

Tesis Doctoral

Regulación de la expresión de leptina y su acción en células placentarias

Maymó, Julieta L.

2010

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:

Maymó, Julieta L.. (2010). Regulación de la expresión de leptina y su acción en células placentarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maymó, Julieta L.. "Regulación de la expresión de leptina y su acción en células placentarias". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA Y SU ACCIÓN EN CÉLULAS PLACENTARIAS

Tesis presentada para optar al título de

Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

LIC. JULIETA L. MAYMÓ

Directora: Dra. Cecilia L. Varone

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Molecular Placentaria.
Departamento de Química Biológica.
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, diciembre 2010

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA Y SU ACCIÓN EN CÉLULAS PLACENTARIAS

RESUMEN

Conocida inicialmente como la “hormona de la gordura” por su asociación con la saciedad y el balance energético del organismo, la leptina, una proteína de 16 kDa, también es reconocida actualmente por el papel fundamental que posee en la biología reproductiva.

La expresión de la leptina y de sus receptores, descubierta originalmente en tejido adiposo, se ha evidenciado en otros tejidos tales como placenta, en donde la síntesis de leptina es altamente regulada. Los niveles de leptina aumentan tempranamente durante la gestación, aún antes de que se incremente el tejido adiposo, sugiriendo que existen otros factores que modulan su producción. Sin embargo, los mecanismos de acción de la leptina sobre la implantación y el crecimiento embrionario son aún desconocidos.

El presente trabajo ha sido desarrollado con el objeto de estudiar las vías de transducción de señales activadas por leptina en placenta y para elucidar los mecanismos que median el efecto antiapoptótico de leptina. Más aún, dado que la leptina sería importante en la supervivencia celular y en el mantenimiento de la placenta, analizamos la regulación de la expresión de leptina en placenta por la hormona gonadotrofina coriónica y por AMPc. Se utilizaron como modelo las líneas celulares trofoblásticas JEG-3 y BeWo, y explantos de placenta humana a término. Demostramos que la unión de la leptina a su receptor causa la estimulación de las vías de señalización de JAK/STAT, MAPK, p38MAPK y PI3K. Asimismo, hallamos que la leptina cumple una función antiapoptótica en células trofoblásticas y que ejerce dicha función principalmente a través de la vía de MAPK. Cuando estudiamos la regulación de la expresión de leptina, los resultados mostraron que la hCG, una hormona esencial del embarazo, estimula la transcripción y la síntesis de leptina en placenta. Contrario a lo esperado, el AMPc inhibió la inducción de leptina por hCG. El efecto de hCG sobre leptina parece estar mediado por la vía de MAPK. Observamos que el AMPc estimula la expresión de leptina en placenta y que el nucleótido

es capaz de activar no sólo la vía de señalización de PKA sino también la de MAPK. En este sentido, demostramos que la acción inductora del AMPc sobre leptina estaría mediada por un entrecruzamiento entre dichas vías.

En síntesis, los resultados obtenidos contribuyen a esclarecer el modo de acción de la leptina en placenta así como los mecanismos de regulación de la expresión de la proteína, y sustentan la importancia de la leptina en la biología de la reproducción.

PALABRAS CLAVE: Leptina, placenta, implantación, vías de señalización, apoptosis, hCG, AMPc, PKA, MAPK.

REGULATION OF LEPTIN EXPRESSION AND ITS ACTION IN PLACENTAL CELLS

ABSTRACT

Leptin is a 16000 MW protein product of the obese gene, originally considered as an adipocyte-derived signaling molecule for the central control of metabolism. However, leptin has been suggested to be involved in other functions during pregnancy, particularly in placenta, where it was found to be expressed. Leptin levels rise early in pregnancy, even before the augmentation of adipose tissue, suggesting that others factors modulate its production. The mechanism of leptin action in implantation and fetal development remains unknown. In the present work we aimed to study the signal transduction pathways activated by leptin in placenta and to elucidate the mechanisms that mediate the antiapoptotic effect of leptin. Moreover, since leptin could be important in trophoblastic cell survival, and therefore in maintenance of the placenta, we attempted to study the regulation of leptin expression in placenta. BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cell lines, as well as trophoblastic cells from human placenta explants were used. We determined that both models of work express leptin and leptin receptor. We have found that leptin stimulates JAK-STAT, MAPK and PI3K signaling pathways. We demonstrated that leptin has an antiapoptotic effect in placental cells and this effect is mediated mainly by the MAPK pathway. We have also found that hCG added to BeWo cells showed a stimulatory effect on leptin expression and transcription. Similar results were obtained with placental explants thus evidencing physiological relevance. We found that dbcAMP counteracted hCG effect on leptin expression. Moreover, hCG effect on leptin is mediated by the MAPK pathway. We showed that cAMP stimulates leptin expression in placental cells. More interestingly, we demonstrated that the cAMP effect on leptin expression probably involves both the PKA classic signaling pathway and the MAPK signal transduction pathway. A cross talk between these pathways would be responsible for the observed effects.

In summary, our results will lead to a better understanding of the regulatory mechanisms of leptin expression by human placental trophoblasts and further support the importance of leptin in the biology of reproduction

KEY WORDS: Leptin, placenta, implantation, signal transduction pathways, apoptosis, cAMP, hCG, PKA, MAPK

Los resultados que se incluyen en la presente Tesis fueron publicados parcialmente en:

- “Leptin prevents apoptosis of trophoblastic cells by activation of MAPK pathway”
Antonio Pérez-Pérez, Julieta Maymó, José L. Dueñas, Raimundo Goberna, Juan Carlos Calvo, Cecilia Varone and Víctor Sánchez-Margalet. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2008. June; 477: 390–395.
- “Upregulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin”
Julieta L. Maymó, Antonio Pérez Pérez, Víctor Sánchez-Margalet, José L. Dueñas, Juan Carlos Calvo and Cecilia L. Varone. Endocrinology. 2009 Jan; 150 (1):304-13.
Epub 2008 Sep 11.
- “Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells”
Antonio Pérez-Pérez, Julieta Maymó, Yésica Gambino, José Luis Dueñas, Ramón Goberna, Cecilia Varone and Víctor Sánchez-Margalet. Biol Reprod 2009. 81:826–832
- “Regulation of placental leptin expression by cAMP involves cross talk between PKA and MAPK signaling pathways”
Julieta L. Maymó, Antonio Pérez Pérez, José L. Dueñas, Juan Carlos Calvo, Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia L. Varone. Endocrinology. 2010 May; 151:3738-3751.
- Review: “Leptin gene expression in the placenta - Regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival”
Julieta L. Maymó, Antonio Pérez-Pérez, Yésica P. Gambino, Juan C. Calvo, Víctor Sánchez-Margalet and Cecilia L. Varone. Placenta. 2011, doi:10.1016/j.placenta.2011.01.004. En Prensa.

Agradecimientos:

La parte más difícil de la Tesis...lograr con palabras que todos y cada uno de los que nombro sientan realmente lo agradecida que estoy por haberme ayudado a llegar hasta acá. Intentaré entonces hacerles saber todo lo que les debo, aunque sea insuficiente en lo que quiero demostrar.

En primer lugar quisiera agradecer a la **Facultad de Ciencias Exactas** y a la **Universidad de Buenos Aires** por haberme permitido desarrollar mis tareas experimentales en ella. Al **Departamento de Química Biológica** por aceptarme entre sus integrantes y brindarme el equipamiento y la atención necesaria para mi trabajo. Agradecer especialmente al **CONICET** por mis becas de Postgrado de Tipo I y II con las cuales me fue posible sustentar mi trabajo doctoral.

A **Ceci**, porque supo ser la Directora y Jefa que todos quisieran tener. Por estar siempre, por guiarme, aconsejarme, impulsarme. Por su fuerza y su dulzura, por su optimismo y su comprensión. Gracias por enseñarme también que “no todo es ciencia”. Por ser además de mi jefa, una amiga, y hasta incluso a veces, como alguien dijo, como una madre.

A **JC** por su apoyo incondicional. Por su bondad infinita y su buen humor imperturbable. Por transmitirme paz en momentos de intranquilidad. Por hacerme creer en las buenas intenciones.

A los chicos del labo. A **Vani**, que está conmigo desde que entré al laboratorio y siempre estuvo ahí cuando la necesité. Por prestarme una oreja en el día a día. Por ser una gran amiga y consejera de vida. A **Yesi**, mi compañera en el “Lep Team”, una trabajadora incansable que tantas veces “me salvó las papas” y a la que admiro por su enorme empeño. A **Fede**, el otro integrante del “Lep Team”, que supo traer mucha alegría al labo, y que es una gran persona. Para mí, ya un amigo, al que intentándole enseñar, terminé aprendiendo también de él. A **Meli**, esa personita muy valiosa y querible, que siempre me da ánimos diciendo “Juli es grosa”; porque con ella también gané una amiga impagable. Y a los chicos de enfrente, a **Lili, Pablo, Dai, Fran, María**. Algunos ya no están ahí, otros sí, pero de algún modo u otro me brindaron su ayuda y compartieron tardes de charlas y mates conmigo.

A los del otro lado del Océano. A los Sevillanos. A esas personas tan generosas que me permitieron realizar una gran parte de mi trabajo allá, me guiaron, me enseñaron y me hicieron sentir siempre como en casa. Gracias a **Antonio** por su ayuda constante, por su paciencia, su buen humor, por hacerme reír, por su apoyo, por integrarme a su vida española. A **Víctor**, mi otro gran jefe, que siempre estuvo presente para aconsejarme y ayudarme; una persona a la que admiro por su conocimiento y por su practicidad, y de la cual siempre aprendo algo. Gracias por aceptarme en tu laboratorio. Y a **Carmen, Flori, Patri, Patri L., Ketama**, todos constantemente dispuestos a ayudarme, sin dejar nunca la sonrisa de lado, haciendo que las distancias se acorten.

A los que empezaron siendo mis “amigos de la Facu” y después la vida los fue alejando de eso y pasaron a ser amigos de la vida. A **Vale, Fede** y **Carli**, que de un modo u otro siempre estuvieron y siempre fueron importantes para mí. Que entre idas y venidas, hoy afortunadamente, están ahí.

A **Mer**, que tanto compartimos en las largas charlas de gimnasio y que tanto aguante me hizo. Por dejarme ser una especie de “madrina” de su relación y ella serlo en la mía.

A las “pibas”, **Sabi, Pao** y **Naty**. Gracias por estar. Gracias por escucharme, por tenerme fe, por sus consejos y sus retos. Por ser las amigas en las que confío ciegamente. Gracias por los momentos de diversión y los de angustia. A **Baby** también, que aunque hoy esté alejada, nunca deja de estar presente.

A mis amigas de siempre, de toda la vida, **Sol, Vero, Paula** y **Pri**, a las que adoro y a las que agradezco por seguir estando ahí pase lo que pase. Por compartir casi toda una vida juntas. Por los abrazos con risas y los abrazos con llantos. Por el aguante

A **Caro**, mi hermana del alma, mi gran amiga, que compartió conmigo todas las emociones implicadas en esta Tesis. Por hacerme reír tanto y por escucharme. Por sus consejos, por sus palabras. Por ser ella.

A toda mi **familia** por acompañarme siempre. A **Margui** y a **Andrés**, los mejores padrinos que me pueden haber elegido. A **Lety** y **Tata**, mis abuelos de oro que siempre se preocupan por mí, me miman y me apoyan sin entender demasiado qué es lo hago. A mi **hermano**, por crecer conmigo y aguantarme lo cual muchas veces no es fácil.

A mi **Papá** y a mi **Mamá**, por su presencia constante, por tanto cariño y comprensión. Por su confianza y su protección. Por malcriarme. Porque es gracias a ellos que llegué hasta acá. Por deberles tanto. Por hacerme quien soy. Los quiero mucho.

Y a **Pato**, el Hombre de mi vida, al que conocí justo en el año en que comencé esta Tesis y al que por suerte todavía tengo a mi lado. Gracias por quererme y dejarme quererte tanto, por enseñarme, por necesitarme. Gracias por bancarme en mis momentos de malhumor y respetar mis silencios. Por tranquilizarme y acompañarme; por conocerme y cuidarme. Por cada momento que compartimos. Gracias por hacerme tan feliz.

A mis papás

ABREVIATURAS:

AC: adenilato ciclasa

ACC: acetil CoA carboxilasa

AIF: factor inductor de apoptosis

AMPc: adenosina-3',5'- monofosfato cíclica

AMPK: proteína quinasa activada por AMP 5'

AP-1: proteína activadora 1

AP-2: proteína activadora 2

APAF-1: factor activador de proteasas-1

ARE: elemento de receptor de andrógenos

BMI: índice de masa corporal

(Bu)₂AMPc: dibutilil adenosina-3',5'- monofosfato cíclica

CAAT/ C/EBP: proteína de unión a intensificador

CaMKs: proteína quinasa dependiente de Ca⁺²/ calmodulina

CKII: caseína quinasa II

CRE: elemento de respuesta a AMPc

CREB: proteína de unión a elemento de respuesta a AMPc

CTBs: citotrofoblastos

DMG: diabetes mellitus gestacional

E2F: factor involucrado en la regulación del ciclo celular

4E-BP1: proteína de unión al factor eIF-4E

ECM: proteínas de la matriz extracelular

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EIF-4E: factor de iniciación eucariótico 4E

Epac: proteína intercambiadora activada por AMPc

EPF: factor temprano de preñez

ER: receptor de estrógenos

ERE: elemento canónico palindrómico de respuesta a estrógenos

ERK: quinasa regulada por señalización extracelular

ETGs: enfermedades trofoblásticas gestacionales

FAST-1/SMAD: señal de transducción de la activina-1/ proteína relacionada a Sma- y Mad- 2

FSH: hormona folículo estimulante

GH: hormona de crecimiento

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas

GPCRs: receptores acoplados a proteína G.

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides

GSK-3: glicógeno sintetasa quinasa-3

GTDs: enfermedades trofoblásticas gestacionales

HCG: gonadotrofina coriónica humana

HIF-1: factor inducible por hipoxia 1

HRE: elemento de respuesta a hipoxia

IAPs: proteínas inhibidoras de apoptosis

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina

IGF-1: factor de crecimiento símil insulina 1

IGF-2: factor de crecimiento símil insulina 2

IGFBP: proteína de unión al IGF

IL-1: interleuquina 1

IL-1 α : interleuquina 1 α

IL-1 β : interleuquina 1 β

IL-4: interleuquina 4

IL-6: interleuquina 6

IL-7: interleuquina 7

IRE: elemento de respuesta a insulina

IRF1: factor de regulación por interferón 1

IRF7: factor de regulación por interferón 7

IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1

IUGR: restricción del crecimiento intrauterino

JAK: quinasa de la familia Janus

JNK: quinasa N-terminal c-jun.

LH: hormona luteinizante

LIF: factor inhibitorio de leucemia
MAPK: quinasa activada por mitógenos
MEC: matriz extracelular
MEKs: MAPK/ERK quinasas
MMP-9: metaloproteínasa de matriz 9
MMP-2: metaloproteínasa de matriz 2
NFkB50: NF-kappaB (p50)
NK: asesinos por naturaleza o “natural killers”
PDEs: fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos
PGE₂: prostaglandina E2
PI3K: fosfoinositol-3-quinasa
PKA: proteína quinasa A
PKC: proteína quinasa C
PKI: inhibidor de proteína quinasa
PKB/Akt: proteína kinasa B
PIF: factor de preimplantación
pp90rsk: proteínas s6 quinasas ribosomales 1-3
qPCR: PCR cuantitativa
Rap: GTPasa pequeña de tipo Ras.
RBPJK: represor transcripcional de mamíferos RBP-Jkappa/CBF1
RREB1: elemento de respuesta por unión de proteína Ras-1
RSK: quinasas ribosomales S6
SF1: factor esteroideogénico1
SFB: suero fetal bovino
SHP-2: proteín tirosín fosfatasa
SOCs: proteínas supresoras de la señalización por citoquinas
SP1: proteína estimulante 1
SRF: factor de respuesta a suero
STAT: proteína transductora de señales y activadora de la transcripción
STAT1: señal activadora y transductora de transcripción 1
STAT3: señal activadora y transductora de transcripción 3

STBs: sinciotrofbastos

TEF: factor tirotrófico embrionario

TGF- α : factor de crecimiento transformante α

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

TSH: hormona estimulante de tiroides

TTF1: sitio de unión de factor de transcripción de tiroides 1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	4
Agradecimientos:	7
ABREVIATURAS:	11
ÍNDICE	15
INTRODUCCIÓN	18
La implantación humana, un proceso único	18
El desarrollo del embrión	22
La placenta humana	24
Mediadores de la implantación y el crecimiento embrionario	28
Apoptosis y proliferación celular placentaria	33
Patologías asociadas al embarazo	37
Enfermedades trofoblásticas gestacionales (ETGs)	37
Preeclampsia	38
Diabetes Mellitus Gestacional	39
Restricción del crecimiento intrauterino (IUGR)	40
Leptina, una hormona reproductiva	41
Estructura	41
Síntesis y degradación	43
Ritmo circadiano de la leptina	45
Funciones biológicas de leptina	45
Leptina como regulador del peso y del apetito	46
Homeostasis de glucosa y sensibilidad a insulina	47
Leptina y remodelamiento óseo	48
La leptina como inmunomodulador	48
Funciones neuroendócrinas de la leptina	49
Otras funciones de la Leptina	50
Regulación de la expresión génica de leptina	51
El receptor de leptina y su señalización	53
	15

Principales vías de señalización de LEPR.....	56
Leptina y Reproducción.....	62
Leptina y pubertad.....	63
Función de la leptina en la fertilidad.....	64
La leptina y las gónadas.....	65
Leptina en el embarazo.....	66
Leptina en la implantación.....	70
Expresión y regulación de la leptina en placenta.....	71
Moléculas involucradas en la regulación de la expresión de leptina.....	73
La leptina y la gonadotropina coriónica humana.....	77
La leptina y el AMPc.....	80
Leptina, apoptosis y proliferación.....	82
Leptina y su relación con las patologías placentarias.....	84
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	87
OBJETIVO GENERAL.....	89
OBJETIVOS PARTICULARES.....	89
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
Cultivos celulares.....	90
Congelamiento de células.....	90
Determinación del número de células.....	90
Diseño de los tratamientos realizados en las líneas celulares.....	91
Obtención y procesamiento de los explantos de placenta.....	92
Tratamiento de los explantos de placenta.....	92
Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección.....	93
Preparación de bacterias competentes.....	94
Transformación de bacterias competentes.....	95
Minipreparación de plásmidos.....	95
Midipreparación de plásmidos.....	96
Electroforesis en gel de agarosa.....	96
Cuantificación de ácidos nucleicos:.....	97
Preparación de extractos celulares proteicos.....	97

Determinación de la concentración de proteínas	98
Geles desnaturalizantes de proteínas	98
Western-blot	98
Transfecciones transitorias	99
Preparación de los extractos celulares	101
Determinación de la actividad luciferasa.....	101
Determinación de la actividad β -galactosidasa	101
Extracción de ARN total.....	102
Retrotranscripción del ARN (Síntesis del ADNc).....	102
PCR cuantitativa.....	103
Análisis de las secuencias promotoras.....	103
Doble tinción FITC-Anexina V/IP	103
Medición del AMPc intracelular	104
Análisis estadístico	105
RESULTADOS y DISCUSIÓN	106
Sección I	106
Vías de señalización activadas por la leptina en placenta	106
Efectos antiapoptóticos de la leptina en placenta	118
Sección II.....	130
Regulación de la expresión de leptina y vías de señalización involucradas.....	130
Regulación de la expresión de leptina por hCG y vías de señalización involucradas.....	130
Regulación de la expresión de leptina por AMPc y vías de señalización involucradas.....	167
CONCLUSIONES	193
REFERENCIAS	201

INTRODUCCIÓN

La implantación humana, un proceso único

El fin esencial de la procreación es diversificarse y pasar a sus descendientes material genético. Así, los mamíferos vivíparos se han adaptado a un sistema reproductivo complejo y altamente regulado (1). El proceso de implantación en el humano, es único y representa una paradoja biológica. En este sentido, es aún un misterio cómo las células trofoectodérmicas del blastocisto y las células epiteliales del endometrio contactan a través de sus membranas apicales (las membranas apicales de las células epiteliales rechazan normalmente otras moléculas de adhesión) (2).

El establecimiento de una íntima conexión entre la madre y el embrión es una característica propia de los mamíferos. La implantación representa una nueva estrategia de reproducción que permite el desarrollo de un pequeño número de embriones en un organismo materno protector. Esto se hizo posible con la aparición de un útero funcional. Sin embargo, aunque la viviparidad es una ventaja evolutiva, presenta una importante limitación: la absoluta necesidad de sincronización entre el desarrollo uterino y embrionario. El útero de prácticamente todos los mamíferos está preparado para la implantación sólo durante un limitado período de tiempo llamado “ventana de implantación”. Antes o después de ese período, el útero resulta o bien indiferente o bien hostil al embrión (3). Así, la interacción recíproca entre el blastocisto y el útero materno da inicio al proceso de implantación, en donde el sistema vascular del embrión entra en comunicación funcional con la circulación materna derivando en el establecimiento de una placenta funcional y en el embarazo (4).

El endometrio es remodelado a través del ciclo menstrual. Atraviesa cambios cíclicos característicos de proliferación y secreción, y sin la implantación embrionaria, se degrada y ocurre el sangrado menstrual. El endometrio uterino por tanto es el prerrequisito anatómico para la continuación de nuestra especie y el principal objetivo durante la edad reproductiva es recibir, nutrir y proteger al blastocisto que se implanta (5). Durante un ciclo normal, el embrión humano ingresa en la cavidad uterina 4 días después de la ovulación

(6). El endometrio se vuelve receptivo a la implantación del blastocisto entre 6-8 días luego de la ovulación y permanece receptivo por 4 días (días del ciclo 20-24) (7). El proceso de implantación comienza 6 o 7 días después de la fertilización (8) y en base a los estudios en el mono Rhesus, se piensa que involucra principalmente tres estados: aposición, adhesión e invasión. Previo a la implantación, el blastocisto muestra evidencias de polaridad, asumiendo una particular orientación a medida que se aproxima al endometrio. Una vez que se orienta correctamente (aposición) la zona pelúcida se pierde. El blastocisto entra en contacto con la capa epitelial y se adhiere a la superficie endometrial (adhesión) (Figura 1). Finalmente, el blastocisto penetra en la capa epitelial e invade el estroma (invasión) (9).

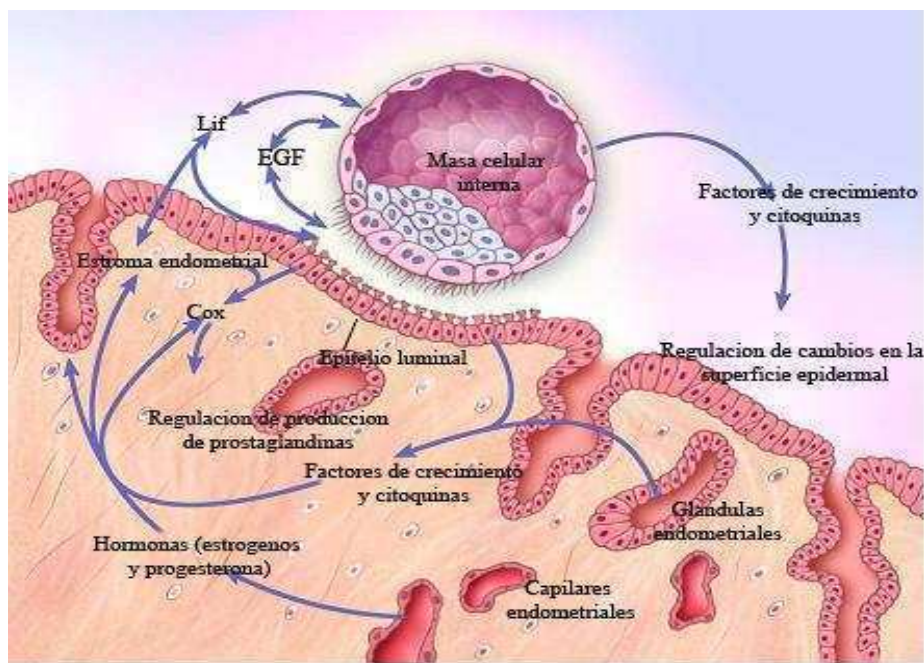


FIGURA 1. Aposición y adhesión del blastocisto. El diagrama muestra el estadio preimplantatorio del blastocisto (6 a 7 días luego de la concepción) y los procesos necesarios para la receptividad uterina y la aposición y adhesión del blastocisto. Modificado de Norwitz y cols. 2001 (10)

La implantación puede ser superficial o intersticial de acuerdo con la extensión de penetración del blastocisto en el endometrio. Puede ser lateral, mesometrial o

antimesometrial de acuerdo a la orientación del embrión en la cavidad uterina. En los humanos, la implantación es intersticial y antimesométrica: el embrión se implanta profundamente en el cuerpo del útero, más frecuentemente en la parte superior de la pared. Durante la aposición, no se establecen conexiones visibles entre el blastocisto y el endometrio, y el blastocisto puede ser desprendido por un simple lavado de la cavidad uterina. En la adhesión se establecen conexiones funcionales pese a que la naturaleza de estas conexiones es aún muy especulativa (11). Aumenta el contacto físico entre el blastocisto y el epitelio del útero, mientras que el polo embrionario se orienta hacia el epitelio. El último estado que es el proceso de invasión (Figura 2) comienza con la penetración del sinciciotrofoblasto a través del epitelio uterino y continúa con la infiltración de los citotrofbastos mononucleares invadiendo el endometrio, el miometrio y la vasculatura uterina (12).

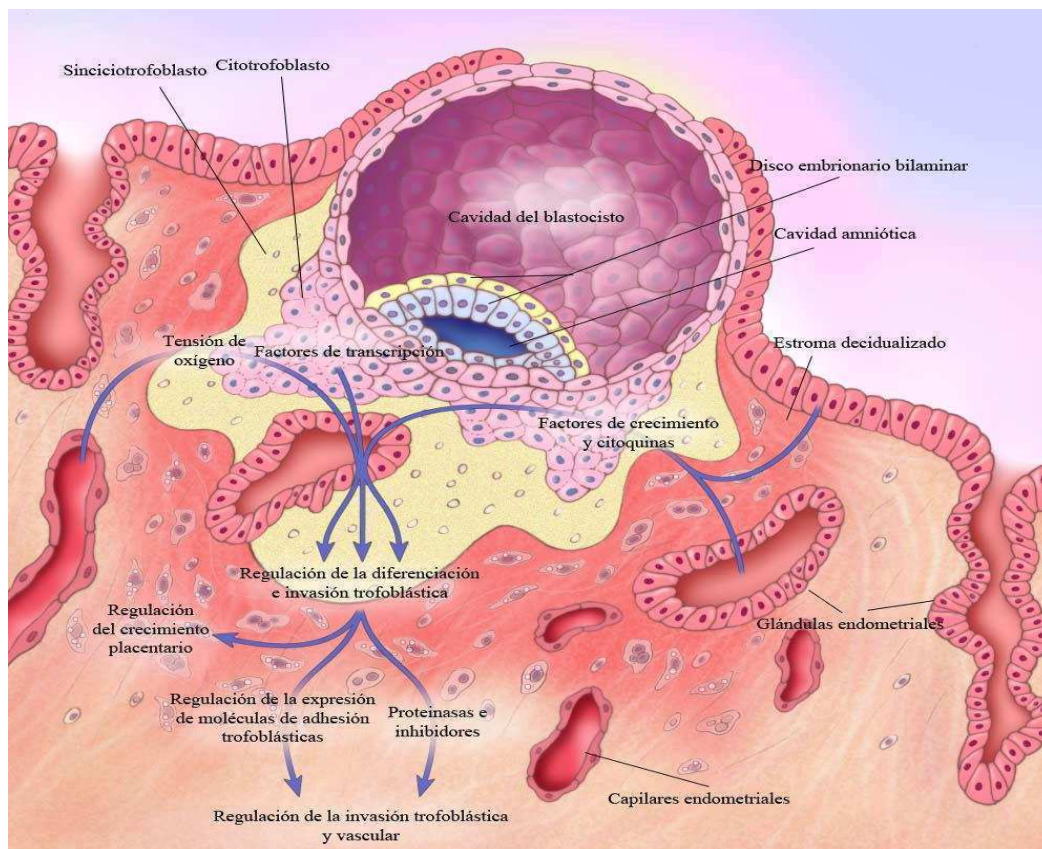


FIGURA 2. Implantación del blastocisto. El diagrama muestra un blastocisto invadiendo (9-10 días luego de la concepción) y el proceso necesario para la invasión trofoblástica. Modificado de Norwitz y cols., 2001 (10).

Los eventos de la unión del embrión al epitelio del endometrio y la subsiguiente invasión del estroma aún no se comprenden completamente. Para proteger a la madre del ataque de los trofoblastos invasivos que migran hacia las arterias espirales uterinas, las células estromales del endometrio sufren una transformación en una densa matriz celular conocida como decidua. Las deciduas obstruyen el movimiento de los trofoblastos formando una barrera física a la penetración de las células y generando un ambiente local de moléculas biológicamente activas, incluyendo citoquinas, que promueven la fijación de los trofoblastos más que la invasión (13). La información de las citoquinas es compleja y frecuentemente contradictoria, sin embargo son reconocidas por desempeñar un rol fundamental en establecer un embarazo exitoso (14).

En la implantación el embrión penetra en los tejidos del endometrio y es rodeado por vasos sanguíneos rotos y por la sangre llena de nutrientes que escapa de ellos; en este momento, la sangre materna entra en contacto directo con el trofoblasto embrionario. Una vez implantado firmemente en el endometrio, el embrión comienza a crecer y expandirse (Figura 3) (2).

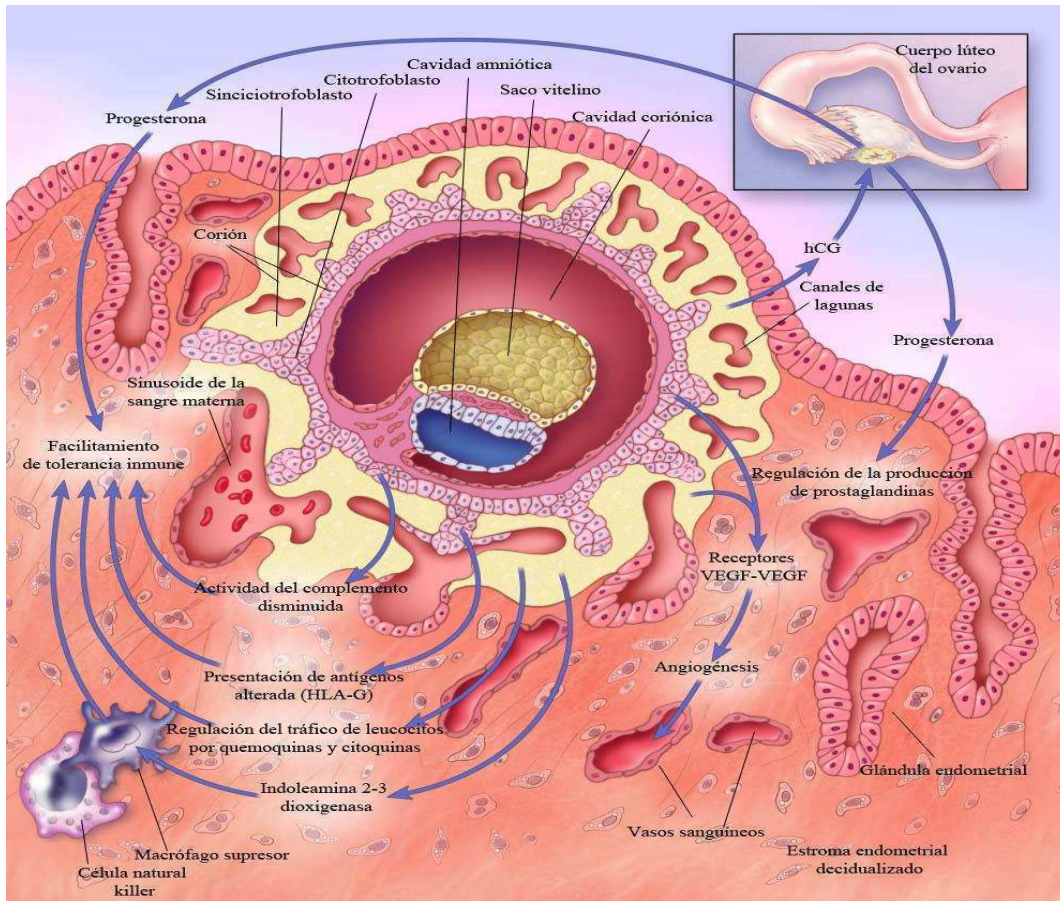


FIGURA 3. Mantenimiento del embarazo temprano. El diagrama representa el embrión implantado, aproximadamente 14 días luego de la concepción, y los procesos necesarios para el mantenimiento del embarazo temprano. Modificado de Norwitz y cols., 2001 (10)

El desarrollo del embrión

Con el fin de alcanzar un embarazo exitoso se requieren dos condiciones indispensables: durante los 4 o 5 días de transporte a lo largo de las trompas de Falopio, el embrión debe sufrir una serie de complejos procesos de maduración y al mismo tiempo debe desarrollarse un endometrio receptivo. La fecundación se produce en el tercio superior de las trompas de Falopio y afecta primero al citoplasma de las células gaméticas y luego a sus núcleos. Con la fusión de los núcleos se origina el cigoto, que a continuación iniciará la lenta migración tubárica, durante la cual ocurre la segmentación del cigoto. En esta etapa del desarrollo embrionario, el huevo se divide por mitosis aumentando el número de células denominadas blastómeros (Figura 4). Hacia las 40-50 horas pueden reconocerse cuatro

blastómeros, y ocho, a las 60 horas. Las divisiones mitóticas de los blastómeros continúan a lo largo de todo el viaje tubárico, hasta originar la mórula, que comprende entre 16-32 células fetales, y luego al blastocisto (32-64 blastómeros) (10).

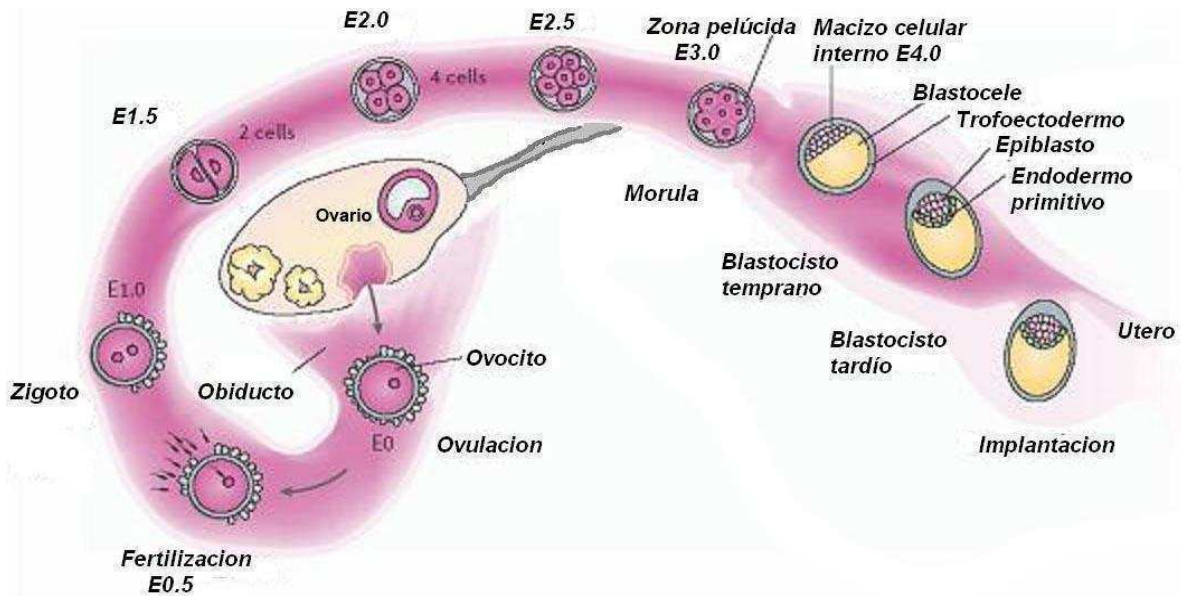


FIGURA 4. Estadios tempranos en el desarrollo del embrión humano desde la fertilización hasta la implantación. La fertilización ocurre en las trompas de Falopio entre las 24 a 48 h luego de la ovulación. Los estadios iniciales del desarrollo, desde el cigoto hasta la mórula, ocurren mientras el embrión atraviesa la trompa. Durante la migración la zona pelúcida evita la adhesión prematura del embrión al oviducto. La mórula entra a la cavidad uterina aproximadamente dos o tres días luego de la fertilización. La aparición del fluido que llena la cavidad interna marca la transición de mórula a blastocisto y es acompañado por diferenciación celular. El embrión se adhiere con su zona pelúcida una vez que alcanzó el útero

Cuando se forma la mórula se produce un aumento de tamaño, adoptándose la forma de una pelota. En el estadio de cuatro a ocho células, los blastómeros son distinguibles y el embrión no posee polaridad. Luego, cada blastómero interactúa con sus vecinos a través de moléculas de adhesión de la superficie celular, como E-cadherinas. Esta

interacción se conoce como compactación. Los blastómeros se diferencian en dos tipos celulares, uno interno y otro externo más numeroso que rodea al anterior. La mayoría de las células derivadas del grupo externo formarán el trofoblasto, del cual se desarrollarán la placenta y el cordón umbilical. Las células descendientes del grupo interno de la mórula generan la masa celular interna que originará el embrión (10, 15, 16). Los trofoblastos son las primeras células en diferenciarse en el embrión. Son derivadas del trofoectodermo del blastocisto en desarrollo. Estas células son esenciales para el mantenimiento de un embarazo exitoso, pues son ellas quienes se adhieren al útero y comienzan el proceso de implantación (17). Las células del trofoectodermo adquieren las características de células epiteliales, aplanándose y juntándose a través de complejos de uniones estrechas. Cuando el embrión alcanza unas 32 células, en un proceso llamado cavitación, la masa celular interna se posiciona sobre un lado del anillo, formado por las células trofoblásticas, y la capa trofoectodérmica secreta fluidos al espacio extracelular, formando una cavidad llamada blastocele, típica del blastocisto tardío. Es en este estadio, en donde el embrión alcanza la cavidad uterina, tres o cuatro días después de la ovulación (18). Durante el embarazo, los trofoblastos retienen una población de células madre de citotrofoblastos vellosos. La diferenciación de los trofoblastos en dos grandes líneas celulares, el sinciciotrofoblasto y el trofoblasto invasivo, continúa hasta el final del embarazo.

La placenta humana

El mantenimiento del embarazo temprano está inexorablemente vinculado con el crecimiento y diferenciación de la placenta. A medida que los mamíferos evolucionaron desde los pequeños roedores con cortos períodos gestacionales a animales de mayor tamaño con gestaciones prolongadas, la placenta ha debido adaptarse a las necesidades crecientes de los fetos en desarrollo. La placenta aumentó su tamaño y la superficie de contacto entre la circulación fetal y materna y adquirió funciones metabólicas, hormonales e inmunológicas especializadas (2). El fin último del desarrollo de la placenta es proporcionar al feto y a la misma placenta los nutrientes necesarios. Esto requiere un eficiente acceso de la sangre materna a una superficie transportadora, que en los primates es representada por el sinciciotrofoblasto vellosos. En los humanos, a diferencia de la mayoría

de la especie con implantación superficial, las adaptaciones iniciales maternas ocurren independientemente del embrión e incluyen secreciones epiteliales, desarrollo de arterias espirales y decidualización. Durante el embarazo temprano se requiere el rol activo del trofoblasto para aumentar el suministro de sangre materna a la placenta. Esto ocurre por invasión y remodelación de las arterias espirales (19).

Se conoce poco acerca de los mecanismos que normalmente regulan el desarrollo de la placenta humana en general y de la proliferación y diferenciación e invasión del citotrofoblasto en particular (20). El término “trofoblasto” fue introducido por primera vez por A.A.W.Hubrecht en 1899 para designar a aquellas células derivadas del blastocisto que no contribuyen al embrión pero que son esenciales para su desarrollo. La placenta, las membranas amnióticas y la decidua contienen diferentes subtipos de células trofoblásticas cumpliendo diversas funciones. Todos estos subtipos se diferencian de las células trofoectodérmicas del blastocisto (21). Los trofoblastos placentarios son críticos para un embarazo exitoso ya que median la implantación, la producción de hormonas de la preñez, la protección inmune del feto, el aumento de la irrigación materna sanguínea en la placenta, y el parto (22). Una vez que el blastocisto está implantado en el útero las células trofoectodérmicas (células madre epiteliales) cambian su nombre a citotrofoblastos (CTBs) (16). La manera en la que se diferencian estas células determina si las vellosidades coriónicas (unidades funcionales de la placenta), flotarán en el espacio intervilloso o anclarán al feto a la pared uterina (20). En el villi flotante, las CTBs se diferencian por fusión para formar el sinciotrofoblasto multinucleado cuyas funciones primarias – transporte y secreción– son idealmente cumplidas en su ubicación en la superficie vellosa. En el villi anclado, las CTBs también se fusionan pero muchas permanecen como células individuales que se desprenden de su membrana basal y se juntan para formar las columnas celulares (21). El embrión expresa una invasividad intrínseca que no está vinculada a la naturaleza celular o bioquímica del tejido invadido ni al estado hormonal del mismo. Observando el sitio de implantación entre las 10-12 semanas de embarazo, puede distinguirse el espacio intervilloso, ocupado por la sangre materna, y que baña las vellosidades coriónicas flotantes y de anclaje. Ambas presentan la misma estructura, con una capa externa de sinciotrofoblastos (STBs) cubierta por una monocapa de CTBs. Las vellosidades de anclaje están formadas por dos tipos de CTB: CTB vellosa (vCTB) y CTB

extravelloso (evCTB). Las primeras son células totipotenciales epiteliales, inmovilizadas, que terminan por diferenciarse en el sincicio, mientras que las evCTB se diferencian a células epiteliales móviles invasivas, no polarizadas (16). Las evCTBs permanecen como células individuales que se despegan de su membrana basal y se agregan para formar las columnas celulares de anclaje. Las células citotrofoblásticas en los extremos distales de estas columnas se pegan para luego invadir profundamente el útero y sus arteriolas. Como resultado de la invasión endovascular, las CTBs reemplazan las capas endoteliales y musculares de las arteriolas uterinas. Este proceso aumenta el diámetro de los vasos e inicia, al final del primer trimestre de embarazo, el flujo sanguíneo materno al espacio intervelloso y a la placenta. Las células citotrofoblásticas de las columnas de las vellosidades de anclaje poseen características únicas como: (1) invadir agresivamente la pared uterina, aunque su invasión está limitada al endometrio decidualizado y a la parte interna del miometrio; (2) proliferación restringida y altamente regulada durante la diferenciación a través del camino invasivo; (3) reemplazar el endotelio materno y una porción de la pared muscular lisa, creando una vasculatura híbrida (20)

Luego de tres días de la fertilización, los trofoblastos comienzan a sintetizar hCG, hormona que asegura que el endometrio sea receptivo al embrión que se implantará. En las siguientes semanas la placenta produce hormonas que controlan la fisiología básica de la madre en el sentido de proporcionarle al feto los nutrientes y el oxígeno necesarios para un crecimiento exitoso. La placenta también protege al feto del ataque inmune de la madre, remueve los productos de desecho del feto, asegura que la madre lleve más sangre a la placenta y cerca del momento del parto, produce hormonas que maduran los órganos fetales que se están preparando para la vida fuera del útero. Una vez firme en el endometrio, el feto en desarrollo crece y continúa expandiéndose dentro de él. Sin embargo, ya en la primera semana de gestación, las células embrionarias permanecen separadas de los tejidos maternos y de la sangre por una capa de células citotrofoblásticas y de sinciciotrofoblastos (10).

Pese al hecho de que el embrión posee sólo 2 cm de diámetro a las cuatro semanas, la estructura básica de la placenta madura ya ha sido formada (Figura 5). El villi coriónico cercano a la sangre materna continuará desarrollándose y expandiéndose hasta formar la masa de tejido coriónico identificado como la placenta. El villi coriónico más lejano del

aporte de sangre materna es lentamente empujado hacia la cavidad uterina expandiendo el saco amniótico que rodea al embrión. Este villi eventualmente degenera y forma la capa coriónica de las membranas externas. A las 20 semanas de gestación las membranas amnios-corion combinadas hacen contacto con el lado opuesto del útero, donde se fusionan con el endometrio decidualizado materno, formando las membranas externas completas consistentes en el amnios, el corion y la decidua (21-23). En el villi de la placenta humana y en todas las edades de gestación, siempre existe una población de citotrofbastos que permanece indiferenciado y disponible para diferenciarse si es necesario (22).

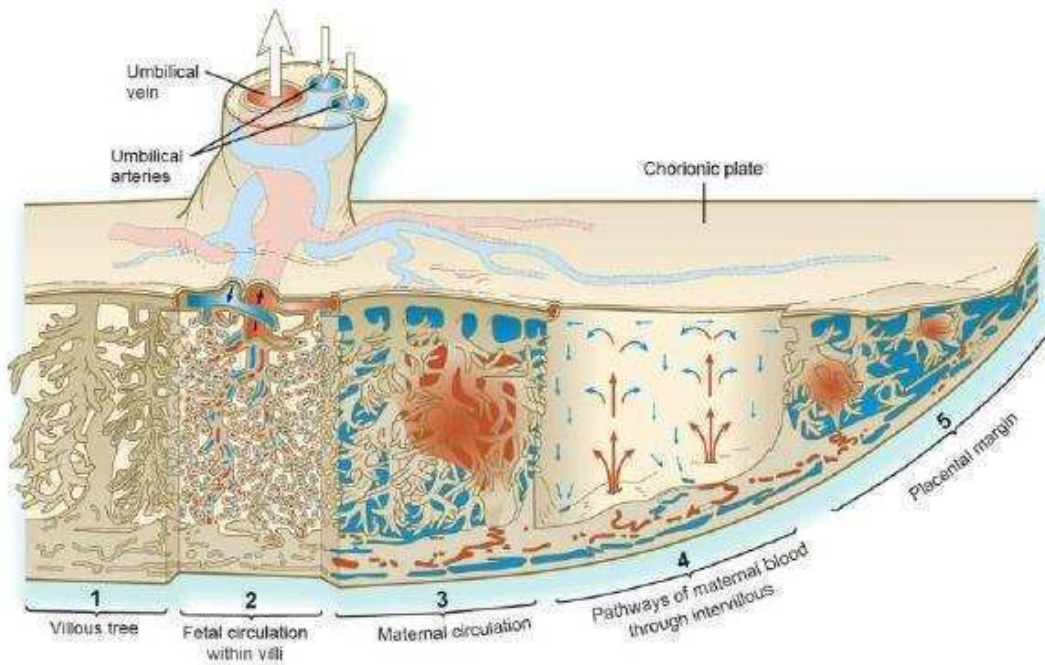


FIGURA 5. Estructura básica de la placenta.

En función de la penetración del corion dentro de la mucosa del útero las placentas pueden clasificarse en cuatro categorías: hemocorial (roedores, humanos y primates subhumanos), en la que el corion penetra en el endometrio y está en contacto directo con los vasos sanguíneos de la madre; epiteliocorial, (caballos, ovejas y cerdos), donde el corion toca ligeramente el endometrio pero no lo penetra; endoteliocoriales (la mayoría de los carnívoros), en la que el corion penetra en el endometrio llegando a tocar los vasos

sanguíneos de la madre; y mesocorial (vacas), en donde el corion entra en el endometrio sin llegar a tocar los vasos sanguíneos de la madre (4).

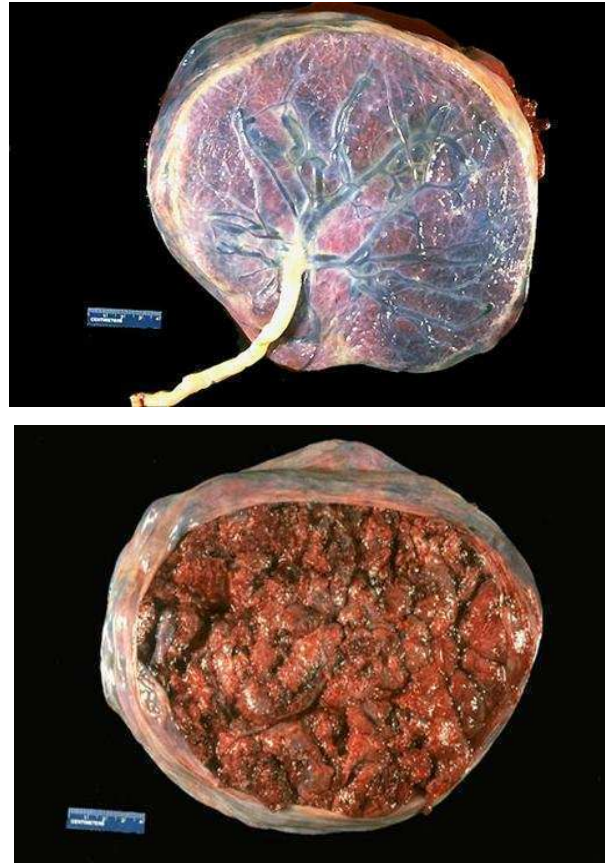


FIGURA 6. Placenta humana a término. Caras fetal (arriba) y materna (abajo) de la placenta humana.

Mediadores de la implantación y el crecimiento embrionario

Durante el período perimplantatorio, gran cantidad de moléculas tales como citoquinas, factores de crecimiento y hormonas cumplen distintos roles en la comunicación que ocurre entre el embrión y el endometrio materno. Dada la amplia variedad de estas señales, se da especial atención a las sustancias que son liberadas en el sitio de implantación, y particularmente, a los factores de crecimiento y citoquinas que cumplen

una función fundamental en la regulación de la diferenciación de los trofoblastos y la invasión (24). El desarrollo de la arquitectura básica de la placenta así como el proceso de diferenciación que ocurre durante todo el embarazo, se encuentran controlados por la propia placenta y por el útero materno; aunque, el embrión también produce señales preimplantatorias como el factor de preimplantación (PIF), el factor temprano de preñez (EPF), factores de crecimiento (EGF, TGF- α) y sus receptores y citoquinas (25).

Profundos cambios químicos dentro del ambiente uterino actúan en concierto con los eventos moleculares esenciales para la implantación. Este diálogo químico y estructural determina la capacidad funcional de la placenta durante la gestación. Así, la cascada de eventos de señalización que ocurre tanto en el tejido fetal como en el materno al momento de la implantación establece un entorno apropiado crítico para el desarrollo y la supervivencia del feto. Los defectos en la formación de esta comunicación y la inhabilidad de mantener este “cross talk” resultan en varias complicaciones asociadas al embarazo que se manifiestan tarde en la gestación (23, 26).

Las **quemoquinas** son la primera ola de moléculas producidas localmente por el endometrio que reclutan leucocitos al sitio de implantación. Estas quemoquinas a su vez producen una segunda ola de citoquinas como el factor inhibidor de leucemia (LIF), la interleuquina 1 (IL- 1), el factor de crecimiento epidermal unido a heparina (HB-EGF), y otros que uniéndose a sus receptores pueden inducir cambios moleculares en el patrón de expresión de las moléculas de adhesión y antiadhesión. El blastocisto debe romper la barrera natural y esto comprende al glicocálix epitelial que está compuesto de moléculas antiadhesión, principalmente de mucina-1 (MUC-1). La MUC-1 es sobreexpresada durante la fase de aposición donde el blastocisto debe ser estacionario en la posición. Luego, el embrión debe activar la moléculas de adhesión endometriales epiteliales para crear los sitios de unión entre el trofoectodermo y las células epiteliales del endometrio (27). Dentro de las moléculas de adhesión, las integrinas del endometrio juegan un importante papel en la obtención de un embarazo exitoso. Según el tiempo en el que se expresan, relacionado con el fijado del embrión, las integrinas α V β 3 y α 4 β 1 son consideradas marcadores de receptividad uterina (28).

Las células trofoblásticas deben confrontar con varias **proteínas de la matriz extracelular** (MEC) y con la membrana basal cuando penetran en la pared uterina. Los

componentes de la matriz afectan el comportamiento y la función de las células trofoblásticas a través de su influencia en las metaloproteasas (MMPs) y sus inhibidores de tejido (TIMPs). Los trofoblastos secretan principalmente MMP-9 y MMP-2, dependiendo del tipo de componente de MEC con el que se encuentren (29).

Los **factores de crecimiento** afectan la implantación de varias maneras. El factor de crecimiento epidermal (EGF) es expresado tanto en la decidua como en las células trofoblásticas e induce la invasión, diferenciación y proliferación de los trofoblastos (30). Es considerado el mayor regulador de la implantación. Aumenta la actividad de MMP-2 y MMP-9 induciendo la invasión celular y estimula la secreción de hCG y de hPL de los trofoblastos. Otros importantes factores de crecimiento son el HB-EGF, que regula la proliferación del endometrio, la secreción y la decidualización; el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que inhibe la proliferación y la invasión trofoblástica; la proteína de unión al factor de crecimiento de insulina (IGFBP-1), que modula los efectos metabólicos del factor de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I y II) y se ha demostrado que aumenta la actividad gelatinolítica de los trofoblastos y su invasividad (31).

Las **citoquinas** cumplen un rol esencial en el establecimiento de un embarazo exitoso. Poseen una amplia variedad de funciones biológicas que involucran crecimiento celular, función y diferenciación. El LIF es secretado desde el útero y representa un importante factor en la implantación embrionaria. Las ratonas que carecen de LIF funcional son fértiles, pero sus blastocistos fallan al implantarse (32). La IL-1 está presente en la interfase feto-maternal. Las células trofoblásticas y el estroma decidualizado producen IL-1 (33). Es una de las primeras señales del blastocisto que actúan sobre el endometrio, ya que in vitro, la IL-1 induce la secreción endometrial de protaglandinas E2, LIF y de la subunidad de integrina $\beta 3$. Estimula la actividad de MMP-9 en los trofoblastos y la expresión en las células endometriales epiteliales, induciendo la invasión trofoblástica (34).

El **requerimiento hormonal** para la implantación y desarrollo del embrión comienza con un incremento en estrógenos, seguido de progesterona y luego se mantienen altos los niveles de ambos. El útero así preparado sostiene la supervivencia del blastocisto en el lumen. Experimentalmente, el tamaño de la dosis de estrógenos afecta la duración de la fase receptiva. Aunque el receptor de estrógenos α (ER α) es la principal isoforma del receptor que media los efectos de estrógenos en el útero, tanto el endometrio de humanos

como de ratones expresan bajos niveles del receptor de estrógenos β (ER β). La eliminación de ER β en ratones compromete la función reproductiva, y la evidencia sugiere que podría modular a ER α . Similarmente, el receptor de progesterona posee dos variantes de “splicing”, A y B, que funcionan como diferentes factores de transcripción (19).

El **estradiol** (E2) cumple un papel central en la regulación del crecimiento fetal, en el trabajo de parto, en la esteroidogénesis placentaria, en la liberación de neuropéptidos, de glicoproteínas y en la secreción de leptina (35). Los mecanismos exactos de la acción del E2 en la placenta son aún tema de debate. Existe evidencia de que el estrógeno placentario podría cumplir un rol en la diferenciación del trofoblasto (36). La acción del E2 en placenta podría ser mediada por receptores clásicos y no clásicos de membrana (37).

Las células del sinciotrofoblasto secretan hormonas como la progesterona y la **gonadotrofina coriónica humana (hCG)** que desempeñan un papel clave en el desarrollo del embarazo. La hCG afecta gran cantidad de procesos durante la gestación que incluyen, además del mantenimiento del cuerpo lúteo, el crecimiento y la diferenciación celular. Los trofoblastos expresan una versión truncada e inactiva del receptor de hCG hasta la novena semana de embarazo. Luego cambian al receptor completo, permitiendo la regulación autocrina por hCG de varias funciones como la diferenciación celular de los trofoblastos. La hCG aumenta la expresión de MMP-9, enzima clave en la invasión trofoblástica. In vitro, estimula la migración de los trofoblastos a través del IGF-II (18, 38).

La **progesterona** posee un rol esencial en la preparación del útero para el desarrollo del embrión y para obtener un embarazo exitoso. Las células estromales se diferencian a deciduales en respuesta a la progesterona durante el proceso de decidualización, caracterizado por cambios morfológicos y secreción de prolactina (39). La progesterona también es requerida durante el embarazo, estimulando y manteniendo las funciones uterinas, necesarias para el desarrollo temprano del embrión, la implantación, la placentación y el desarrollo fetal. Las hormonas como hCG producidas por los trofoblastos, mantienen la producción de progesterona en el embarazo temprano (40).

Mediante la expresión de distintos **factores inflamatorios**, el embrión modula el proceso inmune materno y favorece la tolerancia materna. Dentro de estos factores se encuentran la hormona liberadora de corticoides (CRH), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las prostaglandinas (PG). La CRH es producida tanto por los trofoblastos como

por la decidua. Estimula la expresión de FasL en los trofoblastos extravelosos permitiéndoles inducir apoptosis en los linfocitos T que los rodean (41, 42). El TNF- α está presente en el endometrio y en los trofoblastos. Estimula la degradación de la fibronectina durante la penetración de los trofoblastos en el endometrio (43). La prostaglandina E2 (PGE2) es esencial en el sistema reproductor femenino de los mamíferos. Está involucrada en la regulación de la decidualización de las células endometriales. Las PG son esenciales para establecer el tiempo correcto de implantación (44).

Las **metaloproteasas de matriz (MMPs)** son una familia de endopeptidasas que contienen zinc, capaces de degradar todos los componentes de la MEC. Existen 5 clases de MMPs humanas según su estructura primaria y la especificidad del sustrato: colagenasas, gelatinasas, estromelinas, según el tipo de membrana y no clasificadas. Los estudios in vitro sugieren que una implantación y placentación exitosas resultan del balance entre la secreción de MMPs por los trofoblastos y su inhibición por TIMPs (45). Las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 degradan el colágeno IV, el principal componente de la membrana basal, y por ello son consideradas como las enzimas clave en el proceso de implantación, permitiendo la invasión trofoblástica a través de la decidua y dentro de la vasculatura materna (46, 47).

Los **inhibidores de tejidos de MMPs (TIMPs)** son los principales inhibidores de MMPs en tejidos que controlan fisiológicamente su actividad. Los TIMP son producidos por los tejidos trofoblásticos y deciduales a través de la gestación. Están dentro de los primeros genes expresados por el embrión que se prepara para la implantación (48-50). Los factores de crecimiento y citoquinas conocidos por poseer un efecto en la invasión trofoblástica pueden actuar induciendo o inhibiendo a los TIMPs. Los TIMPs pueden tener funciones adicionales en la proliferación celular y en el desarrollo del embrión (51, 52).

El **sistema activador de plasminógenos** incluye el sistema activador de plasminógenos de tipo urokina (uPA), de tipo tisular (tPA), los inhibidores de PA, PAI-1 y PAI-2, y el receptor de superficie celular de uPA. El sistema de PA convierte los plasminógenos en serin-proteasas plasminas activas que son capaces de degradar la MEC. Su actividad es regulada por PAI. El sistema PA posee también un efecto indirecto mediante la activación proteolítica de las MMPs (53).

Finalmente, en relación a la invasión endovascular, el desarrollo de un sistema de vasculatura placentaria es esencial para el crecimiento y el mantenimiento del embrión. Gran variedad de factores se encuentran involucrados en este proceso angiogénico, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (**VEGF**), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (**PDGF**) y el factor activador de plaquetas (**PAF**). EL VEGF induce la angiogenesis y aumenta la permeabilización de los vasos sanguíneos. VEGF y su receptor se expresan en el endometrio y en células trofoblásticas (12, 54).

Apoptosis y proliferación celular placentaria

En un tejido maduro que se encuentra en proliferación, existen células que deben morir o perderse para mantener la homeostasis. En consecuencia la proliferación y la muerte celular programada son procesos finamente regulados. El ciclo celular de mamíferos se divide en distintas fases. Las células quiescentes se encuentran en el estadio G0 y entran en el ciclo celular en G1. Pasan a través de la fase S cuando el DNA se replica progresando a la fase G2 antes de entrar en mitosis (fase M). La progresión en cada fase es regulada por la actividad de los complejos de ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (55).

La muerte celular se divide según observaciones histológicas en muerte celular programada o necrosis. La muerte celular programada es dividida en apoptosis y autofagia. La apoptosis fue descrita por primera vez en 1972 cuando los patólogos identificaron un patrón de muerte celular en la que las organelas se fragmentan, se condensan y se empaquetan con las membranas celulares en cuerpos apoptóticos densos para ser fagocitados por las células vecinas o macrófagos (56).

La apariencia similar de las células apoptóticas entre las especies y tejidos de un organismo sugieren un mecanismo de control altamente conservado. La apoptosis puede resultar de una vía que es iniciada desde el interior de la célula (vía intrínseca o mitocondrial) u originarse de una señal externa como citoquinas o de la activación de los receptores de muerte (vía extrínseca). Ambas vías culminan en la activación de cistein proteasas aspartato específicas conocidas como caspasas, que digieren proteínas intracelulares, mediando la muerte celular apoptótica (57) (Figura 7).

Las caspasas son una familia de 14 enzimas proteolíticas. Las caspasas-2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10 están asociadas con la apoptosis y pueden ser subdivididas en iniciadoras (2, 8, 9, 10) y efectoras (3, 6, 7), dependiendo de su lugar y función en la cascada de caspasas. (58, 59). Las caspasas efectoras activan enzimas relacionadas con la degradación del ADN y de proteínas estructurales. También pueden potenciar la señal apoptótica y ligar las vías extrínsecas e intrínsecas de apoptosis, con el clivado de Bid o tBid por la caspasa 8, aumentando la permeabilidad mitocondrial y por lo tanto, la cascada apoptótica (60).

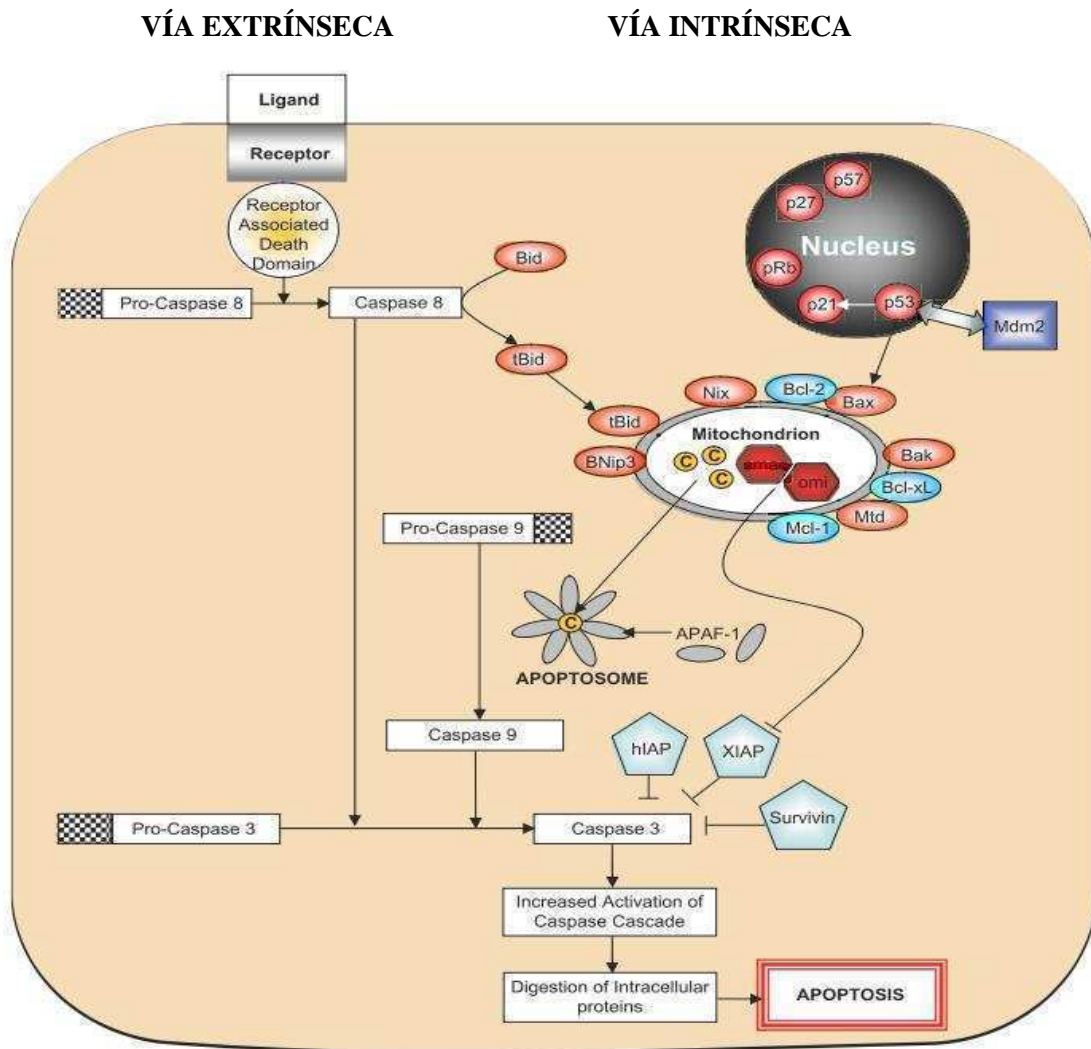


FIGURA 7. Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis. Las proteínas proapoptóticas se muestran en rojo y las antiapoptóticas en azul. Las proteínas que actúan predominantemente en el núcleo se muestran en círculos pequeños. La familia de proteínas de Bcl-2 se muestra en óvalos y las IAPs en pentágonos. El citocromo c se indica en círculos amarillos. Modificado de Heazell y Crocker, 2008 (59).

La vía intrínseca puede ser programada para ocurrir en un punto específico del desarrollo celular o en respuesta al daño celular. Esta vía comprende alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, resultando en la liberación del citocromo c. Éste se combina con el factor activador de proteasas-1 (APAF-1), que se encuentra en el citoplasma, para formar un heptámero, llamado apoptosoma, que es capaz de combinarse con la procaspasa-9, clivándose en caspasa-9, y activando a las caspasas efectoras -3, -6 y -7 (61). La vía extrínseca utiliza receptores que unen o bien ligando de supervivencia o pro-apoptóticos. Por ejemplo, la familia de receptores TNF unen un complejo de señalización de muerte. En el caso del receptor TNFR1, la unión de TNF- α promueve la asociación de TRADD con la pro-caspasa-8, activando un estadio temprano de la cascada de caspasas. (62). Este mecanismo produce un potente estímulo de muerte en los trofoblastos (63).

La regulación de la vía intrínseca de apoptosis posee cuatro componentes: (i) el reconocimiento del daño celular; (ii) la transcripción alterada de los componentes río abajo de la cascada apoptótica; (iii) la permeabilidad alterada de la membrana mitocondrial; y (iv) la modificación de la actividad de caspasa. El control mitocondrial de la permeabilidad de la membrana es gobernado por la familia de proteínas de Bcl-2, que comprende miembros pro- y antiapoptóticos. Algunos de sus miembros proapoptóticos son Bax, Bid, Bak, PUMA. Bcl-2, miembro antiapoptótico, puede unirse a ellos y desactivarlos. Los miembros de Bcl-2 efectúan cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo cual lleva a la liberación de proteínas como citocromo c, SMAC, HtrA2/omi y AIF (factor inductor de apoptosis) que contribuyen a la vía intrínseca de apoptosis (59). Varios inhibidores endógenos como proteínas inhibitoras de FLICE (enzima convertidora de IL-1 β tipo FADD) (FLIPs), inhibidores de apoptosis (IAPs), y proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 inhiben la activación de caspasa, previniendo la propagación de la señal apoptótica. En células sanas es fundamental el balance entre la expresión de las proteínas pro y antiapoptóticas en la determinación de la supervivencia celular. Y esto sería regulado por el balance entre p53-Mdm2, Bax/Bak-Bcl-2, y SMAC/HtrA2/omi-IAPs. Un desbalance en cualquier punto sería suficiente para inducir apoptosis (64).

Durante el desarrollo de la placenta, ocurren en los diferentes estadios, los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. La placenta posee una capacidad de autorrenovación continua y dinámica y muestra una alta tasa de proliferación celular y una

pérdida de inhibición por contacto durante todo el período gestacional (65). De acuerdo a estas características morfológicas, el término “pseudomaligno” ha sido utilizado para describir este tejido. La mayor parte del remodelaje de la placenta es debido a eventos apoptóticos. Por ello, la regulación del balance entre la proliferación y la muerte celular es esencial en la placenta a fin de permitir los cambios morfológicos y funcionales necesarios (66).

Se conoce poco del entorno y del control genético que regulan la muerte celular programada en trofoblastos. Sin embargo, la incidencia de la apoptosis es mayor en el villi de la placenta del tercer trimestre comparado con la del primer trimestre, sugiriendo que la apoptosis placentaria es regulada durante el desarrollo (67). Múltiples cascadas de señales pro-apoptóticas están presentes en el villi placentario, pero aún es escaso el conocimiento acerca de cómo las cascadas receptoras regulan la apoptosis en los trofoblastos y en otros tipos celulares del villi. La sobreexpresión de p53 en los trofoblastos indiferenciados podría ser un mecanismo de control de la proliferación trofoblástica en la placenta normal. Inesperadamente, el gen salvaje de p53, en lugar de la versión mutada, se encuentra sobreexpresado en las enfermedades relacionadas con la gestación y estos tejidos muestran una alta tasa de apoptosis (68, 69).

Los mecanismos moleculares responsables de controlar la proliferación trofoblástica aún no son claros. Varios estudios han buscado la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores, así como de proteínas antiapoptóticas durante el desarrollo de la placenta humana (68, 70-73). La actividad simultánea de diversas proteínas involucradas en la proliferación celular o la apoptosis, durante la diferenciación de los trofoblastos, cumple un rol fundamental en la regulación de la invasión celular y en la expansión de la población, especialmente durante el primer trimestre (66). Es claro que el trofoblasto veloso expresa muchos constituyentes de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca. Los elementos de la vía extrínseca presentes en el citotrofoblasto y el sinciotrofoblasto, incluyen receptores TNF, Fas, Fas-ligando (Fas-L) y caspasa-8 (59). Numerosos estudios han demostrado que la predominancia de las citoquinas Th2 sobre las de tipo Th1 es esencial para un embarazo exitoso. Este cambio no sólo promueve la protección inmune sino que también podría regular directamente la supervivencia de los trofoblastos. Uno de los posibles mecanismos por el que las citoquinas podrían afectar la supervivencia de los

trofoblastos es regulando la expresión y/o la función de los componentes de la cascada apoptótica (74). Dentro del trofoblasto vellosos, la proliferación está restringida a los citotrofoblastos. La apoptosis ocurre en el villi placentario y, bajo condiciones normales, casi exclusivamente en el sincitiotrofoblasto (67). La apoptosis es raramente descripta en las células del citotrofoblasto. La cantidad de procesos apoptóticos se encuentra alterada en varias condiciones clínicas asociadas con una anormal morfología y función placentaria. La apoptosis placentaria se halla aumentada en las enfermedades trofoblásticas gestacionales, incluyendo la mola hidatiforme parcial, la mola hidatiforme completa y el coriocarcinoma. La apoptosis también está incrementada en embarazos complicados con abortos en el primer trimestre y en condiciones clínicas de embarazo tardío como la restricción de crecimiento uterino (IUGR) y la preeclampsia (75-77). En estos casos se ha detectado una gran incidencia de apoptosis en el tejido vellosos y en el extraveloso, sugiriendo que la regulación de la apoptosis trofoblástica es importante para un embarazo normal. Un incremento en la muerte celular de los trofoblastos podría explicar la insuficiencia en la invasión trofoblástica, y la pérdida de la transformación de las arterias espirales frecuentemente observada en embarazos anormales. El aumento de la apoptosis placentaria en la gestación temprana limita la invasión intersticial y endovascular de los trofoblastos extravelosos (74).

Patologías asociadas al embarazo

Enfermedades trofoblásticas gestacionales (ETGs)

Las ETGs comprenden un grupo de enfermedades del tejido trofoblástico que incluye la mola hidatiforme (MH), la mola invasiva, el coriocarcinoma, y el tumor placentario trofoblástico (TPT). Representan un grupo único e interesante de enfermedades donde el tejido materno es invadido por los tejidos del feto, genéticamente diferentes a los de la madre. La patogénesis de las ETGs resulta de un desequilibrio en la regulación de distintos procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, apoptosis e invasión de las células trofoblásticas. La invasión anormalmente extensiva es lo que puede derivar en condiciones premalignas o malignas como la mola hidatiforme o el coriocarcinoma. El

aumento en el potencial invasivo del trofoblasto es una consecuencia de la patología, no la causa (16).

El coriocarcinoma es un tumor maligno del trofoblasto, que invade los tejidos normales y se disemina a sitios distantes, como los pulmones, el cerebro, el hígado, la pelvis, la vagina, el bazo, los intestinos y los riñones. En aproximadamente la mitad de los casos de coriocarcinoma, el factor precedente es la mola hidatiforme.

La mola hidatiforme es un tumor trofoblástico benigno considerado como una degeneración cística de las vellosidades placentarias, generalmente en ausencia de un feto (mola completa), y que muestra inflamaciones macroscópicas como quistes de las vellosidades coriónicas debido a la acumulación de líquido (78).

Preeclampsia

El término preeclampsia refiere a una condición de hipertensión (140/90 mmHg) y proteinuria luego de las 20 semanas de gestación, en mujeres previamente normotensas y no proteinúricas. Esta condición es común, ocurre en el 5% de embarazos de Estados Unidos y Europa y es la principal causa de morbilidad y muerte de la madre y el feto. Los factores que predisponen a la preeclampsia son la historia familiar, la hipertensión, la diabetes, enfermedades renales preexistentes, embarazos múltiples, y una pobre historia obstétrica (79). La preeclampsia puede rápidamente derivar en una eclampsia, especialmente si no es tratada. La eclampsia puede ser precedida por un persistente y severo dolor de cabeza y cambios en la visión. La muerte de la madre está frecuentemente relacionada con la hipertensión y la eclampsia (80).

En el feto, la preeclampsia comúnmente causa restricción del crecimiento uterino (IUGR), bajo peso al nacer, prematuridad y muerte perinatal (81). El bajo peso al nacer consecuencia de la preeclampsia, conlleva un importante riesgo cardiovascular y es un factor de muerte infantil (82). En la segunda mitad del embarazo la preeclampsia es potencialmente peligrosa, y se manifiesta con disfunción endotelial y trastorno vascular, que conducen a hipertensión (83).

La preeclampsia ocurre sólo en presencia de la placenta o de una mola hidatiforme, y remite dramáticamente luego del parto cuando se elimina la placenta (84).

La patogénesis puede incluir la invasión anormal citotrofoblástica de las arterias espirales, una disminución de la perfusión uteroplacental, un desbalance entre el aumento

de la síntesis de tromboxanos y la disminución de la producción de prostaglandinas I₂, un aumento en el estrés oxidativo, desórdenes en el metabolismo de la endotelina, o disfunciones endoteliales (79). Las tasas de apoptosis se hallan significativamente aumentadas en el sinciotrofoblasto preeclámptico (85).

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, aún no existen diagnósticos específicos y el diagnóstico inicial es clínico (86).

Diabetes Mellitus Gestacional

El embarazo confiere un estado de resistencia a insulina e hiperinsulinemia que puede predisponer a algunas mujeres a desarrollar diabetes. La diabetes mellitus gestacional (DMG) ocurre cuando la función pancreática de la mujer no es suficiente para superar el ambiente diabetogénico de la preñez. La DMG es definida como un estado de intolerancia a la glucosa que no estaba presente o no era reconocida previamente al embarazo (87).

La resistencia a insulina durante el embarazo se origina por una variedad de factores incluyendo alteraciones en las hormonas de crecimiento y la secreción de cortisol (antagonistas de insulina), secreción de lactógeno placentario humano y secreción de insulinasa. Los estrógenos y la progesterona también contribuyen a la disrupción del balance glucosa-insulina (88).

Los daños producidos por la diabetes al principio de la gestación podrían tener efectos a largo plazo en el desarrollo de la placenta. Las respuestas adaptativas de la placenta al entorno diabético, como balancear el exceso de glucosa materna o aumentar la resistencia vascular, podrían ayudar a limitar el crecimiento fetal dentro del rango normal. Si la duración o la extensión de la injuria por diabetes, incluyendo la hiperglucemia materna, hiperinsulinemia, o dislipidemia, excede la capacidad de la placenta para responder adecuadamente, entonces ocurriría un excesivo crecimiento fetal (89).

La presencia de la DMG posee implicancias tanto para la madre como para el bebé. (90). La DMG está asociada con riesgo de macrosomía así como de hipoglucemia e hiperbilirrubina neonatal. Para la madre, la DMG es un signo de riesgo incrementado de desarrollar diabetes (91).

Restricción del crecimiento intrauterino (IUGR)

El crecimiento fetal es el resultado de un potencial genético modulado por el entorno nutricional y endócrino. La IUGR ocurre cuando el feto falla en lograr su completo potencial de crecimiento. La IUGR es la causa más importante de morbilidad y mortalidad perinatal, afectando aproximadamente entre el 7-15% de los embarazos (92, 93).

Se observan dos patrones principales de IUGR. Si el crecimiento fetal es desparejo durante el primer o segundo trimestre, el niño tendrá una restricción de crecimiento simétrica. Esta pérdida proporcional de crecimiento es causada por una reducida proliferación celular fetal de todos los órganos y ocurre aproximadamente entre 20-30% de los niños con IUGR. En contraste, el crecimiento asimétrico en el que el infante posee un tamaño abdominal pequeño comparado con el tamaño de la cabeza ocurrirá si la disminución en la velocidad de crecimiento se da en el tercer trimestre. Este fenómeno es el más común en las IUGR (70-80%) y se atribuye a la habilidad del feto de adaptarse, redistribuyendo el flujo cardíaco al bazo, las coronarias, la glándula adrenal y la circulación cerebral (94).

En la IUGR aparece un fenotipo específico de la placenta asociado con defectos en el metabolismo y transporte placentarios. Los estudios han demostrado reducciones significativas en el transporte de aminoácidos desde la placenta al feto (95).

No existe una definición clínica internacionalmente aceptada para IUGR. Muchas investigaciones la definen como un infante debajo del décimo, quinto o tercer percentilo para la edad gestacional. El monitoreo de IUGR está basado en exámenes clínicos y la identificación de factores de riesgo. Los factores de riesgo maternos para el desarrollo de IUGR incluyen un embarazo previo con IUGR, preeclampsia, bajo peso pre-embarazo, poco peso ganado durante el embarazo, enfermedades maternas preexistentes (autoinmunes, endócrinas, cardiovasculares), enfermedades adquiridas (citomegalovirus, rubeola, malaria) o posición anormal de la placenta. Más aún, en presencia de anomalías fetales, como defectos cromosómicos o malformaciones, o en gestaciones múltiples, el potencial del crecimiento fetal puede ser alterado (96).

El desarrollo anormal, la perfusión inadecuada y la disfunción del villi placentario son frecuentemente responsables del desencadenamiento de la IUGR, especialmente la del tipo temprano (97).

Leptina, una hormona reproductiva

Desde su descubrimiento en 1994 (98) la hormona del tejido adiposo, leptina, se ha posicionado indiscutiblemente como una molécula central en la reproducción.

La leptina es la hormona producto del gen LEP, cuya síntesis se descubrió originalmente en tejido adiposo, con la función de regular la saciedad y el balance energético vía receptores hipotalámicos específicos (99, 100). No obstante, hoy se sabe que la leptina es producida por múltiples tejidos y que sus niveles incrementados están asociados con el advenimiento de la madurez reproductiva y la fertilidad (101).

Estructura

La leptina es un péptido no glicosilado de 167 aminoácidos, altamente hidrofílico, con una señal secretoria amino terminal de 21 aminoácidos. La translocación de leptina a microsomas es seguida por la eliminación del péptido señal y la secreción al torrente sanguíneo (98, 102).

La leptina circulante es un péptido de 146 aminoácidos con un peso molecular de 16 kDa. El análisis del producto del gen LEP revela una alta homología entre especies. La leptina humana posee 84% de homología con el ratón y 83% con la rata. La estructura de cristalización revela un paquete de cuatro hélices alfa antiparalelas, cuatro giros beta y un enlace disulfuro entre los residuos aminoacídicos 117 y 167. Es una estructura altamente conservada entre los mamíferos (Figura 8) (98).

La estructura primaria de la proteína es similar a la de la familia de citoquinas helicoidales de cadena larga (98), entre las que se encuentran, LIF, OSM (Oncostatina M), CT-1 (Cardiotrofina-1), G-CSF, CNTF, IL-2, IL-6, IL-11, IL-12 y GH (hormona del crecimiento) (103). Su plegamiento es similar a los plegamientos de la subfamilia de citoquinas de cadena corta (104).

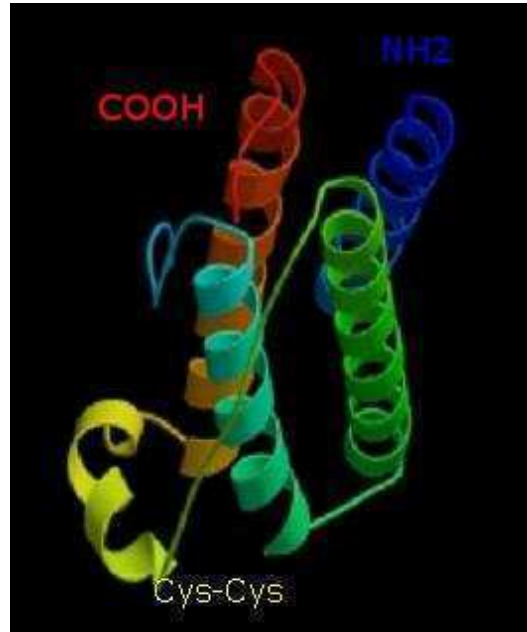


FIGURA 8. Estructura de la hormona leptina. Modificado de Zhang y cols., 1994 (98)

Los distintos fragmentos estructurales de la proteína afectan las actividades biológicas de la leptina in vivo, y a la unión al receptor in vitro:

- **la secuencia aminoacídica NH₂-terminal (22-115)**, es esencial para las acciones biológicas y para la unión al receptor (105);
- **la secuencia aminoacídica C-terminal (116-167)**, posee una estructura de lazo, encargada de aumentar los efectos activadores que residen en la región N-terminal. La actividad biológica de la proteína reside en los dominios 106-167 situados entre las regiones N y C-terminal (106);
- **el puente disulfuro C-terminal (Cys⁹⁶-Cys¹¹⁶)**, generalmente no es necesario para las acciones de la leptina, aunque es esencial para la adopción de la conformación proteica y para la interacción leptina-receptor. Una mutación en esta región ocasiona una proteína inactiva (103). La formación de un puente disulfuro intramolecular entre las Cys¹¹⁷ y Cys¹⁶⁷ es necesario para el normal procesamiento y secreción de la leptina (107).

Síntesis y degradación

La leptina es codificada por un gen localizado en el cromosoma humano 7q31.3 (108) y en el cromosoma 6 de ratones (98). Está integrado aproximadamente por 650 kilobases (kb) agrupadas en tres exones separados por dos intrones que transcriben un ARNm de 4.500 nucleótidos. La región codificante para la leptina se encuentra en los exones 2 y 3 (109) (Figura 9). La región promotora de este gen parece comprender unas 3 kb, que posee la región TATA localizada entre -26 a -30, así como múltiples sitios regulatorios que serán descriptos más adelante (102).

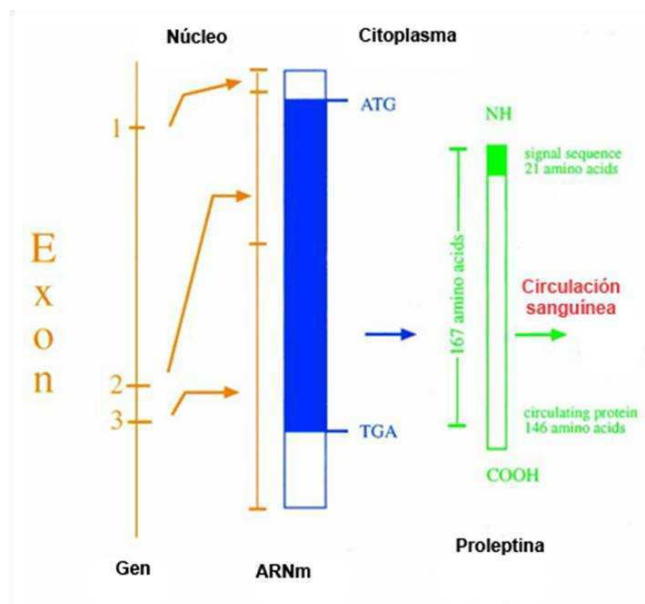


FIGURA 9. Estructura del gen de leptina. El gen de leptina consiste en tres exones y dos intrones. El gen se transcribe en un ARNm de 3.5kb (azul) que codifica una prohormona de 167 aa (verde). La secuencia señal de 21 aa es luego removida antes de la liberación de la leptina a circulación (rojo). Modificada de Prolo y cols, 1998 (104).

La transcripción y la traducción del gen de leptina ocurre en el tejido adiposo (98), en la mucosa gástrica (110), las células del epitelio mamario (111), los miocitos (112) y la placenta (113). Su expresión se ha reportado también en testículos, ovario y folículos pilosos (114) así como en las glándulas fúndicas humanas (115) (Figura 10).

La leptina circula en el plasma libre o unida a proteínas de unión a leptina (116). Estas proteínas aún no han sido identificadas pero incluyen la forma soluble del receptor (117). La mayor parte de la leptina circula en su forma unida en individuos de peso normal, y en su forma libre en obesos (118).

La tasa de producción de leptina es directamente proporcional a la masa adiposa. Con un peso corporal normal, la leptina está mejor correlacionada con la masa adiposa absoluta que con el índice de masa corporal (BMI) o el porcentaje de grasa corporal. Los niveles de leptina circulante parecen estar directamente relacionados con la cantidad de ARNm de leptina en el tejido adiposo. Pese a que la leptina circulante parece correlacionar con la cantidad de tejido adiposo, también existe un factor sexual: dada la misma cantidad de grasa corporal, las mujeres secretan más del doble de leptina que los hombres. Cambios en la ingesta y en el desarrollo del crecimiento pueden alterar las concentraciones séricas de leptina (119).

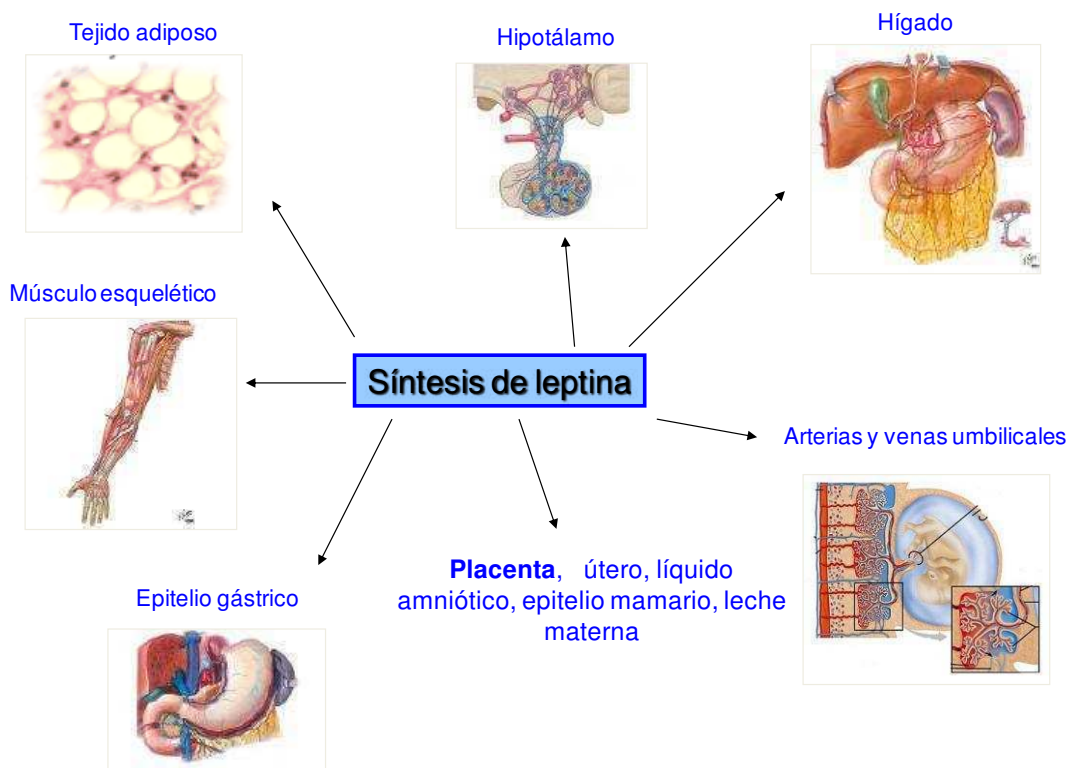


FIGURA 10. La leptina se sintetiza en diversos tejidos.

La leptina se sintetiza en la placenta a niveles comparables o incluso mayores a los de tejido adiposo (120). La leptina humana posee un tiempo de vida media de $24,9 \pm 4.4$ minutos, que es la misma en individuos obesos y de peso normal. El tiempo corto de vida de la leptina en circulación está principalmente determinado por su eliminación renal, mediada por la filtración glomerular, seguido por procesos de degradación metabólica en los túbulos renales (121). El 97% de la leptina extraída es metabolizada por el riñón (122) a nivel de los túbulos renales, no participando el pulmón ni el bazo en su eliminación (123).

Ritmo circadiano de la leptina

La concentración plasmática de leptina en humanos muestra una variación circadiana, con bajos niveles durante la mañana y mediodía (124), que se van incrementando durante la tarde hasta alcanzar su pico máximo entre la 1:00 am y 4:00 am. (125). Luego de alcanzar este máximo, los niveles de leptina disminuyen gradualmente y por la mañana se detecta su concentración más baja (126, 127). La duración del pulso de liberación de leptina es de 30 minutos, con una amplitud mayor en hombres que en mujeres, y una frecuencia similar (127). La altura alcanzada por el pulso es mayor en individuos obesos que en delgados y mayor en mujeres que en hombres (126).

El ritmo circadiano de la leptina se modifica también según la edad del individuo (126). La leptinemia del recién nacido permanece alta durante las 6 horas posteriores al nacimiento, luego cae rápidamente hasta su concentración mínima en torno a las 12-16 horas de vida y permanece en este pico mínimo durante algunos días (128).

Funciones biológicas de leptina

El sistema nervioso central, específicamente el núcleo hipotalámico, es el blanco donde la leptina ejerce la mayor parte de sus efectos en el metabolismo energético. La leptina disminuye la ingesta de alimentos, aumenta el gasto de energía y disminuye la eficiencia del metabolismo. Se ha demostrado que la leptina participa en un amplio espectro de funciones biológicas como el metabolismo de lípidos y glucosa, síntesis de glucocorticoides e insulina, proliferación de linfocitos T CD4+, secreción de citoquinas,

fagocitosis y transmisión sináptica. Más aún, regula el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, la maduración del sistema reproductivo, la hematopoyesis, la angiogénesis y el desarrollo fetal (129) (Figura 11).

Leptina como regulador del peso y del apetito

La leptina posee un potente efecto en la reducción del peso in vivo. En los ratones *Lep/Lep*, el gen que codifica para leptina está mutado y los ratones son obesos (98). El efecto de leptina en el peso corporal y la ingesta de comida depende de su unión a la forma larga del receptor, LEPRb (117, 130). Una mutación que específicamente anula la expresión de LEPRb en ratones diabéticos da como resultado ratones obesos y completamente resistentes a leptina. LEPRb está altamente expresado en el hipotálamo sugiriendo que esta región del cerebro es un importante sitio de acción de la leptina (131). Los circuitos neuronales en el núcleo arqueado del hipotálamo que median las señales de leptina, involucran las neuronas NPY/AgRP, que aumentan la ingesta de alimentos, y las neuronas POMC/CART, que inhiben la ingesta y el metabolismo energético (132). Cuando las células adiposas aumentan en número y tamaño, el gen *LEP* comienza a producir leptina, que es secretada a circulación (121). Cuando la leptina alcanza el cerebro a través de regiones fuera de la barrera hematoencefálica, incluyendo parte del hipotálamo, disminuye el apetito e incrementa la tasa metabólica; aumenta la termogénesis, el consumo de oxígeno, la expresión del ARNm de proteínas UCP (proteínas desacoplantes) y la actividad motora (133).

El núcleo ventromedial en el hipotálamo cumple un rol central en la regulación del comportamiento de alimentación, y es el blanco principal de la leptina (98). Las investigaciones sugieren que la pérdida de peso disminuye los niveles de leptina, lo cual induce un estado de balance energético positivo. Por el contrario, un incremento en la adiposidad conduce a un aumento en los niveles de leptina y a un balance negativo. Así, la leptina no sólo funciona como una señal adipostática para indicar el estado de la reserva de energía al cerebro (y posiblemente otros tejidos) sino que también funciona como un sensor del balance energético (109).

La leptina puede actuar en el cerebro reduciendo los niveles del neuropéptido Y (NPY). Es el único péptido conocido que puede inducir obesidad a través de la

administración prolongada, con o sin aumento de ingesta de comida. La disminución en la síntesis y secreción del NPY producida por la leptina o un cambio en la sensibilidad a NPY podría explicar la disminución en la ingesta (134). De todas formas, la leptina es igualmente efectiva en animales “knock out” para NPY, sugiriendo que NPY no es esencial para la acción de la leptina (135).

Homeostasis de glucosa y sensibilidad a insulina

Una característica del tratamiento de ratones Lep/Lep con leptina es el incremento de la sensibilidad a insulina y la atenuación de la hiperglucemia, independientemente de los efectos en la ingesta de comida. De esta forma, el vínculo entre la sensibilidad a insulina, el metabolismo de glucosa y la leptina se volvió foco de investigación. Pese a que los niveles circulantes de glucosa en los ratones deficientes en leptina alternan entre normales y bajos, los niveles plasmáticos de insulina, ácidos grasos y triglicéridos están disminuidos (136).

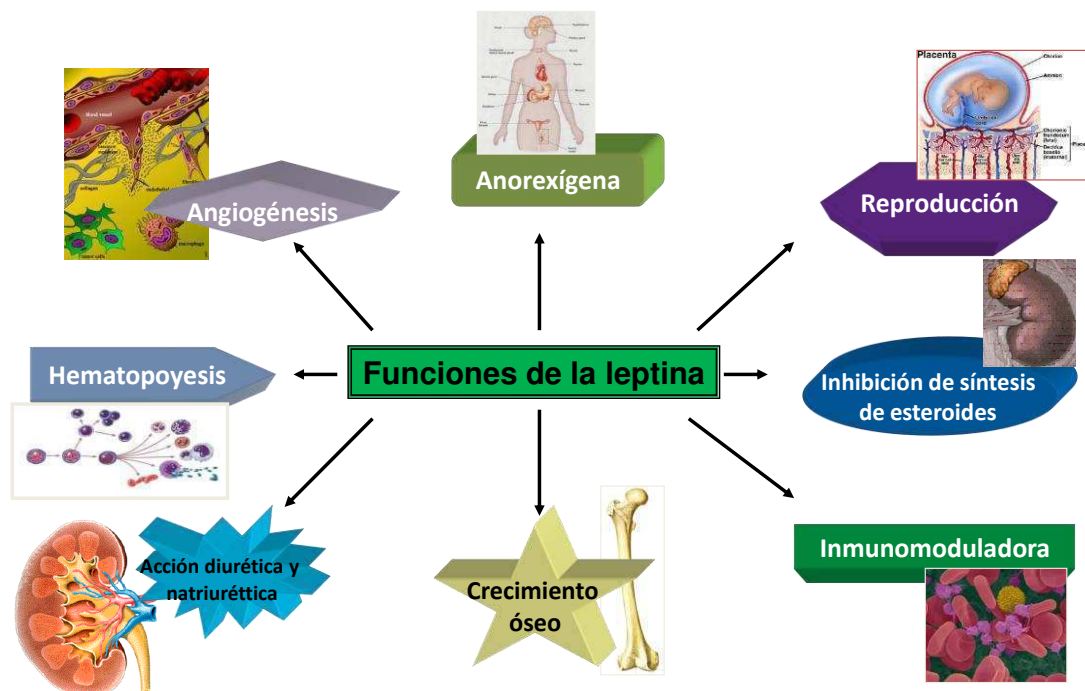


FIGURA 11. Funciones biológicas de la leptina. La leptina posee un efecto pleiotrópico en el organismo. Cumple múltiples funciones en diversos tejidos.

Leptina y remodelamiento óseo

La masa ósea es controlada por el remodelamiento óseo. El remodelamiento involucra dos etapas definidas: resorción del hueso preexistente por los osteoclastos y formación del hueso de novo por los osteoblastos. Si este balance es interrumpido, ocurren enfermedades en el remodelamiento de los huesos (137).

El aumento en el peso causado por la obesidad resulta en un incremento en la remodelación ósea y una disminución en la renovación ósea. Esto se observa en mujeres postmenopáusicas obesas que muestran tasas disminuidas de fracturas causadas por osteoporosis. Así, un mecanismo que relaciona la obesidad con la osteoporosis sería de gran interés en el tratamiento de mujeres no obesas. La observación de que el tratamiento con leptina en ratones normales y deficientes en leptina lleva a una pérdida ósea, plantea la hipótesis de que la leptina participaría en la modulación de la formación de los huesos a través de su acción en el hipotálamo, actuando como inhibidor de este proceso (138), independientemente de su función anorexigénica (139). Las deficiencias en leptina fortalecen la formación ósea, pero su abundancia en los organismos con hiperleptinemia no causa un efecto inhibitorio de la remodelación ósea (140). De hecho, la leptina ejerce efectos directos en la proliferación, diferenciación, mineralización y aumenta la vida de los osteoblastos primarios humanos por inhibición de la apoptosis (138, 141, 142).

La leptina como inmunomodulador

Varios estudios han demostrado que los niveles circulantes de leptina aumentan durante la infección e inflamación, sugiriendo que la leptina es parte de la respuesta inmune y de los mecanismos de defensa. La deficiencia en leptina incrementa la sensibilidad a estímulos infecciosos e inflamatorios y se relaciona con la producción alterada de citoquinas (143). Durante las respuestas inflamatorias sistémicas, la leptina participa en la síntesis de proteínas de fase aguda (144). Los niveles de leptina son intensamente incrementados por varios factores de la fase aguda como TNF, IL-1 e IL-6, y también durante una infección bacteriana o desafío con lipopolisacáridos (145). Se ha demostrado además que la leptina modula la respuesta inmune adaptativa (129). La leptina estimula la función fagocítica de macrófagos vía la activación de la fosfolipasa. En células dendríticas induce una serie de cambios morfológicos y funcionales que les otorgan la capacidad de ser

células presentadoras de antígenos y las guía hacia el aumento de la respuesta Th1 (146). Sobre las células NK (natural killers), la leptina activa procesos de maduración celular, diferenciación, proliferación, activación y citotoxicidad (147). La leptina también es un factor trófico para la supervivencia de células mononucleares sanguíneas humanas, en ausencia de suero. Su efecto está mediado a través de la p42/44 MAPK (148, 149). Posee asimismo, efectos específicos en la respuesta de los linfocitos T, regulando diferencialmente la proliferación de los T naive y los T de memoria. Aumenta la producción de citoquinas Th1 como IFN- γ e IL-2, pero suprime la producción de citoquinas Th2, tales como la IL-4 (150).

Funciones neuroendócrinas de la leptina

La leptina actúa como una señal hormonal crítica del estatus nutricional en la regulación neuroendócrina de la secreción pulsátil de GH. La leptina estimula la secreción y liberación de GH, a través de su acción, por un lado, a nivel hipotalámico aumentando la liberación de GHRH (mediada por el neuropéptido Y); y por otro lado a nivel hipofisario, ejerciendo un potente efecto estimulador en la secreción pulsátil espontánea de GH y en la secreción de GH en respuesta a GHRH (151).

En el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) la leptina posee efectos inhibitorios. Inhibe la liberación hipotalámica de CRH (hormona liberadora de corticotropina), directa o indirectamente a través de algún otro neuropéptido hipotalámico, como el NPY, impidiendo la activación del eje HPA en respuesta al estrés (152). A nivel periférico, inhibe la esteroideogénesis adrenal directamente vía receptores LEPR de la superficie adrenocortical (153). Inhibe la producción de cortisol en células adrenocorticales y actúa como una señal metabólica directa sobre la glándula adrenal. Disminuye en forma dosis dependiente la secreción de corticotropina (ACTH) inducida por aldosterona adrenal, la secreción de cortisol y la de dehidroepiandrosterona (153).

La deficiencia en leptina también se relaciona con desajustes en la función tirotrópica, concretamente en la estimulación con TRH (hormona tirotrópica) de la glándula tiroides. La administración de leptina en humanos revierte la supresión de T3, TSH (hormona estimuladora de tirotrópicos) y los niveles del ARNm de TRH en el núcleo paraventricular

hipotalámico (NPV) (109) a través de un efecto directo sobre la actividad del promotor TRH (154).

La leptina también controla el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal a distintos niveles. A nivel central, sobre el hipotálamo, estimula la síntesis y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y potencia los efectos de la insulina en la liberación de GnRH (155). La leptina acelera el pulso de GnRH de una forma dosis dependiente sin influir sobre la amplitud, actuando directamente sobre LEPR hipotalámicos. Ejerce una estimulación indirecta sobre el hipotálamo a través de interneuronas secretoras de neuropéptidos y de óxido nítrico, lo que induciría la secreción de GnRH (156).

Por otro lado, la leptina tiene acción directa sobre la hipófisis, regulando la concentración de FSH y LH. Entre un 20% y un 25% de células de la hipófisis anterior, predominantemente células foliculares y corticotrofas, expresan leptina, que a su vez, regulan el crecimiento y diferenciación de células hipofisarias (157).

Otras funciones de la Leptina

Se ha demostrado la expresión del receptor de leptina y la señalización in vivo en regiones discretas del **tracto gastrointestinal** del ratón. La leptina media la inducción de genes tempranos y la activación de STAT3 y STAT5 en células CACO-2 (modelos humanos de epitelio de intestino). Los resultados sugieren que el epitelio del yeyuno es un blanco directo de la acción de leptina y que esta actividad depende de la presencia del LEPRb (158).

El receptor de leptina es expresado en la **vasculatura humana** y en cultivos primarios de células endoteliales. Los ensayos in vitro e in vivo revelan que la leptina posee **actividad angiogénica** y que estimula la proliferación endotelial. Modula el crecimiento de la vasculatura endotelial (159), induce proliferación en las células endoteliales de vena umbilical y en células musculares lisas de arteria coronaria humana. El endotelio vascular es un blanco de la leptina y existiría un mecanismo fisiológico donde la angiogénesis inducida por la leptina facilitaría el gasto de energía (160).

La presencia del receptor LEPRb ha sido reportado también en las células hepáticas. El tratamiento con leptina de estas células modifica la sensibilidad y la acción de la

insulina. Dado que el hígado es el principal sitio de homeostasis de nutrientes, la acción directa de la leptina en el hígado podría modular la respuesta del organismo frente al exceso de ingesta de comida en la obesidad (137).

La mayor parte de los estudios de señalización del receptor de leptina en tejidos periféricos han sido realizados utilizando **células β pancreáticas** como modelo. El LEPRb se ha detectado en islotes y células β pancreáticas así como también el efecto inhibitorio de la leptina sobre la secreción de insulina (137).

Por otro lado, la leptina aumenta la **reabsorción renal** de Na^+ principalmente en el asa de Henle, debido a su efecto activador del sistema nervioso simpático y a la inducción del sistema renina-angiotensina. Esta acción está relacionada con la patogénesis de la hipertensión en individuos diabéticos o en obesos (161). Por otro lado, la leptina humana es un factor diurético/natriurético ahorrador de K^+ en ratas, dirigida hacia la excreción de sales. El efecto natriurético de la leptina es consecuencia de la disminución de la actividad renal medular de la Na^+/K^+ -ATPasa por medio de la activación de la PI3K, requiriendo la integridad del citoesqueleto de actina (162, 163).

Regulación de la expresión génica de leptina

Una gran variedad de factores que influyen profundamente la producción de leptina han sido identificados. Las influencias fisiológicas en la regulación de la producción de leptina incluyen ayuno, ejercicio y exposición al frío, lo cual resulta en una caída en la expresión del gen LEP y una disminución en los niveles circulantes de leptina. Luego del ayuno, la alimentación inmediata restituye rápidamente los niveles de leptina circulante (164-166).

Varios factores metabólicos y endócrinos contribuyen a regular la transcripción del gen en adipocitos. La insulina estimula la expresión del gen de leptina y la producción de la proteína. Es un importante regulador del ARNm de leptina en roedores, pese a que esto no se observa tan directamente en humanos (2). Los glucocorticoides inducen la expresión y la secreción de leptina en humanos y ratas así como en cultivos primarios de adipocitos, pero

no en líneas celulares 3T3-L1 (167-169). La expresión del gen de leptina en adipocitos de ratas es finamente regulada por dexametasona. La dexametasona estimula la secreción de leptina a través de mecanismos principalmente transcripcionales. En contraste, la insulina parece regular a la leptina por mecanismos postranscripcionales, movilizandolos los pools preexistentes de leptina y estimulando la síntesis de la misma (167, 170-175). Por otro lado, las tiazolidinedionas, la noradrenalina y la isoprenalina inhiben la expresión de leptina y los niveles circulantes de la proteína (176-178). La adrenalina induce una rápida caída en la leptina circulante. Los efectos de las catecolaminas ocurren principalmente a través de receptores β -adrenérgicos (179).

El aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc resulta en una disminución en la expresión del ARNm y de la secreción de leptina en adipocitos de rata. Dado que los agonistas β adrenérgicos inducen pérdida de peso a través de un aumento de la termogénesis en ratas, es interesante el hecho de que estos agonistas también regulen negativamente la expresión de leptina, que similarmente incrementa la tasa metabólica en ratas (180).

La expresión del gen de leptina es también inducida por el factor de transcripción adiposo, C/EBP (CCAAT/proteína intensificadora de unión) (181), un efecto consistente con la identificación del sitio de unión de C/EBP en la región proximal del promotor de leptina (182). Millar y colaboradores reportaron que sólo 217 pb de la secuencia en el 5' se requieren para la transcripción basal específica de la leptina, en tejido adiposo, así como para la estimulación con C/EBP α (183). En contraste, el ligando activador de los receptores gamma activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) que heterodimeriza con el receptor de retinoides X, se une a un elemento respondedor PP y reduce la expresión de leptina (184).

Algunos estudios han reportado que la colecistoquinina (CCK) estimula la secreción gástrica de leptina in vivo en las ratas y la expresión en células gástricas aisladas de caninos in vitro (185). Más aún, la secreción de leptina es incrementada luego de la infusión de secretina, una hormona ácida inhibitoria, y luego de la estimulación vagal en humanos (186). En células gástricas humanas que producen leptina ésta es inducida luego del tratamiento con CCK, insulina, glucocorticoides y ácidos trans-retinoicos, a través de la activación del promotor. Se ha demostrado también que la foskolina y el BRL37344, que

aumentan los niveles de AMPc, no afectan la actividad del promotor de leptina en células gástricas humanas (187).

El 17β -estradiol también incrementa la secreción de leptina en el medio de cultivo del tejido adiposo de ratas. Más aún, el efecto del estradiol fue aditivo al de la dexametasona (188). Los niveles más altos de estradiol y el aumento de la respuesta a estrógenos en ratas hembras junto con el aumento en la respuesta a dexametasona contribuye a la diferencias de sexo en los niveles de leptina (189).

Gran variedad de citoquinas tales como el $TNF\alpha$ (190), la IL-1 (191), LIF y la IL-6 (192) alteran la expresión del ARNm de leptina y los niveles circulantes. Ha sido reportado que la leptina y el $TNF\alpha$ podrían ser responsables de la pérdida de peso en los pacientes con tuberculosis pulmonar. La elevación de leptina en respuesta a citoquinas puede contribuir a la anorexia y a la pérdida de peso en estas condiciones inflamatorias (193).

La infusión de glucosamina aumenta los niveles de leptina en tejido adiposo e induce síntesis de novo en músculo esquelético de rata. La glucosa y la ingesta de lípidos poseen efectos similares sobre la leptina en estos tejidos sugiriendo que la leptina actuaría como un sensor del flujo de nutrientes en tejido adiposo y músculo esquelético (194).

En hombres sanos, las concentraciones de testosterona se correlacionaron negativamente con los niveles de leptina en suero. Se ha reportado también que la dehidroepiandrosterona (DHEA), DHEA-sulfato (DHEAS), androstenediona y dihidrotestosterona no aromatizable son potentes inhibidores de la secreción de leptina por el tejido adiposo (195, 196).

El receptor de leptina y su señalización

La naturaleza pleiotrópica de la leptina se basa en la distribución universal de los receptores de leptina (LEPR). La leptina actúa vía receptores transmembrana que muestran similitud estructural con la familia de receptores de citoquinas de clase I (99, 117, 197-199). Esta incluye los receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, LIF, factor estimulador de colonias de granulocitos, GH, prolactina y eritropoyetina (200, 201). Los miembros de esta

familia poseen motivos extracelulares característicos de cuatro residuos de cisteínas y WSXWS (Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser) conteniendo diferente número de dominios de fibronectina de tipo III (202-204).

El LEPR es producido en varias formas alternativas de procesamiento o “splicing”, denominadas LEPRa, LEPRb, LEPRc, LEPRd, LEPRE y LEPRf (117, 205), que poseen un dominio extracelular común de alrededor de 800 aminoácidos, una región transmembrana de 34 aminoácidos y un dominio intracelular variable, característico de cada una de las isoformas (Figura 12). De esta manera, las isoformas pueden ser clasificadas en tres clases: corta, larga y secretada. Además de contener dominios extracelulares y transmembrana idénticos, las isoformas cortas y largas comparten los mismos primeros 29 aminoácidos, divergiendo en su secuencia por el procesamiento alternativo del exón 3'. El dominio extracelular del LEPR posee dos motivos de receptores de citoquinas y cuatro dominios de fibronectina tipo III (99, 197, 199). Las construcciones de receptores recombinantes han mostrado que sólo el segundo motivo putativo de unión a leptina es importante y que la afinidad se ubica en el orden nanomolar. Las formas cortas del receptor, LEPRa, LEPRc, LEPRd y LEPRf poseen entre 30-40 residuos citoplasmáticos. Sin embargo, sólo la isoforma larga, LEPRb fue inicialmente considerada como receptor funcional, basado en el hecho de que posee un dominio intracelular de aproximadamente 300 residuos citoplasmáticos (mayor en el humano que en ratones), conteniendo varios motivos requeridos para la interacción con otras proteínas y la subsecuente activación de las vías de señalización (197). Se ha demostrado que la pérdida del LEPRb causa fenotipos obesos en ratones y ratas (206). El receptor “largo” es el único que posee los motivos intracelulares necesarios para la activación de la vía de señalización de JAK (quinasa de la familia Janus) /STAT (proteína transductora de señales y activadora de la transcripción) (199). El LEPRb se ha encontrado altamente expresado en el hipotálamo. El LEPRa y LEPRc están altamente expresados en el plexo coroide y en la microvasculatura (207, 208).

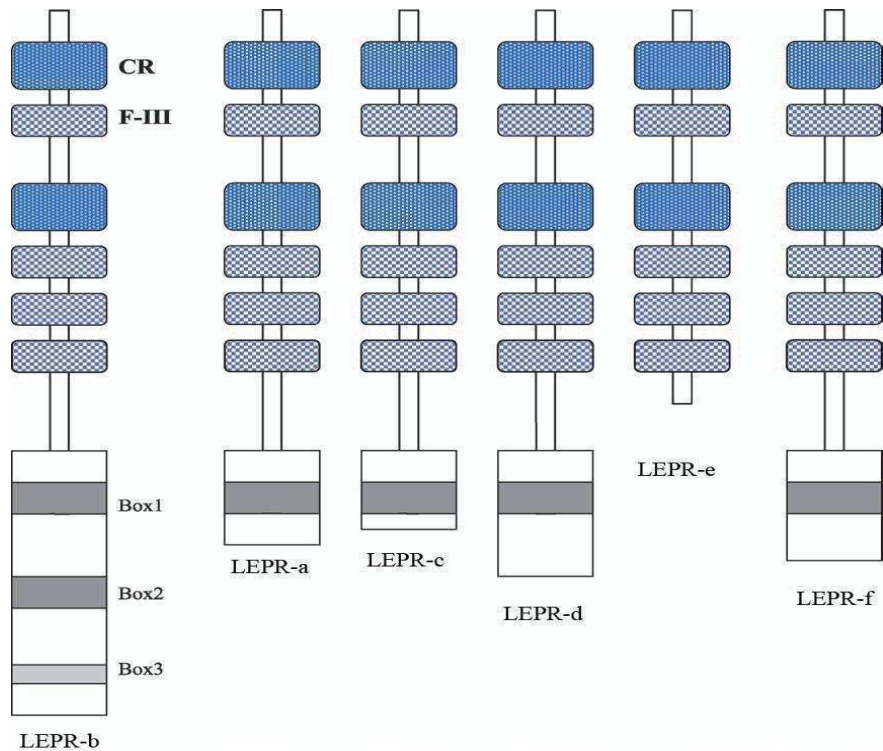


FIGURA 12. Estructura esquemática de las diferentes isoformas del receptor de leptina. LEPR-b: forma larga con los tres dominios BOX; LEPR-a, c, d y f: formas cortas con dominio BOX1; LEPR-e: forma secretada. CR: Dominio de receptor de citoquinas. F-III: dominio de tipo fibronectina. Modificado de Hegyi y cols, 2004 (201).

El LEPR_e, que carece del dominio intracelular, codifica para el receptor soluble. La isoforma secretada, LEPR_e, representa un producto alternativo de “splicing” o es un producto del clivaje proteolítico del LEPR unido a membrana (117). En ratones se ha reportado que la isoforma soluble putativa del receptor, LEPR_e, es producida a niveles lo suficientemente altos como para actuar como un sistema de buffer para la leptina libre circulante (209). El receptor soluble de leptina representa la principal actividad de unión a leptina en sangre humana y es determinada por el sexo, la adiposidad y la administración de leptina (210).

Inicialmente, se pensaba que las acciones directas de leptina se circunscribían únicamente al sistema nervioso central. Sin embargo, la distribución universal de sus receptores LEPR_a y LEPR_b, refleja la multiplicidad de sus efectos biológicos en tejidos extraneurales, proveyendo evidencia de la extrema pleiotropía funcional de la leptina (103).

Así, la regulación de la acción de leptina en sus tejidos blanco depende, al menos en parte, del balance en la expresión de las diferentes isoformas.

Tanto la forma larga como las cortas del receptor son capaces de formar homodímeros en ausencia de ligando, y la extensión de esta asociación no cambia apreciablemente bajo la estimulación de ligando (211, 212). En consecuencia, la dimerización no parece cumplir un rol regulatorio en la activación del receptor. No obstante, la formación de dímeros entre los receptores de leptina sería necesaria para la señalización (213). Cada LEPR se une en una estequiometría 1:1 con la leptina, lo cual resulta en una formación tetramérica del complejo receptor/ligando (184). El cambio en la conformación de la estructura del receptor inducida por la formación de este complejo resulta crítica en la activación de la señalización de leptina (214). Interesantemente, los heterodímeros no pueden ser detectados en ausencia del ligando, aún en células donde diferentes isoformas del receptor han sido cotransfectados en altos niveles (184). Los heterodímeros se detectan en presencia de leptina (212). Los receptores de leptina no forman heterodímeros con receptores de citoquinas estructuralmente similares (211).

Los miembros de la familia de receptores de citoquinas son conocidos por ser internalizados luego de la unión del ligando, a través de vesículas cubiertas de clatrina en endosomas tempranos, con el receptor siendo procesado para degradación o reciclado a la superficie celular (215). Se ha estimado que bajo condiciones normales sólo el 5 al 25% de las isoformas totales de LEPR están localizadas en la superficie celular y que la mayoría de las células contienen pools intracelulares (216). Tanto el LEPRa como el LEPRb median la internalización y la degradación lisosomal, en donde los aminoácidos 8-29 del dominio intracelular determinan este proceso (215, 217). Algunos autores han reportado que la internalización y la regulación negativa de los receptores de membrana es mayor para los LEPRb (216). Adicionalmente, la isoforma corta del receptor es reciclada en la célula más rápido (217). En conjunto, estas observaciones proveen una explicación plausible para la resistencia selectiva a leptina ligada a la hiperleptinemia en la obesidad humana, basada en la regulación negativa preferencial de la señalización del LEPRb (215-217).

Principales vías de señalización de LEPR

La vía primaria de señalización del receptor de leptina: JAK/STAT

La **vía de JAK/STAT** comprende una familia de cuatro tirosin quinasas no receptores y siete factores de transcripción de 85-95kDa regulados por la fosforilación en residuos específicos de tirosina y serina. Típicamente, la cascada de señales de transducción de JAK/STAT es activada por interferón, interleuquinas y otras citoquinas cuyos receptores carecen de actividad intrínseca de quinasas (218). El LEPR no posee un dominio intrínseco de tirosin quinasa, y por ello une quinasas citoplasmáticas, principalmente JAK2 a través de los motivos “box 1” y “box 2” (219, 220).

LEPRb señala asociándose de forma no covalente con JAK2, que se autofosforila en numerosos residuos tirosina, al mismo tiempo que fosforila residuos tirosina en el receptor. El dominio intracelular fosforilado del receptor provee un sitio de unión para proteínas STAT, que se activan y translocan al núcleo, estimulando la transcripción. La unión del ligando al receptor activa STAT3, STAT5 y STAT6. Asimismo, la proteína SH2 con un dominio de proteína tirosin fosfatasa (SHP-2), se une a una fosfotirosina del dominio intracelular del receptor, con la habilidad para regular negativamente la fosforilación en tirosina dependiente de la señalización por leptina, como la activación de STAT3 (215).

Los factores de transcripción STAT3 reconocen elementos conservados en el promotor del gen $p21^{waf1}$ y aumentan la expresión de este gen regulador del ciclo celular. STAT3 también se requiere para la regulación de otros genes como c-myc, ciclina D1, Bcl2, Bcl-xL; todos genes asociados a la regulación del ciclo celular, crecimiento y transformación. Posee un rol fundamental durante la proliferación y supervivencia celular en el desarrollo embrionario (221).

Los tres residuos intracelulares de tirosina del LEPRb, exhiben diferentes capacidades para la activación de las señales río abajo. La tirosina 985 (tir⁹⁸⁵) se requiere para la activación de la vía de Ras/Raf/ERK (quinasa regulada por señalización extracelular). La fosforilación en tir¹⁰⁷⁷ o tir¹¹³⁸ es requerida para la fosforilación en tirosina de STAT5; tir¹¹³⁸ se requiere para la activación de STAT1 y STAT3 (99).

Existe evidencia de que la vía de JAK/STAT se halla bajo el control por retroalimentación negativa de proteínas supresoras de la señalización por citoquinas

(SOCSs). La expresión endógena de SOCS3 inhibe la fosforilación de LEPR, proveyendo de un importante mecanismo de control en la señalización del receptor. Sumado a ello, los cambios en la expresión de SOCS3 podrían estar involucrados en el fenómeno de resistencia a leptina (211, 222, 223). Otro regulador negativo de la señalización de leptina está representado por la proteína tirosín fosfatasa 1B (PTP1B), que se ha visto que regula la señal de transducción de la leptina, in vivo e in vitro, vía desfosforilación de JAK2 (223).

La vía de señalización de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos)

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos son Ser/Thr quinasas. Se dividen en tres clases:

- ERK. El peso molecular de las quinasas ERK oscila entre 40-42 kDa y están implicadas en el control de la diferenciación y proliferación celular.
- JNK-SAPK (Quinasa NH2 terminal c-Jun / Proteína quinasa activada por estrés)
- p38-MAPK, junto con la anterior está implicada en la respuesta celular al estrés.

Los miembros ERK de la familia de MAPK son componentes bien definidos de la cascada de señalización Ras/Raf/MAPK y se activan por un amplio rango de estímulos, incluyendo la leptina. La vía de MAPK puede ser estimulada por LEPRa o LEPRb, aunque en menor extensión por el primero (224). Pese a que la zona distal del LEPR no es esencial en la señalización de MAPK, se necesita la porción intracelular del receptor largo para alcanzar la máxima activación. Esto se basa en el hecho de que la leptina es capaz de desencadenar la cascada de MAPK de dos maneras diferentes:

-Vía activación del receptor asociado a JAK-2 por fosforilación en Tyr⁹⁸⁵: Cuando el residuo Tyr⁹⁸⁵ se fosforila activan proteínas JAKs, principalmente JAK2 y JAK1, y proporciona sitios de unión para SHP-2, que junto con Grb-2 y SOS, activan eventos señalizadores posteriores en la misma cascada de señalización (201).

-Mecanismo independiente de la fosforilación del receptor: En este caso, JAK2 aumenta la activación de ERK vía LEPR e independientemente de la fosforilación del receptor. JAK2 se asocia a SHP-2 y a la proteína adaptadora Grb-2 y este complejo activa

los posteriores pasos de la señalización. La forma corta del receptor activa ERK por esta vía (224).

De todas formas, en ambas vías las señales río abajo requieren un dominio catalítico intacto SHP-2. Se ha reportado que una pérdida en la actividad de fosfatasa causa una falla en la fosforilación de ERK (225). Pese a que no han sido completamente elucidadas las moléculas involucradas en transmitir las señales de leptina, las quinasas MEKs (MAPK/ERK quinasas) activadas fosforilan ERK, conduciendo a la expresión final de genes blancos específicos como c-fos y egr-1, que participan en la proliferación y diferenciación celular. Se ha demostrado en células precursoras osteoblásticas que la leptina induce apoptosis a través de la vía de MAPK, activando la fosfolipasa A citosólica y llevando a la liberación del citocromo c y la activación de caspasas 3 y 9 (226). En monocitos la leptina activa el promotor de IL-1Ra (receptor antagonista de IL-1) a través de la MAPK (227). Otro estudio mostró que la leptina estimula la actividad de la óxido nítrico sintasa en tejido adiposo a través de un complejo mecanismo que involucra a la PKA y a la MAPK (228). La leptina también induce la vía p38 MAPK en células de músculo liso vascular, llevando a la hipertrofia (229).

La vía de señalización de PI3K (fosfatidilinositol 3 quinasa)

La PI3K está compuesta de una subunidad reguladora de 85 kDa y una catalítica de 110 kDa que fosforila al fosfatidilinositol (PI). Se han descrito dos subunidades reguladoras, productos de genes diferentes: p85 α y p85 β (230). La actividad de PI3K representa un blanco clave regulado por un amplio espectro de ligandos, especialmente la insulina. La mayor parte de las acciones de insulina involucran la activación de la PI3K, lo cual lo hace un punto relevante de “cross talk” entre las vías de señalización de la leptina y la insulina (201, 229, 231, 232). En la vía de la PI3K se estimulan proteínas quinasas como Akt (proteína quinasa B) y PKC (proteína quinasa C) (215). Se ha reportado que la leptina actúa a través de algunos componentes de la cascada de señalización de insulina. La unión de la insulina a su receptor recluta varios IRSs (sustratos del receptor de insulina) que son fosforilados en tirosina por la actividad de quinasa intrínseca del receptor. La fosforilación

de IRSs aumenta su afinidad de unión por otras moléculas de señalización. Las proteínas IRS activan PI3K a través de la asociación con su subunidad reguladora, p85, aumentando la actividad del dominio catalítico. La PI3K a su vez activa a las Ser/Thr quinasas dependientes de fosfoinosítidos como PDK-1,2, las cuáles activan a Akt/PKB. Ésta es una Ser/Thr quinasa implicada en procesos de supervivencia celular y metabolismo hidrocarbonado (233). Akt posee varios blancos como la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3), una serina quinasa con importantes acciones, como la fosforilación de glucógeno sintasa y C/EBP (234). La activación de Akt vía fosforilación dependiente de fosfoinosítidos puede implicar además a otras proteínas en el mecanismo, como miembros del grupo de quinasas asociadas a proteína G (AGC): p70S6K, PKC y PKA (233). Las proteínas JAKs también están involucradas en la tirosín-fosforilación de IRS mediadas por leptina.

La leptina actúa a través de algunos componentes de la cascada de señalización de la insulina. En el sistema nervioso central así como en el tejido adiposo, páncreas e hígado, la leptina induce una vía de señalización similar a la de la insulina, incluyendo la activación de la fosfodiesterasa 3B (PDE3B) dependiente de PI3K y la reducción del nivel de AMPc intracelular (103).

La regulación de PI3K por leptina fue demostrada por primera vez en células HepG2 (235). La estimulación de PI3K por la leptina ha sido relacionada por ejemplo con la regulación de la PDE3B en la actividad de bombas de Na-K en fibroblastos, en la invasividad de las células epiteliales del colon, en la actividad de la lipasa sensible a hormona de los macrófagos y en la toma de glucosa de las células C2C12 (215). En otros tipos celulares, como adipocitos o hepatocitos de ratas (236) la leptina no aumenta la fosforilación de Akt y sí aumenta la fosforilación de IRS1 e IRS2 asociado a la actividad PI3K. En células mononucleares humanas, la leptina promueve la tirosin-fosforilación de IRS-1, su asociación a p85 y la activación de la vía PI3K (237, 238); además, también activa la p70S6-kinasa (239).

La leptina presenta un efecto dual, estimulador e inhibidor sobre PKC. In vivo, la secreción de insulina disminuye en respuesta a leptina, quizás consecuencia de la disminución en la liberación de insulina desde los islotes pancreáticos en respuesta a la

estimulación de PKC (240). Sin embargo, la leptina no disminuye la secreción de insulina inducida por agentes que incrementan los niveles de AMPc intracelulares (241).

El AMP cíclico activa la PKA, que representa un punto de intersección entre distintas vías de señalización (242). El metabolismo del AMPc y GMPc está controlado por una familia de fosfodiesterasas (243). La leptina participa en la regulación de la PDE3B disminuyendo los niveles de AMPc. Así, en células β pancreáticas, inhibe la secreción de insulina estimulada por el GLP-1 (péptido-1 similar al glucagón). En el hipotálamo, la vía de transducción de la leptina PI3K/PDE3B/AMPc interactúa con la cascada JAK2/STAT3 (236).

Vía de la AMPK (proteína quinasa activada por 5'-AMP)

Se ha establecido claramente que la leptina estimula la oxidación de ácidos grasos ejerciendo así un efecto protector contra la lipotoxicidad en tejido no adiposo (244). Sin embargo, los elementos de señalización que contraponen la lipotoxicidad no fueron bien comprendidos hasta que se descubrió una vía nueva participante en la acción de leptina en el metabolismo (245). Se observó que la leptina activa selectivamente la subunidad catalítica $\alpha 2$ de la AMPK en músculo esquelético, lo cual estimula la oxidación de los ácidos grasos, bloqueando el efecto de la ACC (acetil CoA carboxilasa). La AMPK representa una enzima heterotrimérica que funciona como combustible para monitorear el estado energético de la célula (245, 246). La activación de AMPK representa una señal para silenciar los caminos anabólicos y para promover los procesos catabólicos en respuesta a una disminución en la relación ATP/AMP fosforilando enzimas claves intermediarias del metabolismo. En paralelo con la activación de AMPK, la leptina suprime la actividad de ACC estimulando por tanto la β -oxidación en músculo por desinhibición de CTP1 (carnitina palmitoil-transferasa 1). Las vías que emplea la leptina para incrementar los niveles de AMP y activar AMPK no se encuentran totalmente definidas. La activación directa de AMPK por la leptina también explica al menos en parte los descubrimientos de que la leptina aumenta tanto in vivo como in vitro la toma de glucosa y el metabolismo (103).

En la Figura 13 se muestra un esquema de las distintas vías de transducción involucradas en la acción de leptina.

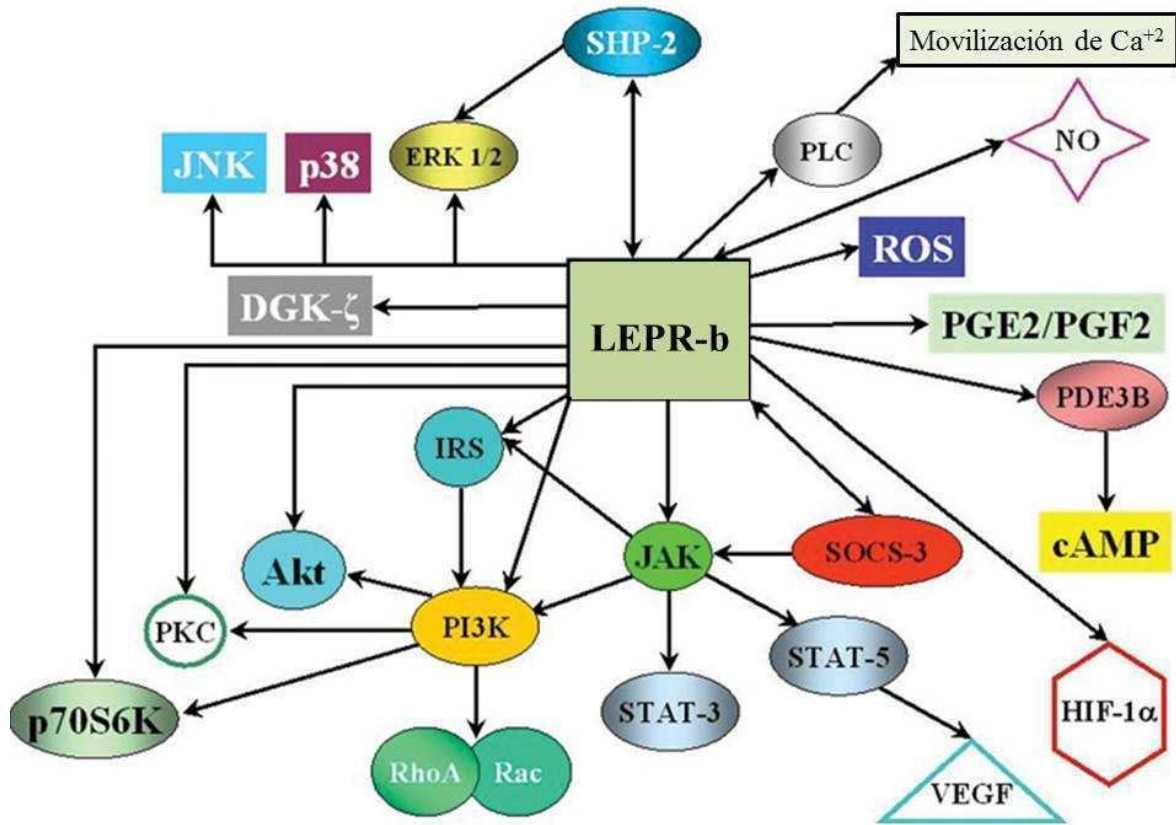


Figura 13. Vías de señalización reportadas de ser reguladas por la unión de leptina a su receptor. El diagrama esquemático resume los numerosos y diversos caminos en los cuales se ha demostrado que está involucrada la leptina. DGK: diacilglicerol quinasa; PG: prostaglandina; PLC: fosfolipasa C; ROS: especies reactivas de oxígeno. Modificado de Sweeney, G, 2002 (215).

Leptina y Reproducción

Luego de su descubrimiento, las investigaciones se dirigieron rápidamente a determinar los roles fisiológicos de la leptina. Se sabe que los ratones obesos *Lep/Lep*,

además de estar afectados por hiperglicemia, hiperinsulinemia y otras disfunciones metabólicas, son infértiles. Mientras que la restricción en la dieta puede restaurar el peso corporal normal en los ratones Lep/Lep, no es posible que recuperen la fertilidad. Sin embargo, la administración de leptina disminuye el peso a niveles normales y reestablece la fertilidad. Estos fueron los primeros indicios de que la leptina estaba asociada con la reproducción. Estudios previos también habían demostrado una relación con la pubertad, dado que la administración de leptina a ratones prepúberes normales causaba adelanto en el inicio de la pubertad. Rápidamente, fue demostrado que la leptina no sólo se expresaba en tejido adiposo sino también en placenta y se extendieron los estudios a las interacciones del polipéptido con la biología reproductiva incluida la gestación. Las investigaciones se expandieron a todos los aspectos de la función reproductiva femenina y masculina de la leptina (247).

Leptina y pubertad

La pubertad es el período de vida donde el organismo adquiere la capacidad para la reproducción (248). Su inicio está determinado genéticamente (249), aunque, condiciones como la situación geográfica, exposición a la luz, el peso corporal y los estados nutritivos, son factores importantes que afectan la llegada de la pubertad. La restricción energética retarda la pubertad y las mujeres con bajo porcentaje de grasa corporal sufren infertilidad (248) y bajos niveles de leptina (250, 251).

Ha sido demostrado que la leptina es capaz de acelerar la llegada de la pubertad en ratones hembras normales (247, 252). Los ratones prepúberes normales inyectados con leptina se reproducen antes, mostrando una maduración más temprana del tracto reproductivo. El tratamiento con leptina no parece interferir con el éxito en la ovulación, embarazo o parto, (247, 252) y más aún, el efecto de leptina en la pubertad puede ocurrir sin cambios en el peso corporal (252). Las concentraciones de leptina en suero aumentan durante el período pubertal en ratones (247) así como la secreción antes de la pubertad en varones (253). Esto sugiere la posibilidad de que exista un aumento en la sensibilidad a leptina durante el desarrollo temprano, que podría ejercer un control sobre el tiempo de la pubertad. Cuando se limita la grasa corporal, las concentraciones séricas de leptina decrecen en la maduración de los niños (254). Dado que las concentraciones de leptina en

el suero frecuentemente acompañan la resistencia a leptina en la obesidad (255), los altos niveles de secreción de leptina en niños jóvenes (254) podría reflejar la resistencia relativa a leptina. Esta resistencia podría ser útil para mantener los altos niveles de ingesta de comida y de crecimiento, así como para prevenir la pubertad prematura.

Durante las fases de la pubertad, los niveles de leptina presentan cambios con diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres exhiben un aumento firme en los niveles de leptina en suero a lo largo de la pubertad, mientras que en hombres el pico de leptina aparece justo antes de ella (253), precediendo al aumento de testosterona libre, GH e IGF-I (250). Este dimorfismo sexual en los niveles plasmáticos de leptina se debe a que los estrógenos estimulan la producción de leptina (de ahí los altos niveles de leptina en mujeres durante las fases tardías de la pubertad) y los andrógenos la suprimen (por eso la disminución de leptina en suero en hombres después de la elevación prepuberal inicial (250, 253, 256). Por otro lado, las mujeres poseen el pulso de leptina mayor que los hombres, siendo la variación diurna importante para la regulación de la menstruación (257). La concentración sanguínea crítica de leptina para mantener la menstruación es alrededor de 2 ng/ml (0,12 nM) (258).

Función de la leptina en la fertilidad

La importancia de una ingesta nutritiva adecuada en el mantenimiento de la función reproductiva ha sido estudiada y establecida (259, 260). Diversas hormonas pueden actuar como posibles señales de estado nutricional para el sistema reproductivo (261). Desde el descubrimiento de la leptina, se ha creído que esta hormona sería el indicador del estado nutricional que permite a los procesos reproductivos proceder. La administración exógena de leptina rescata de la esterilidad a ratonas Lep/Lep y eleva significativamente los niveles en suero de la LH, aumenta el peso del ovario y uterino y estimula algunos aspectos de la histología uterina y del ovario (262). La esterilidad de los machos no puede ser revertida por restricción en la dieta, pero los ratones Lep/Lep tratados con leptina pueden fertilizar a las hembras normales (263), y el tratamiento con leptina aumenta significativamente los pesos testiculares y seminales y eleva el número de espermatozoides comparado con los controles (262, 263). La acción de leptina incluye la regulación de la liberación de esteroides por efecto directo en las células de granulosa (264). Pese a que la leptina puede

actuar directamente en el útero y las vesículas seminales, es probable que la leptina estimule las gónadas para incrementar la producción de esteroides. Esto conduce a la estimulación de los tejidos sensibles a hormonas esteroides (262, 263).

Se han reportado efectos beneficiosos en el empleo de leptina en condiciones de niveles bajos de la hormona FSH. Los estudios sugieren que la leptina es requerida para la normal función reproductiva y neuroendócrina y podría ser de utilidad clínica en el tratamiento de deficiencia en leptina de mujeres con amenorrea hipotalámica (265).

La leptina y las gónadas

Leptina y ovario

Varios estudios han fijado su atención en el ovario, donde la expresión del LEPR es abundante (266, 267). La leptina actúa de forma directa en el ovario (268-270). Se ha identificado ARNm de leptina y su receptor en varios tipos celulares del ovario. La leptina y su receptor se producen en el folículo ovárico humano (células granulosas y células de la teca) (267, 271-273), en cuerpo lúteo (272, 273), en oocitos (273, 274) y está presente en el líquido folicular (275).

La granulosa de los folículos antrales contiene leptina en concentraciones comparables a las del suero o plasma a pesar de no tener suministro de sangre directa (267). Así, existe una correlación entre los niveles de leptina en líquido folicular, masa de grasa corporal y niveles sanguíneos de leptina. Sin embargo, hay variación en la concentración de leptina interfolicular, lo que podría explicarse por la secreción local de leptina (276).

Los estudios *in vitro* realizados en células de la teca y la granulosa mostraron que la leptina posee un efecto negativo sobre los esteroides ováricos. En particular, se ha encontrado que la leptina inhibe la expresión de progesterona y 17β -estradiol inducidos por insulina en células de la granulosa bovinas; que previene de la secreción de progesterona y androstenediona inducidas por insulina en células bovinas de la teca; y que interfiere en la liberación del estradiol en células de la granulosa en ratas (266, 277). Si los niveles incrementados de leptina interfieren con el normal desarrollo del folículo y reducen la

producción de estradiol no habrá estímulo adecuado para la liberación de LH, lo cual resultará en una anovulación (278).

El sistema de IGF/IGFBP está implicado en la mediación de la acción de la leptina sobre el ovario (279). Así se contribuye al desarrollo de un ambiente folicular óptimo para la maduración del oocito durante el período preovulatorio (280).

La leptina ejerce efectos parácrinos en las funciones ováricas y sobre el oocito. Favorece el desarrollo de oocitos humanos fertilizados (281).

Leptina y testículos

La primera identificación del receptor de leptina en testículos fue realizada por Hoggard, que detectó el ARNm del dominio extracelular en células espermáticas murinas y en células de Leydig. El pasaje de la leptina a través de la barrera hemato-testicular es por un proceso pasivo y no saturable (282). En ambos tipos celulares la leptina ejerce un rápido efecto de inhibición de la testosterona estimulada por LH (283). La leptina posee el potencial para modular las vías parácrinas que controlan la esteroideogénesis testicular estimulada por gonatropinas, lo cual es análogo a lo que sucede en ovarios (284). Estudios en ratones han demostrado que las células germinales de ratones expresan LEPR en función del estadio y de la edad. La leptina poseería efectos adicionales en los testículos, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células germinales y la pérdida de éstas funciones podría estar involucrada en la patogénesis de infertilidad observada en los ratones deficientes en leptina (285).

Leptina en el embarazo

Numerosos estudios han documentado que los niveles de leptina en suero están elevados durante el embarazo humano (183, 286-289). El incremento de leptina en el primer trimestre antes de cualquier incremento detectable en el peso corporal debido al progreso del embarazo, implica que factores distintos al aumento de la adiposidad modulan los niveles de la hormona. Los niveles de leptina se elevan junto con los estrógenos y están correlacionados en el embarazo temprano con los de hCG. El tejido adiposo fetal produce leptina (290); sin embargo la disminución en los niveles neonatales luego del nacimiento

denotan que la placenta cumple un rol fundamental como contribuyente a la leptina fetal (291). La presencia del ARNm de leptina en el sinciciotrofoblasto placentario, sugiere que el aumento en los niveles maternos de la hormona con el avance de la gestación podría originarse allí (120). El ARNm de leptina y el de sus receptores LEPRb y LEPRa son expresados tempranamente (semana 7 a 14) en la gestación, en los trofoblastos (292). Inmediatamente después del parto los niveles de leptina declinan con la eliminación de la placenta. La regulación de LEP y LEPR y su función en la gestación en roedores difieren respecto a los humanos (292-295) y respecto a los primates no humanos (296-298). Pese a que las concentraciones periféricas de leptina aumentan con la edad gestacional en los humanos, el ARNm en el villi placentario es mayor en el primer trimestre que a término (292). En ratas, el ARNm de leptina aumenta entre 4-5 veces sobre el final del embarazo, aunque otros observaron que aumenta en abundancia a lo largo de toda la gestación (299, 300). En ratones, aunque la leptina se expresa en placenta y en el feto (301), la proteína no parece ejercer algún efecto fisiológico en estos tejidos. En consecuencia, Zhao y colaboradores han concluido que la regulación de la leptina en el embarazo es específica de la taxa y que cada orden (Chiroptera, Rodentia, Primate) posee diferentes mecanismos que causan la hiperleptinemia asociada con el embarazo (302).

Un incremento en la cantidad de la isoforma soluble del receptor de leptina y por tanto, en el nivel de leptina unida en la circulación materna ocurre durante el embarazo avanzado (286, 287, 303). Este aumento reduciría la disponibilidad de leptina para los receptores hipotalámicos y prevendría de cualquier influencia inhibitoria en la ingesta de comida durante el período de desarrollo. En el humano, al menos dos isoformas solubles del receptor unen la leptina y potencian el estado de resistencia a la leptina (304, 305). Según un estudio, la placenta humana expresa dos isoformas solubles del receptor de leptina. Los resultados sugieren que el aumento en la expresión del receptor de leptina cumple una función en la regulación de la disponibilidad de leptina en primates (306).

Varias funciones fisiológicas se han descripto para la leptina en el embarazo humano (183, 286-289, 303). La identificación de la leptina y de su receptor en el sinciciotrofoblasto sugiere la existencia de mecanismos autocrinos y paracrinos en un tejido como la placenta, que produce hormonas necesarias para el mantenimiento del embarazo (292, 307). Los citotrofoblastos en cultivo producen leptina y el agregado de leptina

recombinante estimula la liberación de hCG (308). La leptina también estimula la secreción de hCG en explantos de placenta humana; es responsable de la inducción de los pulsos de hCG y aumenta su amplitud (309). La leptina activa la liberación de citoquinas proinflamatorias y prostaglandinas en los explantos de placenta humana (310). La expresión de la leptina y su receptor en placenta humana (311) y en el endometrio uterino (312) y la observación de que la secreción endometrial de leptina es estimulada en presencia de un blastocisto viable, asocia a la hormona con el desarrollo temprano del feto (313, 314) y evidencia su lugar entre los reguladores de la aposición y la adhesión implantatoria (25, 315, 316). Algunos trabajos sugieren que la leptina incrementa la habilidad del oocito para sustentar el desarrollo embrionario y potencia la regulación negativa de la apoptosis en el blastocisto temprano (317).

Dado que el receptor de leptina se expresa en la decidua materna, y el endometrio uterino se ha identificado como un blanco de la acción de leptina, ha surgido la función de la leptina como intermediaria en el diálogo endometrio-embrión (274, 318, 319). La leptina interviene en el desarrollo embrionario, en la implantación y en la regulación del crecimiento fetal (320-322).

En ratones, la leptina es fundamental para los procesos normales de preimplantación e implantación. Es esencial también para el correcto desarrollo de las glándulas mamarias; aunque no se requiere para el embarazo y el parto. En ratones preñados, los niveles de leptina en el suero llegan al pico el día 17 y son mucho más altos que en los ratones no preñados (323).

En humanos, la leptina y su receptor no sólo se expresan en placenta, sino también en el amnios, corion y vasculatura umbilical (287).

Los resultados de varios estudios sugieren que tanto en roedores como en humanos la isoforma soluble del receptor de leptina actuaría como el vehículo fisiológico responsable del movimiento transplacentario de la leptina a la circulación fetal, favoreciendo el crecimiento del feto. Así ocurriría el intercambio materno-fetal de leptina, a través de la placenta humana (324, 325).

La leptina facilita la angiogénesis en el embarazo al estimular la síntesis del VEGF en citotrofoblastos en cultivo. La hCG y la leptina sintetizadas por el trofoblasto están probablemente involucradas en el control de la secreción de VEGF en la interfase materno-

fetal. El endotelio vascular es un blanco para la acción de la leptina. La leptina actuaría sinérgicamente con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2 y con VEGF para estimular la angiogénesis (326).

Algunas citoquinas proinflamatorias aumentan las concentraciones de leptina circulante en ratón. Dado que un embarazo exitoso está asociado a una regulación negativa de las citoquinas intrauterinas proinflamatorias como TNF α e IL-1, la leptina podría funcionar como inmunomodulador local en la interfase materno-placental. La leptina en placenta también puede regular la maduración del sistema inmune fetal y del neonato. Tiene efectos específicos en la respuesta de linfocitos T, regulando diferencialmente la proliferación de los T “naive” y de memoria (307).

Asimismo, la leptina ha sido asociada con el desarrollo pulmonar en el feto. La leptina tendría un rol directo en estimular la producción de factores surfactantes en distintas especies (327). El desarrollo de los pulmones en fetos masculinos está retrasado en relación a los femeninos en varias especies (328). Este efecto se relaciona con la inhibición de la síntesis de leptina por andrógenos (329, 330).

En el final del embarazo la producción de leptina proviene también del tejido adiposo fetal (290), posiblemente debido a la prolactina, que estimula la síntesis de leptina por los adipocitos fetales (331). Así, es posible que la leptina fetal tenga un origen dual, primero a través de la placenta, que juega un papel importante en la gestación temprana, cuando el feto carece de tejido adiposo, y luego del tejido adiposo fetal, importante en la gestación tardía. La concentración de leptina fetal se correlaciona con la edad gestacional (332) y se detecta en plasma fetal en la semana 18 de gestación. Los niveles de leptina en cordón son independientes de la producción de leptina placentaria y sirven como marcador de masa grasa en fetos humanos (290).

En el feto las funciones de la leptina parecen extenderse más allá del embarazo. La leptina se produce durante el desarrollo de las células adiposas desde el comienzo de la lipogénesis y diferenciación (286). La expresión de altos niveles de leptina y de su receptor en hueso y cartílagos fetales implica un rol de la leptina en el desarrollo de estos tejidos, que podría estar ligado a la influencia de leptina en la hematopoyesis en el adulto, o representar una función de la hormona en el desarrollo óseo. El receptor de leptina ha sido identificado en meninges y plexo coroide del cerebro fetal. Los elevados niveles de leptina

y su receptor en el feto sugieren que esta proteína podría desempeñar un papel clave en el desarrollo fetal. Un posible rol de la leptina es como factor de crecimiento fetal, o como una señal al feto del estado energético materno. Alternativamente la leptina fetal provee una señal a la madre del crecimiento fetal y del desarrollo. La expresión de leptina en el feto sería multifuncional, con efectos paracrinos y endocrinos (322).

Leptina en la implantación

Los embriones humanos y de ratón en preimplantación expresan ARNm de leptina exclusivamente en la fase de blastocisto (274, 314), aunque, se ha encontrado que la leptina, pero no el ARNm, se encuentra en blastocistos del ratón (319). Los receptores de leptina se encuentran en el embrión a lo largo de todos los estadios preimplantatorios en ratón (314) y en humanos (274).

En ratones *Lep/Lep* la ausencia de leptina disminuye la tasa de embarazo, siendo esencial para el proceso de preimplantación e implantación (323). El empleo de un antagonista o anticuerpo anti-receptor de leptina altera la implantación del embrión (320). El endometrio requiere de leptina para ser receptivo a la implantación de un blastocisto en la fase secretoria media. La expresión de ARNm de leptina en la fase de blastocisto del embrión en preimplantación y su efecto en la activación de la leptina endometrial, sugiere un papel de la leptina en el diálogo entre el blastocisto, el endometrio y la receptividad del mismo (312).

En ratones, la isoforma larga del receptor de leptina se regula de forma diferente en los sitios de implantación e interimplantación, con una mayor expresión en este último. La expresión temporal y espacial del receptor de leptina puede ser un mecanismo para establecer el entrecruzamiento molecular clave entre el endometrio y el blastocisto en el momento de la implantación (319).

La leptina incrementa de forma dosis dependiente la secreción de MMPs, favoreciendo la invasión a la pared uterina (25).

Expresión y regulación de la leptina en placenta

Tal como se ha mencionado previamente, la leptina es producida en placenta a niveles similares a los de tejido adiposo durante un embarazo normal (120, 302, 307, 322). La expresión del gen de leptina puede ser detectada en placenta humana por northern blot (120).

La leptina es expresada en sinciciotrofoblastos que están expuestos a la sangre materna y en las células endoteliales vasculares fetales que están en contacto directo con la sangre fetal (307, 333).

La leptina que se sintetiza en placenta es en el 95% liberada en la circulación materna y 5% en la circulación fetal (290, 334). La tasa de liberación de leptina al lado fetal es mucho mayor que aquella para otras hormonas derivadas de placenta como la hormona lactógena placentaria (HPL) y la hCG (334).

La presencia de leptina y de sus receptores en los tejidos placentarios indica que la hormona puede ejercer acciones biológicas localmente o en sitios adyacentes a su síntesis. Una vez unida a su receptor, la leptina desencadena efectos locales, o periféricos, opuestos a sus efectos centrales en el hipotálamo. La leptina induce la producción de hCG en células trofoblásticas (35). También estimula la mitogénesis, la toma de aminoácidos y aumenta la síntesis de EMP y MMP (25, 335). Estos efectos están relacionados con la propiedad de leptina de regular el crecimiento placentario, lo cual podría llevar a hipertrofia placentaria en condiciones de sobreproducción de leptina. La leptina también estimula la angiogénesis en cultivos primarios de células endoteliales humanas (159).

En el promotor de leptina, la región 5'flanqueante parece poseer todos los elementos necesarios para la transcripción basal del gen y para funcionar como promotor. Éste, incluye el motivo TATAA, tres motivos GC, un sitio de unión de AP-2 (proteína activadora-2) y un motivo C/EBP (336, 337). Incluso con 300 pares de bases (pb) se observa una mayor actividad transcripcional que con el fragmento completo de 3 kb, por lo que la región más lejana al sitio de iniciación podría poseer elementos inhibitorios de la transcripción. Análisis BLAST en la región promotora de 3 kb revelaron dos secuencias repetitivas MER11 y Alu desde -2514 a -1545 y desde -1364 a -1046. Se encontraron también sitios de unión para factores de transcripción como Sp1 (proteína estimuladora 1),

CRE (elemento de respuesta a CREB) y GRE (elemento de respuesta a glucocorticoides) (336).

La leptina detectada en placenta humana se considera idéntica a la leptina de origen adiposo, en relación al tamaño, la carga y la inmunoreactividad (113). El mismo promotor es utilizado en la transcripción en tejido adiposo y en placenta humana; sin embargo, se han identificado complejos de proteínas-ADN involucrados en la transcripción trofoblástica específica del gen humano de leptina (338). Se conoce un intensificador (“enhancer”), río arriba del gen, que es activo en células de coriocarcinoma BeWo y JAR, pero no en células adiposas ni en HeLa. La porción mínima para su activación es de 60 pb. Esta región presenta un elemento repetitivo MER11. La inserción de este elemento pudo haber sido el evento evolutivo que produjo el aumento significativo de expresión de leptina en placenta (339, 340). Estos elementos pueden tener al menos 100 pb y se ubican entre 1500-3000 veces en el genoma humano, pero no están presentes en el genoma murino. Esto podría proveer de una explicación para la expresión de ARNm en placenta humana pero no en placenta murina (339).

Los análisis de unión revelan tres sitios de unión de proteínas en la región intensificadora de placenta, que han sido designados como elementos intensificadores de leptina 1, 2 y 3 (PLE 1-3). Las proteínas de unión a PLE3 se han encontrado en células JEG-3 y en extractos nucleares de placenta pero no en extractos de fuentes no placentarias. Al triplicar el elemento PLE3 se intensificó fuertemente la expresión de leptina en células de coriocarcinoma pero no en HeLa. PLE1 y PLE2 no compitieron con PLE3 por la unión de proteínas. La proteína que une a PLE3 parece ser un factor de transcripción novedoso específico de placenta. Esto implica que la leptina placentaria es diferencialmente regulada de la leptina adiposa (339). Por otro lado, cuando se suprime la región del promotor entre -1546 y -1951, la expresión de leptina en células JEG-3 disminuye drásticamente, lo que sugiere la presencia de un intensificador de la transcripción en esa zona (339).

Ebihara y colaboradores demostraron que secuencias de ADN entre -1885 y -1830 del gen de leptina están involucradas en la transcripción trofoblasto-específica en humanos; y esa secuencia no presenta consenso con la de unión del factor C/EBP α (183).

También se identificó al menos un elemento de respuesta a hipoxia (HRE) en el promotor de leptina, localizado entre los -120 y -116 pb. Asimismo, existen evidencias de

que el promotor del gen de leptina posee un elemento de respuesta a insulina (IRE) localizado en -720 a -150 pb (341).

Moléculas involucradas en la regulación de la expresión de leptina

En placenta, la expresión de leptina se halla sometida a una fina regulación, la cual varía en función de los diversos factores presentes y de la situación metabólica del tejido. Ensayos con el gen reportero de luciferasa han permitido investigar directamente la activación del promotor del gen LEP (338, 339). En la Figura 14 se pueden visualizar los distintos reguladores de la expresión de leptina en placenta.

La presencia de elementos de respuesta a AMPc y a glucocorticoides en el promotor de leptina sugiere la modulación en la expresión del gen por dichos factores (311). La ingesta crónica de corticoides disminuye el apetito por mecanismos poco claros que podrían estar mediados por el aumento en los valores de leptina (342). En células trofoblásticas de placenta humana la liberación de leptina es inducida por glucocorticoides (311). No obstante, pese a estimular la síntesis de leptina en placenta, los glucocorticoides podrían comprometer los mecanismos de transporte, posiblemente a través de efectos sobre la expresión del receptor (325). Los glucocorticoides también retardan el crecimiento fetal y placentario (343).

En ratas, la exposición excesiva a glucocorticoides durante el desarrollo fetal tardío causa IUGR, junto con hipertensión e hiperinsulinemia en la madurez (344). El pasaje transplacentario de leptina materna aumenta significativamente en la rata preñada a término, siendo la principal fuente de leptina fetal (324, 325). En ratas preñadas, los glucocorticoides regulan positivamente la expresión del receptor en placenta (292). La administración de dexametasona durante el tercer trimestre del embarazo disminuye la masa placentaria y el peso fetal en el día 21 de gestación, causando hiperleptinemia materna e hipoleptinemia fetal. Suprime la expresión de leptina placentaria pese a que incrementa la expresión de receptor circulante de leptina (344). Por otro lado, el tratamiento materno con dexametasona disminuye la cantidad de ARNm del receptor, tanto en tejido adiposo de cerdos como en placenta de rata. En mujeres adolescentes, los niveles aumentados de cortisol se correlacionaron fuertemente con las concentraciones de receptores circulantes, lo cual indica la regulación a nivel de escisión proteolítica del

receptor unido a membrana. Interrupciones en la señalización de la leptina se relacionan a una inhibición directa en la vía de JAK/STAT (292).

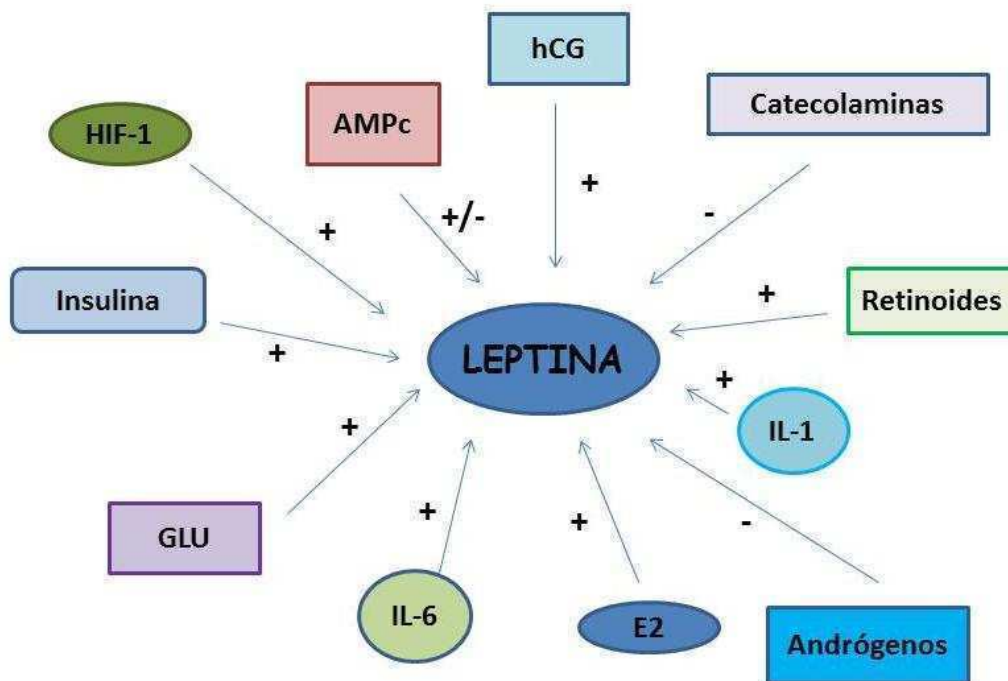


FIGURA 14. Reguladores de la expresión de leptina. Diagrama esquemático de las moléculas que se han descrito capaces de inducir (+) o inhibir (-) la expresión de la proteína. GLU: glucocorticoides; E2: estradiol.

En células BeWo y cultivos de explantos de placenta humana a término, la expresión y producción de leptina es incrementada con tratamiento con forskolina así como con forbol acetato miristato (PMA). Esto demuestra el incremento en la producción de leptina a través de PKA y PKC en cultivos de células trofoblásticas humanas (345). La vía de la PKA juega un papel fundamental en la señalización de varias hormonas de la placenta, como epinefrina, prostanoïdes y hCG. De acuerdo con esto, se encontró que la activación de la PKA, a través del tratamiento con $(\text{Bu})_2\text{AMPC}$ o con forskolina lleva a un aumento en la secreción de leptina en explantos de placenta humana a término. También se hallaron aumentados los niveles de ARNm de leptina (311).

Las células citotrofoblásticas en cultivo del primer trimestre producen leptina en cantidades considerables y esta secreción es estimulada por IL-1 α , estradiol e IL-6 (287).

La insulina es un fuerte inductor de la producción de leptina en placenta humana. Ésta contiene gran número de receptores de insulina y responde efectivamente a la hiperinsulinemia con un aumento en la toma de glucosa y en la fosforilación. Es posible que la secreción de la leptina placentaria sea regulada por insulina. Se ha demostrado que existe un aumento de 3 a 5 veces en la expresión de leptina en placenta en mujeres diabéticas tratadas (346).

Ha sido publicado que la hipoxia induce la transcripción y secreción de leptina en tejidos de placenta in vivo e in vitro, por un mecanismo en el que se halla involucrado el factor de respuesta a hipoxia, HIF-1 α . En normoxia, HIF-1 α se degrada constitutivamente por el proteosoma 26S, mientras que se estabiliza y se acumula en condiciones de hipoxia. El sitio de unión de Sp1 es un blanco para MAPK. Las MAPK están involucradas en la activación de HIF-1 α a través de la fosforilación de la proteína inactiva (341). Bajo condiciones de hipoxia, HIF-1 α es activado también vía PI3K/Akt (103). Células BeWo tratadas en condiciones de hipoxia (5% O₂) durante 72 horas aumentan la secreción de leptina tres veces más que las células cultivadas con 20% de O₂ (183).

La síntesis de leptina en placenta puede ser estimulada por la combinación de factores locales, como la hipoxia, junto a factores generales como la hiperinsulinemia. Esto confirma la alta capacidad de la placenta para sintetizar leptina bajo condiciones específicas (341). Se ha demostrado que HIF-1 α actúa en forma sinérgica con la insulina, regulando, vía diferentes elementos transcripcionales, el promotor humano de leptina (347).

Los retinoides también se encuentran involucrados en la regulación de la secreción de leptina por la placenta humana (308).

Un delicado mecanismo regulatorio entre esteroides y hormonas polipeptídicas producidas por el sinciotrofoblasto es básico para mantener el embarazo en el primate. Varios trabajos indican que la secreción de leptina es regulada por hormonas esteroides. A pesar de que sus efectos difieren en función del tejido, la especie, y el método experimental utilizado, hay consenso en las opiniones que apoyan el rol de los estrógenos en el aumento de la transcripción y producción de leptina, y el rol de los andrógenos en inhibir la síntesis del polipéptido (287).

Los estrógenos placentarios aumentan con el avance de la gestación y regulan múltiples vías endócrinas (348). Se ha reportado que los estrógenos activan la producción de leptina a través de la inducción de la transcripción del gen LEP. La hiperleptinemia asociada al embarazo se ha ligado a aumentos potenciales en la producción de leptina por el tejido adiposo materno, bajo la influencia de elevados niveles de estrógenos típicos del embarazo en primates (349).

Progesterona y 17β -estradiol son las dos hormonas esteroideas más importantes producidas por la placenta humana. La progesterona es indispensable para el mantenimiento del embarazo y crucial para un estado quiescente del útero, el cual previene de un parto prematuro. La leptina podría regular algunas de las enzimas que metabolizan el colesterol (precursor de la progesterona) o su transporte. Algunos resultados sugieren una inhibición en la secreción de progesterona inducida por la leptina y mediada por IL-6 (308).

El receptor de estrógenos pertenece a la familia de receptores nucleares. Dos receptores se han identificado capaces de mediar la respuesta a estrógenos, $ER\alpha$ y $ER\beta$. $ER\alpha$ tiene una distribución en los tejidos distintas al clásico $ER\beta$, lo que puede proveer una explicación para la acción selectiva de estrógenos en diferentes tejidos (349). La activación tradicional de un elemento de respuesta estrógenos (ERE) comprende la unión del ligando al receptor, el cual tiene afinidad por secuencias palindrómicas específicas del ADN. De todas formas, ER también media la transcripción de genes por unión a elementos activadores AP1, cuando se une a los factores de transcripción AP1, Fos y Jun. $ER\alpha$ y $ER\beta$ señalizan de maneras opuestas cuando se unen a estradiol en un sitio AP1(349). Saville y colaboradores, demostraron que la regulación de la transcripción por $ER\beta$ -Sp1 es inhibida por estradiol y estimulada por antiestrógenos (350). Estos resultados, combinados con los de Zou y colaboradores, confirman las diferencias funcionales en la regulación transcripcional por estrógenos y antiestrógenos sobre $ER\alpha/\beta$ (351). El promotor Lep contiene regiones ERE así como sitios AP1. Por ello, es probable que en células JEG-3 la activación del gen de leptina ocurra a través de la vía clásica por unión de $ER\alpha$ a ERE y de $ER\beta$ a AP1. La regulación tejido específica de la síntesis de leptina por estrógenos podría depender del tipo y cantidad de ER presente en los tejidos blanco (349).

Dado que la placenta de primates necesita de los andrógenos precursores secretados por el feto para sintetizar estrógenos, la remoción del feto en experimentos en monos

babuinos, redujo drásticamente las concentraciones de estrógenos en el suero. Coincidentemente, los niveles de ARNm de leptina y de la proteína se redujeron en el tejido adiposo materno y aumentaron en los tejidos vellosos placentarios, sugiriendo que los estrógenos afectan la producción de leptina de manera tejido-específica (349).

Investigaciones recientes han demostrado que el E2 induce la expresión de leptina en células placentarias a través de efectos genómicos y no genómicos, actuando mediante un entrecruzamiento entre el ER α y las vías de señalización de MAPK y PI3K (37).

Los efectos por altos niveles de andrógenos en el embarazo son desconocidos (352).

La secreción de leptina es estimulada significativamente por GnRH-II y a su vez la leptina, estimula la secreción de hCG en explantos placentarios (309, 353). Considerando que la IL-6 y la IL-1 son reconocidos como promotores de la secreción de hCG por el trofoblasto humano a término, y que los resultados muestran que se requieren bajas dosis de leptina para estimular la secreción de IL-6, en comparación con las de hCG, ciertos estudios han sugerido que el efecto estimulante de la leptina en la secreción de hCG podría ser mediada, al menos en parte, por la IL-6 (308).

Existe evidencia de un efecto inhibitorio de la leptina en la producción de progesterona en las CTBs. Esto, y la correlación negativa encontrada entre la hCG y la secreción de progesterona, luego de la estimulación con leptina, sugieren que el polipéptido podría ser el vínculo perdido entre ambas hormonas (308).

Se encuentran diferencias significativas con respecto a los mecanismos que influyen en la síntesis de la leptina durante el primer y el tercer trimestre. Bajoria y colaboradores han concluido que el potencial efecto en cada período gestacional debe ser dilucidado a fin de entender el papel de la leptina en el embarazo (288).

La leptina y la gonadotropina coriónica humana

La hCG es una hormona glicoproteica comprendida por dos subunidades, unidas no covalentemente, α y β . Media su acción a través del receptor LH/hCG y su función principal es la de mantener la producción de progesterona por el cuerpo lúteo durante el embarazo temprano; sin embargo, la hCG, al ser una de las señales embrionarias más tempranas, posee muchas otras funciones. Es expresada ya en el estadio embrionario de ocho células y secretada localmente en altas concentraciones por el blastocisto que penetra

en la cavidad uterina. Se considera como una de las más importantes señales embrionarias involucradas en diálogo materno-embionario que regula la implantación (Figura 15) (354, 355). La hCG puede actuar como un factor de crecimiento y diferenciación durante el embarazo. Su modo de acción puede ser dividido en tres fases secuenciales. Durante la primera fase, que comienza en el estadio de blastocisto y dura hasta que llega a suero, la hCG actúa preferencialmente de una manera parácrina. Estimula parámetros de diferenciación (IGFBP-1, prolactina) y de implantación (LIF, M-CSF). También induce VEGF, sugiriendo un rol de hCG en la vascularización y la placentación. La segunda fase, endocrina, de la acción de la hormona está determinada por la aparición de hCG en el suero materno (38). Niveles significativos de hCG pueden ser medidos en la sangre materna 10 días después de la ovulación (356). Este incremento causa el aumento de la progesterona. Otras funciones endocrinas de la hCG incluyen su actividad tirotrófica intrínseca y la modulación de las funciones testicular, ovárica y adrenal en el feto. La tercera fase de la acción de hCG se caracteriza por la expresión de los receptores hCG/LH completos en los trofoblastos. Antes de la novena semana de gestación los trofoblastos humanos expresan una versión truncada del receptor (isoforma de 50 kDa) y son probablemente no respondedores a hCG. Luego, cambia el patrón de expresión a la isoforma completa del receptor (80 kDa), permitiendo a la hCG modular la diferenciación de los trofoblastos (38).

Tanto la hormona luteinizante (LH) como la hCG interactúan con el mismo receptor. Éste es una gran glicoproteína de superficie celular con la estructura característica de la familia de receptores acoplados a proteína G (354, 357). Clásicamente, la unión de hCG a estos receptores genera la transducción de señales a través de la activación de las proteínas G heterotriméricas asociadas. En tejidos gonadales, tal como en la repuesta clásica, luego de la unión de la CG a su receptor, ocurre un incremento de AMPc luego de la activación de la adenilato ciclasa (AC) y una activación subsecuente de la PKA, así como un aumento en el calcio intracelular a través de la vía del inositol trifosfato/fosfolipasa A2 (317, 358, 359). Se ha reportado que la hCG induce la expresión de genes específicos tales como el VEGF, LIF y MMP-9, todos ellos importantes moduladores tanto del sistema inmune como de la supervivencia celular en la interfase materno-fetal (354). La expresión de los receptores de hCG/LH ha sido descrita en diversos tejidos no gonadales como la placenta, el útero, las mamas, piel y otros, sugiriendo que la hormona podría gobernar una

gran cantidad de procesos moleculares asociados con la reproducción. De hecho, en células fetales o maternas, se han detectado distintos efectos de hCG, incluyendo el aumento de la diferenciación trofoblástica y la decidualización, la inhibición de la contractilidad miometrial, y la promoción de la angiogénesis uterina (360).

Los sinciciotrofbastos expresan leptina así como receptores funcionales LH/hCG (361, 362). Previamente se ha demostrado que en explantos placentarios de primer trimestre la liberación de hCG es pulsátil y que esta secreción episódica es estimulada por GnRH y leptina (309, 353). También se ha demostrado que la leptina posee un efecto estimulatorio en la secreción de hCG en cultivos primarios de células trofoblásticas de placenta humana a término y en células trofoblásticas del primer trimestre (35, 308). La acción de leptina sobre la secreción de hCG depende aparentemente del momento de la gestación, no afectando la secreción a término (363), pero aumentando la secreción de hCG por explantos placentarios del primer trimestre. Por otro lado, la secreción de leptina es significativamente estimulada en células citotrofoblásticas tratadas durante 4 h con GnRH-II (309). En este contexto, es probable que los cambios locales en las concentraciones de hCG determinen la expresión de leptina (326).

Aunque se desconoce la vida media de los receptores de LH/hCG en los trofbastos, pareciera ser mucho más reducida que en otros tipos celulares debido a la alta producción de hCG por la placenta (364)

A pesar de que el rol fisiológico de hCG en promover el aumento de AMPc se halla bien documentado, se ha descripto que el receptor LH/hCG puede mediar la activación de las vías de MAPK (365, 366), de JAK y PI3K (367). Se ha sugerido también que la estimulación por LH que promueve la vía de MAPK podría resultar en una desensibilización a la esteroideogénesis estimulada por LH en células de la granulosa (368). En líneas celulares epiteliales endometriales humanas (HES) y en células endometriales epiteliales de baboon, la CG no activa la vía de señalización de AC-AMPc-PKA, pero puede inducir rápidamente la fosforilación de ERK 1/2 de manera PKA independiente (365). Se ha descripto también que las arrestinas cumplen un rol en la desensibilización de los receptores acoplados a proteína G, y que alternativamente eso lleva a la activación de otras vías como la de la MAPK (369).

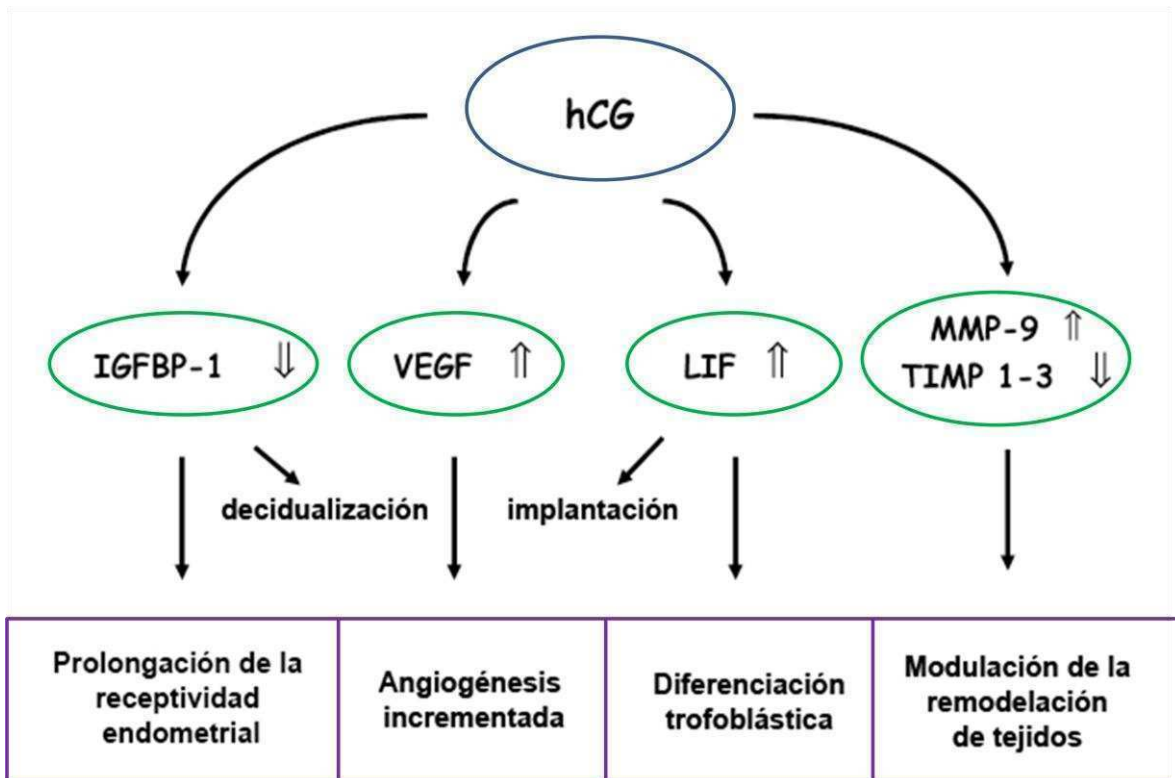


FIGURA 15. Modelo hipotético de las funciones de hCG en la implantación humana. Los efectos coordinados de hCG sobre varias funciones endometriales podrían llevar a la prolongación de la receptividad endometrial, una angiogénesis aumentada, la modulación de los parámetros de implantación y la remodelación de tejidos. Modificado Licht y cols., 2007 (370).

La leptina y el AMPc

Muchas de las funciones atribuidas a los trofoblastos de la placenta humana, incluyendo la producción de varias hormonas del embarazo y el transporte de nutrientes esenciales al feto, se hallan bajo la regulación de segundos mensajeros, incluyendo el AMPc (371). El AMPc es una de las moléculas de señalización más antiguas conocidas. Se ha demostrado que el aumento en el AMPc intracelular resulta en una disminución en la expresión del ARNm de leptina y en la secreción de la proteína en adipocitos de rata (180), y que este efecto inhibitorio es dependiente de la PKA (372). En contraste, se ha observado que la secreción de leptina en células BeWo y en tejido placentario a término cultivado en monocapa, es incrementada por forskolina, un activador de la AC (311, 345). De todas

formas, varios experimentos han provisto evidencia de que el AMPc afecta algunos procesos celulares de manera independiente de PKA (373-375). Han sido bien documentados los profundos efectos que posee el AMPc sobre la función de trofoblastos humanos, como lo demuestran los numerosos estudios in vitro de células trofoblásticas normales y transformadas (376).

Muy poco es conocido acerca de la regulación de leptina por AMPc. El efecto estimulador del AMPc sobre la expresión de leptina se ha reportado en varias células no adiposas, como las células de glioma C6, las células tumorales pituitarias GH3 (377, 378), células tumorales mamarias MCF-7 (349), células gástricas MKN-74 (113), y en tejido placentario coriónico (345).

La PKA posee un rol central en la señalización de varias hormonas en la placenta, tales como la epinefrina, los prostanoides, y la hCG (376). Más aún, existe un grupo grande de hormonas y factores de crecimiento, como el glucagón, TSH, EGF, PDGF, en los que el AMPc posee un papel importante como segundo mensajero (379). La unión de la insulina a su receptor también activa la vía de señalización dependiente de AMPc así como la de MAPK (380-382). Entre los sustratos intracelulares de PKA se encuentra CREB (383, 384). CREB (proteína de unión al elemento CRE) es una proteína transcripcional regulada por AMPc, que se une a elementos consenso del ADN en los genes blanco que responden a AMPc. CREB es importante para la expresión de varios genes de respuesta a AMPc en diferentes tipos celulares y en respuesta a distintas señales (385).

En relación a la vía del AMPc, se ha reportado que la cascada de MAPK es capaz de modular la actividad de PKA a través de distintos mecanismos (386). Las vías de señalización del AMPc/PKA y la de la MAPK regulan procesos en común en la célula y ocurren entrecruzamientos entre ambas vías a múltiples niveles (386-389). En algunos tipos celulares la activación de PKA resulta en la activación de la vía de ERK 1/2, mientras que en otros tipos celulares y bajo ciertas condiciones de cultivo, PKA bloquea la señalización de ERK 1/2 (390). Por otro lado, si bien la fosforilación de CREB en serina 133 se atribuyó inicialmente a la PKA, distintos estudios han establecido que varias quinasas pueden fosforilar a CREB en el mismo residuo aminoacídico. ERK 1/2 no es capaz de fosforilar directamente a CREB pero puede activarlo por fosforilación de miembros de la familia de proteínas quinasas de pp90rsk (proteínas s6 quinasas ribosomales 1-3), que translocan al

núcleo y fosforilan directamente a CREB (391). Por otro lado, el AMPc puede activar la vía de MAPK mediante miembros de la superfamilia de Ras. El AMPc se une a factores de intercambio de guanidina (GEF) y activa Rap1A, que fosforila la MAPK (392, 393). Epac (proteína intercambiadora activada por AMPc) es un factor intercambiador de nucleótidos de guanidina (GEF) para las GTPasas pequeñas tipo Ras, Rap1 y Rap2. Epac fue inicialmente identificado como un factor de señalización mediador del AMPc, que actúa de una manera diferente a la de la clásica vía de señalización de PKA. Existen dos isoformas de Epac, Epac 1 (también llamada cAMP-GEF-I) y Epac2 (cAMP-GEF-II), que son productos de diferentes genes en mamíferos pero comparten una extensa secuencia homóloga. Epac1 se expresa en todos los tejidos, mientras que Epac2 tiene una distribución más limitada al cerebro y las glándulas adrenales (392). Se ha reportado que la señalización del AMPc mediada por Epac está involucrada en funciones celulares tales como la diferenciación celular, la secreción/exocitosis, la adhesión celular y las uniones célula-célula (394-396). La importancia fisiológica de la expresión de Epac en la función trofoblástica aún se ignora.

Pese a que el entrecruzamiento entre las vías de PKA-ERK 1/2 ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos exactos involucrados aún son desconocidos. Y en este sentido, aún poco se sabe respecto del “cross talk” existente entre las vías de PKA y MAPK en placenta humana, así como la función de este entrecruzamiento en la estimulación de leptina por AMPc.

Leptina, apoptosis y proliferación

Se conocen muchas citoquinas y factores de crecimiento que influyen la migración de los trofoblastos, la proliferación y su invasión (397). En particular, la leptina ha sido propuesta como una de las moléculas que juegan un papel fundamental en la implantación debido a su efecto estimulador sobre la expresión de MMP en citotrofoblastos (25). Varios estudios han investigado el rol de la leptina en el crecimiento celular. Lang y colaboradores demostraron que la leptina induce la proliferación celular en células hepáticas estelares in vitro a través de la activación de la vía de PI3K/Akt (398).

Otro trabajo demostró que la leptina estimula la proliferación de células endoteliales *in vitro* y la secreción de VEGF (399). La leptina también estimuló la proliferación y la activación de linfocitos T humanos circulantes, cuando se coestimularon con PHA o ConA (concavalina A) (400). Asimismo, la leptina promueve la proliferación y la supervivencia de células humanas mononucleares periféricas de sangre a través de la activación de la vía de MAPK (148, 401). La leptina también induce actividad proliferativa en progenitores hematopoyéticos y osteoblastos, entre otras (139, 402).

Resultados de nuestro grupo han demostrado que la leptina induce la proliferación y la supervivencia celular en líneas trofoblásticas humanas, BeWo y JEG-3 (361). La leptina estimula la progresión del ciclo celular a la fase G2/S. Se sabe que la progresión a través de la fase G1 es acompañada por la expresión de ciclina D, entre otras proteínas (403). Recientemente se ha demostrado que la leptina aumenta la expresión de ciclina D1 en células hepáticas estelares (404). En células trofoblásticas humanas la leptina incrementa la expresión de ciclina D1(361), lo cual es consistente con trabajos que muestran que la leptina regula positivamente la expresión del gen AP-1, el cual promueve la expresión de ciclina D1, resultando en la proliferación del osteoblasto (405).

El rol antiapoptótico de la leptina ha sido demostrado en varios sistemas, como en monocitos, eosinófilos, células vasculares endoteliales, osteoblastos, células de neuroblastoma y células foliculares (148, 406-410). Más aún, se ha publicado que la leptina aumenta la proporción de ovocitos que se desarrollan en blastocistos, y que éstos exhiben un alto número de células y la proporción de células apoptóticas es reducida (317). En cultivos de células de neuroblastoma humano estimulados con leptina, se observó un aumento significativo en el número de células, de manera dosis dependiente. En medio libre de suero, la adición de leptina redujo la muerte por apoptosis. Los efectos antiapoptóticos de leptina requirieron JAK/STAT, MAPK, y activación de PI3K. Estudios de microarreglos (“microarrays”) demostraron que la leptina inhibe la apoptosis a través de una potencial regulación negativa de la caspasa 10 y de TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF) (409).

Se ha demostrado que la leptina aumenta la proliferación en células hematopoyéticas y en células madre embrionarias, así como en linfocitos T CD4⁺ (404).

En células trofoblásticas humanas se ha demostrado que la leptina induce el crecimiento celular y la proliferación mediante la estimulación de síntesis de proteínas por mecanismos que involucran la activación de la maquinaria de transcripción a través de las vías de MAPK y PI3K (411).

Algunos estudios han observado que la leptina no es capaz de impedir la apoptosis en células trofoblásticas afectadas por condiciones patofisiológicas tales como la hipoxia (412), pese a que se conoce el efecto estimulador de la hipoxia sobre la expresión de leptina (413).

Las vías de señalización de PI3K, PKB y mTOR han sido descritas en la regulación de la diferenciación invasiva de los trofoblastos humanos (414). Asimismo, la activación de la vía de PI3K por la leptina ha sido descrita en varios tipos celulares (103, 415, 416). Por otro lado, se ha demostrado que la leptina es capaz de activar la vía de MAPK en diferentes sistemas, mediando la respuesta proliferativa (224, 237, 417, 418).

En la línea celular trofoblástica JAR, la leptina no tiene efecto en la proliferación. Además, no actúa en la ruta apoptótica de la línea celular bajo condiciones de hipoxia ni en presencia de oxígeno (412).

Leptina y su relación con las patologías placentarias

Dado que la leptina promueve la invasividad, su expresión y la de sus receptores es alta en las **ETGs**. Los estudios demuestran que existe una sobrerregulación de la expresión de leptina y de todas las isoformas de su receptor en las ETGs (120, 183). La mola hidatidiforme, el coriocarcinoma y otros neoplasmas trofoblásticos son tumores productores de leptina, aunque se desconoce el papel que juega en la regulación de éstos (419).

En el caso de la **preeclampsia**, la concentración de leptina libre y total se encuentra significativamente elevada en tejidos fetoplacentarios (placenta, amnio y corión) (420, 421). La expresión de leptina en placentas de embarazadas con preeclampsia es más alta que en embarazos controles (183, 421, 422). Los niveles de leptina en suero materno y en plasma fetal aumentan en preeclampsia, particularmente desde la semana 20 de gestación en adelante. La expresión del gen de leptina sólo se eleva en la preeclampsia a pretérmino. (422).

La secreción de hCG está disminuída en preeclampsia lo que sugiere que en los trofoblastos la producción de leptina se regula en forma diferencial a la de hCG (423).

La leptina se asocia con hipertensión materna que puede preceder o no a la preeclampsia. Niveles bajos de leptina en el embarazo pueden indicar insuficiencia placentaria y un aumento en la expresión y secreción de leptina por parte de la placenta puede reflejar estados de estrés de la placenta en casos de anoxia por déficit vascular (420).

En preeclampsia, la hiperleptinemia se vincula con disminución del peso fetal y placentario, por lo que el aumento exacerbado en la circulación periférica materna, junto con la pobre invasión trofoblástica, tipifica el estado de preeclampsia y sirve como marcador de una escasa perfusión e insuficiencia general de la placenta (101).

La **DMG** es otra patología caracterizada por incrementos en la leptina placentaria, con niveles de 3 a 5 veces superior a embarazos normales, en particular durante el segundo y tercer trimestre del embarazo y sobre todo en mujeres tratadas con insulina (346).

En placentas de mujeres con **DMG** y en diabetes mellitus tipo I se sobreexpresan la leptina y una de las isoformas cortas del receptor de leptina en relación a placentas de embarazos normales. Aumenta asimismo, la concentración de receptores solubles de leptina, sobre todo en el tercer trimestre del embarazo, induciendo resistencia a la leptina en la madre, siendo los niveles de leptina en embarazadas con **DMG** mayores que en diabetes mellitus tipo I (346, 424).

El aumento en los niveles de leptina asociados con **DMG** es una respuesta protectora que se opone a los efectos de un desequilibrio de citoquinas proinflamatorias, característico de muchas patologías del embarazo. Los estudios de composición corporal muestran que los fetos expuestos a un ambiente diabético tienen una masa adiposa aumentada al nacimiento. La hiperleptinemia de fetos diabéticos contribuye a una programación alterada en el útero como se observa en el desequilibrio metabólico que se desarrolla después en la madurez (425).

Aún existe mucha discrepancia en relación a las variaciones en los niveles de leptina en placentas de embarazos con **IUGR** respecto a los normales. La falla en la producción y regulación adecuada de leptina podría ser una causa adicional de **IUGR**. Según algunos estudios, los niveles de leptina en el feto con **IUGR** son significativamente menores y, la leptina se supone que es un factor de crecimiento en el desarrollo fetal. Varias

investigaciones han demostrado que los niveles de leptina en placentas de embarazos complicados con IUGR disminuyen en comparación con los de placentas normales (426-430).

Otro estudio, en contraste con los resultados previos, ha revelado incrementos significativos en la expresión del gen de leptina en placentas con IUGR (431, 432). En este contexto, ha sido demostrado que el ARNm de leptina es sobreexpresado en los tejidos placentarios con IUGR, pero sólo cuando el análisis se realizó en las áreas intermediarias o periféricas de la placenta (medidas desde el cordón umbilical) (433).

Por otro lado, se ha encontrado que los niveles de leptina en mujeres con embarazos con IUGR son mayores comparadas con mujeres de embarazos normales (434). Esto podría reflejar el estado de inflamación y estrés crónico en madres con IUGR, predisponiéndolas eventualmente a un estado de resistencia a insulina. Se ha postulado que el flujo sanguíneo uteroplacentario reducido de la IUGR, que conduce a hipoxia fetoplacental, causaría un aumento en la producción de leptina (435). La mayor relación leptina/IBM en IUGR comparada con embarazos normales, podría implicar que existe una predisposición en las madres con IUGR a producir más leptina. Así, es posible que los fetos con IUGR posean una predisposición genética para una leptina aumentada (434).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las técnicas de fertilización o reproducción asistida, han ido evolucionando a fin de brindar soluciones a los problemas que aparecían en parejas infértiles. Es así como las principales soluciones se dieron para la etapa de la fertilización, propiamente dicha. Sin embargo, estas estrategias no aseguran el éxito en llegar con un buen embarazo a término. Y es aquí donde aparecen las complicaciones relacionadas con la implantación. En las mujeres abortadoras espontáneas recurrentes, muy probablemente el problema no se encuentre a nivel de fertilización, sino en la comunicación bidireccional endometrio-embrión.

La implantación involucra una señalización recíproca entre el blastocisto y el útero, altamente regulada. Este proceso incluye una delicada modulación de mecanismos de proliferación, diferenciación, apoptosis e invasión de células trofoblásticas. La identificación de moléculas que afecten el complejo mecanismo de señalización entre el embrión y el útero, podría ser útil para elaborar nuevas estrategias para el diagnóstico y tratamiento de mujeres con problemas de implantación, abortos recurrentes espontáneos e infertilidad sin causa aparente.

En este contexto surge la hipótesis del presente trabajo, basada en las siguientes premisas obtenidas tanto de datos de la literatura así como de nuestros resultados preliminares:

- La leptina si bien originalmente fue descripta como una hormona central en la regulación de la reserva energética del organismo, se ha encontrado que posee importancia fisiológica en la reproducción y embarazo.
- La placenta es un sitio importante de producción de leptina y blanco de su acción y correlaciona con la expresión de metaloproteasas necesarias para promover el proceso invasivo de la implantación.
- En diversas patologías reproductivas (abortos recurrentes, coriocarcinomas, molas hidatiformes, preeclampsia, diabetes), los niveles de expresión de leptina cambian dramáticamente, aunque se desconoce ampliamente su regulación.

-Resultados de nuestro laboratorio han situado a la leptina como una hormona capaz de estimular la proliferación celular e inhibir los procesos apoptóticos en células placentarias. Otros reportes han demostrado similares resultados para otros sistemas.

La leptina surge como uno de los candidatos a estudiar en los problemas reproductivos relacionados con la implantación. De esta manera, planteamos que la leptina, como citoquina placentaria, sería una molécula clave regulatoria del proceso implantacional, promoviendo el crecimiento y desarrollo en las primeras etapas embrionarias. Este proceso debiera ocurrir de manera concertada con los niveles de las diferentes señales que controlan el diálogo materno-fetal.

OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo ha sido desarrollado con el fin de estudiar la acción de leptina en placenta así como regulación de su expresión por distintos efectores placentarios; y para intentar dilucidar los mecanismos involucrados en dichos procesos.

OBJETIVOS PARTICULARES

SECCIÓN I

- Estudio de los caminos de transducción de señales involucrados en la acción de leptina en placenta
- Estudio de la participación de leptina en el mecanismo de apoptosis celular placentaria. Vías de señalización involucradas.

SECCIÓN II

- Estudio de la acción de hCG y AMPc sobre la expresión de leptina en placenta.
- Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de leptina por hCG y AMPc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Todos los ensayos se realizaron con las líneas celulares de coriocarcinoma humano JEG-3 y BeWo, mantenidas en medio DMEM-F12 conteniendo suero fetal bovino (SFB) al 10% (Bionos SRL), anfotericina 50 U/ml, penicilina-estreptomicina 50 U/ml, y suplementado con glutamina 4 mM y piruvato 1 mM (Invitrogen). El medio se preparó con agua bidestilada. Los cultivos se manipularon en estrictas condiciones de esterilidad, dentro de una cámara de flujo laminar. Los cultivos se hicieron crecer en monocapa en botellas de 75 ml, a 37°C y atmósfera de 5% CO₂. Fueron renovados con una periodicidad aproximada de 72 horas (fase estacionaria de crecimiento), pasándolos a nuevas cajas, previo despegado de las células por tratamiento con tripsina (Invitrogen). Para ello, se eliminó por aspiración el medio de cultivo, las células se lavaron con 2 ml de PBS y se trataron con 1 ml de tripsina durante 2 minutos a 37°C. A continuación, se resuspendieron en 10 ml de medio fresco, aspirándolas y bajándolas repetidas veces con una pipeta de punta fina.

Congelamiento de células

Para la preservación de stocks de las líneas, se prepararon suspensiones celulares de las mismas. A tal fin, una vez despegadas por la tripsina, y cuantificadas, las células fueron centrifugadas y resuspendidas a una densidad de 5×10^6 células/ml en suero fetal bovino conteniendo DMSO 10%. La suspensión se dividió en alícuotas en crioviales, se los enfrió lentamente hasta una temperatura final de -70°C y se los transfirió a N₂ líquido.

Determinación del número de células

Seguido al tratamiento con tripsina y dilución de las células en el medio, se efectuó el conteo de las mismas, colocando una gota de la suspensión obtenida, en el borde de un cubreobjeto cubriendo la cámara de Neubauer. El conteo de las células se realizó con

microscopio óptico a un aumento de 40X, considerando los cuatro cuadrados grandes de las esquinas de la cámara.

El número de células totales por ml se calculó según la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = N \times 1/4 \times 1000 \times 10$$

, donde N = número total de células en los cuatro cuadrantes.

Diseño de los tratamientos realizados en las líneas celulares

Los tratamientos realizados en cada experimento se detallan en la leyenda de las figuras mostradas en el apartado de resultados. De manera general, las células BeWo o JEG-3 fueron incubadas en medio DMEM-F12 1% SFB con hCG (Laboratorio Elea), (Bu)₂cAMP, IBMX, H89, SQ22,536, PD98059, wortmanina (Sigma Chemical Co) durante 48 o 72 h tanto en los experimentos de Western blot como en los ensayos de determinación de actividad promotora. La hormona hCG se preparó en el solvente provisto por el fabricante. El (Bu)₂cAMP así como los inhibidores IBMX, H89 y SQ22,536 fueron preparados en soluciones acuosas. El PD98059 y la wortmanina se prepararon en DMSO. En todos los experimentos se incluyó una muestra control que contiene el vehículo utilizado.

En los experimentos de señalización o de determinación de proteínas apoptóticas, las células fueron incubadas en medio DMEM-F12 1% o 0% SFB, con leptina recombinante (R&D Systems) preparada en solución HCl 15mM/NaOH 7,5mM. El tiempo de tratamiento fue de 15 minutos para la determinación de fosforilación y de 72 h para Western blot de proteínas apoptóticas.

En los experimentos diseñados para disminuir la expresión de leptina endógena, se utilizó un oligonucleótido antisentido (AS) (Sigma Co), complementario a los 5 primeros aminoácidos de la secuencia del ARNm de leptina. La secuencia es: GCACAGGGTTCCCCAATGCAT. Se probaron diferentes concentraciones del AS desde 0,5 μM hasta 2 μM durante 24 a 96 h de incubación. Los tratamientos con el AS se

realizaron en DMEM-F12 1% SFB. En estos experimentos se incluyó un control con un oligonucleótido conteniendo secuencias al azar.

Obtención y procesamiento de los explantos de placenta

Placentas humanas a término de embarazos normales se obtuvieron luego de partos naturales o cesáreas e inmediatamente se colocaron en cubos con PBS frío. Se transportaron al laboratorio y se lavaron 3 veces con PBS estéril de manera de remover la sangre excedente. Se eligió para extraer los explantos el tejido veloso libre de infarto, calcificación o hematoma. Con pinzas y tijera de cirugía se extrajeron muestras de al menos 5 cotiledones a una distancia media entre la base de la placenta y las vellosidades coriónicas. De estas muestras se cortaron trozos de explantos de aproximadamente 10-15 g y fueron colocados en PBS para un último lavado. Ninguna de las pacientes donantes sufría de embarazo anómalo. Este estudio está aprobado con el consentimiento escrito de las donantes y por el comité de ética local.

Tratamiento de los explantos de placenta

Los explantos de placenta se distribuyeron al azar en tubos Eppendorf conteniendo 1 ml de medio DMEM-F12 (n = 1 explanto/tubo, 4 réplicas por tratamiento). Los tubos con los explantos se colocaron en un baño a 37°C durante 5 minutos para la aclimatación y luego se los incubó con las diferentes drogas durante 15 minutos para medir fosforilación por Western blot o durante 4 h para medir leptina por Western blot o para extraer ARN para la qRT-PCR. Transcurrido el tiempo correspondiente, se removió a los explantos del baño, se los centrifugó a 4°C 2 minutos a 2000g, se eliminó el medio y se los resuspendió en 300 µl de buffer de lisis (PBS 1X, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% dodecil sulfato de sodio (SDS), y 10 mg/ml fenilmetanosulfonilfluorido (PMSF)). Los explantos se colocaron en un agitador orbital a 4°C durante 30 minutos y luego fueron centrifugados a 10000g por 20 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos limpios y se separaron 5 µl de cada muestra para medir la concentración de proteínas. El volumen de muestra restante se desnaturalizó por tratamiento a 90°C durante 5 minutos en buffer de siembra (50

mM Tris-HCl pH 7,1; SDS 2%; β -mercaptoetanol 2%; glicerol 10%; EDTA 0,1 M 1%; azul de bromofenol 0,1%).

Para la qRT-PCR, los explantos fueron congelados inmediatamente después del tratamiento respectivo, libres de medio, en tubos a -80°C .

Plásmidos utilizados en los ensayos de transfección:

Se utilizaron diferentes construcciones derivadas del vector pGL3 (Promega) que poseen clonada la región promotora del gen de la leptina, río arriba del gen reportero luc. Los plásmidos fueron cedidos gentilmente por la Dra. Oksana Gavrilova (NIH/NIDDK). De acuerdo a la región promotora que poseen, se los nombró según: pL2922 (-2922 a +42), pL1951 (-1951 a +42), pL1546 (-1546 a +42), pL948 (-948 a +42), pL218 (-218 a +42) y pL1512 (vector vacío). Ver Figura 1.

Se utilizó como control de eficiencia de transfección, un plásmido de expresión constitutiva en células eucariotas del gen de la beta galactosidasa (RSV β -gal).

Todos los vectores poseen un gen de resistencia a ampicilina para su previo clonado y amplificación en células procariotas.

Los plásmidos se conservaron a -20°C hasta el momento de la transformación.

Se empleó también el plásmido pCRE-Luc, derivado del vector pGL3 (Promega), que posee clonado el elemento CRE río arriba del gen de la luciferasa. Este plásmido fue donado por la Dra. Adalí Pecci (Depto. de Qca. Biológica, FCEN, UBA).

Por otro lado, en la sección de experimentos de apoptosis, se utilizó el plásmido pBax-Luc, derivado del vector vacío pGL2, que posee el promotor de Bax clonado río arriba del gen reportero de luciferasa. Este plásmido fue cedido por la Dra. Susana Llanos (CNIO, Madrid, España).

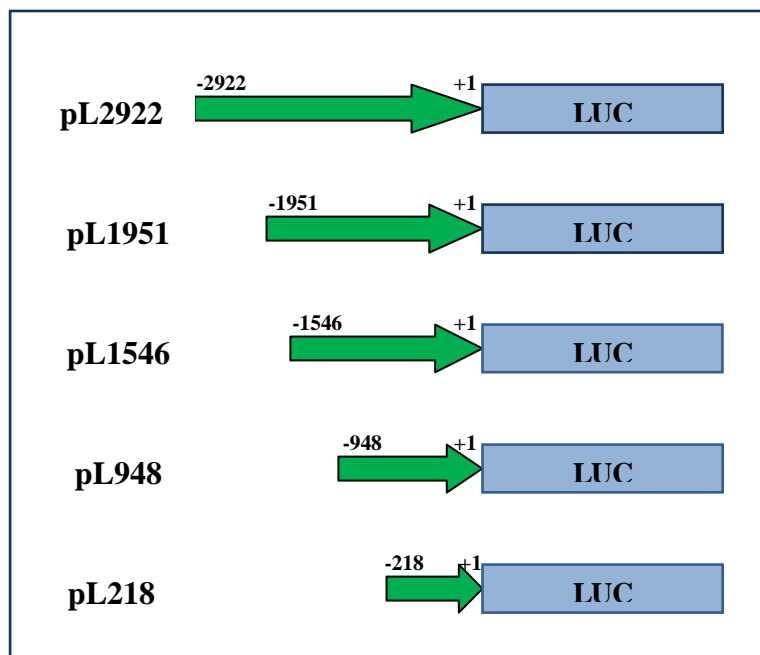


FIGURA 1. Esquema de las construcciones utilizadas en las transfecciones. Se muestran los plásmidos empleados (pL2922, pL1951, pL1546, pL948 y pL218) en los ensayos para determinar la actividad del promotor de leptina. En verde se encuentra representado el promotor con la cantidad de pares de bases respectivas a cada construcción, río arriba del gen reportero de luciferasa (Luc), representado en azul.

Se incluyeron también cotransfecciones en las que se emplearon vectores que expresan de manera constitutiva las proteínas CREB (1µg/ml), PKA (2.3µg/ml), PKI (1.75µg/ml), MAPKkd (dominante negativo de ERK 1/2), EPAC y Rap1a.

Los plásmidos de PKA, PKI y CREB fueron donados por el Dr. Sassone Corsi (UC Irvine) y el de MAPKkd fue generosamente cedido por el Dr. Silvio Gutkind (NIH/NIDCR). Los plásmidos de EPAC y Rap1a fueron donados por el Dr. Omar Coso (FBMC, FCEN, UBA).

Preparación de bacterias competentes:

Una alícuota de cultivo de *E. coli* DH5α, conservado a -70°C, se creció a 37°C durante toda la noche en 500 µl de medio LB (10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, pH 7.4). Luego, se sembraron 100 µl del cultivo en 2 ml de medio LB y se agitó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (aproximadamente 2 horas). El

cultivo se centrifugó a 4°C y el pellet celular fue resuspendido en 800 µl de CaCl₂ 50 mM. Se dejó reposar 15 minutos en hielo y se centrifugó durante 2 minutos a 4°C. El pellet se resuspendió en 150 µl de CaCl₂ 50 mM y se conservó en glicerol (Merck) 15 % a -70°C, para la posterior transformación plasmídica.

Transformación de bacterias competentes:

Se mezclaron 100 µl de células competentes con 100 ng de ADN. Se dejó reposar 30 minutos en hielo y se incubó a 42°C por 2 minutos. Se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 30 minutos en baño a 37°C. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante dejando una gota. El pellet celular se sembró en medio LB sólido con ampicilina 100 µg/ml (Sigma Chemical Co, St. Louis), incluyendo una placa control sembrada con bacterias competentes sin transformar.

Minipreparación de plásmidos:

Con el objetivo de verificar la presencia de plásmido en las colonias transformadas, se realizaron minipreparaciones plasmídicas. Para ello, algunas de las colonias previamente transformadas se crecieron en 2 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg/ml) durante 24 h a 37°C. Cada cultivo se centrifugó a 5000g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de solución I (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8). Se agregó RNasa (20 µg/ml concentración final) más 200 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión. Luego de incubar 15 minutos a 0°C, se agregaron 150 µl de solución III (acetato de potasio 5 M, pH 5.2) fría, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 10000g para separar el ADN genómico que precipita formando un pellet, y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio para la posterior purificación mediante dos extracciones con un volumen de fenol:cloroformo (1:1). Se mezcló por inversión y se centrifugó 2 minutos a 10000g para separar las fases. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto y se dejó reposar 30 minutos a -20°C.

Finalmente, se centrifugó 20 minutos a 10000g, se eliminó el sobrenadante, se secó el pellet y se resuspendió en 50 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM).

Midipreparación de plásmidos

Una vez confirmadas algunas colonias obtenidas, se realizaron preparaciones de plásmido en mayor escala y pureza, para obtener masa de ADN a ser transfectedo en los cultivos celulares JEG-3 y BeWo. En este procedimiento se utilizó el kit de midipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Para ello, 200 µl del cultivo de E. coli transformado con el plásmido a extraer, se crecieron en agitación a 37°C durante toda la noche en 200 ml de medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron 15 minutos a 5000g a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 3 ml de solución de resuspensión. Se mezcló por inversión y agregaron 3 ml de solución de lisis. Se mezcló nuevamente y se agregaron 3 ml de solución de neutralización. Se centrifugó 20 minutos a 10000g. El sobrenadante se traspasó a un tubo de 50 ml en donde se mezcló con 10 ml de la resina provista por el kit. Se volcó a una columna de 15 ml y se centrifugó 5 minutos a 5000g. Se agregaron 15 ml de solución de lavado y se centrifugó 10 minutos a 5000g.

Finalmente, se escindió la zona de la columna con la resina, se colocó en un tubo Eppendorf y se eluyó el ADN plasmídico con 300 µl de agua tibia. Se centrifugó 5 minutos a 10000g y el eluido se guardó a -20°C, para su posterior cuantificación y análisis.

Electroforesis en gel de agarosa

Los plásmidos obtenidos tanto en las minipreparaciones como en las midipreparaciones se analizaron en geles de agarosa (Sigma Chemical Co) 1% en buffer TAE (Tris-acético 0,04 M, EDTA 1 mM). La agarosa fue fundida en microondas y vertida sobre una cuba horizontal. Se colocó el peine y se esperó a la gelificación. Se sembraron 10 µl de cada preparación en 4 µl de buffer de siembra (azul de bromofenol 0,25%, xilene cianol FF 0,25% y glicerol 30%) por pocillo. Se sembraron en otra calle 500 ng del marcador de peso molecular y masa, fago λ digerido con EcoR I y Hind III (Promega). La

corrida se desarrolló en buffer TAE a 100 mV durante 1 hora. Se reveló el gel por tinción en una solución de bromuro de etidio 5 µg/ml (Sigma Chemical Co).

Las bandas obtenidas se observaron por fluorescencia a la luz ultravioleta y posteriormente se las fotografió con una cámara digital.

Cuantificación de ácidos nucleicos:

La concentración de ADN en cada muestra de plásmido a ser utilizado en las transfecciones, o de ARN en las extracciones para la RT-PCR, se determinó por la lectura de su OD a 260 nm. Se tomaron 5 µl de cada muestra obtenida y se diluyeron en 1 ml de agua destilada. La absorbancia a 260 nm se midió en un espectrofotómetro. La misma fue corregida por la absorbancia a 280 nm indicativa de la presencia de contaminantes proteicos, verificando que la relación entre ambas mediciones fuera mayor a 1.5 (para el ADN) o de 2 (para el ARN). El ADN plasmídico se cuantificó de acuerdo a la relación establecida: 1 unidad $OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$. Para el ARN la relación establecida es: 1 unidad $OD_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$ (436).

Preparación de extractos celulares proteicos

Para los ensayos de Western-blot las células BeWo o JEG-3 se cultivaron en cajas de 10 cm de diámetro (1×10^6 células) con medio DMEM- F12 suplementado con 10% SFB. Se incubaron 24 horas a 37°C. A continuación se cambió el medio por 5 ml de medio DMEM suplementado con 1% SFB y se agregaron las drogas respectivas a cada tratamiento.

Transcurridas 72 h de incubación, se procedió a preparar los extractos celulares. Para ello, se descartó el medio, se lavó con 2 ml de PBS y las células se despegaron de la placa mecánicamente utilizando un rastrillo de goma en 1 ml de PBS. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10000g y el pellet se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis (Tris 5 mM pH 6,8; EDTA 20 mM; SDS 0,1%; NP40 1%). De cada muestra se separaron 5 µl para medir la concentración de proteínas. El volumen de muestra restante se desnaturalizó por tratamiento a 90°C durante 5 minutos en buffer de siembra (50 mM Tris-

HCl pH 7,1; SDS 2%; β -mercaptoetanol 2%; glicerol 10%; EDTA 0,1 M 1%; azul de bromofenol 0,1%)

Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas en los extractos celulares por el método colorimétrico de Bradford (437)

Se utilizó 1 ml de reactivo de Bradford (Coomasie blue G 0.1 mg/ml, 5% etanol 100%, 10% ácido ortofosfórico) y 5 μ l de extracto celular. La lectura de absorbancia se realizó a 595 nm. La concentración proteica de cada muestra se determinó realizando una curva de calibración con BSA (Sigma Chemical Co, St. Louis).

Geles desnaturalizantes de proteínas

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de SDS-PAGE (438). En cada gel se sembró igual cantidad de proteínas de cada muestra (100 μ g de proteínas/calle). En una calle en paralelo se sembraron marcadores de peso molecular preteñidos (Prestained Molecular Markers Broad Range, Bio Rad). La electroforesis se realizó en buffer de corrida (Tris 250 mM, glicina 1.92 M), a 100 V durante aproximadamente 2 horas.

Western-blot

Luego de la migración electroforética se procedió a efectuar la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa no cargadas (Hybond, Amersham Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La misma se realizó en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 2% metanol; pH 1) a 100 V durante 90 minutos a 4°C. Finalizada la transferencia, se bloqueó la membrana durante 30 minutos de agitación a temperatura ambiente en leche descremada 5% en buffer PBS. Luego se lavó la membrana con PBS-Tween 20 0,05% y se procedió a incubarla a 4°C en agitación, toda la noche, con el anticuerpo primario correspondiente: anti leptina humana V20 1:1000 (conejo, Santa

Cruz), anti-P-ERK1/2 1:3000 (conejo, New England Biolabs), anti-P-MEK 1:3000, anti-P-PKB 1:5000, anti-P-STAT-3 1:3000, anti-caspasa-3 1:1000 (conejo, Sigma ; conejo, BD Biosciences Pharmingen™), anti-P-CREB 1:1000, anti-P-p38 1:1000, anti-P-S6K 1:3000 (conejo, Sigma), anti-P-JAK-2 1:1000 (conejo, Santa Cruz, CA), anti-P-EIF4E (Ser²⁰⁹) 1:1000, anti-P-EIF4EBP1 (PHAS-I) (Thr³⁷ o Thr⁴⁶) 1:1000 (conejo, New England Biolabs).

La incubación se realizó en PBS-leche 5% con las diluciones indicadas para cada anticuerpo.

Al día siguiente, la membrana se lavó cuatro veces con PBS-Tween 0,05% y luego se la incubó, en agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos, con el anticuerpo secundario de cabra anti conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology Inc), en PBS-leche 5%, dilución 1/1000. A continuación se efectuaron cuatro lavados con PBS-Tween 0,05% y se reveló por quimioluminiscencia con 500 µl del reactivo A más 500 µl del reactivo B de ECL (Amersham Pharmacia Biotech.). Los controles de carga se realizaron con anticuerpos anti-β-actina 1:5000, anti-GAPDH 1:10000, anti-ERK 1/2 1:3000, anti-PKB 1:1000, anti-MEK 1:1000, anti-STAT-3 1:3000, anti-CREB 1:1000, anti-p38 1:1000, anti-S6K 1:3000, anti-JAK-2 1:1000 (conejo, Sigma), anti-EIF4E 1:1000, anti-EIF4EBP1 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas se visualizaron con el detector Bio-Imaging Analyzer Fujifilm LAS-1000. Fueron cuantificadas con el software Image J.Ink y se relativizaron a la señal detectada en el control de carga correspondiente.

Transfecciones transitorias

Para realizar las transfecciones transitorias se utilizó el método de liposomas Lipofectamina Plus (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del producto. Células BeWo o JEG-3 fueron crecidas durante 24 h en medio DMEM 10% SFB, en placas de 6 pocillos con 2 ml de cultivo por pocillo (aproximadamente 5×10^5 células). A continuación se preparó por un lado cada mezcla de plásmido más 100 µl de medio DMEM carente de antibióticos y de suero, y por otro lado la mezcla de 5 µl de reactivo Lipofectamina (1 mg/ml, Invitrogen) y 100 µl de medio, por cada plásmido a transfectar. Cada mezcla se incubó por separado durante 10 minutos y luego se agregó la Lipofectamina a los plásmidos. Dichas mezclas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y luego se

agregaron a las células (previamente lavadas con 1 ml de medio sin suero) adicionando 800 μ l de medio más de manera de alcanzar 1 ml final de medio de incubación. Transcurridas 5 h de incubación en estufa, se removió la mezcla de transfección y se reemplazó por 1 ml de medio DMEM suplementado con 1% SFB. De acuerdo a cada caso, se agregaron las distintas drogas y efectores placentarios, en las concentraciones indicadas en los resultados para cada experimento. Las células se incubaron a 37°C durante 48 o 72 horas según el caso.

La cantidad óptima de plásmido necesaria para una transfección eficiente, a fin de evitar saturaciones en la actividad, se determinó mediante una curva de transfección con distintas dosis de la construcción más larga (vector pL2922). Así, en base a lo observado en la Figura 2, se decidió transfectar con 5 μ g de cada construcción empleada

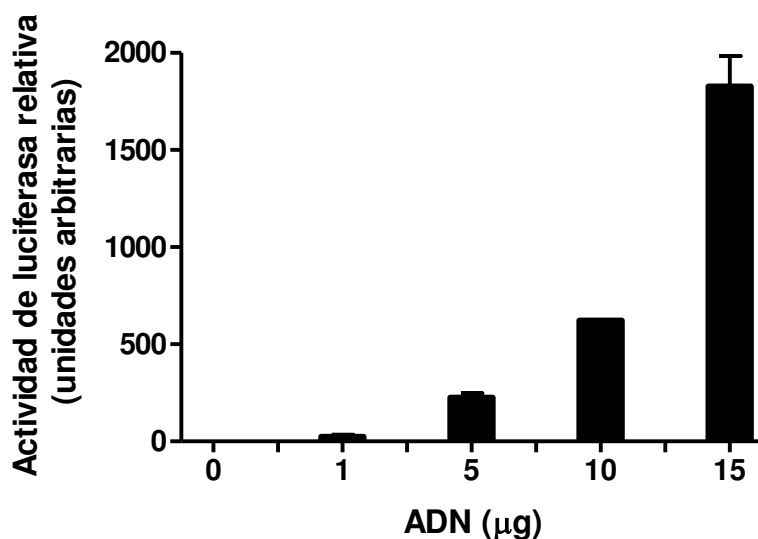


FIGURA 2. Actividad basal del fragmento -2922 del promotor de leptina. Células BeWo fueron transfectadas en forma transitoria con cantidades crecientes de la construcción plasmídica pL2922 (1-15 μ g). Se incubaron 72 h en medio DMEM-F12 1% suero. Se midió la actividad de luciferasa en los extractos celulares y los resultados se relativizaron a la actividad de β -galactosidasa.

Preparación de los extractos celulares

Se prepararon extractos de las células transfectadas de la siguiente manera: por cada pocillo se descartó el medio de cultivo, se lavó dos veces con 1 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH_2PO_4 1.4 mM, Na_2HPO_4 4.3 mM, pH 7.4), y se levantaron mecánicamente utilizando un rastrillo de goma en 1 ml de PBS. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10000g. El pellet celular se resuspendió en 50 μl de buffer de lisis (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, 10% glicerol, NP-40 1%).

Determinación de la actividad luciferasa

Para el ensayo de gen reportero luciferasa se utilizó el sistema de determinación luc de Promega. Para ello, 30 μl de cada extracto celular se mezclaron con 50 μl del sustrato luciferina proporcionado por el proveedor (Promega). La actividad enzimática fue registrada en unidades arbitrarias, medidas en un luminómetro Bio Rad, obtenidas en 30 segundos de registro. Estos valores luego fueron relativizados a la actividad enzimática de β -galactosidasa obtenida en cada muestra para considerar la eficiencia de transfección en cada caso. A los resultados obtenidos se les restó el valor registrado para la muestra control, que proviene de extractos de células transfectadas con el vector vacío pL1512, sin promotor.

Determinación de la actividad β -galactosidasa

La actividad de β -galactosidasa se determinó en 20 μl de cada extracto celular y 150 μl de Buffer Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, β -mercaptoetanol 0.07%) conteniendo el sustrato ONPG 1mg/ml (Amresco). La incubación se realizó a 37°C, en placa de 96 pocillos hasta la aparición de coloración amarilla. La reacción se detuvo con el agregado de 75 μl de Na_2CO_3 1M por pocillo. La medición de absorbancia a 420 nm se realizó en un lector de Elisa Bio Rad.

Extracción de ARN total

Luego del tratamiento correspondiente, se retiró el medio de las células, se lavaron con PBS y se levantaron las células en PBS con rastrillo de goma. El contenido de cada placa se trasvasó a un tubo y se centrifugó 10 minutos a 10000g. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de Trisure (Bioline) por tubo. En el caso de los explantos de placenta, los mismos fueron descongelados y resuspendidos en el Trisure (1ml/tubo). Se mezcló hasta homogeneizar completamente el pellet o el tejido. El tejido se disgregó en hielo con un politron (Tissue Ruptor, Qiagen) durante el tiempo necesario para llegar a homogeneidad. Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se agregaron 200 µl de cloroformo/tubo. Se mezcló por agitación por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se centrifugó a 11,800rpm a 4°C por 15 minutos. Luego de la centrifugación, se trasvasó la fase acuosa (superior) conteniendo el ARN a un nuevo tubo. Se agregaron 500 µl de isopropanol por cada tubo y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 11.800rpm por 5 minutos a 4°C. Finalmente se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 75% por tubo. Se mezcló por inversión y se centrifugó a 9000rpm durante 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante, dejando secar el pellet en hielo por 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 50 µl de agua destilada, homogeneizando completamente. Se determinó la pureza y concentración del ARN según lo previamente descrito y 5 µg de cada ARN extraído se utilizaron para la retrotranscripción.

Retrotranscripción del ARN (Síntesis del ADNc)

El ARN total fue retrotranscrito con el kit “Transcriptor first Strand cDNA synthesis Kit” (Roche). La mezcla de reacción se preparó según lo indicado por el kit en 20 µl finales. La reacción se realizó en un termociclador (T-gradient, Biometra) a 50°C por 1 hora. La enzima retrotranscriptasa se inactivó calentando a 85°C por 5 minutos. El ADNc se utilizó inmediatamente para la qPCR o se guardó a -20°C para ser utilizado posteriormente.

PCR cuantitativa

La qPCR se realizó utilizando las siguientes secuencias de primers: leptina, sentido, 5'GAACCCTGTGATTCTT3'; antisentido, 5'CCAGGTCGTTATTTGG3'; ciclofilina, sentido, 5'CTTCCCCGATACTTCA3'; antisentido, 5'TCTTGGTGCTACCTC3'. La mezcla de reacción se preparó con 10 μ M de los primers sentido y antisentido, 3 μ l de ADNc, en un volumen final de 25 μ l, incluyendo 6,25 μ l de la master mix 2X que contiene el colorante SYBR green (Fast Start universal SYBR Green, Roche). Las reacciones de PCR se realizaron en el Chromo 4 DNA Engine (Biorad). La reacción se inició a 50°C por 2 minutos, seguida de 10 minutos a 95°C. Luego se llevaron a cabo 41 ciclos de amplificación con 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de apareamiento a 58°C y 30 segundos de extensión a 72°C. Los datos obtenidos fueron recolectados y analizados con el programa Opticon Monitor 3.1.32, BioRad Laboratories, Inc. La cuantificación relativa se calculó de acuerdo al método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (439). Los experimentos se realizaron en triplicado con un mínimo de tres muestras por experimento.

Análisis de las secuencias promotoras

Se realizó un análisis in silico de las secuencias promotoras del gen de leptina, comparando con la base de datos de elementos o secuencias de unión al ADN consenso para distintos factores de transcripción. Se emplearon los programas de búsqueda y comparación Transfac y MatInspector Release Professional 7.4. Se consideraron sólo aquellos elementos con un “score” de similitud igual a 1.

Doble tinción FITC-Anexina V/IP

Células JEG-3 fueron tratadas en DMEM-F12 1% SFB o sin suero, con o sin leptina durante 5 horas en presencia o ausencia de los inhibidores farmacológicos wortmanina o PD98059. Las células se lavaron 3 veces con PBS y luego fueron levantadas con un rastrillo de goma, centrifugadas y resuspendidas en el binding buffer (Hepes 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, y CaCl₂ 2.5 mM). A continuación se agregó fluoresceína isotiocianato

(FITC)–Anexina V e ioduro de propidio (IP) en una concentración final de 1 µg/ml (103) (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, BD Biosciences Pharmingen™). La mezcla se incubó durante 10 minutos y luego se analizó por citometría de flujo. Un total de 20000 células fueron adquiridas en el citómetro de flujo FACScalibur. Los datos se analizaron utilizando el CELLQuest software (BDIS). La población de células trofoblásticas fue primero seleccionada en el análisis de tamaño y granulosidad (side-forward scattering) para luego determinar el FL-1 (FITC–Anexina V) y el FL-2 (IP). Este análisis discrimina las células intactas (Anexina V-/IP-), las células en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-) y las células en apoptosis tardía y necróticas (Anexina V+/IP+). Los datos fueron analizados utilizando el programa WinMDI version 2.8.

Medición del AMPc intracelular

Células BeWo (1×10^5) se sembraron en placas de 96 wells (100 µl de células / pocillo). Se utilizaron placas estériles blancas con fondo transparente (Corning). Luego de incubarlas 24 h en DMEM-F12 10 % SFB, se realizaron los correspondientes tratamientos en 100 µl de DMEM-F12 1% SFB. Transcurridas 72 h de incubación, se extrajeron las placas de la estufa de cultivo y se determinó la concentración de AMPc según lo indicado por el kit cAMP-Glo™ Assay (Promega). Se agregaron 20 µl del buffer de lisis a todos los pocillos y luego se incubó la placa en agitación a T ambiente por 15 min. Se agregaron 40µl de la solución de detección de AMPc y se mezcló agitando la placa por 1 min. Se incubó a T ambiente por 20 min y luego se agregaron 80 µl del Kinase-Glo® Reagent a todas las reacciones. Se mezcló y se incubó T ambiente por 10 min. Se determinó la actividad de luciferasa en un luminómetro de placa (GloMax 20/20 Promega). Se realizó también una curva estándar de luminiscencia en función de la concentración de AMPc, de manera de intercalar los valores obtenidos en el experimento en esta curva y determinar la concentración de AMPc en las células luego de cada tratamiento. La luminiscencia detectada es inversamente proporcional a los niveles de AMPc, dado que el kit determina los niveles de ATP remanentes luego de la formación del AMPc y la reacción de la PKA.

Análisis estadístico

Los valores obtenidos en los distintos ensayos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa GraphPad InStat (San Diego, CA). Los resultados se evaluaron por el método de ANOVA y a posteriori se aplicaron otros tests, según el caso. Se consideró un $P < 0.05$ como criterio de diferencia significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sección I

Vías de señalización activadas por la leptina en placenta

Recientemente, resultados de nuestro grupo han demostrado que la leptina actúa como un factor trófico y mitogénico en células trofoblásticas humanas, en base a su capacidad de promover la proliferación e inhibir la apoptosis (361). Es así como la leptina se posiciona como un importante factor trófico autócrino, para el crecimiento y el mantenimiento de la placenta durante el embarazo, en donde se elevan los niveles circulantes de leptina, principalmente debido a su producción por los trofoblastos (120, 288). Se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos de la leptina en células trofoblásticas, así como de las vías de señalización activadas por la leptina en placenta. En este sentido, como primer objetivo del presente trabajo, nos hemos propuesto investigar las vías de señalización activadas por la leptina en placenta humana. Se utilizaron como modelos de estudio la línea celular trofoblástica JEG-3, derivada de coriocarcinoma humano; y explantos de placenta humana a término.

La leptina activa la vía de señalización de JAK-STAT en células trofoblásticas JEG-3

Con el fin de estudiar la activación de quinasas JAK por el receptor de leptina, células JEG-3 fueron estimuladas con leptina humana (0,1-10 nM) y la fosforilación de JAK-2 se analizó por Western blot, empleando anticuerpos específicos que reconocen la forma fosforilada en tirosina de JAK-2. El control de carga en cada muestra se realizó con anticuerpos que reconocen JAK-2 total. Según se observa en la Figura 1A, la máxima activación se obtuvo con leptina 10 nM, pese a que una concentración de 0,1 nM de leptina fue suficiente para activar parcialmente a JAK-2. Se ha demostrado que la isoforma larga

del receptor de leptina es capaz de aumentar de manera ligando-dependiente, la fosforilación en tirosina del propio receptor, reclutando receptores asociados a quinasas de la familia Janus (219, 237). En células JEG-3, demostramos por Western blot que la leptina humana estimula la fosforilación en tirosina de la isoforma larga del receptor (Figura 1B). Este efecto resultó dosis dependiente, luego de 10 min de tratamiento. La fosforilación máxima se observó a una concentración de 10 nM de leptina. La banda fosforilada que se observa corresponde a una masa molecular de alrededor de 120 kDa consistente con lo reportado previamente en diferentes sistemas (224, 237).

Luego nos planteamos estudiar la posible activación de STAT-3 mediada por leptina en células JEG-3 (238). Los lisados celulares fueron analizados por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la forma fosforilada de STAT-3. La cantidad de STAT-3 total se determinó por Western blot como control de carga. Como se observa en la Figura 1C, STAT-3 es fosforilada en respuesta al tratamiento con leptina humana. El efecto de leptina sobre STAT-3 es dosis dependiente y el máximo efecto se alcanzó a 1nM de leptina, aunque se observó también a 0,1nM de leptina.

Estos resultados coinciden con los hallados para leptina en otros sistemas (238, 440). Sin embargo, están en contraste con aquéllos obtenidos por otro grupo quienes reportaron que en células trofoblásticas BeWo la leptina no es capaz de inducir la fosforilación de JAK-2, STAT-3 o STAT-1, aunque hallaron que JAK-2 se encuentra constitutivamente fosforilada (221). Esta discrepancia podría deberse a las diferencias entre ambas líneas celulares. Por ello, posteriormente nos planteamos evaluar la activación de estas proteínas por leptina en explantos de placenta. JAK-2 es la isoforma más importante de la familia de JAK, en la mediación de las acciones de leptina (219, 441). No hemos analizado la activación de otras isoformas de STAT en la señalización del receptor de leptina en placenta; no obstante no descartamos esta posibilidad. Por otro lado, la actividad de STAT-3 ha sido relacionada con la invasividad del trofoblasto (442). Se ha demostrado asimismo, que la leptina podría tener un rol en varios aspectos de la maduración del oocito a través de la activación de la vía de STAT-3 (443). Los embriones de ratón deficientes en STAT-3 pueden implantarse pero degeneran luego de la implantación y se produce muerte embrionaria (444).

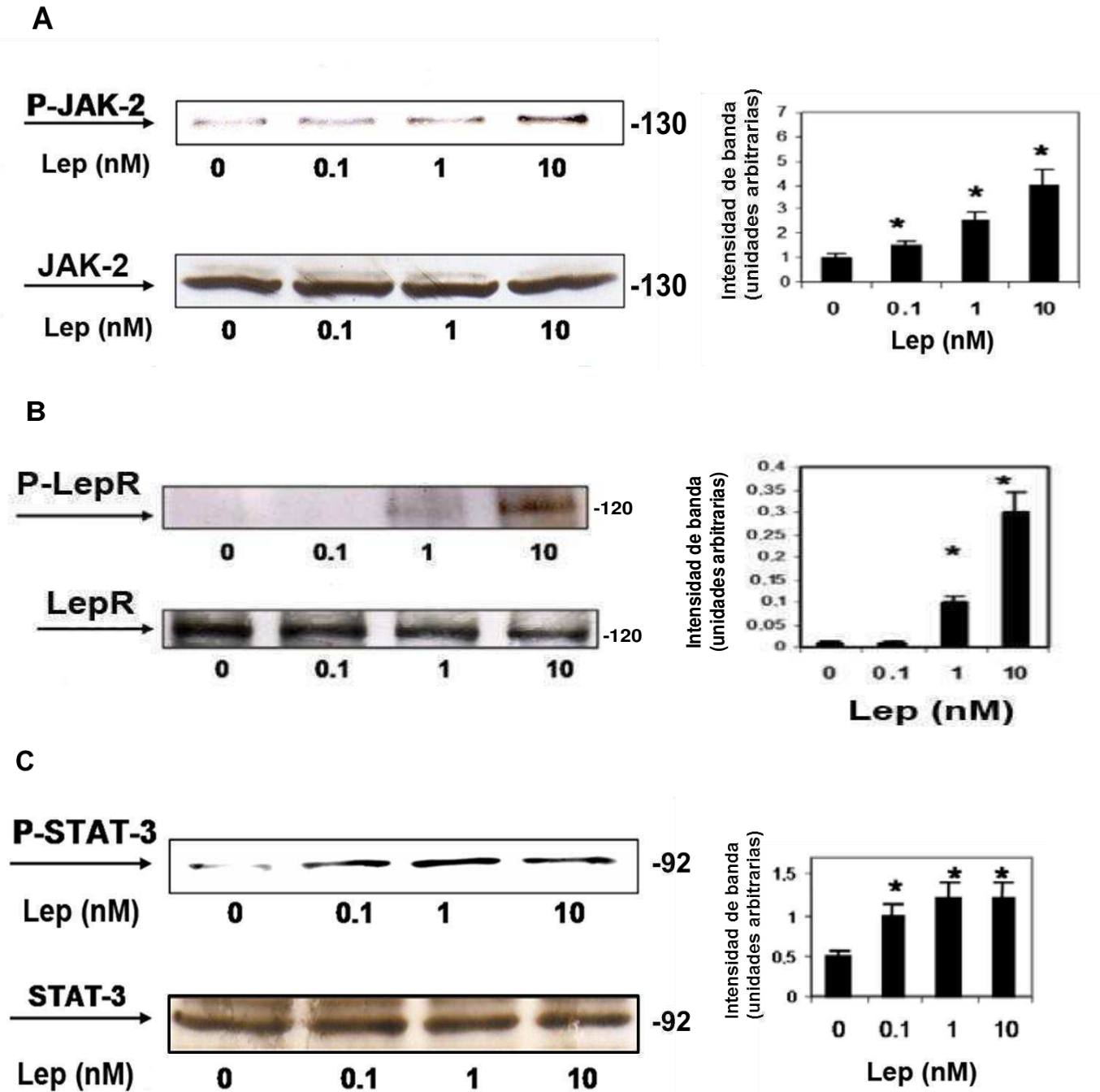


FIGURA 1. La leptina activa la vía de señalización de JAK-STAT en células trofoblásticas. Células JEG-3 se incubaron durante 10 min en DMEM 0% SFB en ausencia o presencia de leptina en concentraciones crecientes. Las células fueron lisadas y los extractos celulares fueron corridos en SDS-PAGE y sometidos a Western blot con anticuerpos anti las formas fosforiladas de JAK-2, LEPR y STAT-3. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. La cuantificación de las bandas con su correspondiente estadística se muestra en el panel derecho. * $p < 0.05$.

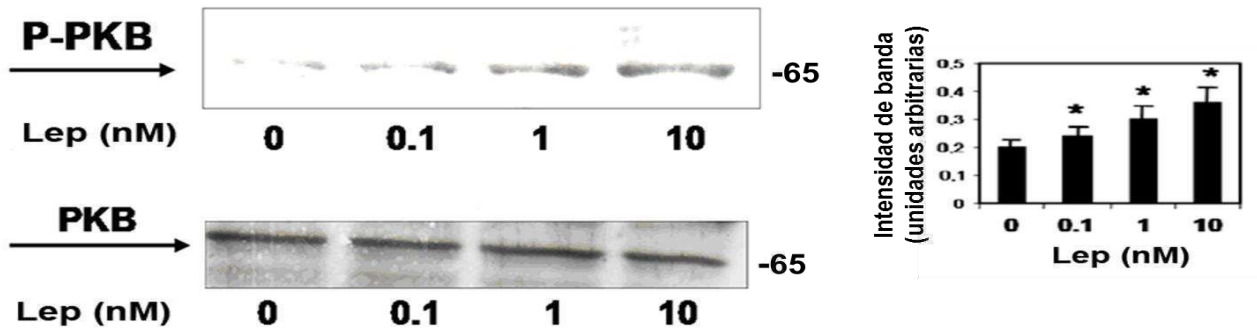
La leptina activa la vía de señalización de la PI3K

Estudios previos han demostrado que la leptina activa la PI3K en miotúbulos, células β , hepatocitos y PBMC (células mononucleadas de sangre periférica) (234, 236, 237, 445, 446). A fin de determinar la activación de la vía de PI3K en células trofoblásticas, en respuesta a la leptina, medimos, por Western blot, la fosforilación de una quinasa central en dicha vía, como lo es la PKB (o Akt). Según muestra la Figura 2A, la leptina estimuló de manera dosis dependiente la fosforilación de PKB. El efecto máximo se observó a 10 nM de leptina aunque incluso a 0,1nM de leptina se detectó estimulación. La quinasa GSK3 es un blanco de la PKB, la cual es inhibida por fosforilación en serina 21 (la isoforma α) y en serina 9 (la isoforma β) (447). De esta forma, empleamos anticuerpos que reconocen la fosforilación en serina de GSK3 y anticuerpos anti-GSK3 total para el control de carga. En la Figura 2B se observa que la leptina incrementa de manera dosis dependiente la fosforilación de GSK3. El efecto máximo se alcanza con 1 nM de leptina pese a que la dosis mínima de 0,1 nM es suficiente para evidenciar la activación de la quinasa por leptina.

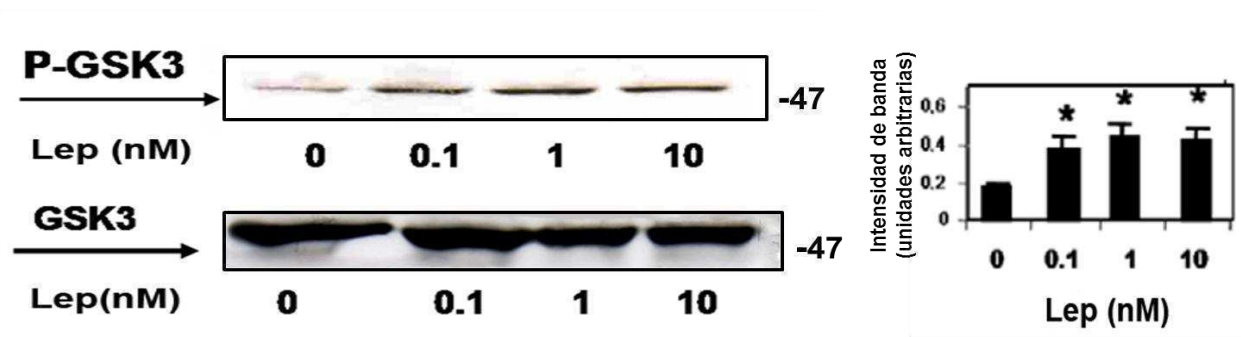
Otra quinasa que se encuentra río debajo de la PKB es la p70S6K. Dado que la actividad de quinasa de esta proteína está correlacionada con su estado de fosforilación en treonina 421 y serina 424 (448), utilizamos anticuerpos policlonales que detectan únicamente la proteína fosforilada. La cantidad de p70S6K total fue determinada como control de carga. En la Figura 2C se muestra que la leptina estimula de manera dosis dependiente la fosforilación de p70S6K, con la máxima fosforilación obtenida a 1nM de leptina y el mínimo a 0,1 nM.

Las proteínas PI3K, PKB y mTOR han sido descritas en las vías de señalización que regulan la diferenciación invasiva de los trofoblastos humanos (414). Han sido también implicadas en la regulación de muchos procesos celulares, incluyendo la resistencia a apoptosis, la movilidad celular, la diferenciación y la proliferación (411). Sin embargo, este es el primer trabajo donde se describe la activación de la vía de PI3K por la leptina en células trofoblásticas, a través del estudio de la fosforilación de las quinasas río abajo, PKB y p70S6K.

A



B



C

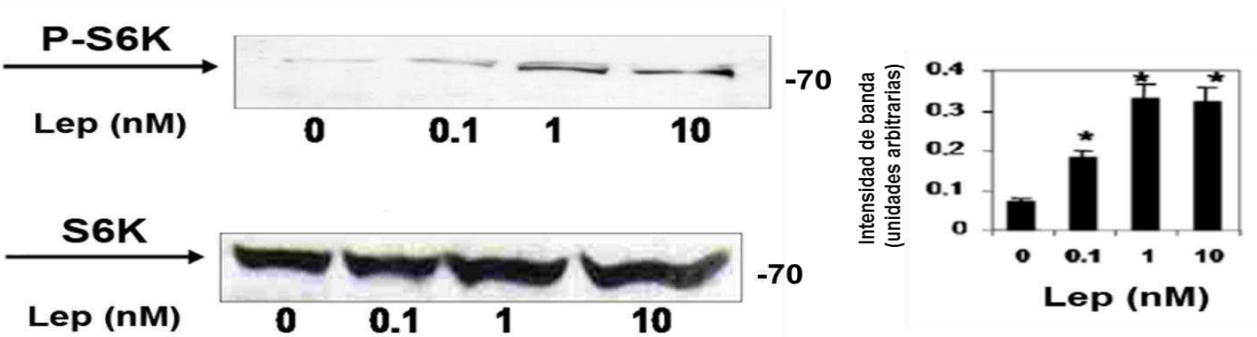


FIGURA 2. La leptina activa la vía de PI3K. Células JEG-3 se incubaron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de leptina durante 10 min. Las células se lisaron y los extractos celulares se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de PKB (A), GSK3 (B) y p70S6K(C). Los mismos lisados se analizaron por inmunoblot con anticuerpos que reconocen las quinasas totales, como control de carga. Se muestran resultados representativos de cuatro experimentos independientes. La cuantificación de las bandas se muestra en el panel de la derecha. * $p < 0.05$.

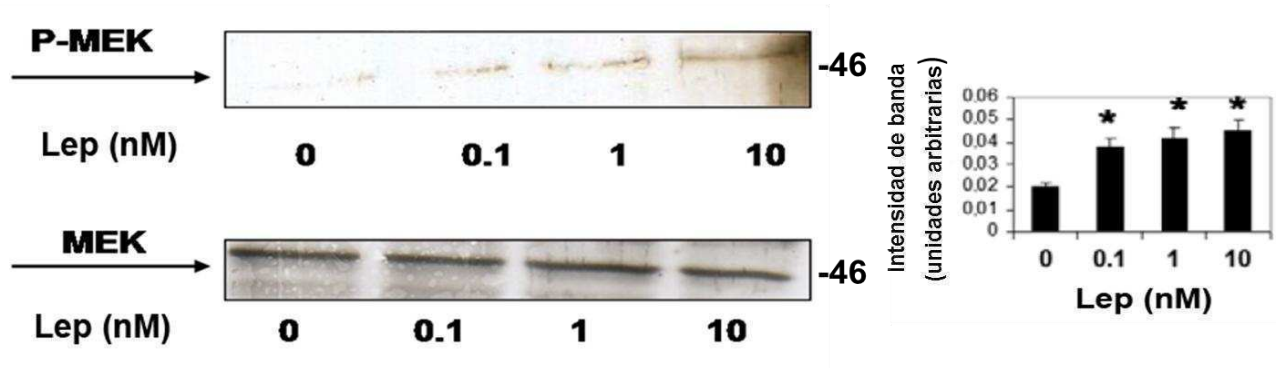
La leptina activa la vía de señalización de la MAPK

En base a lo previamente descrito en relación a los efectos de leptina en la vía de MAPK en diferentes sistemas, tales como en las PBMC (224, 237, 417, 418), nos propusimos evaluar si MEK y su blanco ERK 1/2 son activadas por leptina en células trofoblásticas. Para ello determinamos por Western blot la fosforilación de dichas quinasas, lo cual refleja su estado de activación. Se emplearon anticuerpos que reconocen específicamente las formas fosforiladas de las quinasas, y anticuerpos anti-MEK y anti-MAPK como controles de carga. Tal como se muestra en la Figura 3A, la leptina estimuló de manera dosis dependiente la fosforilación de MEK y el máximo efecto se alcanzó a 10 nM de leptina. Se observó un efecto similar en la activación de ERK 1/2 por leptina (Figura 3B). La leptina estimuló la fosforilación de MAPK en tirosina/treonina, según se detectó con un anticuerpo anti-MAPK doblemente fosforilada. Tanto ERK1 como ERK2 fueron fosforiladas luego del tratamiento durante 10 min con leptina humana.

Así, tal como en otros sistemas, también en placenta la leptina estimula la vía de MAPK. Previamente se ha demostrado que dicha vía media los efectos proliferativos de la leptina (224, 237, 417, 418). Se encuentra involucrada en los mecanismos por los cuales la leptina promueve la supervivencia celular y previene la apoptosis (148, 404, 449).

Las vías de JAK/STAT y de MAPK son esenciales para la reproducción en general, y en particular, para el desarrollo de la placenta, tal como lo han demostrado una serie de experimentos de knockout. Aspectos de ambas vías están también implicados en la invasión trofoblástica. Ratones deficientes en MEKK3, p38 y ERK5 presentan defectos en la angiogénesis y en la formación de la placenta (411).

A



B

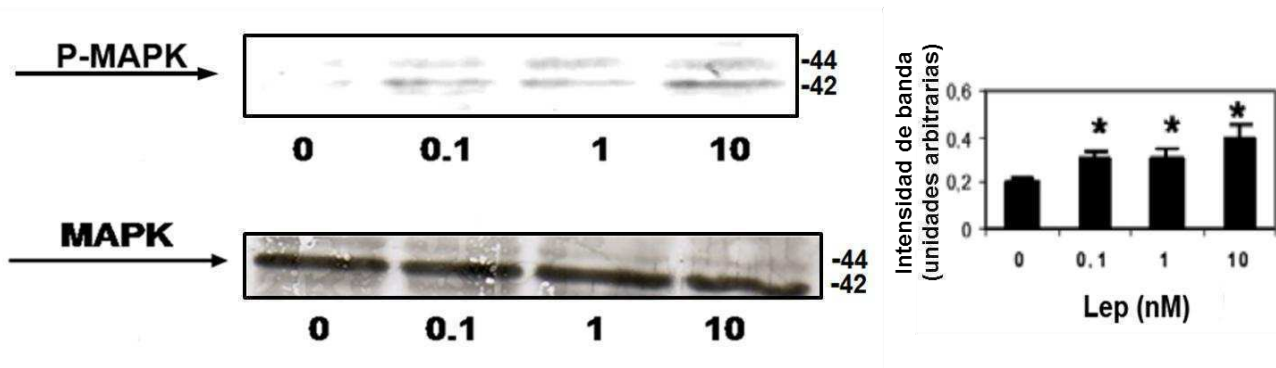


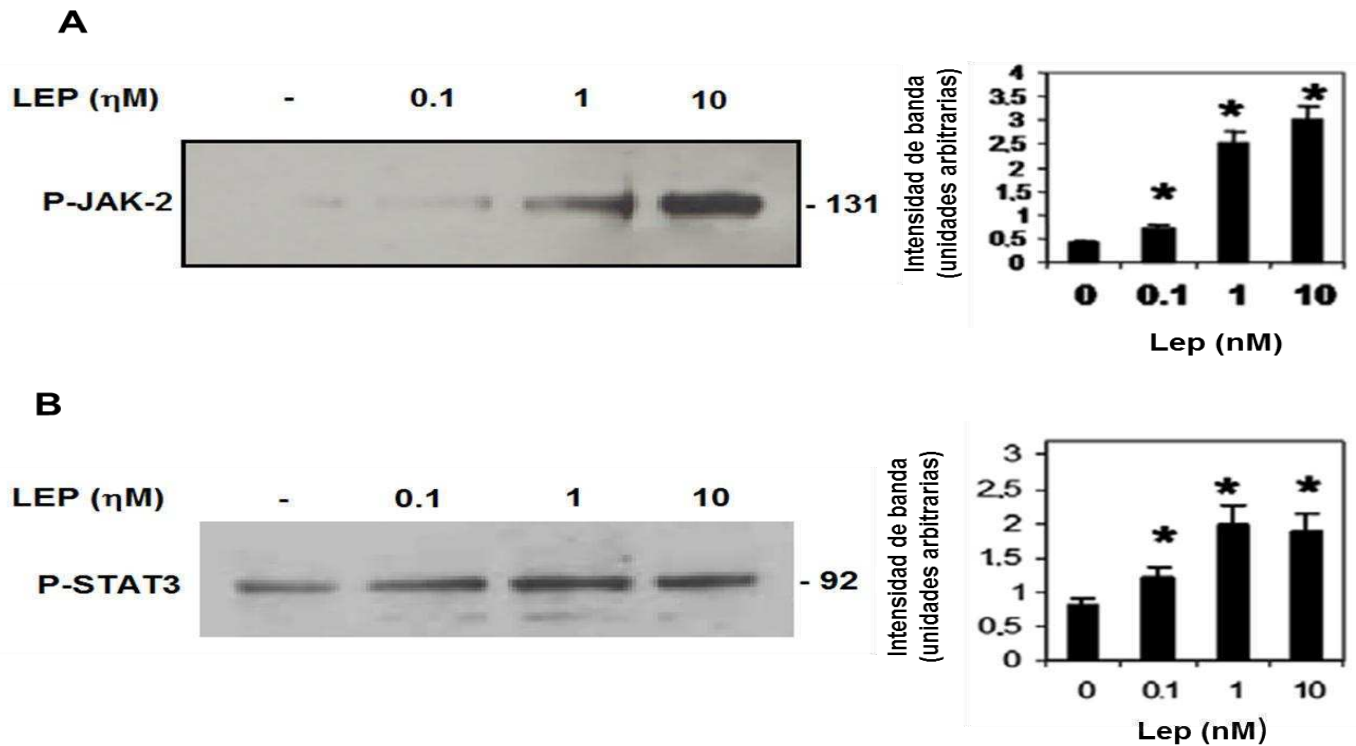
FIGURA 3. La leptina activa la vía de MAPK. Células JEG-3 fueron incubadas en presencia de concentraciones crecientes de leptina, durante 10 min. Las células fueron lisadas y los extractos celulares se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de MEK (A) o de MAPK (B). Las mismas membranas fueron analizadas por inmunoblot con anticuerpos específicos que reconocen las quinasas totales, como control de carga. Se muestra un resultado representativo de cuatro experimentos independientes. El panel derecho muestra la cuantificación de las bandas con la correspondiente estadística. * $p < 0.05$.

Las vías de JAK-STAT, PI3K y MAPK son activadas por leptina en explantos de placenta humana

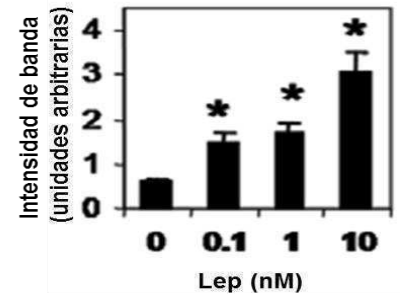
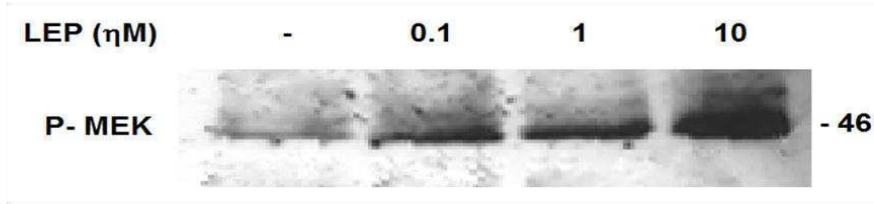
Con el fin de verificar la acción de leptina en la activación de distintas vías de señalización en placenta, empleamos explantos de placenta humana a término como un

modelo más fisiológico de trabajo. Se realizaron experimentos de Western blot en explantos de placentas normales tratadas con concentraciones crecientes de leptina. De manera similar a lo observado en las células JEG-3, demostramos que en explantos trofoblásticos de placenta la leptina estimula de forma dosis-dependiente la fosforilación de JAK-2 (Figura 4A), STAT-3 (Figura 4B), MEK (Figura 4C), ERK 1/2 (Figura 4D), PKB (Figura 4E) y p70S6K (Figura 4F). Se observó también la activación por fosforilación de p38 (Figura 4G). La estimulación máxima en todos los casos se obtuvo a 10 nM de leptina; sin embargo ya a 0,1 nM se detectó un efecto significativo de leptina. Estos resultados confirman la relevancia fisiológica de la activación por leptina de las vías de señalización estudiadas.

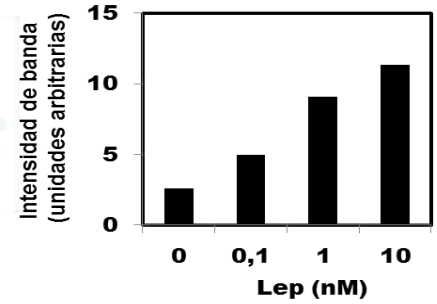
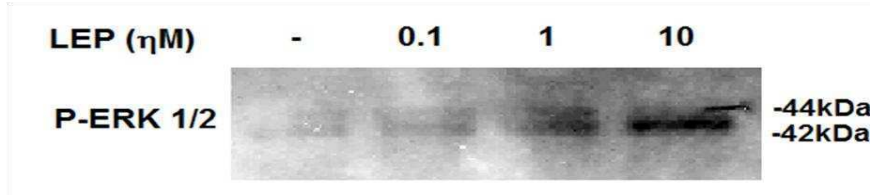
En el caso de la vía de JAK/STAT, esta es la primera vez que se estudia la activación de la vía en placenta normal, y los resultados demuestran claramente que éste es un camino de señalización reclutado por el receptor de leptina en placenta.



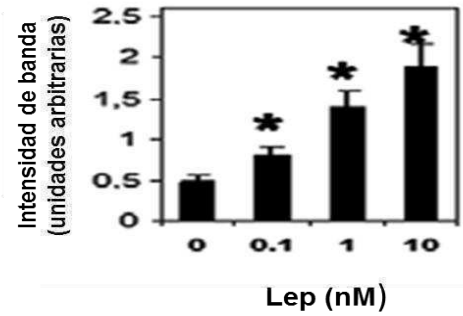
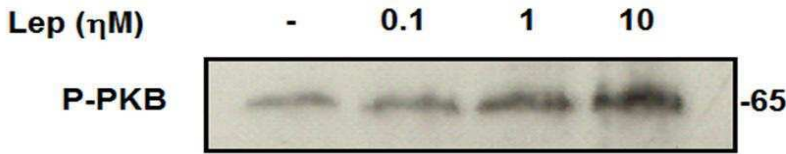
C



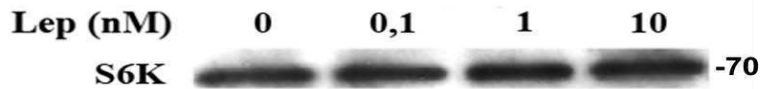
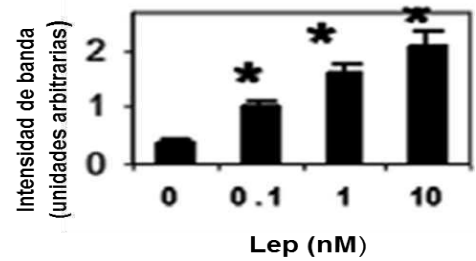
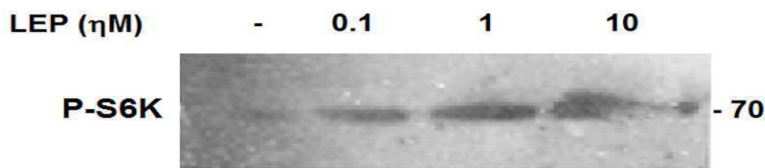
D



E



F



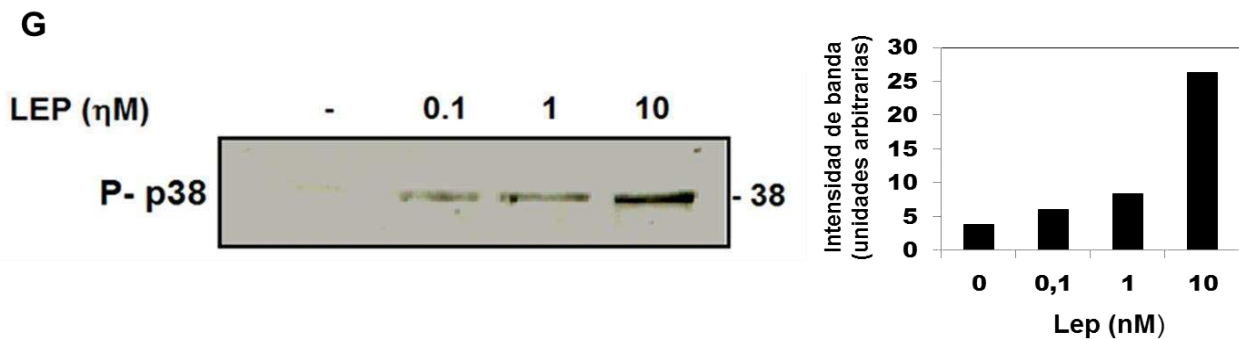


FIGURA 4. La leptina activa las vías de JAK-STAT, PI3K y MAPK en trofoblastos de placenta a término. Explantos de placenta (50 mg) se incubaron durante 10 min en presencia de concentraciones crecientes de leptina. Se lavaron y los lisados se analizaron por Western blot con anticuerpos que reconocen específicamente las formas fosforiladas de JAK-2 (A), STAT-3 (B), MEK (C), ERK 1/2 (D), PKB (E), p70S6K (F) y p38 (G). El control de carga de las muestras se realizó por inmunoblot de p70S6K total. Se muestra un resultado representativo de cuatro experimentos independientes. En los paneles a la derecha se muestra la densitometría de las bandas con la correspondiente estadística. * $p < 0.05$.

La leptina estimula la activación de intermediarios de la síntesis de proteínas en placenta

Se sabe que la síntesis de proteínas es regulada por la insulina y por otras hormonas por fosforilación de diferentes factores de traducción, involucrados en las etapas de iniciación y la elongación (450). Así, el factor de iniciación de la traducción, EIF-4E (factor de iniciación eucariótico 4E) se une al “cap” del ARNm y media el ensamble del complejo de iniciación EIF4F. Este complejo es inhibido por las proteínas de unión a EIF-4E (EIF4EBPs), como la EIF4EBP1 (o PHAS-I) (451). La fosforilación de estas EIF4EBPs libera a EIF-4E de su forma inactiva en el complejo EIF4EBP-EIF4E, permitiendo a EIF-4E unirse a EIF4G y a EIF4A para formar el complejo activo EIF4F (452).

La cascada intracelular que lleva a la activación de EIF4EBP1 involucra la activación de la quinasa p70S6K, cuya fosforilación hemos demostrado que es inducida por leptina en placenta. In vitro algunos estudios han demostrado que la leptina es capaz de estimular el sistema A de transporte de aminoácidos en placenta, de manera tiempo específica, y que esto depende de la activación de la vía de señalización de JAK-STAT (335, 453)

Dado que observamos que la leptina activa la vía de PI3K y que hemos demostrado previamente que la leptina estimula la proliferación de células trofoblásticas, nos propusimos analizar si la hormona participa en la estimulación la síntesis de proteínas en placenta. Para ello, analizamos por Western blot, en células JEG-3, la activación por leptina del factor de iniciación de la traducción, EIF-4E y de la proteína EIF4EBP1 (Figura 5). Como puede observarse, el tratamiento con leptina indujo la fosforilación de EIF-4E y de EIF4EBP1, de manera dosis dependiente. Para ambas proteínas el máximo efecto se obtuvo a una concentración de leptina de 10 nM, aumentando hasta 5 y 10 veces respectivamente, en relación al nivel basal. Sin embargo, ya con 0,1 nM de leptina puede observarse un aumento en la fosforilación de las proteínas.

Efectuamos experimentos similares en explantos de placenta humana (Figura 6). Al igual que lo observado en el resultado previo, la leptina estimuló la fosforilación de EIF-4E y de EIF4EBP1 y este efecto fue dosis dependiente. La máxima fosforilación de EIF4EBP1 se obtuvo con 1 nM de leptina, pero un efecto significativo ya se observa con 0,1 nM (Figura 6B). En el caso de EIF-4E (Figura 6B) el máximo efecto se obtuvo con 10 nM de leptina. Con leptina 1 nM ya se obtuvo una inducción significativa.

El sitio de fosforilación más importante en el factor EIF-4E es el residuo Ser²⁰⁹, la cual incrementa su afinidad por el ARNm y por el eIF4G, generando un complejo eIF4F más estable, que es el que inicia la traducción. Se ha descrito que la acción de mitógenos y estímulos de estrés mediado por ERK y p38MAPK induce la fosforilación de EIF-4E en la Ser²⁰⁹ y que esta fosforilación se bloquea en presencia de inhibidores como LY294002 y rapamicina.

La fosforilación de EIF4EBP1 ocurre primero en los residuos Thr³⁷ y Thr⁴⁶, que son necesarios para que continúe la fosforilación de otros aminoácidos. Estos son los residuos que analizamos en los experimentos mostrados.

Demostramos entonces que la leptina activa la maquinaria de traducción de las células trofoblásticas. Resultados obtenidos por colaboradores de nuestro grupo de investigación han demostrado a través de experimentos de incorporación de leucina tritiada, que la leptina promueve la síntesis de proteínas totales en células de placenta (411). Por otro lado también se ha demostrado que dicha activación es dependiente de las vías de señalización de MAPK

y PI3K (454). Todos estos resultados estarían reforzando el rol de leptina en la proliferación de los trofoblastos.

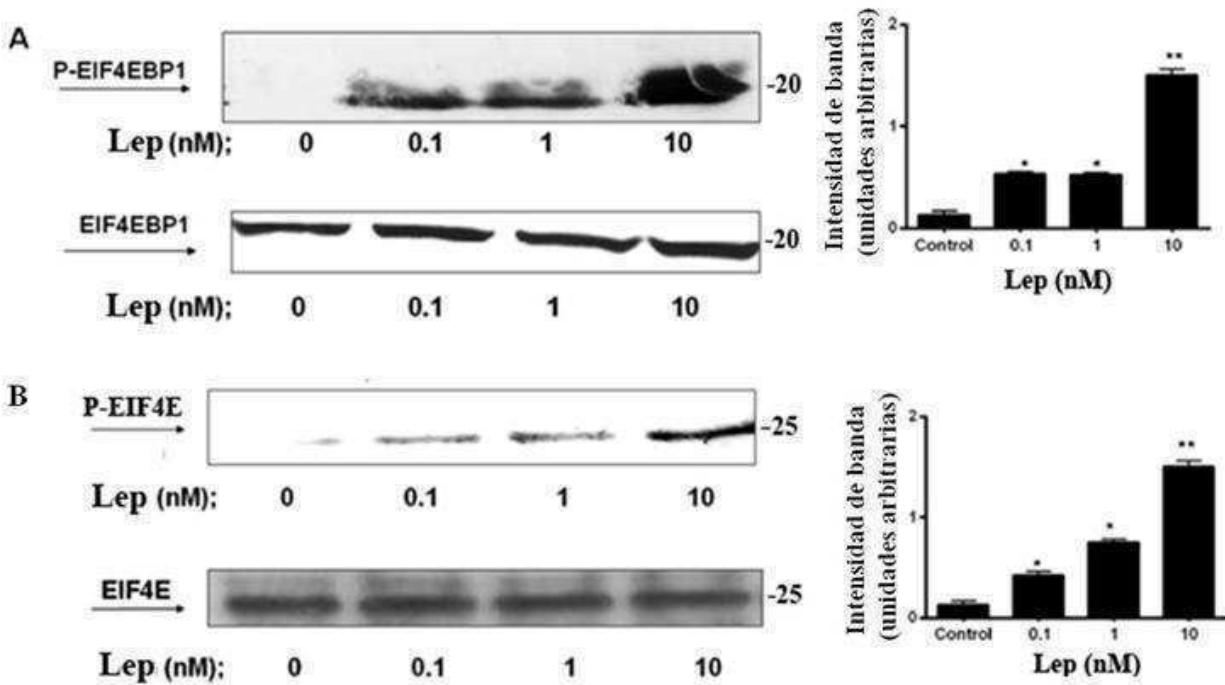


FIGURA 5. La leptina estimula la fosforilación de EIF4EBP1 y EIF4E en células JEG-3. Células JEG-3 se incubaron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de leptina durante 10 min. Las células se lisaron y los extractos celulares se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de EIF4EBP1 (A) y EIF4E (B). Los mismos lisados se analizaron por inmunoblot con anticuerpos que reconocen las proteínas totales, como control de carga. Se muestran resultados representativos de cuatro experimentos independientes. Los resultados se expresan como promedio \pm D.E. La cuantificación de las bandas se muestra en el panel de la derecha. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

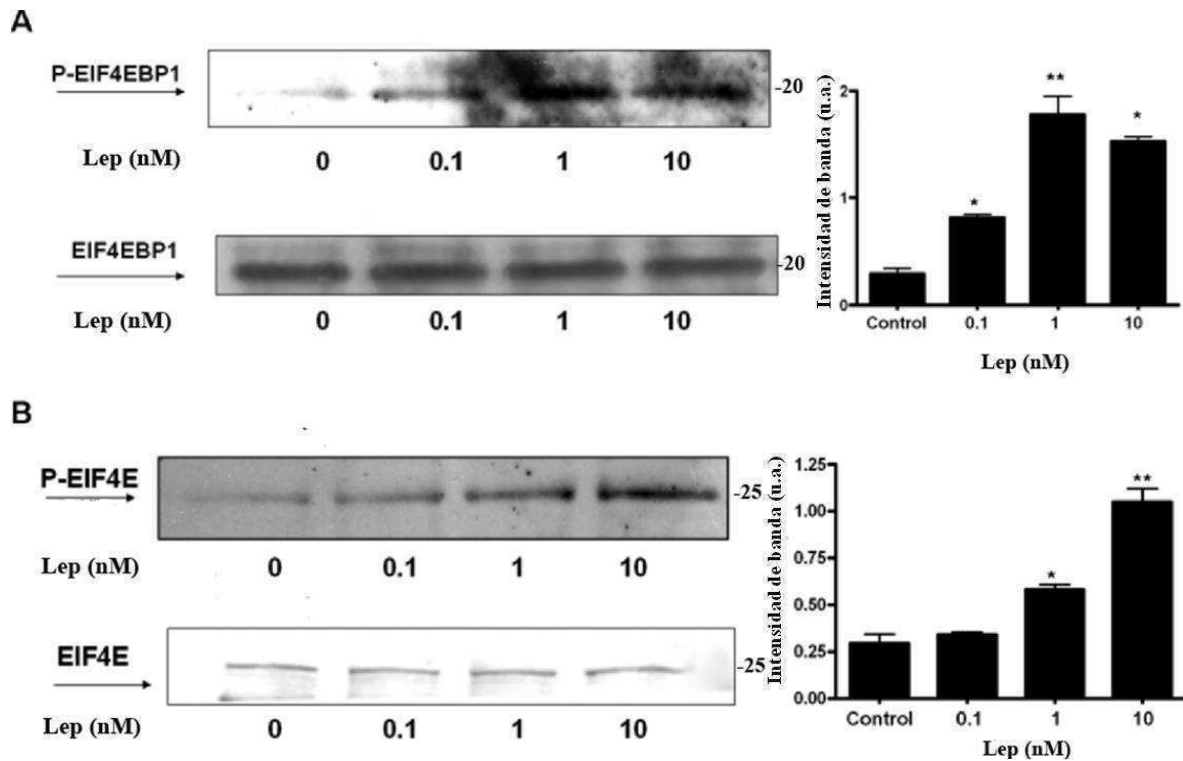


FIGURA 6. La leptina estimula la fosforilación de EIF4EBP1 y EIF4E en explantos de placenta. Explantos de placenta humana a término se incubaron en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de leptina durante 10 min. Los explantos se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos y los extractos celulares se analizaron por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de EIF4EBP1 (A) y EIF4E (B). Los mismos lisados se analizaron por inmunoblot con anticuerpos que reconocen las proteínas totales, como control de carga. Se muestran resultados representativos de tres experimentos independientes. Los resultados se expresan como promedio \pm D.E. La cuantificación de las bandas se muestra en el panel de la derecha. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. u.a, unidades arbitrarias

Efectos antiapoptóticos de la leptina en placenta

La leptina inhibe la apoptosis en células trofoblásticas humanas

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que la leptina posee un efecto trófico en células JEG-3, promoviendo su proliferación (361). Por otro lado,

varios estudios han mostrado la acción antiapoptótica de leptina en distintos sistemas (148, 317, 406, 407, 409, 449, 455). En base a estas evidencias, nos hemos propuesto evaluar con distintas estrategias, la función antiapoptótica de leptina en placenta humana. Diferentes vías apoptóticas convergen en la activación tardía de un efector apoptótico clave, la caspasa-3. Por ello, en primer lugar, se evaluó la activación de caspasa-3 por Western blot en extractos de células JEG-3 deprivadas de suero y tratadas por 3 días con concentraciones crecientes de leptina. Se empleó en este caso un anticuerpo que detecta la procaspasa (caspasa inactiva) y las formas clivadas activas de caspasa. Según muestra la Figura 7, con medio sin suero se detecta la aparición de la banda correspondiente a la caspasa-3 activa. Ésta disminuye progresivamente a medida que aumenta la concentración de leptina, hasta alcanzar niveles incluso inferiores al control con 10% de suero, con la máxima concentración de leptina. Las procaspasas son procesadas por clivado enzimático para generar enzimas activas. La procaspasa de 32 kDa es primera clivada en el lado C-terminal de la Asp²⁸ para remover el prodominio amino terminal, quedando un fragmento de aproximadamente 29 kDa. Éste sería el correspondiente a la banda que observamos en la Figura 7. Clivajes adicionales generan fragmentos de 17 y 12 kDa.

Podríamos concluir entonces que la leptina previene la activación de caspasa-3 inducida por la deprivación de suero, y este efecto es dependiente de la dosis.

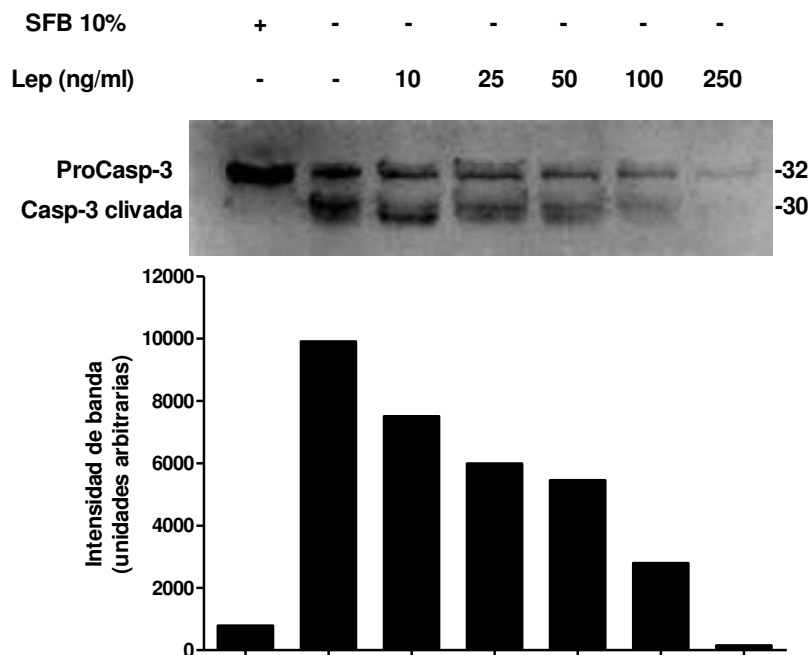


FIGURA 7. La leptina previene la activación de caspasa-3 en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron incubadas durante 3 días en medio 0% SFB y tratadas con concentraciones crecientes de leptina. Los lisados se sembraron en un gel 12% SDS-PAGE y se analizaron por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos contra caspasa-3. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas correspondientes a la caspasa clivada.

A partir de lo observado previamente, decidimos evaluar el efecto de la inhibición en la expresión de leptina sobre la activación de la caspasa-3. Para ello, se trataron a las células con un oligonucleótido antisentido (AS) para leptina, en combinación o no, con distintas concentraciones de leptina. Según se muestra en la Figura 8, el tratamiento con el AS produjo un aumento en la expresión de la caspasa-3 activa y el agregado de leptina recombinante disminuyó dicha expresión. El efecto máximo se observó con 100 ng/ml de leptina. Este resultado demuestra que el agregado de leptina puede compensar la falta de leptina endógena, previniendo a los trofoblastos de la muerte por apoptosis.

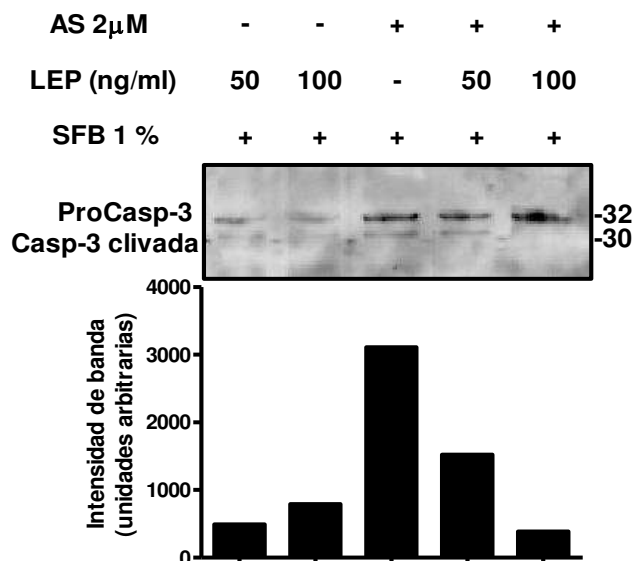


FIGURA 8. La inhibición de leptina induce la activación de caspasa-3 en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron incubadas durante 3 días en medio 1% SFB y tratadas con leptina y/o un oligonucleótido antisentido (AS) de leptina, en la concentraciones que se indican. Los lisados se sembraron en un gel 12% SDS-PAGE y se analizaron por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos contra caspasa-3. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas correspondientes a la caspasa clivada

Como una estrategia alternativa para determinar la acción antiapoptótica de leptina, evaluamos los eventos apoptóticos tempranos midiendo la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática, la cual presenta alta afinidad por la anexina V. Se realizó una doble tinción con anexina V-FITC/ ioduro de propidio, para discriminar las células viables de las apoptóticas y de las apoptóticas tardías o necróticas. Las células se incubaron durante tres días con los tratamientos respectivos y los resultados se evaluaron por citometría de flujo. Tal como lo muestra la Figura 9, el tratamiento con el AS para leptina incrementó el número de células apoptóticas 60 veces respecto al control (0,5% de células AnexinaV+/ PI- en A comparadas con 30% de B). Más aún, cuando las células se incubaron en presencia de AS y leptina, se revirtió el proceso y la cantidad de células apoptóticas se redujo 90%, siendo sólo el 3% células AnexinaV+/ PI-. Estos resultados son consistentes con la inhibición de la actividad de caspasa-3 previamente mostrada y demuestran que la leptina endógena es importante para la viabilidad celular de los trofoblastos. Asimismo, nuevamente observamos que la leptina exógena es capaz de suplir la falta de leptina endógena y prevenir la apoptosis trofoblástica.

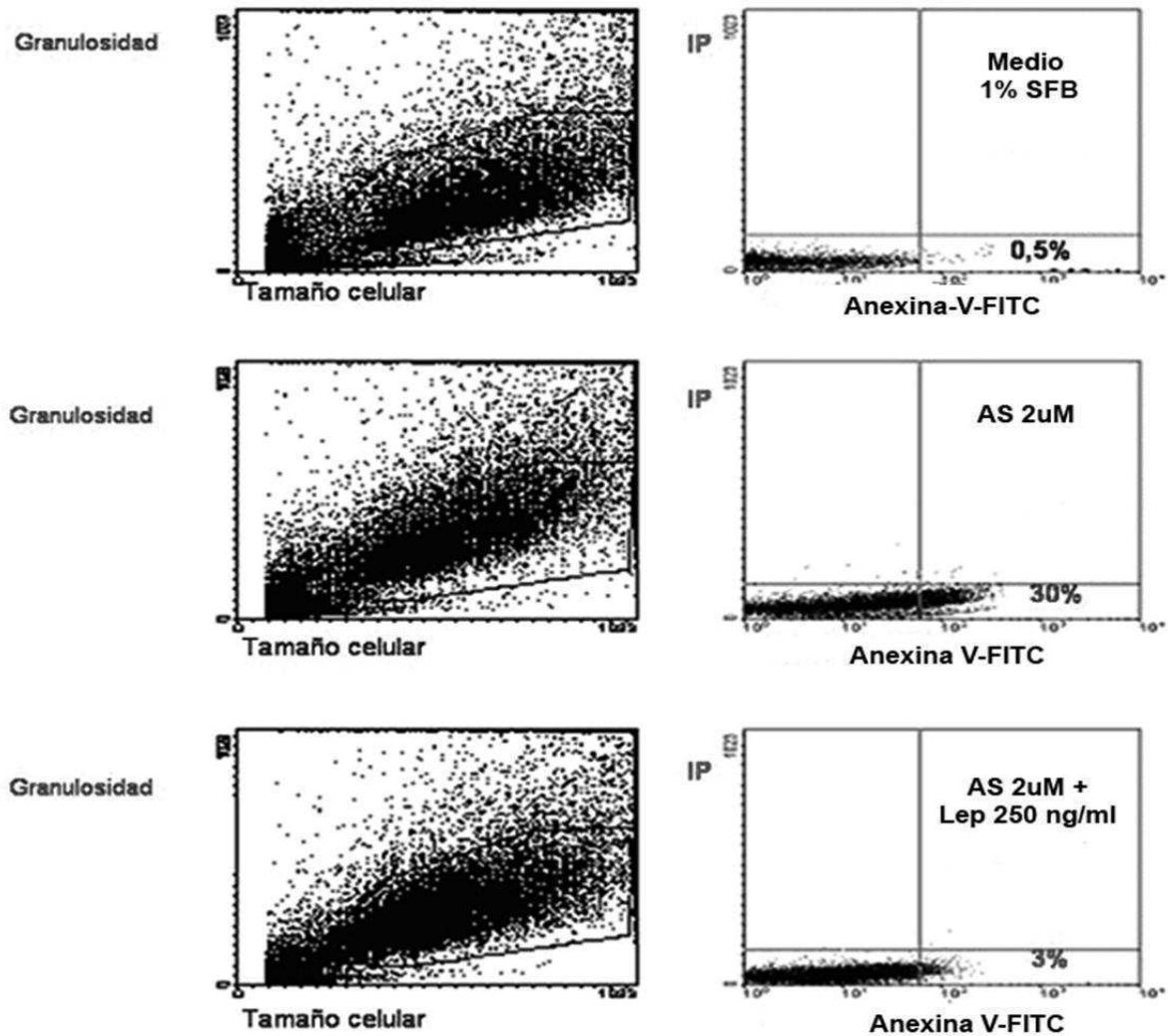


FIGURA 9. La leptina previene la apoptosis en células JEG-3. Células JEG-3 (1×10^6 células) se incubaron en placas de 10 cm en medio completo DMEM-F12 suplementado con 10% SFB. Luego de 24 hs, el medio fue reemplazado por DMEM-F12 suplementado con suero 1%, en presencia de un oligonucleótido control (A), un oligonucleótido antisentido para leptina (AS) $2\mu\text{M}$ (B) o el antisentido para leptina $2\mu\text{M}$ más leptina 250 ng/ml. Las células se cultivaron por 3 días y se procesaron y analizaron por citometría de flujo, según se indica en Materiales y Métodos. Los datos de la izquierda son gráficos de puntos derivados del tamaño celular (FSC) y la granulosidad celular (SSC), en escala lineal. En cada uno de estos gráficos se marcan los eventos celulares seleccionados para ser analizados. Los datos mostrados a la derecha indican los eventos detectados con Anexina V-FITC/ yoduro de propidio en el flujo del citómetro. El cuadrante de abajo a la izquierda representa las células viables, negativas para las dos tinciones. El cuadrante de arriba a la derecha contiene las células no viables, necróticas, y con apoptosis tardía, positivas para ambas tinciones. El cuadrante inferior derecho representa a las células apoptóticas, positivas para Anexina-FITC y negativas para Yoduro de Propidio (PI). Se muestra un resultado representativo de 3 repeticiones independientes.

Algunos aspectos clave de la apoptosis involucran a la mitocondria y a las proteínas anti y proapoptóticas Bcl-2 y Bax, respectivamente. La sobreexpresión de Bax acelera la muerte por apoptosis actuando a nivel de la mitocondria, donde disrumpe la cadena de transporte de electrones y promueve la liberación del citocromo c en el citoplasma. La relación Bcl-2/Bax parece determinar la susceptibilidad a la apoptosis, regulando la función mitocondrial que sigue a un estímulo apoptótico (59). Para comenzar a investigar el posible mecanismo por el cual la leptina podría estar previniendo de apoptosis en las células de placenta, analizamos la activación de una de las principales proteínas proapoptóticas involucradas en la vía intrínseca mitocondrial, Bax. Para ello, se realizaron transfecciones transitorias con un plásmido que posee clonado el promotor de bax río arriba del gen de la luciferasa (pBax-Luc). Según se observa en la Figura 10, el tratamiento con leptina previno la inducción de Bax causada por la disminución de suero en el medio, alcanzando un máximo de 100 veces de inhibición de Bax con 100 ng/ml de leptina.

La expresión de Bcl-2 y Bax es regulada de manera espacio-temporal durante el desarrollo de la placenta. Ambas proteínas se encuentran involucradas en los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular, que ocurre a medida que avanza el embarazo, principalmente en el tercer trimestre (59). La expresión de Bax se ha demostrado en los trofoblastos del primer y tercer trimestre y en células BeWo (456). Se cree que un aumento en la expresión de Bax proveería un mecanismo novedoso en la iniciación de la muerte celular en los trofoblastos de la placenta humana a término. La comprensión de los mecanismos apoptóticos en trofoblastos es de gran utilidad en los casos de patologías placentarias. Algunas observaciones sugieren que la apoptosis en los sinciciotrofoblastos se encuentra aumentada en placentas de bebés con restricción de crecimiento intrauterino (59).

Ha sido observado que el clivaje de Bax resulta altamente eficiente en el desencadenamiento de la vía mitocondrial proapoptótica. En estudios en neutrófilos humanos, la leptina retardó el clivaje de Bax, y dicho retardo se ha asociado a su vez con con la inhibición en la liberación del citocromo c en el citosol (449). En adipocitos, la leptina aumenta la expresión de Bcl-2, lo cual es consistente con el papel antiapoptótico que cumple la leptina en estas células (457). Artwohl y colaboradores observaron que la leptina redujo la apoptosis en células humanas endoteliales y esta acción se correlacionó con el aumento en la expresión de Bcl-2 (407). Otro estudio demostró que la leptina no sólo

es capaz de incrementar la expresión de ciclina D1 para promover la proliferación, sino que también previene de apoptosis inhibiendo Bax en células de hepatocarcinoma humano. (458).

De esta manera se sugiere un rol de la leptina como inhibidora de Bax. Sin embargo, tal como se ha mencionado, la relación entre las proteínas anti y proapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2/Bax) es lo que determina si la célula desencadenará o no el proceso de apoptosis. La Figura 10 demuestra únicamente la inhibición de una proteína proapoptótica. La disminución en la activación de Bax (por privación de suero) al tratar con leptina, aumentaría el ratio Bcl2/Bax, en el caso en que Bcl-2 se mantuviese constante o aumentase. Esto sugeriría que la leptina podría estar actuando a través de la inhibición de la vía intrínseca de apoptosis. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar los mecanismos por los cuales la leptina previene de la muerte celular trofoblástica.

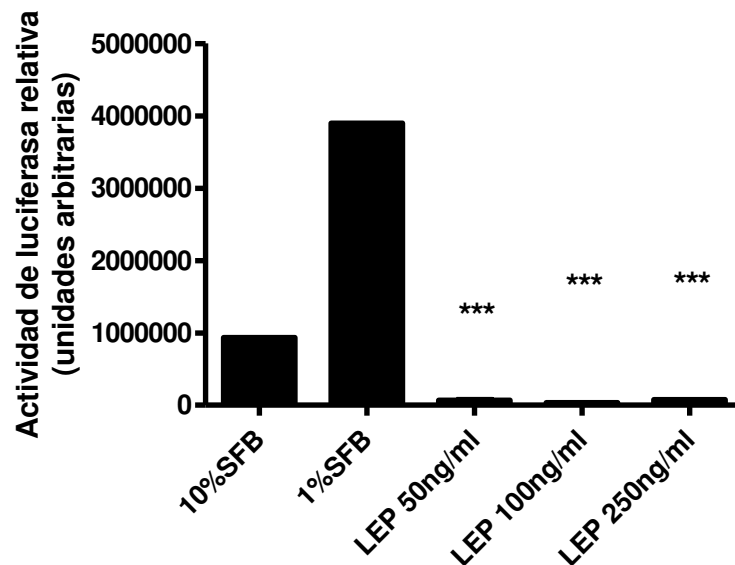


FIGURA 10. La leptina inhibe la expresión del intermediario pro-apoptótico Bax. Células JEG-3 fueron transitoriamente transfectadas con la construcción plasmídica pBax-Luc y tratadas con leptina, según se indica. Se incubaron por 72 h en medio DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa fue medida en los extractos celulares y normalizada a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados están expresados como promedios \pm D.E de un experimento realizado en triplicado. *** $p < 0.001$ vs 1% SFB.

Ha sido publicado que la leptina aumenta la proporción de ovocitos que luego desarrollan en blastocistos. Estos blastocistos exhiben un número de células incrementado y la proporción de células apoptóticas se encuentra reducida (317). Dado que hemos hallado que la inhibición de la expresión de leptina en trofoblastos resulta en la inducción de la apoptosis y dicho efecto puede ser totalmente revertido con la adición de leptina exógena, la acción autócrina de la leptina sería importante en la supervivencia de los trofoblastos y por tanto para el mantenimiento de la placenta. Esto también tendría relevancia en condiciones patológicas, dado que el ARNm de leptina se encuentra incrementado en placentas preeclámpticas en las que el feto podría encontrarse bajo condición de estrés crónico (459). Sin embargo, estudios previos han demostrado que en células trofoblásticas, la leptina no es capaz de contrarrestar la apoptosis promovida por condiciones patofisiológicas como la hipoxia (412), incluso siendo éste un conocido factor promotor de la expresión de leptina (413).

La leptina previene la apoptosis de células trofoblásticas a través de la activación de la vía de MAPK

Una vez evaluada la acción antiapoptótica de leptina en trofoblastos de placenta humana, nos hemos propuesto determinar las vías de señalización involucradas en dicho efecto. Para ello, en primer lugar se cultivaron células JEG-3 en ausencia de suero, con o sin leptina y en presencia de un inhibidor de PI3K, wortmanina, o de un inhibidor de MEK, PD98059. Se midieron los eventos apoptóticos tempranos por detección simultánea de Anexina V-FITC/PI empleando citometría de flujo. Al igual que lo observado previamente, la leptina inhibió la apoptosis inducida por privación de suero, en células trofoblásticas, reduciendo aproximadamente a un tercio del control el porcentaje de células apoptóticas (42,5% a 12,8%) (Figura 11A). Asimismo, la leptina fue capaz de disminuir 4,5 veces la población de células apoptóticas generada por ausencia de suero, aún en presencia de 50 nM de wortmanina (Figura 11B).

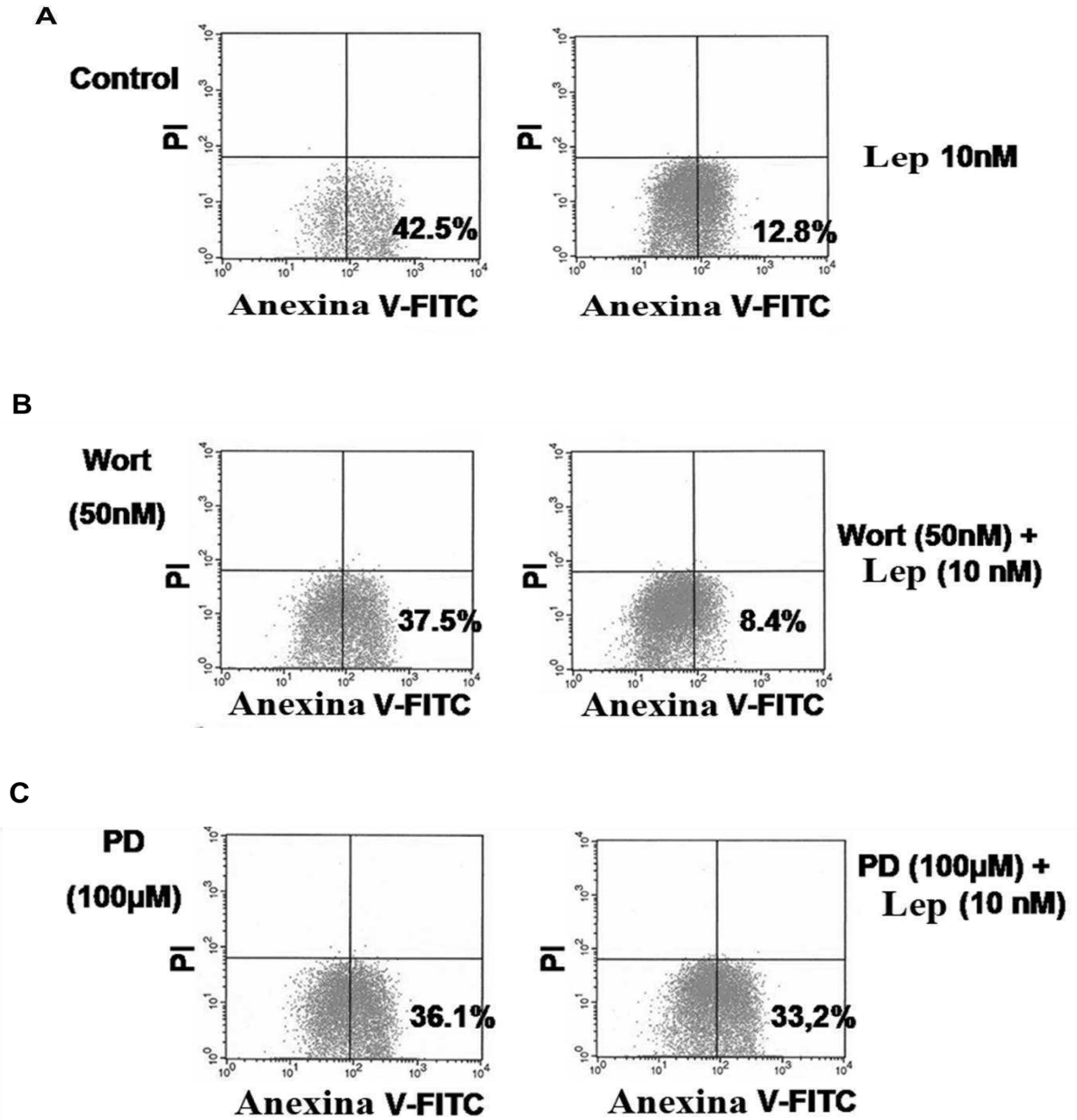


FIGURA 11. La leptina previene los eventos apoptóticos tempranos en células JEG-3 activando la vía de MAPK. Células fueron incubadas con o sin leptina 10 nM, en ausencia o presencia de 50 nM de wortmanina (wort) o 100 µM de PD98059 (PD). Los datos presentados son gráficos de puntos de la citometría de flujo de células JEG-3 teñidas con Anexina V-FITC/PI. El cuadrante inferior izquierdo contiene las células viables, que excluyen al PI y son negativas para la unión de anexina V-FITC. El cuadrante superior derecho muestra las células no viables, apoptóticas tardías y necróticas, positivas para ambas tinciones. Los cuadrantes inferiores a la derecha representan las células apoptóticas, positivas para la Anexina V-FITC, y negativas para PI. Se muestra un experimento representativo de cuatro repeticiones independientes.

Sin embargo, en presencia de 100 μ M de PD98059, el efecto antiapoptótico de leptina fue totalmente revertido, observándose un porcentaje similar de células apoptóticas con y sin leptina (Figura 11C). Esto sugiere que la vía de MAPK estaría mediando el efecto antiapoptótico de leptina en trofoblastos de placenta.

A fin de confirmar las vías involucradas en la acción antiapoptótica de leptina, estudiamos por western blot, la activación de caspasa-3 en células JEG-3, utilizando anticuerpos específicos contra la forma activa (clivada) de la proteína. Según muestra la Figura 12, la leptina previno la activación de caspasa-3 inducida por la deprivación de suero durante 16 h. Este efecto fue bloqueado por PD98059, mientras que la wortmanina no fue capaz de revertir el efecto antiapoptótico de la hormona. En este caso, la banda de caspasa activa detectada es el fragmento de 17 kDa.

De esta forma, hemos demostrado que la leptina previene tanto los eventos apoptóticos tempranos (exposición de fosfatidilserina) como los tardíos (activación de caspasa-3), a través de la vía de MAPK. La vía de la PI3K cumple un rol clave en la regulación de la apoptosis y en el crecimiento y ciclo celular. Sin embargo, en nuestro caso, la inhibición de dicha vía no previene del efecto antiapoptótico de leptina, sugiriendo que en las células trofoblásticas, la vía de señalización de PI3K no estaría involucrada en las funciones antiapoptóticas de leptina en placenta.

En resumen, hemos hallado que las principales vías de señalización del receptor de leptina son activadas por la leptina en placenta y que los efectos antiapoptóticos de leptina están principalmente mediados por la vía de MAPK. En la Figura 13 se puede observar la representación gráfica de los resultados obtenidos, en donde se esquematizan las vías de señalización activadas por la leptina en placenta, así como los posibles efectos derivados de dicha activación.

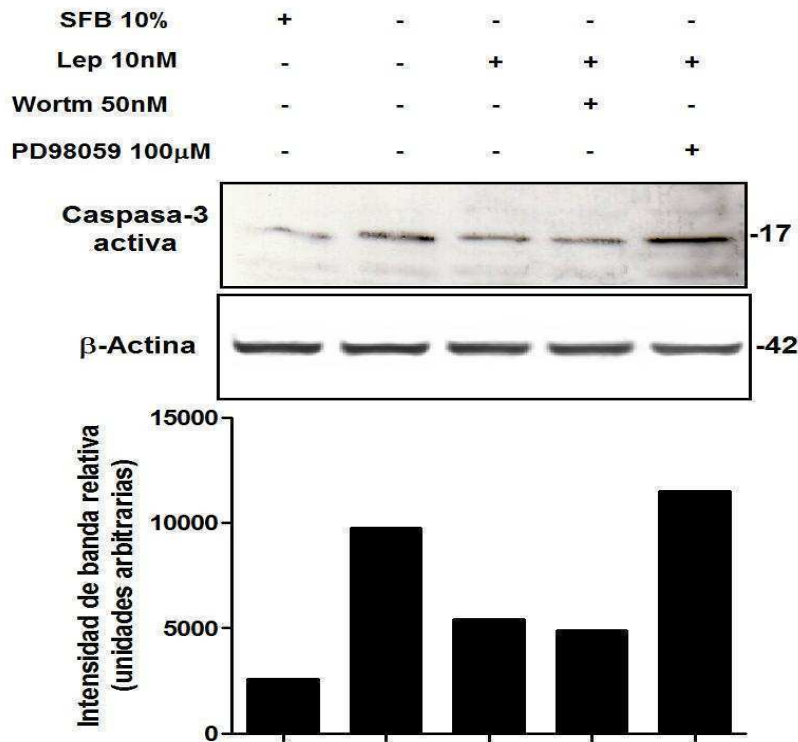


FIGURA 12. La leptina inhibe la apoptosis en células trofoblásticas a través de la activación de la vía de MAPK. Células JEG-3 fueron incubadas en ausencia de suero con o sin leptina 10 nM por 16 h, en ausencia o presencia de 50 nM de wortmanina o 100 μ M de PD98059. Las células fueron lisadas y los extractos celulares se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos específicos para la forma clivada de caspasa-3. El control del experimento se realizó con células JEG-3 cultivadas en medio 10 % suero. La cantidad de proteína en cada muestra se determinó por inmunoblot con un anticuerpo anti- β -actina. Se muestra un experimento representativo de tres repeticiones independientes.

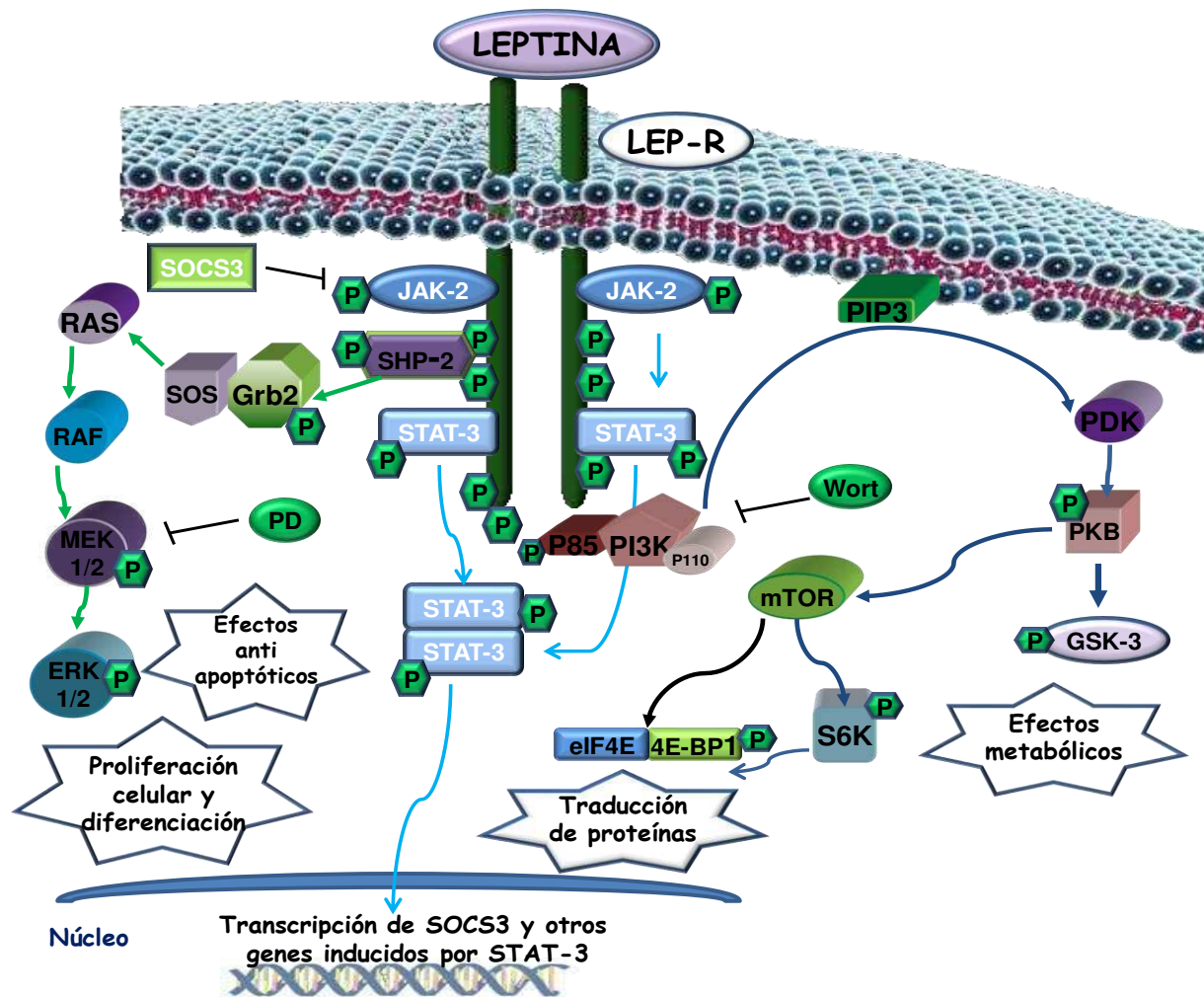


FIGURA 13: Vías de señalización activadas por la leptina en placenta. El diagrama esquemático resume los caminos de señalización regulados por la leptina en placenta humana, incluyendo las vías de JAK/STAT, MAPK y PI3K. La vía de MAPK se indica como la responsable de los efectos antiapoptóticos de la leptina. ERK (quinasa regulada extracelularmente), SHP-2 (proteína tirosín fosfatasa conteniendo un dominio con homología a Src-2 (SH2)), SOCS-3 (supresor de la señalización de citoquinas 3), Grb2 (factor de crecimiento de unión a receptor-2), SOS (hijo de la proteína sevenless, “son of sevenless”), JAK (Familia de tirosin quinasa Janus), STAT (señales activadoras y transductoras de la transcripción), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), PDK (quinasa dependiente de inosítidos -1), PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato), PKB (proteína quinasa B o Akt), p70S6K (p70S6quinasa ribosomal), GSK-3 (glicógeno sintasa quinasa 3). PD, PD98059. Wort, wortmanina. Las flechas con punta indican activación o regulación. Las flechas terminadas en línea recta cruzada indican inhibición.

Sección II

Regulación de la expresión de leptina y vías de señalización involucradas

Regulación de la expresión de leptina por hCG y vías de señalización involucradas

Hemos analizado en la sección previa, la importancia de la leptina en la supervivencia de las células trofoblásticas y en la prevención de la apoptosis. Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la regulación de la expresión de leptina en placenta por distintas moléculas claves durante el período gestacional. En particular, dado al rol fundamental que cumple la hormona hCG en el inicio y el mantenimiento del embarazo (355), nos planteamos analizar la modulación de la expresión de leptina por hCG. Utilizamos como modelos de trabajo las líneas celulares trofoblásticas BeWo y JEG-3, derivadas de coriocarcinoma humano, y explantos de placenta humana a término. Estas líneas celulares expresan tanto leptina como su receptor (361) y mantienen muchas de las características de las células trofoblásticas humanas. Han sido ampliamente utilizadas para estudios de señalización celular en placenta (120, 221, 460-462). La placenta, y en particular sus citotrofoblastos, cumplen la mayor función endócrina necesaria para el desarrollo y crecimiento fetal. La hCG es secretada por el trofoblasto veloso y actúa sobre otras células receptoras productoras, del ambiente fetoplacentario (354). De esta manera, procedimos a investigar la acción de hCG, como señal esencial durante el embarazo, sobre la expresión de la leptina placentaria.

La hCG induce la expresión de leptina endógena en células de placenta de manera dosis y tiempo dependiente

Células BeWo fueron crecidas al 50-60% de confluencia en medio completo DMEM-F12 suplementado con SFB 10 %. El tratamiento con hCG recombinante (0-500 IU/ml) se realizó en el mismo medio con 1% de SFB, durante 3 días. Luego del tratamiento, las células fueron lisadas y los extractos celulares fueron corridos en SDS-PAGE. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Según se observa en la Figura 14, hCG incrementa la expresión de leptina en células BeWo de manera dosis dependiente. El máximo efecto se alcanzó a 100 IU/ml de hCG, con 3,5 veces de inducción respecto al control sin tratar. A dosis más altas (500 IU/ml), la expresión de leptina retorna a los niveles control. Este efecto es probablemente debido a una pérdida transitoria en la producción de segundos mensajeros y/o a una pérdida en los receptores de superficie celular (desensibilización), en respuesta a las dosis farmacológicas del ligando (463). A fin de estudiar el efecto de hCG en un modelo más fisiológico, analizamos explantos de placentas humanas normales. Los explantos fueron incubados durante 4 h en medio suplementado o no con concentraciones crecientes de hCG (0-500 IU/ml). La expresión de leptina se determinó por Western blot. La Figura 15 muestra que hCG incrementó la expresión de leptina en explantos de placenta. Este efecto fue dosis dependiente, observándose la estimulación máxima a 100 IU/ml de hCG, con 5,5 veces de inducción. Estos resultados coinciden con los obtenidos en células BeWo, dando una mayor validez fisiológica a los mismos. Para caracterizar en más detalle el efecto de hCG sobre la expresión de leptina en placenta, realizamos experimentos de curvas de tiempo para la expresión de leptina, en células BeWo estimuladas con 50 o 100 IU/ml de hCG. El tratamiento se realizó en medio DMEM-F12 suplementado con 1% SFB y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Según se observa en la Figura 18, la presencia de hCG en el medio de cultivo produjo un aumento en la expresión de leptina. El efecto máximo se obtuvo a las 72 h de tratamiento con 100 IU/ml de hCG, alcanzando 6,9 veces de estimulación. Sin embargo, ya a las 24 h y a las 48 h de tratamiento se observa inducción con 100 IU/ml de hCG, alcanzando las 5 veces de estimulación de leptina.

Previamente ha sido demostrado que en explantos de primer trimestre, la liberación de hCG es pulsátil y que dicha secreción es aumentada tanto por GnRH como por leptina (309, 353). También se ha demostrado que la leptina posee un efecto estimulatorio en la secreción de hCG en cultivos primarios de células trofoblásticas de placenta humana a

término (308) y en células trofoblásticas del primer trimestre (35). La acción de la leptina en la secreción de hCG aparentemente depende del momento del embarazo, no afectando la secreción de hCG a término (363) pero aumentando la secreción de hCG en explantos del primer trimestre (309). Por otro lado, la secreción de leptina es estimulada significativamente en células citotrofoblásticas luego del tratamiento por 4 h con GnRH-II. Dado este escenario, es posible que en el contexto fisiológico, cambios en las concentraciones locales de hCG puedan determinar la expresión de leptina. En dicho sentido, ha sido reportado que la secreción de leptina en citotrofblastos humanos fue significativamente inhibida, cuando se incubaron durante 4 h con concentraciones crecientes de hCG (326). En estos experimentos los autores emplean concentraciones de hCG desde 5000 a 30000 IU/ml. En coincidencia con dichos resultados, nuestros hallazgos mostraron una reducción pronunciada en la expresión de leptina a concentraciones de hCG mayores a 100 IU/ml. Entre las diferentes hormonas secretadas por la placenta, la GnRH, la hCG y la leptina estarían involucradas en un circuito autócrino/parácrino, regulando funciones placentarias principalmente durante el primer trimestre de embarazo.

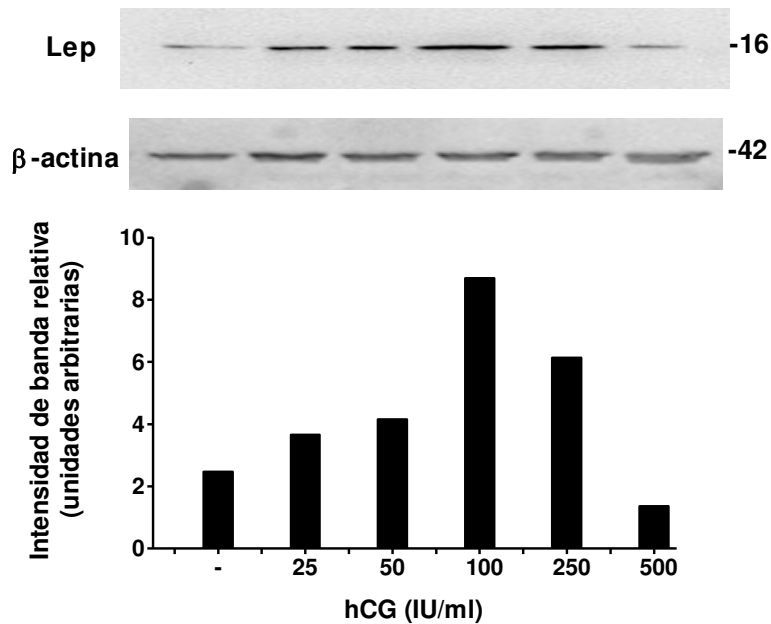


FIGURA 14. HCG induce la expresión de leptina en células de placenta. Células BeWo (1×10^6) fueron plaqueadas en medio DMEM-F12 suplementado con 1% SFB e incubadas durante 3 días con diferentes dosis de hCG (unidades internacionales por ml). Los extractos

celulares se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anticuerpo anti- β -actina. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas. La masa molecular (kiloDaltons) se indica a la derecha de las bandas.

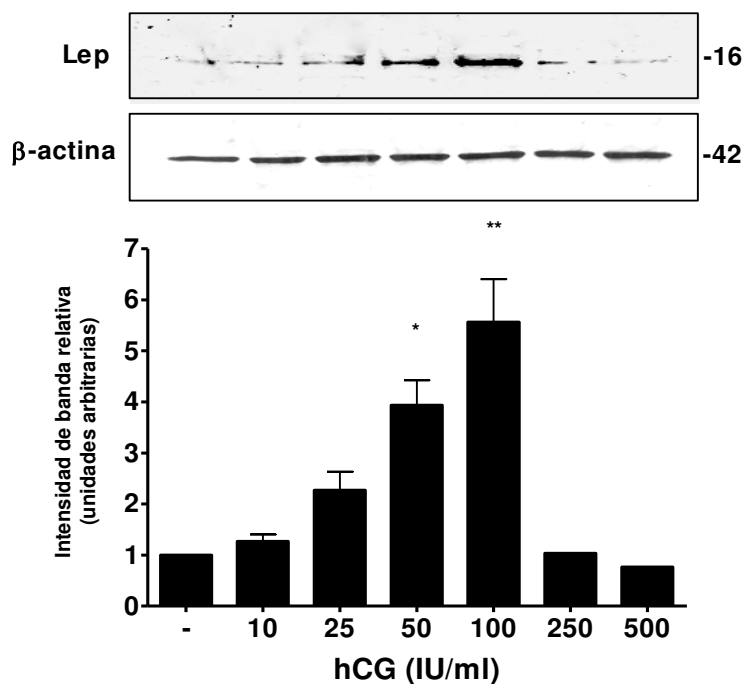


FIGURA 15. La hCG estimula la expresión de leptina endógena en explantos de placenta. Explantos de placenta humana a término fueron procesados según lo descrito previamente y tratados con concentraciones crecientes de hCG durante 10 min. Los extractos celulares se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anticuerpo anti- β -actina. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas relativas al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control de acuerdo al test de comparaciones múltiples post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. La masa molecular (kDa) se indica a la derecha de las bandas.

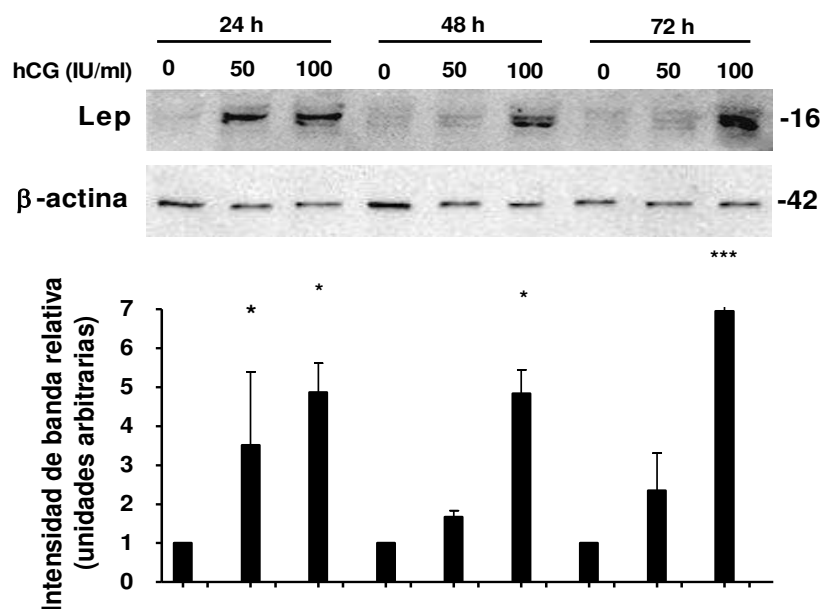


FIGURA 16. La hCG estimula la expresión de leptina a distintos tiempos de incubación. Células BeWo fueron incubadas por 24 (calles 1-3), 48 (calles 4-6) y 72 h (calles 3-9), y tratadas con 50 IU/ml de hCG (calles 2, 5 y 8), 100 IU/ml de hCG (calles 3, 6 y 9) o no tratadas (calles 1, 4 y 7). Los extractos celulares se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anticuerpo anti- β -actina. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas relativas al control sin agregado de droga a cada tiempo al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a cada control de acuerdo al test de comparaciones múltiples post hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. La masa molecular (kDa) se indica a la derecha de las bandas.

La expresión del ARNm de leptina es estimulada por hCG

Una vez que determinamos que la hCG estimula la síntesis de leptina como proteína en placenta, nos propusimos analizar si dicho efecto ocurre también a nivel del ARNm. A tal fin, se trataron células JEG-3 durante 3 días, con las concentraciones indicadas de hCG y se extrajo el ARN total para evaluar por PCR cuantitativa a tiempo real la cantidad de

ARNm de leptina presente. Según se muestra en la Figura 17, hCG estimula la expresión del mensajero de leptina de manera dosis dependiente, alcanzándose el máximo efecto con 50 IU/ml de hCG (11,7 veces de inducción). De manera similar, y otorgando una validación fisiológica a los resultados en líneas celulares, cuando se trataron explantos de placentas normales con distintas dosis de hCG, se observó que ésta induce significativamente la expresión del ARNm de leptina, llegando a las 27,2 veces de estimulación, con 50 IU/ml de hCG (Figura 18).

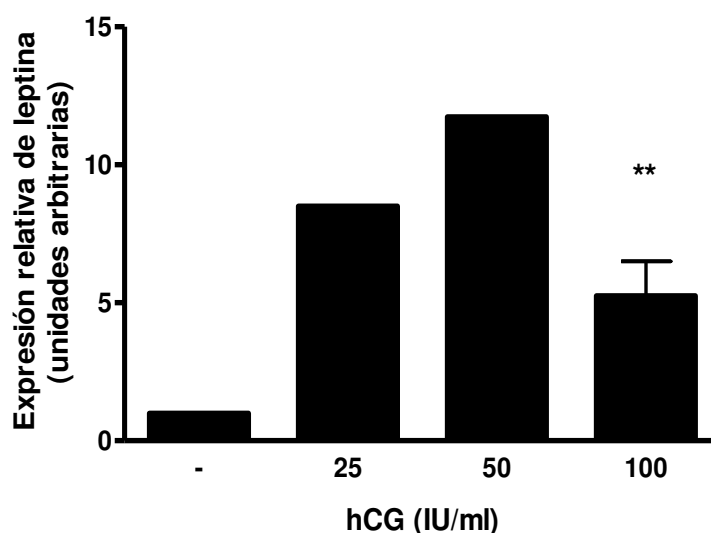


FIGURA 17. HCG induce la transcripción de leptina en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron incubadas en medio DMEM-F12 con 1% SFB y tratadas con concentraciones crecientes de hCG. Luego de 3 días de incubación, se extrajo el ARN de las células según lo descrito en Materiales y Métodos y el ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. Como control de expresión se utilizó la ciclofilina. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control de acuerdo al análisis estadístico por ANOVA seguido del test a posteriori de Bonferroni. ** $p < 0.01$.

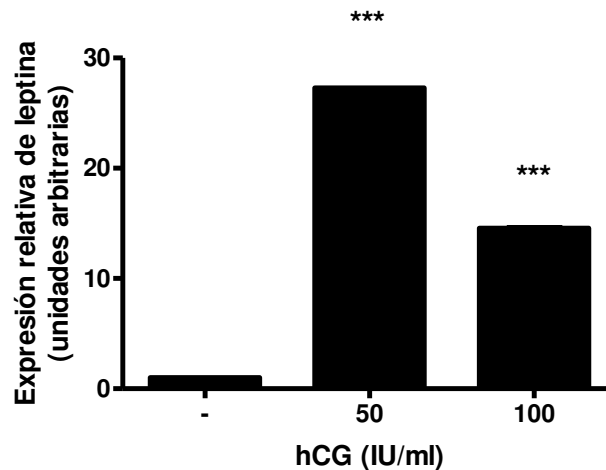


FIGURA 18. HCG induce la transcripción de leptina en explantos de placenta. Explantos de placentas normales a término fueron incubados durante 4 h en medio DMEM-F12 con 1% SFB y tratados con concentraciones crecientes de hCG. Luego de la incubación, se extrajo el ARN de los explantos según lo descrito en Materiales y Métodos y el ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. Como control de expresión se utilizó la ciclofilina. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control de acuerdo al análisis estadístico por ANOVA seguido del test a posteriori de Bonferroni. *** $p < 0.001$

Estos resultados demuestran que la hCG es capaz de estimular la expresión de leptina a nivel del ARNm.

La actividad del promotor de leptina es inducida por hCG de manera dosis dependiente

Dados los efectos estimulatorios que hemos observado de hCG sobre la expresión de la proteína y del ARNm de leptina, nos planteamos estudiar si estos efectos son ejercidos a nivel de la activación del promotor, induciendo la transcripción del gen de leptina. Para ello, se realizaron ensayos de transfecciones transitorias con un vector que contiene la región regulatoria del gen de leptina (desde -1951pb) fusionada al gen reportero de la luciferasa (pL1951). La expresión de luciferasa bajo el control del promotor de leptina fue proporcional a la cantidad de plásmido tranfectado, hasta los 15 μ g, según se mostró en la

sección Materiales y Métodos. Según observamos en la Figura 19 el tratamiento con hCG aumentó significativamente la expresión de luciferasa en células transfectadas con pL1951. El efecto máximo se alcanzó a las 100 IU/ml de hCG, donde se obtuvo una inducción de 23 veces. La actividad del promotor comienza a decrecer a dosis más altas de hCG, al igual que lo observado previamente para la expresión endógena de la leptina. Estos resultados indican que la hCG estimula la actividad del promotor de leptina y que regula la expresión del gen a un nivel transcripcional.

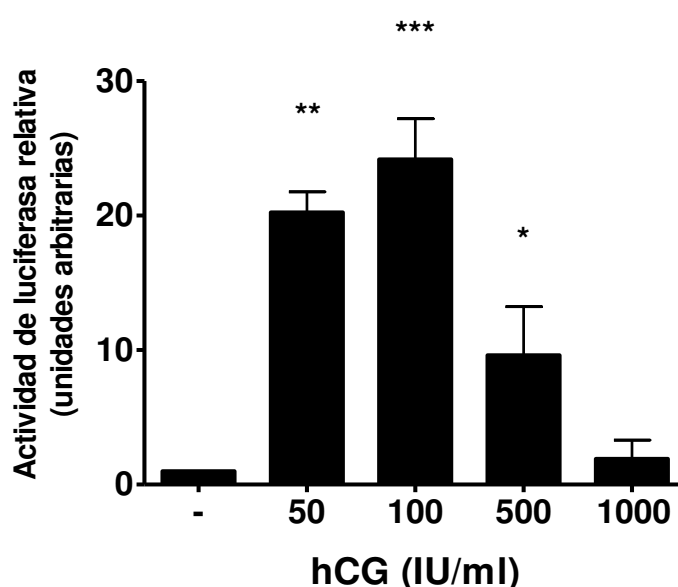


FIGURA 19. HCG induce la actividad del promotor de leptina en células BeWo. Células fueron transitoriamente transfectadas con la construcción plasmídica pL1951 y tratadas con hCG según se indica. Se incubaron por 72 h en medio DMEM-F12 y 1% SFB. La actividad de luciferasa fue medida en los extractos celulares y normalizada a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados están expresados como promedios \pm D.E para dos experimentos independientes realizados en triplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$.

Con el objeto de identificar la región del promotor de leptina necesaria y suficiente para evidenciar dicha inducción, realizamos ensayos de transfección transitoria con plásmidos conteniendo deleciones seriales del promotor de leptina. Determinamos que hCG

es capaz de estimular la expresión de leptina en todos los fragmentos analizados (Figura 20). La región de -2922 a -1951 pb fue inducida 3 veces respecto a su control sin hCG. La construcción que contiene la región promotora de -948 a -1546 pb probablemente posee algún o algunos elementos inhibitorios, dado que la actividad promotora, tanto basal como en presencia de hCG, disminuye abruptamente. Esta actividad se recupera cuando se utiliza la construcción desde -948 pb. En resumen, estos resultados muestran que la hCG estimula la actividad del promotor de leptina probablemente a través de elementos presentes en su promotor y una región mínima de 218 pb es suficiente para evidenciar el efecto de inducción.

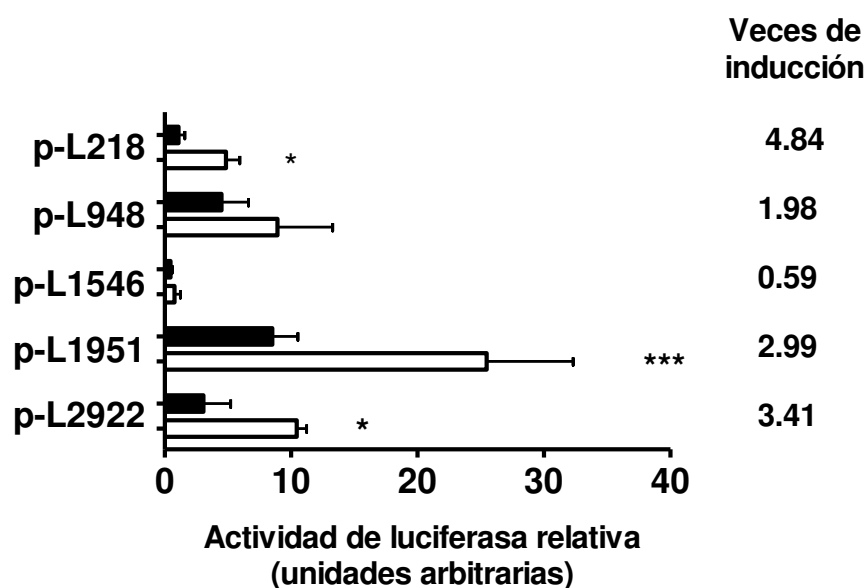


FIGURA 20. Una región mínima de 218 pb es suficiente para evidenciar la activación del promotor de leptina por hCG. Células BeWo fueron transitoriamente transfectadas con plásmidos conteniendo diferentes deleciones del promotor de leptina y tratadas (barras blancas) o no tratadas (barras negras) con hCG 100 IU/ml. La actividad de luciferasa fue medida en los extractos celulares y normalizada a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados están expresados como promedios \pm D.E. para dos experimentos independientes realizados en triplicado. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

En función de lo observado, hemos analizado las secuencias promotoras de leptina comprendida entre los -2922 pb el +1, a fin de identificar los elementos potencialmente responsables de la regulación del promotor de leptina por hCG. Para ello, realizamos un

análisis in silico de las secuencias promotoras del gen de leptina, comparando con la base de datos de elementos o secuencias de unión al DNA consenso para distintos factores de transcripción (Figura 21). Se utilizaron las herramientas informáticas de búsqueda y comparación disponibles, Transfac y MatInspector. Del análisis de la secuencia -218, se evidenciaron putativos elementos de unión para diferentes factores como C/EBP y Sp1 con una similitud de 1. Reportes previos ya habían demostrado que estos factores de transcripción regulan la expresión de leptina en adipocitos (183, 336-339). Asimismo, los factores C/EBP pueden regularse por hCG durante el desarrollo del folículo (464). Otros investigadores también describieron que la hCG regula positivamente la expresión de C/EBP en cultivos primarios de adipocitos de rata (465, 466). Sp-1 es un factor de transcripción ubicuo involucrado en la vía de MAPK, cuyo elemento de unión fue descrito en el gen de leptina (336, 339). En tejido adiposo, la presencia de estos dos elementos parece ser clave, dado que sólo se requieren 217 pb de la secuencia 5' del gen de leptina para su transcripción basal (183). También se encontraron en el promotor de leptina elementos CRE, que responden a AMPc. Esta observación podría sugerir la modulación en la expresión del gen por el segundo mensajero y sustenta nuestra hipótesis de que el nucleótido es uno de los reguladores en placenta de la transcripción de leptina. En la región comprendida entre -1971 y -1983 localizamos una secuencia GATA. Los factores de transcripción que se unen a este elemento emergen como actores fundamentales en el desarrollo y en las funciones reproductivas en mamíferos. Los elementos GATAs parecen ser regulados en parte por la señalización de gonadotropinas, a través de la vía del AMPc y la PKA (467), lo que sería una evidencia más para la regulación del promotor de leptina por hCG.

estimulante 1, factor de transcripción ubicuo dedos de zinc, **C/EBP**: CAAT/ proteína de unión a intensificador, **CRE**: elemento de respuesta a AMPc, **GRE**: elemento de respuesta a glucocorticoides, **TEF**: factor tirotrófico embrionario, **SF1**: factor esteroideogénico 1, **IRF1**: factor de regulación por interferon 1, **IRF7**: factor de regulación por interferon 7, **ARE**: elemento de unión a receptor de andrógenos, **TTF1**: sitio de unión de factor de transcripción de tiroides 1, **HRE**: elemento de respuesta a hipoxia, **VJUN**: v-Jun, **FAST-1/SMAD**: señal de transducción de la activina-1/proteína relacionada a Sma- y Mad-2, **RREB1**: elemento de respuesta por unión de proteína Ras-1, **ERE**: elemento canónico palindrómico de respuesta a estrógenos, **NFKB50**: NF-kappaB (p50), **INSM1**: elemento de unión a proteína asociada a insulinoma-1 (IA-1), funciona como represor transcripcional, **GFI1**: factor de crecimiento independiente 1, proteína con motivos de dedos de zinc que actúa como represor transcripcional.

Finalmente, a partir de los datos obtenidos en el análisis in silico descrito y los datos provistos por publicaciones previas, hemos realizado una representación integratoria y esquemática con los elementos regulatorios presentes en el promotor de leptina (Figura 22). Se destaca entre los elementos, el intensificador de la transcripción de leptina, específico de placenta, formado por tres elementos distintos consecutivos denominados PLE (339). Este “enhancer” media la expresión placentaria de leptina y podría explicar el aumento de la misma durante el embarazo. Aún no se han identificado los factores de transcripción que se unen al mismo.

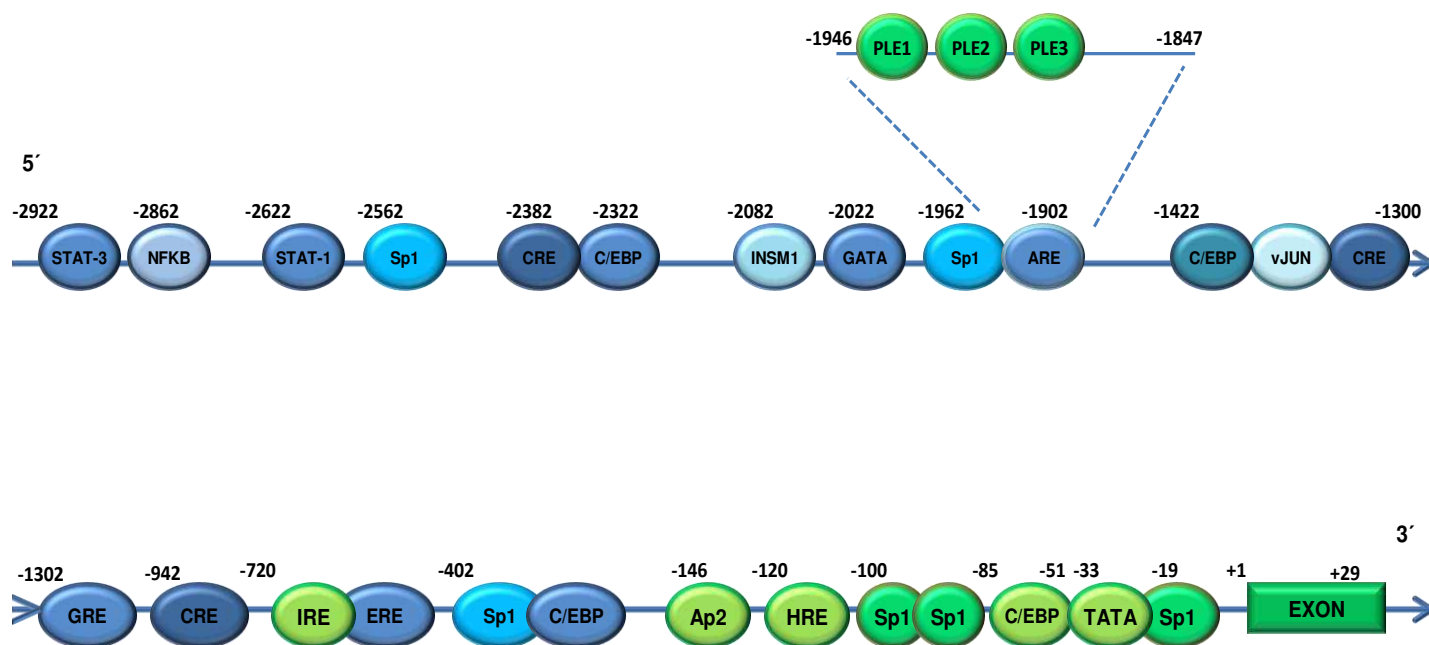


FIGURA 22. Representación esquemática de los elementos reguladores del promotor de leptina. El diagrama muestra los elementos regulatorios putativos (círculos azules) y los reportados (círculos verdes) para diferentes factores de transcripción. La zona aumentada del promotor muestra la posición del “enhancer” placentario de leptina (PLE 1, 2 y 3) (339).

El tratamiento con hCG aumenta la concentración de AMPc endógeno e involucra la participación de elementos CRE en la regulación de la transcripción

Se encuentra generalmente aceptado que la unión de hCG a su receptor desencadena la vía de transducción de señales a través de la activación de la proteína G heterotrimérica, y en la clásica respuesta se elevan los niveles intracelulares de AMPc y se induce la activación de la vía de PKA (358). De hecho, ha sido reportado que la hCG es capaz de aumentar los niveles de AMPc en la placenta humana, lo que sugiere que el AMPc sería uno de los segundos mensajeros en la acción del hCG para regular su propia síntesis y la de otras moléculas (468, 469). En base a esto, decidimos evaluar en primer lugar si en nuestro sistema, el tratamiento con hCG eleva los niveles intracelulares de AMPc. Así, llevamos a cabo un experimento en el cual utilizando un kit comercial medimos el AMPc intracelular generado en los trofoblastos luego del tratamiento con concentraciones crecientes de hCG

(Figura 23). La hCG produjo un aumento del AMPc endógeno y este efecto resultó dosis dependiente. El incremento en los niveles de AMPc resultó significativo a partir de 50 IU/ml de hCG. Nuestros resultados coinciden con reportes previos que indican que en placenta, la hCG produce un incremento en el AMPc intracelular (468, 469). Los niveles de AMPc generados (0,4-1,8 μ M), resultaron cercanos a las concentraciones de AMPc utilizadas en los experimentos de incubación con el análogo dibutilil AMPc (Ver más adelante).

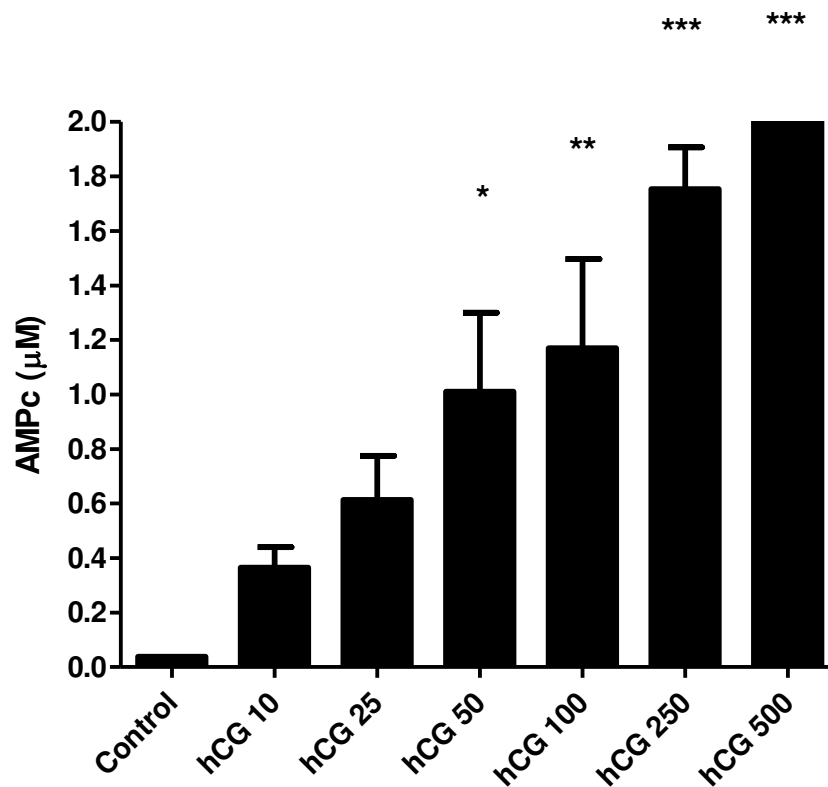


FIGURA 23. La hCG incrementa el AMPc en células de placenta. Células BeWo crecidas en DMEM 10 % SFB, fueron tratadas en placas de 96 pocillos, durante 3 días, con las concentraciones de hCG (IU/ml) que se indican, en medio 1% SFB. Se realizó la lisis celular según lo indicado por el kit de medición de AMPc (ver Materiales y Métodos) y se determinó la actividad de luciferasa en cada pocillo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las concentraciones de AMPc se determinaron a partir de una curva estándar de RLU (unidades de luminiscencia relativa) en función de [AMPc] μ M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Para continuar analizando la participación de la vía del AMPc en la acción de hCG en placenta, realizamos en células BeWo, una transfección transitoria con un plásmido reportero que posee clonados varios elementos CRE junto a un promotor mínimo río arriba del gen Luc (pCRE-luc). Analizamos así si dicho gen es activado por el tratamiento con hCG. Según se observa en la Figura 24, hCG indujo la activación de CRE-luc, hasta incluso 1,7 veces respecto al control (100 IU/ml de hCG). Tal como se esperaba, el tratamiento con AMPc 1mM o la cotransfección con un plásmido de expresión del factor de transcripción CREB produjeron un aumento en la actividad de CRE-luc. El tratamiento con hCG causó un aumento aún mayor que el de estos dos tratamientos controles.

El núcleo de la secuencia de CRE se halla en una variedad de elementos regulatorios de genes que son activados por PKA. El principal factor de transcripción que se une a los CREs es CREB, el cual es sustrato de fosforilación por PKA (391). De acuerdo a esto, el resultado obtenido nos haría suponer que la activación de la leptina por hCG podría estar mediada por la vía de señalización de la PKA. Sin embargo, existen otras vías de señalización por las cuales CREB puede ser activado. Varios estudios han reportado que distintas quinasas son capaces de fosforilar CREB y luego éste activar la transcripción del gen respectivo. Son ejemplo de ellas, las quinasas CaMKs (proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} / calmodulina), RSKs (quinasas ribosomales S6), PKC, GSK-3 y CKII (caseína quinasa II) (391).

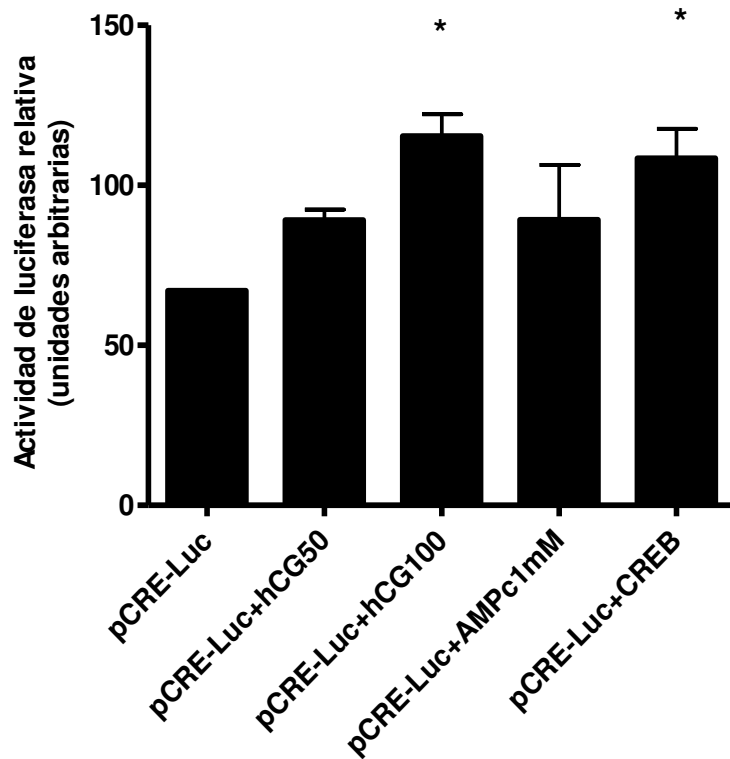


FIGURA 24. HCG activa la transcripción a través de elementos CRE. Células BeWo fueron transitoriamente transfectadas con la construcción plasmídica pCRE-Luc y tratadas con hCG o AMPc, según se indica; o cotransfectadas con el plásmido de expresión de CREB. Se incubaron por 72 h en medio DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa fue medida en los extractos celulares y normalizada a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados están expresados como promedios \pm D.E de un experimento realizado en triplicado. * $p < 0.05$.

La inducción de leptina por hCG es inhibida por la activación de la vía de señalización dependiente de AMPc

En función de los resultados obtenidos, el siguiente paso fue evaluar si la estimulación de leptina por hCG es mediada por la vía del AMPc. Para ello, se trataron células BeWo con hCG, (Bu)₂cAMP o ambos, y la expresión de leptina se determinó por Western blot (Figura 25). De acuerdo a lo hallado previamente, la hCG estimuló de manera significativa la expresión de leptina, 2,5 veces con hCG 100 IU/ml y 2 veces con hCG 50 IU/ml. Sin embargo, el tratamiento conjunto de distintas concentraciones de (Bu)₂cAMP

más hCG causó una pérdida completa del efecto inductor de la hormona. Esto resultó contrario a lo esperado, puesto que suponíamos que al tratar con ambas moléculas se observaría un efecto potenciado sobre la estimulación de la expresión de leptina.

A partir de lo observado a nivel de la expresión de leptina, nos propusimos analizar si el efecto inhibitorio del AMPc sobre la acción del hCG ocurría también a nivel de la transcripción de la leptina. Así, tratamos células JEG-3 con hCG en combinación con AMPc. Si bien, la hCG y el AMPc indujeron la expresión de leptina 64 y 66 veces respecto al control sin tratar, hallamos que el AMPc suprimió la estimulación de leptina por hCG, llevando los niveles del mensajero de leptina casi a los del control (Figura 26).

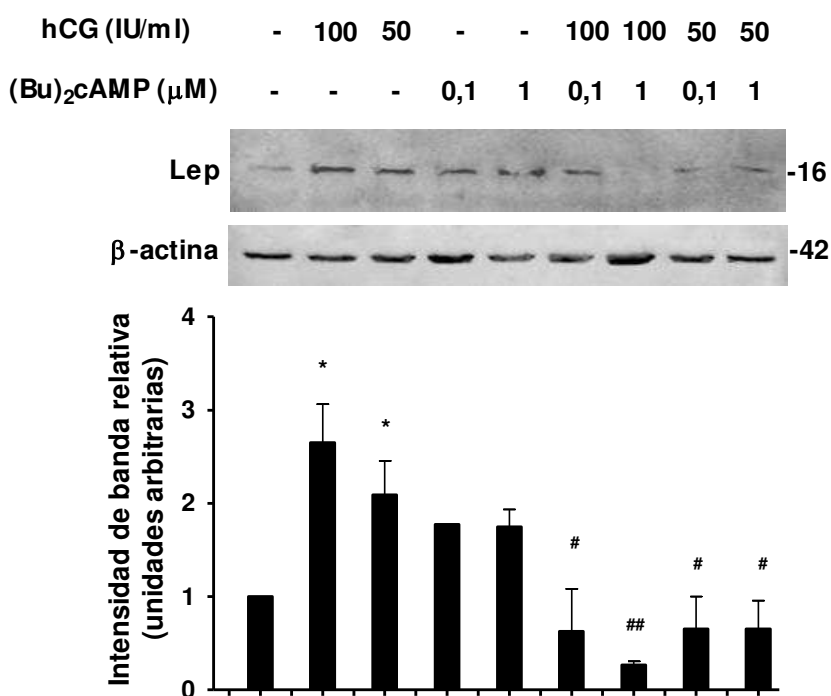


FIGURA 25. El AMPc impide la estimulación de hCG sobre la expresión de leptina en células BeWo. Se incubaron células durante 3 días con diferentes dosis de hCG y (Bu)₂cAMP como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito previamente y se sembraron en un SDS-PAGE 12%. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anti-β-actina. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se observa un experimento representativo de tres experimentos

independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados se expresan como promedios \pm D.E. * $p < 0.05$ vs control; #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.01$ vs tratamiento con hCG.

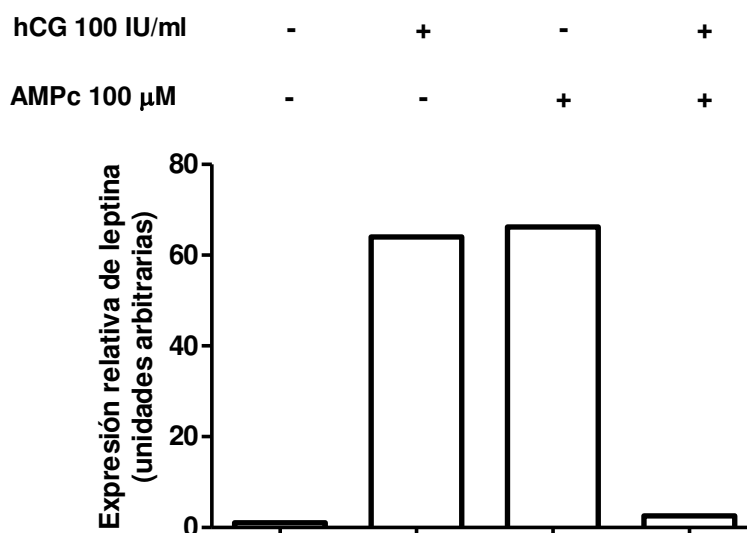


FIGURA 26. El AMPc bloquea el efecto inductor de hCG sobre el ARNm de leptina en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron cultivadas según lo descrito previamente y tratadas por 3 días con hCG y/o (Bu)₂cAMP en las concentraciones que se indican. Se extrajo el ARN total y el ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. La ciclofilina se empleó como control estándar interno. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados se expresan como el promedio de valores de un experimento realizado en triplicado.

Para confirmar los resultados previos, decidimos estudiar el efecto de AMPc en la inducción de leptina por hCG, a nivel de la activación de su promotor. Células BeWo fueron transitoriamente transfectadas con la construcción reportera de luciferasa pL1951 y tratadas con hCG, (Bu)₂cAMP, o IBMX, un inhibidor inespecífico de fosfodiesterasas. Los resultados se muestran en la Figura 27. Según se esperaba, hCG estimuló significativamente la actividad del promotor de leptina. El cotratamiento con la hormona y el nucleótido cíclico suprimió la inducción de leptina por hCG, causando una reducción de la actividad de 3,8; 5,1 y 30 veces con 0,1 μ M, 1 μ M y 1mM, respectivamente. Más aún, el tratamiento con IBMX en combinación con hCG también causó la supresión del efecto de

hCG sobre leptina, llevando a una reducción de 17 veces en la actividad del promotor de leptina. Esto refuerza la idea de que altos niveles de AMPc podrían suprimir el efecto de hCG sobre la expresión de leptina. Por otro lado, observamos que el tratamiento con (Bu)₂cAMP 0,1 μM o 1 μM indujo la actividad del promotor de leptina. Dicha observación coincide con lo obtenido en las Figuras 25 y 26 y se continuará analizando más adelante en el apartado correspondiente de la presente tesis.

hCG 100 IU/ml	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
(Bu) ₂ cAMP (μM)	-	-	0.1	1	1000	-	0.1	1	1000	-
IBMX 0.1mM	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

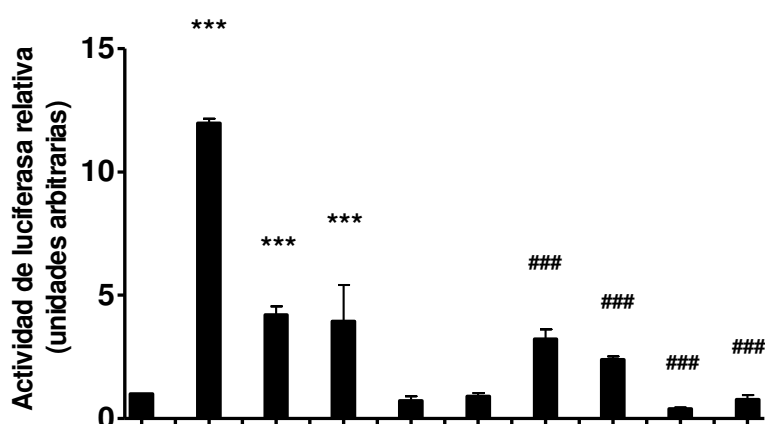


FIGURA 27. El AMPc suprime la inducción del promotor de leptina por hCG. Células BeWo fueron transitoriamente transfectadas con la construcción plasmídica pL1951 y tratadas con hCG, (Bu)₂cAMP e IBMX, según se indica. Las células se incubaron 72 h en DMEM-F12 y 1% SFB. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados se expresan como promedios ± D.E. ***p < 0.001 vs. control; ###p < 0.001 vs. tratamiento con hCG.

Finalmente, decidimos analizar la participación de la PKA en el mecanismo de inducción de leptina por hCG. Para ello, tratamos a las células con un inhibidor específico

de PKA, H89, en combinación con hCG. Como puede observarse en la Figura 28, la hCG incrementó la expresión de leptina y éste efecto se mantuvo en presencia del inhibidor, siendo incluso mayor la inducción de leptina en presencia del inhibidor y hCG, que sólo con hCG. Esto sugeriría que la vía de la PKA no se encontraría involucrada en los mecanismos de estimulación de leptina por hCG. Asimismo, sería posible que la inhibición del AMPc sobre la acción de hCG en placenta estuviera mediada por la activación de la PKA.

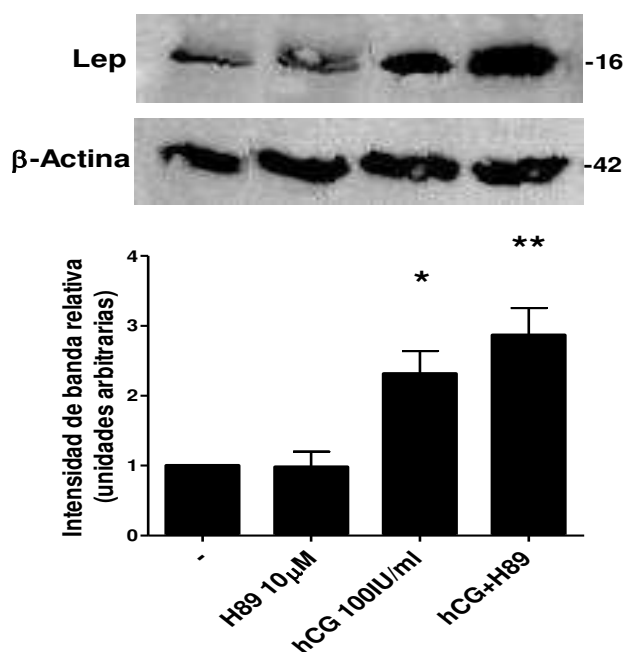


FIGURA 28. La inhibición de la PKA no bloquea el efecto inductor de hCG sobre la leptina en células placentarias. Células BeWo se preincubaron con H89 durante 30 min y luego se incubaron o no con hCG, por 72 h, como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito previamente y se sembraron en un SDS-PAGE 12%. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anti-β-actina. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se observa un experimento representativo de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los resultados se expresan como promedios ± D.E. *p< 0.05, ** p< 0.01.

Los resultados sugieren que el aumento en los niveles de AMPc inhibe la inducción de leptina por hCG. En adipocitos ha sido reportado que el ARNm de leptina es estimulado por AMPc (180). Por otro lado, Zhao y colaboradores (302) demostraron que la expresión y secreción de leptina en placenta son especie-específico y que 1mM de AMPc aumenta la secreción de leptina en células BeWo. En nuestro caso, la activación de la PKA por un aumento en los niveles de AMPc podría ser la responsable de la anulación del efecto de hCG sobre leptina, por el AMPc. De todas formas, se requieren más experimentos para determinar los mecanismos responsables del fenómeno observado.

Recientemente ha sido descrita la regulación negativa del receptor de LH/hCG, en ratas tratadas con hCG o con elevación crónica de la producción de AMPc. Por otro lado, en células de ovario o testículo altas concentraciones de hCG o de AMPc regulan negativamente los receptores de superficie, además de disminuir la abundancia de todos los transcriptos del receptor (470). Otro mecanismo por el que el AMPc disminuye los receptores de LH/hCG es reduciendo la tasa de aparición de los receptores. La regulación negativa del receptor LH/hCG parece ser un proceso lento que lleva más de 24 hs para ser efectivo (471). Además, la finalización en la señalización, mediada por el receptor acoplado a proteína G debido al exceso de ligando, ha sido descrita tanto in vivo como in vitro en diferentes tipos celulares (472, 473).

Así, la regulación negativa del receptor de hCG podría explicar la ausencia de la estimulación de AMPc en el efecto de hCG sobre la leptina. Por otro lado, estos resultados sugieren la existencia de una vía alternativa activada por hCG, independiente de la vía AMPc/PKA, la cual podría estar previniendo la rápida desensibilización del receptor, en presencia de altas concentraciones del ligando que ocurren durante la implantación y el embarazo.

Algunos autores han mostrado que el hecho de que el receptor de hCG se regule de manera positiva o negativa depende de la concentración de AMPc utilizada y del tiempo de exposición (474). Esta evidencia nos condujo a pensar en la posibilidad de que altas concentraciones de hCG en combinación con AMPc agregado exógeno causen la inhibición en la estimulación de leptina por hCG. Por lo tanto, llevamos a cabo un experimento en el cual determinamos por Western blot la expresión de leptina en células BeWo tratadas con concentraciones bajas de hCG (no estimuladoras de leptina) combinadas o no con

(Bu)₂cAMP (Figura 29). Según se observa, el agregado de AMPc causó un aumento en la inducción de leptina por hCG, y éste fue mayor aún, con bajas concentraciones de AMPc (1µM). Esto estaría verificando la evidencia de que altas concentraciones de AMPc (en nuestro caso producidas por el AMPc exógeno sumado al AMPc que se generaría por el tratamiento con hCG) llevarían a una inhibición del efecto estimulador del hCG. De hecho, en la Figura 23 confirmamos que el tratamiento con hCG causa un incremento en las concentraciones de AMPc

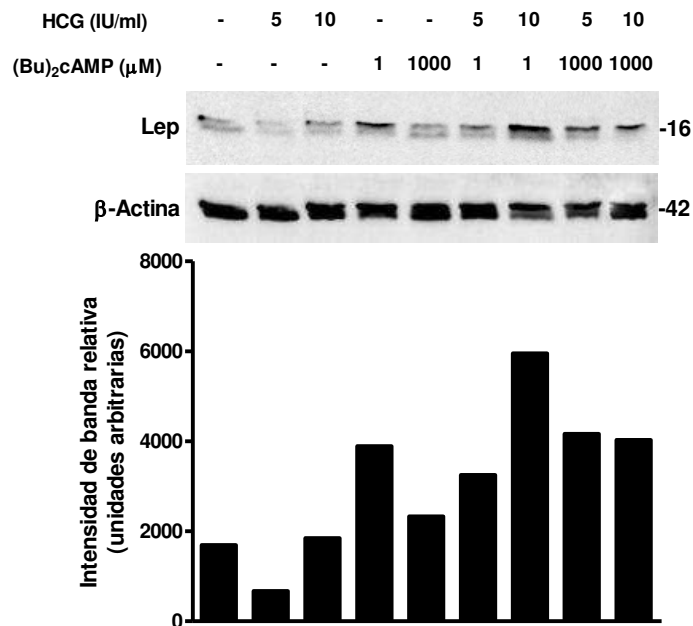


FIGURA 29. El AMPc induce el efecto estimulador de hCG sobre leptina a bajas concentraciones de la hormona. Células BeWo se incubaron células durante 3 días con diferentes dosis de hCG y (Bu)₂cAMP como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito previamente y se sembraron en un SDS-PAGE 12%. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anti-β-actina. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1.

La vía de MAPK está involucrada en la inducción de leptina por hCG en células trofoblásticas

A partir de lo observado previamente, dado que la vía dependiente de PKA pareciera no estar involucrada en la inducción de leptina por hCG, nos planteamos estudiar entonces si esta hormona podría estimular otras vías de señalización. Previamente, se ha reportado la habilidad del receptor LH/hCG para transducir señales a través de la vía de MAPK/ERK en endometrio de primate (475) y en células de la granulosa porcina (476, 477). Asimismo, ha sido demostrado que el receptor de LH/hCG es capaz de activar la vía de PI3K/Akt en ovario de rata (367) y en células de la teca de ovario humano (478). Por lo tanto decidimos examinar si las vías de MAPK o de PI3K pueden cumplir un rol en el incremento de los niveles de leptina por hCG. Células BeWo se preincubaron por 30 min en presencia o ausencia de diferentes inhibidores farmacológicos que actúan en dichas vías de señalización y luego se incubaron por 72 h con hCG 100 IU/ml en continua presencia o ausencia de esos inhibidores. Por Western blot, determinamos que el pretratamiento con el inhibidor de PI3K (wortmanina 0,1 μ M) disminuyó levemente la estimulación de leptina por hCG, aunque sin presentar un efecto significativo (Figura 30). Sin embargo, debido a que se empleó una única concentración del inhibidor y se realizó dicha determinación en este único experimento, no descartamos que la vía de PI3K pudiera estar relacionada con los efectos de hCG en cuestión (ver más adelante). Por otro lado, cuando se trató con el inhibidor de MEK (PD98059 50 μ M), se bloqueó completamente el efecto de hCG 100 IU/ml sobre la expresión de leptina, demostrando que la activación de ERK es necesaria para el incremento por hCG en el nivel de leptina en células BeWo.

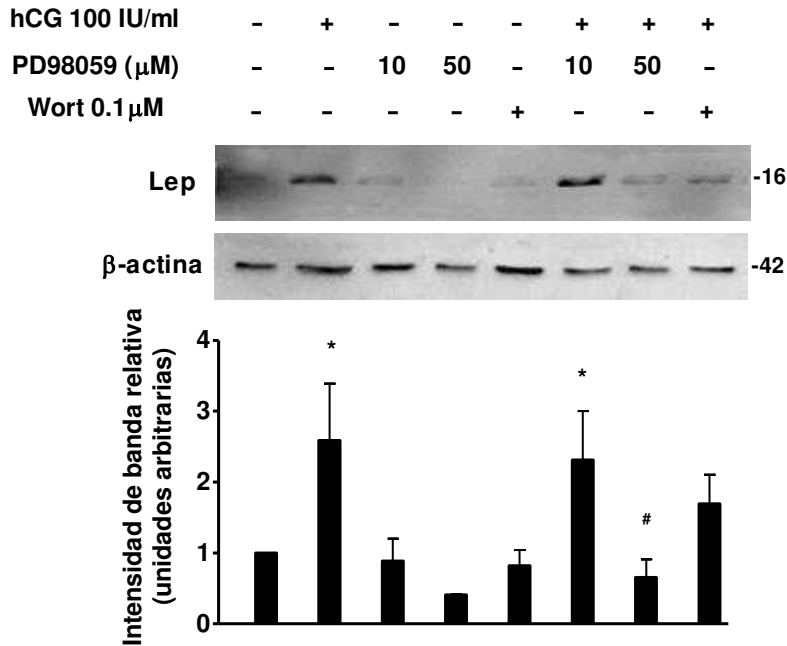


FIGURA 30. Estudio de las vías de transducción de señales de MAPK y PI3K en la expresión de leptina mediada por hCG. Células BeWo (1×10^6) se plaquearon en medio completo DMEM-F12 con 1% SFB y se preincubaron durante 30 min con PD98059 o wortmanina (Wort). Luego se incubaron por 3 días con hCG y PD98059 o wortmanina según se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron con anticuerpo anti- β -actina. Los pesos moleculares se estimaron utilizando marcadores de peso molecular estándar. En los paneles inferiores se muestra la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. El resultado de la figura es representativo de 3 experimentos independientes y los datos se expresan como promedio \pm D.E. * $p < 0.05$ vs control; # $p < 0.05$ vs tratamiento con hCG

De manera de confirmar el rol de la activación de ERK en la regulación positiva de leptina por hCG, realizamos experimentos similares a los descriptos, en explantos placentarios. Se trataron los explantos durante 10 min con PD98059 50 μ M y luego se incubaron por 4 h con hCG 50 o 100 IU/ml, en presencia o ausencia del inhibidor. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Como se muestra en la Figura 31, hCG elevó los niveles de leptina y este efecto fue inhibido con el tratamiento con PD98059.

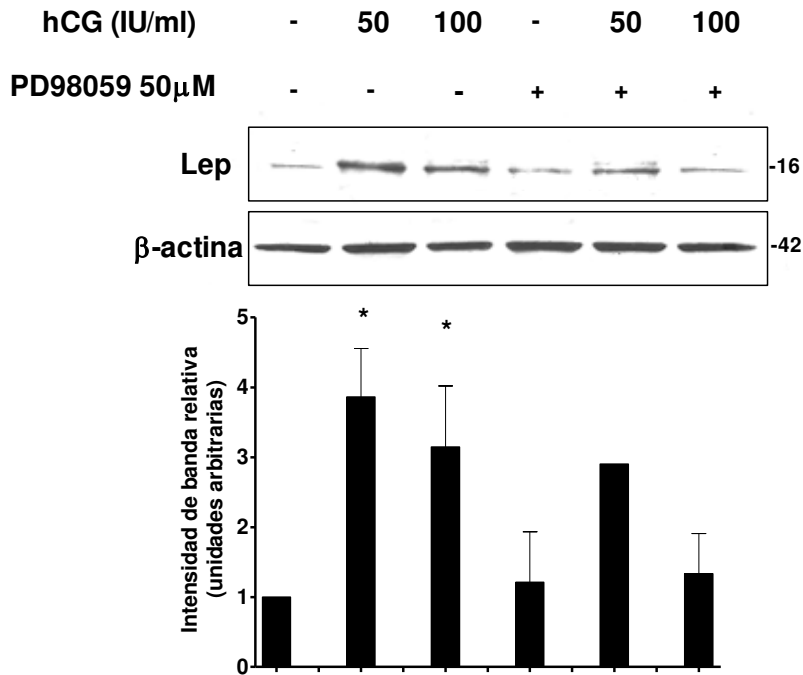


FIGURA 31. La hCG induce la expresión de leptina en placenta a través de la vía MAPK. Explantos de placenta humana fueron procesadas según lo previamente descrito y pretratadas con PD98059 por 10 min, seguido del tratamiento con hCG por 4 h. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron con anticuerpo anti- β -actina. Los pesos moleculares se estimaron utilizando marcadores de peso molecular estándar. En los paneles inferiores se muestra la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. El resultado de la figura es representativo de 3 experimentos independientes y los datos se expresan como promedio \pm D.E. * $p < 0.05$.

Realizamos también, en células JEG-3, un experimento de PCR cuantitativa en tiempo real (Figura 32), con el fin de determinar el efecto de la inhibición de la vía de MAPK a nivel de la expresión del ARNm de leptina. Como se puede observar, la hCG estimuló la expresión de los mensajeros de leptina y el tratamiento con PD98059 inhibió por completo dicha estimulación, hasta incluso a niveles por debajo del control.

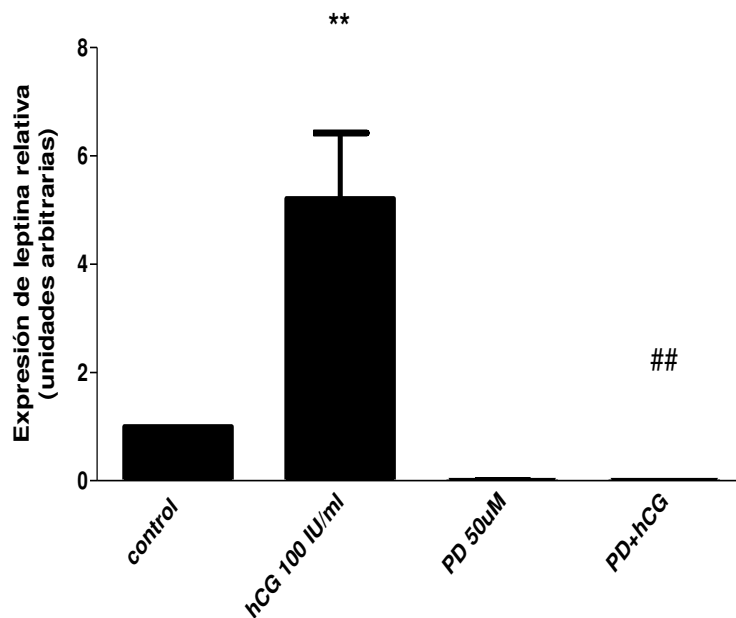


FIGURA 32. La inhibición de la vía de MAPK bloquea el efecto inductor de hCG sobre el ARNm de leptina en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron cultivadas según lo descrito previamente y tratadas por 3 días con hCG y/o PD98059 en las concentraciones que se indican. Se extrajo el ARN total y el ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. La ciclofilina se empleó como control estándar interno. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados se expresan como el promedio \pm D.E de un experimento realizado en duplicado. ** $p < 0.01$ vs control; ## $p < 0.01$ vs tratamiento con hCG.

Para investigar en mayor profundidad el papel de la vía de MAPK/ERK en la señalización de hCG sobre la estimulación de leptina, realizamos experimentos de transfecciones transitorias empleando la construcción pL1951. Células BeWo se preincubaron durante 30 min con 10 o 50 μ M de PD98059 o 0,1 μ M de wortmanina, y se incubaron por 72 h con hCG 100 IU/ml. La hormona incrementó la actividad del promotor de leptina. Este efecto fue totalmente bloqueado con PD98059 50 μ M (Figura 33). Se obtuvo una disminución en la inducción de hCG sobre leptina con wortmanina 0,1 μ M, aunque dicho efecto no resultó significativo. Por otro lado, obtuvimos evidencia adicional de la participación de la vía de MAPK en la señalización de hCG, efectuando experimentos en donde las células BeWo fueron cotransfectadas transitoriamente con la construcción

reportera pL1951 y un plásmido que codifica para una mutante dominante negativa de ERK2 (MAPK-kd). Según se observa en la Figura 34, la cotransfección con MAPK-kd bloqueó la inducción de la actividad del promotor de leptina por hCG, sin modificar la actividad basal.

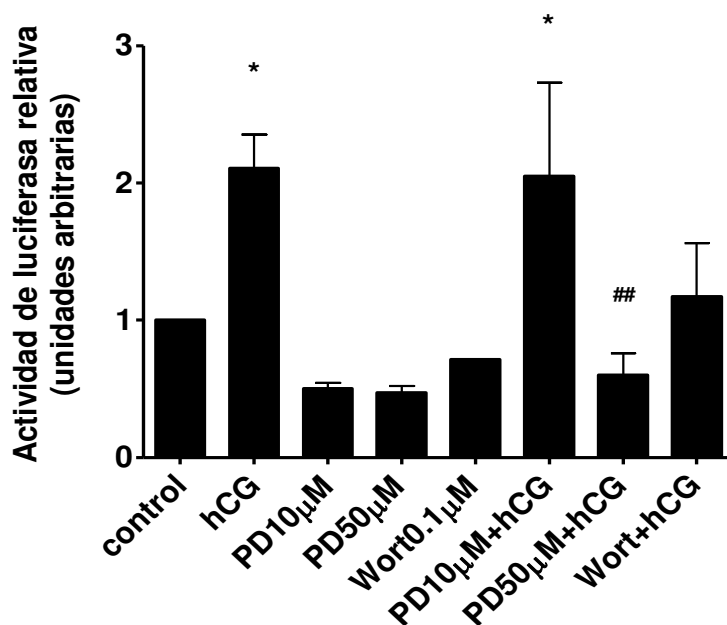


FIGURA 33. Estudio de las vías de transducción de señales de MAPK y PI3K en la transcripción de leptina mediada por hCG. Células BeWo se transfectaron transitoriamente con la construcción plasmídica pL1951y se incubaron en presencia o ausencia de hCG 100 IU/ml más PD98059 (PD) o Wortmanina 0,1 μ M (Wort). La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados son expresados como promedio \pm D.E de dos experimentos independientes realizados en triplicado. * $p < 0.05$ vs. control; ## $p < 0,01$ vs. tratamiento con hCG.

hCG (IU/ml)	-	50	100	-	50	100
MAPK kd (μ g)	-	-	-	10	10	10

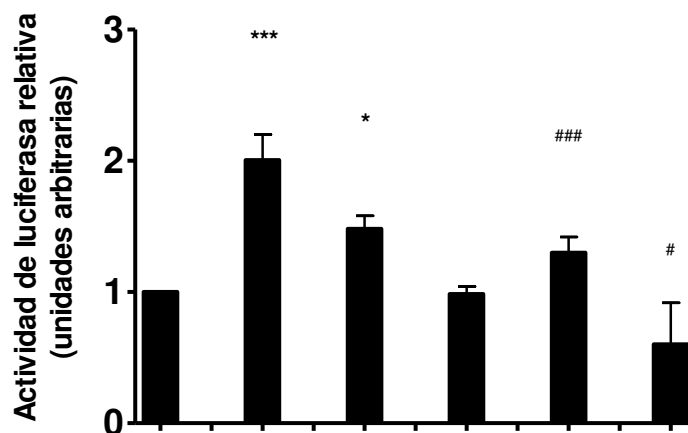


FIGURA 34. La vía de MAPK está involucrada en la estimulación de la transcripción de leptina por hCG. Células BeWo se cotransfectaron transitoriamente con pL1951 y un plásmido expresando MAPK-kd (mutante dominante negativa de MAPK), y se trataron con hCG como se indica. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados son expresados como promedio \pm D.E de dos experimentos independientes realizados en triplicado. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs tratamiento con hCG.

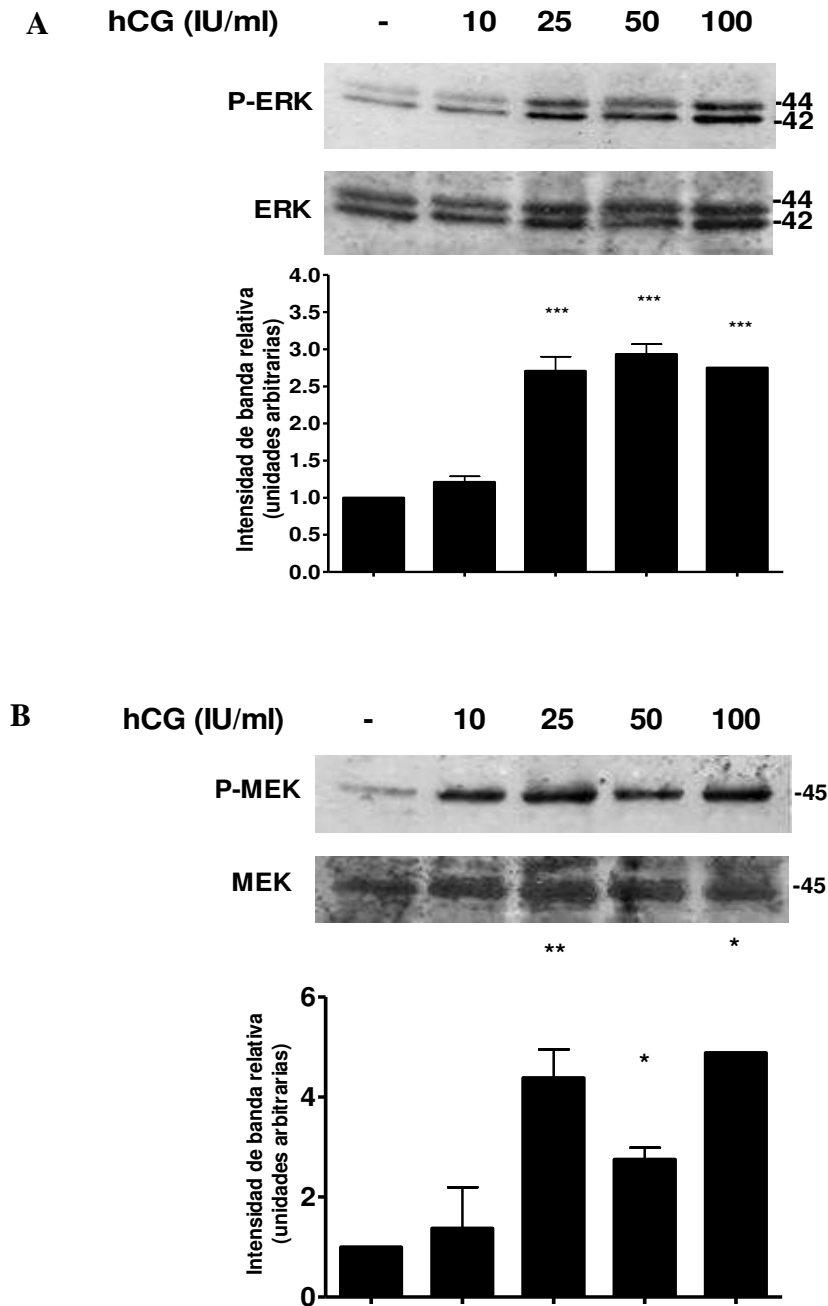
En conjunto, todos los resultados sugieren que la inducción del gen de leptina por hCG en placenta es dependiente de la estimulación de la vía de MAPK. La capacidad de la hCG en inducir el aumento de AMPc ha sido ampliamente documentada. Sin embargo, la señalización del receptor de LH/hCG independiente de la activación de la vía de AMPc/PKA se ha demostrado en varios modelos (479, 480). El receptor de LH/hCG es capaz de mediar la activación de las vías de MAPK (365, 366), de Janus quinasas y de PI3K (367). Se sabe que las quinasas ERK funcionan como integradoras de señales mitogénicas y de otras señales originadas desde distintas clases de receptores de superficie, tales como los receptores de tirosina quinasas y los GPCRs. La unión de distintos estímulos a los GPCRs puede activar a estas quinasas a través de varias vías de señalización (365). Ha sido sugerido que la estimulación de MAPK promovida por LH podría resultar en la desensibilización de la esteroideogénesis estimulada por LH en células de la granulosa

(368). Por ejemplo, se ha reportado que en la línea celular epitelial de endometrio humano (HES) y en células epiteliales de endometrio de mono, la CG no activa la vía de AC-AMPC-PKA, pero puede inducir rápidamente la fosforilación de ERK 1/2 de manera independiente de PKA (365). En el presente trabajo, hemos demostrado que la vía de MAPK cumple un rol esencial en la transducción de señales inducida por la gonadotropina en la regulación positiva de la leptina.

HCG activa la vía de señalización de MAPK/ERK en explantos de placenta

Con el objeto de confirmar en un modelo más fisiológico, que la vía de MAPK es capaz de mediar la acción de hCG sobre la expresión de leptina en placenta, procedimos a examinar la activación por fosforilación de ERK 1/2 y de MEK en explantos de placenta humana tratados con dosis crecientes de hCG. La fosforilación de las quinasas se determinó por Western blot empleando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas. Según se muestra en la Figura 35A, la fosforilación de ERK 1/2 fue significativamente aumentada con el tratamiento con 25, 50 y 100 IU/ml de hCG. La fosforilación de MEK también fue inducida por 25, 50 y 100 IU/ml de hCG (Figura 35B). Más aún, la estimulación de la fosforilación con 100 IU/ml de hCG resultó significativamente bloqueada cuando los explantos se preincubaron por 10 min con 50 μ M de PD98059 (Figura 36).

En suma, los experimentos demuestran que la hCG induce la fosforilación de MEK y ERK 1/2 en explantos de placenta y confirman que dicha vía de señalización podría estar involucrada en la regulación de la expresión de leptina. La activación de esta vía de señalización alternativa por hCG en placenta, estaría teniendo relevancia fisiológica durante el embarazo. En presencia del embrión, la propia placenta se encuentra sujeta a altos niveles de hCG, lo cual resulta crítico para que los trofoblastos se mantengan funcionales durante el proceso de implantación. Por ello, una posibilidad es que la placenta conserve su respuesta funcional a hCG silenciando los caminos canónicos de proteínas Gs y Gi y manteniendo la señalización a través de vías alternativas como la de MAPK, previniendo así su desensibilización y su internalización.



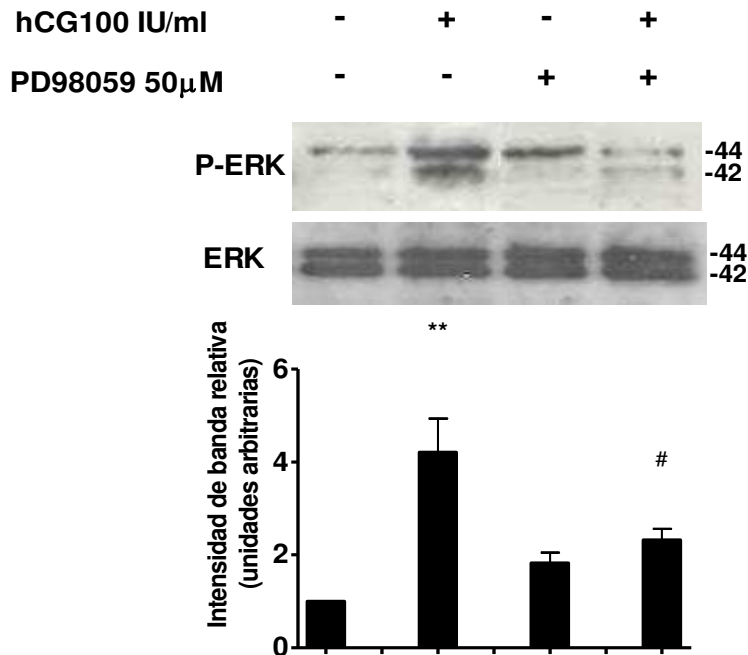


FIGURA 36. La vía de MAPK es activada por hCG en placenta. Explantos de placenta fueron procesados según lo descrito previamente, pretratados con PD98059 por 10 min y luego tratados con hCG por 10 min. Las muestras se sembraron en un gel SDS-PAGE 12%, y la fosforilación de ERK 1/2 se determinó por Western blot como se indica en Materiales y Métodos. Se determinó el nivel total de ERK en los extractos celulares como control de carga. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se expone un resultado representativo de 2 experimentos independientes ** $p < 0.01$ vs. control; # $p < 0.05$ vs. tratamiento con hCG.

Con respecto a la vía de PI3K, con los experimentos realizados, no podemos confirmar que se encuentre participando en el camino de señalización de la regulación de leptina por hCG. Sin embargo, y dado que se conoce la habilidad del receptor de hCG para activar múltiples vías de señalización, decidimos evaluar por Western blot la capacidad de hCG para activar la vía de la PI3K en explantos de placenta. Como puede observarse en la Figura 37, la hCG estimuló la fosforilación de Akt, incluso con una concentración mínima de 10 IU/ml de hCG, y dicha estimulación se mantuvo con todas las concentraciones probadas. La proteína kinasa B/Akt es uno de los blancos principales río abajo de la PI3K y

resulta activada por fosforilación en serina y en treonina. La activación de Akt está relacionada con el crecimiento celular, la inhibición de la apoptosis y la supervivencia de la granulosa (481). Se ha sugerido que la hCG aumenta la invasión trofoblástica y la migración a través de la activación de las vías de señalización de ERK y de Akt (360).

Hemos demostrado que la hCG es capaz de activar la vía de PKB/Akt en explantos de placenta humana. No obstante, dicha activación no participaría de los mecanismos involucrados en la inducción de la expresión de leptina por hCG en placenta.

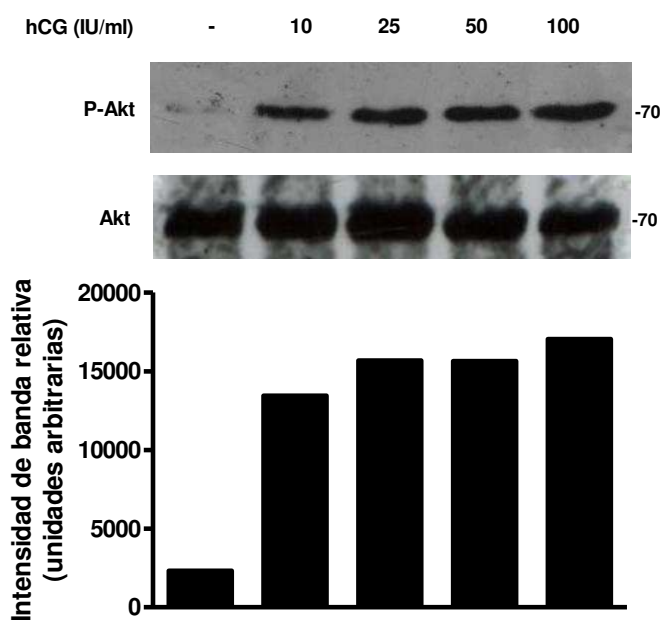


FIGURA 37. HCG induce la fosforilación de Akt en explantos de placenta. Explantos de placenta fueron procesados según lo descrito previamente y se trataron con hCG por 10 min. Las muestras se sembraron en un gel SDS-PAGE 12%, y la fosforilación de Akt se determinó por Western blot como se indica en Materiales y Métodos. Se determinó el nivel total de Akt en los extractos proteicos como control de carga. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas.

En base a los resultados observados en las Figuras 25, 26 y 27, nos propusimos analizar si la inhibición del AMPc en el efecto de hCG sobre la leptina, podría deberse, no sólo a la desensibilización y/o disminución del receptor hCG/LH sino también a una

inhibición de la vía de MAPK generada por la activación de la vía AMPc/PKA. Para ello analizamos la fosforilación de ERK1/2 en condiciones de inhibición de PKA (con el inhibidor específico H89), y luego del tratamiento con hCG. En la Figura 38 se observa que la hCG estimuló la fosforilación de ERK 1/2 hasta 6 veces respecto al control. La inhibición de PKA con H89 causó un aumento en la fosforilación de ERK 1/2, y más aún, el tratamiento con hCG en combinación con H89 estimuló significativamente la fosforilación de ERK 1/2, a niveles incluso mayores a los de hCG solo. Esto, coincidentemente con resultados anteriores, indicaría que la hCG estimularía la expresión de leptina a través de la vía de MAPK, y la activación de la vía de AMPc/PKA estaría interfiriendo con dicho efecto.

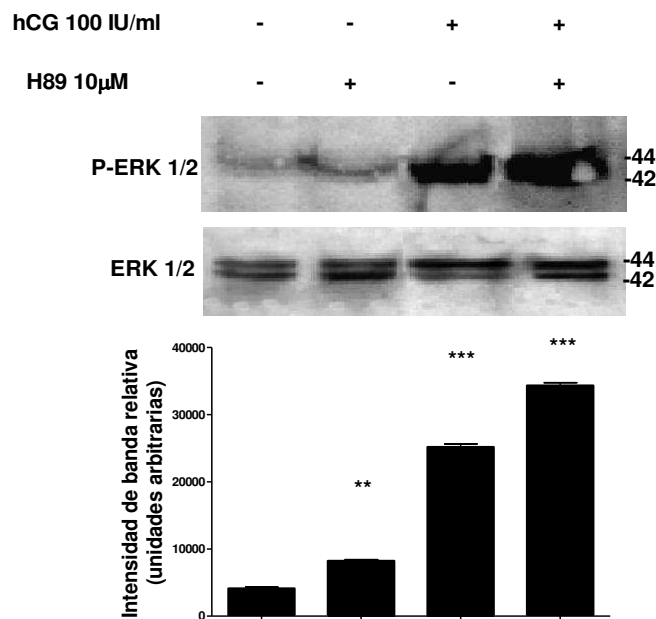
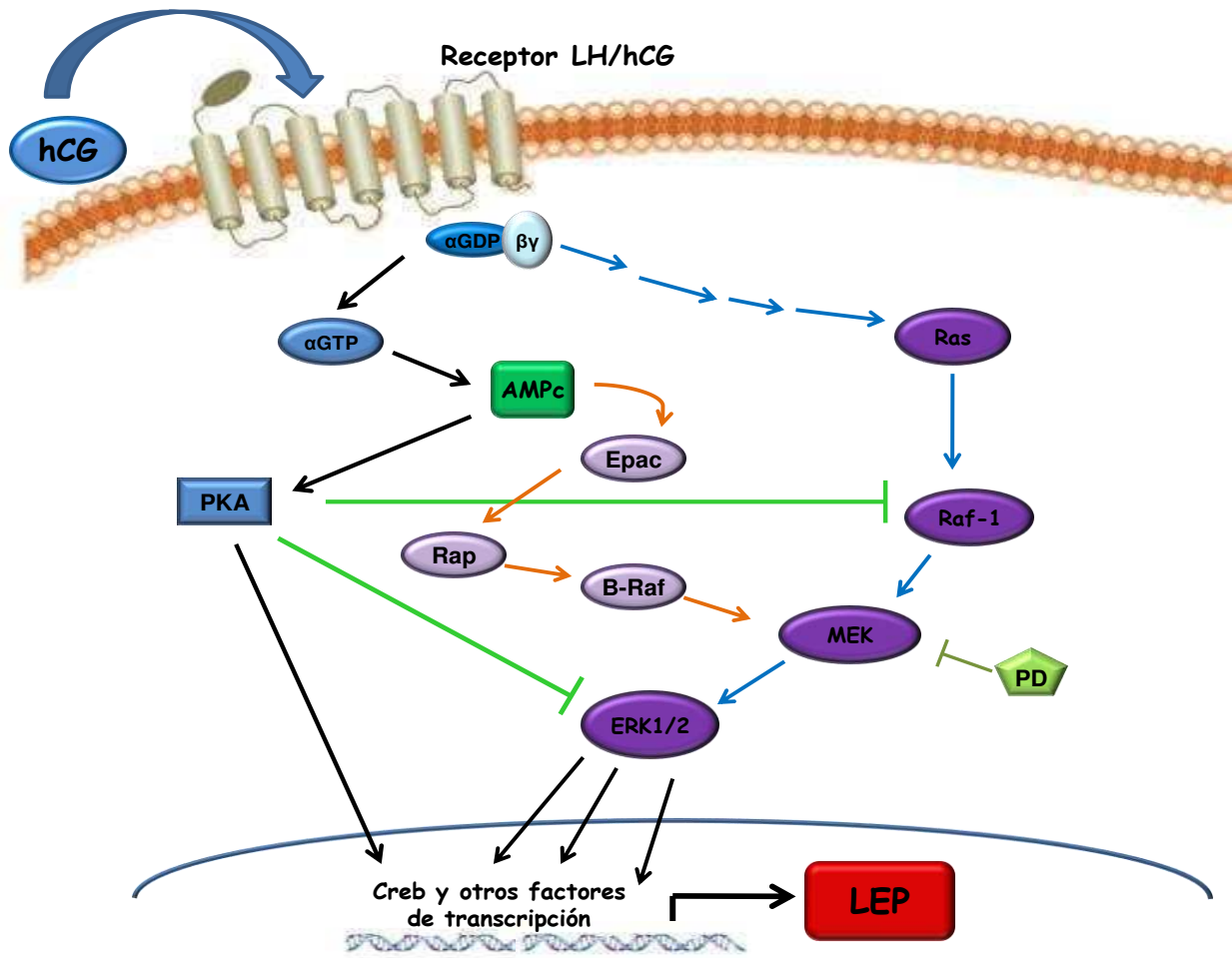


FIGURA 38. La PKA impide la activación de ERK 1/2 por hCG en células trofoblásticas. Células BeWo (1×10^6) se plaquearon en medio completo DMEM-F12 con 1% SFB y se preincubaron durante 10 min con H89 y luego otros 10 min con hCG, según se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo descrito en Materiales y Métodos. Las muestras se sembraron en un gel SDS-PAGE 12%, y la fosforilación de ERK 1/2 se determinó por Western blot como se indica en Materiales y Métodos. Se determinó el nivel total de ERK en los extractos celulares como control de carga. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas. Se expone un resultado representativo de 2 experimentos independientes. **p < 0.01, ***p < 0.001.

A partir de todos los resultados obtenidos en esta parte de la presente sección, hemos construido un modelo esquemático que hipotetiza sobre el mecanismo por el cual la hCG estimula la expresión de leptina (Figuras 39A y 39B). Cuando la hCG actúa sobre su receptor en trofoblastos, conduce a una expresión aumentada de leptina, fundamentalmente a través de la vía de MAPK (dependiente o independiente de AMPc) (Figura 39A). En el momento en el que los niveles intracelulares de AMPc se incrementan (Figura 39B) por causa del agregado de AMPc exógeno, ocurre una inhibición en el efecto estimulador de leptina por hCG. Esto podría deberse a un mecanismo de desensibilización del receptor de hCG (o de disminución de los receptores en membrana) o a una inhibición de la vía de MAPK por la sobreactivación de la PKA. Estos mecanismos llevarían a una reducción en la expresión de leptina.

A



Regulación de la expresión de leptina por AMPc y vías de señalización involucradas

Tal como hemos descrito en la introducción, se sabe que muchas de las funciones atribuidas a los trofoblastos de la placenta humana, incluyendo la producción de varias hormonas del embarazo y el transporte de nutrientes esenciales para el feto, se encuentran bajo la regulación de segundos mensajeros, principalmente del AMPc (371). Ha sido ampliamente documentado el profundo efecto que posee el AMPc en las funciones del trofoblasto humano, según demuestran numerosos estudios in vitro de células trofoblásticas normales y transformadas (376). Dado el rol crítico que posee el AMPc en controlar la expresión de genes específicos de placenta y en mediar la acción de numerosas hormonas placentarias, nos planteamos como siguiente objetivo investigar la regulación de la expresión de leptina por AMPc así como las vías de señalización involucradas. Asimismo, cumplir con este objetivo nos permitirá comprender con mayor claridad los resultados obtenidos en la primera parte de esta sección.

El AMPc induce la expresión de leptina en células trofoblásticas

Al igual que en los experimentos previos, utilizamos como modelo de trabajo las líneas celulares trofoblásticas BeWo y JEG-3. Dado los resultados obtenidos en los cuales el tratamiento con (Bu)₂cAMP causó una pérdida completa del efecto de inducción de la hCG sobre la leptina decidimos investigar la regulación de la expresión de leptina por AMPc. En particular, comenzamos por estudiar el efecto del tratamiento con AMPc sobre la síntesis, transcripción y activación del promotor de leptina. Mediante análisis por Western blot, determinamos que el (Bu)₂cAMP (0,1-100 μM) estimuló la expresión de leptina en células BeWo (Figura 40). Este efecto resultó dosis-dependiente, alcanzando un máximo de 2,9 veces de inducción con 100 μM de (Bu)₂cAMP. A dosis más altas (1 mM-10 mM) la expresión de leptina retornó al nivel del control. Luego examinamos si el AMPc podría tener efecto sobre el nivel de ARNm de leptina. La Figura 41 muestra que el (Bu)₂cAMP incrementó la expresión del ARNm de leptina, medido por qRT-PCR. El efecto máximo se obtuvo con 1 mM de AMPc, con 22 veces de inducción respecto al

control. Finalmente, realizamos ensayos de transfecciones transitorias, con el vector plasmídico reportero pL1951. En las células BeWo transfectadas, el AMPc fue capaz de estimular la actividad del promotor de leptina desde una concentración de 0,1 μ M hasta una de 1 mM del nucleótido (Figura 41). El máximo efecto se obtuvo con 10 μ M de (Bu)₂cAMP, donde se indujo 4,2 veces la actividad de luciferasa por sobre el control sin tratar.

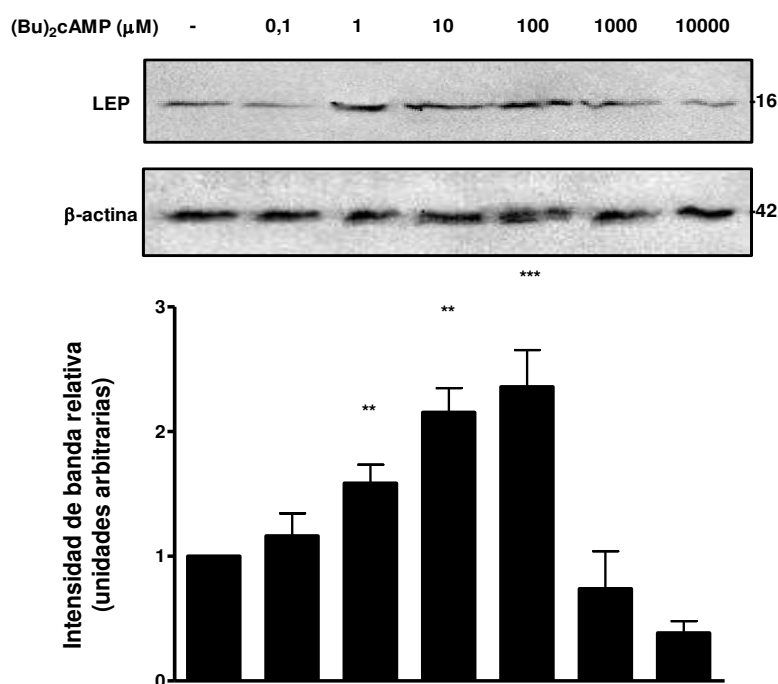


FIGURA 40. El AMPc induce la expresión de leptina en células de placenta. Células BeWo (1×10^6) se plaquearon en medio completo DMEM-F12, suplementado con 1% SFB, y se incubaron por 3 días con diferentes dosis de (Bu)₂cAMP como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en un gel SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por western blot. Los pesos moleculares se estimaron empleando marcadores de peso molecular estándar. Los controles de carga se efectuaron por inmunoblot de la misma membrana con anticuerpo anti- β -actina. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. La masa molecular (kDa) se indica a la derecha de las bandas. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de tres repeticiones independientes. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

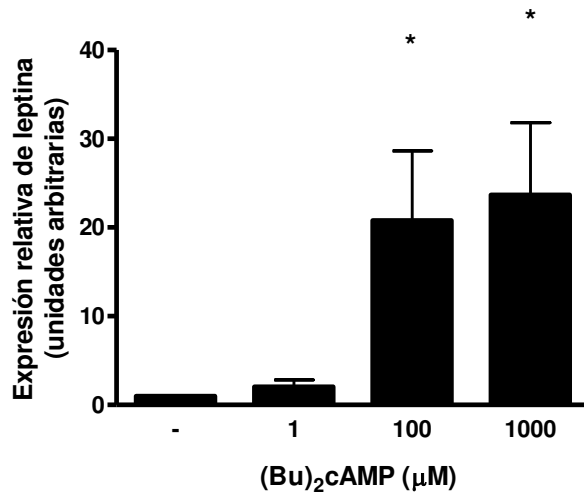


FIGURA 41. El AMPc induce la transcripción de leptina en células trofoblásticas. Células JEG-3 fueron cultivadas según lo descrito previamente para células BeWo y se trataron por 3 días con dosis crecientes de (Bu)₂cAMP. Se extrajo el ARN total y el ARNm de leptina se cuantificó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La ciclofilina se empleó como control estándar interno. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados se expresan como el promedio ± D.E. de dos experimentos independientes realizados en triplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p < 0.05

Así, en conjunto, estos resultados demuestran que el AMPc incrementa la expresión de leptina no sólo a nivel de su síntesis sino también de su transcripción, en células de placenta humana.

Los niveles de ARNm de leptina en tejido adiposo son incrementados por glucocorticoides e insulina (288, 482, 483) y disminuidos por agonistas β-adrenérgicos (178). Por otro lado, un aumento en las concentraciones de AMPc, regula negativamente la secreción de leptina y una disminución, ejerce el efecto contrario (484). Varios elementos regulatorios han sido identificados en el promotor de leptina (por ejemplo, elementos de respuesta a AMPc y glucocorticoides y sitios SP-1 y C/EBP), sugiriendo una regulación directa de la expresión de leptina a través de distintas vías transcripcionales (98, 182, 336, 485).

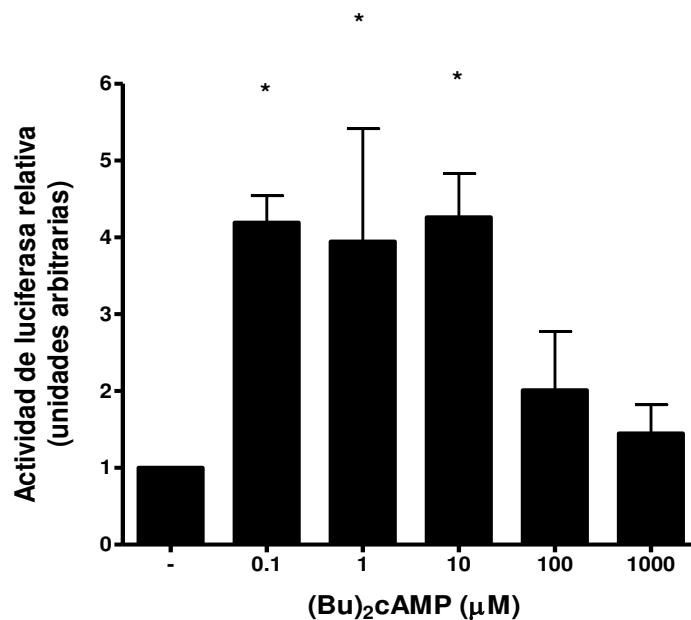


FIGURA 42. El promotor de leptina es activado por AMPc en células placentarias. Células BeWo fueron transitoriamente transfectadas con la construcción plasmídica pL1951 y tratadas con (Bu)₂cAMP como se indica, durante 72 h, en medio DMEM-F12 1% SFB. Se midió la actividad de Luc en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Los resultados se expresan como promedio ± D.E. de dos experimentos independientes realizados en triplicado. El análisis estadístico se realizó por ANOVA seguido del test a posteriori de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p < 0.05

La regulación y la fisiología de la leptina en placenta no son totalmente conocidas y, en particular, muy poco se conoce acerca de la regulación de leptina por AMPc. Nuestros resultados mostraron que bajas dosis de AMPc estimulan la expresión de leptina de manera dosis dependiente; sin embargo a dosis mayores a 1mM la estimulación por AMPc desaparece, observándose una curva de respuesta con forma de U invertida. Al respecto, se ha reportado que la activación de la PKA es capaz de regular su propia expresión. Una activación sostenida del sistema de PKA por forskolina o por análogos del AMPc, causa una disminución en las subunidades catalíticas y un aumento en los niveles de las subunidades regulatorias (486). Esta retroalimentación negativa actúa como un mecanismo regulatorio que ayuda a mantener la homeostasis celular bajo condiciones de prolongada

exposición o de estimulación neurohormonal, y previene de la sobreestimulación. Estas observaciones podrían explicar nuestros resultados.

El efecto estimulador del AMPc sobre la expresión de leptina ha sido también reportado en varias células no adiposas tales como células C6 de glioma, células GH3 de tumor pituitario (377, 378), células de cáncer mamario MCF-7 (349), células gástricas MKN-74 (187), y tejido placentario coriónico (345). No obstante, estos resultados contrastan con lo que ha sido demostrado en tejido adiposo. En cultivos de explantos de adipocitos maduros, la activación de PKA suprimió la secreción y los niveles de ARNm de leptina (180). Sin embargo, esta discrepancia en la regulación de leptina en ambos tejidos productores de leptina concuerda con el hecho de que el gen de leptina humano posea un intensificador específico de placenta y una proteína nuclear de unión involucrados en la expresión de leptina (338, 339). Estas evidencias indican que la regulación de la producción de leptina en trofoblastos de placenta es diferente de la de adipocitos.

Por otro lado, la síntesis y secreción de leptina en trofoblastos normales están reguladas por una variedad de agentes bioquímicos endógenos entre los que se incluyen factores de crecimiento, hormonas y citoquinas (101). Dichos agentes inician una serie de eventos intracelulares de señalización que resultan en la activación de varias vías de señalización (376, 487), incluyendo las del AMPc/PKA y la de MAPK (488-491). La vía de PKA cumple un rol central en la señalización biológica de varias hormonas en la placenta, tales como la epinefrina, los prostanoides y la hCG (376). La insulina y los glucocorticoides son hormonas candidatas a regular la expresión y secreción de leptina en placenta, dado que se encuentran aumentadas en el suero materno al final de la gestación y sus receptores son expresados en placenta (311, 346). De hecho, la insulina y la dexametasona son importantes moduladores de la expresión del gen de leptina; y su secreción es finamente regulada por insulina en adipocitos aislados de ratas (492). El efecto de la insulina sobre la síntesis y secreción de leptina parece ser regulada al menos en dos pasos posttranscripcionales: 1) movilizándolo pools preexistentes de leptina, y 2) estimulando la síntesis de leptina. Estos estudios implican a las vías de PI3K, MAPK y mTOR como mediadoras de la síntesis y secreción de leptina (493). Pese a que existe literatura disponible en relación a la regulación del gen de leptina en tejido adiposo, la información referente a la regulación de la leptina placentaria surge por comparación. Los efectos de insulina implican el reclutamiento de

C/EBP a través de la vía dependiente de AMPc (382). La unión de la insulina a su receptor también activa la vía de MAPK (380, 381). Así podría ser que la estimulación de leptina en placenta por AMPc sea desencadenada por distintas hormonas, entre ellas la insulina, capaces de activar las vías de señalización dependientes del nucleótido.

La expresión de leptina es estimulada por AMPc en explantos de placenta

Con el fin de estudiar los efectos del AMPc en un sistema más fisiológico, analizamos explantos de placenta humana a término, de embarazadas sanas. Los explantos fueron incubados durante 4 h en medio tratado o no, con concentraciones crecientes de (Bu)₂cAMP (0,1-1000 μM). En la Figura 43 se observa que el AMPc estimuló la expresión de leptina en explantos de placenta, medida por Western blot. Este efecto resultó dosis dependiente, alcanzando un máximo de 2,5 veces de inducción con (Bu)₂cAMP 10 μM.

De manera de caracterizar en mayor profundidad el efecto de leptina sobre el AMPc en células trofoblásticas, realizamos experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real en explantos de placenta estimulados con (Bu)₂cAMP como se describió previamente. Como muestra la Figura 44, el AMPc causó un aumento en la expresión del ARNm de leptina, y el máximo efecto se obtuvo a los 100 μM de (Bu)₂cAMP, con 56 veces de inducción. Más aún, incluso con 1 mM de (Bu)₂cAMP, se observó una estimulación de leptina de 11 veces respecto al control. Estos resultados refuerzan la idea de que el AMPc posee un importante rol en la regulación de la expresión de leptina en placenta humana.

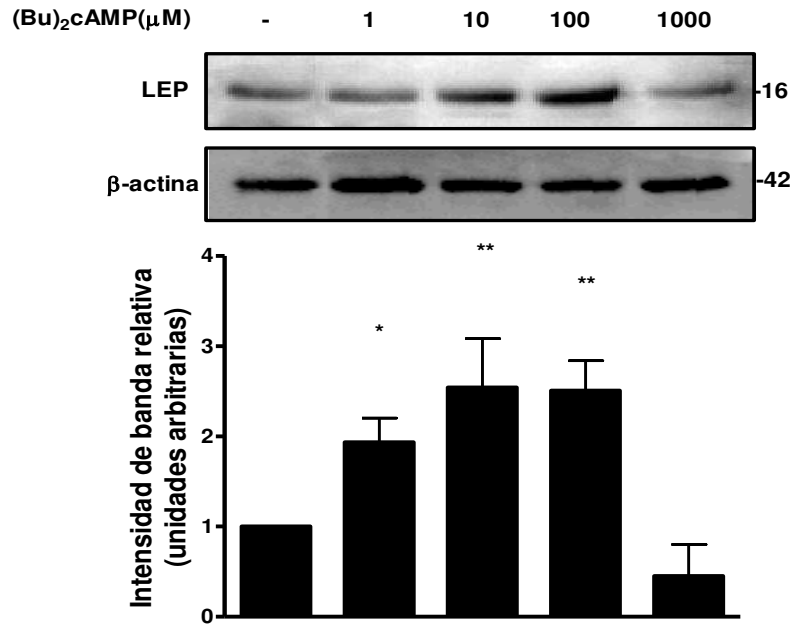


FIGURA 43. El AMPc induce la expresión de leptina en explantos de placenta humana. Explantos de placenta humana a término se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos y se trataron con dosis crecientes de (Bu)₂cAMP durante 4 h. Se prepararon los extractos de placenta y las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de las mismas membranas con anticuerpo anti-β-actina. Los pesos moleculares se estimaron empleando marcadores de peso molecular estándar. La densitometría de las bandas se muestra en el panel inferior. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se observa un resultado representativo de tres repeticiones independientes. *p < 0.05; **p < 0.01.

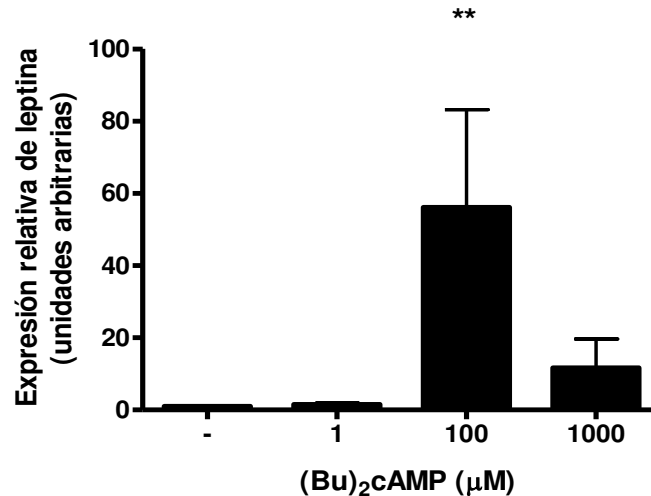


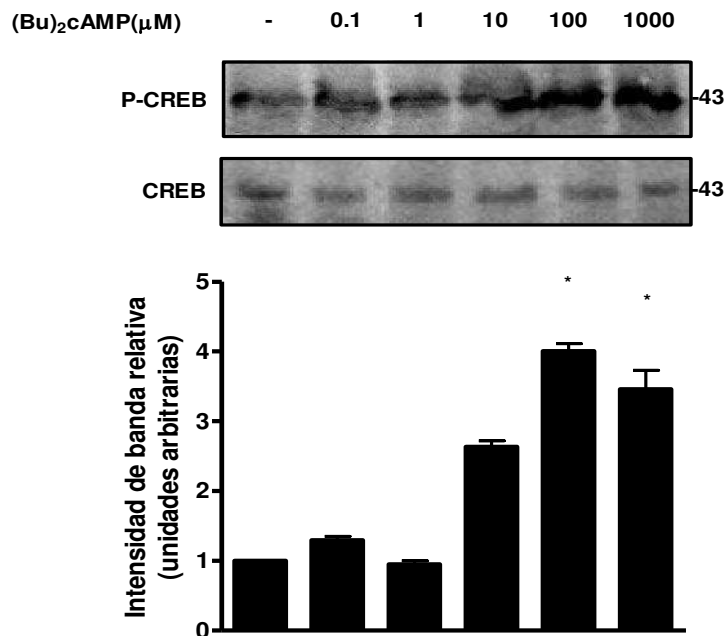
FIGURA 44 El ARNm de leptina es inducido por AMPc en explantos de placenta. Se obtuvieron explantos de placenta humana según lo indicado en Materiales y Métodos y se trataron con (Bu)₂cAMP como se indica. El ARN total se extrajo como se describió previamente y el ARNm de leptina se cuantificó por qRT-PCR. La ciclofilina se utilizó como control de expresión interno. Los resultados se expresan relativos al control sin agregado de droga al que se consideró 1. Se muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes realizados en triplicado. **p< 0.01.

La vía de señalización de PKA está involucrada en el efecto de AMPc sobre la expresión de leptina

Dado que el AMPc mostró un efecto inductor sobre la expresión de leptina en placenta, nuestro siguiente objetivo fue investigar si este segundo mensajero ejerce su acción a través de la activación de la vía de señalización de PKA. Para ello, primero determinamos si el AMPc es capaz de activar la señalización de PKA en placenta humana. A tal fin analizamos la fosforilación de CREB en células BeWo (Figura 45A) y en explantos de placenta (Figura 45B) tratadas con diferentes dosis de (Bu)₂cAMP. Como puede observarse, la fosforilación de CREB fue inducida significativamente por el tratamiento con (Bu)₂cAMP y este efecto resultó dosis dependiente, alcanzándose la máxima estimulación con 10, 100 y 1000 µM de AMPc. Para confirmar la participación de esta vía en el efecto del AMPc, realizamos experimentos de cotransfección con el plásmido

pL1951 y cantidades crecientes (I a IV) de plásmidos de expresión de la subunidad catalítica de PKA o del factor de transcripción CREB. Según se muestra en la Figura 46, la sobreexpresión de las proteínas PKA o CREB causó una estimulación significativa en la actividad del promotor de leptina. PKA o CREB generaron una inducción máxima de 42,5 y 58 veces, respectivamente. Los efectos fueron dosis dependiente. En una estrategia opuesta, realizamos una cotransfección con un plásmido de expresión de una mutante dominante negativa de PKA (PKI). Esta proteína es una mutante de la subunidad regulatoria de la PKA que es capaz de unir AMPc pero no de dissociarse de la subunidad catalítica. Como se observa en la Figura 47, la expresión de PKI inhibió significativamente la actividad del promotor de leptina con 9,8 veces de reducción en la misma. En conjunto, estos resultados demuestran que el AMPc induce la fosforilación de CREB en placenta humana y que la vía de señalización de PKA estaría involucrada en la regulación de la expresión de leptina por AMPc.

A



B

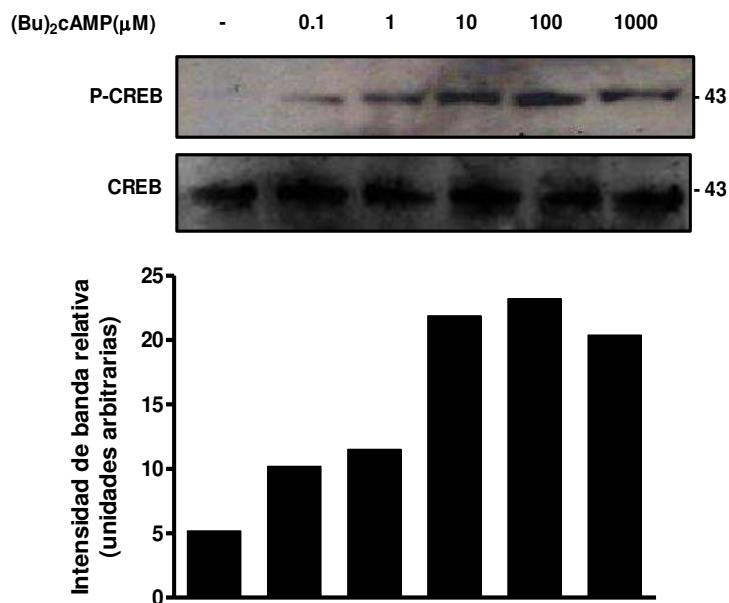


FIGURA 45. El AMPc es capaz de activar la vía PKA en placenta. **A**, Células BeWo (1×10^6) se cultivaron en medio DMEM-F12 completo suplementado con 1% SFB, y se incubaron por 15 min con (Bu)₂cAMP como se indica. **B**, Explantos de placenta se procesaron según lo previamente descrito y se trataron por 15 min con (Bu)₂cAMP. A y B, Los extractos se prepararon como se indica en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes SDS-PAGE. La fosforilación de CREB se determinó mediante análisis de Western blot. Se determinó el nivel total de CREB en los extractos celulares como control de carga. Los pesos moleculares se estimaron utilizando marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la densitometría de bandas.

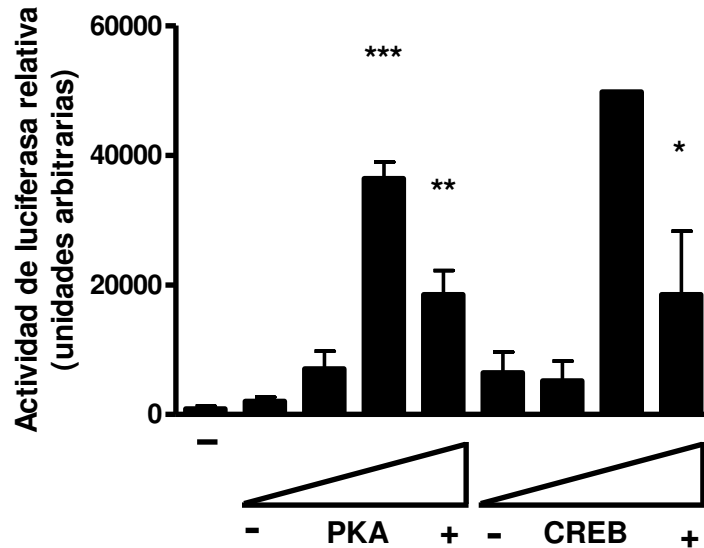


FIGURA 46. La vía de PKA participa en la activación del promotor de leptina. Células BeWo se cotransfectaron transitoriamente con el plásmido pL1951 y concentraciones crecientes de plásmidos expresando la subunidad catalítica de la PKA (2,3 $\mu\text{g/ml}$) o de CREB (1 $\mu\text{g/ml}$). Las células se incubaron durante 72 h en DMEM-F12 con 1% SFB. Se midió la actividad de luciferasa en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados están expresados como promedio \pm D.E, de tres experimentos independientes realizados en duplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

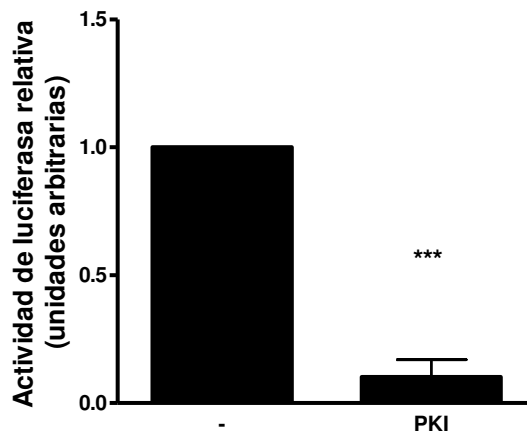


FIGURA 47. La inhibición de PKA impide la activación del promotor de leptina. Células BeWo se cotransfectaron transitoriamente con el plásmido pL1951 y con una mutante dominante negativa de la subunidad reguladora de la PKA (PKI) (1 $\mu\text{g/ml}$) como se indica. Las células se incubaron durante 72 h en DMEM-F12 con 1% SFB. Se midió la actividad de luciferasa en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin cotransfectar con PKI al que se consideró 1. Los resultados están expresados como promedio \pm D.E, de tres experimentos independientes realizados en duplicado. *** $p < 0.001$.

En esta parte del trabajo nuestro objetivo fue analizar si el efecto de inducción del AMPc sobre la expresión de leptina era resultado de la activación de la PKA o podía deberse a eventos independientes de la PKA inducidos por dicho nucleótido. La última posibilidad no puede ser excluida debido a que existen varios experimentos que han provisto de evidencia acerca de los procesos celulares que afecta el AMPc de manera independiente de la PKA (373-375). Entre los sustratos intracelulares de PKA se encuentra CREB (383, 384). CREB es importante para la expresión de muchos genes que responden al AMPc en diferentes tipos celulares y en respuesta a distintas señales (385). En nuestro caso, confirmamos que el AMPc es capaz de inducir la fosforilación de CREB no sólo en células de coriocarcinoma sino también en un modelo más fisiológico como lo son los explantos placentarios. El aumento en la actividad del promotor de leptina con la sobreexpresión de PKA y CREB permitió confirmar la participación de estas proteínas en la regulación positiva del nucleótido sobre la hormona.

La inhibición de la vía dependiente de PKA previene la inducción de leptina por AMPc

Para profundizar en el rol de la vía dependiente de PKA en la inducción de la expresión de leptina en células placentarias, diseñamos otro abordaje experimental utilizando inhibidores farmacológicos de la vía. Células BeWo se trataron con 1 μ M de (Bu)₂cAMP, en presencia o ausencia del inhibidor específico de PKA, H89, 10 μ M, según lo descrito previamente. Se determinó la expresión de leptina por Western blot (Figura 48). Como se esperaba, 1 μ M de (Bu)₂cAMP produjo una inducción en la expresión de leptina de 7 veces respecto al control. Este efecto fue significativamente inhibido con el pretratamiento con H89 10 μ M. Más aún, el H89 causó también una inhibición en el nivel de leptina basal. Para verificar el papel de la activación de PKA en la estimulación de la expresión de leptina por AMPc, se realizaron experimentos similares en células de explantos placentarios. En la Figura 49 se observa que al igual que en células BeWo, el AMPc aumentó la expresión de leptina en explantos de placenta hasta 1,8 veces en comparación con el control, y dicho efecto fue inhibido con el pretratamiento con H89. En base a estos resultados, decidimos investigar si el H89 era capaz de ejercer el mismo efecto inhibitorio a nivel transcripcional. Células BeWo se transfectaron transitoriamente con la

construcción reportera de Luc pL1951 y se trataron con (Bu)₂cAMP y/o H89 10 μM. De manera similar a lo observado previamente, el AMPc estimuló significativamente la actividad del promotor de leptina (Figura 50). El cotratamiento con el nucleótido y el inhibidor de PKA suprimió la inducción de la expresión de leptina por AMPc, con una reducción de 12 y 4 veces con 1μM y 1mM de (Bu)₂cAMP, respectivamente. Más aún, la Figura 51 muestra que cuando las células fueron tratadas con un inhibidor farmacológico de la adenilato ciclasa, SQ22,536 100μM, ocurrió una disminución significativa de 2,3 veces en el efecto de AMPc sobre la expresión de leptina. Estos resultados refuerzan la idea de que la vía de señalización de PKA está involucrada en el efecto de AMPc sobre la expresión de leptina.

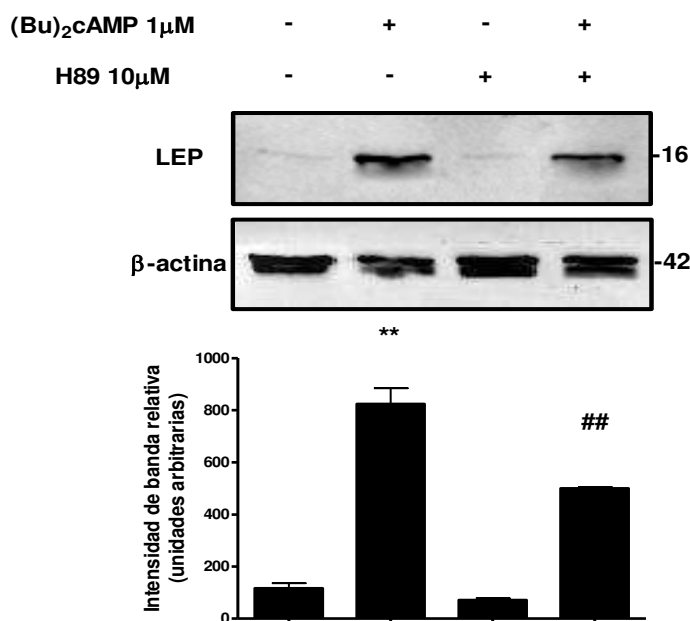


FIGURA 48. La inhibición de la vía de PKA bloquea la inducción de leptina por AMPc en células trofoblásticas. Células BeWo (1×10^6) se cultivaron en medio DMEM-F12 completo suplementado con 1% SFB y se incubaron durante 3 días con (Bu)₂cAMP 1μM y H89 10μM como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de la misma membrana con anticuerpo anti-β-actina. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan como promedio \pm D.E de tres experimentos independientes. **p< 0.01 vs. control; ##p<0.01 vs. tratamiento con (Bu)₂cAMP.

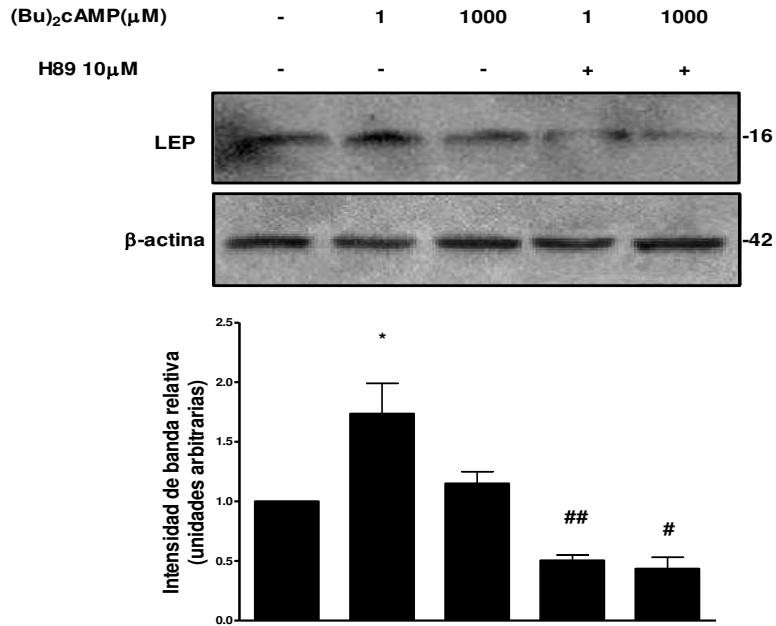


FIGURA 49. La inhibición de PKA suprime la estimulación de leptina por AMPc en explantos de placenta. Explantos de placenta humana a término fueron procesados según lo previamente descrito y tratados con 1-1000 μM de (Bu)₂cAMP y H89 10 μM por 4 h. Los extractos de placenta se prepararon según lo indicado en Materiales y Métodos. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE y la expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se realizaron por inmunoblot de la misma membrana con anticuerpo anti-β-actina. Los pesos moleculares se estimaron con marcadores de peso molecular estándar. Se muestra en el panel inferior la densitometría de las bandas. Los resultados se expresan como promedio ± D.E de tres experimentos independientes.

*p< 0.05 vs. control; #p<0.05, ##p<0.01 vs. tratamiento con (Bu)₂cAMP.

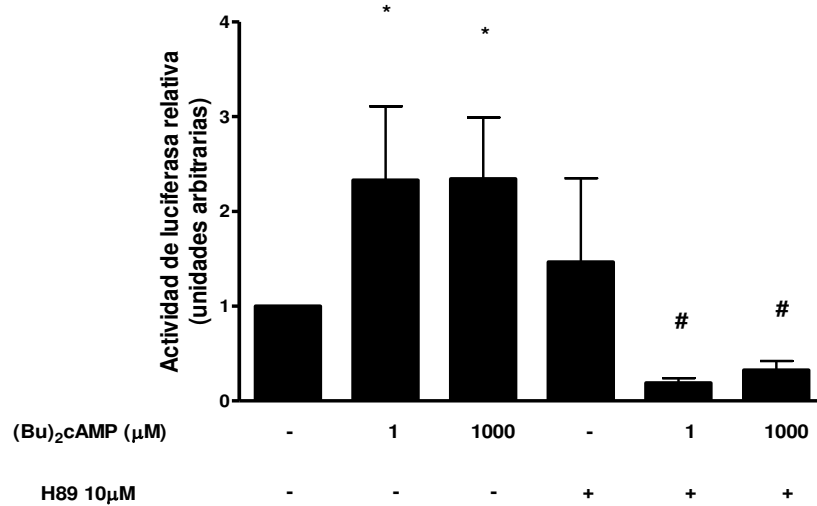


FIGURA 50. La inhibición de la vía de PKA suprime la actividad del promotor de leptina. Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con la construcción plasmídica pL1951 y tratadas con (Bu)₂cAMP y H89, como se indica. Se incubaron las células por 72 h en medio DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin drogas al que se consideró 1. Los resultados se expresan como promedio ± D.E de tres experimentos independientes realizados en duplicado. *p< 0.05 vs. control; #p<0.05 vs. tratamiento con (Bu)₂cAMP.

Con el empleo de un inhibidor selectivo de PKA, H89 (494), confirmamos la participación de la vía dependiente de PKA en el efecto del AMPc sobre leptina en placenta. La inhibición de la PKA suprimió la inducción de leptina por AMPc, tanto en células BeWo como en explantos de placenta a término. Sumado a ello, la vía de PKA también actuó a nivel transcripcional dado que el H89 fue capaz de suprimir la actividad del promotor de leptina inducida por AMPc. Por otro lado, la inhibición de la adenilato ciclasa causó una reducción en la actividad del promotor de leptina, demostrando que una disminución en los niveles endógenos de AMPc también afecta la expresión basal de la proteína. En resumen, los resultados presentados demuestran que el AMPc estimula la expresión de leptina a través de la activación de la vía de PKA.

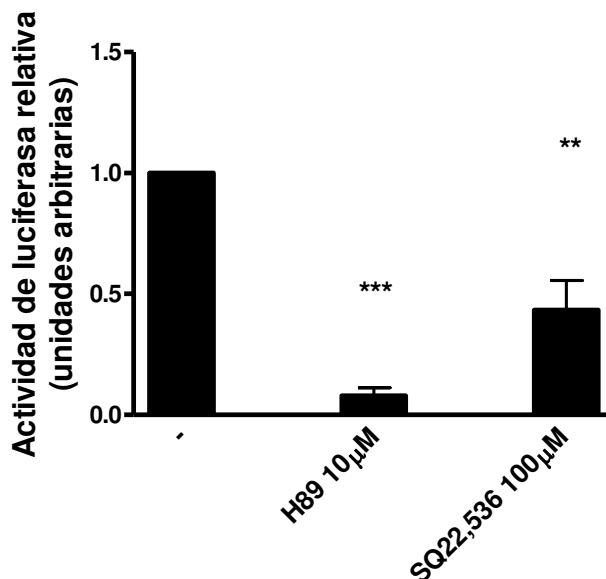


FIGURA 51. La inhibición de la vía de PKA suprime la activación del promotor de leptina por AMPc. Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con la construcción plasmídica pL1951 y tratadas con H89 y SQ22,536, como se indica. Se incubaron las células por 72 h en medio DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin drogas al que se consideró 1. Los resultados se expresan como promedio \pm D.E de tres experimentos independientes realizados en duplicado. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La vía de MAPK está involucrada en la estimulación de leptina por AMPc en células de placenta

Ha sido reportado que el AMPc es capaz de estimular (495-497) o de inhibir (498, 499) la vía de MAPK en una gran variedad de tipos celulares. En base a los estudios previos, nos planteamos como siguiente objetivo investigar si la vía de MAPK se encuentra involucrada en la estimulación de la leptina por AMPc en placenta. A tal fin, se evaluó el efecto de un inhibidor farmacológico de MEK, PD98059, sobre la expresión de leptina. Se incubaron para ello células BeWo con 1, 100 o 1000 μ M de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$, en presencia o no de PD98059 50 μ M. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Según se observa en la Figura 52, el inhibidor de MEK bloqueó la inducción de leptina con 1 y 100

μM de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ en 1,6 y 2,4 veces respectivamente. El tratamiento con PD98059 $50 \mu\text{M}$ también produjo una inhibición en el nivel basal de leptina.

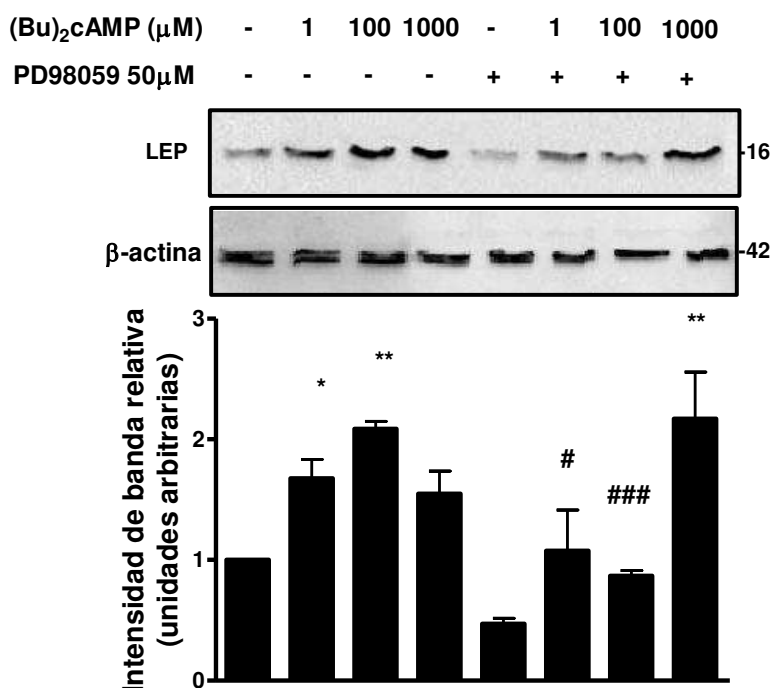


FIGURA 52. El AMPc involucra la activación de la vía de MAPK en la inducción de leptina. Células BeWo fueron incubadas por 3 días con $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ y PD98059 como se indica. Los extractos celulares se prepararon según lo previamente descrito y se sembraron en SDS-PAGE 12%. La expresión de leptina se determinó por Western blot. Los controles de carga se efectuaron por inmunoblot de las mismas membranas con anticuerpo anti- β -actina. Los pesos moleculares se determinaron con marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas, relativa a la de las bandas de β -actina. Los resultados son representativos de un experimento realizado en triplicado.* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.vs. control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$ vs. tratamiento con $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$.

A partir de este resultado, decidimos evaluar la activación de ERK por AMPc en células de placenta. Se trataron células BeWo durante 15 min con 0,1-1000 μM de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ y la fosforilación de ERK 1/2 se determinó por Western blot. Como muestra la Figura 53A, el AMPc indujo la fosforilación de ERK 1/2, alcanzando un máximo de estimulación de 2,3 veces con $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ 10 μM . Se realizó el mismo experimento se

realizó en explantos de placenta humana a término, para confirmar en un modelo más fisiológico, lo observado previamente en la línea celular. Examinamos así, la fosforilación de ERK 1/2 en explantos de placenta tratados con diferentes dosis de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ (Figura 53B). La fosforilación de ERK 1/2 fue significativamente incrementada con el tratamiento con AMPc, y el máximo efecto se obtuvo con $100\ \mu\text{M}$ de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ (2,2 veces de inducción). Para estudiar en mayor profundidad la participación de la MAPK en el efecto de AMPc sobre la expresión de leptina, realizamos experimentos de transfección transitoria empleando la construcción reportera pL1951. Las células transfectadas se trataron con $100\ \mu\text{M}$ o 1mM de $(\text{Bu})_2\text{cAMP}$ y/o $10\ \mu\text{M}$ de PD98059. En la Figura 54, se muestra que el AMPc indujo la actividad del promotor de leptina y el tratamiento con PD98059 bloqueó dicha inducción.

Por otro lado, cuando se realizaron experimentos de cotransfección con un vector de expresión que codifica la subunidad catalítica de PKA, observamos un aumento significativo de la actividad del promotor de leptina alcanzando las 5 veces de inducción respecto al control. El tratamiento con PD98059 $10\ \mu\text{M}$ inhibió la estimulación por PKA. En resumen, todos estos datos sugieren que la inducción por AMPc del gen de leptina es mediada no sólo por la activación de la vía de señalización de PKA sino también por la vía de MAPK/ERK, y probablemente un entrecruzamiento entre estas vías es responsable de los efectos observados.

La vía de señalización de la MAPK es esencial para la reproducción en general. Ha sido relacionada con la maduración del ovocito y en el control de la invasión y penetración trofoblástica (397). Más aún, está bien establecido que la vía de ERK se encuentra involucrada en el desarrollo de la placenta (500). Hemos demostrado previamente que la leptina previene de la apoptosis en células trofoblásticas a través de la vía de MAPK. Estas evidencias nos condujeron a investigar si la vía de transducción de señales de la MAPK se encuentra involucrada en la regulación positiva de la leptina por AMPc en células de placenta. Con el empleo de un inhibidor farmacológico de MEK (PD98059) logramos demostrar, por Western blot y transfecciones transitorias, que la vía de MAPK participa en la regulación de la expresión de leptina por AMPc. Además, el PD98059 bloqueó parcialmente la inducción de leptina causada por la sobreexpresión de la subunidad

catalítica de PKA. En este contexto, ha sido reportado que la cascada de MAPK puede modular la actividad de PKA por varios mecanismos (386).

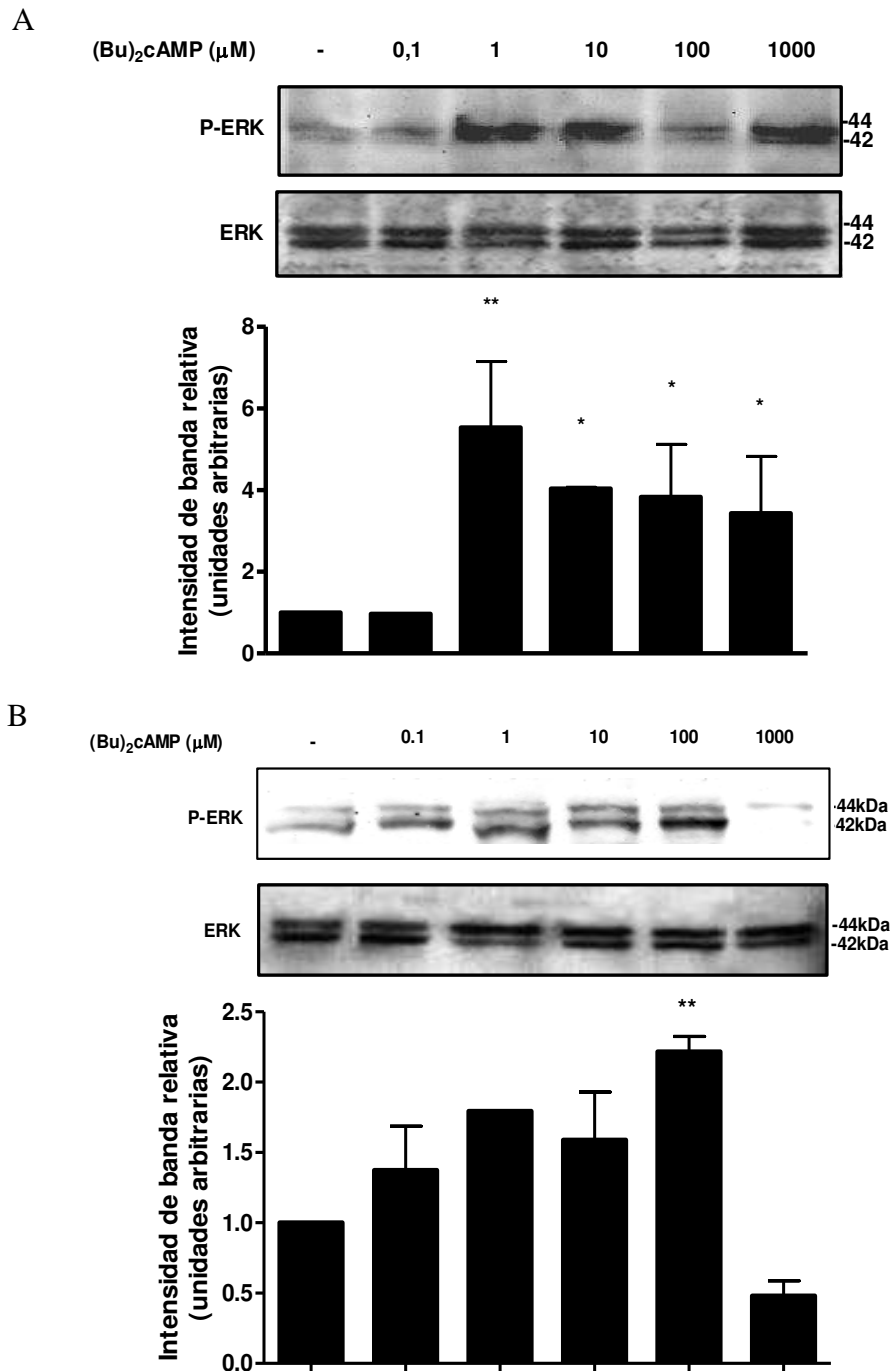


FIGURA 53. La vía de MAPK es activada por el AMPc en placenta. A, Células BeWo (1×10^6) se incubaron en medio completo DMEM-F12 suplementado con 1% SFB y se trataron con diferentes dosis de (Bu)₂cAMP (μM) durante 15 min. B, Explantos de placenta

se procesaron según lo descrito en Materiales y Métodos y se incubaron con (Bu)₂cAMP como se indica, durante 15 min. Los extractos se sembraron en un gel 12 % SDS-PAGE y la fosforilación de ERK 1/2 se determinó por Western blot. Como control de carga se determinó el total de proteína ERK 1/2. Los pesos moleculares se determinaron con marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la cuantificación de las bandas. Los resultados son representativos de un experimento realizado en triplicado. *p< 0.05; **p< 0.01.

(Bu) ₂ cAMP (μM)	-	-	100	1000	-	-	100	1000
PKA 1μg/ml	-	+	-	-	-	+	-	-
PD98059 10μM	-	-	-	-	+	+	+	+

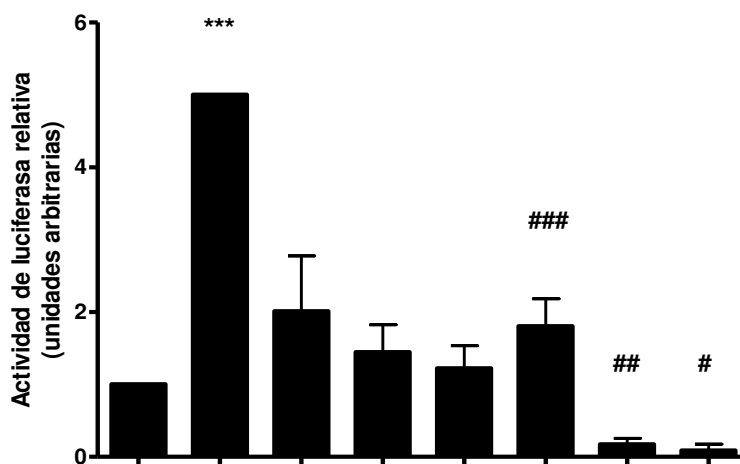


FIGURA 54. El promotor de leptina es activado por AMPc a través de la vía de MAPK. Células BeWo fueron transfectadas transitoriamente con la construcción plasmídica pL1951. Según se indica las células se cotransfectaron con un plásmido de expresión para la subunidad catalítica de PKA, y se trataron con (Bu)₂cAMP y/o PD98059. Las células se incubaron durante 72 h en DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β-galactosidasa. Los resultados se expresan relativos al control sin ningún agregado al que se consideró 1. Los resultados se expresan como promedio ± D.E. ***p< 0.01 vs. control; #p< 0.05; ##p< 0.01; ###p< 0.001 vs. tratamiento con (Bu)₂cAMP.

El efecto del AMPc sobre la expresión de leptina en células de placenta involucra un entrecruzamiento entre las vías de señalización de PKA y MAPK

La vía de AMPc/PKA y la cascada de MAPK modulan procesos en común en la célula y se han descrito múltiples niveles de “crosstalk” entre dichas vías de señalización. (386-389). En algunos tipos celulares y bajo ciertas circunstancias la activación de PKA resulta en la activación de la vía de ERK; mientras que en otros tipos celulares y bajo otras condiciones de cultivo, PKA bloquea la señalización de ERK (390). Pese a que el entrecruzamiento entre PKA-ERK 1/2 ha sido ampliamente estudiado, los mecanismos precisos involucrados en este proceso aún no están claros. En esta parte del trabajo, estudiamos el posible entrecruzamiento entre las vías en cuestión en células trofoblásticas, a fin de establecer los mecanismos moleculares subyacentes al efecto de AMPc en la estimulación de la leptina.

Tal como discutimos previamente, las vías de PKA y MAPK no operan independientemente una de otra sino que múltiples eventos de entrecruzamiento ocurren entre ambas vías. Demostramos que el tratamiento con AMPc activa la fosforilación de ERK en células de placenta (Figura 53) y que PD inhibe la activación ejercida por PKA sobre el promotor de leptina (Figura 54), por lo tanto decidimos continuar investigando la presencia de dicho “cross talk” entre estas dos vías de señalización y su relación con el efecto del AMPc sobre la expresión de leptina en placenta. Para establecer si la inhibición de la vía de MAPK podría afectar la activación de la señalización del AMPc en placenta humana, examinamos por Western blot la fosforilación de CREB, en explantos de placenta tratados con (Bu)₂cAMP 0,1 o 1 μM y/o PD98059 50 μM. Como se esperaba, la fosforilación de CREB fue estimulada con la incubación con AMPc (Figura 55). Interesantemente, este efecto fue bloqueado con PD98059 50 μM. La fosforilación de CREB en la serina 133 inicialmente fue atribuida a PKA. Sin embargo, otros estudios han establecido que varias quinasas son capaces de fosforilar CREB en ese mismo residuo. Si bien ERK 1/2 no puede fosforilar directamente a CREB, puede activarla por fosforilación de miembros de la familia de proteínas quinasas pp90rsk, que translocan al núcleo y fosforilan directamente a CREB (391). Por otro lado, examinamos la fosforilación de ERK 1/2 en células BeWo preincubadas con H89 10 μM o SQ22,536 100 μM y luego tratadas

con (Bu)₂cAMP 1 o 1000 μM. La fosforilación de las quinasas se determinó por Western blot. Según se observa en la Figura 56, la fosforilación de ERK 1/2 aumentó significativamente cuando se utilizaron los inhibidores de PKA o de AC. Más aún, cuando las células se trataron con (Bu)₂cAMP 1 o 1000 μM en presencia de H89, la fosforilación de ERK 1/2 alcanzó 2,2 y 2,8 veces de inducción respectivamente. Esto sugiere que la activación de PKA podría causar la inhibición de ERK, y que el AMPc activaría la vía de señalización de ERK de manera independiente de PKA.

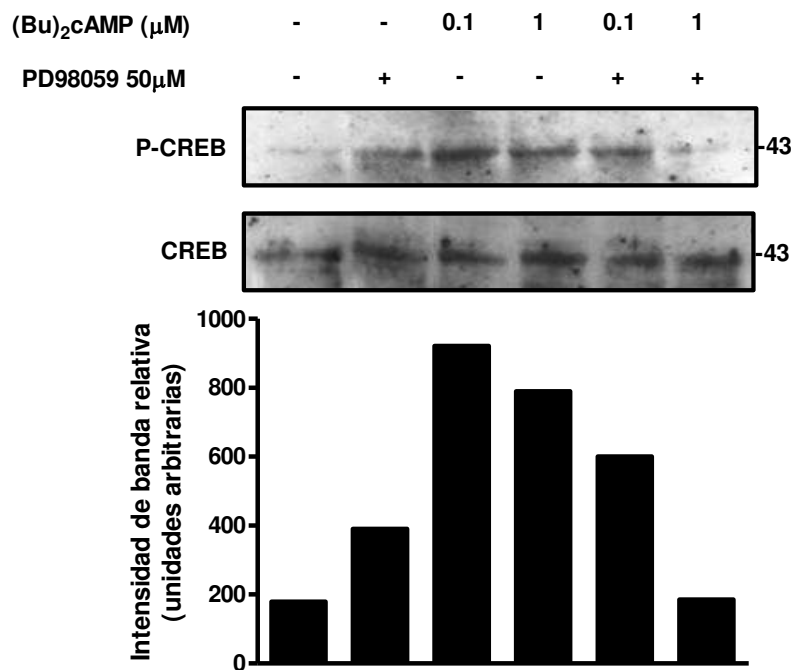


FIGURA 55. Un entrecruzamiento entre las vías de PKA y MAPK está involucrado en el efecto de AMPc sobre la expresión de leptina en placenta. Explantos de placenta humana se procesaron según lo previamente descrito y se trataron con (Bu)₂cAMP y/o PD98059 por 15 min. Los extractos de placenta se sembraron en un gel 12% SDS-PAGE y se analizó la fosforilación de CREB por Western blot. Como control de carga se determinó el nivel total de CREB sin fosforilar. Los pesos moleculares se estimaron empleando marcadores de peso molecular estándar. En el panel inferior se muestra la densitometría de las bandas.

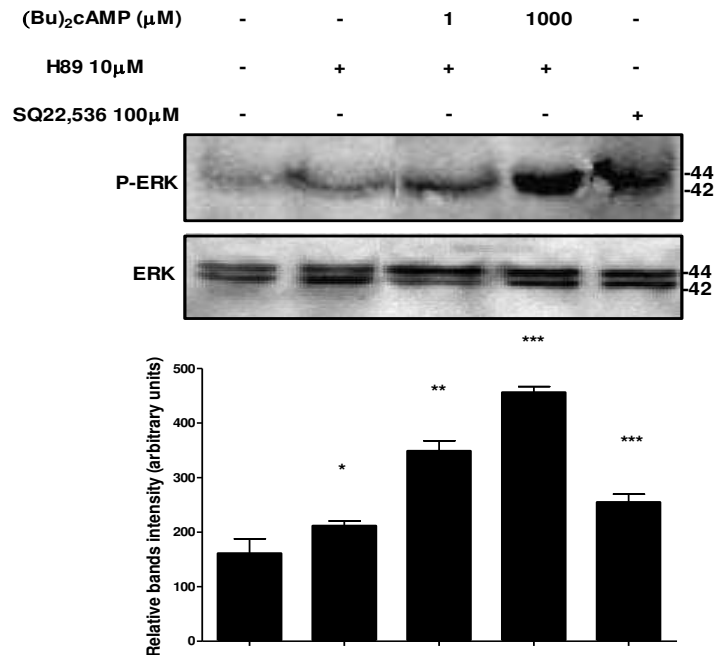


FIGURA 56. Las vías de PKA y MAPK se entrecruzan en células de placenta. Células BeWo (1×10^6) se incubaron en medio completo DMEM-F12 suplementado con 1% de SFB y se trataron durante 15 min con (Bu)₂cAMP, H89, o SQ22,536 como se indica. Los extractos celulares se sembraron en un gel 12% SDS-PAGE y la fosforilación de ERK 1/2 se analizó por Western blot. Se determinó el nivel total de ERK 1/2 como control de carga. Los pesos moleculares se estimaron utilizando marcadores de peso molecular estándar. La densitometría de bandas se muestra en el panel inferior. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes y se expresan como promedio \pm D.E. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Está descrito que el AMPc puede activar a la MAPK a través de miembros de la superfamilia de proteínas Ras. En dicho mecanismo, el AMPc se une al factor intercambiador de guanidina (Epac) y activa Rap1a, que luego aumenta la fosforilación de MAPK (392, 393).

Con el fin de evaluar el rol de esta vía en la estimulación de leptina por el AMPc, realizamos un ensayo de gen reportero en el cual cotransfectamos células BeWo con el pL1951 y plásmidos de expresión de las proteínas Epac y Rap1a. El resultado se muestra en la Figura 57. La sobreexpresión de las proteínas Epac y Rap1a causó una estimulación en la actividad del promotor de leptina, sugiriendo que esta vía alternativa de señalización del

AMPC podría estar involucrada en la acción que el nucleótido ejerce sobre la leptina. En este sentido, ha sido reportado que Epac se expresa en los diferentes estadios de la placenta humana. Epac1 y Epac2 son expresadas en los trofoblastos placentarios del villi coriónico y tendrían funciones en la diferenciación y en la formación del sincicio (392). En placentas de primer y segundo trimestre, tanto la expresión de Epac1 como la de Epac2 fueron halladas en el STB, en los CTB, en el estroma, los vasos sanguíneos y los EVT. En placenta a término, Epac1 y Epac2 se localizaron en el STB, EVT y vasos sanguíneos. En células BeWo, Epac1 y Epac2 fueron localizados en la membrana plasmática y el citoplasma respectivamente (501). Epac1 se transloca rápida y reversiblemente a la membrana plasmática y activa a Rap en respuesta al AMPC (502, 503). Se ha demostrado que la acción sinérgica de PKA y Epac en la señalización de AMPC se requiere para la diferenciación de fibroblastos de ratón 3T3-L1 en adipocitos. En contraste, la estimulación persistente de PKA inhibe la diferenciación a adipocitos (504). Estos resultados indicarían que se requiere una regulación estricta de PKA y Epac en la señalización mediada por AMPC para las respuestas celulares adecuadas. En neuronas de cerebelo de ratón se ha hallado que la señalización dependiente de AMPC/Epac, pero independiente de PKA, es la que controla la excitabilidad celular (505). Así, los resultados obtenidos sugieren que en nuestro sistema, estarían involucradas tanto las vías de PKA como la de Epac en la acción del AMPC sobre la expresión de leptina.

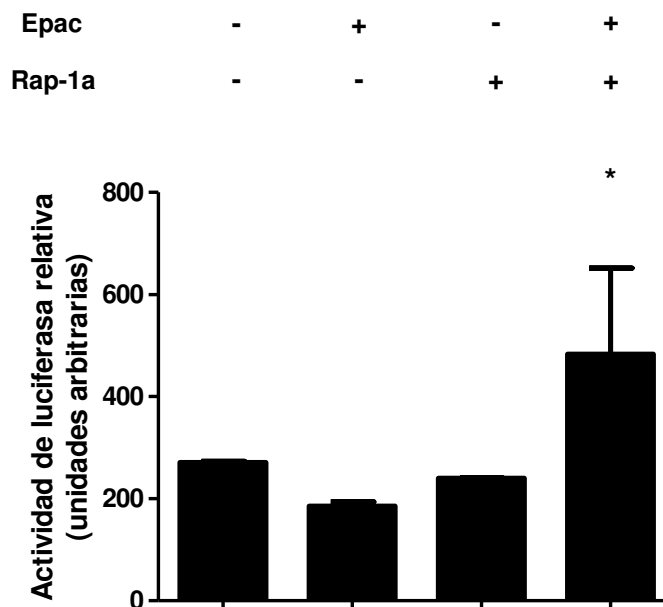


FIGURA 57. El promotor de leptina es activado por Epac/Rap-1A. Células BeWo fueron cotransfectadas transitoriamente con la construcción plasmídica pL1951 y plásmidos que codifican para las proteínas Epac o Rap1a, como se indica. Las células se incubaron durante 72 h en DMEM-F12 1% SFB. La actividad de luciferasa se midió en los extractos celulares y se normalizó a la actividad de β -galactosidasa. Los resultados se expresan como promedio \pm D.E. * $p < 0.05$.

Las posibles interrelaciones que ocurren en las células trofoblásticas cuando aumenta el AMPc intracelular, están descritas en el modelo mostrado en la Figura 58, elaborado en base a reportes previos (386, 506) y a los resultados obtenidos en el presente trabajo. No obstante, se requieren más estudios que permitan verificar el modelo y explicar los mecanismos moleculares responsables de la acción del AMPc sobre la leptina. Los resultados obtenidos indican que tanto las vías de señalización de PKA como la de MAPK están involucradas en la estimulación de la expresión de leptina por AMPc en placenta y este efecto podría ocurrir probablemente como consecuencia de un entrecruzamiento entre las dos vías.

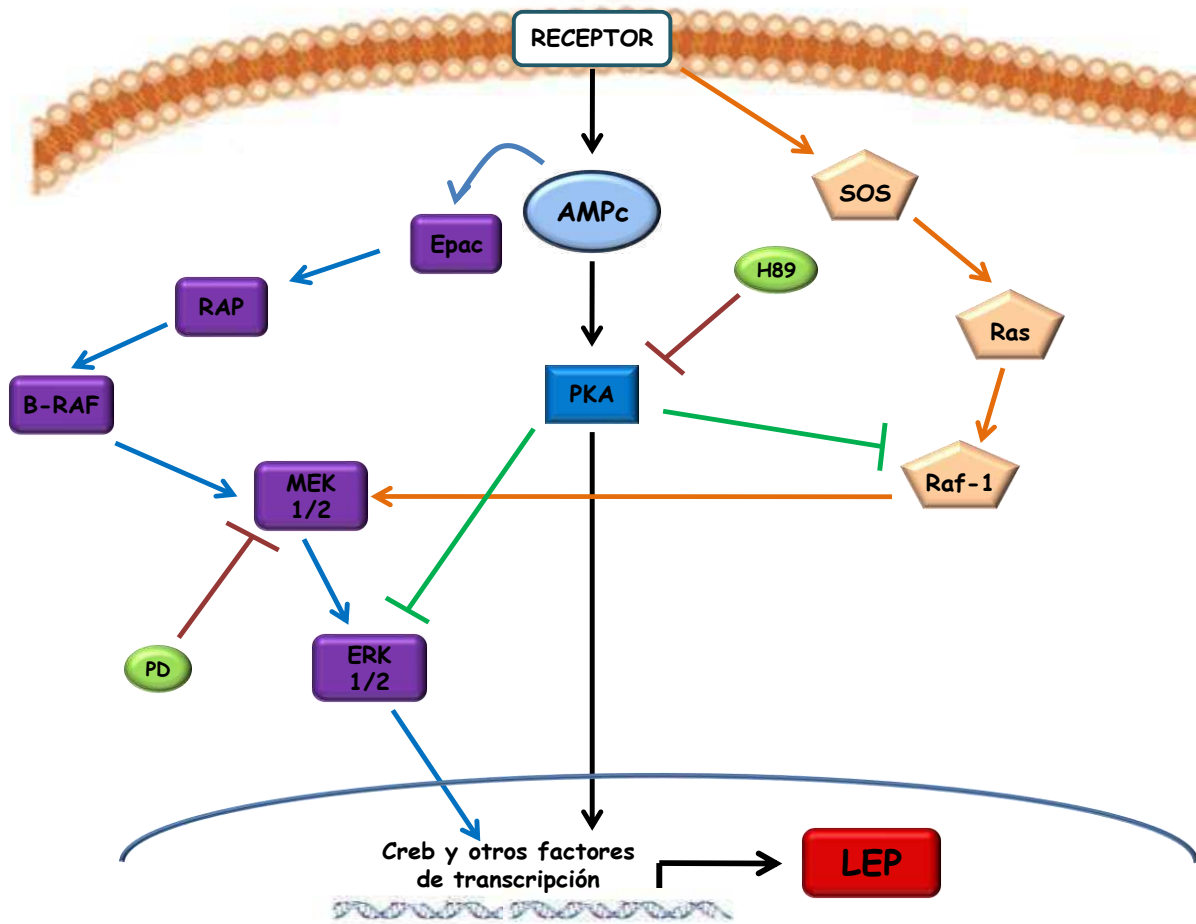


FIGURA 58. Cross talk entre las vías de PKA y MAPK y su acción sobre la expresión de leptina en placenta. Modelo propuesto de las vías de señalización involucradas en la estimulación de leptina por AMPc en placenta, basado en datos actuales. Las flechas terminadas en punta indican estimulación; las flechas cortadas, inhibición. RAP, pequeña proteína GTPasa Rap1 similar a Ras.

CONCLUSIONES

La infertilidad es un aspecto central de la salud reproductiva mundial. El proceso de desarrollo del embrión en la etapa de preimplantación y la preparación del útero para la implantación representan los dos principales determinantes para el éxito del proceso reproductivo. La investigación básica y clínica que permita comprender mejor estos eventos ayudará a aliviar los problemas reproductivos postfertilización. Así, explorando y definiendo los eventos moleculares durante el tiempo crítico de la implantación, tanto en el lado embrionario como en el uterino, se podrá formular un escenario más claro de dicho proceso. El objetivo no es sencillo pues investigar en humanos conlleva dificultades experimentales, consideraciones éticas y ciertas restricciones en los estudios. En este contexto, en el presente trabajo, hemos decidido centrarnos en el estudio de la acción y expresión de una proteína placentaria, importante no sólo en la implantación sino también durante todo período gestacional: la leptina. La comprensión de la biología de la leptina en placenta es un requisito fundamental para determinar la relevancia fisiológica de la hormona durante el embarazo. Por ello, hemos desarrollado una serie de experimentos destinados a ampliar los conocimientos respecto, a las funciones de la leptina por un lado, y a los factores responsables de su expresión en la placenta humana, por otro.

En la **Sección I** de la presente Tesis, estudiamos las vías de señalización activadas por la leptina en placenta, así como la acción antiapoptótica de la proteína y las vías de señalización involucradas en dicho efecto. Como modelo de trabajo hemos utilizado la línea celular de coriocarcinoma humano, JEG-3, y explantos de placenta humana a término. La línea JEG-3 mantiene muchas de las características de las células trofoblásticas humanas y ha sido ampliamente empleada en los estudios de señalización de células placentarias (120, 221). Asimismo, estas células expresan tanto leptina como su receptor (361). El uso de explantos de placenta humana permitió dar relevancia fisiológica a los resultados obtenidos en la línea celular.

La concentración de leptina fisiológica durante el embarazo normal en humanos oscila entre 7,4-35 ng/ml (0,4-2nM) (288); sin embargo, se estima que las concentraciones locales de la proteína son mayores a estos valores. Por ello, hemos elegido trabajar en nuestros experimentos con concentraciones de leptina entre 0-10 nM.

La estimulación del LEPR por la leptina desencadena una serie de transducción de señales, que abarcan varias vías de señalización. Ello ocurre en la familia de receptores de las citoquinas de clase I y en la del receptor de insulina, entre otras. Nuestros resultados se centran fundamentalmente en las vías de JAK/STAT, MAPK y PI3K, de las cuales se ha demostrado que pueden activarse en respuesta a leptina en otros sistemas y que son capaces de mediar los efectos proliferativos de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento.

Inicialmente, determinamos la activación por fosforilación en tirosina del LEPR. Hemos demostrado que el LEPR es activado en respuesta a leptina en células trofoblásticas JEG-3. Este resultado refleja la regulación parácrina y/o endócrina de la leptina en placenta. Existen estudios previos que describen la regulación del crecimiento celular por leptina en células BeWo. No obstante, debemos considerar que las diferentes isoformas del LEPR poseen distintas capacidades de señalización y aún, resta por estudiar las isoformas del LEPR que median la acción de leptina en placenta. Sin embargo, en el modelo de células JEG-3, sólo hemos detectado la isoforma larga del receptor, lo que sugiere que la leptina en estas células actuaría principalmente a través de la isoforma mencionada.

El receptor de leptina pertenece a la familia de receptores de citoquinas de clase I, que estimulan la fosforilación en tirosina de proteínas STATs por activación de quinasas JAK (asociadas a la región intracelular del receptor). La unión del ligando con el receptor promueve su dimerización y la fosforilación de quinasas JAK. En nuestro caso, hemos demostrado que la leptina activa la vía de JAK-STAT en células trofoblásticas JEG-3. La estimulación con leptina en estas células provocó un aumento en la fosforilación de las proteínas JAK2 y STAT3. En células BeWo, JAK2 ya se encuentra fosforilada en el estado basal y no puede ser activada por la leptina (221) y se ha sugerido que este estado puede ser específico de células de placenta. Sin embargo, nosotros hallamos que la leptina induce de forma dependiente de la dosis la activación de JAK2 en células JEG-3. Aún no hemos estudiado la activación de otras formas de STATs ni de JAKs, de manera de comprobar cuáles son las isoformas que median la señalización de la leptina.

Luego determinamos la activación por leptina de las vías de PI3K y MAPK. En primer lugar demostramos que la leptina induce en células trofoblásticas la fosforilación de intermediarios de la vía de PI3K, como Akt/PKB, GSK-3 y p70S6K. La actividad de la

PI3K ha sido implicada en la activación del metabolismo celular estimulado por la insulina y en la proliferación (400, 507). Por otro lado, observamos que la leptina fue capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2, MEK y p38, demostrando que hormona estimula las vías de MAPK en placenta. Ha sido reportado que la leptina activa la vía de MAPK en diferentes sistemas, mediando una respuesta proliferativa (225), y que la leptina posee una función antiapoptótica en monocitos circulantes, mediada por la vía de MAPK (148).

Finalmente, y en coincidencia con los resultados en células JEG-3, determinamos que la leptina es capaz de activar las vías de JAK/STAT, PI3K y MAPK en explantos de placentas humanas normales, lo cual valida con un modelo más fisiológico los efectos observados.

Como paso siguiente, luego de establecer las vías de señalización, investigamos si la leptina es capaz de ejercer un efecto antiapoptótico en células trofoblásticas. Demostramos que la leptina inhibe de la muerte celular inducida por deprivación de suero, y que dicha inhibición es ejercida tanto en los eventos tempranos como en los tardíos de la apoptosis.

Al investigar las vías de señalización involucradas en la acción antiapoptótica de leptina, empleando inhibidores farmacológicos de distintas vías, demostramos que la activación de la vía de la MAPK es necesaria para que la leptina ejerza sus efectos antiapoptóticos en células JEG-3. Al bloquear la vía de MAPK, con el inhibidor de MEK, PD98059, la leptina no logró revertir la apoptosis inducida con medio sin suero. En cambio, con el inhibidor de PI3K, wortmanina, la leptina continuó inhibiendo la apoptosis. Esto sugiere que la leptina previene la apoptosis en placenta a través de la vía de MAPK, y la vía de PI3K parece no estar involucrada en este efecto. Sin embargo, no hemos descartado la participación de otras vías no estudiadas, en la acción antiapoptótica de leptina.

En resumen, los resultados obtenidos hasta aquí aumentan el conocimiento de los mecanismos de acción de leptina en placenta, y aportan evidencias del efecto inhibitorio de leptina sobre la apoptosis, sugiriendo un papel trófico de la proteína en células trofoblásticas. Este hecho presenta relevancia en condiciones patológicas, donde la expresión de leptina por la placenta se encuentra incrementada por condiciones de estrés por hipoxia, como ocurre en la preeclampsia. También, en las GTDs existe una sobreexpresión de la expresión de leptina y todas las isoformas de su receptor (120) y los

niveles plasmáticos disminuyen después del tratamiento del tumor (340). El rol de la leptina en placentas de embarazos patológicos es ampliamente desconocido y requerirá de futuros estudios.

En la **Sección II** del presente trabajo, nos propusimos investigar la regulación de la expresión de leptina por dos moléculas que cumplen funciones esenciales durante el embarazo: la hCG y el AMPc. Más aún, decidimos investigar las vías de señalización involucradas en los efectos de hCG y AMPc sobre la leptina en placenta.

En esta parte del trabajo incluimos como modelo de estudio, la línea celular trofoblástica BeWo.

En primer lugar, demostramos que la hCG estimula la expresión endógena de leptina en células trofoblásticas de manera dosis dependiente, y que a concentraciones altas de hCG (>250 IU/ml) dicha estimulación desaparece. El efecto de regulación positiva se observa ya a las 24 horas de tratamiento y se mantiene al menos hasta las 72 horas. La hCG también es capaz de inducir la expresión del ARNm de leptina y de estimular la actividad del promotor de la hormona. Cuando evaluamos las distintas zonas del promotor que podrían ser responsables del efecto de hCG sobre leptina, observamos que la hormona estimula la actividad del promotor de leptina en toda su extensión, incluso en una porción mínima de 218 pb.

En explantos de placenta humana a término, la hCG incrementó la expresión de leptina así como su ARNm, de manera dosis dependiente, en coincidencia con los resultados obtenidos en células BeWo.

Tal como describimos previamente, la unión de hCG a su receptor LH/hCG, activa clásicamente la vía de señalización del AMPc/PKA. Sin embargo, al tratar a las células con hCG en combinación con AMPc, observamos un efecto inhibitorio del nucleótido sobre la estimulación de la hormona sobre leptina, ya sea tratando directamente con (Bu)₂cAMP o con un inhibidor de las fosfodiesterasas (IBMX). El AMPc bloquea la estimulación del hCG sobre la leptina, no sólo a nivel de la expresión de la proteína sino también a nivel del ARNm. Ha sido reportado que altas concentraciones de hCG (mayores a 100UI/ml) causan un aumento en los niveles de AMPc y esto llevaría a la inhibición de la respuesta de los receptores LH/hCG a la hormona, ya sea por desensibilización o por desaparición de los receptores de la superficie (368, 463). Esto podría explicar que un

incremento en el AMPc conduzca a una supresión de los efectos de hCG sobre la expresión de leptina. Por otro lado, hemos observado que la inhibición de la PKA no afecta la estimulación de la leptina por hCG; más aún, tiende a incrementar dicho efecto. Esto sugeriría que la hCG actuaría sobre la leptina por una vía independiente de la PKA. Sin embargo, varios experimentos permanecen pendientes de manera de elucidar los mecanismos involucrados en el fenómeno observado.

Previamente, ha sido demostrado que en el endometrio de primates (475) y en células de la granulosa porcina (476, 477) el receptor LH/hCG posee la habilidad de señalizar a través de la vía de MAPK/ERK. Estas evidencias nos llevaron a suponer que también en placenta humana, la hCG podría activar vías de señalización alternativas, no excluyente de la vía clásica. En efecto, al investigar la estimulación de leptina por hCG en presencia de PD98059, dicha estimulación fue significativamente inhibida. La acción del PD98059 se observó no sólo en células BeWo sino también en explantos de placenta, y a nivel de la síntesis y de la transcripción de la proteína. Demostramos así, que la vía de MAPK se encuentra involucrada en el efecto de hCG sobre la expresión de leptina en placenta. Más aún, determinamos que la hCG induce la fosforilación de ERK 1/2 y de MEK, siendo capaz por lo tanto de activar la vía de la MAPK en explantos de placenta, tal como había sido reportado en otros sistemas.

Si bien, la inducción de leptina por hCG no resultó significativamente afectada cuando se incluyó un inhibidor de la vía de PI3K (wortmanina), se observó una cierta disminución en dicha inducción. Asimismo, la hCG indujo la fosforilación de Akt en explantos de placenta. Esto nos condujo a pensar que la vía de la PI3K podría estar involucrada también en los efectos de hCG sobre la expresión de leptina. En efecto, se ha reportado la activación de la vía de PI3K por hCG (478).

Otros estudios serán necesarios para clarificar la participación de las vías del AMPc y de MAPK en la acción del hCG sobre la expresión de leptina, y para determinar en qué medida contribuyen ambas en el efecto estimulador observado. Asimismo, deberá determinarse si existen otras vías de señalización involucradas.

Los resultados obtenidos nos condujeron al estudio del efecto del AMPc sobre la expresión de leptina en placenta. Utilizando estrategias experimentales similares y los mismos modelos de trabajo, demostramos, en primer lugar que el AMPc estimula la

expresión de leptina en placenta y que dicho efecto es dosis dependiente. Demostramos también que el AMPc incrementa la expresión del ARNm de leptina así como la actividad de su promotor. Estos resultados se encuentran en concordancia con el hecho de que el AMPc es un importante mediador de la acción y expresión de varias hormonas en placenta (376). Para profundizar en el estudio, decidimos analizar las vías de señalización responsables del efecto del AMPc sobre la leptina. Como primera estrategia, evaluamos si el AMPc era capaz de activar la vía de PKA en placenta. Comprobamos que el AMPc estimula la fosforilación de CREB de manera dosis dependiente en células BeWo y en explantos de placenta. Por otro lado, la sobreexpresión de PKA y de CREB produjo un aumento en la actividad del promotor de leptina, de forma proporcional a la cantidad de proteína sobreexpresada. En este sentido, la inhibición de la actividad de PKA generó una disminución tanto en la expresión de leptina como en la activación de su promotor. Así, demostramos que la vía de PKA es responsable, al menos en parte, de la estimulación de leptina por AMPc. Sin embargo, ha sido reportado que el AMPc es capaz, dependiendo del tipo celular, de inducir o de inhibir la vía de MAPK. A partir de estas evidencias, nos planteamos la posibilidad de que el AMPc pudiera estar actuando a través de distintas vías. En efecto, observamos que la inhibición de la vía de MAPK, causó un bloqueo de la inducción de leptina por AMPc. Más aún, demostramos que el AMPc estimula la fosforilación de ERK 1/2 en células BeWo y en explantos de placenta.

Varios estudios han descrito el entrecruzamiento existente entre las vías de señalización de AMPc/PKA y la de MAPK. Múltiples eventos de “cross talk” ocurren a distintos niveles en ambas vías y de manera diferente según el tipo celular. En placenta, hemos hallado que la inhibición de la vía de MAPK suprime el efecto estimulador del AMPc sobre CREB. Por otro lado, la inhibición de la vía de PKA causó un incremento en la activación de ERK por AMPc, sugiriendo que el AMPc induciría la fosforilación de ERK de manera independiente a PKA. En este sentido, se sabe que el AMPc puede activar a la MAPK a través de miembros de la superfamilia de proteínas Ras. En dicho mecanismo, el AMPc se une al factor intercambiador de guanidina, Epac y activa Rap1a, que luego aumenta la fosforilación de MAPK (392, 393). Al analizar estos intermediarios, observamos que la sobreexpresión de las proteínas Epac y Rap1a aumenta la expresión de

leptina, lo que nos sugiere que esta vía alternativa de señalización del AMPc podría estar involucrada en la acción del nucleótido sobre la hormona.

En base a los resultados obtenidos hasta el momento, propusimos un modelo de señalización, responsable de la inducción de leptina por el AMPc. En dicho modelo, el AMPc sería capaz de activar las vías de PKA y de MAPK de manera paralela, lo cual llevaría a la estimulación de la leptina, tal como lo observamos en nuestros resultados. Sin embargo, la sobreactivación de la PKA conduciría a la inhibición de ERK, dado que observamos que con el tratamiento con un inhibidor específico de la PKA aumenta la fosforilación de ERK1/2. Así, la señalización del AMPc por la vía de MAPK sería independiente de PKA, involucrando a la vía alternativa de Epac/RAP.

Finalmente, integrando todos los resultados obtenidos en la Sección II, los experimentos realizados nos sugieren que el AMPc se encuentra involucrado en la estimulación de la leptina por hCG. No obstante, en este caso, el rol del AMPc como segundo mensajero de la hCG sería a través de la vía alternativa de Epac. Asimismo, la hCG podría actuar de forma independiente del AMPc y estimular la expresión de leptina en placenta por medio de la vía de la MAPK. El AMPc por su parte, generado por la acción de diversos efectores, a través de la activación de la PKA, estimularía a la leptina. En síntesis, aún cuando múltiples vías se requieren para la estimulación de la leptina por AMPc sólo algunas de ellas son dependientes de PKA, mientras que otras, a las que estaría activando la hCG, serían independientes de PKA.

Hasta el momento, con los resultados obtenidos, los modelos son sólo especulativos. No obstante se requerirán más experimentos que demuestren con mayor profundidad los mecanismos involucrados no sólo en la acción del AMPc sobre la expresión de leptina sino también en la acción del AMPc sobre la acción de hCG en la expresión de leptina.

Es evidente que la leptina cumple un rol fundamental en la biología reproductiva. La versatilidad y la cada vez más amplia lista de actividades y cascadas de señalización en las que está involucrada, implican que aún, resta mucho por investigar al respecto.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis amplían los conocimientos relativos a la acción de leptina en placenta humana y a los mecanismos regulatorios de su expresión. Esto revistaría también importancia en los casos de patologías del embarazo o en casos de abortos espontáneos, en donde la expresión de leptina se encuentra alterada o desregulada.

No cabe duda que actualmente la leptina se posiciona como un nexo comunicante entre el embrión y el endometrio y como una molécula clave en la regulación de la implantación.

REFERENCIAS

1. **Dey S** 2006 Implantation. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction-Elsevier 3rd edition
2. **Bischof P, Campana A** 1996 A model for implantation of the human blastocyst and early placentation. Hum Reprod Update 2:262-270
3. **Bischof P, Aplin JD, Bentin-Ley U, Brannstrom M, Casslen B, Castrillo JL, Classen-Linke I, Critchley HO, Devoto L, D'Hooghe T, Horcajadas JA, Groothuis P, Ivell R, Pongrantz I, Macklon NS, Sharkey A, Vicovac L, White JO, Winterhager E, von Wolff M, Simon C, Stavreus-Evers A** 2006 Implantation of the human embryo: research lines and models. From the implantation research network 'Fruitful'. Gynecol Obstet Invest 62:206-216
4. **Renfree MB** ed. 1982 Implantation and placentation: Cambridge University Press, Cambridge
5. **Krussel JS, Bielfeld P, Polan ML, Simon C** 2003 Regulation of embryonic implantation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 110 Suppl 1:S2-9
6. **Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD** 1978 Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. Am J Obstet Gynecol 132:629-634
7. **Bergh PA, Navot D** 1992 The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. Fertil Steril 58:537-542
8. **Vigano P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I** 2003 Maternal-conceptus cross talk--a review. Placenta 24 Suppl B:S56-61
9. **Enders AC, Schlafke S, Hendrickx AG** 1986 Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. Am J Anat 177:161-185
10. **Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ** 2001 Implantation and the survival of early pregnancy. N Engl J Med 345:1400-1408
11. **Bischof P** 1997 **IN VITRO MODELS USED TO STUDY IMPLANTATION, TROPHOBLAST INVASION AND PLACENTATION.-A Review.-** Trophoblast Research 10:67-82
12. **Staun-Ram E, Shalev E** 2005 Human trophoblast function during the implantation process. Reprod Biol Endocrinol 3:56
13. **Fazleabas AT, Kim JJ, Strakova Z** 2004 Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review. Placenta 25 Suppl A:S26-31
14. **Rice A, Chard T** 1998 Cytokines in implantation. Cytokine Growth Factor Rev 9:287-296
15. **Curtis H BN, Schnek A, Flores G.** ed. 2000 Biología. 6th ed
16. **Bischof P, Irminger-Finger I** 2005 The human cytotrophoblastic cell, a mononuclear chameleon. Int J Biochem Cell Biol 37:1-16
17. **Goldman-Wohl D, Yagel S** 2002 Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. Mol Cell Endocrinol 187:233-238
18. **Bischof P, Campana A** 2000 Molecular mediators of implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 14:801-814

19. **Aplin JD** 2000 The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14:757-764
20. **Genbacev O, Miller RK** 2000 Post-implantation differentiation and proliferation of cytotrophoblast cells: in vitro models--a review. *Placenta* 21 Suppl A:S45-49
21. **Enders AC** 1968 Fine structure of anchoring villi of the human placenta. *Am J Anat* 122:419-451
22. **Harvey J. Kliman MD, Ph.D.** ed. 1998 *From Trophoblast to Human Placenta*: Yale University School of Medicine
23. **Vitiello D, Patrizio P** 2007 Implantation and early embryonic development: implications for pregnancy. *Semin Perinatol* 31:204-207
24. **Duc-Goiran P, Mignot TM, Bourgeois C, Ferre F** 1999 Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 83:85-100
25. **Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P** 2000 Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 6:951-958
26. **Red-Horse K, Zhou Y, Genbacev O, Prakobphol A, Foulk R, McMaster M, Fisher SJ** 2004 Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J Clin Invest* 114:744-754
27. **Simon C, Dominguez F, Remohi J, Pellicer A** 2001 Embryo effects in human implantation: embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *Ann N Y Acad Sci* 943:1-16
28. **Lessey BA** 1998 Endometrial integrins and the establishment of uterine receptivity. *Hum Reprod* 13 Suppl 3:247-258; discussion 259-261
29. **Salamonsen LA, Nie G** 2002 Proteases at the endometrial-trophoblast interface: their role in implantation. *Rev Endocr Metab Disord* 3:133-143
30. **Hofmann GE, Scott RT, Jr., Bergh PA, Deligdisch L** 1991 Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in human endometrium, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73:882-887
31. **Li RH, Zhuang LZ** 1997 The effects of growth factors on human normal placental cytotrophoblast cell proliferation. *Hum Reprod* 12:830-834
32. **Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, Abbondanzo SJ** 1992 Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 359:76-79
33. **Sharkey AM, King A, Clark DE, Burrows TD, Jokhi PP, Charnock-Jones DS, Loke YW, Smith SK** 1999 Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. *Biol Reprod* 60:355-364
34. **Bischof P, Haenggeli L, Campana A** 1995 Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol* 34:225-230
35. **Chardonnens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC, Bischof P** 1999 Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion. *Mol Hum Reprod* 5:1077-1082

36. **Albrecht ED, Bonagura TW, Burleigh DW, Enders AC, Aberdeen GW, Pepe GJ** 2006 Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta* 27:483-490
37. **Gambino YP, Maymo JL, Perez-Perez A, Duenas JL, Sanchez-Margalet V, Calvo JC, Varone CL** 2010 17Beta-Estradiol Enhances Leptin Expression in Human Placental Cells Through Genomic and Nongenomic Actions. *Biol Reprod*
38. **Licht P, Russu V, Wildt L** 2001 On the role of human chorionic gonadotropin (hCG) in the embryo-endometrial microenvironment: implications for differentiation and implantation. *Semin Reprod Med* 19:37-47
39. **Dunn CL, Kelly RW, Critchley HO** 2003 Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod Biomed Online* 7:151-161
40. **Spencer TE, Bazer FW** 2004 Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 2:49
41. **Athanassakis I, Farmakiotis V, Aifantis I, Gravanis A, Vassiliadis S** 1999 Expression of corticotrophin-releasing hormone in the mouse uterus: participation in embryo implantation. *J Endocrinol* 163:221-227
42. **Bamberger AM, Schulte HM, Thuneke I, Erdmann I, Bamberger CM, Asa SL** 1997 Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3173-3175
43. **Hunt JS** 1993 Expression and regulation of the tumour necrosis factor-alpha gene in the female reproductive tract. *Reprod Fertil Dev* 5:141-153
44. **Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang JP, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC** 2002 Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 143:2119-2138
45. **Sternlicht MD, Werb Z** 2001 How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
46. **Isaka K, Usuda S, Ito H, Sagawa Y, Nakamura H, Nishi H, Suzuki Y, Li YF, Takayama M** 2003 Expression and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in human trophoblasts. *Placenta* 24:53-64
47. **Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H** 2004 Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341-373
48. **Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S** 2000 Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 66:1127-1137
49. **Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA** 1989 Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264:17374-17378
50. **Hurskainen T, Hoyhtya M, Tuuttila A, Oikarinen A, Autio-Harmainen H** 1996 mRNA expressions of TIMP-1, -2, and -3 and 92-KD type IV collagenase in early human placenta and decidual membrane as studied by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 44:1379-1388
51. **Hayakawa T** 1994 Tissue inhibitors of metalloproteinases and their cell growth-promoting activity. *Cell Struct Funct* 19:109-114

52. **Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E, Shinagawa A** 1994 Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J Cell Sci* 107 (Pt 9):2373-2379
53. **Vassalli JD, Sappino AP, Belin D** 1991 The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1067-1072
54. **Hill JA** 2001 Maternal-embryonic cross-talk. *Ann N Y Acad Sci* 943:17-25
55. **Nasmyth K** 1996 Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274:1643-1645
56. **Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR** 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
57. **Fadeel B, Orrenius S** 2005 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258:479-517
58. **Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N** 1998 Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17:3237-3245
59. **Heazell AE, Crocker IP** 2008 Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta* 29:772-783
60. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X** 1998 Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490
61. **Nicholson DW, Thornberry NA** 2003 Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299:214-215
62. **Hsu H, Xiong J, Goeddel DV** 1995 The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81:495-504
63. **Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ** 1994 Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 15:819-835
64. **Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P** 2004 Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874
65. **De Falco M, De Luca L, Acanfora F, Cavallotti I, Cottone G, Laforgia V, De Luca B, Baldi A, De Luca A** 2001 Alteration of the Bcl-2:Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochem J* 33:421-425
66. **Nelson RL** 2000 To Be, or Not to Be, That is the Question. Apoptosis in Human Trophoblast. *Placenta* 21:1-13
67. **Smith SC, Baker PN, Symonds EM** 1997 Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 177:57-65
68. **Fulop V, Mok SC, Genest DR, Gati I, Doszpod J, Berkowitz RS** 1998 p53, p21, Rb and mdm2 oncoproteins. Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med* 43:119-127
69. **Chevillie JC, Robinson RA, Benda JA** 1996 p53 expression in placentas with hydropic change and hydatidiform moles. *Mod Pathol* 9:392-396
70. **Pfeifer-Ohlsson S, Goustin AS, Rydnert J, Wahlstrom T, Bjersing L, Stehelin D, Ohlsson R** 1984 Spatial and temporal pattern of cellular myc oncogene expression in developing human placenta: implications for embryonic cell proliferation. *Cell* 38:585-596

71. **Roncalli M, Bulfamante G, Viale G, Springall DR, Alfano R, Comi A, Maggioni M, Polak JM, Coggi G** 1994 C-myc and tumour suppressor gene product expression in developing and term human trophoblast. *Placenta* 15:399-409
72. **Marzusch K, Ruck P, Horny HP, Dietl J, Kaiserling E** 1995 Expression of the p53 tumour suppressor gene in human placenta: an immunohistochemical study. *Placenta* 16:101-104
73. **Quenby S, Brazeau C, Drakeley A, Lewis-Jones DI, Vince G** 1998 Oncogene and tumour suppressor gene products during trophoblast differentiation in the first trimester. *Mol Hum Reprod* 4:477-481
74. **Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G** 2005 The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev* 26:877-897
75. **Wong SY, Ngan HY, Chan CC, Cheung AN** 1999 Apoptosis in gestational trophoblastic disease is correlated with clinical outcome and Bcl-2 expression but not Bax expression. *Mod Pathol* 12:1025-1033
76. **Chiu PM, Ngan YS, Khoo US, Cheung AN** 2001 Apoptotic activity in gestational trophoblastic disease correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 CytoDeath antibody. *Histopathology* 38:243-249
77. **Allaire AD, Ballenger KA, Wells SR, McMahon MJ, Lessey BA** 2000 Placental apoptosis in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 96:271-276
78. **Li HW, Tsao SW, Cheung AN** 2002 Current understandings of the molecular genetics of gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 23:20-31
79. **Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft FC** 2004 New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol* 15:2440-2448
80. **Noris M, Perico N, Remuzzi G** 2005 Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat Clin Pract Nephrol* 1:98-114; quiz 120
81. **Duley L** 2009 The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol* 33:130-137
82. **Gagnon R** 2003 Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:S99-107
83. **Pridjian G, Puschett JB** 2002 Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. *Obstet Gynecol Surv* 57:598-618
84. **Redman CW, Sargent IL** 2003 Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review. *Placenta* 24 Suppl A:S21-27
85. **Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T** 2002 Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 186:158-166
86. **Walker JJ** 2000 Pre-eclampsia. *Lancet* 356:1260-1265
87. **Gilmartin AB, Ural SH, Repke JT** 2008 Gestational diabetes mellitus. *Rev Obstet Gynecol* 1:129-134
88. **Ecker JL** 2008 Gestational Diabetes: An Opportunity for Improvement. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4646-4647
89. **Desoye G, Hauguel-de Mouzon S** 2007 The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care* 30 Suppl 2:S120-126

90. **Hoffman L, Nolan C, Wilson JD, Oats JJ, Simmons D** 1998 Gestational diabetes mellitus--management guidelines. The Australasian Diabetes in Pregnancy Society. *Med J Aust* 169:93-97
91. **Hod M, Merlob P, Friedman S, Schoenfeld A, Ovadia J** 1991 Gestational diabetes mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes* 40 Suppl 2:74-78
92. **Cetin I SJ** 2005 Determinants of intrauterine growth. *Neonatal Nutrition and Metabolism* Hay WW, Thureen P, editors 2nd ed
93. **Baschat A** 2004 Fetal responses to placental insufficiency: an update. *Br J Obstet Gynaecol*:1031-1041
94. **Lin CC SS, River LP** 1991 Comparison of associated high-risk factors and perinatal outcome between symmetric and asymmetric fetal intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1535-1541
95. **Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, Glazier JD, Greenwood SL, Jansson T, Powell T** 2005 Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res* 58:827-832
96. **Cetin I, Alvino G** 2009 Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. *Placenta* 30 Suppl A:S77-82
97. **Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P** 2000 Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 92:35-43
98. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
99. **Myers MG, Jr.** 2004 Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* 59:287-304
100. **Kershaw EE, Flier JS** 2004 Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556
101. **Henson MC, Castracane VD** 2006 Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod* 74:218-229
102. **Considine RV, Caro JF** 1997 Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol* 29:1255-1272
103. **Fruhbeck G** 2006 Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393:7-20
104. **Prolo P, Wong ML, Licinio J** 1998 Leptin. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1285-1290
105. **Imagawa K, Numata Y, Katsuura G, Sakaguchi I, Morita A, Kikuoka S, Matumoto Y, Tsuji T, Tamaki M, Sasakura K, Teraoka H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K** 1998 Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem* 273:35245-35249
106. **Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM** 1998 Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol* 18:399-419
107. **Boute N, Zilberfarb V, Camoin L, Bonnafous S, Le Marchand-Brustel Y, Issad T** 2004 The formation of an intrachain disulfide bond in the leptin protein is necessary for efficient leptin secretion. *Biochimie* 86:351-356
108. **Auwerx J, Staels B** 1998 Leptin. *Lancet* 351:737-742
109. **Ahima RS, Flier JS** 2000 Leptin. *Annu Rev Physiol* 62:413-437

110. **Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ** 1998 The stomach is a source of leptin. *Nature* 394:790-793
111. **Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL** 1998 Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1810-1813
112. **Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L** 1998 A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393:684-688
113. **Senaris R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF** 1997 Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138:4501-4504
114. **Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG** 1997 Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11073-11078
115. **Mix H, Manns MP, Wagner S, Widjaja A, Brabant G** 1999 Expression of leptin and its receptor in the human stomach. *Gastroenterology* 117:509
116. **Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB** 1996 Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 45:1638-1643
117. **Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM** 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635
118. **Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF** 1996 Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest* 98:1277-1282
119. **Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS** 1995 Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314
120. **Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K** 1997 Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 3:1029-1033
121. **Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M** 1996 Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 45:984-987
122. **Garibotto G, Russo R, Franceschini R, Robaudo C, Saffioti S, Sofia A, Rolandi E, Deferrari G, Barreca T** 1998 Inter-organ leptin exchange in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 247:504-509
123. **Jensen MD, Moller N, Nair KS, Eisenberg P, Landt M, Klein S** 1999 Regional leptin kinetics in humans. *Am J Clin Nutr* 69:18-21
124. **Kalsbeek A, Fliers E, Romijn JA, La Fleur SE, Wortel J, Bakker O, Endert E, Buijs RM** 2001 The suprachiasmatic nucleus generates the diurnal changes in plasma leptin levels. *Endocrinology* 142:2677-2685
125. **Wagner R, Oberste-Berghaus C, Herpertz S, Blum WF, Pelz B, Hebebrand J, Senf W, Mann K, Albers N** 2000 Time relationship between circadian variation of serum levels of leptin, insulin and cortisol in healthy subjects. *Horm Res* 54:174-180

126. **Saad MF, Riad-Gabriel MG, Khan A, Sharma A, Michael R, Jinagouda SD, Boyadjian R, Steil GM** 1998 Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 83:453-459
127. **Licinio J, Negrao AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Mulla A, Cearnal L, Veldhuis JD, Flier JS, McCann SM, Gold PW** 1998 Synchronicity of frequently sampled, 24-h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2541-2546
128. **Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Blum W** 1996 Leptin concentrations in amniotic fluid, venous and arterial cord blood and maternal serum: high leptin synthesis in the fetus and inverse correlation with placental weight. *Eur J Pediatr* 155:830
129. **Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O** 2005 Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 579:295-301
130. **Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP** 1996 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
131. **Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P** 1996 Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387:113-116
132. **Friedman JM** 2000 Obesity in the new millennium. *Nature* 404:632-634
133. **Zhou YT, Shimabukuro M, Koyama K, Lee Y, Wang MY, Trieu F, Newgard CB, Unger RH** 1997 Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6386-6390
134. **Seeley RJ, van Dijk G, Campfield LA, Smith FJ, Burn P, Nelligan JA, Bell SM, Baskin DG, Woods SC, Schwartz MW** 1996 Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats. *Horm Metab Res* 28:664-668
135. **Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD** 1996 Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381:415-421
136. **Savage DB, O'Rahilly S** 2002 Leptin: a novel therapeutic role in lipodystrophy. *J Clin Invest* 109:1285-1286
137. **Huang L, Li C** 2000 Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res* 10:81-92
138. **Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G** 2000 Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100:197-207
139. **Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G** 2002 Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111:305-317
140. **Cehab FF, Qiu J, Ogus S** 2004 The use of animal models to dissect the biology of leptin. *Recent Prog Horm Res* 59:245-266
141. **Kishida Y, Hirao M, Tamai N, Nampei A, Fujimoto T, Nakase T, Shimizu N, Yoshikawa H, Myoui A** 2005 Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification. *Bone* 37:607-621

142. **Reseland JE, Haugen F, Hollung K, Solvoll K, Halvorsen B, Brude IR, Nenseter MS, Christiansen EN, Drevon CA** 2001 Reduction of leptin gene expression by dietary polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 42:743-750
143. **Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser A, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C** 1999 Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol* 276:R136-142
144. **Maruna P, Gurlich R, Frasko R** 2001 [Leptin--a new acute phase reactant]. *Vnitr Lek* 47:478-483
145. **Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME** 1998 The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 76:1405-1420
146. **Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M** 2005 Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 174:6820-6828
147. **Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS** 2005 Leptin in immunology. *J Immunol* 174:3137-3142
148. **Najib S, Sanchez-Margalet V** 2002 Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell Immunol* 220:143-149
149. **Faggioni R, Feingold KR, Grunfeld C** 2001 Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J* 15:2565-2571
150. **Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI** 1998 Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394:897-901
151. **Tannenbaum GS, Gurd W, Lapointe M** 1998 Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone. *Endocrinology* 139:3871-3875
152. **Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS** 1997 Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138:3859-3863
153. **Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR** 1998 Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4459-4466
154. **Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjoorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN** 2001 Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107:111-120
155. **Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM** 1997 Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1023-1028
156. **Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM** 1997 Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 138:5055-5058
157. **Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV** 1999 Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2903-2911

158. **Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA** 1998 Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem* 273:26194-26201
159. **Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R** 1998 Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 83:1059-1066
160. **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR** 1998 Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686
161. **Halle M, Berg A, Garwers U, Grathwohl D, Knisel W, Keul J** 1999 Concurrent reductions of serum leptin and lipids during weight loss in obese men with type II diabetes. *Am J Physiol* 277:E277-282
162. **Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A, Borkowska E, Wojcicka G** 2004 Up-regulation of renal Na⁺, K⁺-ATPase: the possible novel mechanism of leptin-induced hypertension. *Pol J Pharmacol* 56:213-222
163. **Beltowski J, Marciniak A, Wojcicka G** 2004 Leptin decreases renal medullary Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase activity through phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism. *J Physiol Pharmacol* 55:391-407
164. **Trayhurn P, Duncan JS, Hoggard N, Rayner DV** 1998 Regulation of leptin production: a dominant role for the sympathetic nervous system? *Proc Nutr Soc* 57:413-419
165. **Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV** 1995 Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J* 311 (Pt 3):729-733
166. **Becker DJ, Ongemba LN, Brichard V, Henquin JC, Brichard SM** 1995 Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. *FEBS Lett* 371:324-328
167. **De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B** 1995 Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 270:15958-15961
168. **Leroy P, Dessolin S, Villageois P, Moon BC, Friedman JM, Ailhaud G, Dani C** 1996 Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem* 271:2365-2368
169. **Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J** 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529
170. **Larsson H, Ahren B** 1996 Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4428-4432
171. **Papaspyrou-Rao S, Schneider SH, Petersen RN, Fried SK** 1997 Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1635-1637
172. **Halleux CM, Servais I, Reul BA, Detry R, Brichard SM** 1998 Multihormonal control of ob gene expression and leptin secretion from cultured human visceral adipose tissue: increased responsiveness to glucocorticoids in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 83:902-910
173. **Hardie LJ, Guilhot N, Trayhurn P** 1996 Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res* 28:685-689

174. **Murakami T, Iida M, Shima K** 1995 Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 214:1260-1267
175. **Rentsch J, Chiesi M** 1996 Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett* 379:55-59
176. **Gettys TW, Harkness PJ, Watson PM** 1996 The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 137:4054-4057
177. **Kallen CB, Lazar MA** 1996 Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5793-5796
178. **Trayhurn P, Duncan JS, Rayner DV, Hardie LJ** 1996 Rapid inhibition of ob gene expression and circulating leptin levels in lean mice by the beta 3-adrenoceptor agonists BRL 35135A and ZD2079. *Biochem Biophys Res Commun* 228:605-610
179. **Pinkney JH, Coppack SW, Mohamed-Ali V** 1998 Effect of isoprenaline on plasma leptin and lipolysis in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48:407-411
180. **Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW** 1996 Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 271:5301-5304
181. **Mason MM, He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M** 1998 Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology* 139:1013-1022
182. **He Y, Chen H, Quon MJ, Reitman M** 1995 The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J Biol Chem* 270:28887-28891
183. **Sagawa N, Yura S, Itoh H, Mise H, Kakui K, Korita D, Takemura M, Nuamah MA, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S** 2002 Role of leptin in pregnancy--a review. *Placenta* 23 Suppl A:S80-86
184. **Devos R, Guisez Y, Van der Heyden J, White DW, Kalai M, Fountoulakis M, Plaetinck G** 1997 Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem* 272:18304-18310
185. **Tsunoda Y, Yao H, Park J, Owyang C** 2003 Cholecystokinin synthesizes and secretes leptin in isolated canine gastric chief cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310:681-684
186. **Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, Attoub S, Lehy T, Henin D, Mignon M, Lewin MJ** 2000 Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47:178-183
187. **Goiot H, Laigneau JP, Devaud H, Sobhani I, Bado A** 2005 Similarities and differences in the transcriptional regulation of the leptin gene promoter in gastric and adipose cells. *FEBS Lett* 579:1911-1916
188. **Casabiell X, Pineiro V, Peino R, Lage M, Camina J, Gallego R, Vallejo LG, Dieguez C, Casanueva FF** 1998 Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2149-2155
189. **Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M** 1995 Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med* 1:953-956

190. **Zumbach MS, Boehme MW, Wahl P, Stremmel W, Ziegler R, Nawroth PP** 1997 Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4080-4082
191. **Janik JE, Curti BD, Considine RV, Rager HC, Powers GC, Alvord WG, Smith JW, 2nd, Gause BL, Kopp WC** 1997 Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3084-3086
192. **Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR** 1997 Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 185:171-175
193. **Cakir B, Yonem A, Guler S, Odabasi E, Demirbas B, Gursoy G, Aral Y** 1999 Relation of leptin and tumor necrosis factor alpha to body weight changes in patients with pulmonary tuberculosis. *Horm Res* 52:279-283
194. **Janeckova R** 2001 The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res* 50:443-459
195. **Thomas T, Burguera B, Melton LJ, 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL, Khosla S** 2000 Relationship of serum leptin levels with body composition and sex steroid and insulin levels in men and women. *Metabolism* 49:1278-1284
196. **Soderberg S, Olsson T, Eliasson M, Johnson O, Brismar K, Carlstrom K, Ahren B** 2001 A strong association between biologically active testosterone and leptin in non-obese men and women is lost with increasing (central) adiposity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:98-105
197. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271
198. **Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M** 1997 Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238:648-652
199. **Tartaglia LA** 1997 The leptin receptor. *J Biol Chem* 272:6093-6096
200. **Bazan JF** 1989 A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 164:788-795
201. **Hegy K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A** 2004 Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28:159-169
202. **Bazan JF** 1990 Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6934-6938
203. **Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T** 1995 Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243-1254
204. **Heim MH** 1996 The Jak-STAT pathway: specific signal transduction from the cell membrane to the nucleus. *Eur J Clin Invest* 26:1-12
205. **Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH** 1996 A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 392:87-90
206. **Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL** 1996 Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271:994-996

207. **Bjorbaek C, Kahn BB** 2004 Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 59:305-331
208. **Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS** 2002 Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143:775-783
209. **Heaney ML, Golde DW** 1993 Soluble hormone receptors. *Blood* 82:1945-1948
210. **Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS** 2002 Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes* 51:2105-2112
211. **Nakashima K, Narazaki M, Taga T** 1997 Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130. *FEBS Lett* 403:79-82
212. **White DW, Tartaglia LA** 1999 Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J Cell Biochem* 73:278-288
213. **White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA** 1997 Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272:4065-4071
214. **Fong TM, Huang RR, Tota MR, Mao C, Smith T, Varnerin J, Karpitskiy VV, Krause JE, Van der Ploeg LH** 1998 Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol* 53:234-240
215. **Sweeney G** 2002 Leptin signalling. *Cell Signal* 14:655-663
216. **Barr VA, Lane K, Taylor SI** 1999 Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem* 274:21416-21424
217. **Lundin A, Rondahl H, Walum E, Wilcke M** 2000 Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera. *Biochim Biophys Acta* 1499:130-138
218. **Ihle JN, Kerr IM** 1995 Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11:69-74
219. **Ghilardi N, Skoda RC** 1997 The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol* 11:393-399
220. **Jiang N, He TC, Miyajima A, Wojchowski DM** 1996 The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *J Biol Chem* 271:16472-16476
221. **Cauzac M, Czuba D, Girard J, Hauguel-de Mouzon S** 2003 Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta* 24:378-384
222. **Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr.** 2000 Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 275:14563-14572
223. **Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr.** 2005 Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 62:642-652
224. **Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS** 1997 Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272:32686-32695

225. **Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG, Jr., Flier JS** 2001 Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 276:4747-4755
226. **Kim GS, Hong JS, Kim SW, Koh JM, An CS, Choi JY, Cheng SL** 2003 Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 278:21920-21929
227. **Dreyer MG, Juge-Aubry CE, Gabay C, Lang U, Rohner-Jeanrenaud F, Dayer JM, Meier CA** 2003 Leptin activates the promoter of the interleukin-1 receptor antagonist through p42/44 mitogen-activated protein kinase and a composite nuclear factor kappa B/PU.1 binding site. *Biochem J* 370:591-599
228. **Mehebik N, Jaubert AM, Sabourault D, Giudicelli Y, Ribiere C** 2005 Leptin-induced nitric oxide production in white adipocytes is mediated through PKA and MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C379-387
229. **Fruhbeck G, Salvador J** 2000 Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia* 43:3-12
230. **Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Truitt K, Imboden J, Sung CK** 1995 Role of p85 subunit of phosphatidylinositol-3-kinase as an adaptor molecule linking the insulin receptor to insulin receptor substrate 1. *Mol Endocrinol* 9:435-442
231. **Niswender KD, Schwartz MW** 2003 Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* 24:1-10
232. **Benomar Y, Roy AF, Aubourg A, Djiane J, Taouis M** 2005 Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J* 388:929-939
233. **Chan TO, Rittenhouse SE, Tsichlis PN** 1999 AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 68:965-1014
234. **Szanto I, Kahn CR** 2000 Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2355-2360
235. **Cohen B, Novick D, Rubinstein M** 1996 Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274:1185-1188
236. **Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE** 2000 Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J Biol Chem* 275:11348-11354
237. **Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V** 2001 Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 212:83-91
238. **Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C** 2001 Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell Immunol* 211:30-36
239. **van den Brink GR, O'Toole T, Hardwick JC, van den Boogaardt DE, Versteeg HH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP** 2000 Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:144-150
240. **Chen NG, Swick AG, Romsos DR** 1997 Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice. *J Clin Invest* 100:1174-1179

241. **Ahren B, Havel PJ** 1999 Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol* 277:R959-966
242. **Houslay MD, Scotland G, Erdogan S, Huston E, Mackenzie S, McCallum JF, McPhee I, Pooley L, Rena G, Ross A, Beard M, Peder A, Begg F, Wilkinson I, Yarwood S, Ackerman C, Houslay ES, Hoffman R, Engels P, Sullivan M, Bolger G** 1997 Intracellular targeting, interaction with Src homology 3 (SH3) domains and rolipram-detected conformational switches in cAMP-specific PDE4A phosphodiesterase. *Biochem Soc Trans* 25:374-381
243. **Soderling SH, Beavo JA** 2000 Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12:174-179
244. **Unger RH** 2004 The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell* 117:145-146
245. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB** 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343
246. **Ceddia RB** 2005 Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 29:1175-1183
247. **Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME** 1997 Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88-90
248. **Strosberg AD, Issad T** 1999 The involvement of leptin in humans revealed by mutations in leptin and leptin receptor genes. *Trends Pharmacol Sci* 20:227-230
249. **Speroff L** 2005 Alternative therapies for postmenopausal women. *Int J Fertil Womens Med* 50:101-114
250. **Roemmich JN, Huerta MG, Sundaresan SM, Rogol AD** 2001 Alterations in body composition and fat distribution in growth hormone-deficient prepubertal children during growth hormone therapy. *Metabolism* 50:537-547
251. **Grasemann C, Wessels HT, Knauer-Fischer S, Richter-Unruh A, Hauffa BP** 2004 Increase of serum leptin after short-term pulsatile GnRH administration in children with delayed puberty. *Eur J Endocrinol* 150:691-698
252. **Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS** 1997 Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 99:391-395
253. **Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD** 1997 A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1066-1070
254. **Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF** 1996 Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 98:201-203
255. **Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B** 1996 The discovery of leptin and its impact in the understanding of obesity. *Eur J Endocrinol* 135:649-650
256. **Horlick MB, Rosenbaum M, Nicolson M, Levine LS, Fedun B, Wang J, Pierson RN, Jr., Leibel RL** 2000 Effect of puberty on the relationship between circulating leptin and body composition. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2509-2518
257. **Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS** 1997 Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: the role of insulin resistance/hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1692-1696

258. **Kopp W, Blum WF, von Prittwitz S, Ziegler A, Lubbert H, Emons G, Herzog W, Herpertz S, Deter HC, Remschmidt H, Hebebrand J** 1997 Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females. *Mol Psychiatry* 2:335-340
259. **Armstrong JD, Britt JH** 1987 Nutritionally-induced anestrus in gilts: metabolic and endocrine changes associated with cessation and resumption of estrous cycles. *J Anim Sci* 65:508-523
260. **Kirkwood RN, Aherne FX** 1985 Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt. *J Anim Sci* 60:1518-1529
261. **Pettigrew JE, and M. D. Tokach.** 1991. Nutrition and female reproduction. *Pig News Info* 12:559-562.
262. **Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA** 1996 Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137:3144-3147
263. **Mounzih K, Lu R, Chehab FF** 1997 Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 138:1190-1193
264. **Rosenbaum M, Leibel RL** 1998 Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends Endocrinol Metab* 9:117-124
265. **Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS** 2004 Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 351:987-997
266. **Spicer LJ, Francisco CC** 1997 The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 138:3374-3379
267. **Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B** 1997 Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148
268. **Ricci AG, Di Yorio MP, Faletti AG** 2006 Inhibitory effect of leptin on the rat ovary during the ovulatory process. *Reproduction* 132:771-780
269. **Roman EA, Ricci AG, Faletti AG** 2005 Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Mol Cell Endocrinol* 242:33-41
270. **Gogacz M, Polak G, Jakowicki J, Kotarski J** 2001 Peritoneal fluid leptin concentration in infertile patients. *J Reprod Immunol* 51:159-165
271. **Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA** 1999 Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1072-1076
272. **Ruiz-Cortes ZT, Men T, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA, Murphy BD** 2000 Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. *Mol Reprod Dev* 56:465-474
273. **Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ** 2002 Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 66:1548-1554
274. **Cervero A, Horcajadas JA, MartIn J, Pellicer A, Simon C** 2004 The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2442-2451
275. **Loffler S, Aust G, Kohler U, Spanel-Borowski K** 2001 Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod* 7:1143-1149

276. **Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Torjesen P, Urbancsek J, Abyholm T** 2000 Leptin and leptin binding activity in the preovulatory follicle of polycystic ovary syndrome patients. *Scand J Clin Lab Invest* 60:649-655
277. **Zachow RJ, Magoffin DA** 1997 Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138:847-850
278. **Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ** 2000 The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 141:1971-1976
279. **Sirotkin AV, Mlyncek M, Kotwica J, Makarevich AV, Florkovicova I, Hetenyi L** 2005 Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system. *Horm Res* 64:198-202
280. **Karamouti M, Kollia P, Karligiotou E, Kallitsaris A, Prapas N, Kollios G, Seferiadis K, Vamvakopoulos N, Messinis IE** 2003 Absence of leptin expression and secretion by human luteinized granulosa cells. *J Mol Endocrinol* 31:233-239
281. **Antczak M, Van Blerkom J** 1997 Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod* 3:1067-1086
282. **Banks WA, McLay RN, Kastin AJ, Sarmiento U, Scully S** 1999 Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am J Physiol* 276:E1099-1104
283. **Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A** 1999 Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 140:4939-4947
284. **Gnessi L, Fabbri A, Spera G** 1997 Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 18:541-609
285. **El-Hefnawy T, Ioffe S, Dym M** 2000 Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology* 141:2624-2630
286. **Henson MC, Castracane VD** 2002 Leptin: roles and regulation in primate pregnancy. *Semin Reprod Med* 20:113-122
287. **Henson MC, Castracane VD** 2000 Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* 63:1219-1228
288. **Bajoria R, Sooranna SR, Ward BS, Chatterjee R** 2002 Prospective function of placental leptin at maternal-fetal interface. *Placenta* 23:103-115
289. **Domali E, Messinis IE** 2002 Leptin in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 12:222-230
290. **Lepercq J, Challier JC, Guerre-Millo M, Cauzac M, Vidal H, Hauguel-de Mouzon S** 2001 Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2409-2413
291. **Yura S, Sagawa N, Mise H, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y, Nakao K** 1998 A positive umbilical venous-arterial difference of leptin level and its rapid decline after birth. *Am J Obstet Gynecol* 178:926-930
292. **Henson MC, Swan KF, O'Neil JS** 1998 Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol* 92:1020-1028

293. **Kawai M, Yamaguchi M, Murakami T, Shima K, Murata Y, Kishi K** 1997 The placenta is not the main source of leptin production in pregnant rat: gestational profile of leptin in plasma and adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 240:798-802
294. **Chien EK, Hara M, Rouard M, Yano H, Phillippe M, Polonsky KS, Bell GI** 1997 Increase in serum leptin and uterine leptin receptor messenger RNA levels during pregnancy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 237:476-480
295. **Tomimatsu T, Yamaguchi M, Murakami T, Ogura K, Sakata M, Mitsuda N, Kanzaki T, Kurachi H, Irahara M, Miyake A, Shima K, Aono T, Murata Y** 1997 Increase of mouse leptin production by adipose tissue after midpregnancy: gestational profile of serum leptin concentration. *Biochem Biophys Res Commun* 240:213-215
296. **Henson MC, Castracane VD, O'Neil JS, Gimpel T, Swan KF, Green AE, Shi W** 1999 Serum leptin concentrations and expression of leptin transcripts in placental trophoblast with advancing baboon pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2543-2549
297. **Castracane VD, Hendrickx AG, Henson MC** 2005 Serum leptin in nonpregnant and pregnant women and in old and new world nonhuman primates. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:251-254
298. **Wang C, Medan MS, Shimizu K, Kojima C, Itoh M, Watanabe G, Taya K** 2005 Secretion of leptin throughout pregnancy and early postpartum period in Japanese monkeys: placenta as another potential source of leptin. *Endocrine* 27:75-81
299. **Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister LA** 1998 Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. *Life Sci* 63:1387-1395
300. **Garcia MD, Casanueva FF, Dieguez C, Senaris RM** 2000 Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 62:698-703
301. **Hoggard N, Hunter L, Lea RG, Trayhurn P, Mercer JG** 2000 Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta. *Br J Nutr* 83:317-326
302. **Zhao J, Kunz TH, Tumba N, Schulz LC, Li C, Reeves M, Widmaier EP** 2003 Comparative analysis of expression and secretion of placental leptin in mammals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R438-446
303. **Henson MC CV** 2003 Leptin in primate pregnancy. . In: Henson MC, Castracane VD, (eds), *Leptin and Reproduction* New York: Kluwer Academic Press/Plenum Press Publishers:239- 263.
304. **Huang L, Wang Z, Li C** 2001 Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 276:6343-6349
305. **Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J** 2001 Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283:982-988
306. **Schulz S, Hackel C, Weise W** 2000 Hormonal regulation of neonatal weight: placental leptin and leptin receptors. *BJOG* 107:1486-1491

307. **Ashworth CJ, Hoggard N, Thomas L, Mercer JG, Wallace JM, Lea RG** 2000 Placental leptin. *Rev Reprod* 5:18-24
308. **Cameo P, Bischof P, Calvo JC** 2003 Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture. *Biol Reprod* 68:472-477
309. **Islami D, Bischof P, Chardonens D** 2003 Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110:169-175
310. **Lappas M, Permezel M, Rice GE** 2005 Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology* 146:3334-3342
311. **Coya R, Gualillo O, Pineda J, Garcia MC, Busturia MA, Aniel-Quiroga A, Martul P, Senaris RM** 2001 Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast. *Biol Reprod* 65:814-819
312. **Gonzalez RR, Caballero-Campo P, Jasper M, Mercader A, Devoto L, Pellicer A, Simon C** 2000 Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4883-4888
313. **Craig JA, Zhu H, Dyce PW, Wen L, Li J** 2005 Leptin enhances porcine preimplantation embryo development in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 229:141-147
314. **Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Murata M, Tanaka T** 2003 The role of leptin during the development of mouse preimplantation embryos. *Mol Cell Endocrinol* 202:185-189
315. **Gonzalez RR, Devoto L, Campana A, Bischof P** 2001 Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases. *Endocrine* 15:157-164
316. **Dominguez F, Pellicer A, Simon C** 2002 Paracrine dialogue in implantation. *Mol Cell Endocrinol* 186:175-181
317. **Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF** 2005 Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod* 73:737-744
318. **Cervero A, Horcajadas JA, Dominguez F, Pellicer A, Simon C** 2005 Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reprod Biomed Online* 10:217-223
319. **Yoon SJ, Cha KY, Lee KA** 2005 Leptin receptors are down-regulated in uterine implantation sites compared to interimplantation sites. *Mol Cell Endocrinol* 232:27-35
320. **Ramos MP, Rueda BR, Leavis PC, Gonzalez RR** 2005 Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. *Endocrinology* 146:694-701
321. **Christou H, Connors JM, Ziotopoulou M, Hatzidakis V, Papathanassoglou E, Ringer SA, Mantzoros CS** 2001 Cord blood leptin and insulin-like growth factor

- levels are independent predictors of fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 86:935-938
322. **Hoggard N, Haggarty P, Thomas L, Lea RG** 2001 Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans* 29:57-63
 323. **Malik NM, Carter ND, Murray JF, Scaramuzzi RJ, Wilson CA, Stock MJ** 2001 Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. *Endocrinology* 142:5198-5202
 324. **Smith JT, Waddell BJ** 2003 Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. *Endocrinology* 144:3024-3030
 325. **Wyrwoll CS, Mark PJ, Waddell BJ** 2005 Directional secretion and transport of leptin and expression of leptin receptor isoforms in human placental BeWo cells. *Mol Cell Endocrinol* 241:73-79
 326. **Islami D, Bischof P, Chardonens D** 2003 Modulation of placental vascular endothelial growth factor by leptin and hCG. *Mol Hum Reprod* 9:395-398
 327. **Torday JS, Rehan VK** 2002 Stretch-stimulated surfactant synthesis is coordinated by the paracrine actions of PTHrP and leptin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L130-135
 328. **Provost PR, Blomquist CH, Drolet R, Flamand N, Tremblay Y** 2002 Androgen inactivation in human lung fibroblasts: variations in levels of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 5 alpha-reductase activity compatible with androgen inactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3883-3892
 329. **Casabiell X, Pineiro V, Vega F, De La Cruz LF, Dieguez C, Casanueva FF** 2001 Leptin, reproduction and sex steroids. *Pituitary* 4:93-99
 330. **Morash BA, Ur E, Wilkinson M** 2001 Pituitary leptin gene expression is reduced by neonatal androgenization of female rats. *Pituitary* 4:63-70
 331. **Budge H, Mostyn A, Wilson V, Khong A, Walker AM, Symonds ME, Stephenson T** 2002 The effect of maternal prolactin infusion during pregnancy on fetal adipose tissue development. *J Endocrinol* 174:427-433
 332. **Ogueh O, Sooranna S, Nicolaidis KH, Johnson MR** 2000 The relationship between leptin concentration and bone metabolism in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1997-1999
 333. **Challier J, Galtier M, Bintein T, Cortez A, Lepercq J, Hauguel-de Mouzon S** 2003 Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta* 24:92-99
 334. **Linnemann K, Malek A, Sager R, Blum WF, Schneider H, Fusch C** 2000 Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4298-4301
 335. **Jansson N, Greenwood SL, Johansson BR, Powell TL, Jansson T** 2003 Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1205-1211
 336. **Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD** 1996 Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 271:3971-3974
 337. **Melzner I, Scott V, Dorsch K, Fischer P, Wabitsch M, Bruderlein S, Hasel C, Moller P** 2002 Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *J Biol Chem* 277:45420-45427

338. **Ebihara K, Ogawa Y, Isse N, Mori K, Tamura N, Masuzaki H, Kohno K, Yura S, Hosoda K, Sagawa N, Nakao K** 1997 Identification of the human leptin 5'-flanking sequences involved in the trophoblast-specific transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 241:658-663
339. **Bi S, Gavrilova O, Gong DW, Mason MM, Reitman M** 1997 Identification of a placental enhancer for the human leptin gene. *J Biol Chem* 272:30583-30588
340. **Reitman ML, Bi S, Marcus-Samuels B, Gavrilova O** 2001 Leptin and its role in pregnancy and fetal development--an overview. *Biochem Soc Trans* 29:68-72
341. **Meibner** 2003 Synergistic effects of hypoxia and insulin are regulated by different transcriptional elements of the human leptin promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303:707-712
342. **Considine RV, Nyce MR, Kolaczynski JW, Zhang PL, Ohannesian JP, Moore JH, Jr., Fox JW, Caro JF** 1997 Dexamethasone stimulates leptin release from human adipocytes: unexpected inhibition by insulin. *J Cell Biochem* 65:254-258
343. **Burton PJ, Waddell BJ** 1999 Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol Reprod* 60:234-240
344. **Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ** 2001 Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol* 145:529-539
345. **Yura S, Sagawa N, Ogawa Y, Masuzaki H, Mise H, Matsumoto T, Ebihara K, Fujii S, Nakao K** 1998 Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3609-3614
346. **Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J, Hauguel-de Mouzon S** 1998 Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin. *Diabetes* 47:847-850
347. **Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigmann MR, Flores-Riveros J** 2002 Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 277:34601-34609
348. **Everett RB, MacDonald PC** 1979 Endocrinology of the placenta. *Annu Rev Med* 30:473-488
349. **O'Neil JS, Burow ME, Green AE, McLachlan JA, Henson MC** 2001 Effects of estrogen on leptin gene promoter activation in MCF-7 breast cancer and JEG-3 choriocarcinoma cells: selective regulation via estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Endocrinol* 176:67-75
350. **Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S** 2000 Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 275:5379-5387
351. **Zou Y, Steurer W, Klima G, Obrist P, Margreiter R, Brandacher G** 2002 Estradiol enhances murine cardiac allograft rejection under cyclosporin and can be antagonized by the antiestrogen tamoxifen. *Transplantation* 74:354-357

352. **Apostolova G, Schweizer RA, Balazs Z, Kostadinova RM, Odermatt A** 2005 Dehydroepiandrosterone inhibits the amplification of glucocorticoid action in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E957-964
353. **Islami D, Chardonens D, Campana A, Bischof P** 2001 Comparison of the effects of GnRH-I and GnRH-II on HCG synthesis and secretion by first trimester trophoblast. *Mol Hum Reprod* 7:3-9
354. **Filicori M, Fazleabas AT, Huhtaniemi I, Licht P, Rao Ch V, Tesarik J, Zygmunt M** 2005 Novel concepts of human chorionic gonadotropin: reproductive system interactions and potential in the management of infertility. *Fertil Steril* 84:275-284
355. **Rao CV** 2001 An overview of the past, present, and future of nongonadal LH/hCG actions in reproductive biology and medicine. *Semin Reprod Med* 19:7-17
356. **Tsampalas M, Gridelet V, Berndt S, Foidart JM, Geenen V, Perrier d'Hauterive S** Human chorionic gonadotropin: a hormone with immunological and angiogenic properties. *J Reprod Immunol* 85:93-98
357. **Dufau ML** 1998 The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* 60:461-496
358. **Segaloff DL, Ascoli M** 1993 The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later. *Endocr Rev* 14:324-347
359. **Ryu KS, Gilchrist RL, Koo YB, Ji I, Ji TH** 1998 Gene, interaction, signal generation, signal divergence and signal transduction of the LH/CG receptor. *Int J Gynaecol Obstet* 60 Suppl 1:S9-20
360. **Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knofler M** 2008 Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology* 149:979-987
361. **Magarinos MP, Sanchez-Margalet V, Kotler M, Calvo JC, Varone CL** 2007 Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biol Reprod* 76:203-210
362. **Pidoux G, Gerbaud P, Tsatsaris V, Marpeau O, Ferreira F, Meduri G, Guibourdenche J, Badet J, Evain-Brion D, Frenedo JL** 2007 Biochemical characterization and modulation of LH/CG-receptor during human trophoblast differentiation. *J Cell Physiol* 212:26-35
363. **Coya R, Martul P, Algorta J, Aniel-Quiroga MA, Busturia MA, Senaris R** 2006 Effect of leptin on the regulation of placental hormone secretion in cultured human placental cells. *Gynecol Endocrinol* 22:620-626
364. **Yang M, Lei ZM, Rao Ch V** 2003 The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144:1108-1120
365. **Srisuparp S, Strakova Z, Brudney A, Mukherjee S, Reierstad S, Hunzicker-Dunn M, Fazleabas AT** 2003 Signal transduction pathways activated by chorionic gonadotropin in the primate endometrial epithelial cells. *Biol Reprod* 68:457-464
366. **Salvador LM, Maizels E, Hales DB, Miyamoto E, Yamamoto H, Hunzicker-Dunn M** 2002 Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143:2986-2994
367. **Carvalho CR, Carnevalheira JB, Lima MH, Zimmerman SF, Caperuto LC, Amanso A, Gasparetti AL, Meneghetti V, Zimmerman LF, Velloso LA, Saad MJ** 2003 Novel signal transduction pathway for luteinizing hormone and its interaction with insulin: activation of Janus kinase/signal transducer and activator of

- transcription and phosphoinositol 3-kinase/Akt pathways. *Endocrinology* 144:638-647
368. **Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R** 2002 Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol* 187:69-74
369. **Pierce KL, Lefkowitz RJ** 2001 Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2:727-733
370. **Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D, Wildt L** 2007 Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol* 269:85-92
371. **Feinman MA, Kliman HJ, Caltabiano S, Strauss JF, 3rd** 1986 8-Bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1211-1217
372. **Szkudelski T, Nowicka E, Szkudelska K** 2005 Leptin secretion and protein kinase A activity. *Physiol Res* 54:79-85
373. **Renstrom E, Eliasson L, Rorsman P** 1997 Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 502 (Pt 1):105-118
374. **Cass LA, Summers SA, Prendergast GV, Backer JM, Birnbaum MJ, Meinkoth JL** 1999 Protein kinase A-dependent and -independent signaling pathways contribute to cyclic AMP-stimulated proliferation. *Mol Cell Biol* 19:5882-5891
375. **Staples KJ, Bergmann M, Tomita K, Houslay MD, McPhee I, Barnes PJ, Giembycz MA, Newton R** 2001 Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-dependent inhibition of IL-5 from human T lymphocytes is not mediated by the cAMP-dependent protein kinase A. *J Immunol* 167:2074-2080
376. **Strauss JF, 3rd, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N, Gafvels ME** 1992 The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta* 13:389-403
377. **Li AW, Morash B, Hollenberg AN, Ur E, Wilkinson M, Murphy PR** 2001 Transcriptional regulation of the leptin gene promoter in rat GH3 pituitary and C6 glioma cells. *Mol Cell Endocrinol* 176:57-65
378. **Morash B, Johnstone J, Leopold C, Li A, Murphy P, Ur E, Wilkinson M** 2000 The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line. *Mol Cell Endocrinol* 165:97-105
379. **Pertseva MN, Shpakov AO** 2002 [Conservatism of the insulin signal system in the evolution of vertebrate and invertebrate animals]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 38:430-441
380. **Hei YJ** 1998 Recent progress in insulin signal transduction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 40:123-135
381. **Martinez-deMena R, Obregon MJ** 2005 Insulin increases the adrenergic stimulation of 5' deiodinase activity and mRNA expression in rat brown adipocytes; role of MAPK and PI3K. *J Mol Endocrinol* 34:139-151
382. **Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs MR, Auwerx J** 1996 The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5507-5511
383. **Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF** 1988 Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242:1430-1433

384. **Gonzalez GA, Montminy MR** 1989 Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59:675-680
385. **Mukherjee A, Park-Sarge OK, Mayo KE** 1996 Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 137:3234-3245
386. **Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U** 2008 Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: comradeship and hostility. *Cell Signal* 20:1592-1607
387. **Houslay MD** 2006 A RSK(y) relationship with promiscuous PKA. *Sci STKE* 2006:pe32
388. **Houslay MD, Kolch W** 2000 Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 58:659-668
389. **Stork PJ, Schmitt JM** 2002 Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12:258-266
390. **Bornfeldt KE, Krebs EG** 1999 Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. *Cell Signal* 11:465-477
391. **Shaywitz AJ, Greenberg ME** 1999 CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861
392. **Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM** 1998 A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282:2275-2279
393. **Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL** 1993 A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260:315-319
394. **Bos JL** 2006 Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* 31:680-686
395. **Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA, Holz GG** 2006 cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* 573:595-609
396. **Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M** 2008 Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377:345-357
397. **Fitzgerald JS, Busch S, Wengenmayer T, Foerster K, de la Motte T, Poehlmann TG, Markert UR** 2005 Signal transduction in trophoblast invasion. *Chem Immunol Allergy* 88:181-199
398. **Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M, Enomoto N, Iijima K, Kitamura T, Takei Y, Sato N** 2004 Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1091-1095
399. **Misztal-Dethloff B, Stepien H, Komorowski J** 2004 Effect of leptin on proliferative activity and vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from cultured endothelial cells HECa10 in vitro. *Endocr Regul* 38:161-166
400. **Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V** 2000 Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 199:15-24

401. **Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V** 1999 Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194:6-11
402. **Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ** 1996 Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14564-14568
403. **Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG** 2004 Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5439-5447
404. **Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA** 2004 Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *Faseb J* 18:1612-1614
405. **Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G** 2005 The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 122:803-815
406. **Conus S, Bruno A, Simon HU** 2005 Leptin is an eosinophil survival factor. *J Allergy Clin Immunol* 116:1228-1234
407. **Artwohl M, Roden M, Holzenbein T, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer SM** 2002 Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:577-580
408. **Gordeladze JO, Reseland JE** 2003 A unified model for the action of leptin on bone turnover. *J Cell Biochem* 88:706-712
409. **Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA** 2004 Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 145:4103-4112
410. **Garris DR** 2005 Ovarian follicular lipoapoptosis: structural, cytochemical and metabolic basis of reproductive tract atrophy following expression of the hypogonadal diabetes (db/db) syndrome. *Reprod Toxicol* 20:31-38
411. **Perez-Perez A, Maymo J, Gambino Y, Duenas JL, Goberna R, Varone C, Sanchez-Margalet V** 2009 Leptin stimulates protein synthesis-activating translation machinery in human trophoblastic cells. *Biol Reprod* 81:826-832
412. **Meissner U, Spranger R, Lehner M, Allabauer I, Rascher W, Dotsch J** 2005 Hypoxia-induced leptin production in human trophoblasts does not protect from apoptosis. *Eur J Endocrinol* 153:455-461
413. **Grosfeld A, Turban S, Andre J, Cauzac M, Challier JC, Hauguel-de Mouzon S, Guerre-Millo M** 2001 Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. *FEBS Lett* 502:122-126
414. **Pollheimer J, Knofler M** 2005 Signalling pathways regulating the invasive differentiation of human trophoblasts: a review. *Placenta* 26 Suppl A:S21-30
415. **Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C** 2003 Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 133:11-19
416. **Sahu A** 2003 Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24:225-253
417. **Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y** 1997 Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 241:765-768

418. **Takahashi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahashi T, Kaji H, Abe H, Chihara K** 1997 Leptin induces mitogen-activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 272:12897-12900
419. **Li RH, Yu MM, Cheung AN, Wong YF** 2004 Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol* 95:299-306
420. **Singh HJ, Abu Bakar A, Che Romli A, Nila A** 2005 Raised leptin concentrations in fetoplacental tissues from women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 24:191-199
421. **Teppa RJ, Ness RB, Crombleholme WR, Roberts JM** 2000 Free leptin is increased in normal pregnancy and further increased in preeclampsia. *Metabolism* 49:1043-1048
422. **Laivuori H, Kaaja R, Koistinen H, Karonen SL, Andersson S, Koivisto V, Ylikorkala O** 2000 Leptin during and after preeclamptic or normal pregnancy: its relation to serum insulin and insulin sensitivity. *Metabolism* 49:259-263
423. **Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K** 1998 Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3225-3229
424. **Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S** 2003 Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 52:2951-2958
425. **Manderson JG, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI, Leslie H, McCance DR** 2003 Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 188:1326-1332
426. **Cetin I, Morpurgo PS, Radaelli T, Taricco E, Cortelazzi D, Bellotti M, Pardi G, Beck-Peccoz P** 2000 Fetal plasma leptin concentrations: relationship with different intrauterine growth patterns from 19 weeks to term. *Pediatr Res* 48:646-651
427. **Geary M, Pringle PJ, Persaud M, Wilshin J, Hindmarsh PC, Rodeck CH, Brook CG** 1999 Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. *Br J Obstet Gynaecol* 106:1054-1060
428. **Koistinen HA, Koivisto VA, Andersson S, Karonen SL, Kontula K, Oksanen L, Teramo KA** 1997 Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3328-3330
429. **Varvarigou A, Mantzoros CS, Beratis NG** 1999 Cord blood leptin concentrations in relation to intrauterine growth. *Clin Endocrinol (Oxf)* 50:177-183
430. **Lea RG, Howe D, Hannah LT, Bonneau O, Hunter L, Hoggard N** 2000 Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod* 6:763-769
431. **McCarthy C, Cotter FE, McElwaine S, Twomey A, Mooney EE, Ryan F, Vaughan J** 2007 Altered gene expression patterns in intrauterine growth restriction: potential role of hypoxia. *Am J Obstet Gynecol* 196:70 e71-76
432. **McMinn J, Wei M, Schupf N, Cusmai J, Johnson EB, Smith AC, Weksberg R, Thaker HM, Tycko B** 2006 Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* 27:540-549

433. **Tzschoppe AA, Struwe E, Dorr HG, Goecke TW, Beckmann MW, Schild RL, Dotsch J** Differences in gene expression dependent on sampling site in placental tissue of fetuses with intrauterine growth restriction. *Placenta* 31:178-185
434. **Kyriakakou M, Malamitsi-Puchner A, Militsi H, Boutsikou T, Margeli A, Hassiakos D, Kanaka-Gantenbein C, Papassotiriou I, Mastorakos G** 2008 Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers. *Eur J Endocrinol* 158:343-348
435. **Redman CW** 1991 Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12:301-308
436. **Davis LG DM, Battey JF.** ed. 1986 *Basic Methods in Molecular Biology*. New York
437. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
438. **Laemmli UK** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
439. **Livak KJ, Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
440. **Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM** 1996 Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14:95-97
441. **Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG, Jr.** 2002 Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem* 277:41547-41555
442. **Corvinus FM, Fitzgerald JS, Friedrich K, Markert UR** 2003 Evidence for a correlation between trophoblast invasiveness and STAT3 activity. *Am J Reprod Immunol* 50:316-321
443. **Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y** 1999 Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 256:480-484
444. **Gonzalez RR, Simon C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonens D, Devoto L, Bischof P** 2000 Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update* 6:290-300
445. **Wang Y, Kuropatwinski KK, White DW, Hawley TS, Hawley RG, Tartaglia LA, Baumann H** 1997 Leptin receptor action in hepatic cells. *J Biol Chem* 272:16216-16223
446. **Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Haring HU** 1997 Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia* 40:1358-1362
447. **Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA** 1995 Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789
448. **Pullen N, Thomas G** 1997 The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* 410:78-82

449. **Bruno A, Conus S, Schmid I, Simon HU** 2005 Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils. *J Immunol* 174:8090-8096
450. **Proud CG, Denton RM** 1997 Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *Biochem J* 328 (Pt 2):329-341
451. **Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC, Jr.** 1994 PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 266:653-656
452. **Kleijn M, Scheper GC, Voorma HO, Thomas AA** 1998 Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur J Biochem* 253:531-544
453. **von Versen-Hoynck F, Rajakumar A, Parrott MS, Powers RW** 2009 Leptin affects system A amino acid transport activity in the human placenta: evidence for STAT3 dependent mechanisms. *Placenta* 30:361-367
454. **Perez-Perez A, Gambino Y, Maymo J, Goberna R, Fabiani F, Varone C, Sanchez-Margalet V** MAPK and PI3K activities are required for leptin stimulation of protein synthesis in human trophoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 396:956-960
455. **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** 1999 Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities. *Blood* 93:1668-1676
456. **Bae SN, Kim J, Lee YS, Kim JD, Kim MY, Park LO** 2007 Cytotoxic effect of zinc-citrate compound on choriocarcinoma cell lines. *Placenta* 28:22-30
457. **Gullicksen PS, Hausman DB, Dean RG, Hartzell DL, Baile CA** 2003 Adipose tissue cellularity and apoptosis after intracerebroventricular injections of leptin and 21 days of recovery in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:302-312
458. **Chen C, Chang YC, Liu CL, Liu TP, Chang KJ, Guo IC** 2007 Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocr Relat Cancer* 14:513-529
459. **Iwagaki S, Yokoyama Y, Tang L, Takahashi Y, Nakagawa Y, Tamaya T** 2004 Augmentation of leptin and hypoxia-inducible factor 1alpha mRNAs in the pre-eclamptic placenta. *Gynecol Endocrinol* 18:263-268
460. **Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U** 1998 Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta* 19:587-593
461. **Rebut-Bonneton C, Segond N, Demignon J, Porquet D, Evain-Brion D** 1992 Effects of calcitonin on human trophoblastic cells in culture: absence of autocrine control. *Mol Cell Endocrinol* 85:65-71
462. **Standley PR, Standley CA** 2002 Identification of a functional Na⁺/Mg²⁺ exchanger in human trophoblast cells. *Am J Hypertens* 15:565-570
463. **Conti M, Harwood JP, Hsueh AJ, Dufau ML, Catt KJ** 1976 Gonadotropin-induced loss of hormone receptors and desensitization of adenylate cyclase in the ovary. *J Biol Chem* 251:7729-7731
464. **Pall M, Hellberg P, Brannstrom M, Mikuni M, Peterson CM, Sundfeldt K, Norden B, Hedin L, Enerback S** 1997 The transcription factor C/EBP-beta and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process. *EMBO J* 16:5273-5279

465. **Nalbant D, Williams SC, Stocco DM, Khan SA** 1998 Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Endocrinology* 139:272-279
466. **Dos Santos E, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R, Serazin V, Giudicelli Y** 2007 In vitro effects of chorionic gonadotropin hormone on human adipose development. *J Endocrinol* 194:313-325
467. **LaVoie HA** 2003 The role of GATA in mammalian reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)* 228:1282-1290
468. **Demers LM, Gabbe SG, Villee CA, Greep RO** 1973 Human chorionic gonadotropin-mediated glycogenolysis in human placental villi: a role of prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 313:202-210
469. **Menon KM, Jaffe RB** 1973 Chorionic gonadotropin sensitive adenylate cyclase in human term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 36:1104-1109
470. **Menon KM, Munshi UM, Clouser CL, Nair AK** 2004 Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol Reprod* 70:861-866
471. **Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao CV, Merz WE** 1993 Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta. *Endocrinology* 133:3014-3025
472. **Hunzicker-Dunn M, Maizels ET** 2006 FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 18:1351-1359
473. **Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Jr., Plant TM** 2006 Continuous human metastatin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 147:2122-2126
474. **Wang H, Segaloff DL, Ascoli M** 1991 Lutropin/choriogonadotropin down-regulates its receptor by both receptor-mediated endocytosis and a cAMP-dependent reduction in receptor mRNA. *J Biol Chem* 266:780-785
475. **Cameo P, Srisuparp S, Strakova Z, Fazleabas AT** 2004 Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate. *Reprod Biol Endocrinol* 2:50
476. **Cameron MR, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J** 1996 Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 55:111-119
477. **Faure M, Voyno-Yasenetskaya TA, Bourne HR** 1994 cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 269:7851-7854
478. **Palaniappan M, Menon KM** Human chorionic gonadotropin stimulates theca-interstitial cell proliferation and cell cycle regulatory proteins by a cAMP-dependent activation of AKT/mTORC1 signaling pathway. *Mol Endocrinol* 24:1782-1793
479. **Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM** 2006 cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J Mol Endocrinol* 37:81-95
480. **Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS** 2000 Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk):

- evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14:1283-1300
481. **Lima MH, Souza LC, Caperuto LC, Bevilacqua E, Gasparetti AL, Zanuto R, Saad MJ, Carvalho CR** 2006 Up-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in the ovary of rats by chronic treatment with hCG and insulin. *J Endocrinol* 190:451-459
 482. **Butte NF, Hopkinson JM, Nicolson MA** 1997 Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. *J Clin Endocrinol Metab* 82:585-589
 483. **Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A** 2001 Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 12:65-72
 484. **Szkudelski T** 2007 Intracellular mediators in regulation of leptin secretion from adipocytes. *Physiol Res* 56:503-512
 485. **Isse N, Ogawa Y, Tamura N, Masuzaki H, Mori K, Okazaki T, Satoh N, Shigemoto M, Yoshimasa Y, Nishi S, et al.** 1995 Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 270:27728-27733
 486. **Houge G, Vintermyr OK, Doskeland SO** 1990 The expression of cAMP-dependent protein kinase subunits in primary rat hepatocyte cultures. Cyclic AMP down-regulates its own effector system by decreasing the amount of catalytic subunit and increasing the mRNAs for the inhibitory (R) subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* 4:481-488
 487. **Bayatti N, Zschocke J, Behl C** 2003 Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology* 144:4051-4060
 488. **Adler GK, Smas CM, Fiandaca M, Frim DM, Majzoub JA** 1990 Regulated expression of the human corticotropin releasing hormone gene by cyclic AMP. *Mol Cell Endocrinol* 70:165-174
 489. **Pende M, Fisher TL, Simpson PB, Russell JT, Blenis J, Gallo V** 1997 Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *J Neurosci* 17:1291-1301
 490. **Scatena CD, Adler S** 1996 Trans-acting factors dictate the species-specific placental expression of corticotropin-releasing factor genes in choriocarcinoma cell lines. *Endocrinology* 137:3000-3008
 491. **Van LP** 1993 Phorbol ester stimulates the activity of human corticotropin-releasing hormone gene promoter via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element in transiently transfected chicken macrophages. *Endocrinology* 132:30-34
 492. **Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H** 1996 Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 45:1435-1438
 493. **Bradley RL, Cheatham B** 1999 Regulation of ob gene expression and leptin secretion by insulin and dexamethasone in rat adipocytes. *Diabetes* 48:272-278
 494. **Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H** 1990 Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-

- isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265:5267-5272
495. **Vossler MR, Yao H, York RD, Pan MG, Rim CS, Stork PJ** 1997 cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89:73-82
496. **Grewal SS, Horgan AM, York RD, Withers GS, Banker GA, Stork PJ** 2000 Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275:3722-3728
497. **Busca R, Abbe P, Mantoux F, Aberdam E, Peyssonnaud C, Eyche A, Ortonne JP, Ballotti R** 2000 Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J* 19:2900-2910
498. **Sevetson BR, Kong X, Lawrence JC, Jr.** 1993 Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10305-10309
499. **Osinski MT, Schror K** 2000 Inhibition of platelet-derived growth factor-induced mitogenesis by phosphodiesterase 3 inhibitors: role of protein kinase A in vascular smooth muscle cell mitogenesis. *Biochem Pharmacol* 60:381-387
500. **Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, Niwa H, Miyazaki J, Hamaoka T, Ogata M** 2003 Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells* 8:847-856
501. **Yoshie M, Kaneyama K, Kusama K, Higuma C, Nishi H, Isaka K, Tamura K** Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Hum Reprod* 25:2229-2238
502. **de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL** 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396:474-477
503. **Ponsioen B, Gloerich M, Ritsma L, Rehmann H, Bos JL, Jalink K** 2009 Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 29:2521-2531
504. **Petersen RK, Madsen L, Pedersen LM, Hallenborg P, Hagland H, Viste K, Doskeland SO, Kristiansen K** 2008 Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* 28:3804-3816
505. **Ster J, De Bock F, Guerineau NC, Janossy A, Barrere-Lemaire S, Bos JL, Bockaert J, Fagni L** 2007 Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:2519-2524
506. **Kolch W** 2000 Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2:289-305
507. **Sanchez-Margalet V, Goldfine ID, Vlahos CJ, Sung CK** 1994 Role of phosphatidylinositol-3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002. *Biochem Biophys Res Commun* 204:446-452