, BSA 0.1% p/v), las células se resuspendieron y analizaron en el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences), incluyendo controles de autofluorescencia y compensación especial. Los datos se procesaron con el *software* FlowJo (BD Biosciences). La actividad TGasa se estimó mediante la intensidad media de fluorescencia (MFI) en el canal PE-Cy5, normalizada respecto al control sin BP, y expresada como el porcentaje relativo a la condición basal.

## 2.7. Ensayo de cicatrización de herida

La capacidad migratoria de las células se evaluó mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Las células se sembraron a una densidad de  $40 \times 10^3$ /pozo (Swan-71) y  $50 \times 10^3$ /pozo (HTR-8/SVneo) en placas de 48 pozos y se cultivaron durante 24 horas hasta obtener monocapas en un 90% de confluencia. La herida se generó raspando la monocapa con una punta de una micropipeta de 200  $\mu$ L y lavando con PBS para eliminar los restos flotantes.

Se aplicaron tratamientos con CTA (0, 1 o 3 mM) en combinación con diferentes concentraciones de FBS (0%, 1% o 10%) durante 8 horas para Swan-71 o 16 horas para HTR-8/SVneo, tiempos inferiores a su duplicación celular para evitar efectos proliferativos. Las imágenes de la herida se capturaron a tiempo cero ( $t=0$ ) y tiempo final utilizando un microscopio

invertido acoplado a cámara (AxioCam ERc 55 microscope, Zeiss). El área de la herida se midió en el *software* Fiji/ImageJ (programa de fuente abierta, OSS) y el porcentaje de cierre de herida se calculó como: % cerrado = [(área inicial - área final) / área inicial] x 100

## 2.8. Detección de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo

La producción de interleuquina-6 (IL-6) en los sobrenadantes de cultivo se cuantificó mediante ELISA de captura. Para ello, las células Swan-71 y HTR-8/SVneo se cultivaron en medio DMEM o RPMI, respectivamente, bajo condiciones de FBS (0, 1 y 10%) y tratadas con CTA (0, 1 y 3 mM en Swan-71; 0 y 1 mM en HTR-8/SVneo).

La cuantificación se realizó utilizando kits comerciales DUOSET (#DY206, *R&D Systems*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas de 96 pozos se sensibilizaron con 100  $\mu$ L/pozo de anticuerpo de captura anti-IL-6 diluido en PBS durante 16 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20® 0.05% y se bloqueó con 200  $\mu$ L de PBS-BSA 1% (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubó con 100  $\mu$ L/pozo de sobrenadantes de cultivo o estándares de IL-6 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubó con 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo de detección biotinilado anti-IL-6 en PBS-BSA 1% (p/v), seguido de 100  $\mu$ L estreptavidina conjugada a peroxidasa en PBS-BSA 1% (p/v) durante 20 minutos en oscuridad. Luego de los lavados, la reacción enzimática se desarrolló al adicionar 100  $\mu$ L de sustrato TMB (buffer acetato de sodio 0,1 M pH 5,5; tetrametilbencidina 6 mg/mL en DMSO;  $H_2O_2$  1%) durante 20 min en oscuridad a temperatura ambiente, deteniéndose con 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  2N. La absorbancia del TMB oxidado por peroxidasa se midió a 450 nm en un lector de placas (Labsystem Multiskan MS). Las concentraciones de IL-6 se determinaron interpolando las absorbancias de las muestras en la curva estándar.

## 2.9. Ensayo de formación de estructuras tubulares tipo endotelio

El ensayo de formación de estructuras tubulares se utilizó como modelo *in vitro* para evaluar la adquisición del fenotipo endovascular de las células trofoblásticas. Se sembraron 50  $\mu$ L/pozo de Geltrex (Thermo Fisher Scientific™) mantenido a 4°C en placas de 96 pozos y se permitió la polimerización durante 20 minutos a 37°C. Sobre esta matriz solidificada se sembraron  $10 \times 10^3$

células/pozo en 100  $\mu$ L de medio DMEM-F12 (Swan-71) o RPMI-1640 (HTR-8/SVneo), en ausencia o suplementado con 1% de FBS, y en presencia/ausencia de CTA 1 mM.

Las placas se incubaron durante 6 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en atmósfera humidificada. Transcurrido este tiempo, las redes tubulares formadas se documentaron fotografiando tres campos representativos por pozo mediante el microscopio óptico invertido (AxioCam ERc 55 microscope, Zeiss, 10x). El análisis cuantitativo automatizado se realizó con el plugin *Angiogenesis Analyzer de Fiji/ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD), evaluando los parámetros clave de la red: área media de las mallas (área promedio de los espacios cerrados delimitados por la red), el área total de las mallas (suma de todas las áreas), la longitud de los segmentos (suma de las prolongaciones entre uniones), la longitud total (incluye las ramas que terminan en extremos libres) y el número de uniones de la red (punto de intersección) <sup>41</sup>.

## 2.10 Expresión de los resultados y estadística

Los resultados se presentan como media  $\pm$  desvío estándar de la media (SE), las réplicas varían según el ensayo y se especifican en la sección correspondiente de resultados. Todos los análisis se realizaron en el programa Graph Pad Prism 8. La normalidad se evaluó mediante tests de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Para Swan-71 se realizó ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para HTR-8/SVneo se realizó t-test no pareado.

## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Evaluación de la expresión y actividad enzimática de TG2 en las líneas celulares Swan-71 y HTR-8/SVneo

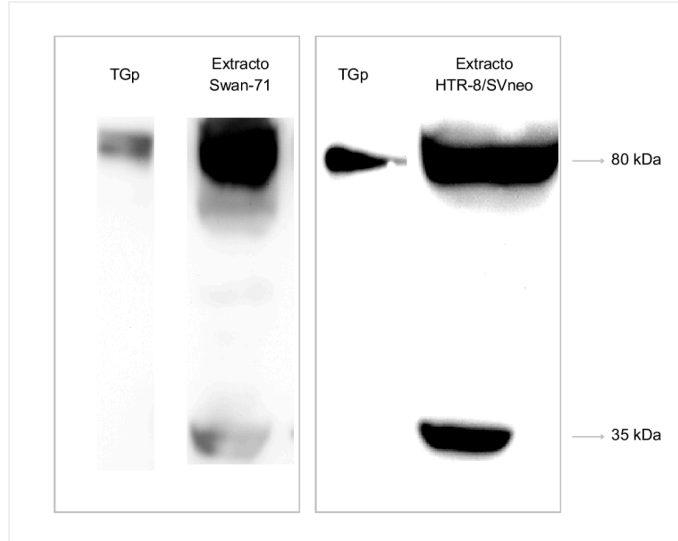
##### 3.1.1. Detección de TG2 en líneas trofoblásticas de primer trimestre

Dado que la expresión de TG2 en HTR-8/SVneo no había sido reportada previamente y que los reactivos validados en Swan-71 ya no están disponibles comercialmente<sup>33</sup>, optimizamos su detección mediante un nuevo anticuerpo monoclonal, evaluando tanto la expresión total por inmunoblot como la distribución celular por inmunofluorescencia indirecta en las líneas trofoblásticas Swan-71 y HTR-8/SVneo.

Los extractos proteicos totales revelaron una banda principal de aproximadamente 80 kDa en ambas líneas celulares, coincidente con el peso molecular esperado de TG2 y con el control positivo de TG2 purificada de cobayo. Adicionalmente, se observó una banda de menor peso molecular de aproximadamente 35 kDa, la cual podría corresponder a un fragmento de degradación generado por tripsinización durante la obtención de los extractos celulares (Figura 7).

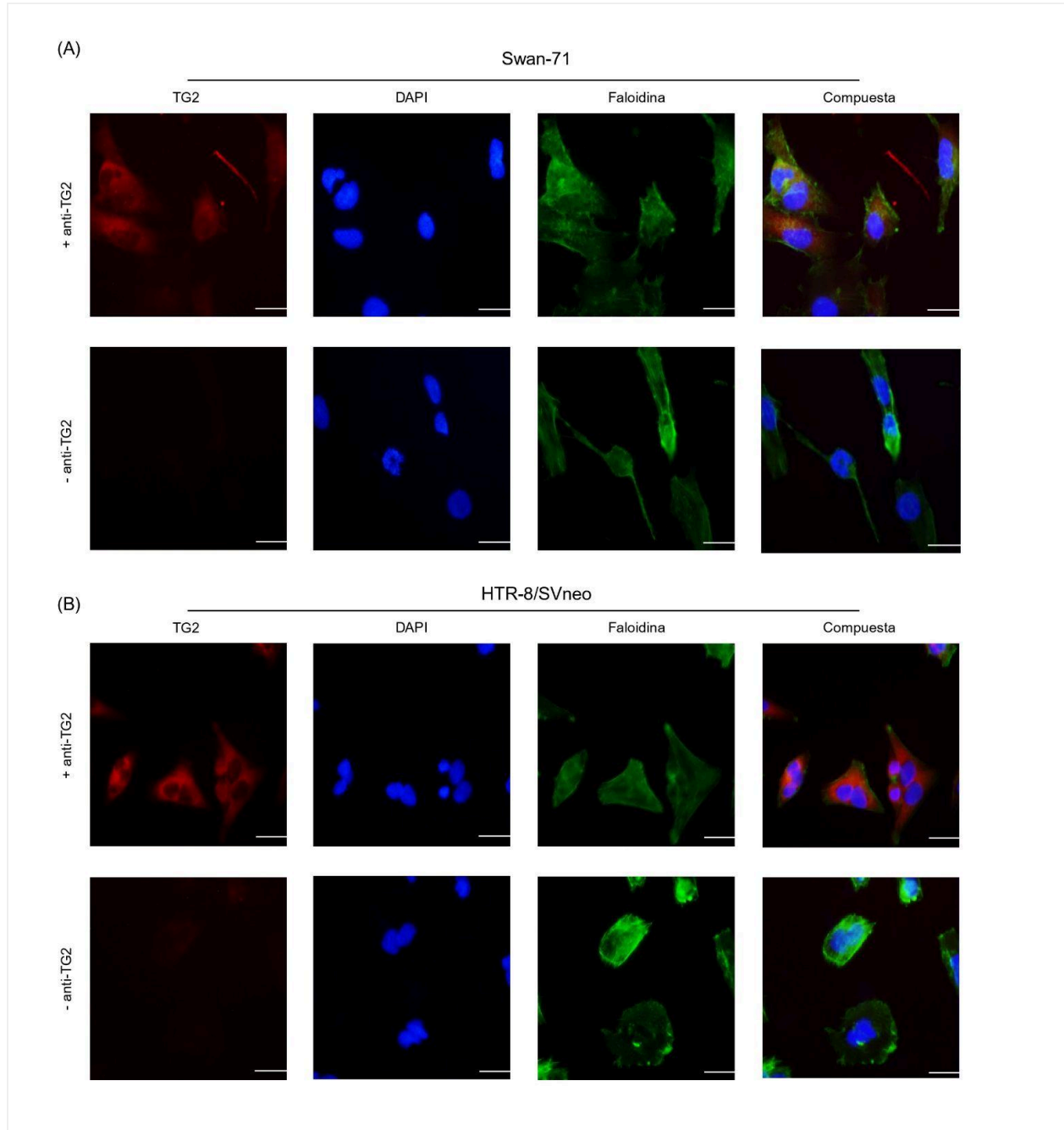
La inmunofluorescencia demostró una distribución predominantemente citoplasmática, difusa y homogénea en ambas líneas celulares, sin evidencia de acumulación en regiones específicas ni asociación evidente con estructuras subcelulares definidas. La morfología celular se preservó, lo que demostró que las condiciones de tinción no alteraron la integridad celular (Figura 8).

Estos resultados confirman la expresión constitutiva de TG2 en el citosol de ambas líneas celulares trofoblásticas de primer trimestre, sin compartimentalización especializada en estado basal.



**Figura 7: Detección de TG2 en extractos proteicos de Swan-71 y HTR-8/SVneo mediante inmunoblot.**

Proteínas separadas por SDS-PAGE (8%), transferidas a membrana PVDF e incubadas con anti-TG2 (1:500) y seguido de anti-IgG conjugado a peroxidasa (1:3000) revelado por quimioluminiscencia. TG2 purificada de cobayo (TGp) como control positivo.



**Figura 8: Localización de TG2 en líneas trofoblásticas de primer trimestre mediante inmunofluorescencia indirecta.**

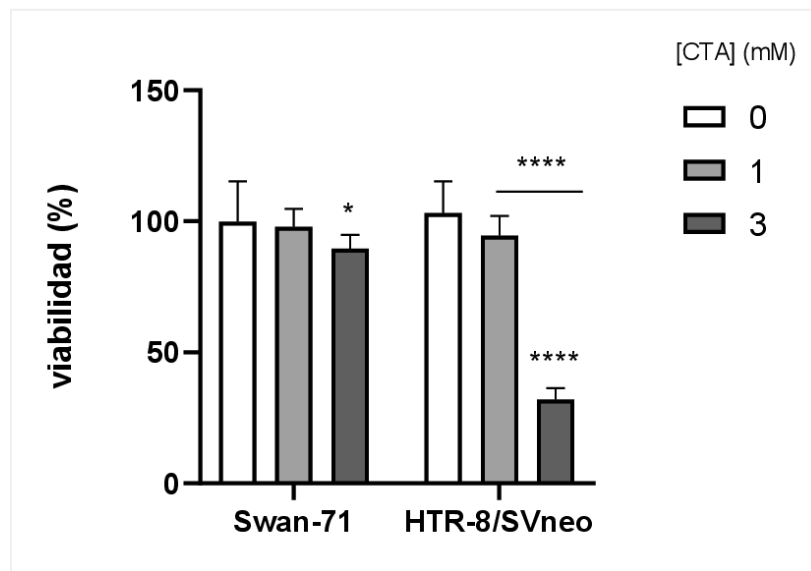
(A) Swan-71 (B) HTR-8/SVneo. Células fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas con anti-TG2 D11A6 (1:100) seguido de anti-IgG conjugado a Alexa Fluor 594 (rojo, 1:500). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los filamentos de actina con faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (verde). Las filas superiores corresponden a células incubadas con anticuerpo primario (+D11A6), las inferiores a controles sin primario (-D11A6). Las imágenes compuestas se muestran en la última columna. Aumento 60x. Barra de escala: 10  $\mu$ m.

### 3.1.2. Evaluación de la viabilidad celular mediante resazurina

La evaluación de la viabilidad celular constituye un requisito indispensable para atribuir efectos funcionales específicos a la inhibición de TG2, evitando interferencias por citotoxicidad inespecífica. Por ello, se analizó el impacto de dos concentraciones de CTA (1 mM y 3 mM) durante 24 horas sobre Swan-71 y HTR-8/SVneo mediante el ensayo colorimétrico de reducción de resazurina.

En células Swan-71, la adición de 3 mM de CTA indujo una reducción leve pero estadísticamente significativa de la viabilidad (90% vs control,  $p = 0.042$ ). En contraste, la línea HTR-8/SVneo evidenció una mayor sensibilidad a esta concentración, con una disminución marcada de la viabilidad (32% vs control,  $p < 0.00010$ ) (Figura 9).

Estos resultados justificaron la selección de 1 mM de CTA para los experimentos posteriores en HTR-8/SVneo, esta concentración minimiza los efectos citotóxicos que pudieran interferir con la interpretación de las respuestas celulares específicas.



**Figura 9: Viabilidad de Swan-71 y HTR-8/SVneo tras tratamiento con CTA.**

Las células fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de CTA y la viabilidad se determinó por reducción de resazurina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SE de dos experimentos representativos para cada línea. La significancia estadística se indica mediante asteriscos al comparar con la condición control \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

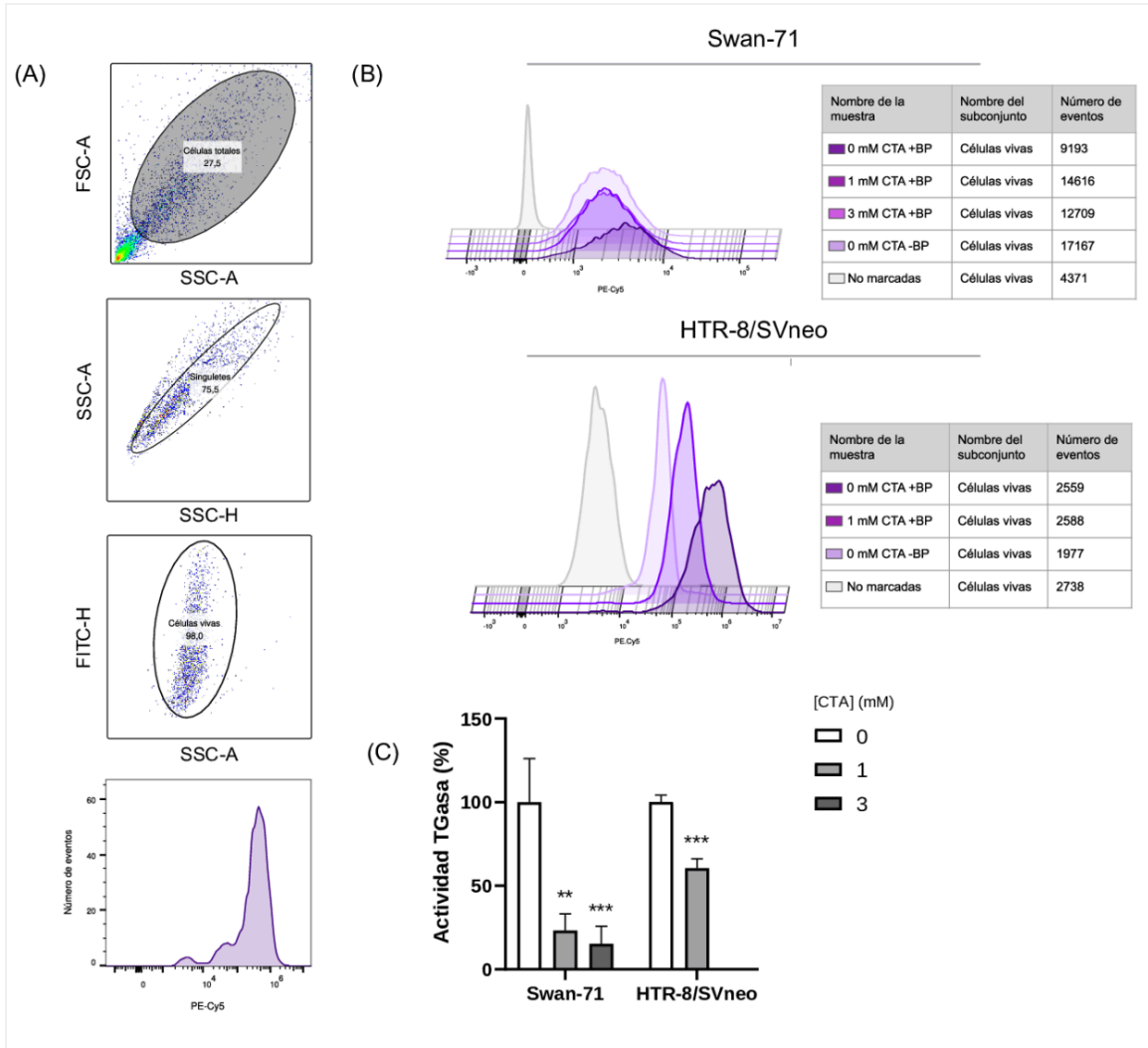
### 3.1.3. Evaluación de la actividad TGasa por citometría de flujo

Para evaluar la actividad funcional de TG2 y su modulación por el inhibidor CTA, se cuantificó la actividad TGasa en ambas líneas celulares. Esta actividad se basa en la capacidad de la enzima de incorporar grupos amino a proteínas sustrato, lo cual fue evaluado mediante la incorporación de biotina-pentilamina (BP) y su posterior detección por citometría de flujo.

El análisis de citometría se realizó aplicando una estrategia de *gating* secuencial. Inicialmente, se seleccionaron las células según su tamaño y complejidad interna (FSC-A/SSC-A), excluyendo detritos y dobletes. Posteriormente, se identificó la población viable mediante colorante de exclusión (FITC). Finalmente, en esta población se cuantificó la intensidad media de fluorescencia (MFI) del canal PE-Cy5, directamente proporcional a la incorporación del sustrato BP (Figura 10A).

La actividad TGasa remanente fue significativamente menor en las células tratadas con CTA respecto al control en ambas líneas celulares (Figura 10B y 10C). En Swan-71, la adición de 1 mM de CTA redujo la actividad en un 77% respecto al control ( $p = 0.013$ ), mientras que 3 mM de CTA produjo una reducción del 85% ( $p = 0.00040$ ). En HTR-8/SVneo, la adición de 1 mM de CTA disminuyó la actividad al 40% respecto al control ( $p = 0.00020$ ).

Estos resultados confirman la capacidad de CTA para inhibir la actividad de TG2 en trofoblastos de manera dosis-dependiente, lo que convierte a este inhibidor en una herramienta para modular la función enzimática de TG2 y evaluar consecuentemente los procesos celulares dependientes de esta enzima.



**Figura 10: Evaluación de la actividad transglutaminasa (TGasa) en células Swan-71 y HTR-8/SVneo tratadas con CTA determinada por citometría de flujo.**

(A) Estrategia de *gating* empleada en el análisis por citometría. (B) Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia de PE-Cy5 en células vivas de Swan-71 (superior) y HTR-8/SVneo (inferior), tratadas con CTA (0,1 y 3 mM en Swan-71; 0 y 1 mM en HTR.8/SVneo). Los controles negativos corresponden a células no marcadas (control de autofluorescencia) y células incubadas sin CTA ni BP (control de señal de fondo y biotina endógena). (C) Los datos se expresan como porcentaje relativo de actividad TGasa, media  $\pm$  SE de dos experimentos por línea celular. La significancia estadística se indica mediante asteriscos al comparar con la condición basal \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

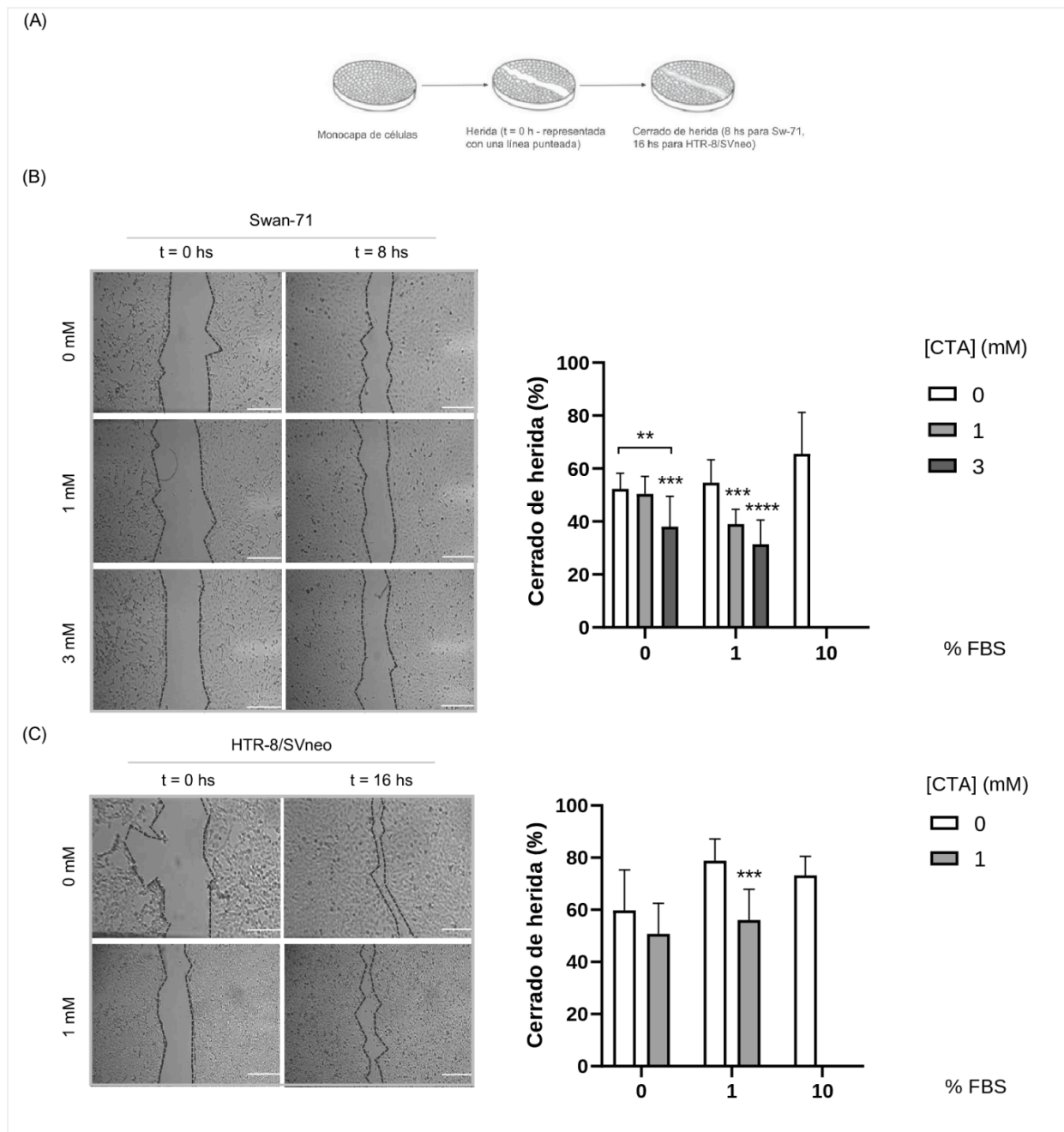
## **3.2. Efecto de la modulación de la actividad de TG2 sobre procesos asociados a la adquisición del fenotipo invasor y endovascular**

### **3.2.1. Ensayo de migración**

La migración de las células trofoblásticas desempeña un papel fundamental en la invasión del estroma y la remodelación de las arterias espirales maternas durante la placentación. Con el fin de evaluar la participación de la actividad TGasa de TG2 en este proceso, se realizaron ensayos de cierre de herida en ambas líneas celulares, tanto en condiciones basales como en presencia de CTA. En Swan-71 se utilizaron concentraciones de 1 y 3 mM de CTA, mientras que en HTR-8/SVneo se empleó únicamente 1 mM debido a la toxicidad observada a concentraciones mayores. Las células fueron cultivadas bajo diferentes condiciones de FBS (0, 1 y 10%), considerando el efecto promigratorio del FBS.

En ambas líneas celulares, la adición de FBS favoreció la migración en forma dosis dependiente, mientras que el tratamiento con CTA inhibió significativamente este proceso. En células Swan-71 incubadas en ausencia de FBS, la adición de 3 mM de CTA redujo la migración ( $p = 0.00090$ ), mientras que en presencia de 1% de FBS tanto 1 mM ( $p = 0.00010$ ) como 3 mM ( $p < 0.00010$ ) de CTA disminuyeron aún más el cierre de la herida respecto al control (Figura 11B). En los ensayos con las células HTR-8/SVneo, la condición de 1 mM de CTA en presencia de 1% de FBS también evidenció una inhibición significativa de la migración ( $p = 0.00020$ ) (Figura 11C). Por otra parte, la condición de 10% de FBS se empleó como control positivo de migración y cabe destacar que la suplementación con bajas concentraciones de FBS fue necesaria para detectar óptimamente el efecto inhibitorio de la CTA sobre la migración celular.

Estos resultados demuestran que la inhibición de la actividad TGasa mediante CTA reduce significativamente la migración de las células trofoblásticas de primer trimestre, lo que sugiere un rol funcional de esta enzima en la adquisición del fenotipo invasivo.



**Figura 11: Evaluación de la migración de Swan-71 y HTR-8/SVneo en presencia de CTA.**

(A) Esquema del ensayo de cierre de herida, se realiza una herida mecánica en la monocapa de células y se monitorea su cierre por migración celular. (B) Imágenes representativas del cerrado de la herida en ausencia de FBS y cuantificación del cierre en células Swan-71. Las imágenes fueron capturadas al inicio del ensayo (0 h) y a las 8 h, evaluando el efecto de distintas concentraciones de CTA (0, 1 y 3 mM). (C) Imágenes representativas del cerrado de la herida en ausencia de FBS y cuantificación del cierre de la herida en células HTR-8/SVneo tratadas con dos concentraciones de CTA (0 y 1 mM), analizadas a las 16 h. Los resultados se expresan como porcentaje de cerrado de la herida, media  $\pm$  SE de dos experimentos por línea celular.

La significancia estadística se indica mediante asteriscos al comparar con la condición basal \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

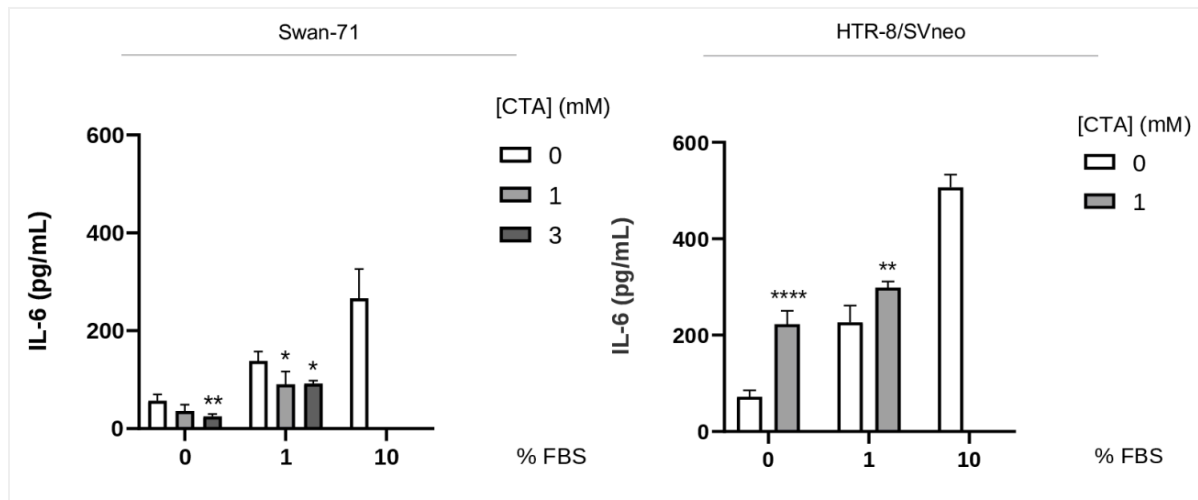
### 3.2.2. Evaluación de la producción de IL-6

La interleuquina-6 (IL-6) actúa como una citoquina pro-invasora en trofoblastos, cuya secreción podría estar modulada por TG2 y el microambiente placentario. Para evaluar este efecto, se cuantificó la IL-6 en sobrenadantes de cultivo de Swan-71 y HTR-8/SVneo mediante ensayos de ELISA de captura.

En ambas líneas celulares se observó que el incremento en la concentración de FBS se correlacionó con mayores niveles secretados de IL-6, utilizándose la condición de 10% de FBS como control positivo de la estimulación.

En la línea Swan-71, el tratamiento con CTA provocó una disminución en la secreción de IL-6 de manera dependiente de su concentración. Este efecto fue particularmente evidente en presencia de 1% de FBS, donde se registraron reducciones significativas de los niveles de secreción tanto con 1 mM ( $p = 0.016$ ) como con 3 mM ( $p = 0.019$ ) de CTA en comparación con el control (Figura 12). Por el contrario, en la línea HTR-8/SVneo el tratamiento con CTA indujo un aumento en la secreción de IL-6, alcanzando significancia estadística con 1 mM de CTA respecto al control ( $p = 0.0077$ ) (Figura 12).

Estos resultados sugieren una regulación diferencial de la secreción de IL-6 tras la inhibición de la actividad TGasa, con supresión en Swan-71 e inducción en HTR-8/SVneo, ambos efectos potenciados por la presencia de FBS. Tal comportamiento divergente sugiere la existencia de mecanismos celulares distintos entre estos subtipos trofoblásticos.



**Figura 12: Evaluación de la producción de IL-6 por parte de las líneas Swan-71 y HTR-8/SVneo.**

Células tratadas con CTA durante 24 horas en ausencia o presencia de FBS (1 y 10% FBS). Cuantificación por ELISA en sobrenadantes de cultivos. Los resultados se expresan como concentración de IL-6 (pg/mL), media  $\pm$  SE de dos experimentos por línea celular. La significancia estadística se indica mediante asteriscos al comparar con la condición basal \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 3.2.3. Formación de estructuras tubulares (ensayo de tubulogénesis)

Diversos estudios han demostrado que las células trofoblásticas de primer trimestre adquieren un fenotipo endovascular esencial para el remodelado vascular placentario <sup>42</sup>. Dado el efecto inhibitorio de CTA sobre la migración y su modulación en la secreción de IL-6, se evaluó el impacto de este inhibidor en ensayos de tubulogénesis en Swan-71 y HTR-8/SVneo sobre Geltrex, en presencia o ausencia de 1 mM de CTA y diferentes concentraciones de FBS. Este ensayo modela *in vitro* la capacidad de estas células para organizarse en estructuras tubulares similares a la de los vasos sanguíneos.

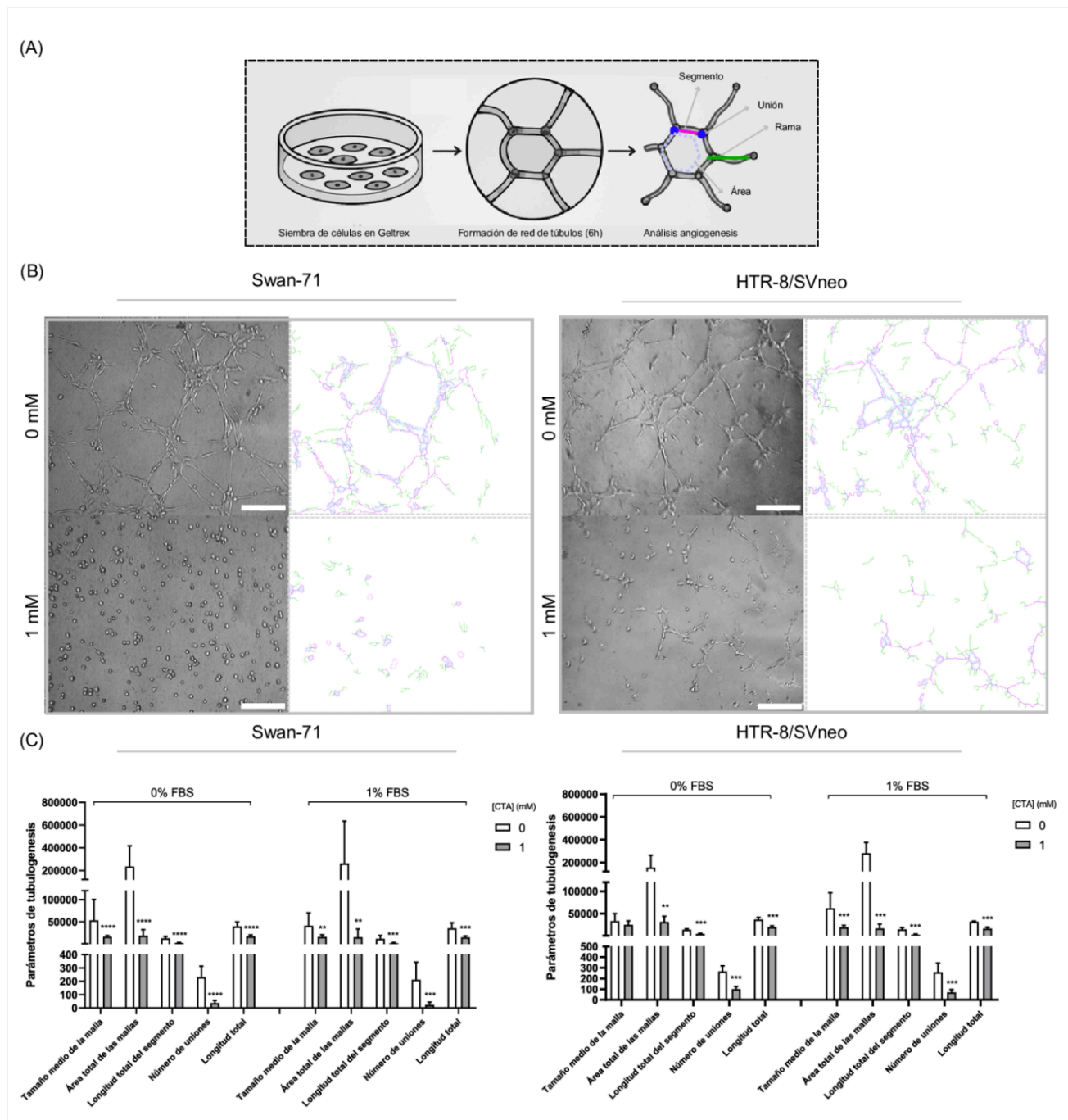
La inhibición de TG2 con 1 mM de CTA redujo significativamente la tubulogénesis en ambas líneas celulares, independientemente de la concentración de FBS utilizada (Figura 13B y C).

En la línea Swan-71, en presencia de 1% de FBS, se observó una disminución marcada en todos los parámetros que describen la red, incluyendo el área media de la malla ( $p = 0.0012$ ), el área

total de las mallas ( $p = 0.0033$ ), la longitud total de segmentos ( $p = 0.00040$ ), la longitud total de la red ( $p = 0.00010$ ) y el número de uniones ( $p = 0.00010$ ).

De manera consistente, en la línea HTR-8/SVneo, en presencia de 1% de FBS, se observó un patrón similar, con reducciones significativas en el área media de la malla ( $p = 0.00010$ ), el área total de las mallas ( $p = 0.00010$ ), la longitud total de los segmentos ( $p = 0.00010$ ), la longitud total ( $p = 0.00020$ ) y el número de uniones ( $p = 0.00010$ ).

Estos resultados sugieren que la actividad TGasa es necesaria para la formación de redes tubulares estables y complejas, una característica asociada al fenotipo endotelial del trofoblasto.



**Figura 13. Evaluación de la formación de estructuras tubulares tipo endotelio en células Swan-71 y HTR-8/SVneo bajo tratamiento con CTA.**

(A) Esquema del ensayo de tubulogénesis. Las células se sembraron sobre Geltrex en presencia o ausencia de CTA e incubaron durante 6 horas. La formación de redes tubulares se cuantificó mediante el *plugin Angiogenesis Analyzer de Fiji/ImageJ*, que genera mapas donde los segmentos aparecen en rosa, las uniones en azul, las ramas en verde y las mallas en cian. (B) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fase (10x) y sus correspondientes mapas de análisis generados para Swan-71 (panel izquierdo) y HTR-8/SVneo (panel derecho) ambas en condiciones control y 1 mM en presencia de 0% de FBS. (C) Cuantificación de los parámetros de tubulogénesis: tamaño medio y área total de la malla, longitud total de segmento, número de uniones y longitud total evaluados en las condiciones de 0% y 1 % de FBS. Los resultados se expresan como parámetros de

tubulogenesis, media  $\pm$  SE, de dos experimentos por línea celular. La significancia estadística se indica mediante asteriscos al comparar con la condición basal \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Test de Mann-Whitney. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$

## CAPÍTULO 4

### 4. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la inhibición de la transglutaminasa tisular (TG2) reduce significativamente la formación de estructuras tubulares en líneas trofoblásticas de primer trimestre. Este efecto se acompañó de una disminución en la migración celular y de una modulación en la producción de IL-6, sin comprometer la viabilidad celular. Estos resultados sugieren que la actividad TGasa de TG2 podría participar en procesos asociados a la adquisición de características endovasculares del trofoblasto, y respaldan su participación en procesos clave del remodelado vascular en la interfaz materno-fetal.

La expresión de TG2 fue confirmada por inmunoblot con una banda principal de ~ 80 kDa en ambas líneas trofoblásticas, consistente con el control positivo de TG2 purificada, junto a una banda menor de ~ 35 kDa posiblemente atribuible a degradación proteolítica durante la preparación de extractos o a la detección de variantes de *splicing* reportadas previamente. Estos resultados concuerdan con reportes previos en Swan-71<sup>33,43</sup> y extienden la evidencia a la línea HTR-8/SVneo.

La distribución citoplasmática difusa es consistente con un estado basal de TG2, cuya localización subcelular y activación son dinámicas según los niveles de calcio o el estado redox. En este sentido, sería interesante evaluar si, bajo condiciones que promuevan la migración o la formación de estructuras tubulares, la TG2 experimenta una redistribución hacia regiones específicas como la membrana plasmática o la matriz extracelular. Este enfoque permitiría vincular de manera más directa su localización subcelular con los fenotipos funcionales observados tras la inhibición de su actividad TGasa<sup>44-46</sup>.

La actividad TGasa de TG2 fue evaluada mediante citometría de flujo utilizando BP como sustrato, evidenciándose una reducción dosis dependiente tras el tratamiento con CTA en ambas líneas celulares. Si bien CTA es un inhibidor ampliamente utilizado, su carácter inespecífico debe ser considerado al interpretar estos resultados<sup>47</sup>, por lo que no puede descartarse que parte

de los efectos observados involucren mecanismos adicionales a la inhibición directa de TG2. No obstante, esta inhibición proporciona una base experimental sólida para analizar los efectos funcionales posteriores. En este contexto, se observaron diferencias en la sensibilidad al inhibidor entre las líneas, con Swan-71 mostrando una mayor reducción de la actividad en comparación con HTR-8/SVneo, lo que podría reflejar variaciones en la expresión basal de TG2, la accesibilidad del inhibidor o la activación de mecanismos compensatorios. En este sentido, la cuantificación de los niveles de ARN mensajero de TG2 permitiría evaluar si estas diferencias se asocian a cambios en su expresión génica basal entre ambas líneas celulares.

En términos funcionales, la inhibición de la actividad de TG2 se asoció con una disminución significativa de la migración celular en ambas líneas, evidenciado en ensayos de cierre de herida, particularmente en condiciones de baja suplementación con FBS. Este resultado sugiere que la TG2 podría participar en la regulación de la migración trofoblástica, posiblemente a través de su rol en la interacción célula-matriz. En este sentido, se ha descrito que TG2 puede localizarse en la superficie celular e interactuar con integrinas y componentes de la MEC, facilitando procesos de adhesión y migración <sup>31,48,49</sup>. La evaluación de esta interacción podría abordarse mediante estudios de inmunofluorescencia con marcaje simultáneo de TG2 y proteínas de la matriz extracelular como fibronectina o integrinas, que permita evaluar su posible colocalización y su modulación tras la inhibición de la actividad TGasa.

De manera complementaria, TG2 se puede externalizar mediante vías no clásicas, y asociarse a componentes de la MEC, donde cataliza el entrecruzamiento de sustratos como fibronectina y fibrinógeno, contribuyendo así a la estabilización y remodelado de la misma <sup>27,50-52</sup>. Estos hallazgos son consistentes con observaciones previas de nuestro grupo en Swan-71, donde la migración celular fue interferida por sueros con alto título de anticuerpos anti-TG2 y en condiciones de hipoxia <sup>33</sup>.

En modelos tumorales, la sobreexpresión de TG2 se ha asociado consistentemente con la adquisición de un fenotipo más agresivo, caracterizado por un aumento en la migración, invasión, capacidad metastásica y resistencia a terapias. En particular, se ha demostrado que la expresión de TG2 es suficiente para inducir transición epitelio-mesenquimal y promover

funciones invasivas en células epiteliales <sup>53</sup>, mientras que estudios posteriores han vinculado su sobreexpresión con movilidad celular, metástasis y peor pronóstico en diversos tipos tumorales <sup>54,55</sup>. Asimismo, el silenciamiento de TG2 conduce a una reducción de la expresión de marcadores mesenquimales y metaloproteasas de matriz, ambos involucrados en la transición epitelio-mesenquimal que sufren las células tumorales <sup>36,37</sup>. Si bien la invasión trofoblástica fisiológica y los procesos tumorales difieren en su regulación, ambos comparten mecanismos moleculares asociados a la adquisición de un fenotipo más migratorio e invasivo, incluyendo cambios en la adhesión celular y en la interacción con el microambiente <sup>35</sup>. En este contexto, nuestros resultados sugieren que TG2 podría participar en la invasión trofoblástica, en línea con mecanismos descritos en otros contextos celulares, posiblemente mediante interacción con la MEC incluyendo funciones adicionales más allá de su actividad TGasa.

En línea con estos resultados, se ha descrito que la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra TG2 afecta procesos angiogénicos, evidenciado por una disminución en la formación de estructuras tubulares *in vitro*, en la invasión y en la actividad de metaloproteasas en estudios con modelos de endotelio <sup>56,57</sup>. De forma consistente, en nuestros experimentos la inhibición de TG2 mediante CTA redujo la capacidad de formar estructuras tubulares, lo que sugiere que esta enzima podría participar no solo en la invasión temprana, sino también en procesos asociados a la adquisición del fenotipo endovascular. Considerando que la fibronectina ha sido descrita como un componente clave tanto para la migración como para la adquisición de características endoteliales por parte del trofoblasto <sup>58</sup> y que TG2 ha sido vinculada con la organización y funcionalidad de la MEC, es posible que la disminución observada en estos procesos responda, al menos en parte, a alteraciones en la interacción célula-matriz.

Dentro de los mecanismos moleculares compartidos entre la invasión trofoblástica y tumoral, la IL-6 ocupa un lugar relevante como modulador de procesos asociados al fenotipo invasivo <sup>35</sup>. En el contexto de la placentación, la IL-6 se expresa constitutivamente en el trofoblasto extraveloso y decidua durante el primer trimestre, donde sus receptores coexpresados permiten tanto efectos autocrinos como paracrinos. En HTR-8/SVneo, esta citoquina ha sido asociada con un aumento de la migración e invasión, mediado por la regulación de la expresión de integrinas y metaloproteasas, así como con un incremento en la proliferación celular <sup>59,60</sup>. De manera análoga,

en modelos tumorales la IL-6 promueve fenotipos invasivos y metastásicos, y la evidencia indica que TG2 puede modular su producción a través de vías proinflamatorias como NF- $\kappa$ B<sup>37</sup>.

En la presente investigación, ambas líneas celulares presentaron producción basal de IL-6, la cual fue modulada diferencialmente tras la inhibición de TG2. En Swan-71, CTA redujo la secreción de IL-6 de manera dosis dependiente, mientras que en HTR-8/SVneo se observó un aumento en respuesta al inhibidor. Estas diferencias podrían reflejar la heterogeneidad fenotípica entre las líneas celulares utilizadas, así como la posible activación de mecanismos compensatorios. En conjunto, estos resultados sugieren que TG2 podría actuar como modulador de la secreción de IL-6 en el trofoblasto de primer trimestre, consistentes con la existencia de mecanismos moleculares parcialmente compartidos entre la invasión trofoblástica fisiológica y los procesos invasivos tumorales, aunque sujetos a una regulación estricta en el contexto gestacional.

Este estudio se fortalece por el uso de líneas celulares relevantes para el estudio de la interfaz materno-fetal, la validación robusta de la inhibición de la actividad TGasa y la comparación detallada con la literatura previa. Sin embargo, presenta limitaciones inherentes que se deben a su carácter estrictamente *in vitro*, la inespecificidad del inhibidor CTA y la ausencia de causalidad directa, lo que subraya la necesidad de continuar con experimentos adicionales más representativos.

En resumen, estos hallazgos posicionan a la actividad TGasa de TG2 como un componente relevante en la regulación de procesos asociados a la migración y organización estructural del trofoblasto, destacando su posible contribución a eventos clave del remodelado vascular en la interfaz materno-fetal.

## **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

La actividad transglutaminasa de la TG2 media procesos asociados a la adquisición del fenotipo invasor y endovascular de líneas celulares trofoblásticas de primer trimestre, sugiriendo su posible rol en el remodelado vascular que ocurre en la interfaz materno-fetal.

Se confirmó la expresión basal y actividad TGasa de TG2 en Swan-71 y HTR-8/SVneo. Su inhibición dosis dependiente redujo la migración, la tubulogénesis y alteró la secreción de IL-6, lo que evidencia su posible participación en la adquisición de dichos fenotipos.

Entre las perspectivas se destaca evaluar los efectos de la ausencia total de TG2 mediante silenciamiento génico *in vitro* en procesos de adhesión, migración, invasión y tubulogenesis, junto con la administración intrauterina de CTA en modelos *in vivo* Wistar destinada a analizar la arquitectura placentaria, vascularización y reabsorción embrionaria, para elucidar su causalidad y relevancia fisiopatológica.

## REFERENCIAS

1. Bondarenko V, Turco MY. Modeling the human maternal-fetal interface. *Cell Stem Cell*. septiembre de 2025;32(9):1321-45. doi:10.1016/j.stem.2025.08.004
2. Soares MJ, Varberg KM, Iqbal K. Hemochorial placentation: development, function, and adaptations†. *Biol Reprod*. 1 de julio de 2018;99(1):196-211. doi:10.1093/biolre/iory049
3. Cindrova-Davies T, Sferruzzi-Perri AN. Human placental development and function. *Semin Cell Dev Biol*. noviembre de 2022;131:66-77. doi:10.1016/j.semcdb.2022.03.039
4. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. *Placenta*. marzo de 2009;30:43-8. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.003
5. Redman CWG, Sargent IL. Placental Stress and Pre-eclampsia: A Revised View. *Placenta*. marzo de 2009;30:38-42. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.021
6. Vargas H VM, Acosta A G, Moreno E MA. La preeclampsia un problema de salud pública mundial. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 2012;77(6):471-6. doi:10.4067/S0717-75262012000600013
7. Wu C, Bayer CL. Imaging placental function: current technology, clinical needs, and emerging modalities. *Phys Med Biol*. 9 de julio de 2018;63(14):14TR01. doi:10.1088/1361-6560/aaccd9
8. Aplin JD, Myers JE, Timms K, Westwood M. Tracking placental development in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. septiembre de 2020;16(9):479-94. doi:10.1038/s41574-020-0372-6
9. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *N Engl J Med*. 8 de noviembre de 2001;345(19):1400-8. doi:10.1056/NEJMra000763
10. Sato Y. Endovascular trophoblast and spiral artery remodeling. *Mol Cell Endocrinol*. marzo de 2020;503:110699. doi:10.1016/j.mce.2019.110699
11. DaSilva-Arnold SC, Zamudio S, Al-Khan A, Alvarez-Perez J, Mannion C, Koenig C, et al. Human trophoblast epithelial-mesenchymal transition in abnormally invasive placenta†. *Biol Reprod*. 1 de agosto de 2018;99(2):409-21. doi:10.1093/biolre/iory042
12. Weiss G, Sundl M, Glasner A, Huppertz B, Moser G. The trophoblast plug during early pregnancy: a deeper insight. *Histochem Cell Biol*. diciembre de 2016;146(6):749-56. doi:10.1007/s00418-016-1474-z
13. Saghian R, Bogle G, James JL, Clark AR. Establishment of maternal blood supply to the placenta: insights into plugging, unplugging and trophoblast behaviour from an agent-based model. *Interface Focus*. 6 de octubre de 2019;9(5):20190019. doi:10.1098/rsfs.2019.0019
14. Harris LK, Keogh RJ, Wareing M, Baker PN, Cartwright JE, Aplin JD, et al. Invasive Trophoblasts Stimulate Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis by a Fas Ligand-Dependent Mechanism. *Am J Pathol*. noviembre de 2006;169(5):1863-74. doi:10.2353/ajpath.2006.060265

15. Whitley GSTJ, Cartwright JE. Cellular and Molecular Regulation of Spiral Artery Remodelling: Lessons from the Cardiovascular Field. *Placenta*. junio de 2010;31(6):465-74. doi:10.1016/j.placenta.2010.03.002
16. Burrows TD, King A, Loke YW. Expression of Adhesion Molecules by Endovascular Trophoblast and Decidual Endothelial Cells: Implications for Vascular Invasion During Implantation.
17. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest*. 1 de enero de 1992;89(1):210-22. doi:10.1172/JCI115565
18. Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, et al. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J Clin Invest*. 1 de mayo de 1997;99(9):2139-51. doi:10.1172/JCI119387
19. Costanzo V, Bardelli A, Siena S, Abrignani S. Exploring the links between cancer and placenta development. *Open Biol*. junio de 2018;8(6):180081. doi:10.1098/rsob.180081
20. Holtan SG, Creedon DJ, Haluska P, Markovic SN. Cancer and Pregnancy: Parallels in Growth, Invasion, and Immune Modulation and Implications for Cancer Therapeutic Agents. *Mayo Clin Proc*. noviembre de 2009;84(11):985-1000. doi:10.4065/84.11.985
21. Wagner GP, Kshitiz, Dighe A, Levchenko A. The Coevolution of Placentation and Cancer. *Annu Rev Anim Biosci*. 15 de febrero de 2022;10(1):259-79. doi:10.1146/annurev-animal-020420-031544
22. Murray M, Lessey B. Embryo Implantation and Tumor Metastasis: Common Pathways of Invasion and Angiogenesis. *Semin Reprod Med*. septiembre de 1999;17(03):275-90. doi:10.1055/s-2007-1016235
23. Staff AC, Fjeldstad HE, Fosheim IK, Moe K, Turowski G, Johnsen GM, et al. Failure of physiological transformation and spiral artery atherosclerosis: their roles in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. febrero de 2022;226(2):S895-906. doi:10.1016/j.ajog.2020.09.026
24. Yao Z, Fan Y, Lin L, Kellems RE, Xia Y. Tissue transglutaminase: a multifunctional and multisite regulator in health and disease. *Physiol Rev*. 1 de enero de 2024;104(1):281-325. doi:10.1152/physrev.00003.2023
25. Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. En: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2012 [citado 12 de marzo de 2026]. p. 1-97. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012394305700001X> doi:10.1016/B978-0-12-394305-7.00001-X
26. Liu J, Mouradian MM. Pathogenetic Contributions and Therapeutic Implications of Transglutaminase 2 in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 17 de febrero de 2024;25(4):2364. doi:10.3390/ijms25042364
27. Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J*. diciembre de 2011;278(24):4704-16. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08346.x

28. Fujimoto M, Kanzaki H, Nakayama H, Higuchi T, Hatayama H, Iwai M, et al. Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Vol. 137. 137(3)*.
29. Robinson NJ, Glazier JD, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD. Tissue Transglutaminase Expression and Activity in Placenta. *Placenta. febrero de 2006;27(2-3):148-57.*  
doi:10.1016/j.placenta.2005.01.008
30. Hager H, Gliemann J, Hamilton-Dutoit S, Ebbesen P, Koppelhus U, Henning Jensen P. DEVELOPMENTAL REGULATION OF TISSUE TRANSGLUTAMINASE DURING HUMAN PLACENTATION AND EXPRESSION IN NEOPLASTIC TROPHOBLAST. *J Pathol. enero de 1997;181(1):106-10.*  
doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199701)181:1%3C106::AID-PATH725%3E3.0.CO;2-K
31. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Sakai K, Iwashita M. Tissue Transglutaminase at Embryo-Maternal Interface. *J Clin Endocrinol Metab. 1 de agosto de 2005;90(8):4694-702.*  
doi:10.1210/jc.2005-0240
32. Robinson NJ, Baker PN, Jones CJP, Aplin JD. A Role for Tissue Transglutaminase in Stabilization of Membrane-Cytoskeletal Particles Shed from the Human Placenta. *Biol Reprod. 1 de octubre de 2007;77(4):648-57.* doi:10.1095/biolreprod.107.061747
33. Arbildi P, Rodríguez-Camejo C, Perelmuter K, Bollati-Fogolín M, Sónora C, Hernández A. Hypoxia and inflammation conditions differentially affect the expression of tissue transglutaminase spliced variants and functional properties of extravillous trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol. junio de 2022;87(6):e13534.* doi:10.1111/aji.13534
34. Liu C, Wang W, Parchim N, Irani RA, Blackwell SC, Sibai B, et al. Tissue Transglutaminase Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia and Stabilizes Placental Angiotensin Receptor Type 1 by Ubiquitination-Preventing Isopeptide Modification. *Hypertension. febrero de 2014;63(2):353-61.* doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02361
35. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol. agosto de 2017;17(8):469-82.* doi:10.1038/nri.2017.64
36. Oh K, Ko E, Kim HS, Park AK, Moon HG, Noh DY, et al. Transglutaminase 2 facilitates the distant hematogenous metastasis of breast cancer by modulating interleukin-6 in cancer cells. *Breast Cancer Res. 3 de octubre de 2011;13(5):R96.* doi:10.1186/bcr3034
37. Oh K, Moon HG, Lee DS, Yoo YB. Tissue transglutaminase-interleukin-6 axis facilitates peritoneal tumor spreading and metastasis of human ovarian cancer cells. *Lab Anim Res. 2015;31(4):188.*  
doi:10.5625/lar.2015.31.4.188
38. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, et al. The Isolation and Characterization of a Novel Telomerase Immortalized First Trimester Trophoblast Cell Line, Swan 71. *Placenta. noviembre de 2009;30(11):939-48.* doi:10.1016/j.placenta.2009.08.007
39. Graham CH, Hawley TS, Hawley RC, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, et al. Establishment and Characterization of First Trimester Human Trophoblast Cells with Extended Lifespan. *Exp Cell Res. junio de 1993;206(2):204-11.* doi:10.1006/excr.1993.1139

40. Cañumil VA, De La Cruz Borthiry FL, Scheffer F, Herrero Y, Scotti L, Bogetti ME, et al. A physiological concentration of anandamide promotes the migration of human endometrial fibroblast and the interaction with endothelial cells in vitro. *Placenta*. agosto de 2023;139:99-111. doi:10.1016/j.placenta.2023.06.004
41. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci Rep*. 14 de julio de 2020;10(1):11568. doi:10.1038/s41598-020-67289-8
42. Beltrame JS, Sordelli MS, Cañumil VA, Alonso CAI, Perez Martinez S, Ribeiro ML. Steroid hormones induce in vitro human first trimester trophoblast tubulogenesis by the lysophosphatidic acid pathway. *Mol Cell Endocrinol*. diciembre de 2018;478:126-32. doi:10.1016/j.mce.2018.08.003
43. Sónora C, Calo G, Fraccaroli L, Pérez-Leirós C, Hernández A, Ramhorst R. Tissue Transglutaminase on Trophoblast Cells as a Possible Target of Autoantibodies Contributing to Pregnancy Complications in Celiac Patients. *Am J Reprod Immunol*. noviembre de 2014;72(5):485-95. doi:10.1111/aji.12290
44. Piacentini M, D’Eletto M, Falasca L, Farrace MG, Rodolfo C. Transglutaminase 2 at the Crossroads between Cell Death and Survival. En: Toone EJ, editor. *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology* [Internet]. 1.<sup>a</sup> ed. Wiley; 2011 [citado 3 de abril de 2026]. p. 197-246. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118105771.ch5> doi:10.1002/9781118105771.ch5
45. Van Den Akker J, VanBavel E, Van Geel R, Matlung HL, Guvenc Tuna B, Janssen GMC, et al. The Redox State of Transglutaminase 2 Controls Arterial Remodeling. Xu Q, editor. *PLoS ONE*. 25 de agosto de 2011;6(8):e23067. doi:10.1371/journal.pone.0023067
46. Gundemir S, Johnson GVW. Intracellular Localization and Conformational State of Transglutaminase 2: Implications for Cell Death. Bergmann A, editor. *PLoS ONE*. 1 de julio de 2009;4(7):e6123. doi:10.1371/journal.pone.0006123
47. Siegel M, Khosla C. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol Ther*. agosto de 2007;115(2):232-45. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.05.003
48. Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM. Tissue Transglutaminase Is an Integrin-Binding Adhesion Coreceptor for Fibronectin. *J Cell Biol*. 21 de febrero de 2000;148(4):825-38. doi:10.1083/jcb.148.4.825
49. Janiak A, Zemskov EA, Belkin AM. Cell Surface Transglutaminase Promotes RhoA Activation via Integrin Clustering and Suppression of the Src-p190RhoGAP Signaling Pathway. *J Cell Physiol*. doi:10.1002/jcp.1041490304
50. Adamczyk M, Griffiths R, Dewitt S, Knäuper V, Aeschlimann D. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2. *J Cell Sci*. 15 de diciembre de 2015;128(24):4615-28. doi:10.1242/jcs.175968
51. Upchurch HF, Conway E, Patterson MK, Maxwell MD. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: Characteristics of the matrix bound enzyme. *J Cell Physiol*. diciembre de 1991;149(3):375-82. doi:10.1002/jcp.1041490304

52. Wang Z, Collighan RJ, Pytel K, Rathbone DL, Li X, Griffin M. Characterization of Heparin-binding Site of Tissue Transglutaminase. *J Biol Chem*. abril de 2012;287(16):13063-83. doi:10.1074/jbc.M111.294819
53. Kumar A, Xu J, Brady S, Gao H, Yu D, Reuben J, et al. Tissue Transglutaminase Promotes Drug Resistance and Invasion by Inducing Mesenchymal Transition in Mammary Epithelial Cells. McCubrey J, editor. *PLoS ONE*. 12 de octubre de 2010;5(10):e13390. doi:10.1371/journal.pone.0013390
54. Zaltron E, Vianello F, Ruzza A, Palazzo A, Brillo V, Celotti I, et al. The Role of Transglutaminase 2 in Cancer: An Update. *Int J Mol Sci*. 28 de febrero de 2024;25(5):2797. doi:10.3390/ijms25052797
55. Huang L, Xu AM, Liu W. Transglutaminase 2 in cancer.
56. Di Simone N, De Spirito M, Di Nicuolo F, Tersigni C, Castellani R, Silano M, et al. Potential New Mechanisms of Placental Damage in Celiac Disease: Anti-Transglutaminase Antibodies Impair Human Endometrial Angiogenesis. *Biol Reprod*. 1 de octubre de 2013;89(4). doi:10.1095/biolreprod.113.109637
57. Di Simone N, Silano M, Castellani R, Di Nicuolo F, D'Alessio MC, Franceschi F, et al. Anti-Tissue Transglutaminase Antibodies From Celiac Patients Are Responsible for Trophoblast Damage via Apoptosis In Vitro. *Am J Gastroenterol*. octubre de 2010;105(10):2254-61. doi:10.1038/ajg.2010.233
58. Lan X, Guo L, Hu C, Zhang Q, Deng J, Wang Y, et al. Fibronectin mediates activin A-promoted human trophoblast migration and acquisition of endothelial-like phenotype. *Cell Commun Signal*. 23 de enero de 2024;22(1):61. doi:10.1186/s12964-023-01463-z
59. Jovanovic M, Kovacevic T, Stefanoska I, Vicovac L. The effect of IL-6 on the trophoblast cell line HTR-8/SVneo. *Arch Biol Sci*. 2010;62(3):531-8. doi:10.2298/ABS1003531J
60. Jovanović M, Vićovac L. Interleukin-6 Stimulates Cell Migration, Invasion and Integrin Expression in HTR-8/SVneo Cell Line. *Placenta*. abril de 2009;30(4):320-8. doi:10.1016/j.placenta.2009.01.013