

Tesis de Posgrado

La Leptina : una nueva hormona placentaria? Su función en la placenta humana

Cameo, Paula

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cameo, Paula. (2002). La Leptina : una nueva hormona placentaria? Su función en la placenta humana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3520_Cameo.pdf

Cita tipo Chicago:

Cameo, Paula. "La Leptina : una nueva hormona placentaria? Su función en la placenta humana". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3520_Cameo.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

La leptina
¿Una nueva hormona placentaria?
Su función en la Placenta humana

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires

Autor: Lic. Paula Cameo

Director: Dr. Juan Carlos Calvo

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)

Buenos Aires, 2002

Abstract

Leptin, the 16 KDa protein product of the *obese* (OB) gene, was originally seen as an adipocyte-derived signaling molecule. In recent years it has been suggested to be involved in some functions during pregnancy, particularly in the placenta. In this work we investigated the role of leptin in many of the fundamental functions of human placenta. Using cultures of CTB and STB cells and chorionic explant cultures we evaluated leptin role as a modulator of hCG, progesterone and IL-6 secretion, leptin effect on trophoblast gelatinolytic activity, cytokine and hormone modulation of leptin secretion by the trophoblast and leptin receptor expression. Additionally we measured leptin levels in sera from patients suffering recurrent spontaneous abortion (RSA).

Leptin mRNA expression in these cultures was observed by reverse transcription - polymerase chain reaction. Recombinant human leptin showed a stimulatory effect on hCG and IL-6 secretion and an inhibitory effect on progesterone secretion by human trophoblast. It also stimulated MMP-9 activity in term trophoblast cultures.

IL-6, IL-1, estradiol, hCG, and pregnenolone stimulated leptin secretion in human trophoblast. Cholesterol, TNF- α and M-CSF had no effect on this activity.

We observed the expression of two different isoforms of leptin receptor; one of 187 KDa and one of 28KDa.

Leptin concentration in sera from RSA patients was significantly lower than in control groups, according to data published by different authors.

All these results suggest a role for leptin in some of the basic functions of human placenta.

Keywords

Leptin
Trophoblast
hCG
progesterone
cytokines
metalloproteases

Resumen

Desde que se la descubriera en 1994, la leptina, una proteína de 16 kDa (167 aminoácidos) expresada por el gen de la obesidad (OB), ha atraído mucha atención debido a su papel importante en la regulación del balance energético. Durante los últimos años se ha sugerido que la leptina podría tener funciones diferentes durante la preñez, particularmente en la fisiología feto-placentaria. Utilizando cultivos primarios de células de CTB y STB y explantos de vellosidades coriónicas, evaluamos: 1) el papel de la leptina como moduladora de la secreción de hCG, progesterona y IL-6, 2) su efecto sobre la capacidad invasiva del trofoblasto, 3) la regulación de la secreción de leptina por distintos factores presentes en la interfase materno/fetal, 4) la expresión del receptor de leptina en el trofoblasto y 5) los niveles de leptina presentes en sueros de pacientes con problemas de aborto recurrente espontáneo (RSA).

Se observó la expresión del ARNm de leptina en estos cultivos por medio de técnicas de RT-PCR. La leptina recombinante humana tuvo un efecto estimulador sobre la secreción de hCG y IL-6 y un efecto inhibitorio sobre la secreción de progesterona por el trofoblasto humano. Además, la leptina estimuló la actividad de la MMP-9 en estos cultivos.

IL-6, IL-1, estradiol, hCG y pregnenolona estimularon la producción de leptina por la placenta; colesterol, TNF- α y M-CSF no tuvieron efecto.

Observamos también la expresión de dos isoformas del receptor de la leptina; una de 187KDa y otra de 28KDa.

La concentración de leptina en sueros de pacientes RSA fue significativamente menor, comparada con valores controles publicados por diferentes autores.

Todos estos resultados apoyan la hipótesis que la leptina cumple un papel importante en fisiología feto-placentaria humana.

Palabras clave

Leptina

Trofoblasto

hCG

Progesterona

Citoquinas

metaloproteasas

Gracias ma, pa, Martu, Mike y Morgu. Nunca podría haber hecho esto sin ustedes.

Gracias por acompañarme siempre.

Gracias ma, por ayudarme a dar mis primeros pasos en esto; por mostrarme, por enseñarme, por contagiarme pasión, por vivir y compartir conmigo cada una de todas las cosas que pasé para poder cumplir este deseo!

Gracias pa, por empujarme siempre a hacer todo lo que quiero, aunque parezca imposible; por hacerme tener confianza; por enseñarme a ver siempre el vaso medio lleno.

Gracias Martus, por creer que lo que hago es interesante, por ayudarme hasta sin darte cuenta, por creer que puedo, por hacerme reír siempre, por creer que las uñas florecen!

Gracias Anastasia, por soportarme y hacerme reír estos dos meses.

Gracias Mike, por que desde siempre fuiste mi ejemplo, por que siempre me enseñaste a vivir la vida con ganas, amor y contenta.

Grazie nonni Renata e Sergio, per darmi un posto sicuro dove posso trovare amore anche nei peggiori momenti; per la compagnia che mi avete fatto tutta la vita, anche con le vostre lettere settimanali quando ero lontano.

Grazie nonna, per la forza che hai; per farmi sempre ricordare che "ogni lasciata é persa"; per essere un rifugio in questa vita; per farmi avere il nonno un pó vicino.

Gracias Juan Carlos, por creer en mi desde el día que entré al laboratorio; por dejarme desarrollar el tema que me gusta; por dejarme crecer con toda la libertad; por ser, además de mi jefe, una persona muy especial con quien compartí mucho más que este trabajo; por entender mis tiempos "contra reloj".

Gracias Paul, por contagiarme entusiasmo por cada uno de mis resultados; por abrirme las puertas sin conocerme; por mostrarme y transmitirme tanta experiencia y pasión; por estar siempre listo a ayudarme; por abrirme las puertas de un tema tan fascinante.

Gracias Dr. Eduardo Charreau, por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis en este tema en el IByME; por interesarse en mi proyecto desde un primer momento.

Agradezco al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado las becas que me permitieron realizar este trabajo.

Agradezco a la Organización Mundial de la Salud, por el subsidio otorgado, que nos permitió realizar este proyecto y por la ayuda que me brindó para poder asistir y realizar el curso Frontiers in Reproduction (FIR) (Woods Hole, MA, USA).

Agradezco al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) y todos sus integrantes, por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis.

Agradezco al Instituto Argentino de Diagnóstico y Tratamiento, al Hospital Alemán, y los profesionales que allí trabajan, que facilitaron la obtención del tejido para poder realizar todo este trabajo.

Agradezco al Dr. Juan José Partamián, por facilitarme los sueros de paciente, por interesarse en el tema cuando me acerqué.

Gracias Ele, por lo que compartimos en el lab y por todo lo que compartimos afuera.

Gracias Caro, por compartir tantas cosas en solo dos años; por siempre mostrarme que tenes confianza en lo que hago.

Gracias a toda la gente que pasó por el laboratorio: Cynthia, Carla, Eugenia, Gabriel, Gabriela, Sergio, Marcela, Mariana, por que todos, de distintas forma, me ayudaron a crecer.

Gracias Ale, Rosa Inés, Gabriela, Erica, Isabel, por que tantas veces molesté pidiendo algo.

Gracias Tere y Rita, por darme un lugar agradable para trabajar, y después entender mi búsqueda del tema que más me gusta.

Gracias BR's- ma, Lucre, Vani, Vir, Marina, Consuelo, Vani, Caro, Laura, Flor, Patricia, Sara, Clari, Mariana, Quique- por aceptarnos a mi y a mis placentas! Por hacer que las largas horas en el laboratorio sean divertidas; por crear un ambiente único. Gracias Vir, Marina y Consuelo, por hacerme reír siempre!

Gracias Lucre, por ser muuuuucho más que "la mujer de mi jefe", por siempre creer en lo que hago.

Gracias Vani, por compartir buenos y malos resultados; por estar cuando todo parece caerse, por compartir vida, conmigo.

Gracias Fer, por incubaciones con consejos, charlas, oreja, cafés.....

Gracias Marce, por todas las veces que escuchaste mis gritos de ayuda, por consejos, por compartir tantas cosas, por creer en lo que hago, por una muy buena amistad!

Gracias Eve, por reírte y creer que soy una exagerada! Por creer que "puedo dedicarme a esto"; por el '98!

Gracias Vik, Lali, Jose, por que no podría haber tenido nunca más suerte con la gente que me tocó compartir la facu; por compartir algunos de los mejores momentos de mi vida; por ayudarme en los peores momentos, por ser parte se esto.

Gracias Dorina, Christine, Arielle, Louise, por hacerme sentir como en casa a tanto kilómetros.

Gracias Lau, por una amistad de lujo! por estar siempre; por ayudarme a soportar los golpes más duros, por vivir este paso conmigo, como todo durante los últimos 20 años.
Gracias Sebas, por que no podría pedir un mejor compañero para mi amiga del alma.

Gracias Co, por que mi hermanita me ayudó, también, a cumplir esto.

Gracias José, por mostrar interés, por que compartimos momentos que nunca me voy a olvidar.

Gracias Car, por que, como siempre, también en esto me acompañaste, por nuestra amistad; por que me ayudaste muchísimo.

Gracias a las madres y bebes que me prestaron sus placentas!

Índice

<i>Tema</i>	<i>Página</i>
Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN	3
La Placenta humana	5
Desarrollo temprano de la placenta	5
Circulación en la placenta	11
Endocrinología	12
Citoquinas	18
Capacidad invasiva del trofoblasto y metaloproteasas	20
La leptina	26
Leptina en reproducción	28
Leptina en la placenta	31
Interacción de la leptina con otras hormonas y citoquinas.....	34
Leptina y viabilidad celular	35
Receptor de leptina	37
Leptina y patologías reproductivas	41
Pre-eclampsia	41
Fallas de implantación	42
Diabetes	43
Endometriosis	43
Retraso en el crecimiento	44
OBJETIVO	45
Consideraciones éticas	46
MATERIALES Y METODOS.....	47
Pacientes	47
Purificación de CTB	47

Trofoblasto de 1º trimestre	48
Trofoblasto de placenta de embarazo a término.....	51
Viabilidad celular	52
Cultivo de CTB	52
Diferenciación y cultivo de STB	53
Inactivación de sueros	54
Preparación y cultivo de explantos	54
Selección de pacientes	54
Obtención y preparación de sueros	55
Ensayo de citotoxicidad por medición de actividad metabólica celular con WST-1	55
Incorporación de [3H]-Timidina	56
Medición de leptina	56
Medición de progesterona	56
Medición de estradiol	56
Medición de hCG	57
Medición de IL-6	57
Cuantificación de proteínas	57
Diseño de "primers"	58
Extracción de ARN total	58
RT-PCR	59
Extracción de proteínas totales	59
• a partir de explantos	59
• a partir de células en cultivo	59
Separación electroforética de proteínas	60
Dot blot	60
Inmunodetección/ Western blot	60
Zimografía	61
Tinción de geles	62
Formación de complejo Ob-Rob <i>in vitro</i>	62
Inmunoprecipitación	63
Estadística	63

RESULTADOS	64
Síntesis y secreción de leptina por la placenta humana	64
a) expresión de mRNA de leptina	64
b) secreción de leptina por células de trofoblasto en cultivo	66
c) síntesis y secreción de leptina en explantos	68
Efecto de la leptina sobre la viabilidad celular	69
a) Efecto de la leptina sobre la actividad metabólica de células CTB de 1º trimestre.....	71
b) Efecto de la leptina sobre la actividad metabólica de células CTB de término.....	74
c) Efecto de la leptina sobre la incorporación de [³ H]-Timidina en células CTB de 1º trimestre.....	75
d) Efecto de la leptina sobre la incorporación de [³ H]-Timidina en células CTB de término	77
Efecto de la leptina sobre la síntesis de hormonas y citoquinas.....	78
a) Efecto de la leptina sobre la secreción de hCG en células CTB de 1º trimestre.....	78
b) Efecto de la leptina sobre la secreción de hCG en células CTB y STB de placenta a término	85
c) Efecto de la leptina sobre la secreción de progesterona en células CTB de 1º trimestre y por células CTB y STB de embarazo a término.....	88
d) Efecto de la leptina sobre la secreción de IL-6 (IL-6) en células CTB de placenta a término	93
Efecto de la leptina sobre la actividad gelatinolítica del trofoblasto.....	95
Efecto de la leptina sobre la actividad de las MMP-9 y 2	95
Regulación de la síntesis de leptina por la placenta	97
a) Efecto de 17-β estradiol sobre la secreción de leptina	98

b) Efecto de IL-6 sobre la síntesis y secreción de leptina	101
c) Efecto de 5-pregnen-3 β -ol-20-ona sobre la secreción de leptina	103
d) Efecto de IL-1 α sobre la secreción de leptina	105
e) Efecto de hCG sobre la expresión de leptina	106
f) Efecto de 22(R)-OH-colesterol sobre la expresión de leptina	108
g) Efecto de TNF- α y M-CSF sobre la secreción de leptina	108
Expresión del R-Ob en la placenta a término.....	109
Niveles de leptina en sueros de pacientes con patologías reproductivas.....	111
DISCUSIÓN	118
CONCLUSIÓN.....	132
Frases Dr. H. Kliman	134
Reactivos y Soluciones	135
Aclaración Bibliografía	138

ABREVIATURAS (ordenadas alfabéticamente)

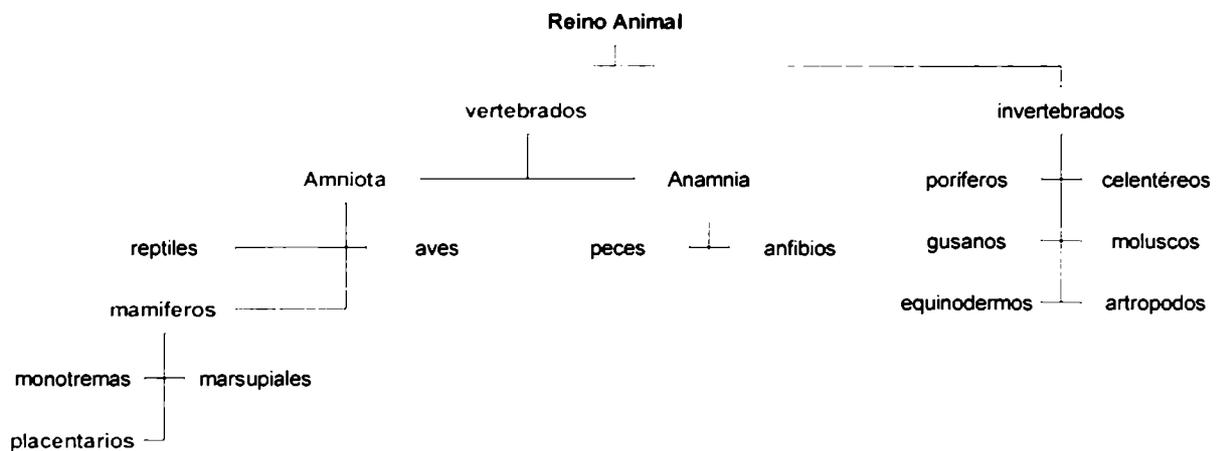
Ab α Ob	Anticuerpo anti leptina
Ab α ROb	Anticuerpo anti receptor de leptina
ANOVA	análisis de varianza
ARNm	ácido- ribonucleico mensajero
BMI	body mass index (Índice de masa corporal)
CTB	citotrofoblasto
Da	dalton
DB	Diabetes Mellitus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	gramo
Gen Ob	gen de leptina
Gen Ob-R	gen del receptor de leptina
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
h	horas
hCG	gonadotrofina coriónica humana
hLP	lactógeno placentario humano
IL	Interleuquina
IRMA	ensayo inmunorradiométrico
IUGR	restricción de crecimiento intrauterina
JAK	janus quinasa
LH	hormona luteinizante
M	molar
mg	miligramo
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	matriz extracelular
μ g	microgramo
ml	mililitro

MMP	metaloproteasa
RIA	radioinmunoensayo
SEM	error estándar de la media
STB	sinciciotrofoblasto
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

Estrategias reproductivas que permiten el desarrollo eficiente de un pequeño número de embriones dentro del organismo materno, en un ambiente intrauterino húmedo y protector, forman parte de las ventajas evolutivas más importantes que adquirieron los mamíferos.



La existencia de las siguientes estructuras extraembrionarias (figura 1) permite el desarrollo correcto del feto en el ambiente intrauterino durante todo el periodo del embarazo hasta el momento del parto:

el saco vitelino, donde se originan las células germinales primordiales;

el amnios, que cubre una cavidad llena de líquido en la que el embrión está suspendido;

el alantoides, cuya función principal en el humano queda reducida a contribuir a la placenta;

- *la placenta*, que conecta al feto con la pared uterina de la madre, y se ocupa de las funciones de respiración, nutrición y excreción del feto;

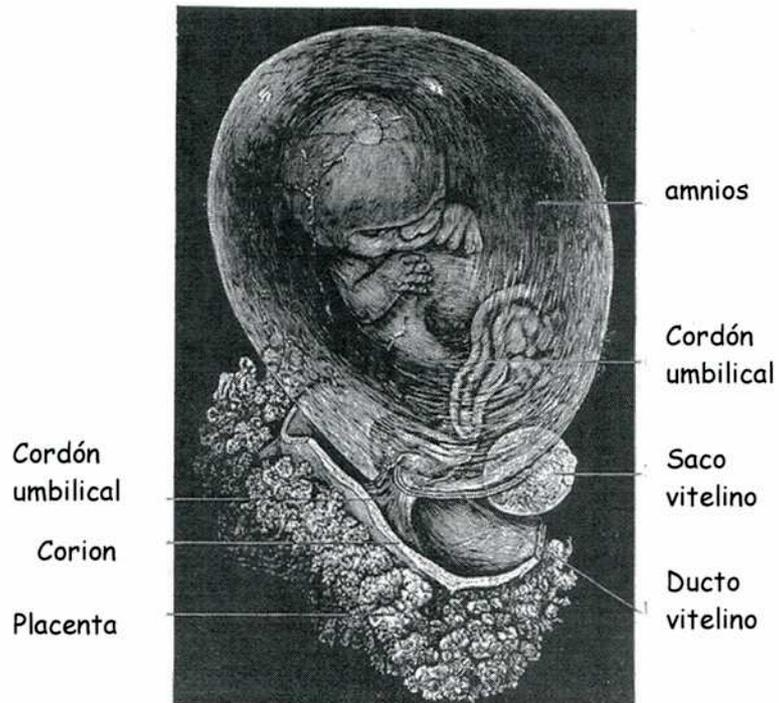


Figura 1 feto de 8 semanas aproximadamente. (Prof. A. Thomson, Oxford). Señalización de las distintas membranas extraembrionarias.

LA PLACENTA HUMANA

Durante toda la preñez, la placenta humana secreta hormonas que controlarán la fisiología básica de la madre, para que ésta pueda proporcionar al feto los nutrientes y el oxígeno necesarios para un crecimiento exitoso. La placenta también protegerá al feto de un posible rechazo inmunológico de la madre, removerá desechos e inducirá una mayor circulación sanguínea. Hacia el final del embarazo producirá hormonas que ayudarán a la maduración de los distintos órganos del feto para poder sobrevivir en el exterior.

- ***Desarrollo temprano de la placenta***

Cuatro a cinco días post-fertilización el embrión, en estadio de blastocisto, está formado por dos tipos celulares bien diferenciados: el que compone la masa celular interna (MCI) que originará principalmente al feto y el que forma el trofoblasto, a partir del cual se desarrollarán la placenta y otras membranas extraembrionarias (figura 2).

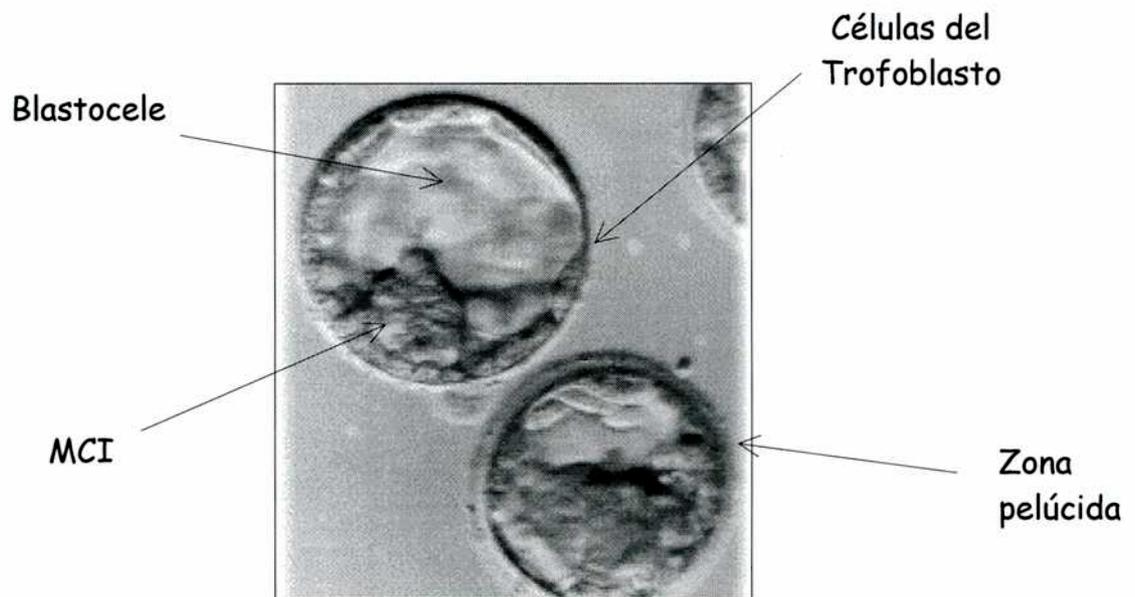


Figura 2 Microfotografía de dos blastocistos humanos (Dra. M. Cameo- Lic. V. Fontana).

Al entrar en la cavidad uterina, el primer desafío del blastocisto es posicionarse frente a la pared uterina e implantarse en ella a través del trofoblasto. Desde este momento se establece un diálogo entre el endometrio materno y el embrión, siendo fundamental la creación de un equilibrio entre la capacidad invasiva del trofoblasto y el control que le impone el endometrio.

Una vez implantado firmemente en el endometrio, el embrión comienza a crecer y expandirse. Ya en la cuarta semana de desarrollo se puede observar la estructura básica de la placenta, con las primeras vellosidades coriónicas entrando en contacto con la sangre materna (placenta de tipo hemocorial). Las vellosidades más cercanas a la zona de invasión, van a desarrollarse y expandirse para formar el futuro tejido coriónico o placenta.

A partir de este momento, y durante los 9 meses de embarazo la placenta se va desarrollando y aumentando de tamaño, a la par del crecimiento del feto

posibilitando la supervivencia del mismo, hasta estar completamente capacitado para una vida externa independiente (figura 3).

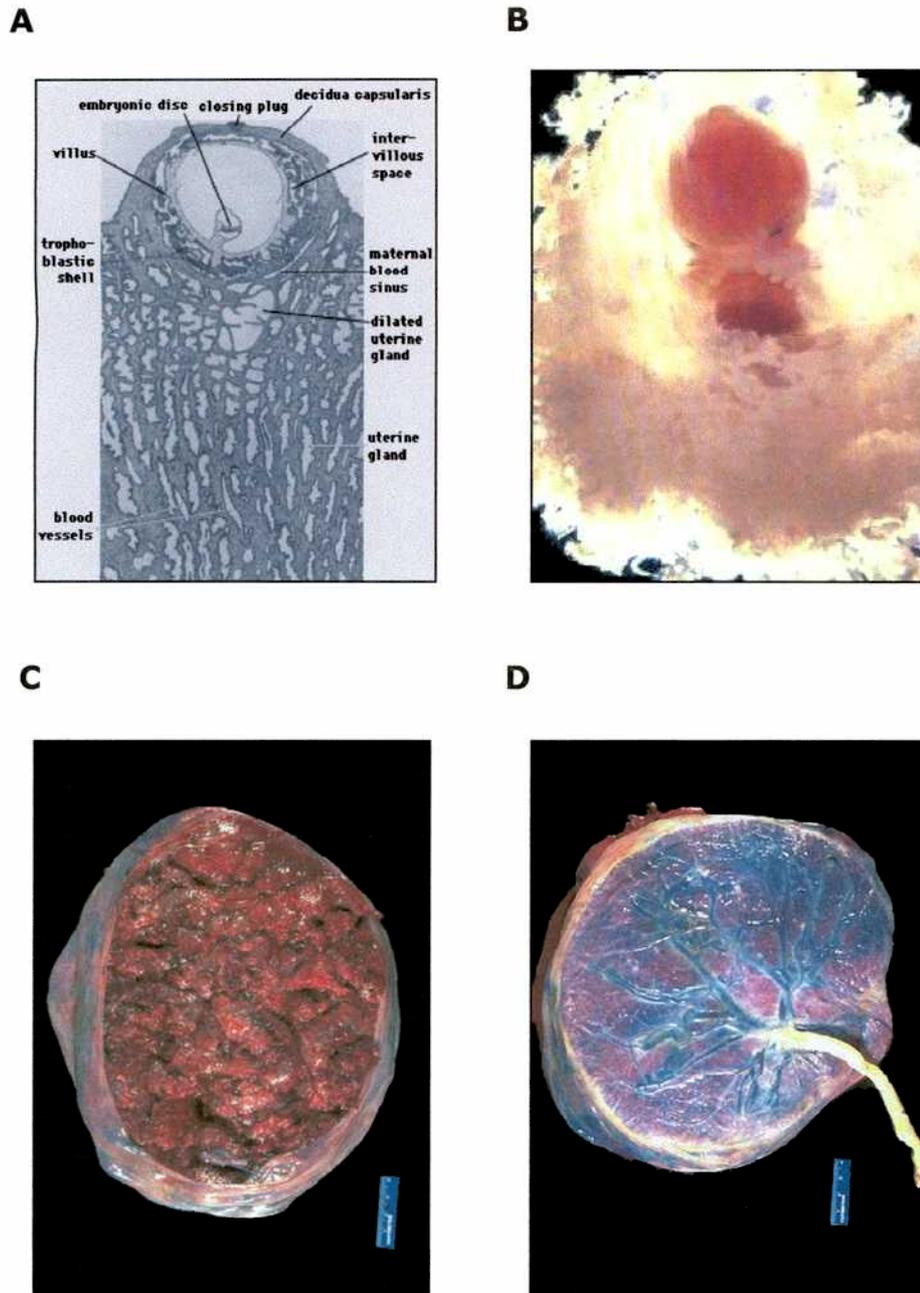


Figura 3 Fotografías de la placenta humana en tres estadios distintos del embarazo: 16 días (A), 12 semanas (B), superficie materna (C) y superficie fetal (D) de una placenta de embarazo a término.

Siendo una interfase entre el feto y la pared uterina, la placenta está compuesta por una porción de origen materno- *la decidua*- y una de origen fetal -*el corion frondoso*.

- *Decidua*

Antes de que el embrión llegue al útero, el endometrio comienza un proceso conocido como decidualización durante el que se observan grandes cambios: aumento de la vascularización, alargamiento de las glándulas, aumento del tejido interglandular, aumento de células grandes redondas, ovales o poligonales. Dado que la reacción decidual, que aumenta a lo largo de la preñez, se expande a las células estromales a través del endometrio, se da el nombre de decidua al endometrio del embarazo.

- *Corion frondoso*

La porción fetal de la placenta está formada por unidades individuales llamadas vellosidades coriónicas que se encuentran altamente ramificadas, aumentando así en gran proporción la superficie de absorción de nutrientes, de eliminación de desechos y de producción hormonal. Cada vellosidad contiene un corazón de tejido conectivo -conteniendo vasos fetales-, rodeado por una capa de células mononucleares -el citotrofoblasto (CTB)- y un protoplasma multinucleado sin divisiones celulares - el sinciotrofoblasto (STB). Acorde al avance del embarazo, las vellosidades coriónicas sufren algunas modificaciones como el aumento de capilares fetales y la disminución de la capa de CTB (figura 3 A, B y C).

Gracias a la estructura anteriormente descrita, desde la primer semana de gestación, las células embrionarias/fetales se encuentran separadas del tejido y sangre materna por medio de una capa de células de CTB y otra de STB, que forman una barrera celular mucho más eficiente y selectiva que una monocapa celular con uniones estrechas.

Existen dos tipos de vellosidades: las flotantes ("floating villi") que se encuentran flotando en el espacio inter-velloso, bañadas en sangre materna y unidas solamente por un extremo, del lado fetal de la placenta; y las de anclaje ("anchoring villi") ancladas por un extremo al lado fetal de la placenta y por el otro al útero (1, 2).

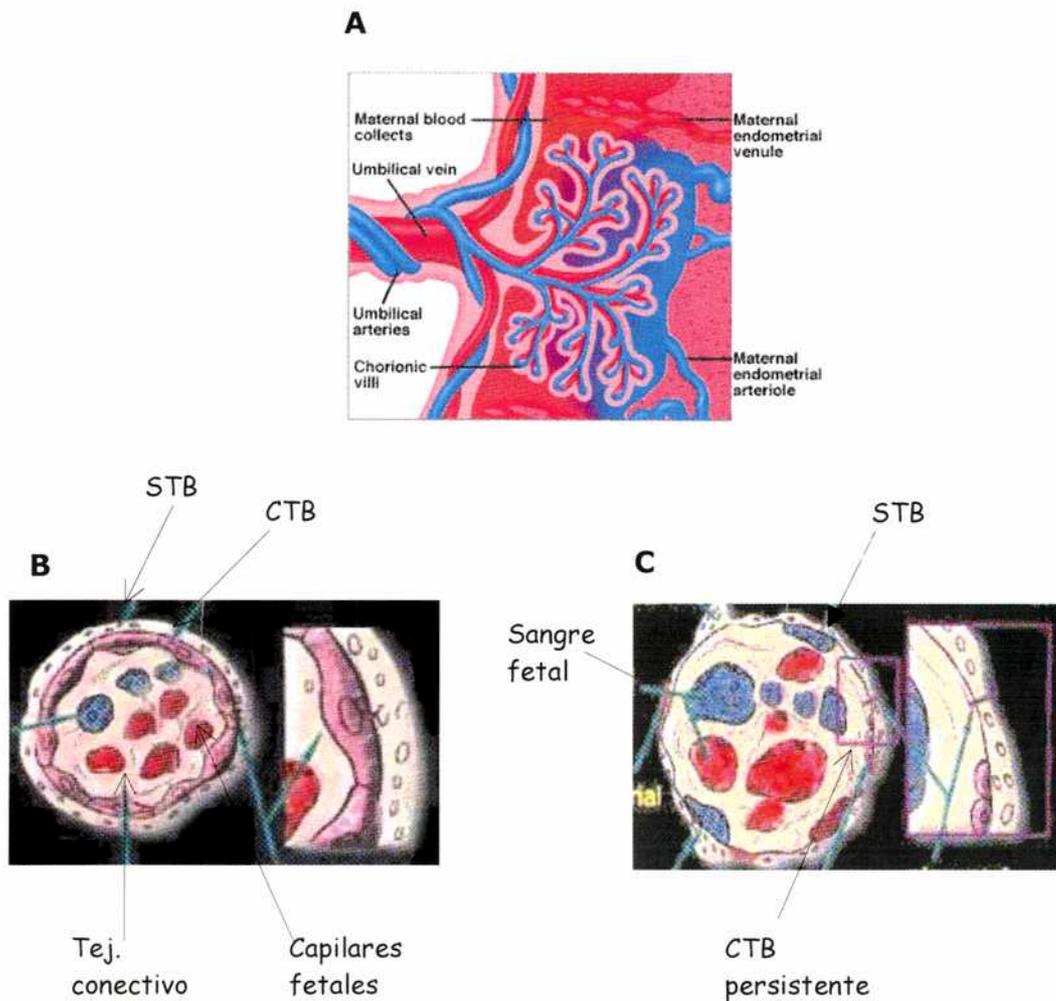


Figura 3 Esquema básico de una vellosidad coriónica (A). Esquema de un corte transversal de una vellosidad coriónica de primer trimestre (B) y una de tercer trimestre (C). *Anatomy of the Human Body* 1918 (Modified from Bryce).

1 Encyclopedia of Reproduction. Edited by E. Knobil and JD Neil. Elsevier Science Academic Press, 1998.

2 Fisher SJ. The placenta dilemma. 2000 Sem Reprod Med 18: 321- 326.

Para el desarrollo de la arquitectura de la placenta que permite el funcionamiento correcto de la misma, las células del CTB indiferenciado deben sufrir distintos procesos de diferenciación y dar origen a los tres tipos de trofoblasto que van a cumplir las distintas funciones *in vivo*:

1. *STB veloso hormonalmente activo*: dentro de las vellosidades el CTB se fusiona dando origen al STB que lo recubre. Este sincicio es el mayor responsable de la secreción hormonal de la placenta.
2. *Trofoblasto extra veloso de anclaje*: en los puntos de contacto entre las vellosidades y el útero una población de CTB prolifera y se diferencia a otro tipo de trofoblasto que originará las columnas de anclaje a la pared uterina. Este tipo de trofoblasto puede sintetizar un tipo único de fibronectina -trofouteronectina- que participa en el pegado de la placenta al útero.
3. *Trofoblasto extra veloso invasivo*: el CTB también puede dar origen a un trofoblasto con fenotipo invasivo, responsable de penetrar los espacios extracelulares del endo- y miometrio.

Tanto el desarrollo de la arquitectura básica de la placenta como el proceso de diferenciación que se da durante todo el embarazo, están finamente regulados por la placenta misma y por el útero materno. Existen varios factores tales como hormonas (hCG), factores de crecimiento (EGF, TGF β , LIF) y citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α) que participan en esta regulación. En los últimos años se ha demostrado que uno de los reguladores principales es el gradiente de oxígeno que se crea en la cavidad uterina a lo largo del eje materno-fetal (3).

3 The physiology of Reproduction. Chapter 8. Knobil E and Neil JD. 1994. Raven Press, NY.

* **Circulación en la placenta**

La placenta actúa como un intercambiador de nutrientes y desechos entre el feto y la madre. Para ello utiliza la circulación que se establece desde temprano en la placenta y la gran superficie que proporcionan las vellosidades que la componen. La circulación fetal ingresa en la placenta por medio de las arterias umbilicales (en el cordón umbilical) y, una vez enriquecida en nutrientes y liberada de desechos, la sangre fetal vuelve al feto por medio de la única vena umbilical (vía el cordón umbilical) (figura 4).

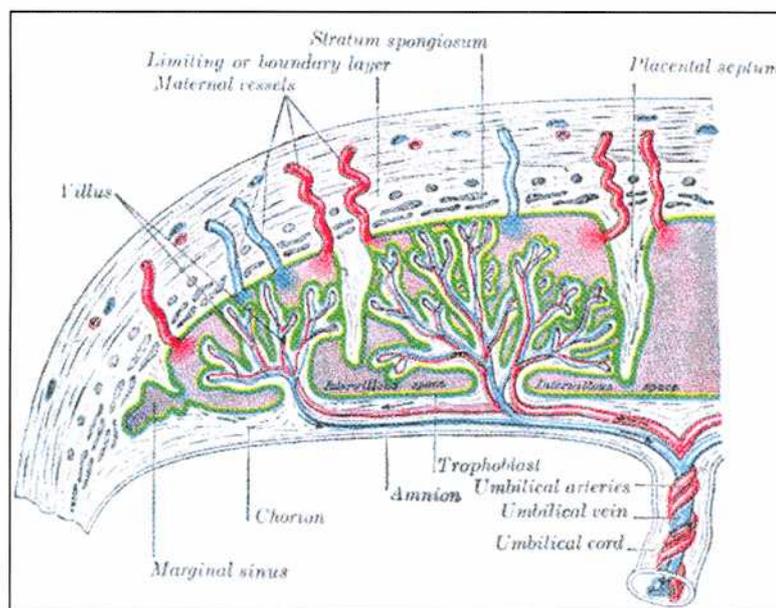


Figura 4 Esquema de la circulación sanguínea básica de la placenta. *Anatomy of the Human Body 1918.*

La circulación se completa con la entrada de sangre materna a la placenta, vía las arterias espirales del útero, que terminan en un canal abierto en el lugar de encuentro con la placenta, provocando la liberación de la sangre materna al espacio inter-velloso en forma de "chorro" (fountained).

• **Endocrinología**

La placenta y en particular el trofoblasto que la compone, cumple una función endocrina fundamental para el crecimiento y desarrollo del feto. Durante el embarazo la placenta secreta distintas hormonas, diferencialmente según el período del embarazo en que se encuentre. Entre las hormonas más importantes se encuentran hCG, lactógeno placentario humano (hLP), progesterona y estrógenos. Otras hormonas como prolactina, relaxina, similar-ACTH y, también GnRH y CRH, son secretadas por la placenta pero en menor proporción.

En este trabajo particularmente se estudió la interacción de la leptina con las siguientes hormonas placentarias:

- La **hCG** es un miembro de la familia de hormonas glicoproteicas que incluye también LH, FSH y TSH. Cada miembro de esta familia, está compuesto por dos subunidades distintas, α y β , unidas no covalentemente. La subunidad α de las distintas hormonas tiene una secuencia aminoacídica idéntica, pero se diferencia en la composición de hidratos de carbono. La subunidad β , en cambio, difiere en su estructura primaria y también en la porción de carbohidratos, y es la responsable de conferir las diferentes actividades biológicas a cada una de las hormonas. La subunidad α tiene un peso molecular de alrededor de 14.5 KDa y la β de 22.2 KDa (4).

La biosíntesis de hCG está regulada en la placenta por distintos factores, secretados por la misma placenta y por el endometrio materno. Entre los factores reguladores se encuentran el factor de crecimiento epidermal (EGF) (5, 6), la IL-1 (7, 8, 9), la IL-6 (7, 10, 11), el TNF- α

4 The physiology of Reproduction. Chapter 8. Knobil E and Neil JD. 1994. Raven Press, NY.

5 D. Islami, P. Mock and P. Bischof. Effects of human chorionic gonadotropin on trophoblast invasion. Sem Reprod Med 2001, 19: 49- 53.

6 Licht P, Russu V and Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo- endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. Sem Reprod Med, 2001; 19: 37- 47.

(8,12), LIF (13), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (8) y GnRH (14).

La hCG es producida por el trofoblasto desde estadios preimplantatorios, dado que es uno de los primeros productos embrionarios. Dentro de las distintas poblaciones de trofoblasto, el STB es el principal productor de esta proteína, si bien el CTB también la produce pero en menor cantidad. La producción placentaria de hCG aumenta con los días de embarazo hasta las 10-12 semanas de la gestación, cuando llega a un pico máximo y posteriormente tiende a un "plateau" de un nivel más bajo por el resto del embarazo.

La acción de la hCG placentaria puede dividirse en tres fases consecutivas (figura 5) (15):

- durante el desarrollo embrionario temprano, desde el estadio de ocho células hasta que la hCG aparece en el suero materno, esta hormona actúa principalmente de forma juxtacrina. Cuando el

7 Masuhiro K, Matsuzaki N, Nishino E, et al. Trophoblast- derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6- receptor system in first trimester human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72: 594- 601.

8 Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bischof P. Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:252-60

9 Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion are dependent upon integrin expression on human cytotrophoblast. *Hum Reprod* 1995; 10:734-742.

10 Nishino E, Matsuzaki N, Masuhiro K et al. Trophoblast- derived interleukin-6 (IL-6) regulates human chorionic gonadotropin release through IL-6 receptor on human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, 71: 436- 441.

11 Neki R, Matsuzaki N, Yamanaka K et al. The interleukine-6 (IL-6)/IL-6-receptor system induces human chorionic gonadotropin production by activating tyrosine kinase-dependent signal transduction pathway different from pathways triggered by protein kinase activators including gonadotropin releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:704-709.

12 Matsuzaki N, Li Y, Masuhiro K et al. Trophoblast- derived transforming growth factor- β 1 suppresses cytokine-induced, but not gonadotropin- releasing hormone- induced, release of human chorionic gonadotropin by normal human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 74: 211- 216.

13 Nachtigall MJ, Kliman H, Feinberg RF, Olive DL, Engin O and Arici A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation. A potential role in human implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 801- 806.

14 D. Islami, P. Mock and P. Bischof. Effects of human chorionic gonadotropin on trophoblast invasion. *Sem Reprod Med* 2001, 19: 49- 53.

15 Licht P, Russu V and Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo- endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Sem Reprod Med*, 2001; 19: 37- 47.

blastocisto entra en la cavidad uterina la hCG producida por el trofoblasto puede regular factores paracrinos y morfológicos de la diferenciación del endometrio. Además, regula la actividad invasiva del trofoblasto modificando la producción y/o actividad de las MMPs y sus inhibidores.

- Cuando esta hormona aparece en el suero materno comienza a tener una actividad endocrina. En esta fase su acción principal se caracteriza por el rescate de la funcionalidad del cuerpo lúteo, esencial para el mantenimiento del embarazo hasta la semana 8-9 durante el primer trimestre, cuando la placenta comienza a secretar progesterona.
- Hacia la semana 9º, cuando el trofoblasto comienza a expresar el receptor de hCG funcional, ésta puede regular en forma autocrina/paracrina la diferenciación del trofoblasto.

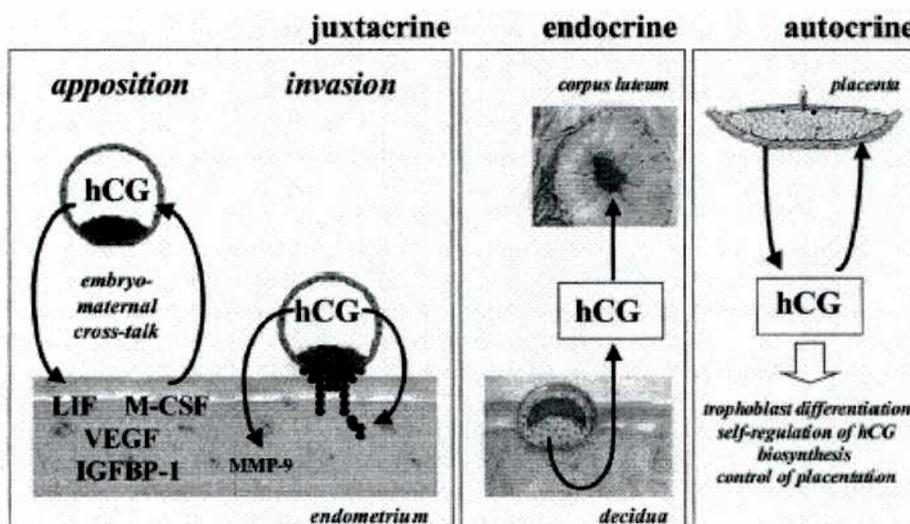


Figura 5 Modelo de acción secuencial de hCG placentaria (15). Se muestran los tres tipos de acción de esta hormona: acción juxtacrina sobre en endometrio y el trofoblasto, endocrina sobre el cuerpo lúteo y autocrina sobre el trofoblasto.

- La **hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)** placentaria es un decapeptido que comparte similitudes estructurales, inmunológicas, químicas y biológicas con la GnRH hipotalámica (16). Si bien GnRH no es una de las hormonas que más produce la placenta, ésta es de gran importancia dado que es uno de los reguladores principales de la secreción de hCG por este tejido (17). Como la placenta produce tanto GnRH y hCG como sus respectivos receptores, se establece un "loop" autocrino de regulación de la síntesis de hCG.

La **Progesterona** es una hormona esteroidea esencial para el mantenimiento del embarazo. Esta hormona es producida por el cuerpo lúteo hasta la semana 8-9º del embarazo, cuando se produce el "shift" lúteo-placentario con el cual la placenta comienza a ser la productora. En este momento esta hormona comienza a tener una concentración mucho mayor en el suero materno, llegando a niveles de 150-175 ng/ml hacia el final del embarazo, con un nivel de producción de 210 mg/ día durante el tercer trimestre (18).

Para la síntesis de progesterona, la placenta necesita una fuente de colesterol externa. Toma colesterol de la circulación materna (19) y, por medio del complejo enzimático de clivado de la cadena lateral (scc P450) lo convierte a pregnenolona, precursora directa de la progesterona (figura 6).

Uno de los pasos limitantes en la síntesis de progesterona en los distintos tejidos que la producen, es el transporte de colesterol hacia el

16 Siler- Khodr TM. Hypotalamic- like releasing hormones of the placenta. Clin Perinatol 1983, 10: 553- 566.

17 Siler- Khodr and Khodr. Dose analysis of GnRH stimulation of hCG release from human term placenta. Biol Reprod 1981; 25: 353-358.

18 Albrecht E and Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. Endocrine Rev 1990, 11: 124-150.

19 Rabe T, Kiesel L and Runnebaum B. Regulation of human placental progesterone synthesis in vitro by naturally occurring steroids. J Steroid Biochem 1985, 22: 657- 644.

complejo enzimático mitocondrial scc P450. En el cuerpo lúteo esta actividad la realiza la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory), no así en la placenta donde no hay expresión de dicha proteína, pero sí de una proteína homóloga de la StAR, MLN64 (20, 21).

Si bien aún no están claros los mecanismos de regulación de la síntesis de progesterona en la placenta, se postula que tanto el sistema scc P450 como la enzima MLN64, son posibles puntos de regulación. Contrariamente a lo que sucede en el cuerpo lúteo, en la placenta la hCG no tiene un efecto estimulador sobre la síntesis de progesterona (22, 23).

- La placenta no posee todas las enzimas necesarias para sintetizar **estrógenos** a partir de colesterol. La falta de la enzima 17 α -hidroxilasa, necesaria para convertir un esteroide de 21 carbonos en uno de 19, hace que la placenta obtenga dehidroisoandrosterona-S, proveniente de la glándula adrenal fetal, como sustrato para la síntesis de estrógenos. Gracias a esta colaboración feto-placentaria, esta última puede sintetizar estriol, estrona y estradiol (figura 6).

20 Bose HS, Whittal RM; Huang MC et al. N-218 MLN64, a protein with StAR- like steroidogenic activity, is folded and cleaved similarly to StAR. *Biochemistry* 2000, 39: 11722- 11731.

21 Strauss III JF, Christenson LK, Devoto L and Martinez F. Providing progesterone for pregnancy: control of cholesterol flux to the side- chain cleavage system. *J Reprod Fertil Supp* 2000, 55: 3-12.

22 Das NP, Khan-Dawood FS, Dawood MY. The effect of steroid hormones and gonadotropins on in vitro placental conversion of pregnenolone to progesterone. *J Steroid Biochem* 1985; 23:517-522.

23 Paul S, Das C, Jaikhai BL, Talwar GP. Progesterone synthesis by human placental syncytiotrophoblast in vitro- preferred precursor and effect of human chorionic gonadotropin. *J Steroid Biochem* 1981; 14:311-313.

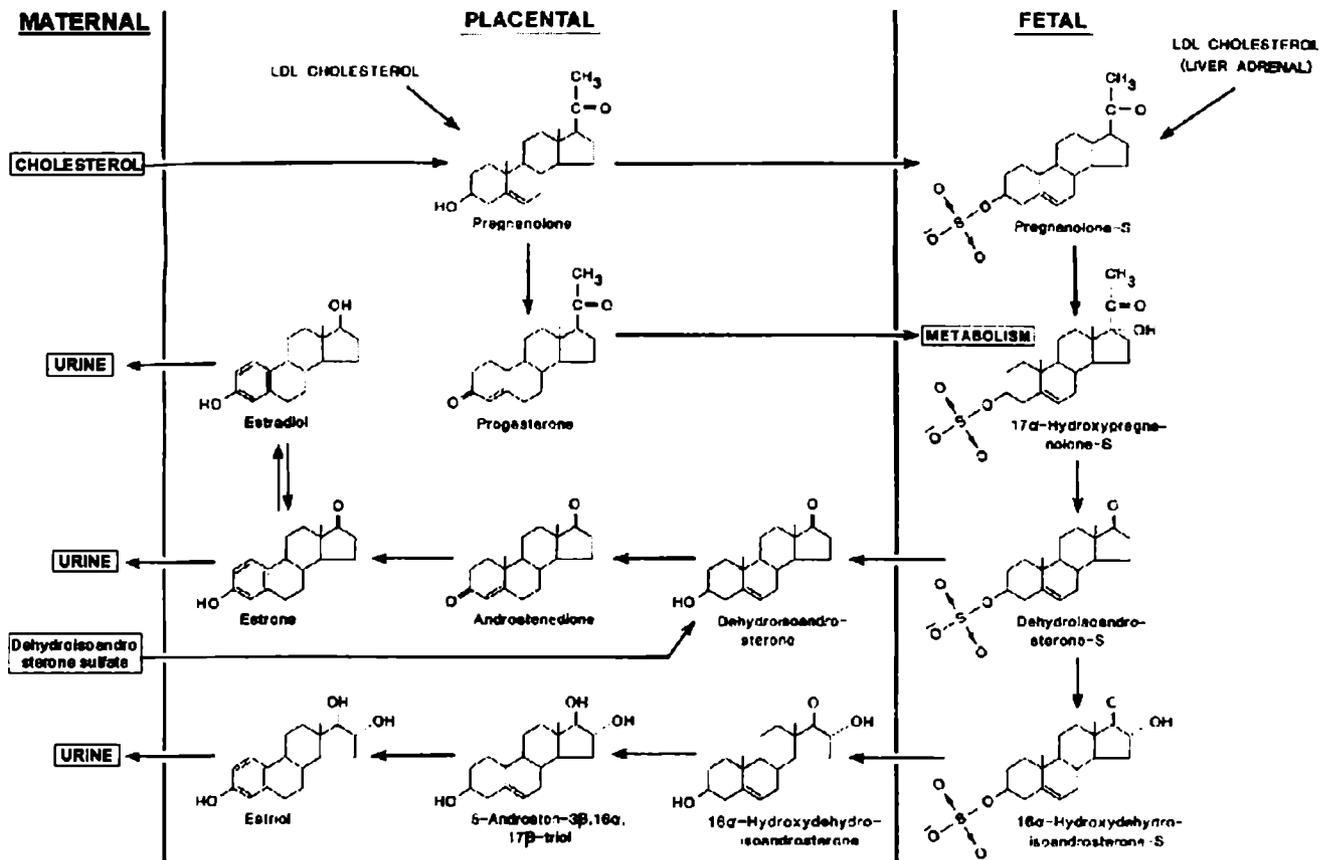


Figura 6 Síntesis de hormonas esteroideas en la unidad madre- feto- placenta. The physiology of Reproduction. Chapter 8. Knobil E and Neil JD. 1994. Raven Press, NY

- **Citoquinas**

Además de hormonas, la placenta sintetiza y secreta citoquinas que serán fundamentales para el desarrollo del feto y la placenta misma. Las citoquinas regulan muchos de los procesos y actividades de la placenta, siendo protagonistas fundamentales para la protección del feto de un posible ataque por parte del sistema inmune materno. Muchos casos de infertilidad en la especie humana están relacionados con alteraciones en los niveles locales de estas proteínas (24).

Las citoquinas están involucradas en la regulación de la invasión del trofoblasto (ver regulación de la actividad invasiva, pagina 24-25 de la introducción) y su diferenciación, así como también en el control de secreciones hormonales y del proceso de implantación durante los primeros días de la gestación.

Dado que no solamente el trofoblasto, sino también la decidua materna tienen la capacidad de secretar este tipo de proteínas, para un desarrollo correcto del feto y de la placenta, debe crearse un balance entre las proteínas secretadas por cada uno de ellos. Por la arquitectura de la interfase útero/placenta, en la mayoría de los casos resulta difícil identificar exactamente la fuente celular de cada citoquina (25, 26). Tanto la implantación, como el proceso de diferenciación de los distintos tipos celulares y la invasión, que participan en conjunto en la creación y desarrollo de la placenta, son regulados en gran medida por este balance.

Tanto las células del trofoblasto como las células del endometrio expresan, diferencialmente a lo largo del embarazo, además de las distintas citoquinas

24 Cameo M, Fontana V, Cameo P, Vauthay L, Kaplan J and Tesone M . Similar embryotoxic effects of sera from infertile patients and exogenous interferon-gamma on long-term in-vitro development of mouse embryo. Human Reproduction, 1999; vol 14, n 4, 959-63.

muchos de sus receptores. En consecuencia, se crea una regulación autocrina/paracrina de la placentación.

Se ha demostrado la secreción de citoquinas como IL-1 α y β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , M-CSF (25), entre otras, en la placenta humana (26, 27).

En particular, la IL-6 ha sido involucrada en la regulación de la secreción de hCG (28, 29) y de hLP (30) por el trofoblasto, y en la inhibición de la estimulación por FSH de la producción de progesterona por células de la granulosa (31).

Además, el trofoblasto también expresa el receptor de IL-6 que está formado por una proteína de 80 KDa que une IL-6 y una proteína asociada de 130 KDa que participa en la transducción de la señal inducida por la interleuquina (29).

25 Jokhi PP, King A, Boocock C, Loke YW. Secretion of colony stimulating factor-1 by human first trimester placental and decidua cell populations and the effect of this cytokine on trophoblast thymidine uptake in vitro. *Hum Reprod* 1995, 10: 2800-7.

26 Jokhi PP, King A and Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of placental- uterine interface. *Cytokine* 1997, 9: 126- 137.

27 Sacks GP, Clover LM; Bainbridge DRJ, Redman CWG and Sargent IL. Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. *Placenta* 2001, 22: 550- 559.

28 Meisser A, Cameo P, Islami D, Campana A, Bischof P. Effects of interleukin-6 on cytotrophoblastic cells. *Molec Hum Reprod* 1999; 5:1055-1058.

29 Neki R, Matzusaki N, Yamanaka K, Shimoya K, Okada T, Saji F, Iwashita M, Tanizawa O. The interleukine-6 (IL-6)/IL-6-receptor system induces human chorionic gonadotropin production by activating tyrosine kinase-dependent signal transduction pathway different from pathways triggered by protein kinase activators including gonadotropin releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:704-709.

30 Stephanou A, Handwerker S. Interleukine-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology* 1994; 135:719-723.

31 Salmassi A, Lü S, Hedderich J, Oettinghaus C, Jonat W. Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion. *J Endocrinol* 2001; 170:471-478.

- **Capacidad invasiva del trofoblasto y metaloproteasas**

Una de las actividades más importantes del trofoblasto, durante los estadios más tempranos del desarrollo del embarazo, es la actividad invasiva de estas células que permite la implantación del embrión en la pared uterina materna. Si bien esta actividad es más importante durante el periodo de implantación embrionaria, durante todo el embarazo una población celular del trofoblasto sigue teniendo una capacidad invasiva importante que le permite avanzar hacia el endometrio continuando el proceso de placentación.

El proceso de implantación y de invasión del endometrio materno no es un proceso pasivo de presión por crecimiento, sino un proceso bioquímico activo. Las células del CTB son invasivas porque secretan metaloproteasas (MMPs) que degradan los componentes de la matriz extracelular (MEC).

Las MMPs, o matrixinas, son una familia de al menos 17 endopeptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar, conjuntamente, todos los componentes de la MEC. Se pueden clasificar, según la especificidad de sustrato y la estructura, en cuatro subgrupos (Tabla 1) (32):

- a. *Gelatinasas*, que digieren colágeno tipo IV (componente mayor de la membrana basal), y colágeno desnaturalizado (gelatina).
- b. *Colagenasas*, que degradan colágeno I, II, III, VII y X.
- c. *Estromelisin*as, que degradan colágeno tipo IV, V, VII y también laminina, fibronectina, elastina, proteoglicanos y gelatina.
- d. *MT-MMPs*, degradan esencialmente pro-MMP-2, provocando la activación de la MMP-2 a nivel de membrana celular.

32 Bischof P and Campana A. Molecular mediators of implantation. Clinical Obstetrics and Gynaecology. Chapter 5. Harcourt Health Science Company 2000.

Subfamilia	MMP	Otro nombre	PM	Sustrato
Gelatinasas	MMP-2	Gelatinasa A, 72- KDa gelatinasa	73.882	Col IV, V, VII, X, gelatina, FN, elastina
	MMP-9	Gelatinasa B, 92- KDa gelatinasa	78.427	Col IV, V, gelatina
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa intersticial, Colagenasa de fibroblastos	54.007	Col I, II, III, VII, X, MMP-5, enactina
	MMP-8	Colagenasa de neutrófilos, Colagenasa de PMNL	53.412	Col I, III
	MMP-13	Colagenasa-3,	53.819	Col I
Estromelisinias	MMP-3	Estromelisinina-1, Transina-1	53.977	Col III, IV, IX, X, gelatina, laminina, FN, elastina, caseína
	MMP-7	PUMP-1, matrilisina	29.677	Caseína, FN, gelatina
	MMP-10	Estromelisinina-2, Transina-2	54.151	Col II, IV, V, FN, gelatina
	MMP-11	Estromelisinina-3	54.595	Col IV
MT-MMPs	MMP-14	MT1-MMP, MMP-X1	65.883	MMP-2
	MMP-15	MT2-MMP	75.807	MMP-2
	MMP-16	MT3-MMP, MMP-X2	69.158	MMP-2

Tabla 1 Clasificación de las MMPs. Col= colágeno; FN= fibronectina; PM= peso molecular; PMNL= leucocitos polimorfonucleares; PUMP-1= MMP-1 putativa.

La familia de genes de las MMPs comparte la presencia de un péptido señal, necesario para la secreción, un pro-péptido, un dominio catalítico que une Zn^{2+} , y un dominio carboxi-terminal de hemopexina (glico-proteína

transportadora de hemo), que es importante para determinar la especificidad de sustrato y la interacción con los inhibidores de las MMPs (TIMPs). Las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), en particular, tienen en el dominio catalítico un dominio de fibronectina tipo II, organizado como un dominio de unión de colágeno (figura 7) (33).

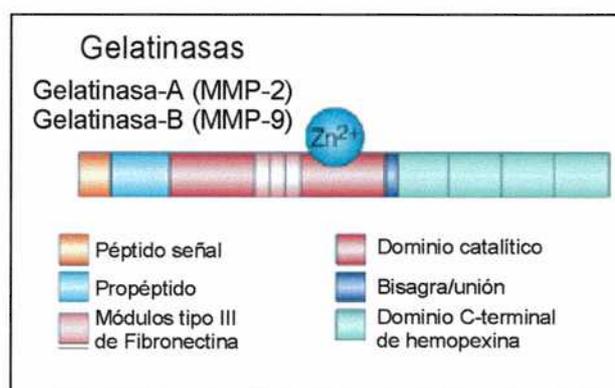


Figura 7 Estructura de los genes de las MMP-2 y 9. (33).

La regulación de la actividad proteolítica de las MMPs se da en distintos niveles *in vivo*; existe regulación transcripcional, a nivel de la activación de la pro-enzima o de la inhibición, además de existir también una regulación más fina de la estabilidad del RNAm, de la eficiencia de la traducción del mismo, de la compartimentalización de las enzimas y de autólisis (figura8)

La mayoría de las MMPs se secretan como pro-enzimas inactivas (pro-MMPs o zimógenos) y son activadas por otras proteasas, tales como plasmina. Se sabe que el pro-dominio enmascara la hendidura del sitio activo y previene

33 Christopher Mark Overall and Carlos López-Otín. Strategies for MMP inhibition in cancer innovations for the post trial era. Nature Reviews Cancer 2002; 2: 657-672.

la hidratación del ión Zn^{+2} del mismo. Un dominio conservado de cisteína en el pro-dominio forma un cierre de cisteína. Después del clivado inicial el pro-dominio se despliega parcialmente exponiendo sitios adicionales de corte de otras enzimas o de la misma MMP en trans.

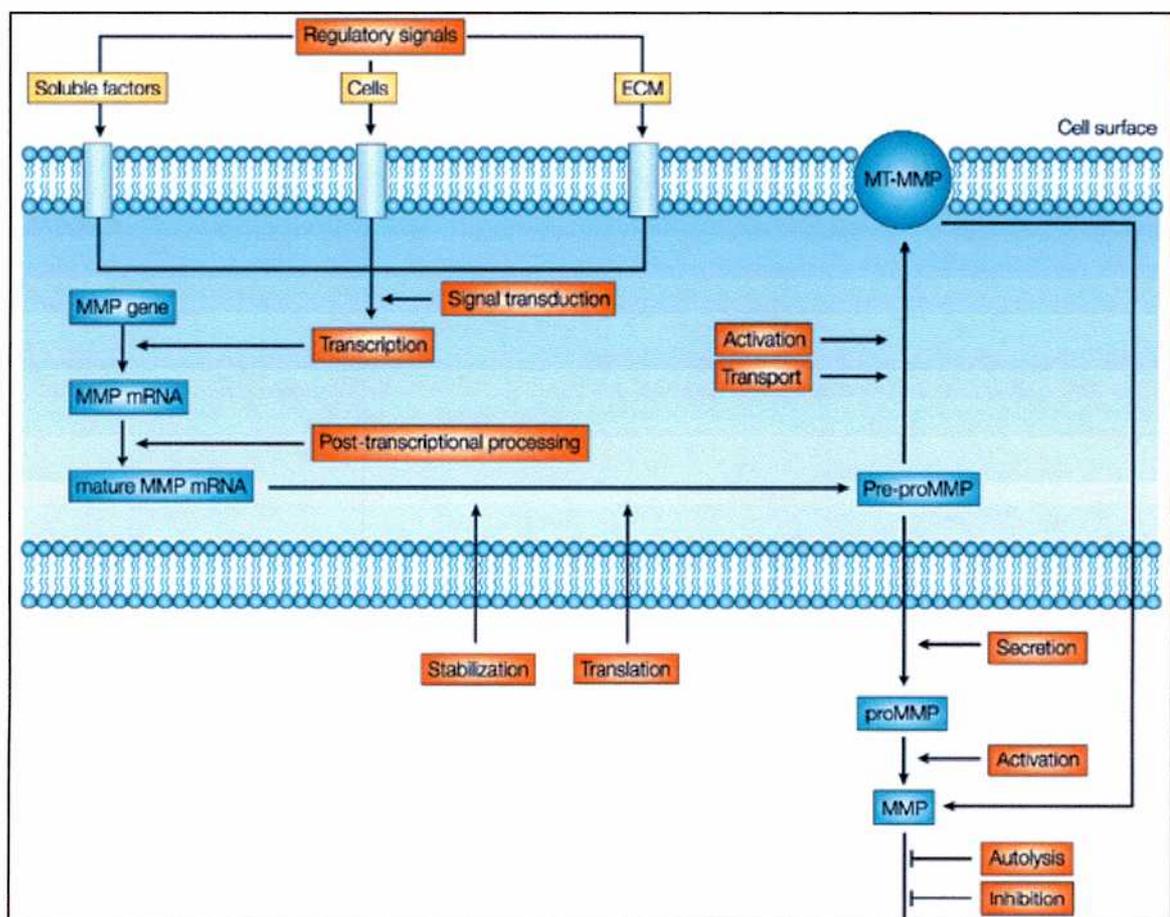


Figura 8 Distintos punto de regulación de la actividad de las MMPs. (32).

La actividad de las MMPs en el espacio extracelular es inhibida por inhibidores específicos ("tissue inhibitor of MMPs- TIMPs") que se unen, fuerte pero no covalentemente, al sitio de unión del Zn^{2+} con una estequiometría de 1:1. La familia de TIMPs consiste en cuatro miembros estructuralmente relacionados: TIMP-1, -2, -3 y -4. La capacidad invasiva del trofoblasto está determinada por el balance entre las MMPs y los TIMPs.

In vitro, se ha observado que las CTB invaden una membrana basal reconstituida (Matrigel) gracias a la secreción de por las CTB, dado que el agregado de TIMPs inhibe este comportamiento (34). Ha sido demostrado que las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 son las responsables de la invasión del trofoblasto (35).

La capacidad invasiva de las CTB es una actividad finamente regulada, dado que debe ser suficiente como para que no se provoque un desprendimiento del embrión/feto antes de tiempo, pero no debe ser demasiada y no ser nociva para la madre. Existe una regulación espacial y temporal autocrina, mediada por factores del trofoblasto y paracrina, mediada por factores uterinos, que hace que se limite a la invasión del endometrio y el tercio proximal del miometrio (36). La regulación de la secreción, activación o inhibición de estas dos proteínas en la placenta ha sido objeto de muchos estudios, dado que está relacionada con problemas de esterilidad tales como fallas de implantación o invasión exagerada de la pared uterina como en el caso de pre-eclampsia.

Existen distintos grupos de factores que actúan como reguladores de la invasión del CTB:

- Entre las hormonas placentarias, se ha demostrado que la progesterona inhibe la producción de MMP-9 (37), hecho que coincide con la disminución de la invasión del CTB a medida que avanza el

34 Librach CL; Werb Z, Fitzgerald ML et al. 92 KDa type IV collagenase mediates invasion of human cytotrophoblasts. J Cell Biol 1991, 113: 437- 449.

35 Bischof P, Martelli M, Campana A et al. Importance of metalloproteinases (MMP) in human trophoblast invasion. Early Pregnancy Biology and Medicine 1995, 1: 263- 269.

36 Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB and Brosens I. Trophoblastic invasion of human deciduas from 8 to 18 weeks of pregnancy. Placenta 1980, 1: 3- 11.

embarazo, junto con el aumento de la secreción de progesterona. Por otro lado, los resultados publicados por distintos autores respecto al efecto de la hCG sobre la capacidad invasiva del CTB, son contradictorios, si bien todos encuentran que de alguna forma afecta esta actividad (38,39).

- Se sabe que los componentes de la MEC influyen en la adhesión, extensión, migración y diferenciación celular a través de receptores específicos de membrana, llamados integrinas. Distintos trabajos muestran que el colágeno tipo I, la laminina, el Matrigel, la fibronectina, modifican la capacidad invasiva del CTB (40, 41).
- Se ha demostrado que muchas citoquinas y factores de crecimiento regulan de alguna forma el comportamiento invasivo celular. Entre las producidas por el trofoblasto o el endometrio humano se sabe que la IL-1 (42), la IL-6 (43), la IL-10 (44), el TNF- α (42), el EGF (45), el LIF (46), TGF- β (43) participan en los procesos de control o de estimulación de la invasión del endometrio por el trofoblasto.

37 Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner- Celnikier D et al. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down- regulation by progesterone. *A J Obst Gyn* 1998, 1788: 457- 461.

38 Yagel S, Geva TE, Solomon H et al. High levels of hCG retard first trimestre trophoblast invasión in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77: 1506- 1511.

39 Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K et al. Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 1998, 19: 587- 593.

40 Emonard H, Christiane Y, Smet M et al. Type IV and interstitial collagenolytic activities in normal and malignant trophoblast cells are specifically regulated by the extra cellular matrix. *Invasion and Metastasis* 1990, 10: 170- 177.

41 Kliman HJ and Feinberg RF. Human trophoblast- extracellular matrix (ECM) interactions in vitro ECM thickness modulates morphology and proteolytic activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990, 87: 3057- 3061.

42 Meisser A, Chardonnens D, Campana A and Bischof P. Effect of tumour necrosis factor alpha, interleukin- 1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Rep* 1999, 5: 252- 260.

43 Meisser A, Cameo P, Islami D et al. Effects of Interleukin- 6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Rep* 1999, 5: 1055- 1058.

44 Roth I and Fisher SJ. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. *Dev Biol* 1999, 205: 194- 204.

45 Bass KE, Moris D, Roth I et al. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol* 1994, 164: 550- 556.

46 Bischof P, Haenggeli L and Campana A. Effect of leukaemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 1995, 34: 225- 230.

- **La Leptina (del griego leptos: flaco)**

La leptina, una proteína de 16 KDa (167 aminoácidos) expresada por el gen de la obesidad (OB), fue clonada originalmente en el ratón (47).

Los ratones mutantes ob/ob son obesos e infértiles y producen una forma truncada de la proteína leptina que carece del 40% del dominio polipeptídico C-terminal (47). La administración de leptina recombinante a los ratones ob/ob hembras, corrigen la fertilidad y la obesidad (48).

Desde que se la descubriera, a fines de 1994, la leptina ha atraído mucha atención debido a su papel importante en la regulación del balance energético.

Al principio, se la estudiaba como una molécula "señal" derivada de los adipocitos con la función de limitar la ingesta de alimentos y aumentar el gasto de energía. Esta proteína se sintetiza en tejido adiposo, se secreta al torrente sanguíneo y se dirige al hipotálamo, donde señala saciedad. Estos efectos se logran mediante la interacción con receptores específicos localizados en el sistema nervioso central y tejido periférico.

La producción de esta proteína se ha demostrado en otros tejidos tales como la placenta (49, 50, 51, 52, 53), el epitelio gástrico (54), el cerebro (55), epitelio mamario (56), músculo esquelético (57) entre otros.

47 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.

48 Chehab FE, Lim ME, Lu RH. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with human recombinant leptin. *Nature Genetics* 1996; 12: 318-20.

49 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Non-adipose tissue production of leptin; leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029-1033.

50 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

51 Dotsch J, Nusken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2755-2758.

52 Senaris R, Garcia Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997; 138:4501-4504.

El gen OB codifica en el tejido adiposo, un ARNm de 4.5 kilobases, que se traduce en una proteína altamente conservada de 167 aminoácidos. Existe un 84% de homología entre la proteína de ratón y la humana (47). En humanos este gen se localiza en el cromosoma 7q31.3 (58) y 7q32.1 (59).

La concentración de leptina circulante refleja el contenido de grasa tanto en ratones como en humanos adultos (60, 61).

En humanos se han identificado pocas mutaciones; entre ellas una mutación sin sentido en el gen de esta proteína que provoca deficiencia de la misma (62).

Un análisis estructural propone que la leptina tiene una estructura del tipo de las citoquinas (63). Este análisis, sumado a características del receptor de la leptina que lo incluyen dentro de la familia de los receptores de citoquinas

53 Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhum P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11073-11078.

54 Bado A, Lévassieur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394:790-793.

55 Wiesner G, Vaz M, Collier G, Seals D, Kaye D, Jennings G, Lambert G, Wilkinson D, Esler M. Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2270-2274.

56 Smith- Kiwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG and Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 1810- 1813.

57 Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N and Rossetti L. A nutrient- sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 1998, 394: 790- 793.

58 Green ED, Maffei M, Braden VV, Proenca R, DeSilva U, Zhang Y, Chua SC Jr, Leibel RL, Weissenbach J, Friedman JM. The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 5:5-12,1995.

59 Geffroy S, De Vos P, Staels B, Duban B, Auwerx J, de Martinville B. Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 28:603-604,1995.

60 Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314,1995.

61 Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob mRNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161,1995.

62 Strobel A, Issad T, Camoin T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 18:213- 215,1998.

63 Madej T, Boguski MS, Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett.* 1995; 373:13-18.

clase I y similitudes de función con algunas citoquinas, sugieren a la leptina como una nueva proteína de este grupo (64).

• **Leptina en reproducción**

La función principal de la leptina es la disminución del apetito y el aumento del gasto energético. Este efecto es producido en el hipotálamo por medio de receptores específicos presentes en el mismo. Aparentemente la leptina reduce la producción del neuropéptido Y (NPY) en el núcleo arcuato del hipotálamo (65). Este péptido, en condiciones normales, produce el aumento en la ingesta de alimentos y después de administración crónica, produce obesidad (66). La infusión intra-cerebro-ventricular de NPY, en ratas, provoca el aumento de la expresión del RNAm de la leptina en tejido adiposo (67).

Desde 1997 se ha sugerido que la leptina podría tener otras funciones además de la regulación del balance energético. Varias observaciones sugieren un papel importante en reproducción, particularmente en la fisiología feto-placentaria.

Evidencias recientes demostraron que esta proteína es importante no solamente en la regulación del peso corporal y deposición de grasa, sino también en otras funciones incluyendo hematopoyesis y reproducción. En común con muchas citoquinas, la leptina tiene un papel en hematopoyesis, donde estimula la proliferación y diferenciación (68, 69). Aún más, el

64 Soh EBE, Mitchel MD and Keelan JA. Does Leptin exhibit cytokine- like properties in tissues of pregnancy? A J Reprod Immunol 2000, 43: 292- 298.

65 Leibowitz SF. Specificity of hypothalamic peptides in the control of behavioural and physiological processes. Ann N Y Acad Sci 1994, 739: 12- 35.

66 Stanley TG, Kyrkouli SE, Lampert S and Leibowitz SF. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical induced of hyperphagia and obesity. Peptides 1986, 7: 1189- 1192.

67 Rohner- Jeanrenaud F. A neuroendocrine reappraisal of the dual- centre hypothesis: its implications for obesity and insulin resistance. Int J Obesity 1995, 19: 517- 534.

68 Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ Mathias J, Thomas GR, Matthews W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. Curr. Biol. 1996; 6: 1170-80.

tratamiento con leptina acelera la aparición de la pubertad en roedores hembras (70).

Aunque en humanos la leptina circula en concentraciones similares en ambos sexos durante el período pre-puberal, las mujeres adultas presentan concentraciones más elevadas que los hombres, independientemente del grado de adiposidad (71). Durante el ciclo menstrual, las concentraciones de leptina fluctúan de acuerdo con la fase del ciclo (72, 73), mostrando una correlación positiva con el índice de masa corporal (BMI, Body Mass Index) (figura 8).

69 Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med.* 1996; 2: 585-9.

70 Chehab FE, Mounzih K, Lu RH, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; 275: 88-90.

71 Claytor E, Gill MS, Hall CM, Tillman V, Whatmore AJ, Price DA. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin Endocrinology* 1997; 46: 727-33.

72 Hardie L, Trayhum P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 101-6.

73 Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *Journal of Endocrinology* 1997; 154: 285-92.

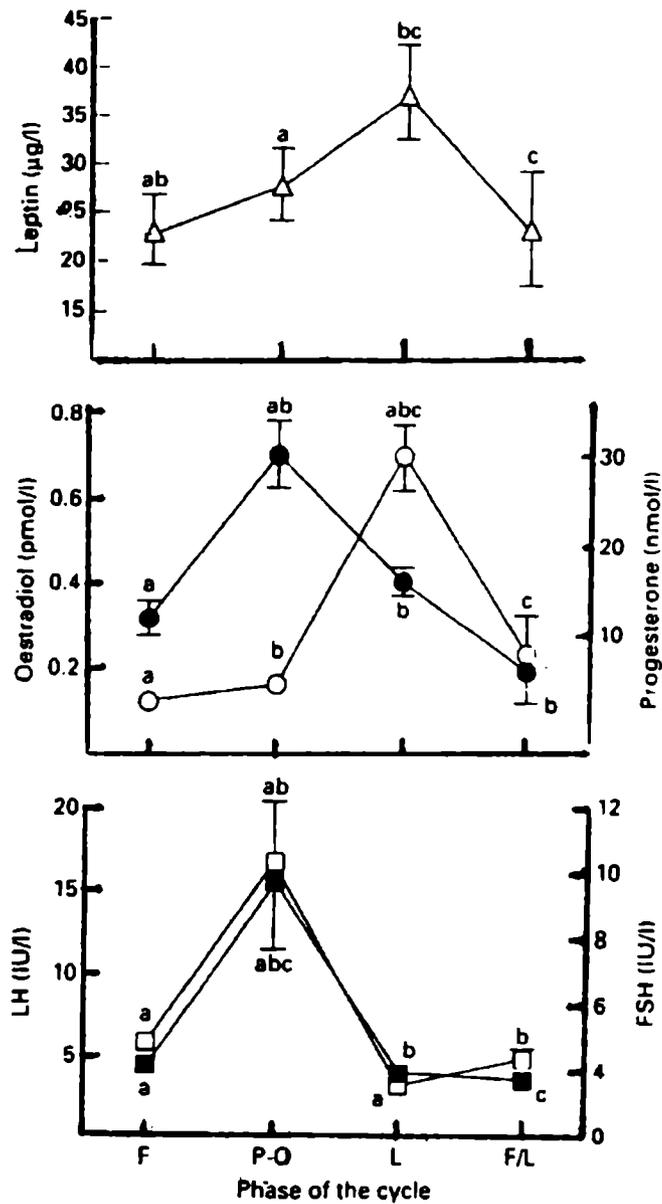


Figura 8 Niveles plasmáticos de estradiol (●), progesterona (○), LH (■), FSH (□) y leptina en mujeres de ciclo espontáneo en las distintas fases del ciclo menstrual (n=6). F: fase folicular, P-O: período peri-ovulatorio, L: fase lutea, F/L: transición fase folicular/fase lutea. Los valores con supraíndices comunes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0.05$) (74).

74 Hardie L, Trayhum P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 101-6.

El receptor de la leptina ha sido encontrado, en su isoforma corta, tanto en ovario (75) como en testículo (76). Aparentemente, esta proteína inhibe las funciones ováricas considerando distintos parámetros; por ejemplo, inhibe la inducción de la secreción de progesterona provocada por insulina en cultivos de células de la teca (77) y la producción de estradiol y progesterona inducida por insulina en células de la granulosa (78). Un efecto inhibitorio análogo se encontró sobre la estimulación de producción de estradiol por LH, en células de la granulosa humanas (79). El efecto de la leptina en las gónadas podría ser directo a través de estos receptores como también indirecto a través del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

Leptina en la placenta

Se observan cambios importantes en los niveles plasmáticos de leptina en las mujeres durante la gestación: en el primer trimestre de embarazo, las concentraciones de leptina son significativamente más elevadas que en mujeres de edad y BMI comparables, pero no embarazadas; durante el segundo trimestre, los niveles plasmáticos de leptina son significativamente más altos que en el primer trimestre y permanecen elevados durante el tercer trimestre. Al final del embarazo, dentro de las 24 horas del parto, los niveles plasmáticos maternos de leptina disminuyen a valores normales (80, 81) (figura 9).

75 Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS and Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 4144–4148.

76 Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K Trayhurn P and Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 232: 383–387.

77 Spicer LJ and Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1998, 58:207–212.

78 Spicer LJ and Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997, 138: 3374–3379.

79 Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS and Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 4144–4148.

80 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, et al. Non-adipose tissue production of leptin; leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3: 1029-33.

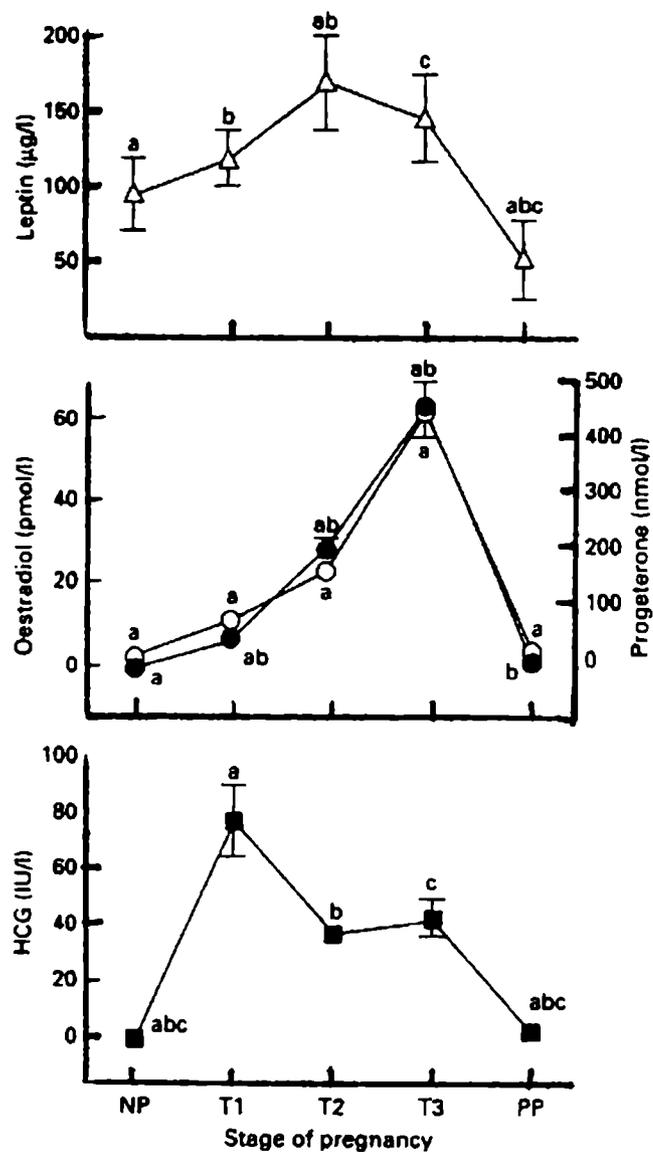


Figura 9 Niveles plasmáticos de estradiol (●), progesterona (○), hCG y leptina en mujeres de ciclo espontáneo antes, durante y un mes después de un embarazo normal (n=5). NP: pre-parto, T1, T2, T3: primer, segundo y tercer trimestres durante el embarazo, PP: 4-6 semanas post parto. Los valores con supraíndices comunes (a, b, c) son significativamente diferentes (ANOVA, $p < 0.05$) (81).

81 Hardie L, Trayhum P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 101-6.

Además de los cambios en los niveles plasmáticos de leptina durante el embarazo, existen muchas observaciones que sugieren un posible papel de la leptina en la reproducción humana, particularmente en la fisiología de la unidad feto/placentaria:

La producción de leptina por la placenta (82, 83, 84, 85, 86).

Niveles significativamente altos de leptina plasmática en casos de mola hidatiforme (87, 88), que decrecen a valores normales después de la cirugía.

Existe una alta expresión del receptor de leptina en la placenta durante el tercer trimestre de embarazo (89, 90, 91, 92).

Se sabe poco de la función fisiológica de la leptina durante la preñez humana pero existen muchas observaciones que sugieren que ésta puede ser un factor clave en el mantenimiento del embarazo. Dados los altos niveles de

82 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Non-adipose tissue production of leptin; leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029-1033.

83 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

84 Dotsch J, Nusken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2755-2758.

85 Senaris R, Garcia Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997; 138:4501-4504.

86 Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhum P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:11073-11078.

87 Chehab FF. The reproductive side of leptin. *Nature Medicine* 1997, 3: 1029- 1033.

88 Sagawa N, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y and Nakao K. Leptin production by hydatidiform mole. *The Lancet* 1997, 350: 1518- 1519.

89 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

90 Wolf HJ, Ebenbichler CF, Huter O and Bodner J. Signal transducing leptin receptor in human term placenta. *Placenta* 1999; 20: A 71.

91 Bodner J, Ebenbichler CF, Wolf HJ, Muller-Holzner E, Stanzl U, Gander R, Huter O, Patsch JR. Leptin receptor in human term placenta : in situ hybridization and immunohistochemical localization. *Placenta* 1999; 20:677-682.

92 Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Cancellor R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marziani D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Rep* 2000; 6:951-958.

esta proteína en el suero de mujeres embarazadas a lo largo de todo el embarazo, y el hecho que los efectos metabólicos de niveles elevados de leptina (disminución en la ingesta y aumento en la eficiencia metabólica) no se observan y no son deseados, se puede esperar que esta proteína cumpla una función importante y diferente durante el período de gestación en la mujer.

Factores como retinoides (93), insulina, glucocorticoides y AMPc (94), han sido involucrados en la regulación de la secreción de leptina por la placenta humana. Por otro lado, se ha demostrado la existencia de un "enhancer" ubicado 1.9 kb río arriba del gen de la leptina humana que contiene tres sitios de unión de proteínas, PLE1-3, que se encuentra en líneas celulares de coriocarcinoma pero no en células de tejido adiposo ni en células HeLa (95). Las proteínas que se unen a los sitios PLE1-3 podrían ser específicas de placenta. Estos antecedentes sugieren que existe una regulación fina de la expresión de leptina en este tejido.

• **Interacción de la leptina con otras hormonas y citoquinas**

En los últimos años la leptina comenzó a verse involucrada en muchas más funciones de las que le fueron atribuidas en un principio.

Por su relación estructural con la familia de las citoquinas clase I, se supuso que estaría involucrada en la modulación del sistema inmune y de la respuesta de la secreción de distintas citoquinas frente a la inflamación. Se vio que en ratones, la administración de TNF- α , IL-1 y LIF (leukemia inhibitory factor) aumentaba la concentración de leptina en suero como, así también, la

93 Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, Evain-Brion D. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2550-2555.

94 Coya R, Gualillo O, Pineda J, Garcia MC, Busturia MA, Aniel- Quiroga A, Martul P, Senaris RM. Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast. *Biol Reprod.* 2001; 65:814-819.

95 Bi S, Gavrilona O, Gong D, Mason MM and Reitman M. Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. *J Biol Chem* 1997, 272: 30583- 30588.

expresión de su ARNm en tejido adiposo (96). También en humanos, infusiones de TNF- α e IL-1 producían un aumento en la concentración de leptina en suero (97, 98).

Por otro lado, esta proteína también se vio involucrada en la secreción de distintas hormonas. Por ejemplo, el dimorfismo sexual que se observa en la concentración de leptina en suero, tanto en humanos como en roedores, se lo relaciona con la concentración de testosterona y otras hormonas sexuales. La testosterona tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de leptina a nivel proteico y de ARNm en tejido adiposo (99). En hombres adultos los niveles de leptina correlacionan negativamente con la testosterona y positivamente con los niveles de estradiol; lo mismo sucede con los niveles de estradiol en mujeres adultas (100).

• **Leptina y viabilidad celular**

Tanto la leptina como el TNF- α y otras citoquinas modulan también la viabilidad celular en muchos tejidos. El producto del gen OB muestra efectos opuestos sobre la viabilidad, dependiendo del tipo celular involucrado. La

96 Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 1997, 185:171-175.

97 Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP. Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:4080-4082.

98 Janik JE, Curti BD, Considine RV, Rager HC, Powers GC, Alvord G, Smith JW II, Gause BL, Kopp WC. Interleukin 1 α increases serum leptin concentrations in humans *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:3084-3086.

99 Wabitsch M, Blum WF, Muehe R, Braun M, Hube F, Rascher W, Heinze E, Teller W, Hauner H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997, 100:808-813.

100 Paolisso G, Rizzo MR, Mone CM, Tagliamonte MR, Gabardella A, Riodino M, Carella C, Varricchio M, D'Onofrio F. Plasma sex hormones are significantly associated with plasma leptin concentration in healthy subjects. *Clin Endocrinol* 1998, 48:291-297.

leptina es pro-apoptótica en adipocitos (101) mientras que estimula la proliferación en células epiteliales de tráquea (102) y en células progenitoras hematopoyéticas (103). Similar es el caso del TNF- α , otro conocido modulador de varias funciones trofoblásticas (104). Esta citoquina induce muerte celular, ya sea apoptosis o necrosis, en algunos tejidos, pero induce efectos mitogénicos en otros (105). En placenta, particularmente, el TNF- α tiene efectos contradictorios sobre la viabilidad de las células dependiendo de la edad del tejido (106, 107).

La apoptosis y la proliferación celular juegan un papel crítico en procesos fundamentales para el desarrollo de la placenta durante el embarazo, tales como la invasión endovascular (108), la tolerancia inmune materna (109) y el desarrollo del trofoblasto (110). Así como en placentas normales estos procesos son fundamentales, se ha demostrado que en casos de desórdenes tales como crecimiento intrauterino restringido y de pre-eclampsia existe un

101 Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology* 1998, 139: 791-4.

102 Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. *Eur J Pharmacol* 1999, 365: 273-9.

103 Konopleva M, Mikhail A, Estrov Z, Zhao S, Harris D, Sanchez-Williams G, Kornblau SM, Dong J, Kliche KO, Jiang S, Snodgrass HR, Estey EH, Andreeff M. Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 1999, 93: 1668-76.

104 Meisser A, Chardonens D, Campana A and Bischof P. Effects of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 α , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor b on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Rep* 1999, 5: 252-60.

105 Fiers W. Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS* 1991, 285: 199-212.

106 Yui J, Gacia-Lloret M, Wegmann TG and Guilbert LJ. Cytotoxicity of Tumour Necrosis Factor- alpha and Gamma-Interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994, 15: 819-35.

107 Knöfler M, Mösl B, Bauer S, Griesinger G and Husslein P. TNF- α /TNFRI in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 2000, 21: 525-35.

108 Chan CC, Lao TT and Cheung An. Apoptotic and proliferative activities in first trimester placentae. *Placenta* 1999, 20: 223- 227.

109 Mor G, Gutierrez LS, Eliza M, Kahyaoglu F and Airici A. Fas- fas ligand system- induced apoptosis in human placenta and gestational trophoblastic disease. *Am J Reprod Immunol* 1998, 40: 89- 94.

110 Crocker IP, Barrat S, Kaur M and Baker PN. The in vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2001, 22: 822- 830.

nivel de apoptosis mucho mayor (111, 112) que en embarazos sin complicaciones.

• **Receptor de Leptina**

La actividad biológica de la leptina está mediada por su interacción con un receptor de membrana específico, Ob-R, miembro de la súper-familia de receptores para citoquinas clase I (113, 114). Como miembro de esta familia de receptores, tiene un solo dominio transmembrana.

Este receptor (producto del gen de la diabetes, db) ha sido clonado y muestra, al menos, cinco isoformas producidas por "splicing" alternativo en ratón (115, 116, 117), y cuatro en humanos (118). Todas las isoformas comparten el dominio extracelular pero difieren en las regiones transmembrana y citoplasmática (85, 119). Entre estas variantes, la que tiene el dominio citoplasmático más largo (Ob-Rb) es la isoforma funcional con

111 Smith SC, Baker NP and Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 1997, 177: 1395- 1401.

112 Allaire AD, Ballanger KA, Wells SR et al. Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000, 96: 271- 276.

113 Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai C, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8374-8378,1996.

114 Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272:6093-6096.

115 Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breibart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84:491-495,1996.

116 Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635,1996.

117 Tartaglia LA, Dembski M, Wen X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore K, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271,1995.

118 Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Medicine* 2:585-588,1996.

119 Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, and Nakao K. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-Identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225:75-83.

capacidad de transducir señales en el hipotálamo (120). También se han publicado resultados que muestran la capacidad de transducir señales de otras isoformas como la Ob-Ra (121). Por otro lado, se ha propuesto un papel como proteína soluble ligadora de leptina, a la isoforma Ob-Re (85). Estos antecedentes indican que la regulación de la acción de la leptina en los tejidos efectores podría depender, al menos parcialmente, del balance en la expresión de las distintas isoformas de su receptor. Ambas formas, la corta y la larga, se han encontrado en la placenta (122, 123). Ninguna publicación muestra los pesos moleculares (PM) de los receptores para leptina en este tejido, tal vez porque estos trabajos utilizan técnicas que no buscan determinar el PM de los receptores presentes en la placenta humana.

La unión de la leptina a la isoforma Ob-Rb de su receptor resulta en la activación de distintas vías de transducción de señales, como la vía JAK- STAT y la vía de las "mitogen activated protein kinase" (MAPK) que, eventualmente, inducen la expresión de varios genes involucrados en la regulación transcripcional y señalización, como también en la fisiología celular. Por otro lado, la forma corta contiene únicamente la caja 1 de ligando de JAK para la activación de JAK y MAPK (124). Aparentemente, la unión de la leptina induce la homodimerización de su receptor (125).

120 Casanueva FF and Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20:317-363.

121 Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M and Shima K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:26-29.

122 Bodner J, Ebenbichler CF, Wolf HJ, Muller-Holzner E, Stanzl U, Gander R, Huter O, Patsch JR. Leptin receptor in human term placenta : in situ hybridization and immunohistochemical localization. *Placenta* 1999; 20:677-682.

123 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

124 Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002. 77:433-444.

125 Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB, Buchanan CD. Leptin and Reproduction. *Steroids* 2002; 67:95-104.

El ADN del OB-R de ratón y humano tienen un 78% de homología (126). El gen codificante para el Ob-R está localizado en el cromosoma 4 en ratón, en el 5 en rata, y en el 1p en humanos (127).

Como ha sido mencionado anteriormente, se ha encontrado expresión del receptor de la leptina en distintos tejidos, donde se ha estudiado su posible función (tabla 2).

126 Tartaglia LA, Dembski M, Wen X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995;83: 1263-71.

127 Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Leibel RL. Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human. *Genome Res* 6:431-438, 1996.

Expresión de R-OB	Función (es)	Referencia	Humana (H)	Animal (A)
CNS	Control de apetito y peso corporal	Halaas 1995	H	A
Adrenales	Disminución de la producción de glucocorticoides	Pralong 1998	H	A
Hígado	Redistribución de producción de glucosa, hematopoyesis fetal	Rosetti 1997, Cioffi 1996	H	A
Células beta, páncreas	Reducción de la secreción de insulina	Seufert 1999	H	
Tejido adiposo blanco	Reducción del "uptake" de glucosa	Wang 1999		A
Tejido adiposo marrón	Aumento del "uptake" de glucosa	Wang 1999		A
Músculo	Aumento del "uptake" de glucosa	Wang 1999		A
Médula ósea	Activación de las células hematopoyéticas, inmunidad mediada por linfocitos T	Mikhaik 1997, Lord 1998	H	A
Endotelio vascular	Estimulación de la angiogénesis	Sierra- Honigman 1998	H	A
	Iniciación de pubertad	Chehab 1997, Farooqi 1999, Bado 1998	H	A
Ovario		Cioffi 1996	H	
Endometrio		Gonzalez 2000	H	
Placenta/ embrión	Desarrollo/función placenta/ embrión?	Antczak 1997, Cioffi 1996	H	A

Tabla 2 Resumen de algunas de las funciones más importantes de la leptina.

• **Leptina y patologías reproductivas**

La expresión diferencial de leptina ha sido relacionada con diferentes patologías reproductivas tales como diabetes recurrente (128, 129), preñez anormal (130), fallas de implantación (131), pre-eclampsia (132), retraso de crecimiento intrauterino (133) y endometriosis (134, 135, 136).

❖ *Pre-eclampsia*

La pre-eclampsia es una enfermedad que ocurre durante el embarazo o inmediatamente después del parto y puede afectar tanto a la madre como al bebé. En casos esporádicos puede causar en la madre eclampsia, y provocar daño en otros órganos como hígado, pulmones, cerebro.

128 Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J, Hauguel-de Mouzon S. Overexpression of Placental Leptin in Diabetic Pregnancy. *Diabetes* 1998; 47:847-850.

129 Lea RG, Howe D, Hannah LT, Bonneau O, Hunter L Hoggard N. Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod* 2000; 6:763-769.

130 Lea RG, Hannah L, Blades J, Howe D and Hoggard N. Placental leptin in normal and abnormal pregnancies. *J Rep Fertl Abs Series* 1998; 21:Abstract 41.

131 Alfer J, Muller-Schottle F, Classen-Linke I, von Rango U, Happel L, Beier-Hellwig K, Rath W, Beier HM. The endometrium as a novel target for leptin : differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6:595-601.

132 Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Augemented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endoc Metab* 1998; 83:3225-3229.

133 Linnemann K, Malek A, Schneider H and Fusch C. Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. *Biochem Soc Tran* 2001, 29, part 2.

134 Wu M, Chuang P, Chen H, Lin C and Tsai S. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation. *Mol Hum Rep* 2002, 8: 456- 464.

135 Matarese G, Alviggi C, Sann V et al. Increased leptin levels in serum and peritoneal fluid of patients with pelvic endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 2483- 2487.

136 Matalliotakis GE, Koumantaki YG, Neonaki MA et al. Increase in serum leptin concentrations among women with endometriosis during danazol and leuprolide depot treatments. 2000, 183: 58-62.

Esta patología, que se desarrolla durante la segunda mitad del embarazo, se caracteriza por hipertensión sanguínea y proteinuria (mas de 300 mg/ día), causando así una reducción en el flujo sanguíneo útero-placenta, y llevando a hipoxia en la placenta y retraso en el crecimiento fetal (137).

De todas las patologías asociadas a la preñez, es de las más comunes, afectando aproximadamente al 5-10% de los embarazos. Si bien la sintomatología tiene una descripción simple, su etiología no es clara.

Distintos autores encontraron niveles elevados de leptina en casos de pre-eclampsia (103, 104, 138, 139). Dada la hipoxia característica de la pre-eclampsia y la existencia de un conjunto de genes regulados por la tensión de oxígeno en la placenta, es lógico entender que distintos autores hayan demostrado que una baja tensión de oxígeno estimula la transcripción del gen de la leptina humana por medio del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) (140, 141).

❖ *Fallas de implantación*

Varios trabajos proponen alteraciones de la leptina como una posible causa de infertilidad en pacientes con infertilidad idiopática. En endometrio de pacientes subfértiles, con imposibilidad de obtener un embarazo en el último año y, en ausencia de anomalías en todos los parámetros evaluados, no se encontró expresión del RNAm del receptor de leptina, que sí se encontró en los pacientes normales (102). Estos resultados sugieren que la presencia del

137 Redman CWG. Current topic: preeclampsia and the placenta. *Placenta* 1991, 12: 301- 308.

138 Odegard RA, Vatten LJ, Nilsen ST et al. Umbilical cord plasma leptin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186: 427- 432.

139 Chappell LC, Seed PT, Briley A et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 187: 127- 136.

140 Grosfeld A, Turban S, André J et al. Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. *FEBS Letters* 2001, 502: 122- 126.

141 Grosfeld A, André J, Hauguel- de Mouzon S et al. Hypoxia- inducible factor 1 (HIF-1) transactivates the human leptin gene promoter. *J Biol Chem* 2002 Sep 4 [epub ahead of print].

receptor de leptina en el endometrio podría estar relacionada con la receptividad del mismo para la implantación del blastocisto.

❖ *Diabetes*

Placentas de pacientes diabéticas con tratamiento crónico de insulina sobre-expresan el gen de la leptina (142); esto sugiere que la insulina modula la expresión de la leptina placentaria.

❖ *Endometriosis*

La endometriosis es una enfermedad común que ocurre principalmente en mujeres en edad reproductiva y es considerada de etiología compleja y multifactorial. El mecanismo exacto responsable del desarrollo de dicho desorden es desconocido aún, si bien está asociada con la sobre-expresión de factores tales como esteroides, prostaglandinas, factores angiogénicos y citoquinas. La expresión de leptina y su receptor han sido detectados en el endometrio con una fluctuación a lo largo del ciclo menstrual (143, 144, 145). Un aumento de la expresión de leptina ha sido asociado con esta patología (104).

142 Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N et al. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy. A critical role for insulin. *Diabetes* 1998, 47: 847- 850.

143 Alfer J, Muller- Schottle F, Classen- Linke I et al. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod* 2000, 6: 595- 601.

144 Gonzales RR, Caballero- Campo P, Jasper M et al. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 4883-4888.

145 Kitawaki J, Koshihara H, Ishihara H et al. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85: 1946- 1950.

❖ *Retraso en el crecimiento*

Un retraso en el crecimiento intrauterino ("intra-uterine growth retardation", IUGR) puede ser causado por factores nutricionales, genéticos o de circulación en la placenta. En los últimos años se ha propuesto que fallas en la producción y regulación de leptina podrían ser otra causa de IUGR (146), dado que se cree que esta proteína es un factor de crecimiento durante el desarrollo fetal (147). Distintos autores publicaron niveles fetales de leptina significativamente más bajos en casos de IUGR (148, 149).

146 Linnemann K, Malek A, Schneider H and Fusch C. Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. *Biochem Soc Tran* 2001, 29, part 2.

147 Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM and Lea RG. *Rev Reprod* 2000, 5: 18-24.

148 Geary M, Pringle PJ, Persaud M et al. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. *Br J Obstet Gynaecol* 1999, 106: 1054- 1060.

149 Cetin I, Morpurgo PS, Radaelli T et al. Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term. *Pediatr Res* 2000, 48: 646- 651.

OBJETIVO

OBJETIVO

El objetivo general de la presente investigación fue estudiar el papel que podría tener la leptina en la placenta humana, particularmente en relación a la actividad de la misma como glándula endócrina, analizando la actividad del trofoblasto de primer y tercer trimestre, teniendo en cuenta que las funciones de este tipo celular son fundamentales para el comienzo, el mantenimiento y la finalización normal del embarazo.

Para poder aclarar nuestro objetivo general desarrollamos los siguientes objetivos parciales:

- ✓ Verificar la expresión y síntesis de leptina en cultivos de trofoblasto y explantos de placenta humana.
- ✓ Estudiar el efecto de la leptina sobre:
 - I. la viabilidad de células de trofoblasto placentario humano.
 - II. la actividad endocrina de la placenta humana.
 - III. la actividad gelatinolítica del trofoblasto.
- ✓ Estudiar el efecto de distintos factores y hormonas, normalmente presentes en la interfase materno/fetal, sobre la síntesis y secreción de leptina por la placenta misma.
- ✓ Estudiar la expresión del receptor de leptina en la placenta.
- ✓ Estudiar el nivel de leptina en sueros de pacientes con algunas patologías reproductivas, en un intento preliminar de tratar de relacionar la expresión de esta proteína con algún desorden endocrinológico/reproductivo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Dado que este trabajo involucra material humano y relacionado con la reproducción, cabe aclarar que para el desarrollo de los experimentos realizados en la Argentina, en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), se utilizó exclusivamente placenta de término, material que se considera de descarte luego de una cesárea o de parto vaginal normal (Guidelines for the opportunistic procurement and use of human tissue and other biological material in research-World Health Organization, 1991).

Por otra parte, todos los experimentos relacionados con material de primer trimestre se realizaron con material obtenido luego de abortos legales bajo la dirección del Dr. Paul Bischof; en el Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Maternidad del Hospital Cantonal Universitario, Ginebra, Suiza.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y METODOS

- Pacientes

Con el objeto de obtener trofoblasto de tercer trimestre se utilizaron placentas de término de embarazo normal, de cesáreas realizadas por existir una cesárea previa, de la Maternidad Suizo Argentina, del Instituto Argentino de Diagnóstico y Tratamiento (IADT) y del Hospital Alemán. Se analizaron 39 placentas.

Para obtener células de trofoblasto de primer trimestre se utilizaron material resultante de abortos legales normales de entre 7 y 11 semanas en el Laboratorio de Endocrinología, Departamento de Ginecología y Obstetricia, Maternidad, Hospital Cantonal Universitario, Ginebra, Suiza. Se analizaron 80 trofoblastos.

- Purificación de CTB

Si bien el protocolo de purificación de las CTB de primer trimestre o de placenta a término es, en general, el mismo, existen algunas diferencias, principalmente en la forma de obtención del material y de los tiempos y extensión de la digestión del mismo. En ambos casos se realizó el protocolo de H. Kliman et al. (1) ligeramente modificado por P. Bischof et al. (2).

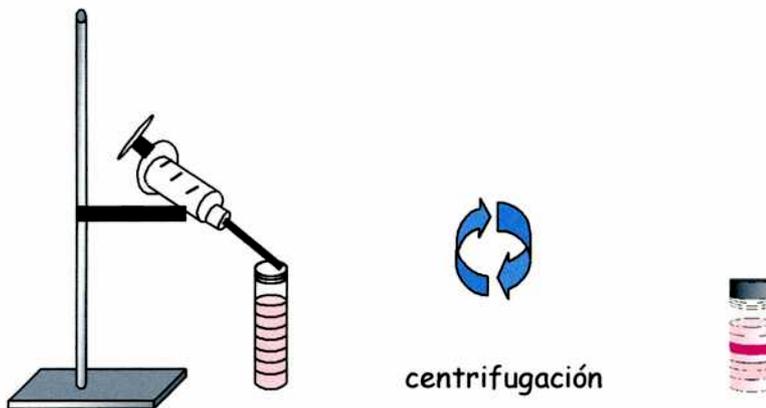
1 Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM and Strauss III JF. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinol* 1986; 118:1567-1582.

2 Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion are dependent upon integrin expression on human cytotrophoblast. *Hum Reprod* 1995; 10:734-742.

▪ Trofoblasto de 1º Trimestre

Para cada purificación se tomaron 3 ó 4 trofoblastos (7-11 semanas) y se colocaron sobre una gasa en un recipiente estéril para eliminar el líquido. Se realizaron lavados consecutivos en cápsulas de Petri con HBSS 1x hasta obtener un tejido limpio. Posteriormente se eliminaron los pequeños coágulos restantes y las membranas hasta obtener las vellosidades limpias. Después de lavar por seguidos pasajes en HBSS y agitación suave, se cortó el material en pedazos no demasiado pequeños (2 cm, aproximadamente). En este punto se guardó hasta el día siguiente a 4 °C en HBSS con Hepes sal sódica 25 mM o se continuó con el protocolo hasta el final.

Armado del gradiente discontinuo de Percoll 5-70%:



A partir de una solución de Percoll 90% en HBSS 10x se realizaron las 14 diluciones con HBSS 1x, necesarias para el gradiente:

% Percoll	ml 90% Percoll	ml Hank's
70	2.33	0.67
65	2.17	0.83
60	2.00	1.00
55	1.83	1.17
50	1.67	1.33
45	1.50	1.50
40	1.33	1.67
35	1.17	1.83
30	1.00	2.00
25	0.83	2.17
20	0.67	2.33
15	0.50	2.50
10	0.33	2.67
5	0.17	2.83

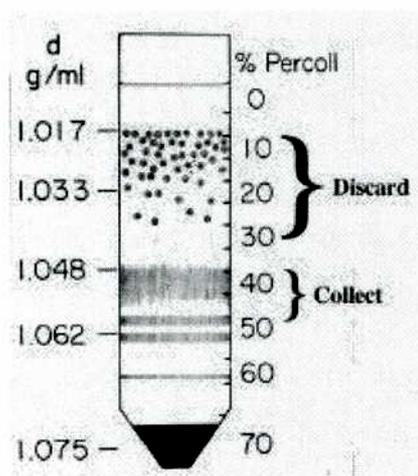
Se sembraron 2.5 ml de cada una de las soluciones, empezando por la solución al 70% en forma decreciente. El gradiente se guardó a 4 °C hasta su utilización.

Digestión con tripsina y DNasa: Para disgregar las células de las vellosidades se realizaron tres digestiones seguidas con un cocktail de tripsina (apéndice reactivos y soluciones). Se usaron 20 ml del cocktail, y se incubó a 37 °C agitando suavemente cada tanto para que todo el tejido entrara en contacto con la solución. Se realizó una digestión de 30 minutos y tres de 20 min. Una vez finalizada cada una de las digestiones, se dejó decantar el tejido, y se juntó el sobrenadante para neutralizarlo con SFB al 10% final. Cada uno de los sobrenadantes se alicuotó en 4 tubos de 15 ml, y se centrifugó 10 minutos a 850xg. Los precipitados se resuspendieron en 2 ml de DMEM con antibiótico (Ab) y sin SFB y se incubaron a 37 °C hasta finalizadas las cuatro digestiones.

Los precipitados se resuspendieron suavemente y se filtraron con un MESH (100 µm) a un tubo de 50 ml para eliminar restos de tejido. El filtrado se centrifugó 15 minutos a 850 xg para quedarse con los precipitados y resuspenderlos en un

volumen total de 4 ml de DMEM. Se sembraron 2 ml por gradiente de Percoll. Finalmente se centrifugó 25 minutos a 1200 xg sin freno.

Posteriormente a la centrifugación las CTB se encuentran alrededor de 35- 40% en el gradiente. Los anillos con las células de interés se recolectaron y se juntaron en un tubo de 15 ml para lavar dos veces con medio centrifugando 10 minutos a 850 xg. Los pellets se resuspendieron en 2 ml de DMEM para realizar la inmunopurificación para eliminar las células LCA (antígeno común leucocitario) positivas.



Inmunopurificación de las CTB con Dynabeads: Antes de usar las Dynabeads, 100 μ l de estas se lavaron tres veces con 5 ml de PBS- 0.1% BSA utilizando una gradilla magnética. Se guardaron a 4 °C hasta usar.

Los 2 ml de muestra se incubaron con 100 μ l (1/20) de anticuerpo anti-LCA 30 minutos a 4 °C, agitando suavemente cada tanto. Se centrifugó 8 minutos a 550 xg, y se descartó el sobrenadante; el precipitado se lavó con 5 ml de PBS-0.1 % BSA y se resuspendió en 2 ml de PBS-0.1 % BSA. Las células con el anticuerpo se juntaron con las Dynabeads lavadas y se incubaron 20 minutos a 4 °C agitando suavemente cada tanto. Finalizada la incubación se agregaron 3 ml de medio sin SFB, y se eliminaron las células LCA positivas utilizando la gradilla magnética. El

sobrenadante, libre de estas células, se lavó y se resuspendió en DMEM para poder contar las células y evaluar la viabilidad.

- Trofoblasto de placenta de embarazo a término

Dentro de las dos horas de realizada la cesárea, la placenta se colocó sobre una gasa en un recipiente estéril, de forma tal de observar la superficie materna, para eliminar el líquido. Utilizando tijeras se quita la decidua (membrana muy finita) y se cortan pequeños trozos de vellosidades. Estos se lavan con HBSS 1x en recipientes estériles agitando más vigorosamente que el material de primer trimestre. Después de sacar todos los coágulos y la membrana y luego de otro lavado en HBSS, se obtienen vellosidades rosadas debido a la gran irrigación que posee la placenta durante el tercer trimestre del embarazo. El material se corta en pedazos pequeños (0,2-0,3 cm). En este punto se puede guardar el material hasta el día siguiente a 4 °C en HBSS con Hepes (sal sódica) 25 mM o continuar el protocolo hasta el final de la purificación.

Digestión con tripsina y DNasa: debido a las características de las vellosidades secundarias, mayoritarias durante el tercer trimestre, la cantidad de material, el volumen de cocktail de tripsina, los tiempos de las digestiones y el tipo de agitación difieren al trabajar con trofoblasto a término de embarazo. Se utilizaron entre 15 y 20 gr de vellosidades limpias por gradiente de Percoll. Se realizó una digestión con 100 ml de cocktail de tripsina y tres con 60 ml, incubando a 37 °C 35, 30, 20 y 20 minutos, respectivamente. Todas las digestiones se realizaron agitando suave y constantemente con un agitador magnético.

El resto del protocolo se realizó siguiendo el mismo que se utilizó con el material de primer trimestre.

- Viabilidad y conteo de células

Para contar la cantidad de células purificadas y su viabilidad se usó una cámara de Neubauer y el colorante vital Azul Tripán o eosina. En ningún caso se usaron purificaciones con una viabilidad menor al 90%.

- Cultivo de CTB

Las células purificadas se sembraron, en la mayoría de los casos, en una concentración de 6×10^5 células por ml. Sin embargo, dependiendo del ensayo que se realizaría con los cultivos, las concentraciones cambiaron según se especifica en cada caso. Los cultivos se dejaron estabilizar en DMEM con 10% de SFB a 37 °C en 5% CO₂ durante la noche. A la mañana siguiente se les cambió el medio de cultivo por el medio deseado en cada caso, en presencia o ausencia de los distintos factores necesarios. Los cambios de medio y los tiempos de cultivo se especifican en cada caso dado que difieren según el ensayo. En los distintos experimentos las células se cultivaron en presencia o ausencia de los siguientes factores:

Rh-leptina:	0.001, 0.01, 0.1, 1 y 2 µg/ml
HCG:	1, 10, 100 mUI/ml
5-Pregnen-3β-ol-20-ona:	1 µg/ml
22-R-OH-colesterol	10 µM
17β-Estradiol:	1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} M
GnRH:	1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} , 1×10^{-11} , 1×10^{-12} M
AGnRH (Cetrorelix y AzalineB)	0.1, 0.5, 1 µg/ml
IL-6:	0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/ml
TNF-α:	100 ng/ml

IL-1 α : 0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ng/ml

M-CSF: 0.1- 100 ng/ml

Diferenciación y cultivo de STB

En los casos en que se necesitó obtener STB se cultivaron las CTB en presencia de 10% SFB por más de 24hs.

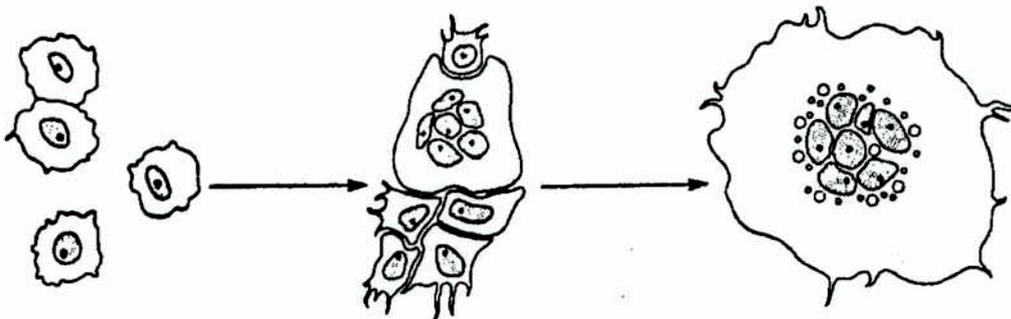


Figura 10 Modelo de formación de STB en cultivo. Al principio las células purificadas del CTB son células aisladas mono- nucleares. A las 24h de cultivo en presencia de SFB al 10% la forma predominante son los agregados, y se observa poco sincicio. Después de la 24h la cantidad de STB comienza a aumentar hasta pasar a ser la forma dominante. Aparentemente, las células del CTB migran, forman agregados entre ellas, y posteriormente se fusionan (3).

3 Albretch ED and Pepe G. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocrine Rev* 1990, 11: 124- 150.

- Inactivación de sueros

Tanto los sueros de pacientes como el suero fetal bovino (SFB) se inactivaron 45 minutos a 56°C y luego se alicuotaron y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

- Preparación y cultivo de explantos

Como fue mencionado anteriormente, se utilizaron placentas de cesáreas dentro de las dos horas posteriores al parto. Colocando la placenta observando la superficie materna, la misma se limpió para obtener vellosidades de la manera ya citada. Una vez obtenidas las vellosidades limpias, éstas se cortaron en pedazos pequeños (~ 200 mg) y se colocaron en placas de cultivo de 6 pozos en 0.5 ml de DMEM. Después de aproximadamente, 18h de cultivo a 37 °C en 5% CO₂, se verificó el pegado de cada explanto al fondo de la placa de cultivo y se agregó DMEM hasta un volumen final de 2 ml agregando los factores necesarios para los distintos tratamientos a ensayar. Los cambios de medio y los tiempos de cultivo se especifican en cada caso. Al finalizar cada cultivo se pesaron los explantos para poder normalizar, según el peso de cada uno, todas las mediciones y los resultados posteriores.

- Selección de pacientes para obtención de sueros

Se seleccionaron mujeres en edad reproductiva con aborto espontáneo recurrente (RSA), [normalmente definido como tres o más abortos durante el primer trimestre de embarazo] o con esterilidad sin causa aparente (ESCA). Se obtuvieron 14 sueros de pacientes RSA y ESCA sin diferenciarlas entre sí (gracias a una colaboración establecida con el laboratorio Biología de la Reproducción).

- Obtención y preparación de los sueros

Las muestras de sangre se recolectaron en tubos estériles. Después de su obtención, las muestras se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 30 minutos. Luego se dejaron 1 hora a temperatura ambiente hasta la formación del coágulo y se separó la fracción sérica trabajando siempre bajo campana de flujo laminar. Los sueros se calentaron durante 45 minutos a 56 °C para inactivar la fracción del complemento y se guardaron en tubos estériles a -20 °C hasta su utilización.

- Ensayo de citotoxicidad por medición de la actividad metabólica celular con WST-1 (disulfonato de 4-3-4-iodofenil-2-4-nitrofenil-2H-5-tetrazolio-1,3-benzeno)

WST-1 es una sal de tetrazolio que es metabólicamente clivada por células activas en cultivo dando como producto formazán, que puede ser cuantificado con un lector de ELISA. La enzima responsable del clivaje del WST-1 es la succinato-tetrazolio- reductasa mitocondrial.

Las CTB (1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 células /pozo) se sembraron y cultivaron en placas de cultivo de 96 pozos por duplicado en 100 μ l de DMEM en presencia o ausencia de TNF- α (100 ng/ml) y/o leptina (0, 0.1, 0.5, 1 μ g/ml). Después de 2-4 días de cultivo a 37 °C, 5% CO₂, se cambió el medio de cultivo por medio fresco con 10 μ l de reactivo WST-1. Después de incubar 4 h a 37 °C, 5% CO₂, se cuantificó el formazan producido usando un lector de ELISA a 450 nm. Se determinó esta actividad tanto en las células pegadas como en los sobrenadantes (células despegadas).

Para verificar la actividad metabólica de las CTB purificadas se realizó una curva estándar con distintas concentraciones celulares por duplicado (0, 1000, 2000, 5000, 10000, 50000 y 100000 células/ pozo) con cada purificación y se realizó el mismo ensayo.

- Incorporación de [³H]-Timidina

Se sembraron las CTB por duplicados en una concentración de 1×10^5 células/pozo en placas de cultivo de 96 pozos y se cultivaron en 100 μ l de medio de cultivo DMEM en presencia o ausencia de TNF- α y/o leptina. Después de 2- 4 días de cultivo en condiciones normales, se colocó medio fresco conteniendo 10 μ Ci/ml de [³H]-Timidina. Se cultivaron las CTB en las condiciones descritas anteriormente durante 14-16h a 37 °C, 5% CO₂ y luego se lavaron con PBS y TCA al 5%; se solubilizaron con NaOH 10M y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido.

- Medición de Leptina

La concentración de leptina en los sobrenadantes de los cultivos y en los sueros de pacientes se determinó por IRMA para leptina humana utilizando el Kit comercial de Diagnostic System Laboratories, con un límite de sensibilidad de 0,1 ng/ml.

- Medición de Progesterona

La concentración de progesterona en los sobrenadantes de los cultivos se determinó por RIA con el Kit comercial COAT-A-COUNT Progesterone, según las indicaciones del fabricante, con un límite de detección mínima de 0.02 ng/ml.

- Medición de Estradiol

La concentración de estradiol en los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinó por RIA con el Kit comercial COAT-A-COUNT Estradiol, según las indicaciones del fabricante, con un límite de detección mínima de 8 pg/ml.

- Medición de hCG

La concentración de hCG en los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinó por IRMA con el Kit comercial COAT-A-COUNT hCG, siguiendo las indicaciones del fabricante, con un límite de detección mínima de 0.3 mIU/ml.

- Medición de IL-6

La concentración de IL-6 en los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinó por ELISA con el Kit comercial Quantikine human IL-6, siguiendo las indicaciones del fabricante, con un límite de sensibilidad de 0.7 pg/ml.

- Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de Lowry ligeramente modificado según Oyama et al. (4) usando albúmina sérica bovina como estándar.

4 Oyama VI and Eagle H. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Cicalteau). Proc Soc Exp Biol Med 1956; v91:305-307.

- Diseño de "primers"

Para la PCR se utilizaron dos juegos de "primers" dirigidos para el gen de la Leptina humana:

"Primer"	Secuencia	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
Sn 159	5'GGATCAATGACATTTACACACG3'	129
Asn 288	5'AGCCCAGGAATGAAGTCCAA3'	129
Sn 8	5'CCAAAAGTCCAAGATGACACC3'	357
Asn 345	5'TCTGTGGAGTAGCCTGAAGC3'	357

Para el diseño de ambos pares de "primers" se utilizó el programa Primer Detective de CLONTECH usando las secuencias de nucleótidos correspondientes al mRNA del gen de la leptina publicadas en el GenBank.

- Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de explantos y de CTB se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi (5) con pequeñas modificaciones. Dada la riqueza proteica de la placenta, la extracción de RNA de explantos resultó muy complicada; una forma de resolver los problemas de degradación del RNA fue guardar el tejido en la solución comercial RNA/ater (Ambion) inmediatamente después de terminado el cultivo y mantenerlo a -20°C.

5 Chomczynski and Sacchi. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem 1987; 156:169.

- RT- PCR

Con el RNA total extraído se realizó una RT-PCR con el Access RT-PCR System (Promega) usando los "primers" específicos para leptina humana descritos anteriormente. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo: 1µg de RNA total, 1 µmol/l de cada "primer", 0.2 mmol/l dNTP, 0.1 U/µl Taq DNA polimerasa, 1.5 mmol/l MgSO₄ y 0.1 U/µl AMV Transcriptasa Reversa en un volumen total de 50 µl.

Se realizó una incubación de 45 minutos a 48 °C para la transcripción reversa y después una desnaturalización a 94 °C durante 2 minutos. Posteriormente se realizaron 45 ciclos de la siguiente PCR:

94 °C 30 segundos

60 °C 60 segundos

68 °C 2 segundos

- Extracción de proteínas totales

1. *A partir de explantos*

Los explantos se homogeneizaron a 4 °C con un Polytron en buffer de lisis A (ver Reactivos y Soluciones) en una concentración de 250 mg/ml. Se incubaron durante 30 minutos en hielo y se centrifugaron durante 20 minutos a 4 °C a 10.000 x g. El precipitado se descartó y se determinó la concentración de proteínas en cada sobrenadante. Se guardó a -20 °C hasta su uso.

2. *A partir de células en cultivo*

Una vez finalizados los cultivos, éstos se lavaron 3 veces con PBS frío, y las células se despegaron y levantaron en PBS con ayuda de un "scraper". Las muestras se centrifugaron a 4 °C a 10.000 x g durante 10 minutos y se agregó buffer de lisis A a los precipitados. Los mismos se sonicaron y, posteriormente, se

centrifugaron a 4 °C, a 10.000 x g durante 10 minutos. En los sobrenadantes se cuantificó la cantidad de proteínas y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

- Separación electroforética de las proteínas

Para llevar a cabo la separación electroforética de las muestras, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), de 0.75 mm de espesor, preparados siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (6). Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra (SDS 8%, Tris-HCl 200mM pH 6.8, glicerol 40%, β -mercaptoetanol 20%, azul de bromofenol 0.4%), calentadas a 100 °C durante 5 minutos, y separadas bajo condiciones de voltaje (120V) constante a temperatura ambiente. En cada gel se sembraron entre 20 y 40 μ g de proteína total por calle.

- Dot blot

Para determinar la concentración adecuada de cada anticuerpo se realizó un ensayo de Dot Blot utilizando distintas concentraciones de cada anticuerpo y de proteína. Se agregaron controles positivos y negativos para cada uno de los anticuerpos.

- Inmunodetección/ Western blot

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-C Extra (Amersham Life SCIENCE), en buffer Tris 190mM, glicina 25mM, metanol 20%, a 100V por 1:30 h. Para visualizar las proteínas, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau. Para ello las membranas se incubaron durante 10 minutos en una solución de rojo

6 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227 (259): 680-685.

Ponceau 0.5% en ácido acético glacial 1%, y el exceso de colorante fue eliminado con lavados con agua deionizada. Las membranas fueron bloqueadas con una solución al 3% de BSA en TBS-Tween 20 0,05% a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se incubaron con anticuerpo anti-leptina humana (diluido 1:1700) o anti-receptor de leptina (diluido 1:1700) en una solución 1% BSA en TBS-Tween 20 0.05% durante 2hs a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C, con agitación en ambos casos. Luego de realizarse tres lavados con TBS-Tween 20 0.05%, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (diluido 1:2000 en una solución de BSA 1% en TBS-Tween 20 0.05%) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Luego de los lavados con TBS-T 0.05% y TBS, se detectaron las bandas reactivas mediante quimioluminiscencia (ECL Kit, Amersham Life SCIENCE Inc) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para descartar señales inespecíficas se realizaron experimentos en los cuales el primer anticuerpo no fue agregado.

La determinación de los pesos moleculares aparentes se llevó a cabo mediante interpolación en la recta obtenida por regresión lineal, utilizando los valores de movilidad electroforética en función del peso de las proteínas patrón.

- Zimografías

Con el objeto de detectar la actividad gelatinolítica en los sobrenadantes de los cultivos de trofoblasto, se realizaron separaciones electroforéticas en geles de poliacrilamida con SDS con gelatina 1 mg/ml. Las muestras se diluyeron 6:1 en buffer de siembra 7x (SDS 17%, sacarosa 7%, rojo fenol) y separadas bajo condiciones de voltaje (200V) constante durante 45 minutos a 4-8 °C.

Finalizada la electroforesis los geles se lavaron 6 veces durante 5 minutos en Tritón 100 (2.5% en agua deionizada) a temperatura ambiente y 3 veces con PBS. Posteriormente se incubaron durante 20-24 h a 37 °C en PBS con CaCl₂ 0.01% y MgCl₂ 0.01%.

- Tinción de geles

Una vez finalizada la incubación a 37°C, los geles fueron sumergidos y agitados en una solución de Azul de Coomasie G250 (0.1% en 25% metanol, 10% ácido acético) durante 45 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue eliminado mediante sucesivas incubaciones en solución de desteñido (5% metanol, 7.5% ácido acético). La actividad gelatinolítica se observó como bandas claras en fondo azul.

La determinación de los pesos moleculares aparentes se llevó a cabo como se mencionó anteriormente.

- Formación del complejo Ob-ROb in vitro

Las muestras (300 µg de proteínas) se incubaron con 20 µg de leptina recombinante humana en 200 µl de PBS (pH 7.4) conteniendo BSA 1% a 4 °C durante toda la noche.

- Inmunoprecipitación

300 µg de proteínas de los distintos extractos se clarificaron incubando con proteína A pre-lavada y suero normal de conejo durante 30 minutos a 4 °C en rotación. Después de centrifugar 5 minutos a 4 °C a 3000 rpm el sobrenadante se incubó con 10µl de anticuerpo anti- leptina humana a 4 °C en rotación. Después de 18-20 h de incubación se agregó proteína A pre-lavada y se incubó 5 h a 4 °C con rotación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 4 °C a 2.500 r.p.m. 5 minutos y los precipitados se lavaron con PBS y se sembraron en geles de poliacrilamida para realizar un inmuno-blot como se describió anteriormente.

- Estadística

Los distintos valores se normalizaron por mg de proteína o por peso de explanto y por el control correspondiente; posteriormente fueron agrupados para analizar. Todos los experimentos se realizaron al menos 3 veces con duplicados o triplicados. El análisis estadístico se realizó por ANOVA usando el programa Graph Pad Instat. Las bandas de los inmuno-blots y de los zimogramas fueron cuantificadas con el programa Scion Image Beta 4.0.2 para Windows. Los geles mostrados son de experimentos representativos.

RESULTADOS

• **SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LEPTINA POR LA PLACENTA HUMANA**

Con el objeto de validar nuestros modelos experimentales para el estudio de la función de la leptina en la placenta humana, verificamos por distintas metodologías la síntesis y secreción de esta proteína en cultivos de células de CTB de primer trimestre, CTB de embarazo a término y en cultivo de explantos de placenta a término. Por otro lado, también quisimos estudiar la diferencia en los niveles de esta proteína secretada por cultivos de CTB y de STB.

Los estudios con STB se realizaron solamente con células de placentas de tercer trimestre de embarazo porque el STB existe en mayor proporción durante este periodo del embarazo, en cambio recién esta comenzando a formarse durante el primer trimestre. Durante las primeras 12 semanas de la gestación el CTB es la población mayoritaria del trofoblasto y cumple una función más importante que el STB.

a) Expresión del mRNA de leptina

Células CTB de trofoblasto de tercer trimestre en cultivo expresan mRNA del gen de la leptina. Por RT-PCR a partir de RNA total de CTB se amplificaron los fragmentos del tamaño esperado, con los dos pares de "primers" utilizados (como se detalla en materiales y métodos, ambos juegos de "primers" fueron diseñados para el gen de la leptina humana) (figura 11). Cuando se utilizó RNA total de explanto, también se obtuvieron fragmentos de ambos tamaños.

No se realizó una RT-PCR con CTB de primer trimestre dado que esa técnica se realizó en Buenos Aires, donde no se trabajó con ese tipo de material.

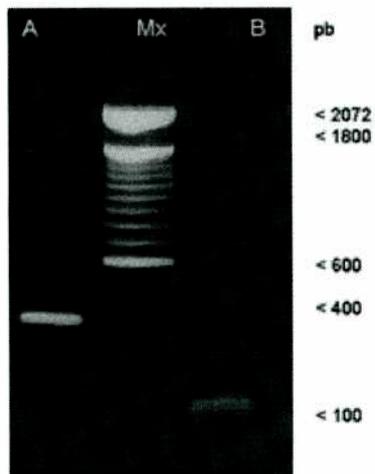


Figura 11. RT-PCR para ARNm de leptina en células CTB. A: primer par de "primers" para mRNA de leptina humana (tamaño del fragmento esperado: 357pb), Mx: marcadores de peso molecular, B: segundo par de "primers" (tamaño del fragmento esperado: 129pb).

b) Secreción de leptina por células de trofoblasto en cultivo

Células CTB en cultivo secretan leptina al medio extracelular, después de 2 y 4 días de cultivo. Al comparar la secreción de células del primer trimestre con la producida por células de placenta a término, se observa una secreción mayor por las primeras. En los cultivos de células de primer trimestre no se observaron diferencias significativas en la secreción diaria a lo largo de los 4 días de cultivo. Por el contrario, la secreción de leptina por CTB de tercer trimestre, disminuyó durante el cultivo.

Al cultivar las CTB de tercer trimestre en presencia de SFB al 10%, permitiendo así la formación de STB, la secreción de esta proteína aumentó significativamente.

Leptina (ng /ml)	CTB 1º trimestre	CTB 3º trimestre	STB 3º trimestre
48 h de cultivo	25.2 ± 2.6	0.037 ± 0.013	0.296 ± 0.1
96 h de cultivo	20 ± 6.1	0.029 ± 0.007	0.223 ± 0.034

Tabla 3. Secreción de leptina en cultivos de células de trofoblasto humano. La concentración de leptina se determinó por IRMA o ELISA en los sobrenadantes de los cultivos.

También se realizaron ensayos de inmunodetección (Western blots) con anticuerpos específicos anti leptina humana con los sobrenadantes de los mismos cultivos donde se midió anteriormente la concentración de leptina. En la figura 12 se puede observar la presencia de leptina en los sobrenadantes de los cultivos a distintos tiempos.

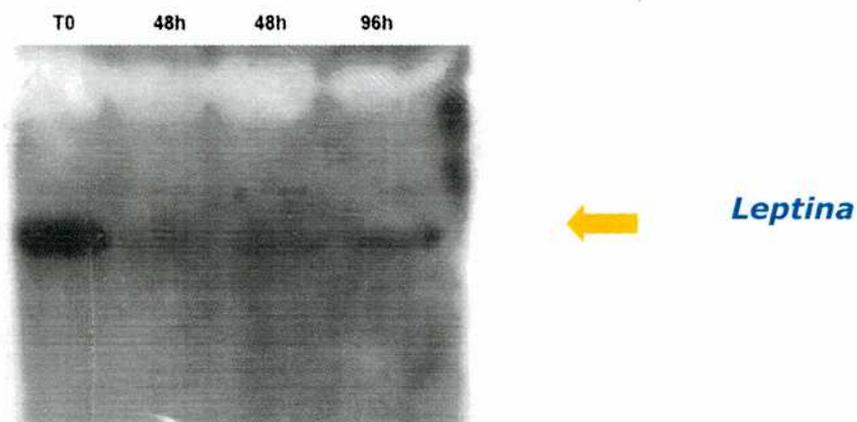


Figura 12. Inmunodetección de leptina en cultivos de células CTB. Los sobrenadantes se obtuvieron 18hs después de la siembra de las células (T0), 48 horas después de T0 (48h) por duplicado (se muestran los duplicados) y 96 horas después de T0 (96h). Los sobrenadantes se concentraron 10 veces utilizando centrifugación al vacío y luego se realizó una inmunodetección con un anticuerpo específico anti leptina humana.

c) Síntesis y secreción de leptina en explantos

En cultivos de explantos se midió la secreción de leptina al medio por IRMA y se encontró una concentración de 7.36 ng/g de tejido después de 10h de cultivo. La síntesis de esta proteína se confirmó por medio de ensayos de inmunodetección, observando la presencia de leptina en los extractos totales de proteínas de los mismos explantos (figura 13).

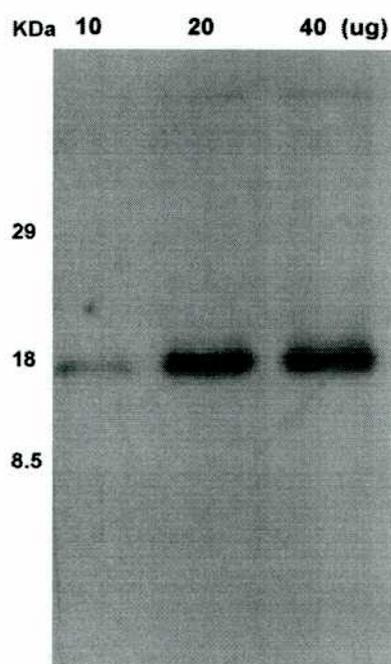


Figura 13. Inmunodetección de leptina en explantos de placenta a término. Las proteínas de los explantos se extrajeron con el buffer de lisis A y luego se realizó una inmunodetección con un anticuerpo específico anti leptina humana. Se sembraron 10, 20 y 40 μ g de proteínas totales.

• **EFEECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

Células CTB de primer y de tercer trimestre se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de leptina recombinante humana (rh-leptina) (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2 µg/ml) en DMEM durante 48 y 96 horas. Utilizando los ensayos de WST-1 e incorporación de ³H-Timidina, se estudió el efecto de esta proteína sobre la viabilidad celular. La actividad metabólica, con el reactivo WST-1, se midió en las células pegadas al fondo de la placa y, también, en los sobrenadantes de los mismos cultivos. Esta última medición se realizó con el objeto de analizar una posible variación en la cantidad de células despegadas vivas, como reflejo de una variación en la capacidad de adhesión de las mismas células, en respuesta a los tratamientos.

Al finalizar los cultivos se analizó, también, la cantidad de proteínas totales en los distintos tratamientos.

Basándonos en resultados publicados en otros tipos celulares y en trofoblasto de tercer trimestre (1, 2), utilizamos TNF-α (100ng/ml) como control de inhibición de viabilidad celular.

Con todas las purificaciones celulares, antes de empezar cada experimento, se realizó una curva estándar con distintas concentraciones celulares para verificar la actividad metabólica basal de las células obtenidas (figura 14).

1 Ying Li et al. 1992. Trophoblast- derived tumor necrosis factor-α induces release of human chorionic gonadotrophin using interleukin-6 (IL-6) and IL-6-receptor dependent system in the normal human trophoblast. J Clin Endocrinol Metab 74: 184-191.

2 Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG and Guilbert LJ. 1994. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamm-interferon against primary human placental trophoblast. Placenta, 15: 819-835.

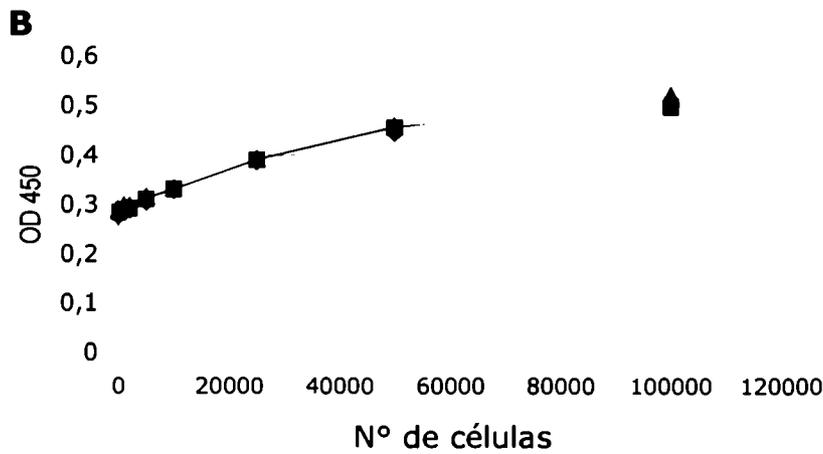
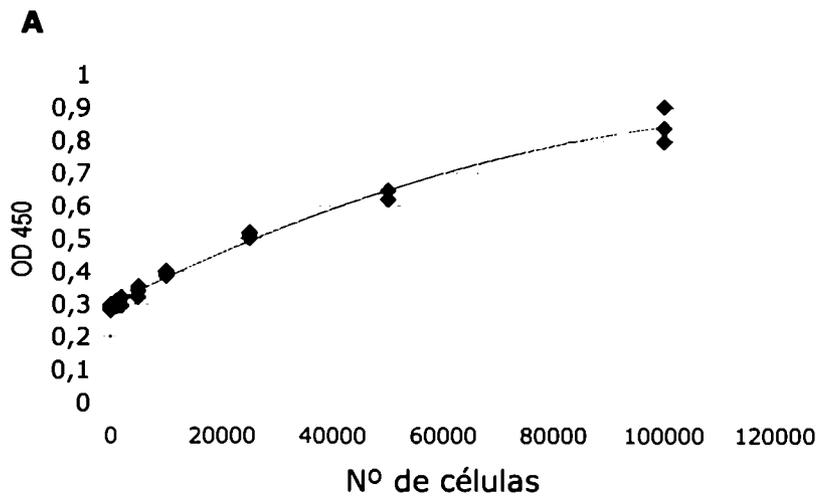


Figura 14. Curva estándar de la actividad metabólica basal de células CTB purificadas. Se realizó una curva estándar con distintas concentraciones celulares por duplicado (0, 1000, 2000, 5000, 10000, 50000 y 100000 células/ pozo) con cada purificación y se realizó el ensayo con el reactivo WST-1. En esta figura se muestra una curva representativa de las CTB de primer trimestre (A) y una de las CTB de embarazo a término (B).

a) Efecto de la Leptina sobre la actividad metabólica de células CTB de 1º trimestre

Cuando se cultivaron células CTB de primer trimestre con distintas concentraciones de leptina, ésta no tuvo efecto sobre la actividad de clivado de WST-1. En cambio, contrariamente a lo esperado, esta actividad aumentó significativamente ($p < 0.0001$) después de 2, 4 y 6 días de cultivo en presencia de $\text{TNF-}\alpha$, comparado con el control sin tratar (figura 15).

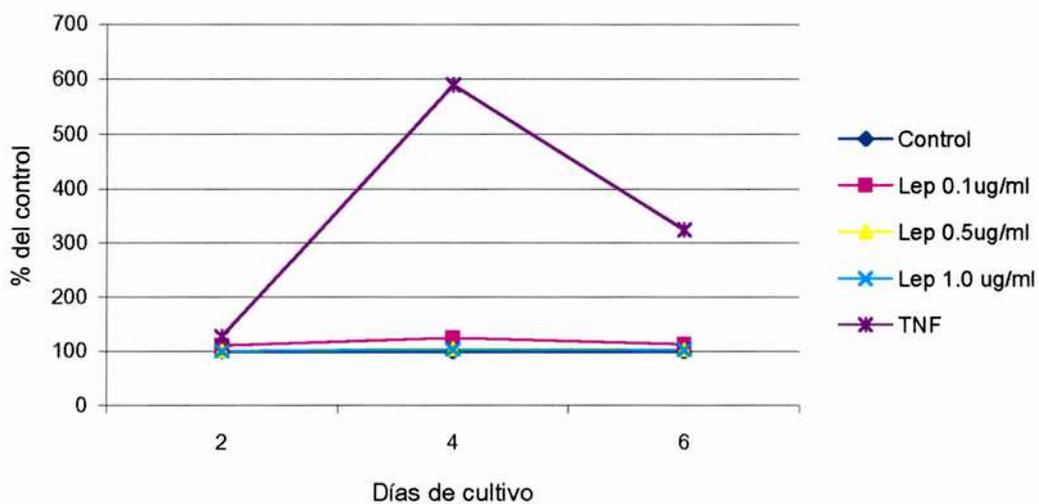


Figura 15. Efecto de leptina y $\text{TNF-}\alpha$ sobre la actividad metabólica de células CTB de primer trimestre en cultivo. Las CTB se cultivaron en ausencia de Leptina y $\text{TNF-}\alpha$ como control, o en presencia de 0.1, 0.5 ó 1 $\mu\text{g/ml}$ de leptina, ó 100 ng/ml de $\text{TNF-}\alpha$. $P < 0.0001$, $\text{TNF-}\alpha$ versus el control.

Al tratarse las CTB con leptina y TNF- α , se observó una inhibición significativa del efecto estimulante del TNF- α ($p < 0.014$ para TNF- α + Leptina 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; $p < 0.03$ para TNF- α + Leptina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, figura 16).

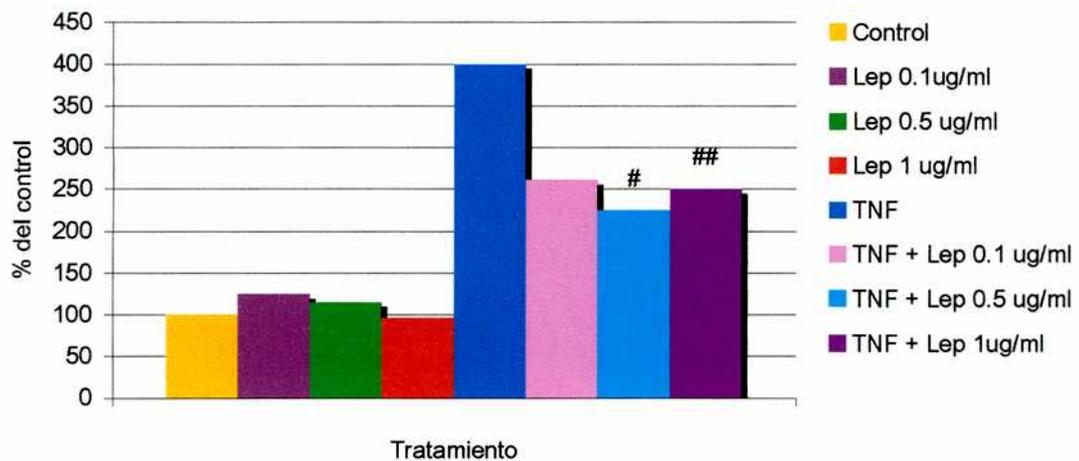


Figura 16. Efecto de leptina y TNF- α sobre la actividad metabólica de células CTB en cultivo. Las CTB se cultivaron en ausencia de leptina y TNF- α como control, o en presencia de 0.1, 0.5 ó 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leptina, ó 100 ng/ml de TNF- α o de las distintas concentraciones de leptina junto con TNF- α . # $P < 0.014$, ## $p < 0.03$, ambos versus el tratamiento con TNF- α solamente.

Cuando se determinó la capacidad de degradar WST-1 en los sobrenadantes de cultivo (actividad metabólica de las células despegadas), la leptina estimuló en forma estadísticamente significativa ($p < 0.02$, $p < 0.05$, $p < 0.03$ versus el control, para leptina 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) esta actividad. El TNF- α no modificó esta actividad comparado con el control (figura 17).

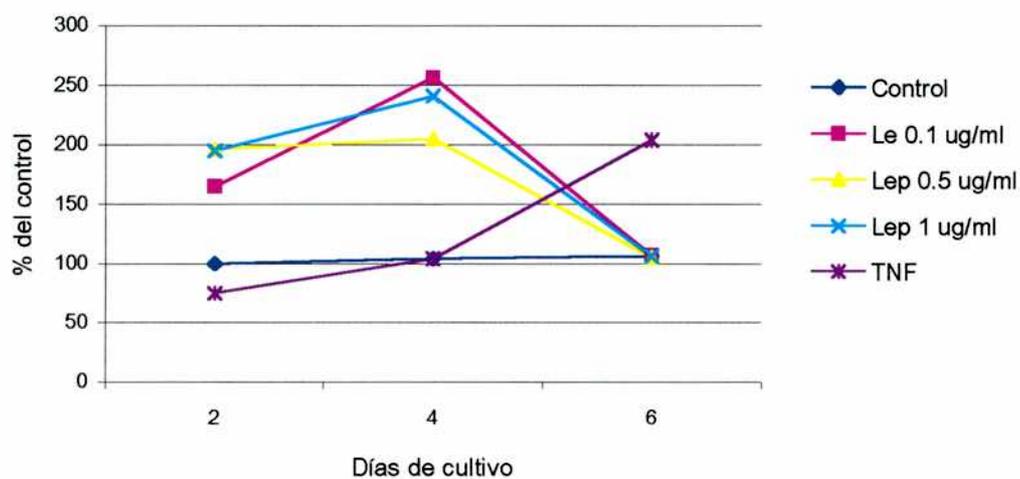


Figura 17. Efecto de leptina y TNF- α sobre la actividad metabólica de células CTB despegadas. Las CTB se cultivaron en ausencia de leptina y TNF- α como control, o en presencia de 0.1, 0.5 ó 1 $\mu\text{g/ml}$ de leptina, ó 100 ng/ml de TNF- α . Al finalizar el cultivo se midió la capacidad de degradar WST-1 en los distintos sobrenadantes. $p < 0.02$, $p < 0.05$, $p < 0.03$ para 0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de leptina, respectivamente, versus el control sin tratamiento.

b) Efecto de la leptina sobre la actividad metabólica de células CTB de término

A diferencia de lo que sucedió con los cultivos de primer trimestre, en los cultivos de trofoblasto de tercer trimestre, la leptina no tuvo ningún efecto en el porcentaje de WST-1 clivada. No se encontraron diferencias significativas entre las células tratadas con leptina y las sin tratar, tanto en las células pegadas como en las despegadas. Coincidiendo con resultados ya publicados por otros autores, que muestran un efecto inhibitorio sobre la viabilidad de las CTB de tercer trimestre del TNF- α .

c) Efecto de leptina sobre la incorporación de [³H]-timidina en células CTB de primer trimestre

Con el objeto de comprender los resultados obtenidos sobre el efecto de la leptina en la actividad metabólica de las células del trofoblasto, estudiamos el efecto de la leptina y el TNF- α sobre la incorporación de [³H]-timidina, en las mismas condiciones de cultivo utilizadas para los ensayos anteriormente mencionados. Inesperadamente, el TNF- α ($p < 0.0001$) y la leptina ($p < 0.0001$) en las tres concentraciones estudiadas (0.1, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$), inhibieron significativamente la incorporación de [³H]-timidina por células CTB de primer trimestre, comparado con los cultivos sin tratar. Por otro lado, el agregado de ambos, TNF- α y leptina, no afectó la inhibición de la incorporación de [³H]-timidina respecto al agregado de ambos factores por separado (figura 18).

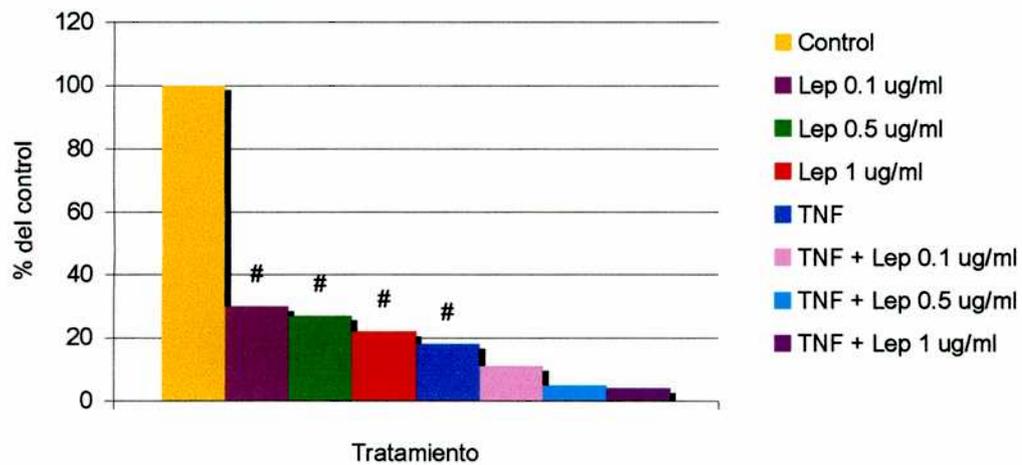


Figura 18. Efecto de leptina y TNF- α sobre la incorporación de [3 H]-timidina en células CTB de primer trimestre en cultivo. Las CTB se cultivaron en ausencia de leptina y TNF- α como control, o en presencia de 0.1, 0.5 ó 1 μ g/ml de leptina, ó 100 ng/ml de TNF- α o de las distintas concentraciones de leptina más TNF- α . P<0.0001, versus el control.

d) Efecto de leptina sobre la incorporación de [³H]-timidina en células CTB a término

Se analizó el efecto de la leptina sobre la incorporación de [³H]-timidina en células CTB a término y no se encontraron diferencias significativas entre las células CTB tratadas con distintas concentraciones de leptina (0.1, 0.5 y 1 µg/ml) y los controles sin tratar.

• **EFFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA SINTESIS DE HORMONAS Y CITOQUINAS**

Células CTB de primer y de tercer trimestre se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de leptina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2 $\mu\text{g/ml}$) en DMEM durante 48 y 96 horas y se determinaron las concentraciones de distintas hormonas y citoquinas secretadas al medio de cultivo. Las células CTB de tercer trimestre también se cultivaron en presencia de 10% de SFB para obtener STB y así medir el efecto de la leptina en la secreción de los mismos factores por el sinciotrofoblasto de embarazo a término.

a) Efecto de la leptina sobre la secreción de hCG en células CTB de 1º trimestre

La secreción basal de hCG en cultivos de CTB de primer trimestre fue de 5722 ± 1055 mIU/mg de proteínas por día, durante los 4 días de cultivo. Cuando las células CTB se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de leptina, esta última estimuló significativamente la secreción de hCG durante los cuatro días de cultivo en forma dependiente de la dosis (figura 19). Al realizarse un análisis de regresión entre la concentración de leptina y la secreción de hCG se encontró una dependencia significativa entre ambas ($p < 0.004$).

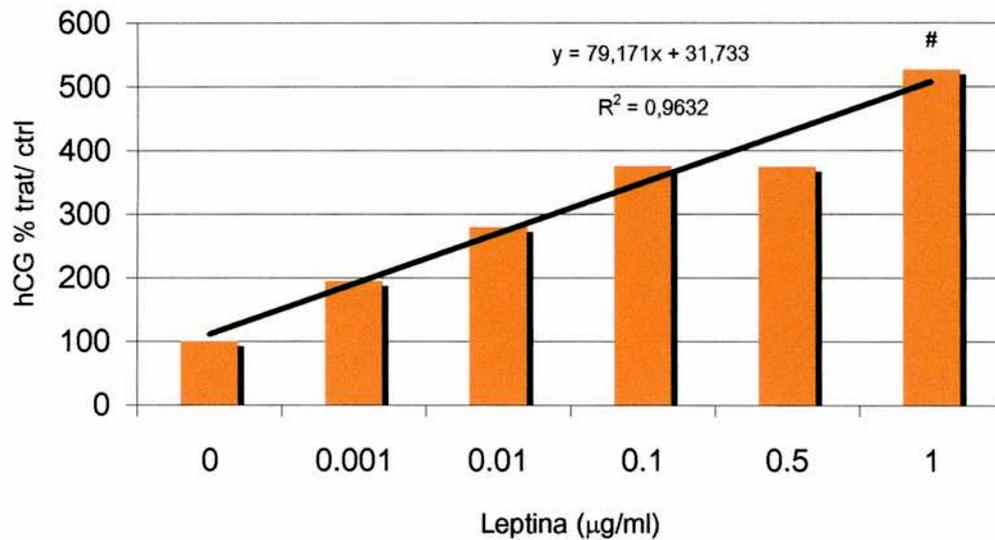


Figura 19. Efecto de leptina sobre la síntesis de hCG (mIU /ml) en células CTB de primer trimestre. Cultivos primarios de CTB de primer trimestre se trataron con concentraciones crecientes de leptina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 µg/ml) y se determinó la concentración de hCG en el medio de cultivo por medio de un IRMA. # $p < 0.006$ versus el control sin tratar.

Con el objeto de elucidar la vía de estimulación por medio de la cual la leptina actúa sobre la secreción de hCG en células CTB de primer trimestre, primero verificamos que la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) estimula la secreción de hCG en estos cultivos. Para ello, células CTB se cultivaron en las mismas condiciones utilizadas anteriormente en presencia de concentraciones crecientes de GnRH y se midió la secreción de hCG (figura 20).

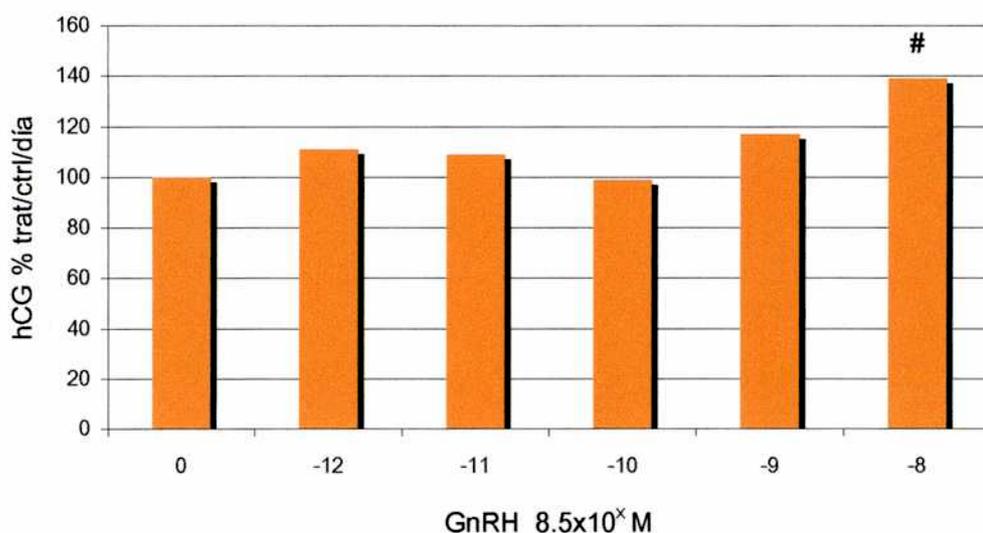


Figura 20 Efecto de GnRH sobre la síntesis de hCG (mIU /ml) en células CTB de primer trimestre. Cultivos primarios de CTB de primer trimestre se trataron con concentraciones crecientes de GnRH (8.5×10^{-8} , 8.5×10^{-9} , 8.5×10^{-10} , 8.5×10^{-11} , 8.5×10^{-12} M) y se determinó la concentración de hCG en el medio de cultivo por medio de un IRMA. # $p < 0.03$ versus el control sin tratar.

Una vez verificado que GnRH estimula la secreción de hCG en nuestros cultivos, con el objeto de dilucidar si el GnRH está involucrado en la estimulación de la secreción de hCG por leptina, estudiamos el efecto de dos antagonistas de GnRH (Cetrorelix y Azaline B) sobre la síntesis basal de hCG. Observamos que tanto Cetrorelix como Azaline B no modificaron la síntesis basal de hCG (figura 21). Si bien, al utilizar una concentración de Azaline B de 5µg/ml, se observó una estimulación de la secreción de hCG, para los ensayos posteriores se usaron las concentraciones que no mostraron efecto alguno.

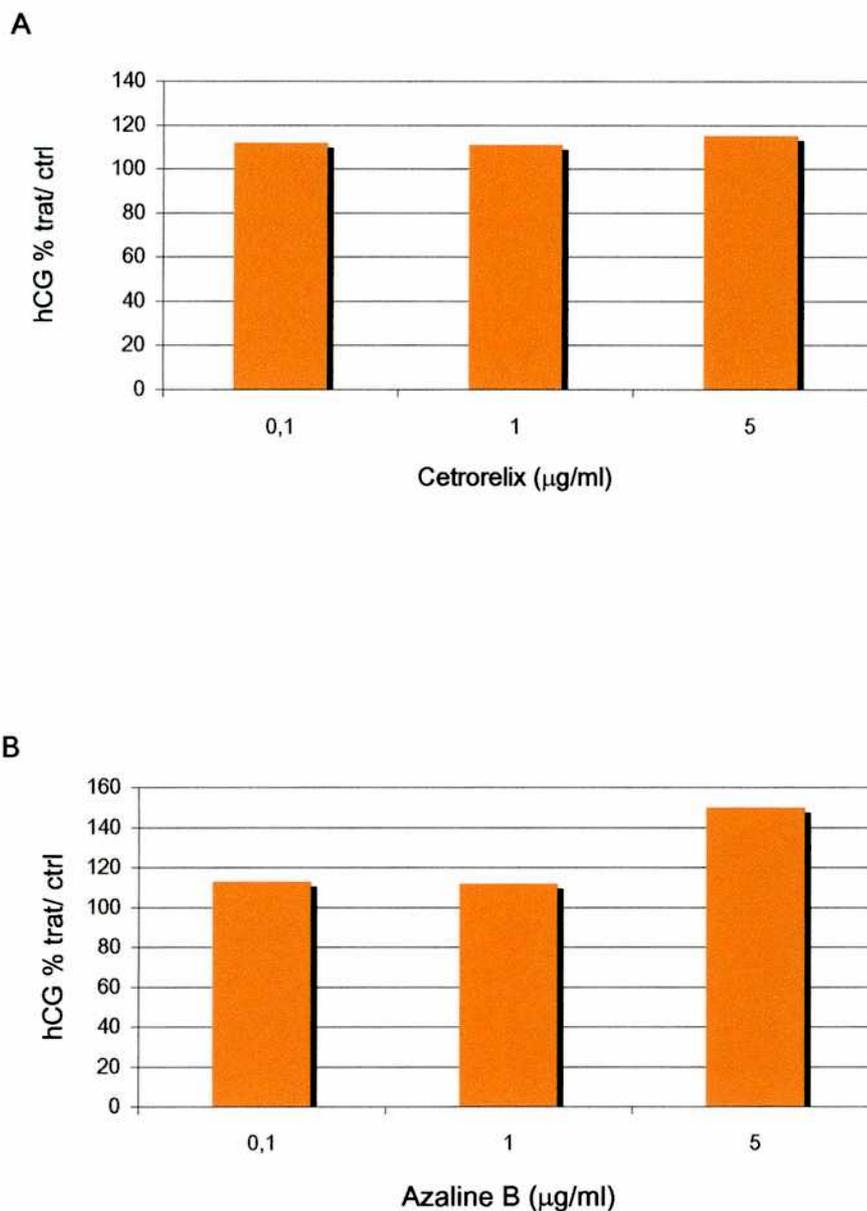
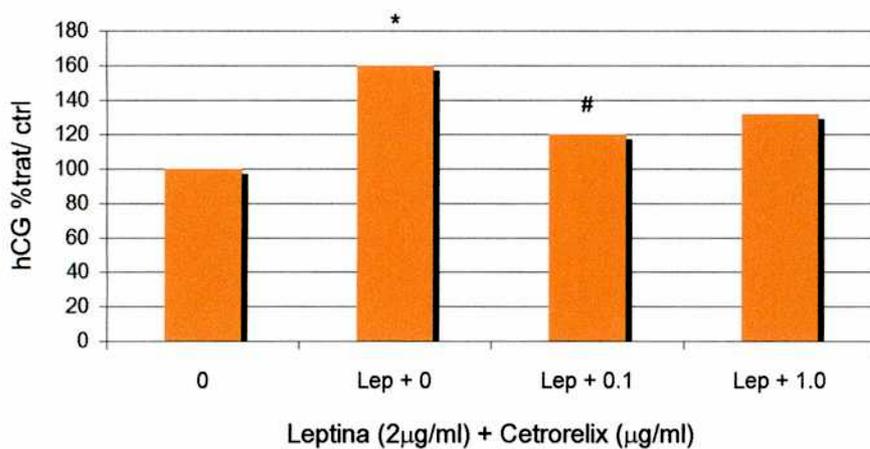


Figura 21 Efecto de dos antagonistas de GnRH sobre la síntesis de hCG en células CTB de primer trimestre. Cetorelix (A), Azaline B (B). Cultivos primarios de CTB de primer trimestre se trataron con concentraciones crecientes de Azaline B y de Cetorelix (0, 0.1, 1, 5 $\mu\text{g/ml}$) y se determinó la concentración de hCG en el medio de cultivo por medio de un IRMA.

Una vez analizado el efecto *per se* de los antagonistas de GnRH sobre la secreción de hCG, se estudió el efecto de los mismos antagonistas sobre el efecto estimulante de la leptina en la secreción de hCG. Para ello se cultivaron CTB en las mismas condiciones que antes, pero en presencia de leptina en combinación con las distintas concentraciones de ambos antagonistas de GnRH. Se observó que la estimulación sobre la secreción de hCG, provocada por la leptina, era inhibida parcialmente tanto por Cetrorelix como por Azaline B en forma estadísticamente significativa (figura 22).

A



B

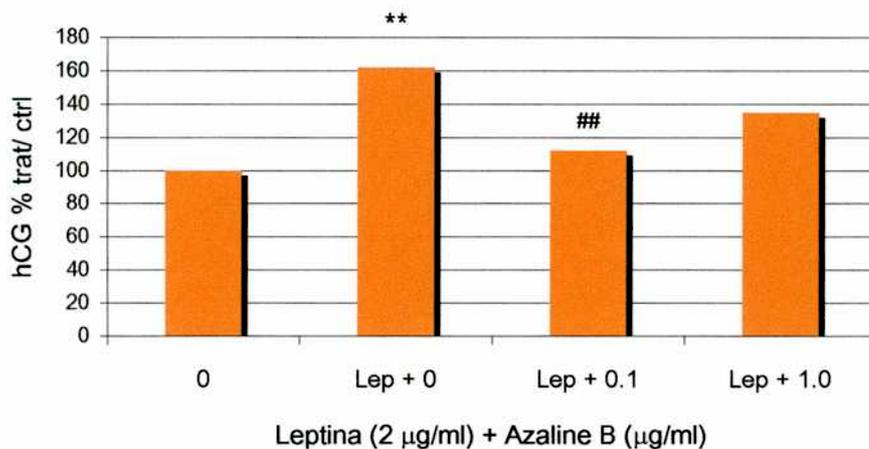


Figura 22 Inhibición del efecto estimulador de la leptina sobre la síntesis de hCG por los antagonistas de GnRH Cetorelix y Azaline B, en células CTB. Cultivos primarios de CTB de primer trimestre se trataron con concentraciones crecientes de Azaline B y de Cetorelix (0, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$) en combinación con leptina (2 $\mu\text{g/ml}$) y se determinó la concentración de hCG en el medio de cultivo por medio de un IRMA. Cetorelix (A), Azaline B (B). * $p < 0.0001$ y ** $p < 0.05$ versus el control sin leptina ni antagonista; # $p < 0.003$ y ## $p < 0.03$ versus el tratamiento con leptina solamente.

b) Efecto de la leptina sobre la secreción de hCG en células CTB y STB de placenta a término

Con el objeto de determinar si el efecto estimulador de la leptina sobre la secreción de hCG en células CTB dependía del origen de las células, se realizó el mismo tipo de ensayos que con CTB de primer trimestre, pero con CTB y STB de placentas de embarazo a término.

Se determinó la secreción de hCG en condiciones basales, en presencia y ausencia de SFB al 10%, a los 2 y 4 días de cultivo. La secreción de hCG aumentó entre 3 y 5 veces cuando las CTB fueron cultivadas con SFB, en condiciones para poder diferenciarse a STB (tabla 4).

<i>hCG (mUI/ml)</i>	Sin SFB	Con SFB
Día 2	88.8 ± 104	1104 ± 8.5
Día 4	31 ± 64	665 ± 120

Tabla 4 Secreción basal de hCG (mIU/ml) por células CTB y STB de tercer trimestre en cultivo.

Cuando se trataron las CTB con concentraciones crecientes de leptina, se observó una estimulación de la secreción de hCG tanto en los cultivos de CTB como en los de STB (estos resultados no se muestran dado que repiten los resultados en CTB). La leptina (1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) estimuló significativamente la secreción de hCG después de dos (figura 23 A) y cuatro días de cultivo (figura 23 B). Después de dos días de cultivo se encontró que la leptina estimuló la secreción de hCG en forma dependiente de la dosis.

Dado que se encontró el mismo efecto estimulador sobre la secreción de hCG en las células de primer y tercer trimestre, no se repitieron los estudios con GnRH y sus antagonistas con células de embarazo a término.

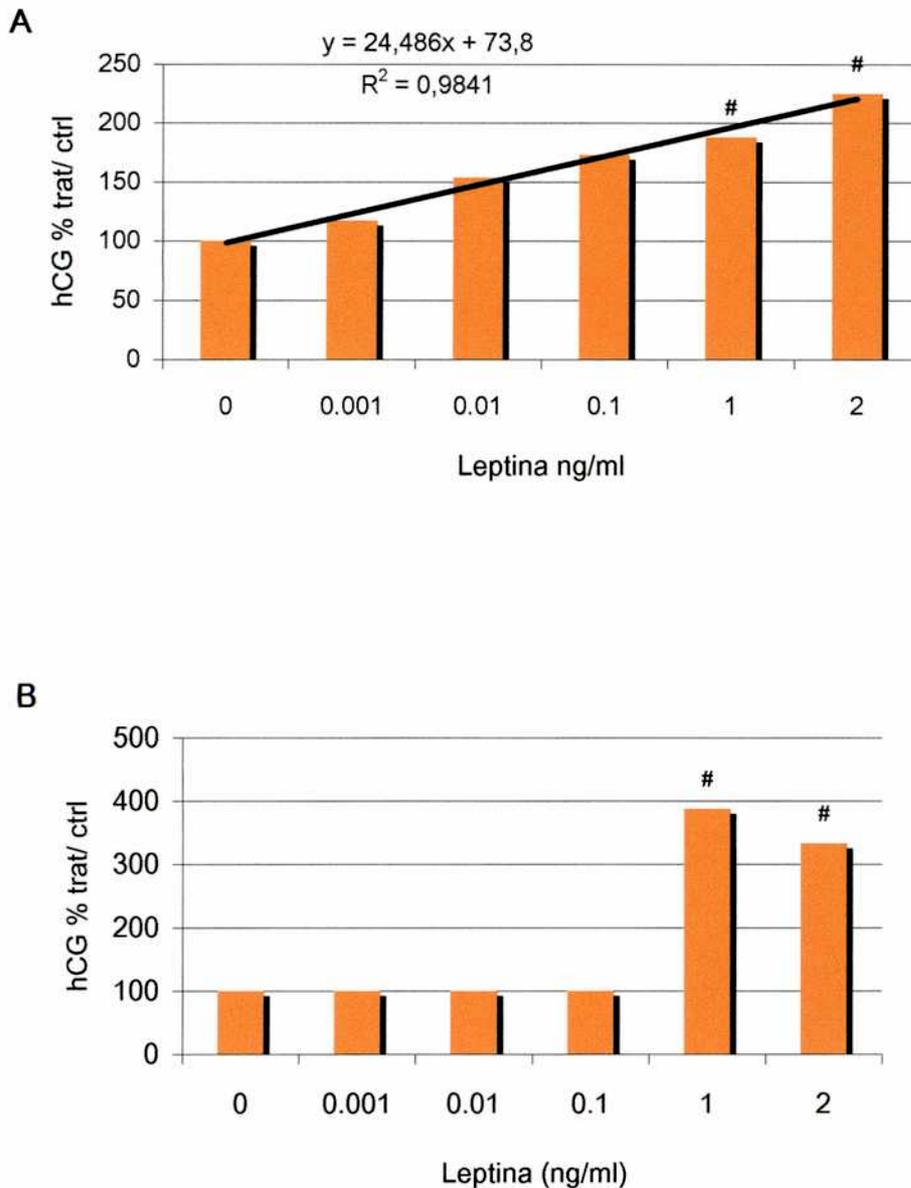


Figura 23 Efecto de leptina sobre la síntesis de hCG (mIU /ml) en células CTB de tercer trimestre en cultivo durante dos (A) o cuatro (B) días. Cultivos primarios de CTB de placenta a término se trataron con concentraciones crecientes de rh-leptina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 2 μ g/ml) y se determinó la concentración de hCG en los sobrenadantes de los cultivos por medio de IRMA. # $p < 0.05$ versus el control sin tratar.

c) Efecto de la leptina sobre la secreción de Progesterona en células CTB de primer trimestre y por células CTB y STB de embarazo a término

Con el objeto de estudiar el efecto de la leptina sobre la secreción de otras hormonas relacionadas con la actividad placentaria, se realizaron cultivos con células de trofoblasto de primer y tercer trimestre en presencia de concentraciones crecientes de rh-leptina y se determinó la concentración de progesterona en el sobrenadante de los cultivos.

Cuando se cultivaron células del CTB de primer trimestre, la leptina no tuvo efecto alguno sobre la síntesis de progesterona; no se encontraron diferencias en los niveles de progesterona en los sobrenadantes de los cultivos tratados, respecto a los controles sin tratar.

En cultivos de trofoblasto de embarazo a término primero se determinó la secreción de progesterona en condiciones basales, en presencia y ausencia de SFB al 10%, a los 2 y 4 días de cultivo. En todas las preparaciones celulares, las células de CTB cultivadas en ausencia de SFB se mantuvieron como mononucleares durante todos los días de cultivo. Cuando las células CTB se diferenciaron a STB, por cultivo de las mismas en presencia de SFB al 10%, secretaron al medio de cultivo una cantidad de progesterona que aumentó entre 2 y 5 veces (Tabla 5). Como ya ha sido publicado, encontramos variabilidad en la secreción hormonal basal entre las distintas preparaciones celulares.

Progesterona (ng/ml)	CTB (Sin SFB)	STB (Con SFB)
Día 2	154 ± 32	608 ± 283
Día 4	46 ± 14	406 ± 111

Tabla 5 Secreción basal de progesterona (ng/mg de proteínas) por células CTB y STB de tercer trimestre.

Cuando las CTB y las STB fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de leptina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$), se observó un efecto inhibitorio sobre la síntesis de progesterona por ambos tipos celulares después de 2 y cuatro días de cultivo. La leptina (1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) inhibió significativamente la secreción de progesterona en células CTB y STB. Concentraciones inferiores de leptina no tuvieron un efecto significativo (figura 24 A y B).

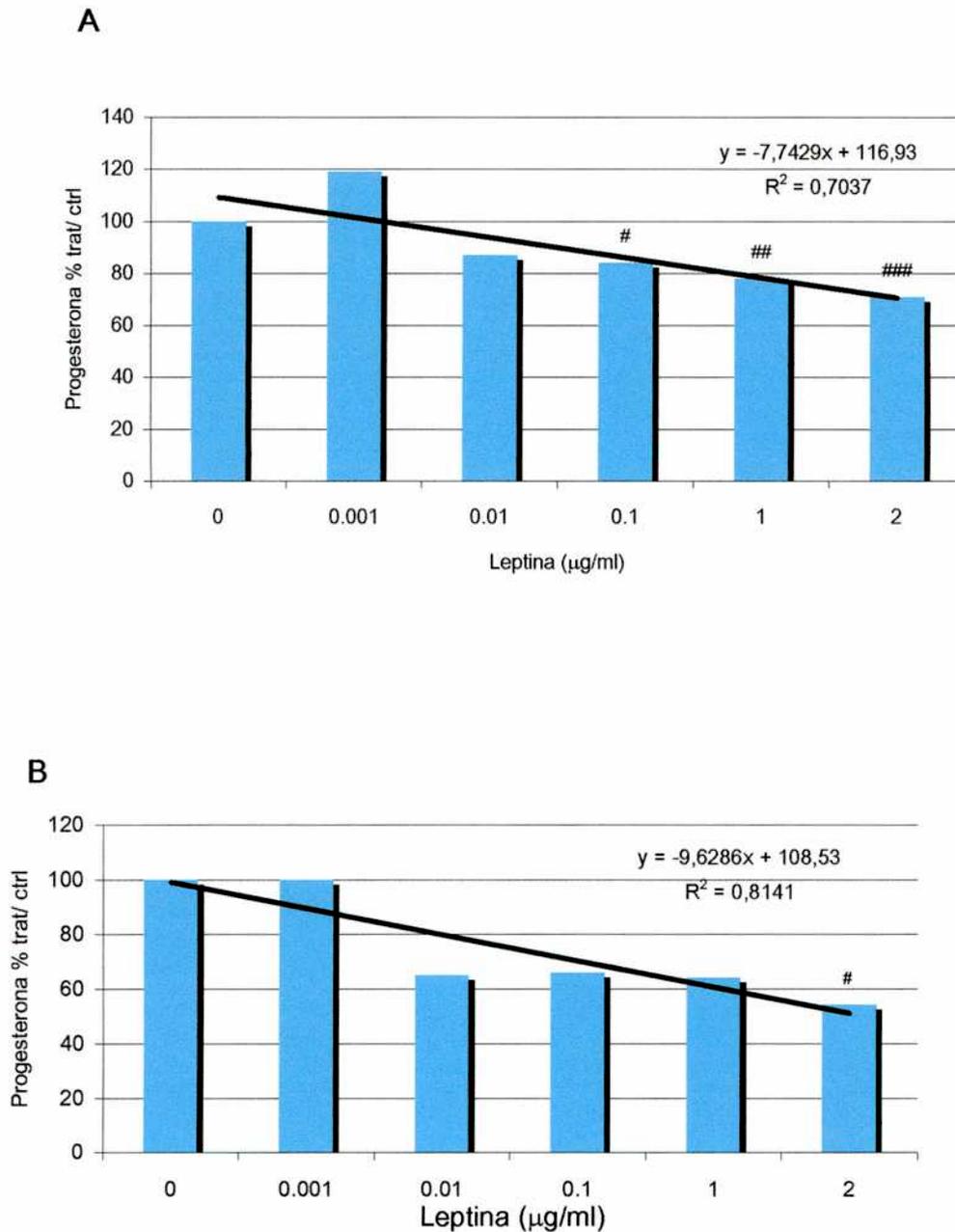
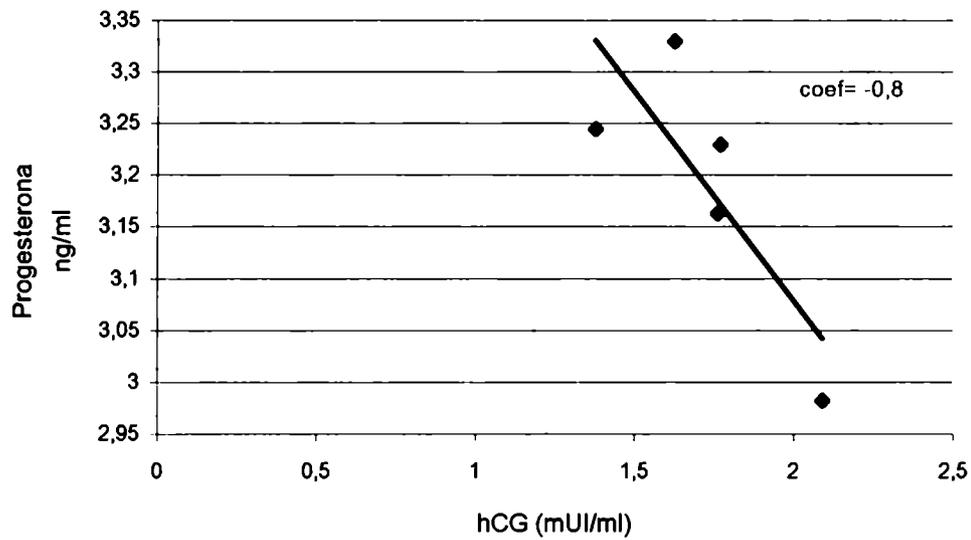


Figura 24 Efecto de leptina sobre la síntesis de Progesterona en células CTB de tercer trimestre después de dos (A) o cuatro (B) días de cultivo. Cultivos primarios de células de CTB se trataron con concentraciones crecientes de rh-leptina y se determinó la concentración de Progesterona en los sobrenadantes por medio de RIA. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus el control.

Al cultivar el CTB en presencia de leptina y determinar los niveles de hCG y progesterona en el medio de cultivo, se encontró un índice de correlación negativo entre la secreción de ambas hormonas placentarias. Al analizarse las concentraciones de estas hormonas después de 2 días de cultivo se encontró un coeficiente de correlación igual a -0.8 ($p < 0.05$); similar al hallado al estudiar los valores de las mismas hormonas en los medios condicionados después de 4 días de cultivo, con un valor igual a -0.81 ($p < 0.049$) (figura 25 A y B).

A



B

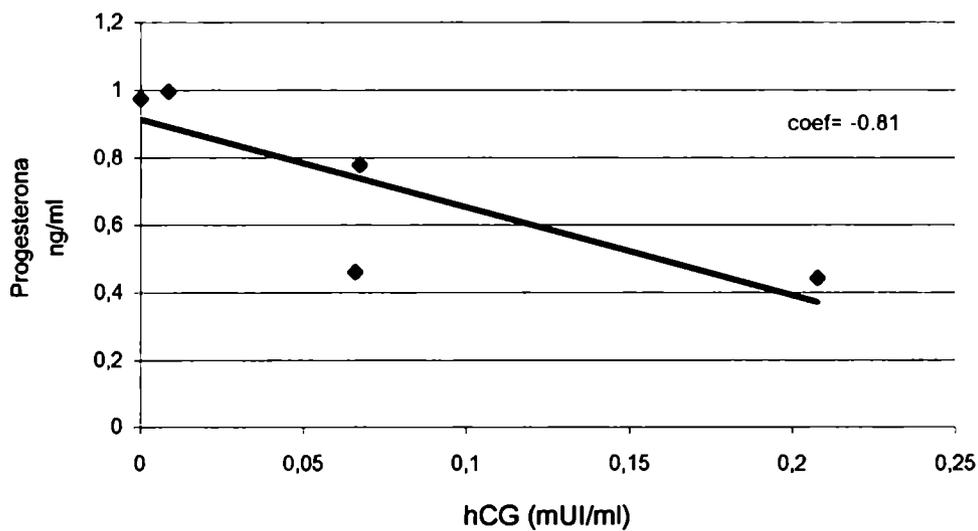


Figura 25 Correlación entre la secreción de hCG y de Progesterona en células CTB a término después de dos (A) y cuatro (B) días de cultivo (coeficiente de correlación -0.8 , $p < 0.05$ y -0.81 , $p < 0.049$, respectivamente). Cultivos de CTB se trataron con concentraciones crecientes de rh-leptina y se determinó hCG y progesterona en los sobrenadantes por medio de IRMA y RIA, respectivamente.

d) Efecto de la leptina sobre la secreción de interleuquina-6 (IL-6) en células CTB de placenta a término

Con el objetivo de comprender de forma más completa la función de la leptina en la placenta humana y, dado que uno de los reguladores de la secreción de hCG en la placenta humana es la IL-6, estudiamos el efecto de la leptina en la secreción de IL-6 en cultivos de trofoblasto.

Teniendo en cuenta los resultados mencionados anteriormente (resultados figuras 9 y 13) que muestran el mismo efecto estimulador sobre la secreción de hCG al tratar las CTB de primer y tercer trimestre con rh-leptina, se utilizó el cultivo de trofoblasto de placenta a término como modelo para estos ensayos.

Cuando células CTB se trataron con distintas concentraciones de leptina y se cuantificó la concentración de IL-6 secretada al medio de cultivo, se observó un efecto estimulador de la leptina sobre esta actividad. Concentraciones de leptina superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ estimularon significativamente la secreción de IL-6 ($p < 0.05$) (figura 26).

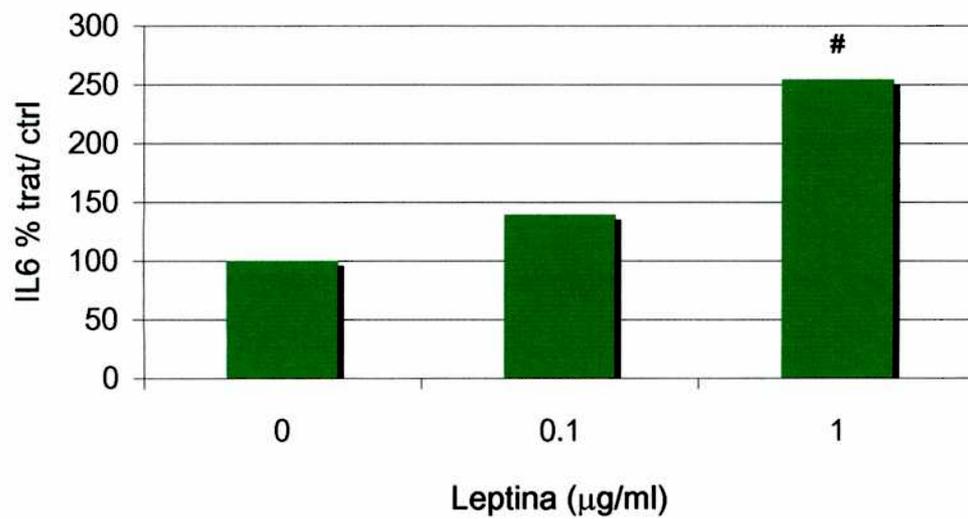


Figura 26 Efecto de leptina sobre la secreción de IL-6 en células CTB en cultivo. Cultivos de CTB se trataron con concentraciones crecientes de rh-leptina (0, 0,1 y 1 µg/ml) y se cuantificó por ELISA la concentración de IL-6 en los sobrenadantes. # $p < 0.05$ versus el control sin tratar.

- **EFFECTO DE LA LEPTINA SOBRE LA ACTIVIDAD GELATINOLITICA DEL TROFOBLASTO**

Efecto de la leptina sobre la actividad de las metaloproteasas (MMP)- 9 y 2

Para estudiar si la leptina cumple algún papel regulatorio de la capacidad invasiva de las células del trofoblasto de placenta a término, como lo hace en el trofoblasto de primer trimestre (3), se realizaron cultivos de CTB y de explantos de embarazo a término y se trataron con concentraciones crecientes de leptina (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 2 µg/ml). En los sobrenadantes de los cultivos se analizó la actividad gelatinolítica por medio de zimografías.

Cuando se analizó la actividad de la MMP-9 (PM 92KDa) en los sobrenadantes de los cultivos de las CTB y de los explantos se observó un efecto estimulador de la leptina sobre la actividad de esta enzima (figuras 27).

Contrariamente, cuando se analizó el efecto de la leptina sobre la actividad de la MMP-2 (PM 72KDa), no se encontró diferencia alguna en los cultivos tratados con respecto a los controles, tanto con las células de CTB como con los explantos.

3 Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marziani D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. Mol Hum Reprod 2000;6:951-8.

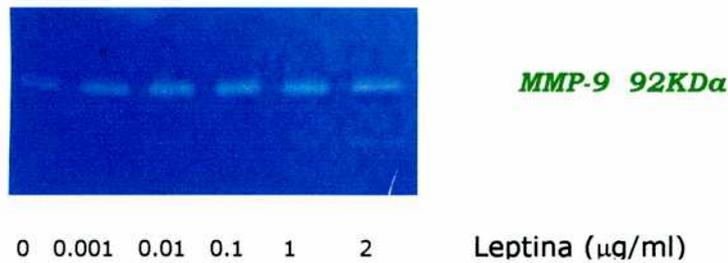
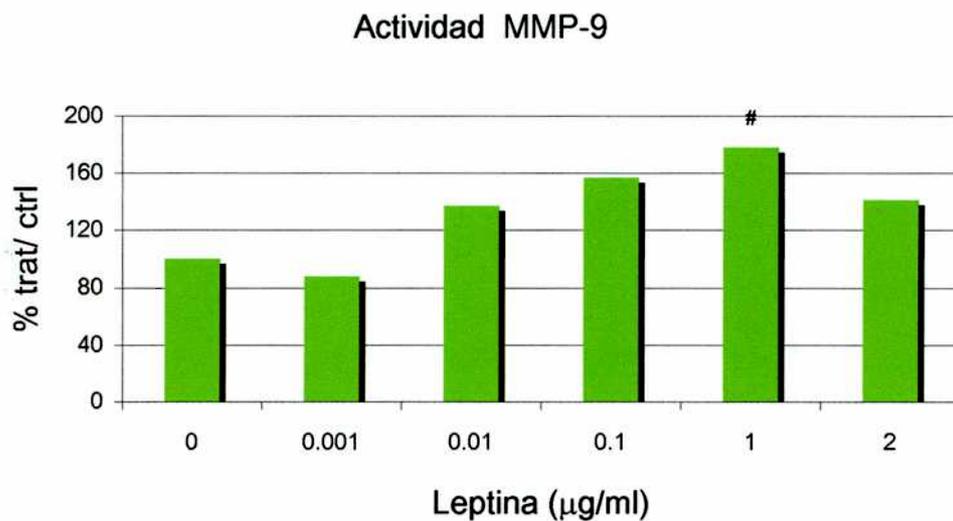
A**B**

Figura 27 Efecto de rh-leptina sobre la actividad gelatinolítica de las CTB de embarazo a término. Células CTB se incubaron con concentraciones crecientes de rh-leptina. 25 µl de cada sobrenadante se analizaron por zimografía. Los zimogramas se analizaron por densitometría; los valores obtenidos se expresan como porcentajes referidos al control sin el agregado de leptina. El panel A muestra un gel representativo. Los datos del panel B representan el promedio \pm SEM de tres zimogramas de experimentos independientes. # $p < 0.09$ versus el control.

• **REGULACION DE LA SINTESIS DE LEPTINA POR LA PLACENTA**

Células CTB y explantos de placenta se cultivaron en presencia de 17- β estradiol ($1 \times 10^{-5}M$, $1 \times 10^{-6}M$, $1 \times 10^{-7}M$, $1 \times 10^{-8}M$, $1 \times 10^{-9}M$), IL-6 (0.1, 0.5, 1, 5, 10 ng/ml o 1000 UI/ml), 5-Pregnen-3 β -ol-20-ona (1 μ g/ml), hCG (1, 10 y 100 mUI/ml), 22-R-OH-colesterol (10 μ M), IL-1 α (0.01, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ng/ml), TNF- α (1-100 ng/ml) o M-CSF (0.1- 100 ng/ml) en DMEM durante 48 y 96 horas. Posteriormente se analizó la síntesis y secreción de leptina por medio de ELISA, IRMA o inmunodetección según se especifica en cada caso.

a) Efecto de 17- β Estradiol sobre la secreción de leptina

Cuando se trataron las células de CTB de primer trimestre con distintas concentraciones de estradiol ($1 \times 10^{-5} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $1 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-9} \text{M}$), se encontró una estimulación de la secreción de leptina estadísticamente significativa (figura 28).

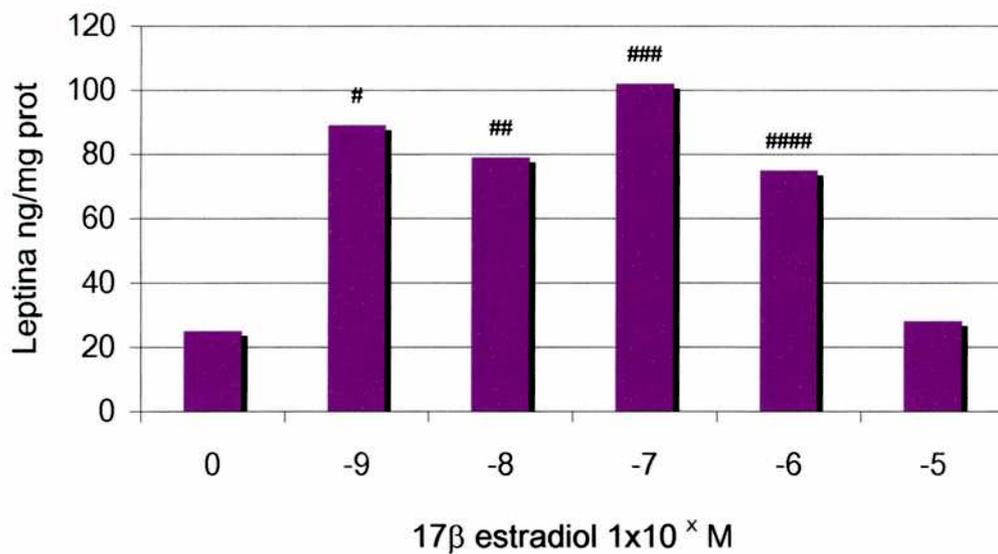


Figura 28 Efecto de 17- β Estradiol sobre la secreción de leptina en células CTB de primer trimestre. Las CTB se cultivaron en presencia de distintas concentraciones de 17 β -estradiol; después de 4 días de cultivo se determinó por ensayo de ELISA la concentración de leptina secretada al medio. # $p < 0.005$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.05$.

El mismo efecto estimulador del estradiol sobre la secreción de leptina se observó al realizar cultivos de explantos de placenta de embarazo a término. Se observó una estimulación de la síntesis de leptina en cultivos de explantos tratados con concentraciones crecientes de estradiol y posteriormente midiendo la concentración de leptina secreta al medio (figura 29). Cuando se cultivaron explantos con estradiol ($10 \times 10^{-9} \text{M}$) y se realizó una inmunodetección de leptina en los explantos, se observó también un efecto estimulador (figura 30).

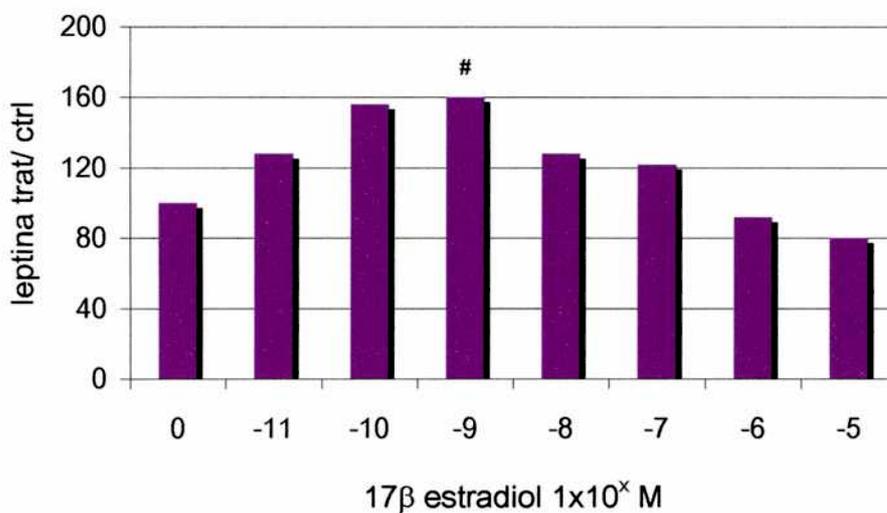


Figura 29 Efecto de 17-β Estradiol sobre la secreción de leptina en explantos de placenta a término. Los explantos se cultivaron en presencia de distintas concentraciones de 17β-estradiol; después de 4h de cultivo se determinó la concentración de leptina secreta al medio por IRMA. # $p < 0.05$ versus el control sin tratar.

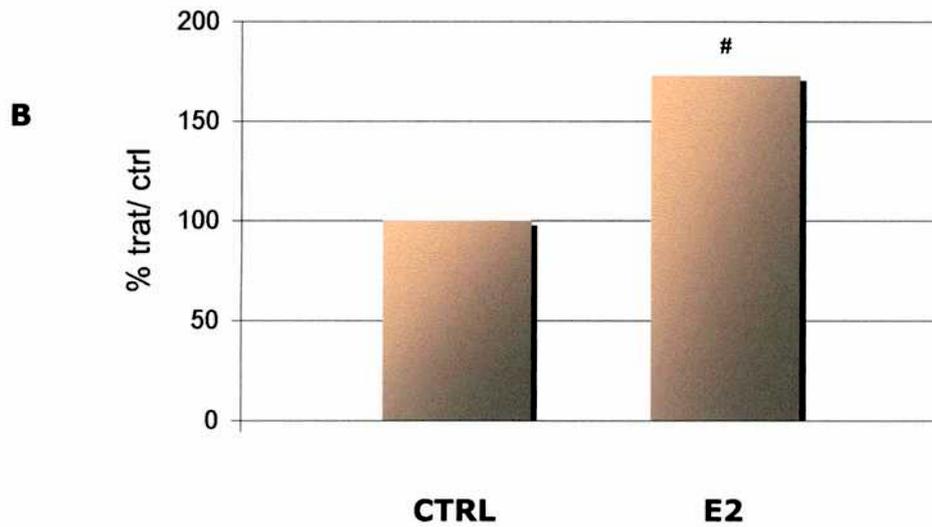
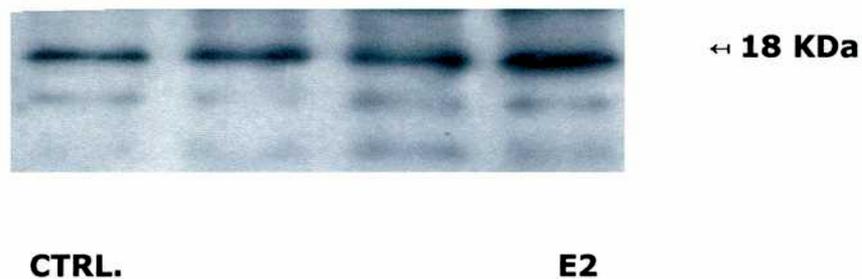
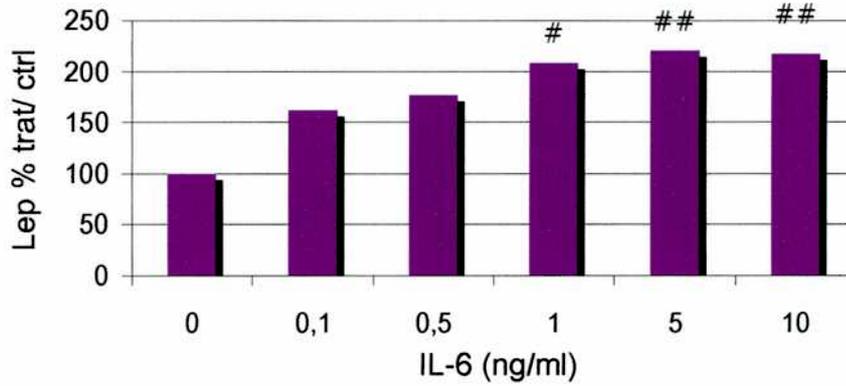
A**B**

Figura 30 Estimulación de la expresión de leptina en explantos de placenta a término. Los explantos se cultivaron durante 48h en presencia o ausencia de estradiol 10^{-9} M. 30 μ g de proteínas totales de extractos de los explantos se sembraron en un SDS- PAGE y se realizó una inmunodetección con $Ab_{\alpha}Ob$. Los resultados se analizaron por densitometría; los valores obtenidos se expresan como porcentajes referidos al control sin el agregado de estradiol. Los datos del panel A representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes; # $p < 0.05$ versus el control. El panel B muestra un gel representativo.

b) Efecto de la IL-6 sobre la síntesis y secreción de leptina

Cuando se cultivaron células CTB en presencia de distintas concentraciones de IL-6 se observó un aumento de la secreción de leptina al medio de cultivo, tanto con CTB de primer trimestre como con las de embarazo a término (figura 31). El efecto estimulador de la IL6 se observó solamente después de 4 días de cultivo, en cambio no fue significativo a los dos días.

A



B

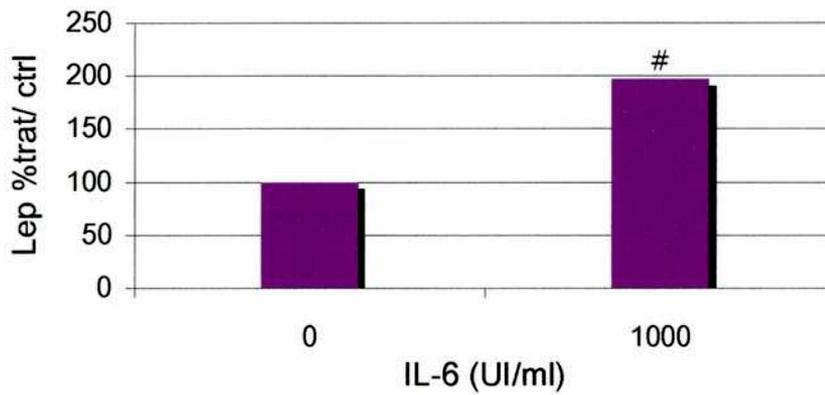


Figura 31 Efecto de IL-6 sobre la secreción de leptina por células CTB de primer (A) y de tercer trimestre de embarazo (B). Células CTB se trataron con distintas concentraciones de IL-6; después de 4 días de cultivo se determinó la concentración de leptina por IRMA o ELISA. # $p < 0.05$, ## $p < 0.04$ versus el control sin tratar.

c) Efecto de 5-Pregnen-3 β -ol-20-ona sobre la secreción de leptina

Cuando se cultivaron células CTB de placenta a término en presencia de pregnenolona (1 μ g/ml), se observó un efecto estimulador sobre la secreción de leptina (figura 32). Este efecto también se observó cuando se realizó una inmunodetección para leptina, con extractos de proteínas totales de explantos tratados con pregnenolona (1 μ g/ml) (figura 33).

Estos ensayos se realizaron únicamente con material de embarazo a término dado que la progesterona y, en consecuencia sus intermediarios, empieza a ser secretada por la placenta alrededor de la 10^a semana post-fecundación.

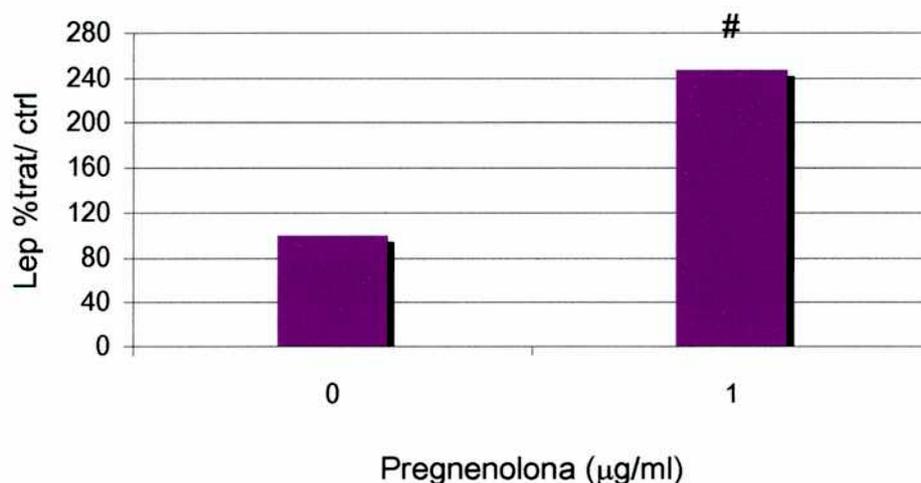


Figura 32 Efecto de Pregnenolona sobre la síntesis de leptina por células CTB de tercer trimestre. Las células CTB se cultivaron en presencia de 1 μ g/ml de 5-pregnen-3 β -ol-20-ona durante 4 días; se determinó la concentración de leptina en el medio por IRMA. # $p < 0.001$ versus el control sin tratar.

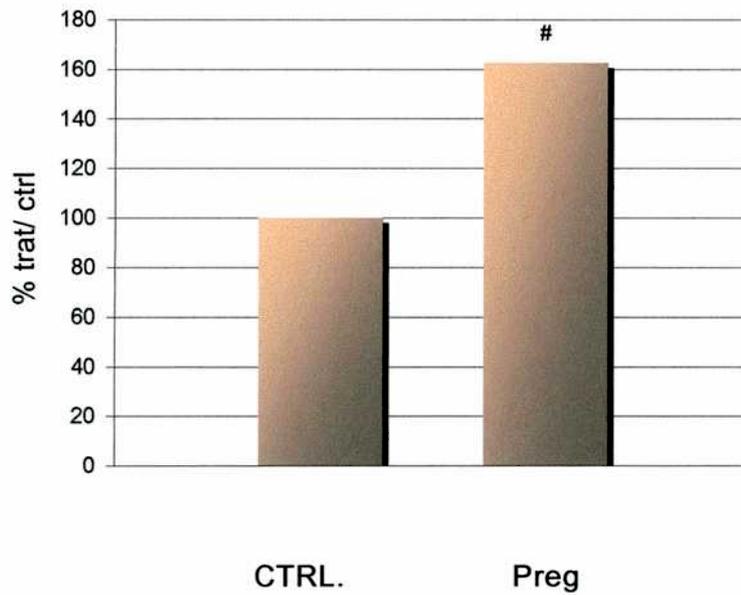
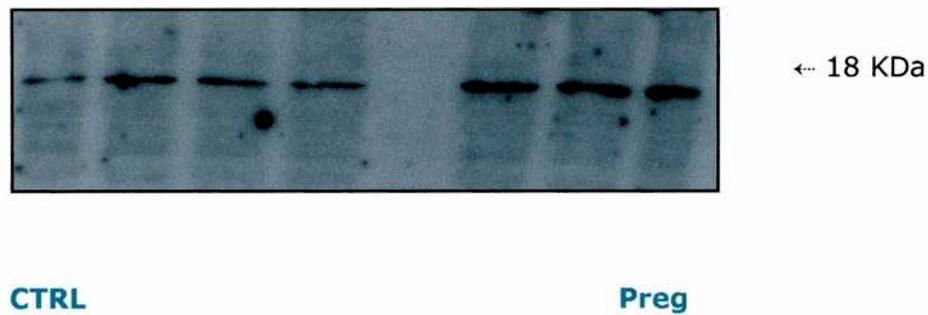
A**B**

Figura 33 Estimulación de la expresión de leptina en explantos de placenta a término. Los explantos se cultivaron durante 48h en presencia o ausencia de 5-pregnen-3β-ol-20-ona (1 μg/ml). Se sembraron 30 μg de proteínas totales de extractos de los explantos en un SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con Ab α Ob. Los resultados se analizaron por densitometría; los valores obtenidos se expresan como porcentajes referidos al control sin el agregado de pregnenolona. Los datos del panel A representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes; # $p < 0.05$ versus el control. El panel B muestra un gel representativo.

d) Efecto de IL-1 α sobre la secreción de leptina

Cuando se cultivaron células CTB en presencia de distintas concentraciones de IL-1 α , se observó una estimulación de la secreción de leptina al medio de cultivo (figura 34).

Estos ensayos se realizaron únicamente con células CTB de primer trimestre dado que la IL-1 α que cumple un papel importante durante el proceso de implantación embrionaria, en las primeras semanas del desarrollo.

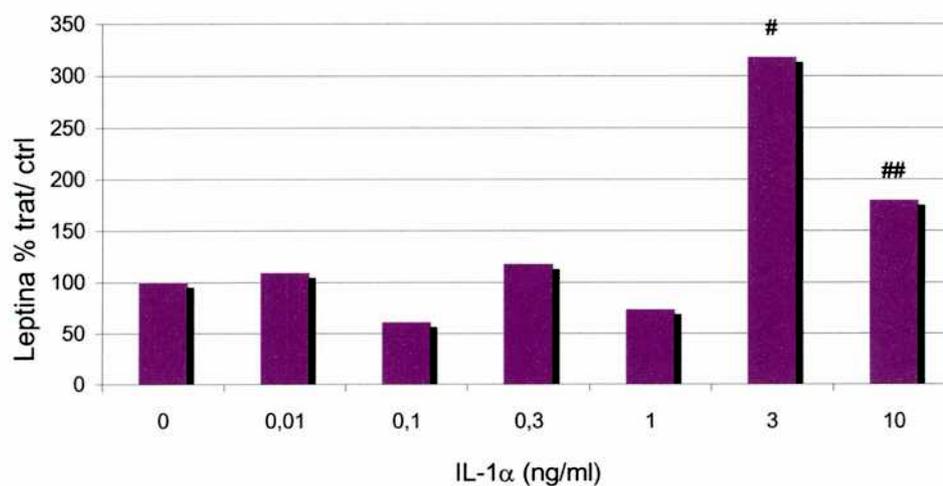


Figura 34 Efecto de IL-1 α sobre la secreción de leptina en células CTB de primer trimestre. Las células CTB se cultivaron en presencia de distintas concentraciones de IL-1 α ; se determinó la concentración de leptina en los sobrenadantes por ELISA. #p<0.0001, ##p<0.0004 versus el control sin tratar.

b) Efecto de hCG sobre la expresión de leptina

La gonadotropina coriónica humana (hCG) estimula la expresión de la proteína leptina por la placenta. Al cultivarse explantos de placenta a término en presencia de distintas concentraciones de hCG (1, 10 y 100 mUI/ml) durante 48 h, se observó una estimulación de la expresión de leptina. En la figura 35 se muestra la estimulación significativa de la expresión de leptina (16KDa) en explantos con 1 y 10 mUI/ml de hCG ($p < 0.05$) detectada por medio de ensayos de inmunodetección con un anticuerpo específico anti leptina humana.

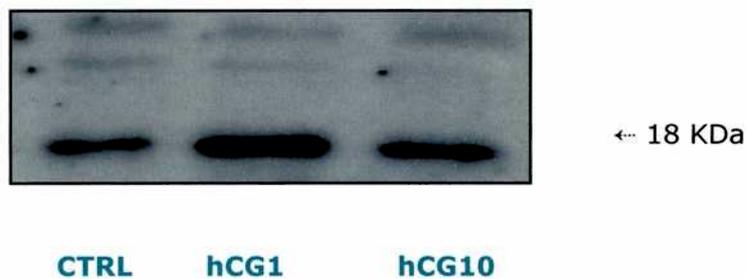
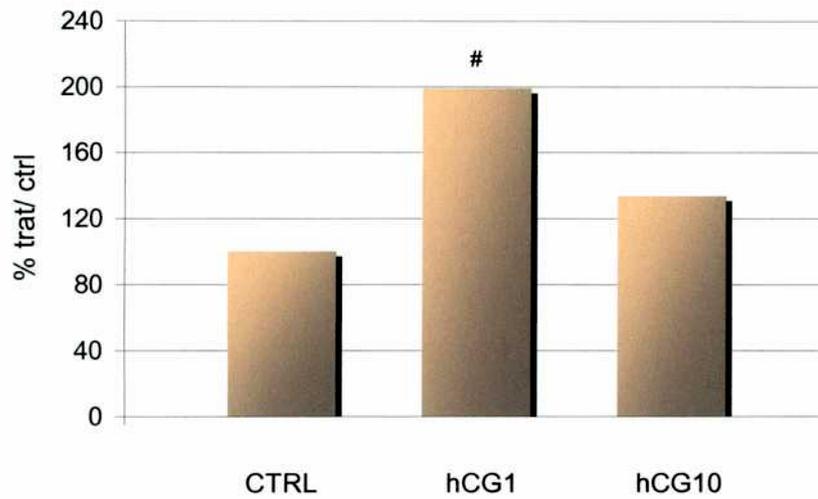
A**B**

Figura 35 Estimulación de la expresión de leptina en explantos de placenta a término. Los explantos se cultivaron durante 48h en presencia o ausencia de distintas concentraciones de hCG (1, 10 y 100 mUI/ml). Se sembraron 30 μ g de proteínas totales de extractos de los explantos en un SDS-PAGE y se realizó una inmunodetección con Ab α Ob. Los resultados se analizaron por densitometría; los valores obtenidos se expresan como porcentajes referidos al control sin el agregado de hCG. Los datos del panel A representan el promedio \pm SEM de tres experimentos independientes; # $p < 0.05$ versus el control. El panel B muestra un gel representativo.

c) Efecto de 22(R)-OH-Colesterol sobre la expresión de leptina

Al cultivar explantos de placenta en presencia de colesterol (10 μ M) durante 48 h, no se observó efecto alguno del mismo sobre la expresión de leptina en los explantos, por medio de ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos para leptina humana.

d) Efecto de TNF- α y M-CSF sobre la secreción de leptina

Al cultivar células CTB en presencia TNF- α (1-100 ng/ml) o de M-CSF (0.1-100 ng/ml) durante 48 h, no se observó efecto alguno sobre la secreción de leptina al medio, por medio de ensayos de ELISA específico para leptina humana.

- **EXPRESIÓN DEL R-OB EN LA PLACENTA A TERMINO**

Se utilizaron extractos proteicos de explantos de placenta a término para realizar ensayos de inmunodetección del receptor de la leptina. Ya que existen varias isoformas del receptor de la leptina (ROb) de distinto peso molecular (PM) que varía según el tipo celular, y que no hay trabajos publicados que muestren el PM de este receptor en la placenta humana, no sabíamos el PM del receptor que debíamos encontrar en estas muestras.

Para poder confirmar que la proteína reconocida por el anticuerpo utilizado era realmente un receptor de leptina, realizamos previamente un ensayo de inmunoprecipitación. Los extractos proteicos de explantos de placenta se incubaron en presencia y/o ausencia de leptina; posteriormente se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti leptina humana ($Ab\alpha Ob$). Por último, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo específico contra un péptido correspondiente a los aminoácidos 541- 840 del dominio interno del receptor de la leptina humana ($Ab\alpha ROb$).

De esta manera encontramos la expresión de dos isoformas del receptor de leptina; una de, aproximadamente, 187 KDa y otra de menor peso molecular, aproximadamente 28 KDa, en la placenta humana (figura 36). En el panel A de la figura 24 se puede observar la presencia de una proteína de ~ 187 KDa reconocida por el $Ab\alpha ROb$, que aparece únicamente en los extractos preincubados con leptina, e inmunoprecipitados con $Ab\alpha Ob$. En el panel B se puede observar la existencia de una proteína de ~ 28 KDa, reconocida por el $Ab\alpha ROb$, que aparece tanto en las muestras preincubadas con leptina e inmunoprecipitadas con el $Ab\alpha Ob$, como en los extractos inmunoprecipitados con $Ab\alpha ROB$ preincubados sin leptina. Por último, en el panel C, se observa la presencia de la banda correspondiente a la proteína de ~ 28 KDa en extractos de cuatro placentas distintas, sembrados directamente en un gel.

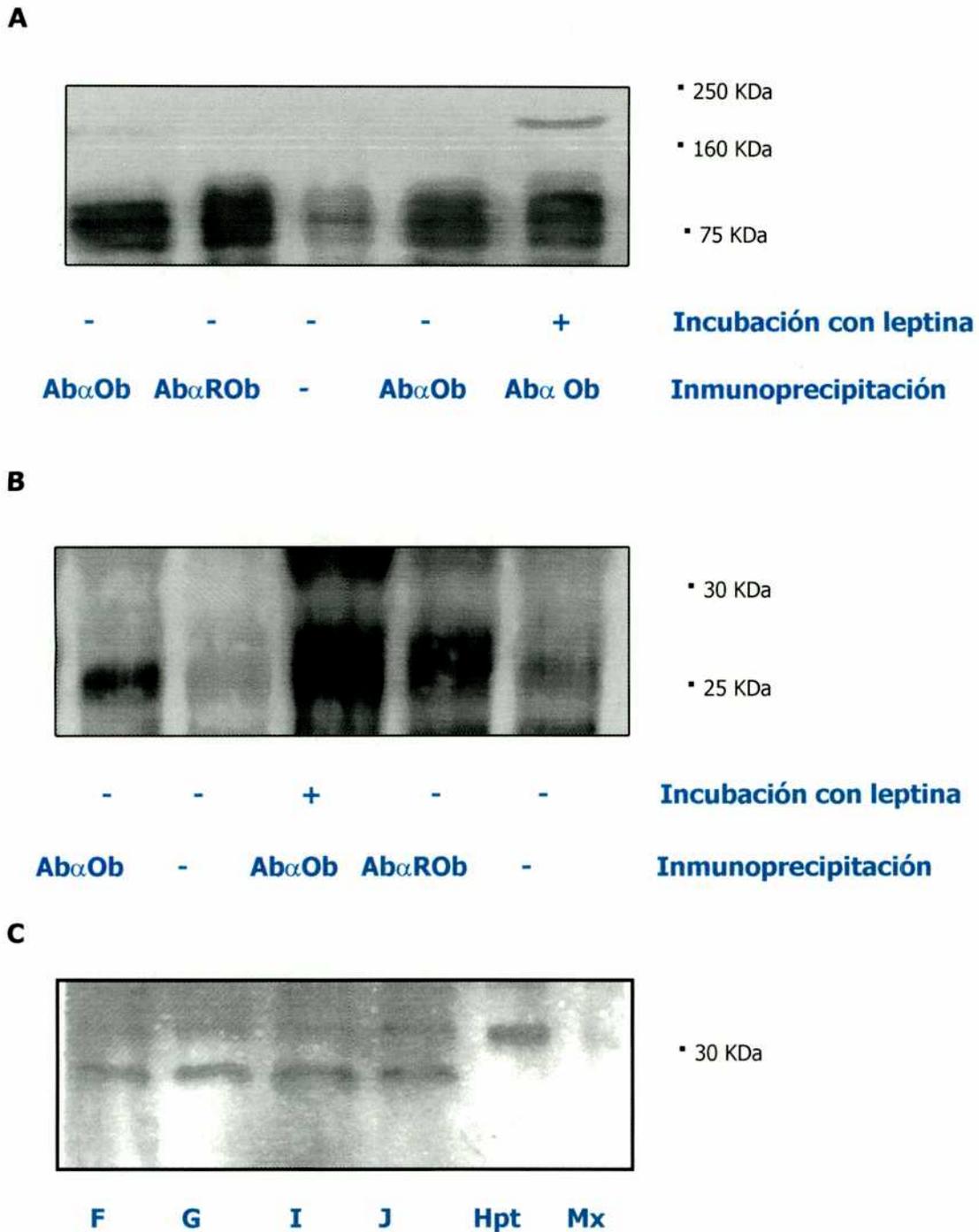


Figura 36 Inmunodetección del receptor de la leptina en extractos totales de explantos de placenta a término. En los geles mostrados en los paneles A (PM mayores que 70 KDa) y B (PM menores que 50 KDa) se sembraron 300 μ g de extracto total de explantos, incubados con o sin leptina e inmunoprecipitados con o sin anticuerpo anti-leptina (Ab α Ob) o anticuerpo anti-receptor de leptina (Ab α ROb). En el gel del panel C se sembraron 30 μ g de extractos de cuatro placentas (F, G, I, J) y de hipotálamo de ratón.

- **NIVELES DE LEPTINA EN SUEROS DE PACIENTES CON PATOLOGÍAS REPRODUCTIVAS**

Se determinó la concentración de leptina en sueros de 44 pacientes: 2 sueros controles (mujeres mayores de 20 años, menores de 40, con antecedentes de embarazo a término durante los últimos dos años, no obesas), y 42 sueros provenientes de pacientes con problemas de esterilidad, con aborto espontáneo recurrente (RSA) o con amenaza de aborto (A).

suero	leptina (ng/ ml)
Control	53.00
Control	45.90
A	13.45
A	5.53
A	8.35
A	16.70
A	16.75
A	8.95
A	25.45
A	21.20
A	39.00
A	29.00
A	11.63
A	48.60
A	82.00
A	26.20
A	13.60
A	14.50
A	16.60
A	27.20

suero	leptina (ng/ ml)
A	8.40
A	44.20
A	4.90
A	14.45
A	75.50
A	6.50
A	65.00
A	24.50
A	11.00
RSA	5.68
RSA	1.17
RSA	1.04
RSA	1.97
RSA	1.67
RSA	1.31
RAS	2.42
RSA	3.07
RSA	0.47
RSA	1.90
RSA	0.36
RSA	0.58
RSA	1.13
RSA	8.95
RSA	6.08

Tabla 6. Nivel de leptina en los distintos sueros, determinados por ensayo IRMA.

Si bien no tenemos aún un número adecuado de mujeres controles no embarazadas, mayores de 20 años, menores de 40, con antecedentes de embarazo a término en los últimos dos años y otro grupo control de mujeres embarazadas en curso del primer trimestre de embarazo, hemos tomado los valores publicados para ambos grupos por distintos autores como valores normales (tabla 7 A y B).

A

Autores	Leptina en suero (ng/ml)
Butte NF, et al. (4)	18 ± 15
Hardie L, et al. (5)	22.9 ± 3.5; 36.7 ± 4.7
Shimizu H, et al. (6)	10.41 ± 0.96
Lage M et al. (7)	11.7 ± 1
Havel PJ, et al.(8)	15 ± 1.9
Stock SM et al (9)	12.5 ± 9

B

Autores	Leptina en suero (ng/ml)
Lage M et al. (7)	14.3 ± 1.4
Stock SM et al (9)	18 ± 8

Tabla 7. Nivel de leptina en sueros de pacientes controles publicados por distintos autores. En la tabla A se presentan los distintos valores publicados para mujeres normales no embarazadas. En la tabla B se presentan los valores de leptina en sueros de mujeres embarazadas durante el primer trimestre.

4 Butte NF, Hopkinson JM and Nicolson MA. Leptin in Human Reproduction: Serum Leptin Levels in Pregnant and Lactating Women. *J Clin Endoc Metab* 1997; 82: 585- 589.

5 Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D and Fowel P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol* 1997; 47: 101- 106.

6 Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatary T, et al. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinol* 1997; 154: 285- 292.

7 Lage M, Garcia- Mayor RV, Tomé M, et al. Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. *Clinical Endocrinology* 1999; 50: 211- 216.

8 Havel PJ, Kasom-Karakas S, Dubuc Gr, et al. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med* 1996; 2: 949-50.

9 Stock SM, Sande EM and Bremme KA. Leptin levels vary significantly during the menstrual cycle, pregnancy, and in vitro fertilization treatment: possible relation to estradiol. 1999; *Fertil Steril* 72: 657- 662.

Al analizar los niveles de leptina encontrados en los sueros de pacientes RSA (n= 15), se encontró que existe un gran número de pacientes dentro de este grupo con una concentración de leptina menor que el valor en pacientes normales. Se encontró un valor promedio de 2.52 ± 2.3 ng/ml de leptina, significativamente mas bajo que el presentado por distintos autores como valor promedio en suero de mujeres normales (tabla 7A).

En cambio, al analizar los valores de leptina en suero de las pacientes A (n= 27) y compararlos con los presentados por varios autores como valores normales en mujeres durante el primer trimestre de embarazo, se encontró un sub-grupo (n= 6) dentro de estos pacientes, con valores menores al promedio normal (promedio: 7.1 ng/ml). Esto sugeriría que los niveles de leptina podrían ser la razón de los abortos en un sub-grupo de estas pacientes, pero no la única causa.

Por otro lado, los sueros de las pacientes RSA han sido analizados con el ensayo de embriotoxicidad con embriones de ratón (10) (esta correlación de resultados ha sido posible gracias a una colaboración establecida con la Dra. M Cameo - Laboratorio Biología de la Reproducción donde se realizó este ensayo). Los resultados obtenidos sugieren que no existe una relación entre la concentración de leptina en estos sueros y la capacidad de los mismos de mantener, estimular o inhibir el desarrollo de embriones murinos de dos células hasta el estadio de blastocisto (tabla 8 y figura 37).

10 El ensayo de embriotoxicidad consiste en el cultivo de embriones de ratón en presencia del factor o medio que uno desea estudiar. Este ensayo permite analizar la presencia de factores que alteren, interrumpan o estimulen el desarrollo normal de los embriones.

Suero	Leptina (ng/ml)	Desarrollo a Blastocisto (Suero/ control)
RSA	5.68	1.00
RSA	1.17	0.84
RSA	1.04	1.00
RSA	1.97	0.51
RSA	1.67	0.73
RSA	1.31	0.77
RSA	2.42	1.25
RSA	3.07	0.77
RSA	0.47	1.22
RSA	1.9	1.11
RSA	0.36	0.62
RSA	0.58	1.20
RSA	1.13	ND
RSA	8.95	ND
RSA	6.08	0.85

Tabla 8 Relación entre el nivel de leptina encontrado en los sueros de pacientes RSA y la capacidad de desarrollo de embriones de ratón en presencia de los sueros. Se determinó la concentración de leptina en los sueros que se utilizaron para realizar el cultivo de los embriones de dos células hasta el estadio de blastocisto. ND: no determinado.

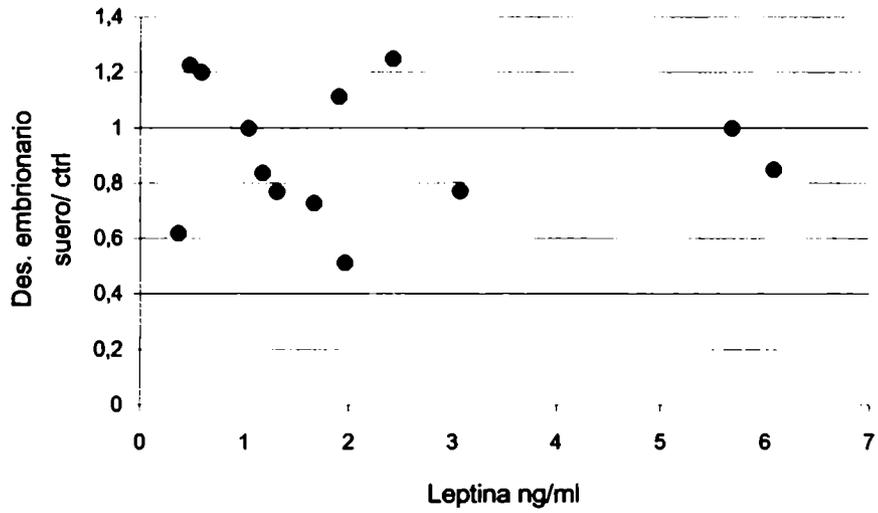


Figura 37 Desarrollo de embriones de ratón de dos células a blastocisto en presencia de sueros de pacientes, en función de la concentración de leptina en los sueros.

DISCUSIÓN

Una preñez exitosa depende del correcto desarrollo y funcionalidad de la placenta, bajo la regulación autocrina/paracrina de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas polipeptídicas y esteroideas. Con el objetivo final de dilucidar si la leptina participa en esta regulación, hemos estudiado, directa o indirectamente, su posible acción como modulador de las principales funciones de la placenta humana.

Coincidiendo con otros autores (1, 2, 3, 4, 5), encontramos expresión de leptina, tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm, en trofoblasto de primer y tercer trimestre de embarazo.

Si bien la concentración de leptina en suero de mujeres embarazadas aumenta significativamente a lo largo de los nueve meses de la gestación (1), las células del trofoblasto de primer trimestre en cultivo secretan hasta 100 veces más leptina que las de término de preñez. Estos hallazgos podrían explicarse como el resultado de dos factores: por un lado, la placenta de embarazo a término tiene un peso de hasta 500g, mientras que el tejido trofoblástico de primer trimestre no supera los 10g. Por otro lado, la población celular mayoritaria en embarazo a término es de STB, que produce, *in vitro*, hasta 10 veces más leptina que las CTB del mismo período; contrariamente a lo que sucede durante el primer trimestre, donde el trofoblasto está compuesto casi exclusivamente por células de CTB.

1 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Non-adipose tissue production of leptin; leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029-1033.

2 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

3 Dotsch J, Nusken KD, Knerr I, Kirschbaum M, Repp R, Rascher W. Leptin and neuropeptide Y gene expression in human placenta ontogeny and evidence for similarities to hypothalamic regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:2755-2758.

4 Senaris R, Garcia Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997; 138:4501-4504.

5 Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 11073-11078.

También hemos observado, que explantos de vellosidades coriónicas de placenta de embarazo a término expresan y secretan leptina al medio de cultivo.

Estos resultados podrían ser un primer aporte a la hipótesis que la leptina es un componente del microambiente modulador del desarrollo y funcionalidad del tejido placentario, tanto al principio como al final del embarazo.

Teniendo en cuenta la expresión del receptor de leptina (6) y de TNF- α (7) en el trofoblasto humano y sus diversos efectos sobre la viabilidad celular en distintos tejidos, analizamos el papel de ambos factores sobre la viabilidad y la actividad metabólica de células CTB de primer y tercer trimestre de embarazo. Los resultados del presente trabajo muestran que el TNF- α estimula la actividad de clivado de WST-1 e inhibe la incorporación de [3 H]-timidina en cultivos de células CTB de primer trimestre. Si se considera que la actividad de clivado es índice de número de células, podría interpretarse, entonces, que el TNF- α por un lado aparentemente aumentaría la cantidad de células y, por otro, inhibiría su proliferación. En realidad, esto sugiere que esta citoquina tendría dos efectos diferentes sobre las células CTB de primer trimestre: por un lado induciendo un efecto citotóxico o apoptótico (demostrado por la inhibición de la incorporación de [3 H]-timidina) y, por el otro, estimulando el metabolismo y particularmente la actividad de la enzima mitocondrial succinato-tetrazolio- reductasa. Estos resultados concuerdan con las explicaciones de los distintos efectos del TNF- α expuestas por Fiers (8). Así también, estas observaciones podrían explicar los efectos, aparentemente contradictorios, de esta citoquina sobre las células CTB previamente publicados

6 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

7 Knöfler M, Mösl B, Bauer S, Griesinger G and Husslein P. TNF- α /TNFRI in primary and immortalized first trimester cytotrophoblasts. *Placenta* 2000, 21: 525-35.

8 Fiers W. Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS* 1991, 285: 199-212.

(6, 9). Dependiendo de la técnica utilizada para analizar viabilidad celular, sea incorporación de [³H]- timidina o clivado de WST-1, su efecto aparentaría ser contradictorio.

Nuestros resultados muestran, también, que la leptina inhibe la incorporación de timidina por células CTB de primer trimestre, pero no hace lo mismo sobre las células provenientes de placentas de embarazo a término. Considerando que la leptina mostró un efecto estimulador sobre la actividad metabólica de las células presentes en los sobrenadantes de los cultivos, podríamos pensar que esta proteína estaría induciendo el despegado de células vivas de la placa durante el cultivo *in vitro*, y no inhibiendo su proliferación. El mecanismo por el cual la leptina podría estar induciendo este efecto no está claro, si bien existen trabajos que proponen que esta proteína modularía la expresión de integrinas (glicoproteínas heterodiméricas transmembrana que reconocen componentes de la MEC) en células de CTB (10, 11).

También hemos observado que, aunque la leptina no tuvo efecto directo alguno sobre la actividad metabólica de las células CTB de primer trimestre, pegadas a la placa de cultivo, sin embargo, inhibió significativamente el efecto estimulador del TNF- α sobre esta actividad. Dado que el receptor de la leptina comparte gran similitud estructural con los receptores de citoquinas, podría pensarse que la leptina interferiría de alguna forma en la señalización del efecto producido por el TNF- α .

La ausencia de efecto de la leptina sobre la viabilidad y la incorporación de timidina en células CTB de embarazo a término, confirma que si bien las células del trofoblasto conservan, durante todo el embarazo, muchas características y funciones comunes, también adquieren características que les son propias. Es importante mencionar que una de las características más

9 Yui J, Gacia-Lloret M, Wegmann TG and Guilbert LJ. Cytotoxicity of Tumour Necrosis Factor- alpha and Gamma-Interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994, 15. 819-35.

10 Bischof P. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of trophoblastic metalloproteinases. *Early Pregnancy* 2001, 5: 30-41.

11 Gonzalez RR, Devoto L, Campana A and Bischof P. Effects of leptin, interleukin- 1 alpha, interleukin- 6, and transforming growth factor- beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. *Endocrine*. 2001 Jul;15(2):157-64.

estudiadas, por los cambios que sufre durante los nueve meses de este período es, justamente, la expresión diferencial de integrinas (12).

Los resultados presentados en este trabajo, sobre un posible efecto de la leptina en la incorporación de timidina y la actividad de la enzima mitocondrial succinato-tetrazolio-reductasa, sugerirían que la proteína producto del gen OB cumpliría un papel diferencial en la regulación de la capacidad de adhesión de las células del CTB humano según el período estudiado y, no tanto sobre la viabilidad de las mismas.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento con TNF- α , muestran que la leptina podría, en cierta medida, inhibir el efecto del mismo sobre la actividad metabólica de las células.

Analizando el papel de la leptina sobre la actividad endocrina de la placenta, nuestros resultados indican que la leptina estimula la secreción de hCG tanto en cultivos de células CTB de primer trimestre como en células provenientes de embarazo a término. Si bien la estimulación fue mayor en las células de primer trimestre, en ambos casos resultó estadísticamente significativa. Por otro lado, hemos confirmado el papel del GnRH en la secreción de hCG (13), con una estimulación máxima a una concentración de 8.5×10^{-8} M. Teniendo en cuenta esta vía de regulación de la síntesis de hCG en la placenta, observamos que el efecto estimulador de la leptina era parcialmente inhibido por dos antagonistas de GnRH. Estos resultados estarían indicando que la estimulación de la secreción de hCG por la leptina sería mediada, al menos parcialmente, por GnRH.

La secreción de hCG por el trofoblasto también está regulada por factores tales como IL-6 (14), IL-1 (15), LIF (16), EGF (17). IL-6 es una citoquina que

12 Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM and Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. J Clin Invest 1996, 97:540-50.

13 Siler- Khodr and Khodr. Dose analysis of GnRH stimulation of hCG release from human term placenta. Biol Reprod 1981; 25: 353-358.

14 Nishino H, Miyata M, Kitamura K. The effect of interleukin-6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells in vitro. Eur Arch Otorhinolaryngol 1998, 255: 468-472.

se expresa en la interfase materno/fetal, siendo reconocida como un modulador de distintas funciones placentarias (18). Considerando que IL-6 es un promotor importante de la secreción de hCG en el trofoblasto, y que nuestros resultados mostraron que se requerían dosis más bajas de leptina para estimular la secreción de IL-6, comparadas con las necesarias para estimular hCG, se puede sugerir que el efecto estimulador de la leptina sobre la secreción de hCG, podría ser mediado, en parte, por IL-6.

Estos resultados sugieren que la leptina podría sumarse a la lista creciente de estimuladores de la secreción de hCG. Este efecto estimulador sería, aparentemente, mediado parcialmente por GnRH y por IL-6.

Otra hormona fundamental para el mantenimiento de la preñez, es la progesterona. Nuestros resultados proveen evidencias de un efecto inhibitorio de la leptina sobre la secreción de progesterona. Este efecto se observó únicamente en cultivos de células purificadas a partir de placentas de embarazo a término, no así en cultivos de células de CTB de primer trimestre, donde no se observó efecto alguno.

La ausencia de efecto sobre la producción de progesterona en células provenientes de tejido de primer trimestre, concuerda con el hecho que la producción de esta hormona por el trofoblasto recién comienza después de la semana 8-9^o de gestación. Por otro lado, dado que los niveles de progesterona producidos por estas células son bajos, podría ser que no fueran suficientes como para el efecto inhibitorio sea observable.

15 Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Gelatinase and oncofetal fibronectin secretion are dependent upon integrin expression on human cytotrophoblast. Hum Reprod 1995; 10:734-742.

16 Sawai K, Matsuzaki N, Kameda T et al. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. J Clin Endocrinol Metab 1995, 80: 1449- 1456.

17 Licht P, Russo V, Wildt L. On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo- endometrium microenvironment: implications for differentiation and implantation. Semin Reprod Med 2001; 19:37-47.

18 Neki R, Matzuzaki N, Yamanaka K, Shimoya K, Okada T, Saji F, Iwashita M, Tanizawa O. The interleukine-6 (IL-6)/IL-6-receptor system induces human chorionic gonadotropin production by activating tyrosine kinase-dependent signal transduction pathway different from pathways triggered by protein kinase activators including gonadotropin releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab 1993, 77: 704-709.

Estos resultados, y la correlación negativa encontrada entre la secreción de hCG y de progesterona después de la estimulación con leptina, coinciden con lo observado por otros autores que muestran que la hCG no tiene efecto alguno sobre la producción de progesterona por la placenta humana (19, 20), contrariamente al efecto estimulador conocido en el cuerpo lúteo. Esto está de acuerdo con el efecto inhibitorio de la leptina sobre la secreción de progesterona estimulada por gonadotrofinas en otros tipos celulares tales como las células de la granulosa humanas (21, 22), bovinas (23) y de rata (24). Esta correlación negativa es un resultado interesante, si bien no podemos explicar su mecanismo de acción. Hasta el momento, según la literatura, no se ha podido demostrar una correlación entre los niveles de hCG y de progesterona en la placenta, aunque esta correlación sería esperable. Tal vez, la leptina sea uno de los conectores entre estas dos hormonas placentarias.

Progesterona y estradiol son dos de las hormonas esteroideas más importantes producidas por la placenta humana. Se sabe que la progesterona es indispensable para el mantenimiento de la preñez y es fundamental para mantener al útero en un estado quiescente, previniendo el desarrollo de un parto prematuro. Dado que la producción de progesterona por la placenta depende del colesterol materno y que, en nuestros experimentos no se agregó alguna fuente externa de colesterol, una explicación posible de la inhibición de la producción de progesterona podría ser la disponibilidad del mismo. Por otra parte, la leptina podría también estar regulando alguna de las enzimas que participan en el metabolismo del colesterol o la proteína de placenta StaR-

19 Das NP, Khan-Dawood FS, Dawood MY. The effect of steroid hormones and gonadotropins on in vitro placental conversion of pregnenolone to progesterone. *J Steroid Biochem* 1985; 23: 517-522.

20 Paul S, Das C, Jaikhai BL, Talwar GP. Progesterone synthesis by human placental syncytiotrophoblast in vitro-preferred precursor and effect of human chorionic gonadotropin. *J Steroid Biochem* 1981; 14:311-313.

21 Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinol*; 1999; 140:1731-1738.

22 Greisen S, Ledet T, Moller N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Petersen K, Ovesen P. Effects of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79:931-935.

23 Brannian J, Zhao Y, McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum Reprod* 1999; 14:1445-1448.

24 Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine* 2000; 12:53-59.

símil, que se ocupa del transporte del colesterol entre las membranas mitocondriales. Se ha descrito una acción inhibitoria de la leptina en tres de los tejidos esteroidogénicos más importantes: glándula adrenal, ovario y testículo (25, 26, 27). El mecanismo involucrado en esta inhibición no fue aún esclarecido completamente: resultados mostrados en testículo sugieren que la inhibición de la esteroidogénesis inducida por la leptina podría ser, al menos parcialmente, mediada por una disminución en la expresión de ARNm para algunas proteínas involucradas en la vía de la esteroidogénesis, tales como P450 scc y StaR (27).

Es importante considerar que en cultivos de células de la granulosa humanas, la IL-6 mostró un efecto inhibitorio sobre la estimulación de la producción de progesterona inducida por FSH (28). Esto y el efecto presentado en este trabajo de la leptina sobre la producción de progesterona y de IL-6, sugerirían que la inhibición de la secreción de progesterona, inducida por leptina, podría ser mediada por IL-6.

Estos resultados sugieren a la leptina como un regulador de la producción de progesterona por la placenta, como así también de la esteroidogénesis en general. Además, esta proteína podría ser uno de los conectores aún no encontrados entre la secreción de hCG y progesterona en este tejido.

La capacidad invasiva del trofoblasto está relacionada con su capacidad de secretar enzimas proteolíticas tales como metaloproteasas de la MEC (MMPs). Los resultados presentados en este trabajo, muestran un efecto estimulatorio

25 Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B and Gaillard RC. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 1998; 139: 4264-4268.

26 Spicer LJ and Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; 138: 3374-3379.

27 Tena-Sempere M, Manna PR, Zhang FP, Pinilla L, Gonzales LC, Dieguez C, Huhtaniemi I and Aguilar E. Molecular mechanism of leptin action in adult rat testis: potential targets for leptin-induced inhibition of steroidogenesis and pattern of leptin receptor messenger ribonucleic acid expression. *J Endocrinol* 2001; 170: 413-423.

28 Salmassi A, Lü S, Hedderich J, Oettinghaus C, Jonat W. Interaction of interleukin-6 on human granulosa cell steroid secretion. *J Endocrinol* 2001; 170:471-478.

de la leptina sobre la actividad de la MMP-9, pero ningún efecto sobre la actividad de la MMP-2. El efecto encontrado de la leptina sobre la MMP-9, la producción de progesterona y la secreción de IL-6, sumado al hecho que la progesterona sea un regulador negativo de la MMP-9 (29) y la IL-6 un estimulador de la misma (30), sugieren que la leptina sería un factor importante que actuaría en colaboración con otros factores en la regulación autocrina/paracrina necesaria para el desarrollo y mantenimiento de la placenta.

Los resultados obtenidos en trofoblasto proveniente de placentas de embarazo a término, coinciden con resultados presentados por otros autores que muestran que la leptina estimula la actividad de MMP-9 en trofoblasto de primer trimestre. Sin embargo, estos autores también presentan un efecto estimulador sobre la MMP-2 (31).

Otros experimentos deberían desarrollarse para poder diferenciar el sitio de regulación de la leptina sobre la actividad de la MMP-9, y qué mecanismo utiliza. La observación de una mayor actividad gelatinolítica no es suficiente para diferenciar si, además de más actividad, también existe una mayor cantidad de enzima.

Estos resultados ponen a la leptina como otro regulador de una de las actividades fundamentales del trofoblasto humano, la invasión; si bien más investigaciones deben realizarse para poder comprender el mecanismo de acción de la misma.

29 Shimonovitz S, Hurwitz A, Hochner- Celnikier D et al. Expression of gelatinase B by trophoblast cells: down- regulation by progesterone. A J Obst Gyn 1998, 1788: 457- 461.

30 Meisser A, Cameo P, Islami D et al. Effects of Interleukin- 6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. Mol Hum Rep 1999, 5: 1055- 1058.

31 Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Cancellò R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P (2000) Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: posible implications for trophoblast invasion. Mol Hum Rep, 6, 10, 951-8.

También estudiamos, los factores placentarios que regularían la secreción de leptina.

En los últimos años se demostró que los valores de leptina circulante durante el embarazo son elevados, aumentando significativamente durante el segundo trimestre y manteniéndose altos hasta el final de la preñez (32). Sin embargo, la deposición de grasas y los cambios endocrinos inducidos por la preñez, no pueden explicar ese drástico aumento de leptina en circulación, sugiriendo así a la unidad feto-placentaria como la responsable de dicho aumento (33). Poco se sabe de la regulación de la secreción de leptina por la placenta. Estudios inmunohistológicos muestran una tinción más intensa en el STB en comparación con el CTB (34). Además, forskolina (35), retinoides (36), insulina, glucocorticoides, AMPc (37) y la tensión de oxígeno (38) mostraron un efecto estimulador sobre la secreción de leptina en líneas celulares de coriocarcinoma y/o en células purificadas de trofoblasto humano.

Los resultados expuestos en este trabajo indican que IL-1 α , IL-6, hCG, pregnenolona y E2 son reguladores positivos de la secreción de leptina por el trofoblasto humano. En cambio colesterol, TNF- α y M-CSF no provocaron cambio alguno en la secreción de esta proteína.

32 Hardie L, Trayhum P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 101-6.

33 Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Non-adipose tissue production of leptin; leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997; 3:1029-1033.

34 Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM and Lea RG. Placental leptin. *Rev Reprod* 2000, 5: 18-24.

35 Yura S, Sagawa N, Ogawa Y ET AL. Augmentation Of leptin sintesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 3609- 3614.

36 Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, Evain-Brion D. Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2550-2555.

37 Coya R, Gualillo O, Pineda J, Garcia MC, Busturia MA, Aniel- Quiroga A, Martul P, Senaris RM. Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast. *Biol Reprod*. 2001; 65:814-819.

38 Grosfeld A, Turban S, André J et al. Transcriptional effect of hypoxia on placenta leptin. *FEBS Letters* 2001, 502: 122-126.

Muchas citoquinas han sido involucradas en la regulación de la producción de leptina en otros tejidos (39). Por otro lado el efecto de IL-1 α y IL-6 parecerían ser específicos, dado que las otras citoquinas ensayadas no mostraron efecto alguno. El sistema IL-1/ IL-6 está presente en la interfase materno/ fetal y está claramente involucrado en los procesos de implantación y placentación (40). Dado que se conoce que IL-1 y IL-6 son actores fundamentales en una de las vías de estimulación de la secreción de hCG por el trofoblasto (41), y que la leptina mostró un efecto estimulador sobre la secreción de hCG, resulta lógico esperar un efecto estimulador de estas citoquinas sobre la secreción de leptina.

Considerando también el efecto estimulador observado en la secreción de leptina, por el tratamiento con hCG, podría pensarse que existe en la placenta un juego auto- estimulador en el que participan leptina, hCG y el sistema IL-1/ IL-6 que asegura la producción de hCG. Es importante considerar que el trofoblasto de primer trimestre, mayor productor de hCG, muestra una mayor sensibilidad a esta regulación.

El estradiol juega un papel en la regulación del crecimiento fetal (42), del inicio del parto (43), de la esteroidogénesis en la placenta (44), de la liberación de neuropéptidos (45), y de glicoproteínas (44), y de la secreción de leptina

39 Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S and Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1997, 13: 231- 259.

40 Simón C, Frances A, Piquette G et al. Interleukin-1 system in the materno- trophoblast unit implantation: immunohistochemical evidence for autocrine/ paracrine function. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78: 847- 854.

41 Masuhiro K, Matsuzaki N, Nishino E et al. Trophoblast- derived interleukin-1 (IL-1) stimulates the release of human chorionic gonadotropin by activating IL-6 and IL-6- receptor system in first trimester human trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991, 72: 594- 601.

42 Abdul-Karim RW, Nesbitt REL, Druck MH and Rizk PT. The regulatory effects of oestrogens on fetal growth. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 109: 656- 662.

43 Chibbar R, Wong S, Miller FD and Mitchell BF. Estrogen stimulates oxytocin gene expression in human chorio- deciduas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 80: 567- 572.

44 Petraglia F, de Micheroux AA, Florio P et al. Steroid- protein interaction in the human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995, 53: 227- 231.

45 Petraglia F, Vaughan J and Vale W. Steroids hormones modulate the release of immunoreactive gonadotropin- releasing hormone from cultured human placental cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 5114- 5117.

(46). El mecanismo exacto de la acción del estradiol en la placenta es aún tema de debate. Nuestros resultados mostraron un efecto estimulador del estradiol sobre la secreción de leptina en la placenta, a una concentración de estradiol (1×10^{-7} / 1×10^{-9} M) no lejana a su concentración fisiológica durante la preñez (30-50 nmol/l) (47). Estos resultados coinciden con resultados *in vivo* que muestran una correlación entre los niveles de leptina y de estradiol circulantes durante el embarazo (48).

Dado el efecto inhibitorio de la leptina sobre la secreción de progesterona, no parece raro el efecto estimulador de la pregnenolona sobre la producción de leptina por el trofoblasto. Siendo la pregnenolona un intermediario en la síntesis de progesterona, podría existir una auto-regulación negativa en la producción de progesterona mediada, al menos parcialmente, por leptina. Deben realizarse más investigaciones para poder comprender este mecanismo, como por ejemplo analizar el efecto directo de la progesterona sobre la síntesis de leptina.

Estos resultados sugieren que IL-1, IL-6, E2, hCG y pregnenolona son estimuladores de la producción de leptina en la placenta humana; no así TNF- α y M-CSF.

Las distintas isoformas del receptor de la leptina se expresan diferencialmente en distintos tejidos. En algunos casos, como en placenta de rata, se encontró una expresión diferencial de las mismas de acuerdo a momentos o situaciones particulares, como puede ser el período del embarazo

46 Sivan E, Whittaker PG, Sinha D et al. Lepton in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. Am J Obstet Gynecol 1998, 179: 1128- 1132.

47 Tulchinsky D, Hobel CJ, Yeager E and Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. Am J Obstet Gynecol 1972, 112: 1095- 1100.

48 Hardie L, Trayhum P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. Clinical Endocrinology 1997; 47: 101-6.

o la localización en el tejido (49). Algunos trabajos muestran por técnicas inmunohistoquímicas y de RT-PCR la presencia de distintas isoformas del receptor de la leptina en la placenta humana (50, 51). Sin embargo, ningún trabajo, hasta el momento, identificó los pesos moleculares de las proteínas correspondientes a esos receptores en este tejido. Por ensayos de Western blot con un anticuerpo específico para el receptor de la leptina en conjunto con ensayos de inmunoprecipitación con leptina recombinante, hemos encontrado la presencia de dos isoformas de este receptor. Hemos demostrado la expresión de un receptor de leptina de un peso aproximado de 187 KDa y otra de menor peso, 28 KDa. El peso molecular más bajo parece ser demasiado chico como para corresponder a alguna de las isoformas del receptor de la leptina, ya sea una de las formas intermedias o una de las formas conteniendo solamente el dominio extracelular que pueden actuar como transportadoras. Sin embargo, otros trabajos muestran la existencia de isoformas similarmente pequeñas, proponiendo que podrían ser productos de proteólisis de las isoformas más cortas (50).

Si bien más investigaciones deben realizarse para estudiar la función de cada una de las isoformas de este receptor, encontradas en la placenta, es importante la presencia de una forma corta de este receptor en este tejido. Variaciones en la expresión de isoformas cortas de este receptor y, posiblemente, su actividad como proteínas ligadoras de leptina, han sido relacionadas con diferentes patologías reproductivas (52, 53).

Estos resultados se obtuvieron con tejido de embarazo a término; sería interesante estudiar la variación de la expresión de las distintas isoformas de

49 Smith JT and Waddell BJ. Leptin receptor expression in the rat placenta: changes in Ob-Ra, Ob-Rb, and Ob-Re with gestational age and suppression by glucocorticoids. *Biol Reprod* 2002, 67: 1204- 1210.

50 Henson MC, Swan KF, O'Neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 1998; 92:1020-1028.

51 Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L et al. Placental leptin. *Rev Reprod* 2000, 5: 18- 24.

52 Laird SM, Quinton ND, Anstie B Li TC and Blakermore AIF. Leptin and leptin- binding activity in women with recurrent miscarriage: correlation with pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2001, 9: 2008- 2013.

53 Lewandowski K, Horn R, O' Callaghan CJ et al. Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 300- 306.

este receptor, en el trofoblasto, a lo largo de toda la preñez. La expresión diferencial de las distintas isoformas podría ser un punto importante de regulación de la respuesta a esta proteína.

Nuestros resultados muestran la presencia de dos isoformas distintas del receptor de la leptina en trofoblasto de embarazo a término.

Algunas patologías reproductivas -como pre-eclampsia, aborto recurrente, retraso de crecimiento intrauterino, diabetes, síndrome de ovario poliquístico, endometriosis-, han sido relacionadas con alteraciones en los niveles de leptina presentes en circulación (54) y, en muchos casos, particularmente con los niveles de su expresión en la placenta (55, 56). Estudios recientes sugieren que bajas concentraciones de leptina durante el embarazo estarían asociadas a resultados sub-óptimos de preñez (52).

Entre el 1-2% de las mujeres en edad reproductiva sufren abortos recurrentes, asociados a condiciones tales como anomalías cromosómicas, desordenes endocrinológicos, alteraciones uterinas, síndrome anti-fosfolípidos. Sin embargo, solamente en el 50% de los casos se puede identificar su causa entre una de las categorías anteriormente mencionadas. Muchos de los casos podrían estar asociados a un desarrollo anormal de la unidad feto/placentaria (56).

Dada la expresión de leptina y su receptor, en estadios muy tempranos de la gestación, tanto en el embrión (57) como en el endometrio (58),

54 Lea RG, Hannah L, Blades J, Howe D and Hoggard N. Placental leptin in normal and abnormal pregnancies. J Rep Fertl Abs Series 1998; 21:Abstract 41.

55 Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. J Clin Endoc Metab 1998; 83: 3225-3229.

56 Linnemann K, Malek A, Schneider H and Fusch C. Physiological and pathological regulation of feto/placento/maternal leptin expression. Biochem Soc Tran 2001, 29, part 2.

57 Kawamura K, Sato N, Fukuda J et al. Leptin Promotes the Development of Mouse Preimplantation Embryos in Vitro. Endocrinology 2002, 143: 1922-193.

alteraciones en sus niveles podrían ser una de las causas de aborto, aún no identificadas.

Si bien nuestros resultados deben ser completados con un mayor número de pacientes, es importante remarcar que el bajo nivel de leptina encontrado en el grupo de pacientes RSA, fue significativamente distinto a los valores de controles presentados por distintos autores.

Los valores de concentración de leptina encontrados en los sueros de pacientes con amenaza de aborto o aborto en curso, no nos permiten concluir si esta proteína puede estar relacionada con el desarrollo de dichas situaciones.

Estos resultados apoyan la hipótesis que alteraciones en la expresión, concentración o funcionalidad de la leptina podrían ser causa de patologías reproductivas. Particularmente indican que dentro del grupo de pacientes abortadoras recurrentes espontáneas (RSA) podrían existir un sub-grupo cuya causa de aborto esté relacionada con los bajos niveles de leptina.

58 Gonzalez RR, Caballero- Campo P, Jasper M et al. Leptin and Leptin Receptor Are Expressed in the Human Endometrium and Endometrial Leptin Secretion Is Regulated by the Human Blastocyst. J Clin Endocrinol Metab 2000, 85: 4883–4888.

CONCLUSIONES

La leptina, proteína que originalmente se creía exclusiva de tejido adiposo, cumple, durante el embarazo, funciones moduladoras en la fisiología de la unidad feto-placentaria.

Hemos demostrado que esta proteína:

- es secretada por el trofoblasto humano durante toda la preñez.*
- estimula la secreción de hCG y IL-6 en este tejido.*
- inhibe la secreción de progesterona.*
- su producción es estimulada por IL-1, IL-6, hCG, E2 y pregnenolona; por el contrario, no es alterada por colesterol, TNF- α y M-CSF.*
- su receptor es expresado en dos isoformas distintas en el trofoblasto de embarazo a término.*
- Alteraciones en su concentración en circulación puede ser una de las causas de los abortos recurrentes espontáneos.*

Durante el embarazo la leptina pasa a cumplir un rol diferente a la regulación del balance energético que cumple fuera de este período.

Nuestros resultados apoyan claramente la hipótesis que la leptina tiene efectos sobre la funcionalidad de la unidad feto-placentaria humana, si bien aún se debe completar el conocimiento del mecanismo de acción. Dado que existen

Conclusión

ya varios trabajos proponiendo una relación importante entre la expresión de dicha proteína y su receptor y varias patologías reproductivas, estos estudios podrían ayudar a esclarecer la causa y tal vez corregir algunas de estas patologías.

Contestando a la pregunta planteada desde el título de esta tesis, podríamos decir que la leptina sería, efectivamente, una nueva hormona placentaria.

"Behind every healthy baby is a healthy placenta".

Just as the rings of a cut tree can tell the story of the tree's life, so too the placenta can disclose the history of the pregnancy. In cases of poor pregnancy outcome, microscopic examination of the placenta often reveals the stresses that caused the fetal damage observed in an affected newborn."

**Dr. H. Kliman (Universidad de Yale, Escuela de Medicina)
<http://info.med.yale.edu/obgyn/kliman/Placenta/behind.html>**

- REACTIVOS (se especifican únicamente los reactivos que consideramos importante saber la marca y calidad utilizada en este proyecto, para obtener la misma eficiencia y respuesta)
 - 10x Bicarbonate free Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). GibcoBRL Cat.14060-024
 - Ca-Mg free HBSS
 - Antibiotic- Antimitotic 100x (Penicillin G sodium, Streptomycin sulfate and Amphotericin B). GibcoBRL Cat.15240-062
 - Percoll. Pharmacia N°17-0891-01
 - Tripsina 1:250 25g. Difco Nr.015131
 - Deoxyribonuclease I. Sigma D-5025
 - Suero Fetal Bovino (SFB)- Gibco BRL Cat.1058596
 - MESH (filtro de nylon) 100µm
 - Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), alta glucosa. Gibco BRL Cat.23700-024
 - Monoclonal Mouse Anti-Human Leucocyte Common Antigen (LCA-CD45). DAKO N°M0701
 - DYNABEADS M-280. Sheep Anti- mouse IgG. Dynal N°11201
 - Magnetic Particle Concentrator. Dynal MPC-1 N°12001
 - WST-1. Roche
 - TNF-α. R&D System
 - Recombinant Human Leptin (rh-Leptin). R&D System
 - Anticuerpo anti leptina humana; contra dominio amino terminal del producto del gen ob. Santa Cruz Ob (Y-20) sc-843
 - Anticuerpo anti R-Ob; dirigido contra los aminoácidos 541- 840, correspondientes al dominio interno del receptor. Santa Cruz Ob-R (H-300) sc-8325
 - RNAlater Ambion
 - Access RT-PCR System. Promega
 - Hybond-C Extra. Amersham Life SCIENCE Inc.
 - RIA COAT-A-COUNT Progesterona
 - RIA COAT-A-COUNT Estradiol
 - IRMA COAT-A-COUNT Leptin
 - IRMA COAT-A-COUNT hCG

- ELISA Quantikinine human IL-6. R&D System
 - ECL Kit, Amersham Life SCIENCE Inc.
 - Proteína A. Sigma
-
- SOLUCIONES (se aclara únicamente la composición de las soluciones específicas de este trabajo)

Tripsina 5%

5g tripsina 1:250 Difco

100ml HBSS 1x

Disolver a 37°C

Filtrar con papel tipo Whatmann

Esterilizar por filtrado (0.22µm)

Cocktail de Tripsina (300ml):

15ml Tripsina 5%

1.3ml MgSO₄ 1M

7.5ml Hepes 1M

3ml Ab 100x

15.000 U DNasa

HBSS 1x hasta 300ml

Percoll 90%

36ml Percoll 100%

4ml HBSS 10x

Buffer de lisis A

Tris 20mM

NaCl 137 mM

KCl 27 mM

CaCl₂ 1mM

Glicerol 10%

Igepal 1%

Aprotinina 2 $\mu\text{g/ml}$

Leupeptina 2 $\mu\text{g/ml}$

Pepstatina 5 $\mu\text{g/ml}$

Benzamidina 1 mM

AEBSF 1 mM

Bibliografía

Aclaración:

Con el objeto de simplificar la consulta al lector, la bibliografía utilizada se citó en la misma página del texto, a medida que se fueron mencionando. Por esto algunas publicaciones se citaron más de una vez,.

Camés

PAULA CAMEO


DR. JUAN CARLOS CALVO
PROFESOR ADJUNTO
DPTO. QUIMICA BIOLOGICA
F.C.E. y N. - U.B.A.